



HAL
open science

Immunciblage bioorthogonal de nanoparticules radiosensibilisantes pour une application en radiothérapie externe

Ludivine Taiariol

► **To cite this version:**

Ludivine Taiariol. Immunciblage bioorthogonal de nanoparticules radiosensibilisantes pour une application en radiothérapie externe. Chimie organique. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2019. Français. NNT : 2019CLFAS024 . tel-03920271

HAL Id: tel-03920271

<https://theses.hal.science/tel-03920271>

Submitted on 3 Jan 2023

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.

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

Thèse

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Chimie organique, minérale, industrielle

Par **TAIARIOL Ludivine**

**Immunociblage bioorthogonal de nanoparticules radiosensibilisantes
pour une application en radiothérapie externe**

Soutenue publiquement le « 19 Décembre 2019 », devant la commission d'examen.

Rapporteurs : Dr. GENIN E., Maître de Conférences à l'Université de Bordeaux, Talence
Pr. ROUX S., Professeur à l'Université de Franche-Comté, Besançon

Examineurs : Dr. DEGOUL F., Chargé de recherche à l'INSERM, UMR 1240 Clermont-Ferrand
Pr. GAUMET V., Professeur à l'Université Clermont-Auvergne, Clermont-Ferrand

Directeurs de thèse : Dr. CHAIX C., Directeur de recherche à l'Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, Villeurbanne
Dr. MOREAU E., Maître de Conférences à l'Université Clermont-Auvergne, Clermont-Ferrand

Laboratoires : UMR INSERM/UCA 1240
« Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques »
58, rue Montalembert, BP 184, 63005 Clermont-Ferrand Cedex

Institut des Sciences Analytiques (ISA)
UMR 5280, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne

*« Se donner du mal pour les petites choses,
c'est parvenir aux grandes, avec le temps »*

Samuel Beckett

« Ils ne savaient pas que c'était impossible alors ils l'ont fait »

Mark Twain

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement le D^r Emilie Genin et le P^r Stéphane Roux pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ces travaux et d'en être les rapporteurs. Je remercie également le D^r Françoise Degoul et le P^r Vincent Gaumet d'avoir accepté d'être examinateurs.

Je ne pourrai continuer mes remerciements sans les adresser à mes directeurs de thèse, le D^r Carole Chaix et le Dr Emmanuel Moreau pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse et de m'avoir encadré. Je ne saurais jamais assez les remercier pour la confiance qu'ils m'ont témoigné, pour tout le savoir scientifique qu'ils m'ont transmis, pour tous les échanges que nous avons eu qui ont été le fruit de précieux conseils qui m'ont permis d'avancer et de mener à bien ces trois années de thèse. Je garderai toujours à l'esprit vos grandes qualités humaines ainsi que le soutien sans lequel je n'aurai pu mener à bien ces travaux.

Je tiens également à remercier l'équipe « Interfaces et Biocapteurs » de l'Institut des Sciences Analytiques de m'avoir accueillie lors de mes séjours sur Lyon. Cette collaboration a été l'occasion de rencontrer et d'échanger avec de nombreuses personnes sur le « fabuleux monde » des nanoparticules jusqu'ici inconnu pour moi. Je tiens à remercier Gabriel De Crozals pour m'avoir initié et formé sur les nanoparticules dès le début de cette thèse. Il est aussi indispensable que je remercie Carole Farre pour son aide dans ce domaine, pour avoir été toujours disponible, ses encouragements et ses nombreux conseils ont été particulièrement précieux pour moi dans les moments où les manipulations ne fonctionnaient pas. Ça a été un réel plaisir de travailler à tes côtés. Je souhaite également remercier Agnès Hagège pour avoir eu la gentillesse de réaliser les analyses ICP-MS sur les complexes de gadolinium qui ont permis de mieux caractériser les nanoparticules.

Ce travail est aussi le fruit de collaborations avec les biologistes, un grand merci à Mme Sophie Besse pour avoir réalisé les nombreuses études sur les anticorps et les nanoparticules et d'avoir pris le temps de m'initier à la cytométrie en flux ainsi qu'à la préparation des échantillons pour la microscopie confocale. Je tiens également à remercier le D^r Françoise Degoul pour son implication dans ce projet et son expertise dans le domaine.

J'adresse aussi mes remerciements au D^r Nancy Ty pour m'avoir initié dès le début de ces travaux à la fonctionnalisation des anticorps, à leur analyse et à leur purification par chromatographie d'exclusion stérique.

Je souhaite aussi adresser mes remerciements au D^r Mercedes Quintana et à M^r Sébastien Tarit pour avoir réalisé les analyses MALDI-TOF sur les anticorps.

Je remercie également l'ensemble du personnel du laboratoire et notamment M^{me} Ariane Baufond et M^r Damien Canitrot pour leur bonne humeur et les bons moments à discuter.

Enfin, ces remerciements ne pourraient être complets sans mentionner le soutien de mes collègues doctorants ou maintenant anciens collègues doctorants. Je voudrais remercier Audrey pour sa gentillesse et son soutien particulier au début de cette thèse. Je souhaite aussi remercier Jean-Baptiste pour m'avoir consacré du temps à la fin de sa thèse pour me former à la synthèse photochimique.

Je tiens à remercier Axel avec qui j'ai partagé mon bureau quelques temps, j'ai apprécié ton aide et pouvoir échanger avec toi aussi bien en chimie qu'avec les nanoparticules. Merci pour les bons moments passés au laboratoire ou autour d'un verre après le travail.

Un grand merci aussi à Sébastien pour sa bonne humeur quotidienne au laboratoire et les moments passés à discuter ensemble.

De manière incontestable, cette thèse n'aurait pas pu être achevée sans le soutien et les encouragements de mes deux proches collègues toujours présents pour moi : Aurélie et Yvain. Aurélie, un énorme merci pour m'avoir formé sur les gels de polyacrylamide. Merci pour tous les bons moments passés ensemble, les pauses thé, le badminton et les supers soirées. Yvain (« la chimie c'est la vie »), j'ai aussi passé des supers moments en ta compagnie, ton grain de folie m'a toujours remonté le moral. Merci à tous les deux d'être toujours là.

Je remercie aussi du fond du cœur celle qui a toujours été présente pour moi depuis tant d'années, mon Estelle, tu es la seule qui connaisse tout de moi (« loin des yeux mais près du cœur »).

Enfin, je ne remercierai jamais assez mes proches et ma famille, j'ai une pensée toute particulière pour mon frère et mon conjoint, si cette thèse a abouti c'est bien grâce à leurs encouragements et leur soutien. Une énorme pensée pour ma maman qui veille tous les jours sur moi, cette thèse t'est entièrement dédiée.

Avant-propos

Ces travaux de recherches doctorales ont été effectués à la fois au sein de l'UMR IMoST 1240 de Clermont-Ferrand et l'UMR CNRS 5280 dans l'équipe « Interfaces et Biocapteurs » de Villeurbanne.

L'UMR 1240 IMoST (« Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques », INSERM/Université Clermont-Auvergne) dirigée par le Dr Elisabeth Miot-Noirault développe une approche focalisée principalement, mais de façon non exclusive, sur la mise au point de nouveaux radiopharmaceutiques. Ces molécules radiomarquées sont développées pour permettre le diagnostic par imagerie fonctionnelle de type Tomographie par Emission de Positons (TEP) ou Tomographie d'Emission Monophotonique (TEMP) de pathologies cancéreuses ou du cartilage. Ces molécules sont également utilisées à visée thérapeutique pour une application en radiothérapie vectorisée. Dans cette perspective, des vecteurs moléculaires présentant un fort tropisme pour un récepteur, une enzyme ou une protéine sont employés afin de servir de support pour adresser sélectivement un radioélément au niveau de la cible biologique d'intérêt. Une fois adressé au niveau de la cible, le radioélément émet des rayonnements (β^+ ou γ) permettant de localiser l'expression voire la surexpression protéique ou enzymatique impliquée dans la pathologie concernée ou bien des rayonnements β^- pour la thérapie du cancer.

L'UMR CNRS 5280 de Villeurbanne dirigée par le Dr Carole Chaix fait partie de l'axe Surfaces Interfaces Micro-Nano systèmes (SIMS) de l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) de Villeurbanne. Les thématiques de recherche de ce groupe sont dédiées à la conception de microsystèmes analytiques de type biocapteurs et de nanomatériaux fonctionnels pour notamment des applications médicales. Les compétences principales de ce groupe relèvent de la fonctionnalisation de surface de NP notamment par des biomolécules (ADN, ARN, peptides, protéines, AcM, enzymes...). Cette équipe a notamment développé une technologie innovante de fonctionnalisation de surface de NP qui a été brevetée par l'Université Lyon 1 et le CNRS (WO2013007944). Cette technologie permet d'élaborer des nanomatériaux hautement fonctionnalisés et de manière contrôlée possédant des propriétés multiples.

Soutiens

Cette thèse a bénéficié d'un financement ministériel de thèse, bourse MESR (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche), de l'EDSF (Ecole Doctorale des Sciences Fondamentales) de Clermont-Ferrand pour la période 2016-2019.

Ces travaux ont bénéficié du soutien du cancéropôle CLARA de la région Auvergne-Rhône-Alpes : « Immunociblage bioorthogonal de nanoparticules théranostiques » pour la période 2019/2020.

Liste des publications

Article soumis :

Jean-Baptiste Bequignat, Nancy Ty, Aurélie Rondon, **Ludivine Taiariol**, Françoise Degoul, Damien Canitrot, Mercedes Quintana, Isabelle Navarro-Teulon, Elisabeth Miot-Noirault, Claude Boucheix, Jean-Michel Chezal and Emmanuel Moreau. "*Optimization of IEDDA bioorthogonal system: efficient process to improve trans-cyclooctene/tetrazine interaction*". Soumise au journal *Molecular Pharmaceutics*.

Revue soumise :

Ludivine Taiariol, Carole Chaix, Carole Farre and Emmanuel Moreau. "*Click and bioorthogonal chemistry: the future of active targeting of nanoparticles for nanomedicines*". Soumise au journal *Chemical review*.

Liste des communications

Communication orale :

E-MRS (European Materials Research Society): du 19 au 22 juin 2018, Strasbourg (France):

*"Antibody functionalization for pretargeted imaging and radiotherapy
Nanotechnology for targeted personalized medicines and theranostics"*.

Ludivine Taiariol*, Aurélie Rondon*, Mercedes Quintana, Sophie Besse, Isabelle Navarro-Teulon, Claude Boucheix, Carole Chaix, Elisabeth Miot-Noirault, Jean-Michel Chezal, Françoise Degoul, Emmanuel Moreau et Nancy Ty.

* co-premier auteur

Animation scientifique :

Organisation des Journées de l'École Doctorale des Sciences Fondamentales. Le 12 juillet 2018.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
CHAPITRE 1. CONTEXTE BIOMEDICAL.....	7
I. Epidémiologie et statistiques du cancer.....	7
II. Les traitements du cancer.....	8
1. La chirurgie.....	9
1.1 Les NP et leurs applications en chirurgie	9
a. Les NP dans les outils chirurgicaux	9
b. Les NP pour la médecine régénérative	10
c. Les NP fluorescentes pour la chirurgie guidée par l'imagerie.....	11
2. La chimiothérapie	13
2.1 Les NP et leurs applications en chimiothérapie	14
a. Les liposomes.....	14
b. Les NP polymères	16
3. Les thérapies ciblées.....	18
3.1 Les anticorps monoclonaux (AcM)	19
3.2 Les petites molécules.....	21
3.3 Les NP et la thérapie ciblée	22
4. La radiothérapie	23
4.1 Généralités.....	24
4.2 Les rayonnements ionisants.....	25
a. Effets moléculaires des rayonnements ionisants sur la matière	25
i. Phase physique : interactions rayonnements-matière.....	25
• Rayonnements ionisants électromagnétiques (Photons X ou γ)	25
• Rayonnements ionisants particuliers	27
• Radionucléides pour la radiothérapie interne.....	30
ii. Phase chimique : mécanismes d'action sur les cellules	32
iii. Phase biologique : mécanismes de mort des cellules lésées	33
b. Facteurs influençant les effets biologiques des rayonnements ionisants	34
i. La radiosensibilité intrinsèque	34
ii. Le cycle cellulaire	34
iii. L'effet oxygène	34
iv. Les facteurs temps	34

4.3	La radiothérapie interne	35
a.	La curiethérapie.....	36
b.	La radiothérapie interne vectorisée (RIV)	36
c.	Les NP comme vecteurs en radiothérapie interne.....	38
4.4	La radiothérapie externe (RE)	39
4.5	Limite de la radiothérapie externe	41
5.	Alternative actuelle à l'amélioration de la radiothérapie : la radiosensibilisation.....	41
5.1	Molécules Dbait.....	41
5.2	Association Dbait/Inhibiteurs de PARP pour contourner la génétique des cellules tumorales.....	43
5.3	Inhibiteurs de l'ADN-PK	43
5.4	Inhibiteurs d'Histone Désacétylase (HDACi)	44
5.5	Les atomes lourds.....	45
a.	La NP NBTXR3 à base d'oxyde d'hafnium	47
b.	La NP AGuIX® à base de gadolinium	48
III.	Ce qu'il faut retenir	50
CHAPITRE 2. LES STRATEGIES DE CIBLAGE TUMORAL DES NP		51
I.	Le ciblage tumoral passif : l'effet EPR	51
1.	La biodistribution des NP par effet EPR	52
1.1	L'influence des paramètres physico-chimiques	52
a.	La taille et la forme.....	52
b.	Influence des propriétés de surface	53
II.	Le ciblage tumoral actif	54
III.	La chimie click et bioorthogonale dans le ciblage tumoral des NP	55
REVIEW.....		57
I.	Ce qu'il faut retenir	120
PARTIE 2. OBJECTIFS.....		121
PARTIE 3. RESULTATS ET DISCUSSION		127
CHAPITRE 1. CONCEPTION DES NP RADIOSENSIBILISANTES A BASE DE GADOLINIUM : NP-ADIBO/DOTA(GD)		129
I.	Synthèse supportée automatisée d'oligonucléotides appliquée à la fonctionnalisation de surface des NP de silice	129
II.	Synthèse supportée automatisée des NP-ADIBO/NH₂ par la chimie dite « aux phosphoramidites »	133

1. Préparation du support solide CPG-NP	133
1.1 Fonctionnalisation du support CPG (CPG-Q-linker)	133
1.2 Silanisation des NP (NP-TESPHU)	135
1.3 Greffage des NP sur le support CPG (CPG-NP)	136
2. Synthèse supportée automatisée des NP-ADIBO/NH₂	138
2.1 La chimie dite « aux phosphoramidites »	138
a. Nature des synthons phosphoramidites utilisés	139
b. Le cycle de synthèse	140
c. Caractérisations des NP-ADIBO/NH ₂	146
i. Décrochage et analyse des NP par DLS et MET	146
ii. Estimation du nombre de fonctions ADIBO par NP	149
iii. Estimation du nombre de fonctions NH ₂ par NP	152
III. Synthèse supportée des NP-ADIBO/DOA	154
1. Choix du précurseur chélatant macrocyclique DOA pour fonctionnaliser les NP-ADIBO/NH₂ via les fonctions amine primaire	154
1.1 Préparation du mDOA	154
1.2 Greffage des DOA via le DOA-NHS et le mDOA	155
1.3 Caractérisation des NP-ADIBO/DOA	156
a. Estimation du nombre de ligands DOA	156
b. Vérification de l'accessibilité des entités bioorthogonales ADIBO	159
c. Décrochage et analyse des NP par DLS et MET	161
1.4 Conclusion	163
2. Optimisation de la conception des NP-ADIBO/DOA pour rendre accessible les fonctions ADIBO	164
2.1 Greffage des DOA via le mDOA (1 éq. et 10 éq.)	164
2.2 Caractérisation des NP-ADIBO/DOA	165
a. Estimation du nombre de ligands DOA	165
b. Vérification de l'accessibilité des entités bioorthogonales ADIBO	166
c. Décrochage et analyse des NP par DLS et MET	166
2.3 Conclusion	168
IV. Synthèse des NP-ADIBO/DOA(Gd)	169
1. Complexation du gadolinium via les NP-ADIBO/DOA(10) en suspension	170
1.1 Quantification du nombre de gadolinium immobilisés sur les NP par ICP-MS	170
2. Incorporation du gadolinium par chimie bioorthogonale sur les NP-ADIBO/NH₂	172
2.1 Incorporation du complexe N ₃ -PEG ₄ -DOA(Gd) par ligation SPAAC	172
a. Synthèse de l'espaceur N ₃ PEG ₄ NH ₂	173
b. Synthèse du complexe N ₃ -PEG ₄ -DOA(Gd)	173
c. Greffage supporté du complexe N ₃ -PEG ₄ -DOA(Gd)	176

d.	Greffage du complexe N ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd) sur les NP-ADIBO/NH ₂ en suspension...	177
2.2	Incorporation du complexe Tz-PEG ₄ -DOTA(Gd) par ligation IEDDA	179
a.	Synthèse de l'espaceur NH ₂ -PEG ₄ -NHBoc	180
b.	Synthèse de l'entité bioorthogonale Tz-PEG ₄ -NH ₂	181
c.	Synthèse du complexe Tz-PEG ₄ -DOTA(Gd)	182
d.	Greffage du complexe Tz-PEG ₄ -DOTA(Gd) sur les NP-ADIBO/NH ₂ en suspension ...	183
3.	Conclusion	185

CHAPITRE 2. SYNTHÈSE DES ACM-N₃ ET ÉVALUATIONS IN VITRO DE LA STRATÉGIE D'IMMUNOPRECIBLAGE.....187

I.	Synthèse de l'entité bioorthogonale azoture (N₃-C₆H₄-CONHS).....	188
II.	Fonctionnalisation du RTX	189
1.	<i>Purification du RTX.....</i>	<i>189</i>
2.	<i>Modification du RTX par l'entité bioorthogonale N₃</i>	<i>190</i>
3.	<i>Analyses par MALDI-TOF</i>	<i>190</i>
III.	Analyses des conjugués RTX-N₃.....	192
1.	<i>Analyses par fluorescence</i>	<i>192</i>
1.1	Etudes moléculaires par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	192
1.2	Etudes <i>in vitro</i> par cytométrie en flux	194
a.	Sélection de la lignée cellulaire de lymphome	194
b.	Détermination de la concentration saturante en RTX	195
c.	Évaluation de la réactivité des RTX-N ₃ modifiés	196
1.3	Etudes <i>in vitro</i> par microscopie confocale	197
IV.	Évaluation <i>in vitro</i> de la stratégie d'immunopréciblage des NP	200
1.	<i>Vérification de la reconnaissance des NP avec les conjugués RTX-N₃ 10 éq. par microscopie confocale</i>	<i>200</i>
2.	<i>Amélioration de la reconnaissance RTX-NP par ajout d'un espaceur sur l'AcM.....</i>	<i>202</i>
2.1	Synthèse de l'entité bioorthogonale <i>trans</i> -cyclooctène (TCO-NHS)	202
a.	Synthèse du TCO-OH	203
b.	Synthèse du TCO-NHS	204
2.2	Modification du RTX par l'entité bioorthogonale TCO	205
a.	Analyse par MALDI-TOF	206
b.	Analyses par fluorescence	206
i.	Etudes moléculaires par électrophorèse sur gel de polyacrylamide	206
ii.	Etudes <i>in vitro</i> par cytométrie en flux.....	207
2.3	Préparation du RTX-PEG ₄ -N ₃	208
2.4	Vérification de la reconnaissance des NP avec les conjugués RTX-PEG ₄ -N ₃ par microscopie confocale	211

V. Etudes préliminaires de radiosensibilité des cellules GRANTA-519	213
1. Irradiation par immunoprécipilage avec une entité bioorthogonale ADIBO porteuse de gadolinium (ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)).....	213
1.1 Synthèse du complexe ADIBO-PEG ₄ -DOTA(Gd).....	213
a. Synthèse de l'ADIBO-NHS	213
b. Synthèse du complexe ADIBO-PEG ₄ -DOTA(Gd).....	215
1.2 Effet du complexe sur les cellules GRANTA-519	216
VI. Conclusion	220
 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	 221
 PART 4. EXPERIMENTAL SECTION	 227
 SUPPORTED SYNTHESSES AND FUNCTIONALIZATION OF SILICA NANOPARTICLES	 229
I. Materials and reagents.....	229
II. Instrumentation	229
III. Preparation of the CPG-NP solid support [224].....	230
1. <i>Functionalization of the Controlled Pore Glass (CPG) support (CPG-Q-linker).....</i>	<i>230</i>
2. <i>Functionalization with primary amines (CPG-NH₂).....</i>	<i>230</i>
3. <i>Functionalization with carboxylic acids (CPG-Q-linker)</i>	<i>230</i>
4. <i>Nanoparticles silanization (NP-TESPHU).....</i>	<i>231</i>
4.1 Synthesis of 3-(triethoxysilyl)propylhydroxyhexyl urea (TESPHU)	231
4.2 TESPHE spacer grafting on nanoparticles (NP-TESPHU)	231
5. <i>Nanoparticle grafting on CPG support (CPG-NP).....</i>	<i>232</i>
5.1 Carboxylic acid activation of CPG support	232
5.2 Nanoparticle grafting	232
5.3 « Capping » step	232
5.4 Quantification of grafted nanoparticles	232
a. Procedure.....	232
IV. Nanoparticle functionalization by automated solid-phase synthesis to obtain NP-ADIBO/NH₂.....	233
V. Preparation of the DOTA-based nanoparticles (NP-ADIBO/DOTA)	236
1. <i>Incorporation of DOTA on primary amines of NP-ADIBO/NH₂</i>	<i>236</i>
1.1 General protocol for mDOTA (1 eq., 10 eq. and 80 eq. based on n _{NH₂}) coupling with NP-ADIBO/NH ₂	236
1.2 General protocol for DOTA-NHS (80 eq.) coupling with NP-ADIBO/NH ₂	236
2. <i>Release of the nanoparticles from the solid support and kinetic studies.....</i>	<i>237</i>

2.1	General protocol for NP-ADIBO/NH ₂ and NP-ADIBO/DOTA release from the CPG support.....	237
2.2	Kinetic studies of nanoparticle release	238
VI.	Preparation of the Gd-based nanoparticles (NP-ADIBO/DOTA(Gd))	238
1.	<i>Gd complexation using NP-ADIBO/DOTA(10) suspension.....</i>	238
2.	<i>Incorporation of Gd-based complexes by bioorthogonal chemistry with ADIBO of NP-ADIBO/NH₂.....</i>	238
2.1	Incorporation of N ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd) by SPAAC	239
a.	Using NP-ADIBO/NH ₂ on CPG support.....	239
b.	Using NP-ADIBO/NH ₂ in suspension	239
2.2	Incorporation of Tz-PEG ₄ -DOTA(Gd) by IEDDA.....	240
VII.	Characterization of nanoparticles.....	240
1.	<i>Dynamic light scattering (DLS) and Zeta potential.....</i>	240
2.	<i>Transmission electron microscopy (TEM).....</i>	240
3.	<i>ICP-MS.....</i>	240
4.	<i>Nanoparticle functions quantification using fluorescent FITC probes.....</i>	241
4.1	Quantification of grafted DOTA per nanoparticle.....	241
a.	General protocol for estimating the total number of NH ₂ before and after DOTA coupling on NP-ADIBO/NH ₂ and NP-ADIBO/DOTA.....	241
4.2	Checking the availability of ADIBO functions on nanoparticles.....	242
a.	General protocol for checking the availability of ADIBO before and after mDOTA or DOTA-NHS coupling on NP-ADIBO/NH ₂	242
b.	General protocol for checking the availability of ADIBO before and after N ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd) coupling on NP-ADIBO/NH ₂	242
	ORGANIC SYNTHESSES.....	243
I.	Reagents and solvents.....	243
II.	Chromatographic methods	243
III.	Instrumentation.....	245
IV.	Syntheses of compounds for mAb functionalization.....	246
1.	<i>RTX-N₃ functionalization</i>	246
1.1	Synthesis of azide precursor.....	246
	• 4-Azidomethyl benzoic acid (N ₃ -C ₆ H ₄ -COOH) [256].....	246
	• 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 4-(azidomethyl)benzoate (N ₃ -C ₆ H ₄ -CONHS) [248] ..	247
2.	<i>RTX-TCO functionalization.....</i>	248
2.1	Synthesis of <i>trans</i> -cyclooctene precursor	248
	• (E)-Cyclooct-4-enol (trans-cyclooct-4-enol) (TCO-OH) [250]	248
	• 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-aminobenzoate (H ₂ N-C ₆ H ₄ -CONHS).....	249

• 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-isocyanatobenzoate (OCN-C₆H₄-CONHS).....	249
• 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl (E)-4-(((cyclooct-4-en-1-yl)oxy)carbonyl)amino)benzoate (TCO-NHS) [257,258]	250
V. Synthesis of tetraethylene glycol derivatives	251
1. Synthesis of PEG₄ derivatives.....	251
• ((Oxybis(ethane-2,1-diyl))bis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl) bis(4-methylbenzenesulfonate) (TsO-PEG₄-OTs) [239].....	251
• 1-Azido-2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy) (N₃-PEG₄-N₃) [239].....	251
• 2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-amine (N₃-PEG₄-NH₂) [239]	252
• tert-Butyl (2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (N₃-PEG₄-NHBoc) [241]	252
• tert-Butyl (2-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (NH₂PEG₄NHBoc) [242]	253
VI. Synthesis of DOTA derivatives.....	254
1. Synthesis of DOTA chelates for coupling with nanoparticles	254
1.1 Synthesis of mDOTA for coupling with primary amines of NP-ADIBO/NH ₂	254
• 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7-tert-butyl triacetate hydrobromide (DO3A-3tBu) [229]	254
• N-(Carbobenzoxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N',N'',N'''-triacetic acid tri-tert-butyl ester (DOTA-3tBu-Bn) [230]	255
• N-(Carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N',N'',N'''-triacetic acid tri-tert-butyl ester (DOTA-3tBu-COOH) [230]	256
• N-[Carbo(2,3,5,6-tetrafluorophenoxy)methyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N',N'',N'''-triacetic acid tri-tert-butyl ester (mDOTA-3tBu) [230].....	257
• N-[Carbo(2,3,5,6-tetrafluorophenoxy)methyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N',N'',N'''-triacetic acid (mDOTA) [230]	258
1.2 Synthesis of DOTA(Gd) derivatives incorporated by bioorthogonal chemistry on NP-ADIBO/NH ₂	259
a. Synthesis of N ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd) incorporated by SPAAC	259
• 2,2',2''-(10-(17-Amino-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaheptadecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid (N₃-PEG₄-DOTA) [259]	259
• 2,2',2''-(10-(17-Amino-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaheptadecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid gadolinium complex (N₃-PEG₄-DOTA(Gd))	260
b. Synthesis of Tz-PEG ₄ -DOTA(Gd) incorporated by IEDDA	260
• 3-Amino-6-(6-(pyridin-2-yl)-1,4-dihydro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridine (DHTz) [243].....	260
• 5-Oxo-5-((6-(6-(pyridin-2-yl)-1,4-dihydro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridin-3-yl)amino)pentanoic acid (DHTz-COOH) [244].....	261
• 5-Oxo-5-((6-(6-(pyridin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridin-3-yl)amino)pentanoic acid (Tz-COOH) [244]	261

• Tert-Butyl (13,17-dioxo-17-((6-(6-(pyridin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridin-3-yl)amino)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyl)carbamate (Tz-PEG₄-NHBoc) [240].....	262
• 2,2',2''-(10-(2-Oxo-2-((2-(2-(5-oxo-5-((6-(6-(pyridin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridin-3-yl)amino)pentanamido)ethoxy)ethyl)amino)ethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid (Tz-PEG₄-DOTA) [240]	263
• 2,2',2''-(10-(2-Oxo-2-((2-(2-(5-oxo-5-((6-(6-(pyridin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridin-3-yl)amino)pentanamido)ethoxy)ethyl)amino)ethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid gadolinium complex (Tz-PEG₄-DOTA(Gd))	264
2. Synthesis of ADIBO-DOTA(Gd) chelating entities for radiosensitization studies with RTX-N₃	265
2.1 Synthesis of ADIBO-NHS [252,253]	265
• H-dibenzo[a,d][7]annulen-5-one oxime (Oxime)	265
• (Z)-dibenzo[b,f]azocin-6(5H)-one (Amide)	266
• (Z)-5,6-dihydrodibenzo[b,f]azocine (Azocine)	267
• Methyl-4-(dibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)-4-oxobutanoate (Octene-COOCH₃).....	268
• 4-Dibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl-4-oxobutanoic acid (Octene-COOH).....	269
• 5-(11,12-Didehydrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)-4-oxobutanoic acid (ADIBO-COOH).....	270
• 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-4-(didehydrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)-4-oxobutanoate (ADIBO-NHS)	271
2.2 Synthesis of ADIBO-PEG ₄ -DOTA(Gd).....	272
• 2,2',2''-(11-Amino-3,6,9-trioxaundecan-1-amino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid gadolinium complex (NH₂-PEG₄-DOTA(Gd))	272
• Complexation of ADIBO-PEG ₄ -DOTA with gadolinium (ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd))	272
VII. Synthesis of the fluorescent FITC probe	273
• Fluorescein azide (FITC-N₃) [260].....	273
BIOLOGICAL ASSESSMENTS ON ANTIBODIES AND NANOPARTICLES	274
I. Materials and reagents	274
II. Cell line and antibody	274
III. Instrumentation	275
IV. mAb functionalizations and <i>in vitro</i> assessments	275
1. mAb modification	275
2. Determination of the number of N₃ and TCO moieties per mAb	276
3. Assessment of the interaction between mAb-N₃ and fluorescent ADIBO or mAb-TCO and fluorescent Tz	276
3.1 Polyacrylamide gel electrophoresis	276

3.2	Flow cytometry	276
a.	Assessment of the interaction between RTX-N ₃ and fluorescent ADIBO probe	276
b.	Assessment of the interaction between RTX-TCO and fluorescent Tz probe.....	277
c.	Assessment of the interaction between RTX-PEG ₄ -N ₃ and fluorescent ADIBO probe	277
d.	Radiosensitization studies on GRANTA-519 cells using RTX-N ₃ and ADIBO-PEG ₄ -DOTA(Gd).....	277
V.	Preliminary <i>In vitro</i> assessments of nanoparticles	277
1.	<i>Confocal imaging on GRANTA 519 with RTX-N₃</i>	277
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	279

Table des figures

Figure 1 : Les principaux facteurs de risque responsables du cancer (d'après l'Institut National du Cancer (INCa), consulté le 17 Juin 2019).	7
Figure 2 : Effectifs annuels moyens de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 2007 à 2016 (d'après l'INCa, consulté le 17 Juin 2019).	8
Figure 3 : (A) Schéma du principe de l'électrofilage. Adaptée de Bhardwaj et Kundu, 2010 [32]. (B) Microscopie confocale Raman montrant des fibres en forme de nid d'abeille après électrofilage. L'hydroxyapatite apparaît en bleu et le polymère (poly-(ϵ -caprolactone) en vert. (C) Grossissement permettant de visualiser les NP d'hydroxyapatite déposées sur le polymère [34].	10
Figure 4 : Images IRM et imagerie optique de tumeurs gliales 9L exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) chez des rats après administration des NP Cy5.5-CLIO. (A) Image IRM pondérée en densité de protons et (B) pondérée en T2. Images après craniotomie et (C) exposition des tumeurs gliales à la lumière blanche, (D) à la longueur d'onde d'excitation de la GFP et (E) à la longueur d'onde d'excitation de la Cy5.5 [47]. ..	12
Figure 5 : Images intra-opératoire de tumeurs SKOV3 chez la souris après administration des FA-IR780-NP. (A) Exposition des tumeurs gliales à la lumière blanche, (B) au proche infra-rouge et (C) superposition des images A et B [49].	13
Figure 6 : Exemples de petites molécules inhibitrices de réactions enzymatiques utilisées en clinique.	21
Figure 7 : Exemples de NP ciblant en essais cliniques utilisées pour la délivrance d'agents thérapeutiques. Adaptée de Biffi et al., 2019 [98]. EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor; HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2; PSMA: Prostate-Specific Membrane Antigen.	22
Figure 8 : Régions de prédominance des trois principales formes d'interaction des photons avec la matière. ..	26
Figure 9 : Effet photoélectrique.	26
Figure 10 : Diffusion Compton.	27
Figure 11 : Création de paires électron-positon.	27
Figure 12 : Energie déposée par différents rayonnements ionisants particuliers au cours de leur pénétration dans les tissus [123]. Le profil de dépôt d'énergie des neutrons n'est pas représenté mais est similaire à celui des photons.	28
Figure 13 : Distribution de dose en profondeur des protons par rapport aux photons. Adaptée de Thariat et al., 2018 [124] et Terasawa, 2009 [125].	29
Figure 14 : Parcours dans la matière des émetteurs α , β et γ . Adaptée d'après Treuil et Quelven [130].	32
Figure 15 : Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des rayonnements ionisants.	32
Figure 16 : Structure chimique des deux analogues de la somatostatine utilisés en clinique, l'OctreoTher [®] marqué à l'Yttrium-90 et le Lutathera [®] marqué au Lutécium-177 ; et représentation schématique du Zévalin [®] marqué à l'yttrium-90 et ciblant les antigènes CD-20 pour le traitement du lymphome Non-Hodgkinien [149].	37
Figure 17 : Les différentes méthodes d'incorporation de radionucléides thérapeutiques sur des NP. Adaptée de Jeon et al., 2019 [150].	38
Figure 18 : Système Cyberknife [®]	40
Figure 19 : Inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN par les Dbait.	42
Figure 20 : Acétylation/désacétylation des histones. Adaptée de Kazantsev et Thompson, 2008 [173].	44
Figure 21 : Comparaison du coefficient d'absorption de l'énergie de masses des photons pour l'or et le gadolinium par rapport à l'eau. Les couches électroniques K et L de chaque élément sont représentées. Adaptée de Kuncic et Lacombe, 2018 [178].	46

Figure 22 : Processus d'interaction des photons (KeV) avec des NP à haut numéro atomique. Adaptée de Kuncic et Lacombe, 2018 [178].	47
Figure 23 : Représentation schématique des NP AGuIX®. Adaptée de NH TherAGuIX [185].	48
Figure 24 : Représentation schématique de l'accumulation des NP dans les tissus tumoraux par effet EPR. Adaptée de Abdalla et al., 2018 [197].	51
Figure 25 : Les paramètres physico-chimiques (taille, forme et charge) des NP influençant leur biodistribution dans les différents organes (poumons, foie, rate et reins). Adaptée de Blanco et al., 2015 [196].	52
Figure 26 : Stratégies de ciblage actif. Adaptée de Danhier et al., 2016 [216].	54
Figure 27 : Stratégie de vectorisation de NP de silice par immunoprécipilage médié par la chimie bioorthogonale de type SPAAC, suivi d'une irradiation par RE.	125
Figure 28 : Structure schématique d'une NP de silice fluorescente à base de rhodamine fonctionnalisée en surface par des entités bioorthogonales de type ADIBO et des complexes de gadolinium macrocycliques DOTA(Gd).	129
Figure 29 : Synthèse sur phase solide (SPS) de NP de silice fluorescentes fonctionnalisées par une protéine G-CSF couplée en solution sur les DTPA pour une application en immunostimulation [225,226].	130
Figure 30 : Stratégie de synthèse supportée automatisée appliquée aux NP de silice.	130
Figure 31 : Schéma de synthèse des NP-ADIBO/DOTA(Gd). 1) Immobilisation des NP de silice sur le support CPG ; 2) Fonctionnalisation des NP via la chimie dite « aux phosphoramidites » par synthèse supportée automatisée pour l'obtention des NP-ADIBO/NH ₂ ; 3) Greffage supporté de l'entité chélatante DOTA via les amines (NP-ADIBO/DOTA) ; 4) Décrochage des NP-ADIBO/DOTA du support CPG ; 5) Complexation des ions Gd ³⁺ .	132
Figure 32 : Représentation schématique de la stratégie de greffage des NP de silice sur le support solide CPG.	133
Figure 33 : Fonctionnalisation d'un support solide utilisé pour la synthèse d'oligonucléotides.	134
Figure 34 : Fonctionnalisation du support CPG par un lien Q-linker.	134
Figure 35 : Silanisation des NP par un espaceur de type TESPHU.	135
Figure 36 : Greffage des NP sur le support CPG.	137
Figure 37 : Observation du support CPG par microscopie électronique à balayage après greffage des NP.	137
Figure 38 : Structure chimique détaillée des NP-ADIBO/NH ₂ conçue par synthèse supportée automatisée.	138
Figure 39 : Structure générale des synthons phosphoramidites utilisés.	139
Figure 40 : Structure des phosphoramidites utilisés pour la fonctionnalisation des NP.	139
Figure 41 : Spectre de masse de l'ADIBO-PEG ₅ -COOH au bout de 24 h dans une solution de DBU 0,1 M.	140
Figure 42 : Cycle de synthèse appliqué pour la fonctionnalisation supportée des NP par chimie dite « aux phosphoramidites ».	141
Figure 43 : Mécanisme réactionnel de détritulation.	141
Figure 44 : Mécanisme réactionnel de couplage des phosphoramidites.	142
Figure 45 : Mécanisme réactionnel de l'étape de capping.	142
Figure 46 : Mécanisme réactionnel d'oxydation.	143
Figure 47 : Synthétiseur à oligonucléotides utilisé pour la fonctionnalisation des NP de silice.	143
Figure 48 : Colonne utilisée pour la synthèse supportée.	144
Figure 49 : Incorporation des différents synthons phosphoramidites par synthèse supportée automatisée.	145
Figure 50 : Mécanisme réactionnel de décrochage des NP du support CPG et formation de la liaison phosphodiester.	147

Figure 51 : Décrochage des NP du support CPG par traitement en milieu basique DBU 0,1 M. (a) Support CPG rose avant décrochage des NP, (b) relargage en solution des NP après traitement à la DBU 0,1M, (c) Support CPG devenu blanc après décrochage des NP.	147
Figure 52 : Cinétique de décrochage des NP-ADIBO/NH ₂ en présence de DBU 0,1 M. (A) Concentrations de NP décrochées pour chaque temps, (B) Concentrations cumulées de NP décrochées dans le temps.	148
Figure 53 : Analyses de DLS et de MET des NP-ADIBO/NH ₂	149
Figure 54 : Spectre de masse validant la réactivité de la FITC-N ₃ synthétisée vis-à-vis de l'ADIBO-PEG ₅ -COOH.	150
Figure 55 : Quantification du nombre d'ADIBO sur les NP-ADIBO/NH ₂	150
Figure 56 : Spectres d'absorbance et de fluorescence des NP-ADIBO/NH ₂ après réaction avec la FITC-N ₃	151
Figure 57 : Quantification du nombre total de NH ₂ sur les NP-ADIBO/NH ₂	152
Figure 58 : Spectres d'absorbance et de fluorescence des NP-ADIBO/NH ₂ après réaction avec la FITC-NCS.	153
Figure 59 : Synthèse des NP-ADIBO/DOTA par couplage peptidique supporté du DOTA-NHS et du mDOTA avec les amines primaires des NP-ADIBO/NH ₂	154
Figure 60 : Hydrolyse possible des esters activés du DOTA en milieu non anhydre.	156
Figure 61 : Stratégie employée pour l'estimation du nombre de ligands DOTA par NP.	157
Figure 62 : Spectres d'absorbance des NP misent en présence de FITC-NCS et quantification du nombre de fonctions amine disponibles avant et après couplage du DOTA.	158
Figure 63 : (a) CPG-NP-ADIBO/NH ₂ et (b) CPG-NP-ADIBO/DOTA-NHS en suspension ayant réagi avec la FITC-NCS.	158
Figure 64 : Spectres de fluorescence des NP après réaction la FITC-NCS.	159
Figure 65 : Stratégie employée pour vérifier l'accessibilité et la réactivité des fonctions ADIBO après greffage des DOTA.	160
Figure 66 : Spectres d'absorbance et de fluorescence des NP misent en présence de FITC-N ₃ pour valider la présence et la réactivité des fonctions ADIBO avant et après couplage des DOTA. *Contrôle : NP non fonctionnalisées + FITC-N ₃	160
Figure 67 : (a) CPG-NP-ADIBO/NH ₂ et (b) CPG-NP-ADIBO/DOTA-NHS en suspension ayant réagi avec la FITC-N ₃	161
Figure 68 : Cinétique de décrochage des NP-ADIBO/NH ₂ , NP-ADIBO/mDOTA, NP-ADIBO/DOTA-NHS en présence de DBU 0,1 M. (A) Concentrations de NP décrochées pour chaque temps, (B) Concentrations cumulées de NP décrochées dans le temps.	161
Figure 69 : Analyses de DLS et de MET (A) des NP-ADIBO/mDOTA et (B) des NP-ADIBO/DOTA-NHS.	163
Figure 70 : Préparation des NP-ADIBO/mDOTA(1) et NP-ADIBO/mDOTA(10).	164
Figure 71 : Spectres d'absorbance des NPs misent en présence de FITC-NCS et quantification du nombre total d'amines avant et après couplage avec le mDOTA.	165
Figure 72 : Spectres de fluorescence des NP-ADIBO/DOTA(1) et NP-ADIBO/DOTA(10) après réaction avec la FITC-N ₃	166
Figure 73 : Cinétique de décrochage des NP-ADIBO/DOTA(1) et NP-ADIBO/DOTA(10) en présence de DBU 0,1 M. (A) Concentrations de NP décrochées pour chaque temps, (B) Concentrations cumulées de NP décrochées dans le temps.	167
Figure 74 : Analyses de DLS et de MET (A) des NP-ADIBO/DOTA(1) et (B) des NP-ADIBO/DOTA(10).	168
Figure 75 : Sphère de coordination du ligand DOTA [233]. Les atomes d'oxygène sont représentés en rouge et les atomes d'azote en bleu. La molécule d'eau n'est pas représentée pour plus de clarté.	169
Figure 76 : Sédimentation des NP-ADIBO/DOTA(10) après ajustement du pH à 6,5.	170
Figure 77 : Synthèse des NP-ADIBO/DOTA(Gd) par complexation du Gd(III) sur les NP-ADIBO/DOTA(10).	170

Figure 78 : Spectre de masse du complexe N ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd).	174
Figure 79 : Chromatogramme HPLC-ICP-MS de la solution de N ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd) à 11 mM.	175
Figure 80 : Greffage supporté du complexe N ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd) par ligation SPAAC.	176
Figure 81 : Spectre de fluorescence des NP misent en présence de FITC-N ₃ avant et après incorporation du complexe N ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd).	177
Figure 82 : Greffage du complexe N ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd) sur les NP-ADIBO/NH ₂ en suspension par ligation SPAAC.	177
Figure 83 : Chromatogramme HPLC-ICP-MS de la solution de N ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd) avant et après réaction avec les NP-ADIBO/NH ₂ .	178
Figure 84 : Sphère de coordination supposée du complexe N ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd).	179
Figure 85 : Spectre de masse du complexe Tz-PEG ₄ -DOTA(Gd).	182
Figure 86 : Greffage du complexe Tz-PEG ₄ -DOTA(Gd) sur les NP-ADIBO/NH ₂ en suspension par ligation IEDDA.	183
Figure 87 : Analyses DLS des NP-ADIBO/DOTA(Gd).	184
Figure 88 : Structure finale des NP-ADIBO/DOTA(Gd) fonctionnalisées en surface par des amines NH ₂ , des entités bioorthogonales ADIBO et des macrocycles DOTA complexants les ions Gd ³⁺ .	186
Figure 89 : Structure schématique du Rituximab.	187
Figure 90 : Chromatogramme de l'entité bioorthogonale N ₃ -C ₆ H ₄ -CONHS.	188
Figure 91 : Chromatogramme du RTX après purification par chromatographie d'exclusion stérique.	189
Figure 92 : Exemple de spectres de masse obtenus pour la gamme 1 des différents conjugués RTX-N ₃ .	191
Figure 93 : Représentations graphiques du nombre de N ₃ greffés par RTX en fonction du nombre d'équivalents d'esters activés N ₃ -C ₆ H ₄ -CONHS mis en réaction.	192
Figure 94 : Procédure employée pour la migration des AcM par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.	192
Figure 95 : Révélation du gel de polyacrylamide par fluorescence après incubation avec la sonde fluorescente ADIBO-Cy5.5 à différents temps et coloration du gel au bleu de Coomassie.	193
Figure 96 : Etude cinétique de la réaction SPAAC entre les différents conjugués RTX-N ₃ et la sonde fluorescente ADIBO-Cy5.5.	194
Figure 97 : Intensités de fluorescence moyenne mesurées pour chaque lignée cellulaire.	195
Figure 98 : Courbe de saturation en RTX (MabThéra®) sur la lignée de lymphome GRANTA-519 par cytométrie en flux.	195
Figure 99 : Protocole de cytométrie en flux des cellules GRANTA-519 incubées avec les RTX-N ₃ modifiés et l'ADIBO-AF488.	196
Figure 100 : Intensité de fluorescence moyenne pour les différents échantillons de RTX-N ₃ .	196
Figure 101 : Intensité de fluorescence moyenne pour les RTX-N ₃ rapportée au nombre de N ₃ /RTX.	197
Figure 102 : Contrôle de la reconnaissance antigénique du conjugué RTX-N ₃ (10).	197
Figure 103 : Images en microscopie confocale en fluorescence (a) de cellules GRANTA-519 incubées (b) avec l'ADIBO-AF488 sans le RTX-N ₃ modifié ou (c) avec le RTX-N ₃ (10). Cellules GRANTA-519 incubées avec (d) l'Ac II-AF488 sans le RTX-N ₃ modifié ou (e) avec le RTX-N ₃ (10). Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu (DAPI), l'ADIBO-AF488 et l'Ac-II AF488 en vert (Alexa Fluor 488).	199
Figure 104 : Protocole de microscopie confocale des cellules GRANTA-519 incubées avec les RTX-N ₃ modifiés et les NP-ADIBO/NH ₂ ou NP-ADIBO/DOTA(Gd).	200

Figure 105 : Images en microscopie confocale en fluorescence (a) de cellules GRANTA-519 incubées avec (b) les NP-ADIBO/NH ₂ sans le RTX-N ₃ modifié ou (c) avec le RTX-N ₃ (10). Cellules GRANTA-519 incubées avec (d) les NP-ADIBO/DOTA(Gd) sans le RTX-N ₃ modifié ou (e) avec le RTX-N ₃ (10). Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu (DAPI) et les NP en rouge (Rhodamine). Z-stack : combinaison de plusieurs images dont le plan focal varie.	201
Figure 106 : Montage photochimique pour l'obtention du TCO-OH. Schéma adapté de Royzen et al., 2008 [250].	203
Figure 107 : Chromatogrammes de la première fraction après élution à l'AcOEt, et de la seconde fraction après élution avec le mélange AcOEt/TEA.	205
Figure 108 : Comparaison graphique du nombre de TCO et N ₃ greffés par RTX en fonction du nombre d'équivalents d'esters activés TCO-NHS ou N ₃ -C ₆ H ₄ -CONHS mis en réaction.	206
Figure 109 : Révélation du gel de polyacrylamide par fluorescence après incubation avec la sonde fluorescente Tz-Cy3 à 5 min et coloration du gel au bleu de Coomassie.	207
Figure 110 : Protocole de cytométrie en flux des cellules GRANTA-519 incubées avec les RTX-TCO modifiés et la sonde fluorescente Tz-5-FAM.	207
Figure 111 : Intensité de fluorescence moyenne pour les différents échantillons de RTX-TCO.	208
Figure 112 : Contrôle de la reconnaissance antigénique du conjugué RTX-TCO(15).	208
Figure 113 : Protocole de cytométrie en flux des cellules GRANTA-519 d'abord incubées avec les RTX-TCO(15) puis avec l'espaceur Tz-PEG ₄ -N ₃ et enfin avec l'ADIBO-AF488. Les cellules ne sont pas représentées pour plus de clarté.	209
Figure 114 : Intensité de fluorescence moyenne mesurée par cytométrie en flux pour les différentes conditions testées.	209
Figure 115 : Images en microscopie confocale en fluorescence (a) de cellules GRANTA-519 incubées (b) avec l'ADIBO-AF488, (c) avec la Tz-PEG ₄ -N ₃ puis l'ADIBO-AF488 ou (d) avec le RTX-TCO(15), la Tz-PEG ₄ -N ₃ puis l'ADIBO-AF488. Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu (DAPI) et l'ADIBO-AF488 en vert (Alexa Fluor 488).	210
Figure 116 : Protocole de microscopie confocale des cellules GRANTA-519 incubées avec le RTX-TCO(15) modifiés, la Tz-PEG ₄ -N ₃ et les NP-ADIBO/NH ₂ ou NP-ADIBO/DOTA(Gd). Les cellules ne sont pas représentées pour plus de clarté.	211
Figure 117 : Images en microscopie confocale en fluorescence (a) de cellules GRANTA-519 incubées (b) avec les NP, (c) avec la Tz-PEG ₄ -N ₃ puis les NP ou (d) avec le RTX-TCO(15), la Tz-PEG ₄ -N ₃ puis les NP. Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu (DAPI) et les NP en rouge (Rhodamine). Z-stack : combinaison de plusieurs images dont le plan focal varie.	212
Figure 118 : Spectre de masse de l'ADIBO-PEG ₄ -DOTA(Gd).	215
Figure 119 : Représentation graphique du pourcentage de cellules GRANTA-519 encore viables après incubation 24h à 37°C (5% de CO ₂) avec différentes concentrations du complexe ADIBO-PEG ₄ -DOTA(Gd) ou de RTX-N ₃ (10).	216
Figure 120 : Plan des plaques 6 puits résumant les différentes conditions testées pour l'étude de radiosensibilité des cellules GRANTA-519. La couleur verte représente les puits pleins.	217
Figure 121 : Nombre de colonies comptées à l'IncuCyte® après irradiation dans différentes conditions à 0, 2 et 4 Gy.	218
Figure 122 : Quantification des γ -H2AX par Western Blot après irradiations des cellules dans différentes conditions à 0, 2 et 4 Gy.	219

Table des schémas

Schéma 1 : Synthèse de la FITC-N ₃	149
Schéma 2 : Synthèse du mDOTA.	155
Schéma 3 : Schéma rétrosynthétique d'obtention du complexe N ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd).	172
Schéma 4 : Synthèse de l'espaceur tétraéthylène glycol N ₃ PEG ₄ NH ₂	173
Schéma 5 : Synthèse du complexe N ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd).	174
Schéma 6 : Schéma rétrosynthétique d'obtention du complexe Tz-PEG ₄ -DOTA(Gd).	180
Schéma 7 : Synthèse de l'espaceur tétraéthylène glycol NH ₂ PEG ₄ NHBoc.	180
Schéma 8 : Synthèse de la Tz-PEG ₄ -NH ₂	181
Schéma 9 : Synthèse du complexe Tz-PEG ₄ -DOTA(Gd).	182
Schéma 10 : Schéma rétrosynthétique d'obtention des AcM-N ₃	187
Schéma 11 : Synthèse de l'entité bioorthogonale N ₃ -C ₆ H ₄ -CONHS conjuguée sur l'AcM.	188
Schéma 12 : Protocole de fonctionnalisation du RTX par l'entité bioorthogonale N ₃	189
Schéma 13 : Schéma rétrosynthétique d'obtention des RTX-PEG ₄ -N ₃	202
Schéma 14 : Schéma rétrosynthétique d'obtention du TCO-NHS.	202
Schéma 15 : Synthèse photochimique du TCO-OH.	203
Schéma 16 : Synthèse du TCO-NHS.	204
Schéma 17 : Protocole de fonctionnalisation du RTX par l'entité bioorthogonale TCO.	205
Schéma 18 : Schéma rétrosynthétique d'obtention du complexe ADIBO-PEG ₄ -DOTA(Gd).	213
Schéma 19 : Synthèse de l'ADIBO-NHS.	214
Schéma 20 : Synthèse du complexe ADIBO-PEG ₄ -DOTA(Gd).	215

Table des tableaux

Tableau 1 : Liposomes utilisés en clinique pour la chimiothérapie [63].	15
Tableau 2 : Exemples de liposomes en phase clinique pour la chimiothérapie [68].	16
Tableau 3 : Exemples de NP polymères en phase clinique pour la chimiothérapie [68].	17
Tableau 4 : Principaux AcM utilisés en clinique [80,81].	19
Tableau 5 : Comparaison de différentes modalités de radiothérapie.*L'efficacité biologique fait référence à la dose de rayonnement relative (en Gy) requise pour produire le même effet biologique que le rayonnement de photons [121].	30
Tableau 6 : Principales caractéristiques des différents types de rayonnements ionisants émis par les radionucléides thérapeutiques. Reproduit d'après Kassis [128].	31
Tableau 7 : Principaux radionucléides utilisés en radiothérapie interne.	35
Tableau 8 : Exemples des principaux radionucléides utilisés pour la curiethérapie [143].	36
Tableau 9 : Exemples d'HDACi utilisés en clinique ou en phase d'essais cliniques.	45
Tableau 10 : Calcul de la quantité de TESPu à synthétiser pour la silanisation des NP de silice.	136
Tableau 11 : Densité de fonctionnalisation du support solide CPG et rendements de couplage obtenus suite à la synthèse supportée des NP-ADIBO/NH ₂ .	146
Tableau 12 : Résultats des analyses ICP-MS après réaction des NP-ADIBO/NH ₂ ou NP-ADIBO/DOTA(10) avec le gadolinium.	171
Tableau 13 : Proportion de Gd libre et complexé après analyse HPLC-ICP-MS de la solution de N ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd).	175
Tableau 14 : Résultats des analyses ICP-MS des filtrats de lavage après réaction des NP-ADIBO/NH ₂ avec 1 éq. ou 5 éq. du complexe N ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd).	178
Tableau 15 : Résultats des analyses ICP-MS des filtrats de lavage après réaction des NP-ADIBO/NH ₂ avec 1 éq. du complexe Tz-PEG ₄ -DOTA(Gd).	183
Tableau 16 : Quantité recouvrée de RTX après contact avec différents équivalents du dérivé azoture activé. *Gamme de RTX-N ₃ réalisée en triplicata.	190
Tableau 17 : Quantité recouvrée de RTX après contact avec différents équivalents du dérivé TCO activé.	206

Table des équations

Équation 1 : Calcul de la densité de fonctionnalisation du support solide et du rendement de couplage par la méthode du dosage des cations DMT ou MMT.	145
Équation 2 : Calcul du ratio de NH ₂ par NP.	152
Équation 3 : Calcul du ratio de DOTA par NP.	157
Équation 4 : Calcul du ratio de Gd par NP.	184

Liste des abréviations

AcM : anticorps monoclonaux	EDTMP : acide éthylènediaminetétraméthylène phosphonique
ACN : acétonitrile	EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique (« Epidermal Growth Factor Receptor »)
AcOH : acide acétique	EMA : « European Medicines Agency »
ADIBO : azadibenzylcyclooctyne	EPR : « Enhanced Permeability and Retention »
APTS : acide paratoluènesulfonique	FDA : « Food and Drug Administration »
APTES : 3-aminopropyltriéthoxysilane	FITC-NCS : fluorescéine isothiocyanate
BOP : benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate	FITC-N₃ : fluorescéine azoture
CGF : chirurgie guidée par fluorescence	HAT : acétyltransférases d'histones
CLARA : Cancéropôle Lyon Auvergne-Rhône-Alpes	HBTU : N,N,N',N'-tétraméthyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uroniumhexafluorophosphate
CPG : verre à porosité contrôlée (« Controlled Pore Glass »)	HDAC : histone déacétylase
CuAAC : cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen azoture-alcyne (« Copper catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition »)	HDACi : inhibiteurs d'histone désacétylase
DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène	HDQA : acide hydroquinone-O,O'-diacétique
DCC : N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide	HER2 : récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (« Human Epidermal growth factor Receptor 2 »)
DCM : dichlorométhane	HMDS : hexraméthylidisilazane
DCU : dicyclohexylurée	ICG : vert d'indocyanine (« Indocyanine green »)
DIEA : N,N-diisopropyléthylamine	ICP-MS : spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (« Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry »)
DiNHS : N,N'-Disuccinimidyl carbonate	IEDDA : cycloaddition de Diels-Alder à demande électronique inverse (« Inverse Electron Demand Diels-Alder »)
DLS : diffusion dynamique de la lumière (« Dynamic Light Scattering »)	IR : infrarouge
DMAP : diméthylaminopyridine	IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
DMF : diméthylformamide	K_{LM} : Constante de stabilité ligand-métal
DMT : diméthoxytrityle	LNH : Lymphome Non-Hodgkinien
DTPA : acide diéthylène triamine penta acétique	MET : microscopie électronique en transmission
DOTA : acide 1,4,7,10-Tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique	MFI : intensité de fluorescence moyenne (« Mean Fluorescence Intensity »)
EBR : efficacité biologique relative	MMP : métalloprotéinases matricielles
EDC : 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide	MMT : monométhoxytrityle
	mTOR : « mammalian Target Of Rapamycin »

NHEJ : jonction d'extrémités non homologues
(« Non-Homologous End-Joining »)

NHS : N-hydroxysuccinimide

NP : nanoparticules

PARP : poly-ADP ribose polymérase

PEG : polyéthylène glycol

PEG₃ : triéthylène glycol

PEG₄ : tétraéthylène glycol

PNT : panitumumab

PSMA : antigène membranaire spécifique de la prostate (Prostate-Specific Membrane Antigen)

RAR : radiothérapie asservie à la respiration

RC-3D : radiothérapie conformationnelle 3D

RCMI : radiothérapie conformationnelle par modulation d'intensité

RE : radiothérapie externe

RIV : radiothérapie interne vectorisée

RMN : résonance magnétique nucléaire

RTX : rituximab

SPAAC : cycloaddition 1,3-dipolaire favorisée par contrainte de cycle (« Strain Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition »)

SPIO : « SuperParamagnetic Iron Oxide »

SPM : Système Phagocytaire Mononucléé

TCO : *trans*-cyclooctène

TEA: triéthylamine

TEL : transfert d'énergie linéaire

TEMP : Tomographie d'Emission MonoPhotonique

TEOS : orthosilicate de tétraéthyle (tetraethoxysilane)

TEP : Tomographie par Emission de Positons

TESPHU : 3-(triéthoxysilyl)propylhydroxyhexylurée

TFA : acide trifluoroacétique

THF : tétrahydrofurane

TMS-Cl : chlorure de triméthylsilyle

TsCl : chlorure de tosyle

Tz : tétrazine

USPIO : « Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide »

VEGF : facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (« Vascular endothelial growth factor »)

5-ALA : Acide 5-aminolévulinique

Introduction générale

De façon progressive, les nanotechnologies sont apparues dans divers domaines tels que la chimie, la biologie, la physique, les sciences des matériaux, les sciences environnementales, la médecine et font désormais partie intégrante de notre vie quotidienne [1]. On les retrouve notamment dans de nombreux produits sur le marché tels que les peintures, les matériaux de construction, les cosmétiques, les vêtements de sport, l'électronique, ou encore les aliments [2]. Depuis le début des années 2000, l'application des nanotechnologies concerne plus particulièrement le domaine de la médecine (nanomédecine) avec une volonté croissante de développer des nanoparticules (NP) pour traiter plus efficacement le cancer. En effet, le cancer demeure une préoccupation majeure de santé publique en raison de ses étiologies diverses. Il est dû à une prolifération anarchique de cellules, liée à un dysfonctionnement des mécanismes de régulation qui assurent normalement le bon développement de notre organisme. La suppression de cette maladie demeurant encore peu plausible, la mise en place de nouvelles stratégies de diagnostic et de traitement suscite un grand intérêt dans le milieu de la recherche.

Dans ce cadre, les nanomédecines démontrent un potentiel intéressant pour surmonter ce défi [3]. Elles possèdent des propriétés intéressantes pour de nombreuses applications comme le diagnostic avec l'imagerie médicale (TEMP, TEP, scanner, IRM, fluorescence, imagerie optique), la thérapie (thérapie photoacoustique, photodynamique, photothermale, chimiothérapie, radiothérapie, thérapie génique), la délivrance d'agents thérapeutiques, la mise au point de vaccins, les traitements antibactériens, les biocapteurs ou encore la médecine régénérative (implants) [4].

Dans le domaine de l'oncologie, les liposomes furent les premières NP organiques thérapeutiques utilisées en clinique. Leur membrane est constituée d'une bicouche lipidique qui permet de protéger et d'encapsuler les médicaments hydrophiles et hydrophobes. Cet enrobage a pour effet d'améliorer la biodistribution, de réduire la toxicité des médicaments et par conséquent d'augmenter leur délivrance au niveau tumoral pour une meilleure efficacité thérapeutique. Le Doxil[®] fut la première NP liposomale approuvée par la FDA en 1995 [5]. Dix ans plus tard, l'Abraxane[®], une NP d'albumine encapsulant du paclitaxel, est commercialisée [6]. En 2007, des NP organiques de type micelles polymériques à base de paclitaxel (Genexol-PM[®]) sont également commercialisées et approuvées en Corée du Sud [7]. Les NP, en plus de posséder diverses propriétés physiques (composition, taille), ont également démontré des possibilités de fonctionnalisation différentes à la fois pour l'imagerie, la thérapie et le ciblage spécifique des cellules cancéreuses [8]. Ces NP constituent une avancée récente dans le développement de la nanomédecine et constituent dorénavant des plateformes idéales pour des approches dites théranostiques. C'est notamment le cas des NP radiosensibilisantes AGuiX[®] (NH TherAguIX, Lyon) à base de gadolinium spécialement conçues pour être activées par les rayons X pour combiner la radiothérapie externe (RE) et l'IRM [9,10].

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet doctoral, à savoir développer des NP théranostiques pour une perspective d'application en imagerie médicale et plus particulièrement pour la RE. La RE occupe l'une des toutes premières places comme outil thérapeutique anticancéreux : 50 à 60% des patients atteints de cancer y ont recours au cours de leur parcours de soins (parfois associée à la chirurgie et/ou à la chimiothérapie). Cette approche thérapeutique est basée sur l'émission de rayonnements particuliers (électrons, protons...) ou d'ondes (photons) qui, en se propageant dans l'organisme, déposent de l'énergie au sein des tissus tumoraux pour altérer le matériel génétique (ADN) des cellules [11].

Cependant, une fois les NP administrées, elles vont devoir faire face aux nombreuses barrières physiques et biologiques de l'organisme : agrégation, diffusion, interaction avec les constituants du sang, séquestration phagocytaire (MPS) et élimination rénale [12]. De nombreux articles mentionnent une limite à l'utilisation du ciblage passif (effet EPR, *Enhanced Permeability and Retention*) qu'utilisent la plupart des NP ; celle de l'hétérogénéité du microenvironnement tumoral observée entre les modèles des études précliniques et cliniques [13–18]. De plus, une méta-analyse regroupant sur dix ans différentes études précliniques a récemment démontré que seulement 0,7% de la dose injectée en NP parvient à atteindre les tumeurs [12]. Or, l'objectif majeur de ces NP reste le ciblage tumoral ; en effet, pour traiter efficacement une tumeur elles devront principalement être concentrées au niveau tumoral et faiblement dans le reste de l'organisme pour limiter les effets indésirables.

C'est pourquoi, de plus en plus de NP ciblantes (ciblage actif) sont développées et présentent en surface des ligands spécifiques de biomarqueurs tumoraux généralement surexprimés dans le microenvironnement tumoral. Cependant, l'ajout de certains ligands, comme les anticorps monoclonaux (AcM), altère le plus souvent la biodistribution des NP du fait de leur haut poids moléculaire. Afin de pallier à cet inconvénient, le concept d'immunopréciblage des NP dans lequel les NP cibleraient spécifiquement les tumeurs sans être greffées directement à l'AcM apparaît comme une stratégie intéressante pour le ciblage actif de NP. Le potentiel de cette approche dans le domaine des nanomédecines fut mis en avant pour la première fois en 2010 par Weissleder et son équipe sur des NP magnétiques fluorescentes (MFNP) [19]. Depuis, de nombreuses études précliniques continuent d'être menées.

Ainsi, au cours de cette thèse nous nous sommes proposés de développer l'immunociblage actif de NP de silice radiosensibilisantes sur la base de la chimie bioorthogonale. Dans cette optique, l'objectif serait de pouvoir cibler spécifiquement les tumeurs *via* la voie intraveineuse grâce à l'utilisation d'une stratégie de préciblage en deux temps qui dissocie l'injection de l'AcM de celle de la NP. Cette dernière se base sur la réaction bioorthogonale covalente entre des fonctions chimiques azoture (N_3) portées par des AcM spécifiques de biomarqueurs tumoraux d'intérêt ; et des fonctions chimiques azadibenzylcyclooctyne (ADIBO) préalablement incorporées lors de la fonctionnalisation des NP. Cette approche est intéressante sur de nombreux points ; il s'agit d'une chimie biocompatible avec une vitesse de réaction rapide, chimio-sélective ne nécessitant aucun catalyseur. Cette technique aura pour but d'augmenter la sélectivité vis-à-vis des tumeurs et également d'améliorer la radiosensibilisation et l'efficacité de la RE par complexation d'atomes lourds de type gadolinium (Gd).

Dans ce manuscrit, l'étude bibliographique sera consacrée dans un premier chapitre au contexte biomédical avec l'implication des NP dans les différents types de traitements du cancer. Dans le cadre du développement de NP radiosensibilisantes, un accent particulier sera donné sur le principe et le fonctionnement de la RE ainsi que les différentes stratégies de radiosensibilisation préexistantes. Le second chapitre, présenté sous forme de revue bibliographique, décrira les différentes stratégies de fonctionnalisation apportées par la chimie click et bioorthogonale pour la fonctionnalisation et le ciblage tumoral des NP. L'approche de préciblage par chimie bioorthogonale, utilisée comme stratégie de base pour cette thèse et particulièrement prometteuse, est exposée plus en détails à la fin de cette revue.

Partie 1. Etude
Bibliographique

Chapitre 1. Contexte biomédical

I. Epidémiologie et statistiques du cancer

Malgré des décennies de recherche, le cancer reste une menace mondiale importante et préoccupante. Il est caractérisé par une croissance cellulaire incontrôlée dans une partie du corps et est déclenché par une multitude de facteurs à la fois endogènes (facteurs biologiques) et exogènes (facteurs liés aux comportements individuels ou à l'environnement) (**Figure 1**). Le premier facteur de risque de cancer est le tabac, il serait à l'origine de 20% des cancers. Alors que les facteurs comme la consommation d'alcool et une alimentation déséquilibrée seraient responsables de 5 à 8% des cancers.

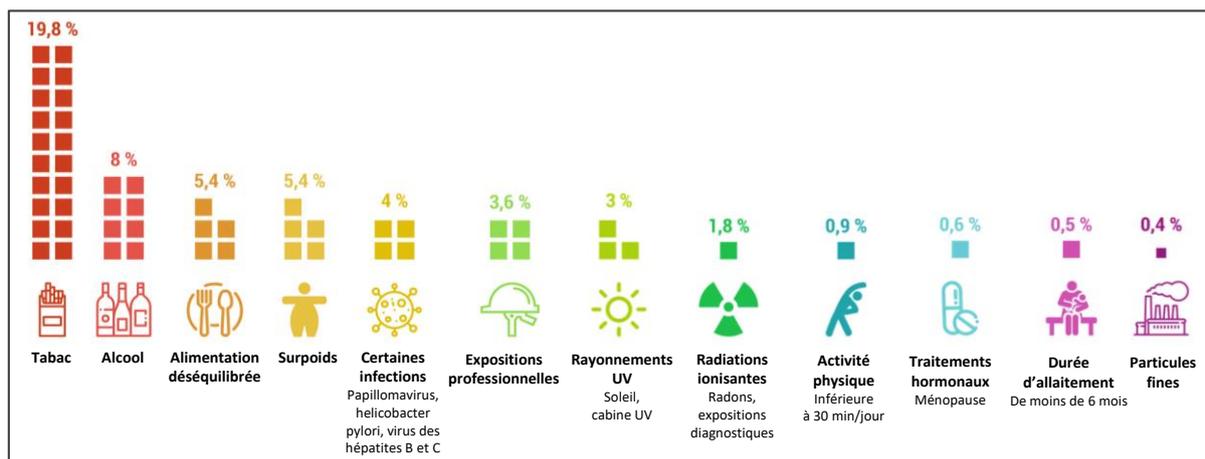


Figure 1 : Les principaux facteurs de risque responsables du cancer (d'après l'Institut National du Cancer (INCa), consulté le 17 Juin 2019).

L'évolution et la fréquence d'apparition du cancer a beaucoup augmenté depuis les années 1980. Ainsi, d'après le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), 20 millions de nouveaux cas de cancers sont prévus d'ici 2025 dans le monde. Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), en Europe il s'agit de la seconde cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires.

En France, une femme sur trois et un homme sur deux se verront diagnostiqués un cancer avant 85 ans (Ligue contre le cancer). Cette maladie représente la première cause de mortalité avec 382 000 nouveaux cas par an de cancers estimés en 2018 en France d'après l'INCa dont 204 600 chez les hommes et 177 400 chez les femmes. Le nombre de décès quant à lui a été estimé à 157 400 en 2018 dont 89 600 concernent les hommes et 67 800 les femmes. Les cancers du sein, de la prostate, du côlon-rectum et du poumon sont parmi les cancers les plus fréquents (**Figure 2**). Le cancer du poumon demeure le cancer le plus meurtrier chez l'homme (22 253 décès de 2007 à 2016), devant le cancer colorectal et le cancer de la prostate.

Chez la femme, le cancer du sein arrive au 1^{er} rang de la mortalité (11 640 décès de 2007 à 2016) ; arrivent ensuite le cancer colorectal puis le cancer du poumon. Malgré une tendance à la baisse de la mortalité en Europe, une récente étude publiée dans la revue *Annals of Oncology* estime à 1,41 millions le nombre de décès en 2019 pour l'union Européenne [20].

D'ici 2030, environ 26,4 millions de nouveaux cas de cancers ainsi que 17 millions de décès par an sont à prévoir dans le monde [21]. Ces chiffres impressionnants montrent que d'autres recherches sont nécessaires afin d'explorer des stratégies thérapeutiques et diagnostiques plus efficaces et plus sûres.

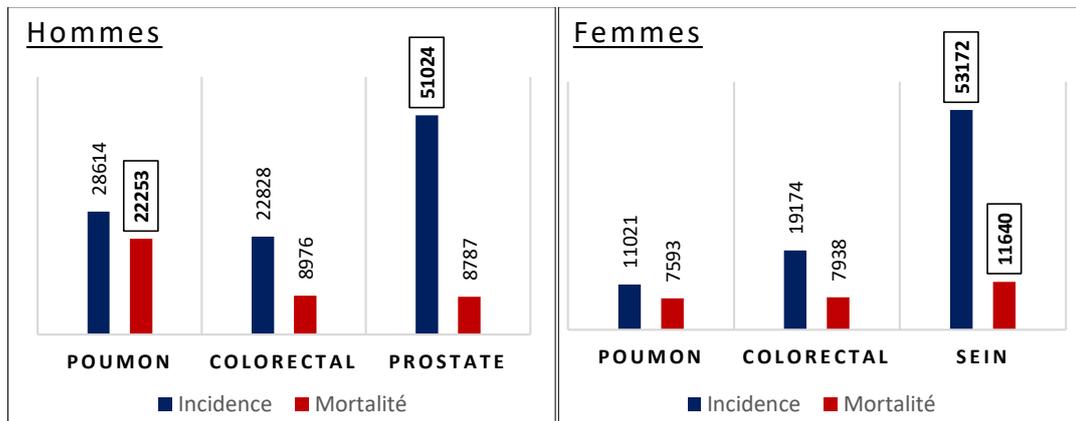


Figure 2 : Effectifs annuels moyens de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 2007 à 2016 (d'après l'INCa, consulté le 17 Juin 2019).

II. Les traitements du cancer

La cancérologie doit faire face au diagnostic précoce et précis du cancer pour le développement de thérapies plus efficaces offrant des meilleures chances de guérison. La détection de tumeurs de quelques millimètres est assurée par des méthodes d'imagerie traditionnelles performantes comme l'échographie (ultra-sons), la médecine nucléaire, l'endoscopie, l'IRM ou encore la radiographie (rayons X). A l'heure actuelle, trois principaux traitements sont utilisés pour lutter contre le cancer : la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. D'autres types de cancers peuvent-être traités par l'hormonothérapie, les thérapies ciblées, la photothérapie dynamique ou encore l'immunothérapie. Malgré de très grands progrès dans le développement de traitements contre le cancer, leurs effets secondaires néfastes sont une préoccupation primordiale. Ces traitements permettent de détruire les cellules cancéreuses, mais peuvent aussi endommager les cellules saines voisines de la tumeur traitée provoquant ainsi des effets secondaires. Par exemple, les médicaments utilisés lors de chimiothérapie sont connus pour provoquer l'infertilité, l'insuffisance ovarienne prématurée, la perte de cheveux, la diarrhée ou encore la constipation [22]. Quant à la chirurgie, elle ne pourra éliminer la totalité des cellules cancéreuses et devra utiliser des traitements pré- ou post-opératoires (chimiothérapie et/ou radiothérapie). De même, la radiothérapie peut engendrer des maladies cardiaques, des nausées, des lésions gastro-intestinales, des douleurs gastriques [23] et pose aussi le problème de la toxicité sur les tissus sains environnants. Cependant, le fractionnement et une meilleure répartition des doses permettent de limiter ces effets secondaires. Actuellement, cette radiotoxicité peut également être réduite en limitant les doses administrées et notamment par l'utilisation de NP radiosensibilisantes.

L'objectif de ce travail de thèse ayant une perspective d'utilisation de NP de silice radiosensibilisantes pour une application en RE, le principe de ce traitement est présenté plus en détails dans la suite de ce manuscrit.

1. La chirurgie

La chirurgie fait partie des traitements locaux de référence utilisés pour les tumeurs cancéreuses. D'après l'INCa, 465 643 hospitalisations pour la chirurgie de cancers ont été recensées en 2017 correspondant à 6,4% de l'activité hospitalière en oncologie. Ce traitement a pour but d'enlever la tumeur maligne (ablation ou exérèse de la tumeur) ainsi qu'une partie des tissus l'entourant, des ganglions locorégionaux et des éventuelles métastases. Elle est généralement utilisée seule comme traitement curatif lorsque les tumeurs sont diagnostiquées à un stade précoce, c'est-à-dire à un stade où elles n'ont pas encore métastasé et lorsque leur taille et leur localisation le permettent. Dans le cas contraire, la tumeur peut être difficilement retirée par chirurgie si elle possède une localisation au sein d'un organe et/ou une taille trop importante. C'est dans cette situation et afin de faciliter son ablation qu'elle est souvent associée à la radiothérapie et/ou à la chimiothérapie dites néo-adjuvantes, c'est-à-dire utilisées avant la chirurgie afin de diminuer le volume de la tumeur. A l'inverse, la chirurgie peut être utilisée en première ligne de traitement pour réduire la masse tumorale afin de simplifier la destruction de la tumeur par radiothérapie et/ou chimiothérapie alors dites adjuvantes. Dans d'autres cas, ces traitements adjuvants permettront aussi de limiter le risque de récurrence et d'assurer l'élimination des cellules cancéreuses encore éventuellement présentes après la chirurgie.

1.1 Les NP et leurs applications en chirurgie

Au gré des avancées technologiques, les NP ont été incorporées avec succès dans la pratique chirurgicale moderne. Il existe déjà un certain nombre d'applications et de procédures dans lesquelles les nanotechnologies permettent d'aider ou d'améliorer les techniques chirurgicales actuelles. Elles sont notamment présentes dans les outils médicaux et impliquées dans la médecine régénérative (réparation de tissus ou d'organes). Elles offrent aussi l'opportunité de réaliser des techniques d'imagerie moins invasives et d'améliorer la délivrance de médicaments.

a. Les NP dans les outils chirurgicaux

L'une des applications en chirurgie est celle de la création de nanorobots (robots miniaturisés) qui permettent des interventions chirurgicales précises (à l'intérieur même des cellules) contrôlées par ordinateur [24]. Maintenant, les nanomatériaux apparaissent également comme revêtement sur les outils chirurgicaux comme les scalpels. Ceux-ci peuvent être recouverts d'une couche nanométrique de diamants qui permet de limiter l'adhérence aux tissus biologiques rendant les incisions plus précises et plus fines [25]. Par ailleurs, il existe aussi des micro-aiguilles de suture en acier inoxydable pour la chirurgie plastique et ophtalmique. Celles-ci sont généralement constituées de cristaux nanométriques qui confèrent à ces outils médicaux une meilleure ductilité et résistance à la corrosion. Par exemple, les aiguilles de silicone (200–300 nm de diamètre, 6–8 µm de longueur) sont utilisées en chirurgie pour délivrer certaines molécules thérapeutiques (MicroPyramid™, Pyraderm™) [26].

Depuis quelques temps, les nanomatériaux apparaissent aussi dans les revêtements des cathéters. Les nanotubes de carbone qui constituent les cathéters permettent d'améliorer leur résistance et leur flexibilité et surtout de réduire les risques de thrombose [27]. Ils peuvent aussi être recouverts de NP d'argent afin de limiter la croissance de biofilms (propriété antibactérienne) [28].

b. Les NP pour la médecine régénérative

La médecine régénérative permet de rétablir la fonction d'un organe, d'un tissu ou de cellules lésées en les réparant ou en les remplaçant. Or, les cellules pour se développer ont besoin d'un environnement tissulaire semblable à celui trouvé dans l'organisme. Malgré des recherches prometteuses à l'utilisation de cellules-souches, aucune approche thérapeutique pour l'ingénierie tissulaire ne s'est encore révélée efficace.

Dans le cadre de la régénération tissulaire, l'essor des nanotechnologies a permis d'envisager d'associer les nanomatériaux avec l'utilisation de cellules-souches. Ainsi, des nanomatériaux possédant des caractéristiques structurales proches de celles retrouvées *in vivo* ont été développés. Des études *in vitro* et *in vivo* utilisant des NP d'argent ont révélé qu'elles permettaient la guérison de plaies chez des souris. Les NP favorisent la prolifération des kératinocytes conduisant à la différenciation des fibroblastes en myo-fibroblastes à l'origine des processus de cicatrisation [29].

L'électrofilage (ou *electrospinning*) est un procédé connu pour mimer une structure tissulaire comme le tissu osseux [30,31]. Cette méthode permet de produire des nanofibres à partir de polymères (poly-(ϵ -caprolactone, chitosane, collagène, acide hyaluronique, gélatine) sous l'effet d'un champ électrique (**Figure 3A**) [32]. Les nanofibres peuvent être de composition, de forme, de taille et de porosité différente [33] et peuvent constituer un substrat adéquat pour le développement tissulaire. Des NP peuvent aussi être incorporées dans la composition finale de ces fibres (**Figure 3B et C**) [34].

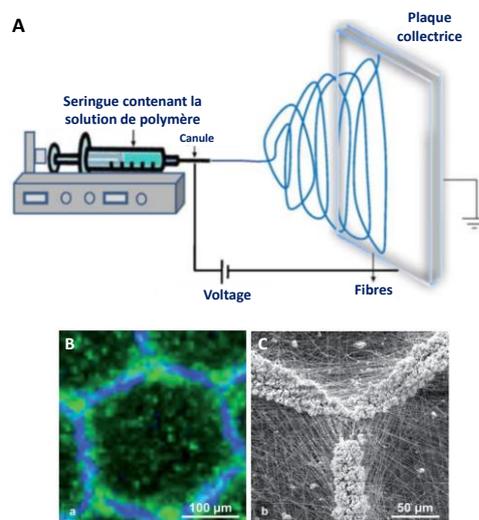


Figure 3 : (A) Schéma du principe de l'électrofilage. Adaptée de Bhardwaj et Kundu, 2010 [32]. (B) Microscopie confocale Raman montrant des fibres en nid d'abeille après électrofilage. L'hydroxyapatite apparaît en bleu et le polymère (poly-(ϵ -caprolactone) en vert. (C) Grossissement permettant de visualiser les NP d'hydroxyapatite déposées sur le polymère [34].

Les nanomatériaux sont également impliqués dans la conception d'implants (organes artificiels). C'est en 2013 que fut implanté chez un patient le premier cœur artificiel. Afin d'assurer l'adhérence des tissus biologiques, les surfaces de l'organe en contact avec le sang et notamment à l'interface des veines et des artères sont recouvertes de nanomatériaux poreux. Cependant, l'utilisation de ces implants en essai clinique a été interrompue en 2016 et nécessite encore des mises au point mécaniques (batterie du cœur défaillante) et biologiques (importante coagulation) [35]. Depuis 2017, l'étude a repris à l'étranger avec des implantations au Kazakhstan, en République tchèque et au Danemark afin que la prothèse puisse être commercialisée.

Récemment, une équipe scientifique Européenne, travaillant dans le cadre du projet EUREKA ModPolEUV, se concentre sur la création de nanomatériaux polymères facilitant la prolifération des cellules humaines. Cette nouvelle technique innovante utilise un laser EUV (Extreme Ultra-Violet) afin d'établir des surfaces polymères nanostructurées avec un degré de précision plus élevé (10 à 20 nm) par rapport aux techniques conventionnelles (100 nm maximum) [36]. Ils ont découvert qu'en fonction des nanomatériaux polymères utilisés, différents types de cellules, par exemple celles du muscle, des nerfs et des os peuvent proliférer. Cette approche montre des perspectives prometteuses notamment dans la conception de nouveaux implants avec moins de risque de rejet [37].

c. Les NP fluorescentes pour la chirurgie guidée par l'imagerie

Jusqu'ici, de nombreuses études ont été menées sur l'utilisation de NP pour améliorer l'imagerie des cancers et en particulier des études concernant l'imagerie préopératoire par IRM [38]. La tendance s'oriente maintenant vers l'utilisation de ces NP pour la chirurgie guidée par l'imagerie de fluorescence afin de localiser et différencier en temps réel les tissus tumoraux des tissus sains pendant la procédure chirurgicale. En effet, l'exérèse complète de la tumeur est un des facteurs pronostiques des plus importants pour améliorer le taux de survie des patients. Le vert d'indocyanine (ICG) (805 nm - 835 nm), la fluorescéine (495 nm - 519 nm) et l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) (405 nm - 705 nm) sont actuellement les trois marqueurs fluorescents les plus utilisés et approuvés par la FDA et l'EMA (*European Medicines Agency*) pour des indications chirurgicales [39,40]. Dans le cadre de la chirurgie guidée par fluorescence (CGF), l'ICG est cliniquement utilisée pour identifier des tumeurs solides, pour cartographier le réseau lymphatique et pour l'angiographie en chirurgie reconstructive [41]. La fluorescéine sodique est quant à elle utilisée pour la CGF de glioblastomes [42], mais le 5-ALA reste le fluorophore le plus fréquemment utilisé en neurochirurgie.

La CGF propose une résolution (de plusieurs millimètres de profondeur dans les tissus) permettant de visualiser les marges positives et les métastases ; elle est aussi peu coûteuse [39]. Toutefois, ces marqueurs fluorescents, de par leur faible taille, sont rapidement éliminés au niveau rénal et peuvent faiblement pénétrer dans les tumeurs limitant l'efficacité de la fluorescence. De plus, l'utilisation de certains d'entre eux peut se révéler toxiques et aussi peu spécifiques des tissus tumoraux. Dans ce contexte, plusieurs études précliniques sont en cours afin d'utiliser les caractéristiques physico-chimiques des NP pour espérer améliorer la délivrance et l'efficacité de ces marqueurs fluorescents [43]. En effet, l'utilisation de NP fluorescentes pour la CGF présente plusieurs avantages. Elles offrent la possibilité d'utiliser l'effet EPR ou d'inclure des ligands de ciblage à leur surface afin d'être préférentiellement retenues dans les tumeurs.

Leur taille et la possibilité de modifier leur état de surface (ex : PEGylation) leur permet de circuler dans le sang plus longtemps en étant éliminées moins rapidement par les cellules du système immunitaire (ex : macrophages). Enfin, elles peuvent encapsuler et relarguer spécifiquement les marqueurs fluorescents grâce à des stimuli intra- ou extrinsèques [43]. Les recherches actuelles sur l'utilisation de NP pour la CGF ne se limitent pas à l'ICG [44,45] et à la fluorescéine sodique [46]. D'autres marqueurs fluorescents comme des dérivés de la Cyanine (Cy5, Cy5.5) ou encore des colorants comme le bleu de Coomassie sont également étudiés et parfois combinés avec le diagnostic pré-opératoire et/ou la thérapie.

Une part importante de ces études concerne la CGF dans le traitement du cancer du cerveau. Distinguer visuellement les cellules cancéreuses des tissus cérébraux normaux lors de chirurgie intra-opératoire reste difficile pour ce type de tumeurs. Des recherches menées par Kircher *et al.* sur des NP de fer combinées à de la Cy5.5 (Cy5.5-CLIO) ont montré qu'elles permettaient à la fois une détection pré-opératoire de tumeurs gliales sur des rats en IRM; ainsi qu'une visualisation et une résection précise des tumeurs pendant la chirurgie grâce à l'imagerie optique (**Figure 4**) [47].

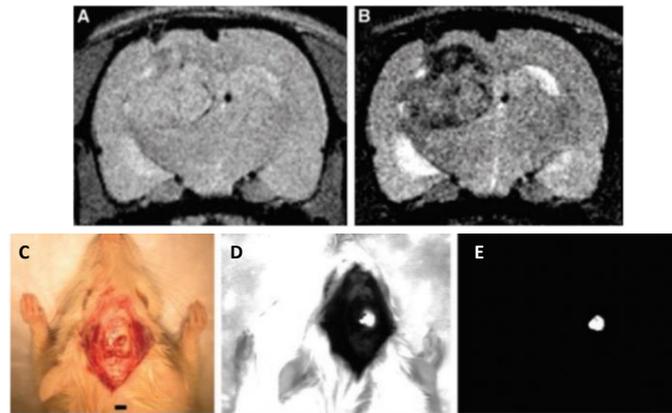


Figure 4 : Images IRM et imagerie optique de tumeurs gliales 9L exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) chez des rats après administration des NP Cy5.5-CLIO. (A) Image IRM pondérée en densité de protons et (B) pondérée en T2. Images après craniotomie et (C) exposition des tumeurs gliales à la lumière blanche, (D) à la longueur d'onde d'excitation de la GFP et (E) à la longueur d'onde d'excitation de la Cy5.5 [47].

En 2012, Nie et al. ont également réalisé des études sur des tumeurs gliales afin de les cibler et de les délimiter spécifiquement pour la chirurgie [48]. Ils ont développé des NP de polyacrylamide (PAA) comportant à leur surface un peptide (F3) spécifique des gliomes et contenant du bleu de Coomassie. Les tests *in vivo* sur des rats porteurs de tumeurs gliales 9L ont révélé une coloration spécifique des tumeurs, et notamment plus importante pour les NP possédant un ligand de ciblage par rapport à celles qui n'en possèdent pas. Très récemment, des liposomes ont également été synthétisés pour encapsuler de l'iodure IR780 et fonctionnalisés en surface par de l'acide folique (FA-IR780-NP) afin de cibler et traiter spécifiquement par CGF des souris porteuses de cellules cancéreuses ovariennes (SKOV3) [49]. Les études montrent que ces NP constituent une future plateforme théranostique. En effet, l'utilisation du fluorophore IR780 permet aux particules d'être utilisées à la fois comme indicateur en fluorescence pour la délimitation en temps réel des marges tumorales pendant la chirurgie ; et comme traitement pour les tumeurs du cancer de l'ovaire grâce à l'effet photothermique induit par un laser à 808 nm (**Figure 5**).

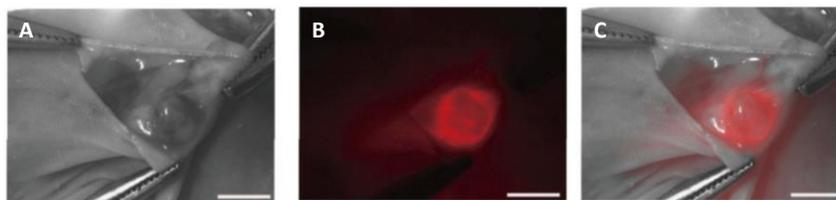


Figure 5 : Images intra-opératoire de tumeurs SKOV3 chez la souris après administration des FA-IR780-NP. (A) Exposition des tumeurs gliales à la lumière blanche, (B) au proche infra-rouge et (C) superposition des images A et B [49].

Les recherches menées dans ce domaine sont prometteuses et en perpétuelle évolution mais nécessitent encore des mises au point avant de pouvoir envisager des essais cliniques [50].

2. La chimiothérapie

Le traitement des cancers par chimiothérapie représente d'après l'INCa 2 538 329 séances effectuées en 2016 soit 39,4% de l'activité hospitalière. Elle est principalement employée pour cinq types de cancers tels que : les cancers digestifs (24%), du sein (21%), hématologiques (19%), de l'appareil respiratoire (14%) et gynécologiques (7%).

La chimiothérapie a pour objectif d'empêcher les cellules cancéreuses de proliférer ou bien de les éradiquer. C'est un traitement médicamenteux qui va pouvoir agir dans l'ensemble de l'organisme par administration de médicaments appelés agents anticancéreux. Différentes classes de médicaments pour la chimiothérapie sont employées comme les agents alkylants, les antimétabolites, les inhibiteurs de topoisomérases, les alcaloïdes végétaux et les antibiotiques anti-tumoraux. Ces substances agissent généralement en inhibant la division du noyau des cellules (mitose) et la synthèse de l'ADN pour provoquer l'apoptose des cellules cancéreuses. Les agents chimiothérapeutiques les plus couramment utilisés sont le paclitaxel, la doxorubicine, la daunorubicine, le cisplatine et le docétaxel. Le paclitaxel et le docétaxel sont tous deux des taxanes qui induisent une stabilisation des microtubules afin d'empêcher la mitose de passer de la métaphase à l'anaphase [51]. La doxorubicine et la daunorubicine appartiennent à la classe des anthracyclines. Ces molécules sont parmi les médicaments les plus efficaces, ils provoquent le plus haut degré de cytotoxicité et sont utilisés pour traiter une grande variété de tumeurs telles que le lymphome, le cancer du sein et la leucémie myéloblastique [52]. La doxorubicine quant à elle est utilisée pour cibler le complexe topoisomérase-II-ADN. Ce médicament permet d'induire des perturbations au niveau de l'ADN et d'empêcher la réplication cellulaire [53]. Le cisplatine agit aussi sur la modification de l'ADN cellulaire et déclenche les voies de signalisation qui conduisent à l'apoptose [54]. L'administration de ces anticancéreux peut avoir lieu par injection intraveineuse (perfusion, cathéter) ou bien par administration orale (comprimés ou gélules). La durée de la chimiothérapie va dépendre du type de cancer et des agents anticancéreux utilisés, elle peut être effectuée à l'hôpital en ambulatoire ou lors d'une hospitalisation. Par ailleurs, la chimiothérapie est employée seule ou bien en association avec la chirurgie et/ou la radiothérapie (radiochimiothérapie). Elle peut être utilisée avant la chirurgie (néo-adjuvante) pour faciliter l'ablation de la tumeur ou bien après la chirurgie (adjuvante) pour assurer l'éradication totale de la tumeur et ainsi éviter le risque de récurrence et l'apparition de métastases.

Par rapport aux autres traitements, la chimiothérapie permet également de traiter les métastases (chimiothérapie métastatique) qui peuvent se développer dans d'autres parties de l'organisme.

2.1 Les NP et leurs applications en chimiothérapie

Les principaux inconvénients liés à l'utilisation des agents chimiothérapeutiques est leur incapacité à différencier les tissus sains des tissus tumoraux. Ils auront une action sur toutes les cellules et en particulier celles à prolifération rapide comme les cellules épithéliales intestinales, les cellules de la moelle osseuse et les cellules des cheveux. Les agents les plus cytotoxiques (ex : doxorubicine) sont souvent les plus efficaces mais entraînent souvent des effets indésirables (nausées, fatigue, cardiotoxicité). De plus, les agents chimiothérapeutiques sont souvent très peu solubles en milieu aqueux et toxiques à très forte dose. Tous ces inconvénients sont autant de paramètres à prendre en compte pour diminuer les effets indésirables de la chimiothérapie et offrent l'opportunité aux nanotechnologies de surmonter ce défi. Les liposomes et les NP polymères sont de loin les plus étudiées pour l'administration de médicaments anticancéreux.

Ces NP possèdent des propriétés optimales en termes de taille et de surface permettant d'améliorer la biodistribution des médicaments. Elles possèdent notamment la particularité de pouvoir encapsuler les médicaments afin de les protéger des éventuelles dégradations par les enzymes et les macrophages, et de diminuer leur clairance rénale. L'enrobage permet également de résoudre les problèmes de solubilité et de toxicité. De plus, ces NP sont capables d'adresser les médicaments de manière sélective jusqu'aux cellules cancéreuses en utilisant la physiopathologie unique des tumeurs. En effet, elles sont connues pour disposer de manière naturelle d'une perméabilité et d'une rétention accrue dans le microenvironnement tumoral (effet EPR).

a. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules constituées d'une bicouche phospholipidique (50-100 nm) similaire à celle des membranes biologiques et disposant également d'un compartiment interne aqueux. Ils sont classés selon la taille et le nombre de compartiments, il existe des liposomes multi-, oligo- ou uni-lamellaires. De par leur nature amphiphile ils peuvent à la fois transporter des médicaments hydrophiles piégés dans le compartiment aqueux et hydrophobes dissous dans la membrane. Leurs propriétés physico-chimiques leur confèrent une excellente circulation et pénétration ainsi que de bonnes propriétés de diffusion.

La première NP liposomale à usage clinique maintenant considérée comme l'un des systèmes chimiothérapeutiques les plus compétitifs concerne un liposome pégylé incorporant de la doxorubicine (DOXIL[®]) approuvé par la FDA en 1995. Il est utilisé comme traitement pour une large gamme de cancers (sarcome, sein, myélome et ovaire) [5]. Le Myocet[®], un autre liposome comportant de la doxorubicine ainsi que le DaunoXome[®], un liposome non PEGylé comportant de la daunorubicine, sont aussi actuellement utilisés en clinique pour le traitement du cancer du sein métastatique, du sarcome de Kaposi lié au SIDA [55–57]. Depuis ces dix dernières années, d'autres liposomes ont été approuvés pour une utilisation clinique, tels que le Lipusu[®], ce liposome à base de paclitaxel approuvé en Chine en 2006 pour le traitement des cancers du sein, du poumon et de l'ovaire [58].

Le Mepact®, un liposome à base de mifamurtide (muramyl tripeptide phosphatidyléthanolamine, MTP-PE), approuvé par l'EMA en 2009 et indiqué dans le traitement d'ostéosarcomes [59]. Mais également en 2012 le Marqibo® à base de vincristine pour le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques [60], en 2015 l'Onivyde®, un liposome PEGylé comportant de l'irinotécan, indiqué en seconde ligne à la gemcitabine pour les cancers pancréatiques métastatiques [61]. Très récemment, le Vyxeos® approuvé en 2017 et utilisé dans le cas de leucémies aiguës myéloblastiques grâce à l'action combinée de la daunorubicine et de la cytarabine [62] (**Tableau 1**).

<i>Nom commercial</i>	<i>Médicament chimiothérapeutique</i>	<i>Indication thérapeutique</i>	<i>Statut</i>
Doxil	Doxorubicine	Sarcomes de Kaposi lié au SIDA, myélome, cancer du sein et de l'ovaire	Approuvé aux Etats-Unis en 1995
DaunoXome	Daunorubicine	Sarcome de Kaposi lié au SIDA	Approuvé aux Etats-Unis en 1996
Myocet	Doxorubicine	Cancer du sein métastatique	Approuvé en Europe et au Canada en 2000
Lipusu	Paclitaxel	Cancer du sein, de l'ovaire et du poumon	Approuvé en Chine en 2006
Mepact	Muramyl tripeptide phosphatidyléthanolamine	Ostéosarcome	Approuvé en Europe en 2009
Marqibo	Sulfate de vincristine	Leucémie aiguë lymphoblastique	Approuvé aux Etats-Unis en 2012
Onivyde	Irinotécan	Cancer pancréatique métastatique	Approuvé aux Etats-Unis en 2015
Vyxeos	Daunorubicine/Cytarabine	leucémie aiguë myéloblastique	Approuvé aux Etats-Unis en 2017

Tableau 1 : Liposomes utilisés en clinique pour la chimiothérapie [63].

Cependant, toutes ces NP lipidiques possèdent en général une solubilité importante et sont rapidement éliminées de la circulation sanguine [64,65]. Pour surmonter cet inconvénient, la surface des liposomes peut être modifiée avec des polymères et également avec des ligands (anticorps, peptides, vitamines, sucres) [66] afin d'augmenter la délivrance spécifique des médicaments [67]. Actuellement, d'autres liposomes chimiothérapeutiques basés sur l'effet EPR mais utilisant aussi des ligands de ciblage (ciblage actif) sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques (**Tableau 2**).

Nom du produit	Ligand	Médicament chimiothérapeutique	Indication thérapeutique	Phase clinique
<i>ATI-1123</i>	-	Docétaxel	Tumeurs solides	I
<i>IHL-305</i>	-	Irinotécan	Tumeurs solides	I
<i>INX-0076</i>	-	Topotécan	Tumeurs solides	I
<i>INX-0125</i>	-	Vinorelbine	Tumeurs solides	I
<i>LiPlaCis</i>	-	Cisplatine	Tumeurs solides	I
<i>MM310</i>	Ephrine A	Docétaxel	Tumeurs solides	I
<i>Immunoliposome anti-EGFR</i>	Anticorps (EGFR)	Doxorubicine	Tumeurs solides	I
<i>LEP-ETU</i>	-	Paclitaxel	Cancer du sein, de l’ovaire et du poumon	I/II
<i>CPX-1</i>	-	Irinotecan/Floxuridine	Cancer colorectal	II
<i>LE-DT</i>	-	Docétaxel	Cancer du pancréas et de la prostate	II
<i>LE-SN38</i>	-	SN38 (métabolite actif de l’irinotécan)	Cancer colorectal	II
<i>EndoTAG-1</i>	-	Paclitaxel	Cancer du pancréas, du foie et du sein triple négatif	II
<i>MBP-426</i>	Transferrine	Oxaliplatine	Cancer gastrique	II
<i>MM-302</i>	Anticorps (HER2)	Doxorubicine	Cancer du sein HER2	II/III
<i>ThermoDox</i>	-	Doxorubicine	Carcinome hépatocellulaire	III
<i>Lipoplatin</i>	-	Cisplatine	Cancer du poumon	III

Tableau 2 : Exemples de liposomes en phase clinique pour la chimiothérapie [68].

b. Les NP polymères

Les polymères employés pour la synthèse de NP polymères peuvent-être classés selon deux catégories : naturels et synthétiques.

Les polymères naturels les plus utilisés sont les protéines (ex : l’albumine) et les glycanes (ex : cyclodextrine). L’Abraxane® est la première NP constituée d’albumine et à base de paclitaxel approuvée par la FDA en 2005. Elle est utilisée dans le traitement par chimiothérapie pour les cancers du sein, du poumon et du pancréas [69]. Le succès rencontré avec ce traitement a ouvert la voie au développement d’autres NP d’albumine dont certaines sont actuellement en phase clinique comme ABI-008 et ABI-009 développées par les entreprises Abraxis et Celgene aux Etats-Unis (Tableau 3). Cependant, il n’existe pas encore de NP à base de glycanes qui soient approuvées pour la chimiothérapie. Une seule NP à base de cyclodextrine incluant de la camptothécine (CRLX-101, Cerulean Pharma, Etats-Unis) est répertoriée comme étant en phase clinique I/II pour les tumeurs solides malignes [70].

Type de NP	Nom du produit	Médicament chimiothérapeutique	Indication thérapeutique	Phase clinique
NP d'albumine	ABI-008	Docétaxel	Cancer du sein métastatique et de la prostate	I
	ABI-009	Rapamycine	Tumeurs solides et cancer de la vessie	I/II
NP de cyclodextrine	CRLX-101	Camptothécine	Tumeurs solides et cancer du rectum	I/II
NP polymère synthétique	Docetaxel-PNP	Docétaxel	Tumeurs solides	I
	Nanotax	Paclitaxel	Carcinose péritonéale	I
	DTX-SPL8783	Docétaxel	Tumeurs solides	I/II
	DHAD-PBCA-NP	Mitoxantrone	Carcinome hépatocellulaire	II
	Transdrug BA-003	Doxorubicine	Carcinome hépatocellulaire	III
Micelle polymère	NK-911	Doxorubicine	Tumeurs solides	I
	Nanoxel	Paclitaxel	Cancer du sein	I
	NC-4016	Oxaliplatine	Tumeurs solides et lymphome	I
	Lipotecan	TLC388 (dérivé de la camptothécine)	Cancer du foie et du rein	II
	NK-012	SN38	Tumeurs solides et cancer du sein et du poumon	II
	Nanoplatin	Cisplatine	Cancer du pancréas	I/II
	NK-105	Paclitaxel	Cancer de l'ovaire	III
	Paclical	Paclitaxel	Cancer de l'ovaire	III

Tableau 3 : Exemples de NP polymères en phase clinique pour la chimiothérapie [68].

Les polymères synthétiques biodégradables les plus utilisés dans la formulation de NP polymères sont l'acide polylactique (PLA), la polyéthylèneimine (PEI), l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PGA), le polyéthylène glycol (PEG), et également des copolymères comme le N-(2-hydroxypropyl)-méthacrylamide (HMPA) et le poly(styrène-co-anhydride maléique). C'est en 1993 qu'a été approuvée au Japon la première NP polymère constituée de poly(styrène-co-acide maléique) et de néocarzinostatine (SMANCS®) pour traiter les cancers du foie et du rein [71,72]. Depuis, d'autres NP polymères sont entrées en essais clinique comme par exemple PK1 et PK2 (UK Cancer Research, Royaume Uni et Pfizer, Etats-Unis), des NP polymères à base d'HMPA et de doxorubicine. PK1 a d'abord été développée et permet de diminuer significativement la toxicité cardiaque ainsi que la chute des cheveux pendant la chimiothérapie [73]. L'étude de phase II est en cours sur des patients atteints des cancers colorectal, du sein et du poumon [74]. PK1 a ensuite été modifiée pour réaliser du ciblage actif en incorporant un ligand de type galactosamine afin de cibler spécifiquement le foie. Cette NP (PK2) est aussi en phase clinique II pour le traitement du carcinome hépatocellulaire [75].

Les NP polymères comprennent aussi les micelles polymères constituées d'une coque hydrophile qui va servir à stabiliser le cœur hydrophobe et à rendre soluble les polymères. En 2007, le Genexol-PM® est la première micelle polymérique à base de paclitaxel qui fut approuvée en Corée du Sud pour le traitement des cancers du sein et du poumon. Actuellement, d'autres micelles polymères sont en phase clinique avancée, telle la Nanoplatin® (NanoCarrier, Etats-Unis) en phase clinique III sur des patients atteints du cancer du pancréas. Les études cliniques de phase I de cette NP ont montré qu'elle permettait de diminuer significativement les risques de toxicité normalement engendrés par le cisplatine [76]. La même compagnie est également en train de réaliser une étude de phase I sur une micelle polymère contenant cette fois-ci de l'oxaliplatine (NC-4016). Comme pour les liposomes, des micelles polymères comportant des ligands sont aussi de plus en plus développées pour tenter d'améliorer le ciblage tumoral.

Dans ce contexte, deux NP sont actuellement en phase clinique. BIND-014 (Bind Therapeutics, Etats-Unis) est la première de ces NP en phase clinique, elle comporte du docétaxel et un ligand de l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA). Cette NP s'est montrée efficace sur des tumeurs solides exprimant le PSMA [77]. Elle est maintenant en phase clinique II pour le cancer de la prostate et du poumon à petites cellules aussi connu pour exprimer ce récepteur. La seconde micelle polymère (SP1049C, Supratek Pharma, Canada) utilise un ligand ciblant spécifiquement la glycoprotéine-P pour délivrer la doxorubicine. Les résultats de l'étude de phase II ont montré une meilleure activité antitumorale par rapport à l'utilisation de la doxorubicine seule sur des patients atteints d'adénocarcinomes [78]. Une étude clinique de phase III est en cours.

Même si la plupart des NP en essais cliniques sont principalement des liposomes et des NP polymères, les dendrimères semblent également prometteurs pour la délivrance d'anticancéreux. Ces polymères synthétiques hautement ramifiés possèdent une architecture en couches comprenant un noyau central, une région interne et de nombreux groupes terminaux leur permettant une fonctionnalisation par une grande variété de molécules telles que des ligands et des anticancéreux. DTX-SPL8783 (Starpharma, Australie) est actuellement le seul dendrimère à base de docétaxel en étude de phase clinique I/II sur des cancers avancés [79].

3. Les thérapies ciblées

Ces sont dans les années 2000 qu'ont été autorisées les premières thérapies ciblées afin de compléter les traitements existants. C'est un traitement de seconde intention puisqu'il va essentiellement concerner les patients pour lesquels les premiers traitements « standards » n'ont pas été efficaces ou cessés de l'être pendant leur parcours de soin. Les thérapies sont dites « ciblées » puisque contrairement aux traitements conventionnels elles vont agir plus spécifiquement sur les mécanismes directs de l'oncogénèse et limiter ainsi les dommages sur les cellules normales. Cette spécificité permet d'engendrer moins d'effets secondaires par rapport aux autres traitements utilisés contre le cancer. Cette thérapie est également appelée « médecine de précision » puisqu'elle a pour but de proposer aux patients un traitement individualisé, en fonction des anomalies spécifiques de leur tumeur.

En effet, les thérapies ciblées s'appuient sur une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la progression tumorale. Les nombreuses années de recherche dans ce domaine ont conduit au développement de différentes approches ciblées afin de bloquer les mécanismes impliqués dans la propagation des cellules tumorales. Ainsi, les cibles de ces thérapies peuvent-être intracellulaires (gènes, transférases, kinases) ; dans ce cas, l'inhibition des différents mécanismes d'activation des processus cancéreux sera assurée par des petites molécules capables de traverser la membrane cellulaire. Pour des cibles extracellulaires (facteurs de croissance, récepteurs aux facteurs de croissance, antigènes), de plus grandes molécules telles que des AcM seront utilisés.

3.1 Les anticorps monoclonaux (AcM)

Les AcM font partis des thérapies ciblées les plus efficaces. Ils vont être capables de reconnaître spécifiquement les cellules cancéreuses en interagissant avec les récepteurs présents à leur surface. La liaison spécifique de ces anticorps aux cellules cancéreuses peut alors induire plusieurs mécanismes d'action possibles : une inhibition de la transduction de signaux, une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales ou bien permettre la délivrance intracellulaire de molécules toxiques qu'ils transportent. Les principaux AcM approuvés par la FDA et utilisés en oncologie sont regroupés dans le **Tableau 4**.

AcM	Cible	Type	Indication thérapeutique principale	Année d'approbation par la FDA
<i>Trastuzumab (Herceptin®)</i>	HER2	Humanisé	Cancer du sein	1998
<i>Cetuximab (Erbix®)</i>	EGFR	Chimérique	Cancer colorectal	2004
<i>Panitumumab (Vectibix®)</i>	EGFR	Humanisé	Cancer colorectal	2006
<i>Bevacizumab (Avastin®)</i>	VEGF	Humanisé	Cancer colorectal, du sein et du poumon	2004
<i>Rituximab (Mabthéra®)</i>	CD20	Chimérique	Lymphome Non-Hodgkinien	1997
<i>Alemtuzumab (Campath®)</i>	CD52	Humanisé	Leucémie lymphatique chronique	2001
⁹⁰ Y-Ibritumomab tiuxétan (<i>Zévalin®</i>)	CD20	Chimérique	Lymphome Non-Hodgkinien	2002
¹³¹ I-Tositumomab (<i>Bexxar®</i>)	CD20	radiomarqué	Lymphome Non-Hodgkinien	2003 (retiré du marché en 2014)
<i>Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg®)</i>	CD33	Humanisé	Leucémie myéloïde aiguë	2000
<i>Brentuximab vedotin (Adcetris®)</i>	CD30	Chimérique	Lymphome Hodgkinien et anaplasique à grandes cellules	2011
<i>Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla®)</i>	HER2	Humanisé	Cancer du sein HER2-positif	2013

Tableau 4 : Principaux AcM utilisés en clinique [80,81].

Les AcM vont pouvoir inhiber la transduction de signaux en se liant par exemple aux récepteurs des facteurs de croissance des cellules tumorales. Ceci a pour effet de bloquer la liaison des ligands endogènes normalement impliqués dans la phosphorylation des récepteurs tyrosine kinase et l'activation de voies de signalisation en aval. Cela concerne notamment le trastuzumab (Herceptin®), qui cible le domaine extracellulaire du récepteur HER2, il s'agit de la première thérapie ciblée autorisée en 2000 dans le traitement du cancer du sein métastatique HER2 positif. Le cetuximab (Erbix®) et le panitumumab (Vectibix®) quant à eux bloquent le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) alors que le bevacizumab (Avastin®) est dirigé contre le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Le rituximab (Mabthéra®) et l'alemtuzumab (Campath®) sont respectivement dirigés contre les antigènes CD20 et CD52 pour le traitement du lymphome non-hodgkinien et de la leucémie lymphatique chronique.

Certains anticorps ne possèdent pas d'activité cytotoxique et sont alors utilisés comme agent de ciblage pour délivrer des radio-isotopes, des toxines, des enzymes ou des médicaments de chimiothérapie directement sur le site tumoral. On peut notamment citer le cas de la radioimmunothérapie (RIT) qui consiste à conjuguer les AcM avec des éléments radioactifs (radionucléides) de haute énergie afin d'irradier spécifiquement des tumeurs. Des radionucléides tels que l'yttrium-90 et l'iode-131 (émetteurs de particules β^-) sont régulièrement choisis pour des applications thérapeutiques.

L'efficacité de la RIT a été démontrée avec le Zévalin® marqué à l'yttrium-90 et le Bexxar® marqué à l'iode-131 pour le traitement du lymphome non-hodgkinien en rechute ou résistant au traitement par le rituximab [82]. Le Bexxar® a cependant été retiré du marché en Février 2014 à cause d'une diminution importante de son utilisation par les oncologues [83]. Toutefois, l'utilisation de ces anticorps radiomarqués se révèle inefficace dans le traitement de tumeurs solides. En effet, leur circulation lente dans le système sanguin et leur faible pénétration intratumorale ont pour effet d'augmenter les risques de radiorésistance et d'hématotoxicité. C'est dans ce contexte qu'a été mise en place la notion de radioimmunothérapie pré-ciblée (PRIT) pour pallier à ces inconvénients. Cette stratégie s'effectue en deux temps en dissociant l'injection des anticorps de celle des radionucléides. Les deux entités vont pouvoir se reconnaître dans l'organisme grâce à l'incorporation au préalable de molécules chimiques spécifiques l'une de l'autre. L'un des premiers systèmes de préciblage développés repose sur l'interaction élevée de la biotine avec la streptavidine ($K_d = 10^{-15}$ M) [84]. Malgré les résultats très convaincants obtenus dans les multiples études cliniques, l'utilisation de la streptavidine engendre des problèmes d'immunogénicité limitant sa transposition en clinique.

Actuellement, le système clinique le plus avancé dans ce domaine repose sur les anticorps bispécifiques dont une partie permet la reconnaissance avec l'antigène tumoral et l'autre partie avec un haptène radiomarqué [85]. Cependant, l'ingénierie de ces anticorps reste laborieuse et coûteuse. Une des méthodes les plus récentes pour la formation de liaisons covalentes spécifiques entre l'anticorps et la molécule radioactive repose sur l'utilisation de la chimie bioorthogonale. Elle est basée sur des réactions chimiques de cycloaddition (IEDDA, *Inverse Electron Demand Diels-Alder* et SPAAC, *Strain Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition*) qui ont pour avantage d'être rapides, spécifiques et inertes envers les macromolécules biologiques. Malgré les succès obtenus dans les nombreuses études précliniques, aucun essai clinique n'a encore été amorcé [86].

Les AcM peuvent aussi être conjugués à des médicaments (Antibody-Drug Conjugates, ADC) et être utilisés comme des agents de ciblage cytotoxiques pour les cellules cancéreuses. La liaison des anticorps aux antigènes des cellules tumorales leur permet d'être internalisés et de libérer la toxine active au niveau intracellulaire. Ceci est le cas pour le Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg®), un anticorps humanisé conjugué à de la calicheamicine (antibiotique antitumoral) ciblant le CD33. Ce traitement s'est révélé efficace pour les patients de 60 ans et plus en rechute atteints de leucémies myéloïdes aiguës [87]. L'Adcetris® est aussi conjugué à un agent anticancéreux, la monométhyl auristatine E. Ce système va cibler spécifiquement les antigènes CD30 pour le traitement de lymphomes hodgkiniens et anaplasiques à grandes cellules [88]. Plus récemment, l'ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla®) lié à un agent chimiothérapeutique, l'emtansine, permet de traiter des patients atteints du cancer du sein HER2-positif et résistants au traitement par le trastuzumab seul [89].

Il y a plus de vingt ans, l'utilisation d'anticorps produits naturellement par le système immunitaire s'est révélée comme une solution thérapeutique intéressante et maintenant efficace pour le traitement de nombreux cancers. Cependant, la faible pénétration intratumorale de ces anticorps ainsi que les problèmes d'immunogénicité qui leur sont associés limitent leur utilisation pour certains types de tumeurs. Des AcM de petite taille (fragments d'anticorps) sont donc en développement afin d'améliorer la pénétration tumorale [90]. Le développement de nouveaux anticorps ne cesse de croître et les recherches dans ce domaine sont encore prometteuses.

3.2 Les petites molécules

Parmi les autres agents utilisés pour la thérapie ciblée anticancéreuse, on retrouve aussi de petites molécules capables d'inhiber des réactions enzymatiques primordiales. Contrairement aux AcM, ces molécules pénètrent plus facilement dans les cellules et ciblent principalement des protéines kinases intracellulaires impliquées dans les mécanismes de prolifération des cellules cancéreuses.

Une dizaine de petites molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase de récepteurs ont été approuvées. Par exemple, l'imatinib (Gleevec®) fut le premier inhibiteur de kinase validé pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique en inhibant l'activité tyrosine kinase BCR-ABL (**Figure 6**). Le gefitinib (Iressa®) et l'erlotinib (Tarceva®) agissent sur le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF) et sont principalement utilisés pour traiter le cancer du poumon. Il existe également des petites molécules inhibitrices de l'angiogénèse (médicaments antiangiogéniques) dont le but est de bloquer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en se liant aux protéines du récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Cela concerne le sorafénib (Nevaxar®) utilisé dans le traitement du carcinome rénal avancé, le sunitinib (Sutent®) pour traiter les tumeurs stromales gastro-intestinales [91]. D'autres molécules ciblent et neutralisent l'enzyme mTOR (*mammalian target of rapamycin*) afin d'empêcher la multiplication anormale des cellules tumorales. Cette sérine-thréonine kinase est connue pour être dérégulée dans de nombreux cancers. Deux inhibiteurs de cette enzyme, le temsirolimus (Torisel®) et l'évérolimus (Afinitor®), disposent actuellement d'une autorisation de mise sur le marché pour des patients atteints de cancer du rein. Toutefois, tous ces agents thérapeutiques sont exposés à des problèmes de résistance, c'est pourquoi d'autres stratégies dites « multi-cibles » sont en développement précliniques et cliniques. Elles consistent par exemple à associer des inhibiteurs de tyrosine kinase entre eux [92] ou à les associer avec des AcM [93,94].

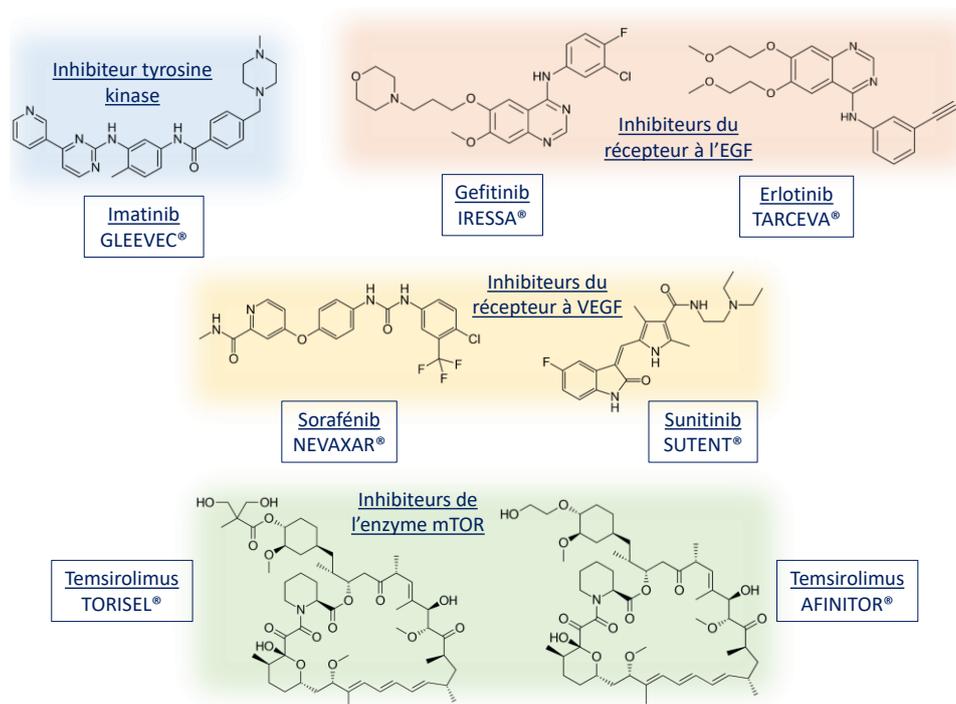


Figure 6 : Exemples de petites molécules inhibitrices de réactions enzymatiques utilisées en clinique.

3.3 Les NP et la thérapie ciblée

Comme mentionné précédemment, la délivrance de molécules anticancéreuses peut être assurée par les NP afin d'augmenter l'accumulation et la libération au niveau tumorale grâce à l'effet EPR. Or, cette capacité de ciblage peut encore être améliorée en ajoutant des biomolécules spécifiques de marqueurs tumoraux à la surface des NP, comme des AcM [95], des aptamères [96] et des peptides [97]. Actuellement, les stratégies de ciblage les plus avancées concernent les récepteurs EGFR, PSMA, transferrine et folate, surexprimés sur les membranes des cellules cancéreuses. De nombreuses NP possédant des ligands de ciblage font l'objet de développements précliniques, mais seules quelques-unes sont en court d'essais cliniques (**Tableau 2**, cf. page 16). En plus de faciliter la délivrance de médicaments anticancéreux, d'autres molécules thérapeutiques comme les peptides, les protéines mais aussi les ADN et ARN (thérapie génique) peuvent également être véhiculées (**Figure 7**).

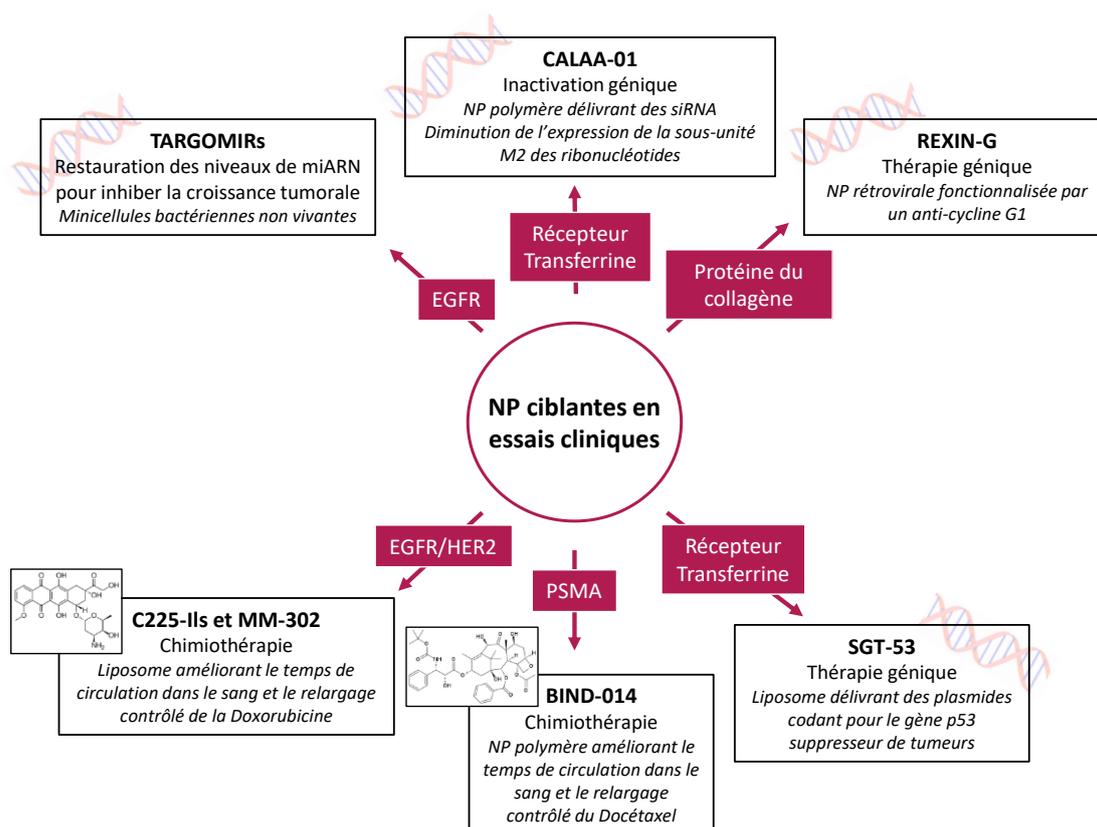


Figure 7 : Exemples de NP ciblantes en essais cliniques utilisées pour la délivrance d'agents thérapeutiques. Adaptée de Biffi et al., 2019 [98]. EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor; HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2; PSMA: Prostate-Specific Membrane Antigen.

Même si la plupart des études cliniques comprend essentiellement des NP ciblant organiques (liposomes, micelles et NP polymères), beaucoup d'études précliniques sont en cours sur les NP inorganiques comprenant un ligand de ciblage pour améliorer la thérapie. Il s'agit plus particulièrement des NP métalliques (or et argent) et magnétiques (USPIO, SPIO) dont les propriétés permettent d'exploiter d'autres types de thérapies. Cela concerne notamment la radiothérapie, la thermothérapie (ou hyperthermie) et la thérapie photodynamique.

En radiothérapie, il n'existe actuellement aucune NP ciblant qui soit en essai clinique. Parmi les nombreux essais précliniques, on retrouve des NP ciblant qui permettent de véhiculer un élément radioactif (^{177}Lu , ^{90}Y) [46] ou bien qui sont utilisées comme agents radiosensibilisants comme les NP d'or [99]. Elles permettent également avec les NP magnétiques d'effectuer de la thermothérapie ciblée pour détruire les cellules cancéreuses [100,101]. Cette technique consiste à engendrer un échauffement local de quelques degrés (autour de 45°C), en activant les NP situées dans la zone tumorale par un signal extrinsèque (ex : laser ou magnétique). Cependant, l'hyperthermie permet seulement de détruire une partie des cellules cancéreuses. En effet, les cellules cancéreuses résiduelles acquièrent rapidement une résistance au stress thermal limitant ainsi l'efficacité thérapeutique de la thermothérapie. Cette dernière est ainsi très souvent couplée à la chimiothérapie comme le montre Yang *et al.* en 2009. Dans cette étude, les auteurs ont synthétisé une NP constituée d'une matrice polymère de type PLGA (acide polylactique-co-glycolique) enrobant un agent chimiothérapeutique (doxorubicine). La matrice est elle-même entourée d'une couche d'or à la surface de laquelle est conjugué un anti-EGFR (Cetuximab). L'anticorps permet d'inhiber les voies de signalisation impliquées dans la croissance tumorale. L'effet photothermal est apporté par la couche d'or et permet à la fois de détruire efficacement la tumeur et de libérer la doxorubicine de la matrice polymère [102].

Quant à la thérapie photodynamique, elle est basée sur l'utilisation de molécules photosensibilisantes (PS) appelées agents photodynamiques qui induisent la fabrication d'espèces oxygénées réactives (oxygène singulet et radicaux libres) après absorption d'un rayonnement lumineux, conduisant à la destruction des cellules [103]. Les NP vont avoir pour rôle de véhiculer ces molécules photo-sensibilisantes. Mangadlao *et al.* ont par exemple mis au point des NP d'or ciblant le PSMA et encapsulant un agent photodynamique (Pc4). L'ajout du ligand à la surface des NP permet l'absorption spécifique par les cellules tumorales ainsi qu'une destruction plus efficace par thérapie photodynamique [104].

À l'heure actuelle, peu de NP utilisant le ciblage actif font l'objet d'essais cliniques pour la délivrance d'agents thérapeutiques. Cependant, les nombreux essais précliniques en cours montrent que de nouveaux types de NP tels que les exosomes, apparaissent comme des systèmes prometteurs et innovants pour l'amélioration de la thérapie [105].

4. La radiothérapie

La radiothérapie est une méthode de traitement des cancers utilisée depuis plus de 100 ans, basée sur l'utilisation de rayonnements ionisants pour détruire les cellules tumorales ou pour stopper leur multiplication. Elle occupe l'une des toutes premières places comme outil thérapeutique contre le cancer, avec la chirurgie et la chimiothérapie. En France, environ 200 000 patients sont traités par radiothérapie chaque année et 40% d'entre eux en ressortent soignés [106]. Cependant, même s'il s'agit d'un traitement fréquent il n'est pas utilisé en première intention en raison des formes multiples et variées du cancer. En effet, son utilisation va dépendre de l'état général de la personne, du stade d'évolution, de la localisation et du type de tumeur [107].

On distingue trois modalités de radiothérapie : la radiothérapie externe (RE), la curiethérapie (ou radiothérapie interne) et la radiothérapie métabolique (ou radiothérapie interne vectorisée, RIV). Concernant la RE, les rayons sont émis en faisceau par un générateur de particules externe à l'organisme et traversent la peau pour atteindre la tumeur. Cette méthode diffère de la curiethérapie, où les rayons sont émis par une source radioactive scellée (iridium, iode-125) implantée directement à l'intérieur de l'organisme, à proximité de la tumeur. Quant à la RIV, elle consiste à administrer une substance ciblante porteuse de radioactivité par voie orale ou par injection intraveineuse pour qu'elle se fixe préférentiellement sur les cellules cancéreuses pour les détruire [108]. L'utilisation de l'une ou de l'autre de ces trois techniques de radiothérapie dépendra de la localisation de la tumeur.

4.1 Généralités

Plus de la moitié des patients atteints d'un cancer reçoivent un traitement par radiothérapie [109]. De façon générale, la radiothérapie est basée sur l'émission d'un rayonnement constitué soit de particules en mouvement (électrons, protons...) soit d'ondes (photons) quelle que soit la source utilisée. En se propageant dans le corps humain, ce rayonnement dépose tout au long de son trajet de l'énergie de façon plus ou moins profonde dans la matière. La traversée de ce rayonnement et l'énergie qu'il dépose au sein du tissu sain ou tumoral, endommage le matériel génétique (ADN) des cellules [11]. Une lésion provoquant la cassure des deux brins de la double hélice d'ADN est néfaste pour la cellule ; qui n'est alors plus capable de se diviser. Ce traitement entraîne la mort cellulaire.

C'est un traitement dit loco-régional, c'est-à-dire que son action se limite à la tumeur que l'on irradie et à la région avoisinante. Elle diffère donc de la chimiothérapie qui elle va agir sur l'ensemble de l'organisme de manière systémique [110]. Elle constitue un traitement de référence pour le cancer de la prostate, et est souvent associée à l'hormonothérapie [111] pour des stades localement avancés et des cancers à haut risque. Elle est aussi fréquemment utilisée pour les cancers du sein, et quasiment toujours réalisée sur la glande mammaire après une chirurgie conservatrice. Pour diminuer le risque de récurrence, une irradiation additionnelle est souvent administrée dans la région où la tumeur a été retirée pour détruire les cellules cancéreuses qui pourraient rester suite à l'intervention [112]. Dans le cas du cancer du col de l'utérus, la RE peut aussi être utilisée. On fait appel à la radiothérapie conformationnelle en trois dimensions (3D) consistant à faire correspondre le plus précisément possible le volume de la tumeur au volume sur lequel vont être dirigés les rayons. Le but est de pouvoir administrer une dose plus élevée à la tumeur sans irradier les tissus voisins [113]. Ce type de RE sera aussi utilisé pour traiter le cancer de l'estomac localement avancé après la chirurgie en association avec la chimiothérapie. A terme la radiothérapie permet de préserver l'organe atteint, de contrôler la maladie cancéreuse sur le plan local (tumeur primitive) et régional (ganglions), de prévenir l'extension métastatique et de réduire la mortalité [114]. Dans le cas des tumeurs très avancées la radiothérapie est utilisée à titre palliatif pour réduire les symptômes (douleurs, saignements) de la maladie.

Par conséquent, cette technique est répandue pour traiter la majorité des cancers. Bien que les radiations visent à tuer les cellules tumorales, il est inévitable que les tissus sains entourant la tumeur soient également endommagés par les radiations. L'objectif de la radiothérapie est de maximiser la dose aux cellules tumorales tout en minimisant l'exposition aux cellules saines normales.

4.2 Les rayonnements ionisants

Les rayonnements sont dits ionisants lorsqu'ils sont capables d'émettre suffisamment d'énergie dans la matière et notamment les atomes qu'ils traversent pour les transformer en ions. L'arrachement d'un électron du cortège électronique d'un atome rend la matière instable, celui-ci va donc chercher à se stabiliser en émettant différents rayonnements. Ce sont les acides nucléiques (ADN et ARN) des cellules cancéreuses traitées que la radiothérapie va ioniser. Les rayonnements ionisants agissent sur les tissus et engendrent des transformations chimiques et physiques ; c'est pourquoi ils peuvent provoquer des effets biologiques différents sur l'organisme en fonction du type de rayonnement émis et de la dose reçue [115]. La dose de rayons absorbée exprimée en Gray (Gy), correspond à une absorption d'énergie d'1 joule pour une masse de 1 kg ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J.Kg}^{-1}$) [116]. L'ionisation agit sur les tissus en trois phases : une première phase physique, une seconde chimique et une dernière biologique.

a. Effets moléculaires des rayonnements ionisants sur la matière

i. Phase physique : interactions rayonnements-matière

La phase physique fait référence à l'excitation et l'ionisation des atomes des molécules cellulaires qui donnent des radicaux libres très réactifs suite au dépôt d'énergie lors du passage du rayon. Ces événements se font avec une extrême rapidité de l'ordre de 10^{-15} à 10^{-16} secondes. Les rayonnements ionisants sont de deux types : ils peuvent être indirectement ionisants (rayonnements électromagnétiques), constitués de particules non chargées (photons) ou bien directement ionisants (rayonnements particulaires), constitués de particules chargées électriquement (protons, électrons...).

- Rayonnements ionisants électromagnétiques (Photons X ou γ)

L'utilisation de photons de haute énergie (4 à 25 MeV), particules sans masse ni charge, est la modalité d'irradiation la plus utilisée en radiothérapie. Ces constituants des rayonnements électromagnétiques déposent la plus grande partie de leur énergie proche de la surface des tissus sains. Cette énergie diminue ensuite progressivement avec la profondeur des tissus, à l'endroit où se situe la tumeur. On distingue les photons γ , naturellement émis lors de leur désintégration nucléaire par des atomes radioactifs (^{60}Co , ^{137}Cs), et les photons X produits artificiellement par le bombardement d'un métal lourd par un faisceau d'électrons issu de tubes de RX ou d'accélérateurs linéaires. Les différents processus d'interaction des photons avec la matière sont déterminés en fonction de l'énergie du photon incident $h\nu$ et du numéro atomique Z de la cible. En fonction de ces deux paramètres trois effets sont alors prédominants (**Figure 8**) :

- * **L'effet photoélectrique** pour des photons de basse énergie et une cible de haut numéro atomique.
- * **L'effet Compton** pour des photons d'énergie modérée et une cible de numéro atomique intermédiaire.
- * **La production de paires dominantes** pour des photons de haute énergie et une cible de haut numéro atomique.

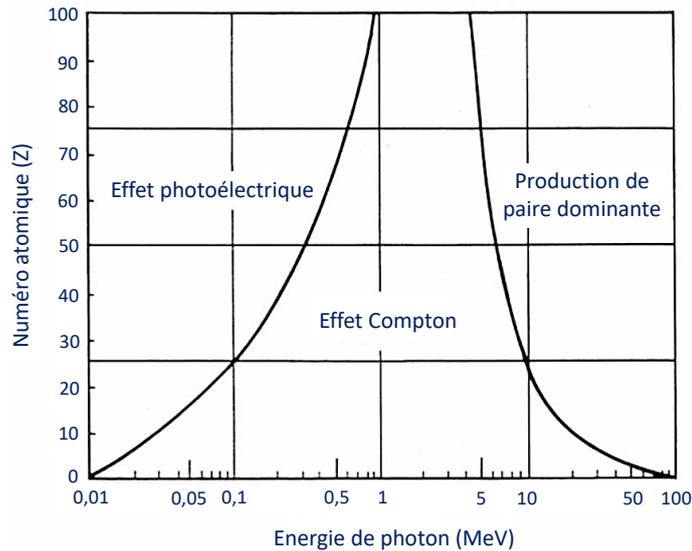


Figure 8 : Régions de prédominance des trois principales formes d'interaction des photons avec la matière.

Lorsqu'un photon incident interagit avec un atome de la matière deux cas de figure sont possibles. Dans la gamme d'énergie des photons utilisés en radiothérapie, l'effet Compton et l'effet photoélectrique sont les deux effets d'interaction photons-matière qui prédominent.

L'effet photoélectrique

L'effet photoélectrique correspond au transfert de l'intégralité de l'énergie du photon incident à un électron fortement lié au noyau atomique (**Figure 9**).

Lors de cette interaction, l'énergie du photon incident supérieure à l'énergie de liaison de l'électron permet d'arracher l'électron de la couche interne de l'atome (**1**), laissant une place vacante qui va être occupée par un électron d'une couche de plus haute énergie lors d'un réarrangement du cortège électronique (**2**). L'énergie générée lors de ce processus cause l'émission d'un rayonnement de fluorescence (photon de fluorescence) ou bien est transférée à un électron d'une couche supérieure qui sera ainsi éjecté de l'atome (émission d'un électron d'Auger) (**3**).

Le photoélectron quant à lui va progressivement perdre son énergie cinétique par interactions avec d'autres atomes du milieu, créant ainsi des ionisations et des excitations secondaires.

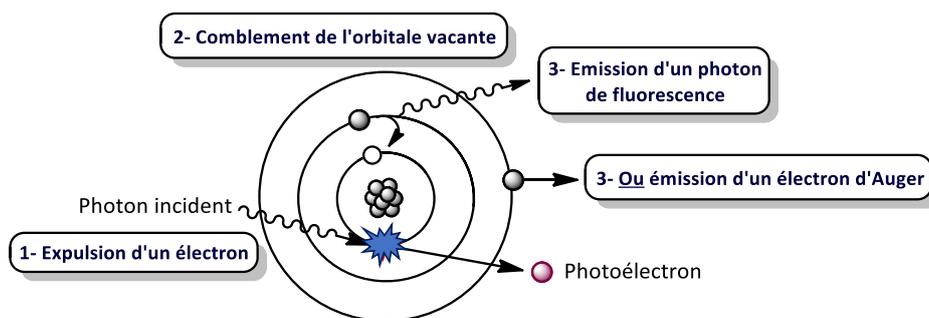


Figure 9 : Effet photoélectrique.

L'effet Compton

L'effet Compton repose sur la collision inélastique entre un photon incident et un électron « libre » ou faiblement lié au noyau atomique comme par exemple les électrons de valence d'un atome (**Figure 10**). Ce processus est un phénomène d'absorption partielle et de diffusion de l'énergie incidente. En effet, au cours de cette interaction, le photon incident transmet son énergie à un électron de la couche périphérique qui est alors éjecté de l'atome en formant un angle φ , appelé angle de recul de l'électron, responsable par la suite des effets biologiques. Dans le même temps, un photon est diffusé en formant un angle ϑ avec la direction incidente, appelé angle de diffusion.

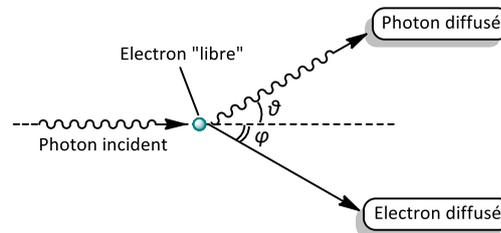


Figure 10 : Diffusion Compton.

La production de paires dominantes (matérialisation)

La production de paires dominantes a lieu lorsqu'un photon très énergétique passe à proximité d'un noyau. Son énergie va alors être totalement absorbée et se matérialiser sous la forme d'une paire particule-antiparticule, autrement dit d'un électron (e^-) et d'un positron (e^+). Ce processus se réalisera uniquement pour des photons dont l'énergie est supérieure ou égale à deux fois la masse au repos du positron ou de l'électron, soit 1022 KeV.

La matérialisation est suivie d'une phase d'annihilation entre le positron et l'électron afin de générer deux photons γ de 511 KeV émis à 180° l'un de l'autre (dématérialisation) (**Figure 11**).

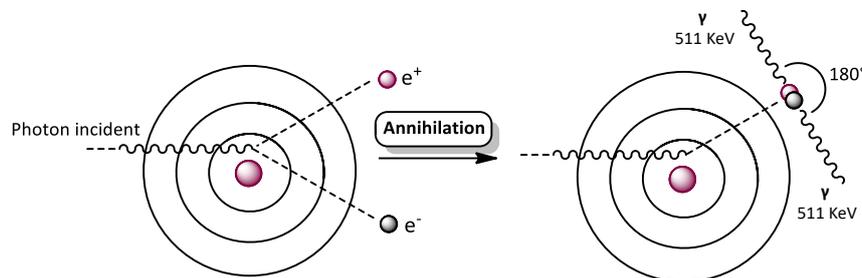


Figure 11 : Création de paires électron-positon.

- Rayonnements ionisants particuliers

L'utilisation de rayonnements ionisants particuliers pour la thérapie est une technique émergente en radiothérapie pour laquelle plusieurs nouveaux centres sont en construction partout dans le monde. Les rayonnements particuliers comprennent à la fois les particules chargées tels que les électrons chargés négativement (-1), les protons chargés positivement (+1), les ions lourds (≥ 2), ainsi que les particules non chargées comme les neutrons. Ils sont principalement utilisés dans le cadre de la RE.

La production de **faisceaux de neutrons** est basée sur l'utilisation de cyclotrons qui vont permettre d'accélérer des protons, ensuite envoyés sur une cible en béryllium et produisant ensuite un spectre secondaire de neutrons. Le transfert d'énergie des neutrons est linéaire à travers les tissus et est approximativement 20 à 100 fois supérieur à celui d'un photon et d'un électron [117]. Ce type de rayonnement particulaire peut donc causer plus de dommages à l'ADN que les photons. En revanche, comme leur dépôt d'énergie est semblable à celui des photons (absence de pic de Bragg), les effets indésirables sur les tissus sains sont généralement plus importants. Actuellement, ce type de traitement est très peu utilisé mais peut-être employé pour certains types de tumeurs radio-résistantes telles que les tumeurs des glandes salivaires, notamment pour les carcinomes adénoïdes kystiques [118] et les glioblastomes [119]. Les principales limitations à utiliser des neutrons sont les difficultés à générer ce type de particules et le coût d'installation des appareils de traitement.

Les **faisceaux d'électrons** comme les photons sont les plus utilisés en radiothérapie conventionnelle. Ils sont produits par des accélérateurs linéaires adaptés pour traiter les tumeurs proches de la surface des tissus. Les électrons vont déposer la majeure partie de leur énergie proche de la surface des tissus, cependant et contrairement aux photons, ils ne vont pas pénétrer profondément dans les tissus [11] (**Figure 12**).

L'utilisation des protons pour la radiothérapie (protonthérapie) a été proposée pour la première fois en 1946 par le physicien Robert Wilson [120]. Les **faisceaux de protons** sont produits par des synchrotrons et des cyclotrons qui permettent l'accélération de ces particules pour qu'elles acquièrent suffisamment d'énergie pour traverser les tissus et avoir une action thérapeutique. Ils sont de plus en plus utilisés pour la thérapie par rapport aux photons du fait d'une meilleure distribution de dose en profondeur, connue sous le nom de pic de Bragg [121] (**Figure 13**) : en fonction de l'énergie initiale, les protons vont déposer un maximum d'énergie en fin de parcours et s'arrêter à une profondeur donnée (**Figure 12**). Ils permettent ainsi de déposer un maximum d'énergie au sein de la tumeur située plutôt en fin de trajectoire tout en minimisant les dommages pouvant être causés au niveau des tissus sains traversés pendant leur passage. La protonthérapie est donc particulièrement employée pour les tumeurs proches des organes sensibles et à risques tels que le nerf optique, le tronc cérébral ou encore la moelle épinière et est également préconisée pour les tumeurs pédiatriques [122].

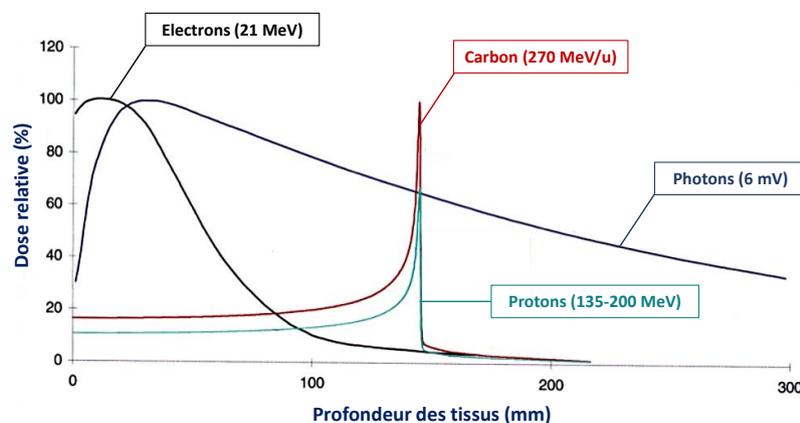


Figure 12 : Energie déposée par différents rayonnements ionisants particuliers au cours de leur pénétration dans les tissus [123]. Le profil de dépôt d'énergie des neutrons n'est pas représenté mais est similaire à celui des photons.

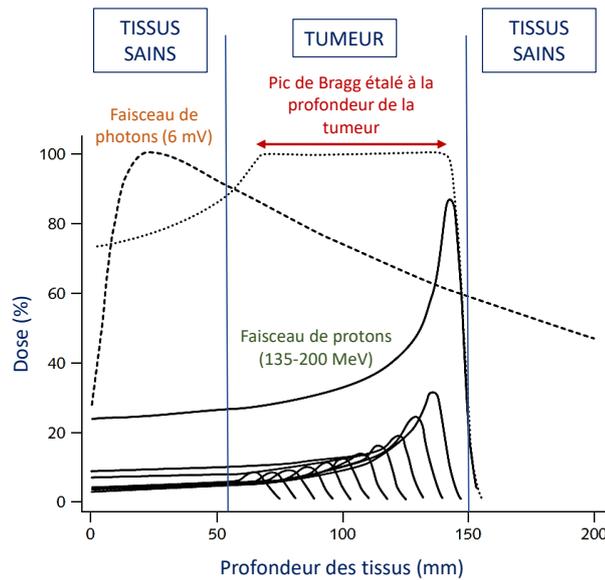


Figure 13 : Distribution de dose en profondeur des protons par rapport aux photons. Adaptée de Thariat et al., 2018 [124] et Terasawa, 2009 [125].

Dans les années 1970, Cornelius A. Tobias a découvert que les particules plus lourdes (charge ≥ 2 : C^{6+} , N^{7+} , Ne^{10+} , Ar^{18+}) pouvaient offrir des avantages supplémentaires pour la thérapie des cancers par rapport aux protons [126]. En effet, les **faisceaux d'ions lourds** sont actuellement utilisés en clinique (hadronthérapie) et concernent essentiellement les ions carbone produits par synchrocyclotrons et synchrotrons. Ces ions plus lourds partagent les propriétés physiques favorables des protons et les avantages biologiques des neutrons [117]. Comme pour les protons, l'énergie déposée par les ions en surface des tissus normaux est faible puis plus élevée dans la zone du pic de Bragg, où la tumeur est localisée. Cependant, les ions lourds ont une diffusion latérale réduite par rapport aux protons, ce qui conduit à une amélioration de la distribution de la dose dans la région tumorale. Comme ces particules sont plus lourdes, les dommages causés au niveau de la tumeur seront plus importants qu'avec les autres formes de rayonnements. La radiothérapie basée sur les ions carbone est notamment employée en clinique pour les tumeurs démontrant une faible radiosensibilité aux faisceaux de photons. Leur utilisation s'est révélée efficace contre de nombreux types de tumeurs tels que les tumeurs de la tête et du cou, de la base du crâne, du poumon, du foie, de la prostate, des os, des tissus mous et des métastases pelviennes du cancer du rectum (adénocarcinome, carcinome adénoïde kystique et divers types de sarcomes) [127]. En 2014, environ 16 000 patients dans le monde ont été traités avec des faisceaux d'ions carbone. Néanmoins, très peu de centres dans le monde proposent ce type de thérapie (France, Allemagne, Chine et Japon), les équipements pour la réalisation de cette technique étant très coûteux [121].

L'efficacité biologique relative (EBR) des rayonnements particuliers correspond au rapport entre la dose produisant un effet biologique (celle des photons comme référence) et la dose de particules chargées requise pour atteindre le même effet biologique. Elle dépend du transfert d'énergie linéaire (TEL), c'est-à-dire de l'énergie transférée par une particule ionisante traversant la matière, par unité de distance ($keV.\mu m^{-1}$).

De ce fait, plus l'énergie cédée localement par la particule incidente est élevée, plus l'efficacité biologique est importante sur les cellules. Les faibles rayonnements TEL ne déposent qu'une quantité relativement faible d'énergie, tandis que les rayonnements hautement TEL déposent des quantités d'énergie supérieures dans les zones ciblées (**Tableau 5**). Par exemple, les protons et les ions carbone possèdent un TEL plus élevé que les photons et les électrons. En effet, ils possèdent une meilleure efficacité biologique en délivrant principalement leur énergie en profondeur dans les tissus.

Types de rayonnement	Modalité	Production	Efficacité biologique relative (EBR)*	Localisation de la dose maximale	Caractéristiques
Rayonnements ionisants électromagnétiques	Photons X/γ	Accélérateurs de particules/radioactivité	1,0	Proche de la surface	Interaction avec les tissus sains situés en amont et en aval de la tumeur
	Electrons	Accélérateurs de particules	1,0	Proche de la surface	Tissus sains épargnés uniquement en aval de la tumeur
Rayonnements ionisants particulaires	Neutron	Cyclotrons	3,0-4,5 [117]	Proche de la surface	Parcours linéaire dans les tissus et interaction importante avec les tissus sains
	Proton	Cyclotrons, synchrotrons	1,1	En profondeur	Tissus sains épargnés
	Ions lourds	Synchrotrons, synchrocyclotrons	≥ 3	En profondeur	Propriétés physiques favorables des protons et avantage biologique des neutrons

Tableau 5 : Comparaison de différentes modalités de radiothérapie.*L'efficacité biologique fait référence à la dose de rayonnement relative (en Gy) requise pour produire le même effet biologique que le rayonnement de photons [121].

Les rayonnements ionisants particulaires ayant une plus grande efficacité biologique par rapport aux photons, leur utilisation est plus adaptée pour les cancers radio-résistants tels que les sarcomes, les carcinomes, les mélanomes et les glioblastomes [127]. Néanmoins, la production de ces formes de radiations reste considérablement plus coûteuse que celle des photons.

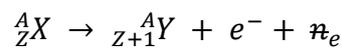
- [Radionucléides pour la radiothérapie interne](#)

Dans le cadre de traitements par radiothérapie interne, la médecine nucléaire reposant sur l'injection de molécules contenant un isotope radioactif (radionucléide) est utilisée. Les radionucléides sont des atomes dont les noyaux sont instables du fait de leur composition relative en protons et neutrons. Ils tentent alors de regagner une configuration plus stable proche de leur composition par l'intermédiaire de la désintégration de leur noyau radioactif entraînant l'émission de rayonnements plus ou moins ionisants. Ces radionucléides sont générés en soumettant les isotopes stables au bombardement de particules d'énergie élevée, soit dans des accélérateurs, soit dans des réacteurs nucléaires. Les principaux radionucléides utilisés pour la thérapie sont des émetteurs de rayonnements β^- , de particules α et d'électrons Auger. L'utilisation thérapeutique de ces rayonnements va dépendre de l'énergie et de la distance qu'ils parcourent à travers la matière (**Tableau 6**).

Type de rayonnement	Nature	$E_{min}-E_{max}$	Distance de parcours dans les tissus	Transfert d'énergie linéique (TEL)
Particules β^-	Electrons énergétiques	50-2300 keV	0,05-12 mm	$\sim 0,2$ keV/ μ m
Particules α	Noyaux d'hélium	5-9 MeV	40-100 μ m	~ 80 keV/ μ m
Electrons d'Auger	Electrons non énergétiques	eV-1 keV	2-500 nm	$\sim 4-26$ keV/ μ m

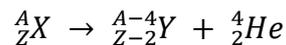
Tableau 6 : Principales caractéristiques des différents types de rayonnements ionisants émis par les radionucléides thérapeutiques. Reproduit d'après Kassis [128].

Les **rayonnements β^-** pouvant être utilisés en radiothérapie proviennent de l'émission d'un électron e^- et d'un antineutrino électronique $\bar{\nu}_e$ due à la transformation d'un neutron en proton dans le noyau [128]. Dans les équations ci-dessous, **A** représente le nombre de masse, **Z** le numéro atomique, **X** le noyau père et **Y** le noyau fils.



Ces particules possèdent un parcours pénétrant beaucoup plus important que les particules α . En effet, les rayonnements β^- possèdent une masse et une charge plus faible ainsi qu'une vitesse plus importante mais demeurent cependant moins ionisants (TEL $\sim 0,2$ keV/ μ m). Une feuille d'aluminium de quelques centimètres d'épaisseur suffit à arrêter ce type de rayonnement (**Figure 14**).

Les **particules α** sont chargées positivement avec une masse et une charge comparable à celle du noyau d'hélium, c'est-à-dire comportant deux protons et deux neutrons (${}^4_2\text{He}^{2+}$). Ce type de rayonnement est émis lors de la désintégration d'un noyau lourd (masse atomique supérieur à 200) présentant un excès de protons, selon l'équation ci-dessous [128] :



Ces rayonnements possèdent un TEL très élevé d'environ 80 keV/ μ m, ils sont donc très ionisants mais possèdent un pouvoir pénétrant plus faible dans les tissus biologiques, de l'ordre de 40-100 μ m, limitant l'irradiation des tissus sains environnants. Les particules α peuvent-être stoppées par une simple feuille de papier.

Enfin, les **électrons Auger** émis lors de la désexcitation d'un atome (cf. page 26) possèdent une énergie plus faible (eV-1 keV) procurant un pouvoir de pénétration inférieur aux électrons β^- et aux particules α . Une efficacité radiothérapeutique de ces électrons est possible s'ils agissent à proximité du noyau (ADN) de la cellule cible [129].

Les différents types de radionucléides couramment utilisés en radiothérapie interne seront exposés plus en détails ultérieurement.

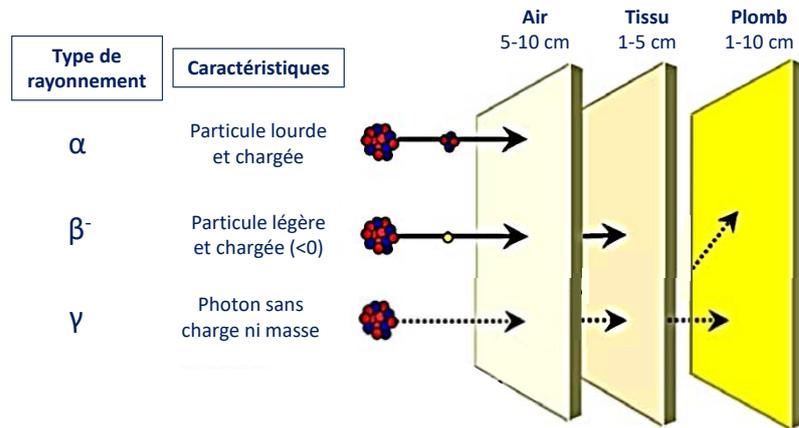


Figure 14 : Parcours dans la matière des émetteurs α , β et γ . Adaptée d'après Treuil et Quelven [130].

ii. Phase chimique : mécanismes d'action sur les cellules

Cette phase correspond à la formation de lésions au niveau des liaisons covalentes des molécules dues aux réarrangements moléculaires lors de la phase physique. Elle se situe 10^{-5} à 1 seconde après l'irradiation. Les rayonnements ionisants vont agir sur la perméabilité de la membrane cellulaire par l'intermédiaire de la dégradation des phospholipides. Cependant, seules les lésions de l'ADN du noyau sont à l'origine des effets biologiques de l'irradiation. Deux effets moléculaires sur l'ADN engendrés par les rayonnements ionisants sont possibles. Ils peuvent détruire et altérer directement le cortège électronique des molécules biologiques (effet direct) ou bien provoquer la radiolyse de l'eau qui génère des radicaux libres qui interagissent avec elles (effet indirect) (Figure 15) [11].

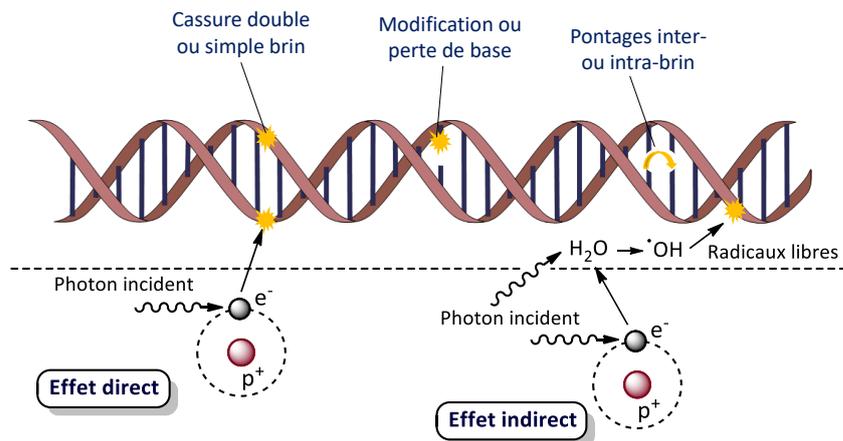


Figure 15 : Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des rayonnements ionisants.

L'effet direct signifie qu'un électron préalablement mis en mouvement par l'absorption d'un photon interagit directement avec la molécule d'ADN. L'effet indirect est quant à lui dû à l'interaction d'un électron avec une molécule d'eau, l'organisme humain étant constitué d'environ 70% d'eau. La radiolyse de molécules d'eau va produire des radicaux libres (oxydants-réducteurs puissants) qui à leur tour vont être capables de provoquer une lésion au niveau de l'ADN.

Ces lésions multiples et plus ou moins localisées peuvent engendrer une altération des bases (méthylation, oxydation...), une destruction des désoxyriboses, des pontages inter- ou intra-brin, des pontages protéine-ADN et des ruptures de liaisons sucre-phosphate (cassure simple ou double brin) [131]. Parmi les lésions engendrées, les lésions « double brin » sont considérées comme responsables de l'effet létal de l'irradiation ; ce sont les plus graves et les plus difficiles à réparer pour la cellule. Les molécules d'ADN sont la base du transfert de l'information génétique lors de la duplication de la cellule et interviennent dans la synthèse des protéines par l'intermédiaire des ARN. Ici, la division cellulaire des tumeurs est alors directement concernée ce qui engendre une altération des chromosomes empêchant les cellules de se multiplier et de survivre. Ainsi, plus l'énergie absorbée par le milieu sera importante plus la probabilité de tuer les cellules le sera également.

iii. Phase biologique : mécanismes de mort des cellules lésées

La phase biologique concerne la mise en route des mécanismes cellulaires pour réparer les lésions engendrées suite aux rayonnements ionisants, pour survivre ou bien mourir. La radiothérapie n'a pas d'effet immédiat sur les cellules cancéreuses. Des heures, des jours et même des semaines de traitement sont parfois nécessaires avant qu'elles ne commencent à mourir. La radiothérapie, comme la plupart des traitements anticancéreux, possède un effet thérapeutique en induisant différents types de réparations et de morts cellulaires [132].

Dans un premier temps, ces lésions cellulaires sont susceptibles d'être complètement réparées afin de restituer le génome de la cellule permettant une restitution dite « *ad integrum* ». En effet, après l'irradiation, la survie cellulaire est assurée par l'activation de l'enzyme P53, un facteur de transcription qui contrôle l'expression de gènes influençant l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la sénescence. Cette enzyme, aussi appelée « gardienne du génome » va stopper la croissance cellulaire afin de corriger les anomalies et réparer les dommages causés à l'ADN [133]. Néanmoins, l'activation de p53 peut-être altérée et entraîner une division cellulaire anormale, notamment lorsqu'elle laisse persister certaines altérations en réparant l'ADN. Ces réparations dites fautive entraînent l'apparition de mutations qui peuvent conduire à la cancérisation secondaire *via* l'instabilité génétique ou à la mort cellulaire [132].

Les lésions radio-induites entraînent la mort cellulaire par deux mécanismes principaux :

- l'apoptose ou « mort cellulaire programmée » qui est un processus actif d'autodestruction de l'ADN. Les tumeurs malignes telles que le lymphome et la leucémie sont connues pour être fortement touchées par ce type de mécanisme [134].
- la nécrose aussi appelée « mort différée » puisque ce phénomène se produit plus ou moins rapidement dans le temps selon la nature des cellules. Le processus de mort cellulaire intervient lorsque la cellule entame un nouveau cycle de division, c'est-à-dire lors de la mitose. La cellule perd sa capacité à proliférer et à répliquer son ADN notamment à cause des cassures d'ADN non réparées et d'aberrations chromosomiques mortelles [133,135].

Les mécanismes de mort cellulaire sont complexes et une identification précise du niveau de mort cellulaire provoqué ainsi que des mécanismes impliqués lors de l'irradiation aident à l'usage approprié de la radiothérapie en clinique.

b. Facteurs influençant les effets biologiques des rayonnements ionisants

Plusieurs facteurs vont impacter l'action biologique des radiations ionisantes sur les tumeurs :

i. La radiosensibilité intrinsèque

Elle va dépendre de la capacité des cellules à réparer ou non les lésions radio-induites et du type de la tumeur. Il existe des tumeurs radiosensibles (embryonnaires et hématolymphoïdes) incapables de réparer les lésions ; des tumeurs dont la radiosensibilité est intermédiaire (carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes), ainsi que des tumeurs radiorésistantes (sarcome et mélanomes) [132].

ii. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est couramment impliqué dans le maintien de l'intégrité génétique des cellules suite à leur exposition aux rayonnements ionisants. En effet, les cellules vont activer certaines enzymes (p53, p21) responsables de l'arrêt temporaire de phases spécifiques du cycle cellulaire pour corriger les dommages liés à l'ADN. Les radiations vont induire en particulier des arrêts en phases G1, S et G2, les cellules étant plus radiosensibles à ces stades du cycle cellulaire. En effet, l'arrêt de la phase G1 empêche la réplication de l'ADN endommagé qui a normalement lieu en phase S, ayant pour effet de provoquer un ralentissement de la synthèse de l'ADN. Quant au blocage temporaire des cellules en G2, il retarde la mitose en empêchant la ségrégation des chromosomes aberrants pendant la phase M. La radiosensibilité des cellules est minimale pour la phase S et maximale pour les phases G2 et M [136].

iii. L'effet oxygène

L'oxygène est indispensable dans les phénomènes physico-chimiques produits directement ou indirectement par les radiations (cf. page 32). Les particules chargées interagissent avec l'oxygène aboutissant à la formation de radicaux à fort pouvoir oxydant tels que les ions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène ($HO\cdot$), le groupe peroxy ($ROO\cdot$) et le groupe alcoxy ($RO\cdot$). Ces radicaux libres interagissent ensuite avec les constituants cellulaires (ADN, ARN, protéines, membrane) provoquant des dysfonctionnements, des lésions et finalement la mort cellulaire [137]. Les tumeurs peu alimentées en oxygène (hypoxiques) sont donc moins sensibles aux rayonnements ionisants et nécessitent une dose jusqu'à 3 fois plus importante qu'une cellule normalement oxygénée pour être détruite. L'hypoxie apparaît comme un facteur majeur de radiorésistance. Pour pallier à cette situation et dans le but d'améliorer l'efficacité antitumorale de la radiothérapie, plusieurs procédés ont été envisagés afin d'augmenter l'oxygénation tumorale (oxygénothérapie hyperbare, augmentation de la concentration en oxygène de l'air respiré, transfusion de culots globulaires) [138].

iv. Les facteurs temps

Le fractionnement et l'étalement sont deux facteurs clés déterminant l'issue de la radiothérapie. En général, la radiothérapie est administrée une fois par jour, 5 jours par semaine, pendant 1 à 8 semaines. Le fractionnement correspond à la répartition de la dose de rayonnement par séance, soit de façon conventionnelle, une fraction par jour de 2 Gy.

Il permet d'éviter les doses trop importantes sur un temps de traitement court et de diminuer les effets secondaires (complications tardives) sur les cellules saines. Différents types de fractionnements existent [139], tels que :

- Le **fractionnement accéléré** qui consiste à raccourcir la durée du traitement global sans changer la dose totale administrée afin de combattre la repopulation tumorale pendant le traitement.
- L'**hyperfractionnement** qui utilise une dose totale plus élevée répartie en 2 séances ou plus chaque jour pendant lesquelles de multiples petites doses quotidiennes (<1,8-2 Gy) sont administrées. Les séances sont espacées d'au moins 6 heures afin de permettre aux cellules saines de se restaurer. Cette technique permet d'augmenter la probabilité d'éradiquer la tumeur (traitement curatif) sans complication tardive.
- L'**hypofractionnement** qui est généralement utilisé comme traitement palliatif afin de soulager les effets d'un cancer avancé. Il consiste à diminuer le nombre de séances et à utiliser des doses plus importantes (>1,8-2 Gy) sur une plus courte période.

L'étalement correspond à la durée totale du traitement et permet d'améliorer l'efficacité biologique des rayonnements ionisants. En effet, la plupart des tumeurs étant à prolifération rapide, un étalement plus court du traitement et l'utilisation de doses plus élevées par séance permettent de dépasser la prolifération des cellules tumorales.

4.3 La radiothérapie interne

La radiothérapie interne se base sur l'utilisation de radionucléides émettant des rayonnements α , β , et γ afin de détruire les cellules cancéreuses (**Tableau 7**). Ce type de radiothérapie est particulièrement employé pour traiter les petites masses tumorales. Différents types de sources radioactives et de techniques de radiothérapie interne peuvent-être appliqués en fonction de la nature et de la localisation de la tumeur.

Type de rayonnement	Radionucléide	Période radioactive ($T_{1/2}$)	Energie
α [129]	Actinium-225 (^{225}Ac)	10 jours	5,83 MeV
	Astate-211 (^{211}At)	7,2 heures	6,76 MeV
	Bismuth-212 (^{212}Bi)	60,5 min	7,8 MeV
	Radium-223 (^{223}Ra)	11,4 jours	5,87 MeV
β [140]	Cuivre-67 (^{67}Cu)	61,9 heures	0,57 MeV
	Iode-131 (^{131}I)	8,02 jours	0,61 MeV
	Lutécium-177 (^{177}Lu)	6,7 jours	0,50 MeV
	Rhénium-188 (^{188}Re)	17 heures	2,13 MeV
	Yttrium-90 (^{90}Y)	64 heures	2,27 MeV
Electrons Auger, γ [141]	Gallium-67 (^{67}Ga)	3,3 jours	8,4 keV
	Indium-111 (^{111}In)	67,3 heures	19 keV

Tableau 7 : Principaux radionucléides utilisés en radiothérapie interne.

Les radionucléides peuvent-êre directement implantés au niveau intratumoral (curiethérapie) ou bien êre véhiculés par un vecteur ayant un tropisme particulier pour une cible cellulaire (RIV). L'objectif principal étant de déposer l'énergie de manière localisée au niveau de la tumeur sans irradier les tissus sains environnants.

a. La curiethérapie

La curiethérapie consiste à introduire la source radioactive scellée dans des tubes à l'intérieur de l'organisme. L'élément radioactif peut êre appliqué dans une cavité naturelle (vagin, trachée, œsophage, bronches et poumons) au contact de la tumeur grâce à un applicateur (curiethérapie endocavitaire) ; ou bien directement implantée dans la tumeur elle-même de manière temporaire ou permanente à l'aide d'un minuscule tube synthétique (curiethérapie interstitielle). C'est notamment le cas pour le cancer du sein traité à l'iridium-192, le cancer de la prostate traité à l'iode-125, et plus récemment au palladium-103 et au césium-131 [142]. La curiethérapie interstitielle est aussi largement employée dans le traitement de cancers liés à l'œil grâce également aux principaux radionucléides regroupés dans le **Tableau 8**.

Radionucléide	Type de rayonnement	Période radioactive ($T_{1/2}$)	Energie moyenne
Césium-131 (^{131}Cs)	γ	9,7 jours	30,4 keV
Iode-125 (^{125}I)	γ	59,4 jours	28 keV
Iridium-192 (^{192}Ir)	γ	740 jours	380 keV
Palladium-103 (^{103}Pd)	γ	17,0 jours	21 keV
Ruthenium-106/Rhodium-106 ($^{106}\text{Ru}/^{106}\text{Rh}$)	β^-	372 jours	3,55 MeV

Tableau 8 : Exemples des principaux radionucléides utilisés pour la curiethérapie [143].

b. La radiothérapie interne vectorisée (RIV)

La RIV aussi appelée radiothérapie métabolique consiste à administrer, par voie orale ou bien intraveineuse, un isotope radioactif couplé à une molécule vectrice afin de cibler et d'irradier spécifiquement les cellules tumorales. Les ligands utilisés peuvent êre des anticorps (radioimmunothérapie, cf. page 19), des fragments d'anticorps, des peptides ou des NP. L'utilisation de vecteurs suffisamment sélectifs rend cette technique intéressante pour traiter en particulier les petites tumeurs et métastases disséminées dans l'organisme.

Ce type de thérapie est notamment connu pour son efficacité sur les tumeurs thyroïdiennes (irathérapie) grâce à l'administration d'iode-131 en complément de la chirurgie. En effet, cet isotope radioactif est spécifiquement capté par les protéines membranaires des cellules thyroïdiennes impliquées dans le transfert intracellulaire de l'iode [144]. L'iode-131 est également utilisé dans le cas du ^{131}I -MIBG (méta-iode-benzyl-guanidine) pour le traitement de tumeurs neuroendocrines telles que les neuroblastomes et les phéochromocytomes.

La molécule de MIBG est utilisée puisqu'elle est un analogue à la noradrénaline, un neurotransmetteur du système nerveux, spécifiquement captée par les cellules neuroendocrines [145].

La fixation des radionucléides à la molécule vectrice est assurée par des chélateurs bifonctionnels et fait appel à la chimie de coordination. La partie chélatante est choisie de façon à assurer la totale complexation du radionucléide grâce à des atomes donneurs comme l'oxygène ou l'azote et afin d'éviter l'éventuelle dissociation du complexe. Les principaux chélatants utilisés sont des polyazamacrocycles comme le DOTA ou des chélatants linéaires comme le DTPA. Les cages de type DOTA sont particulièrement employées pour les radionucléides trivalents comme le lutécium-177, l'indium-111, le gallium-68, l'yttrium-90. C'est notamment le cas des tumeurs neuroendocrines pour lesquelles le traitement peut être assuré par des analogues peptidiques de la somatostatine radiomarqués par des radionucléides grâce à la présence d'agents chélateurs bifonctionnels de type DOTA. En effet, ces récepteurs représentent des cibles potentielles puisqu'ils sont présents à la surface de 80% des tumeurs neuroendocrines et interviennent dans la régulation de la prolifération cellulaire. Dans ce contexte, deux nouveaux analogues de la somatostatine pour le traitement de ces tumeurs neuroendocrines ont été décrits. L'un est marqué à l'yttrium-90 (Y-90-DOTA-Phe1-Tyr3-octreotide ou ^{90}Y -SMT 487, OctreoTher®)[146] et montre une affinité deux fois plus élevée pour les récepteurs du sous-type 2 de la somatostatine [147]. L'autre analogue plus récemment développé est marqué au Lutécium-177 (^{177}Lu -DOTA-Tyr3-octreotate ou ^{177}Lu -DOTATATE, Lutathera®). Il possède une meilleure efficacité thérapeutique sur les petits volumes tumoraux du fait du parcours plus court des particules β émises et limite dans le même temps l'irradiation des tissus sains (**Figure 16**) [148]. Le DTPA peut quant à lui aussi bien être utilisé avec l'indium-111 ou de l'yttrium-90, comme c'est le cas avec le Zévalin®, un anticorps monoclonal contenant du DTPA et marqué à l'yttrium-90.

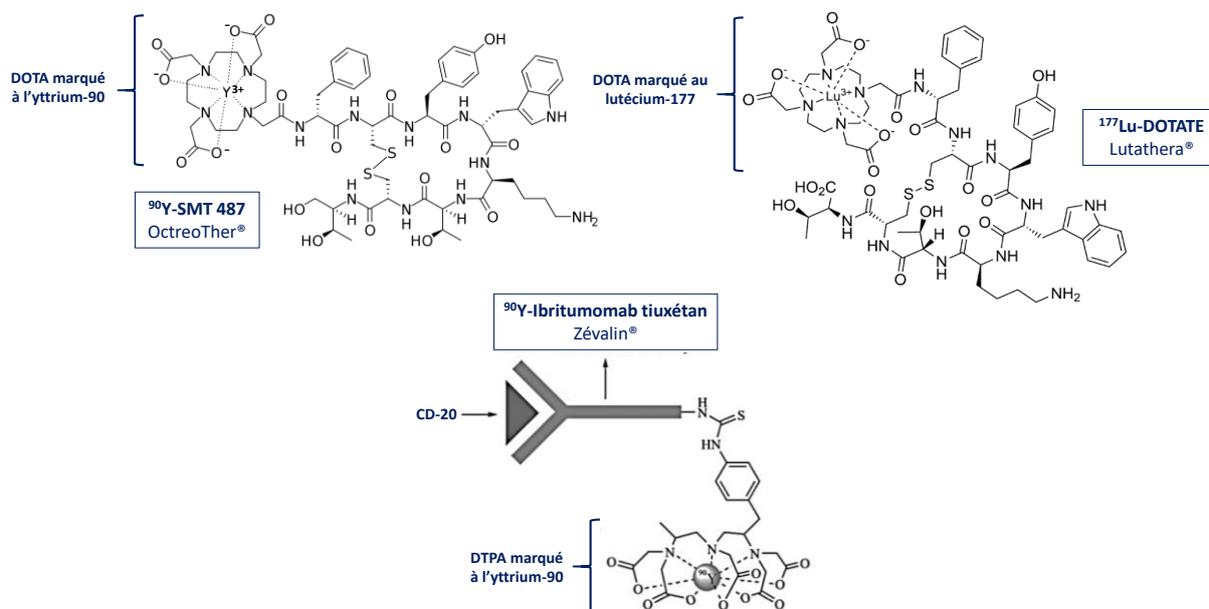


Figure 16 : Structure chimique des deux analogues de la somatostatine utilisés en clinique, l'OctreoTher® marqué à l'Yttrium-90 et le Lutathera® marqué au Lutécium-177 ; et représentation schématique du Zévalin® marqué à l'yttrium-90 et ciblant les antigènes CD-20 pour le traitement du lymphome Non-Hodgkinien [149].

c. Les NP comme vecteurs en radiothérapie interne

Dans ce contexte, les NP ont un rôle à jouer et divers nanomatériaux radiomarqués aussi bien organiques qu'inorganiques sont à l'étude pour le traitement du cancer. L'incorporation de radionucléides (émetteurs α et β) avec des NP peut avoir lieu de quatre façons différentes : chélation, encapsulation, adsorption ou fixation par une liaison covalente (**Figure 17**) [150].

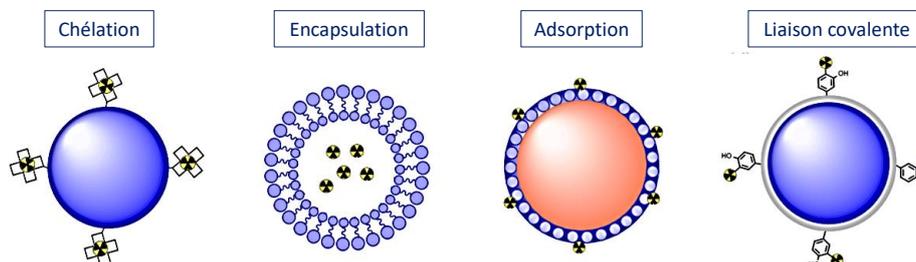


Figure 17 : Les différentes méthodes d'incorporation de radionucléides thérapeutiques sur des NP. Adaptée de Jeon *et al.*, 2019 [150].

Les isotopes radioactifs incorporés dans les NP présentent des propriétés plus favorables *in vivo* par rapport aux radionucléides sans NP. En effet, les NP assurent aux radionucléides une meilleure stabilité et permettent d'éviter les phénomènes de relargage dans l'organisme souvent la cause d'effets indésirables tels que la toxicité et l'irradiation des tissus sains. Par ailleurs, un avantage majeur à utiliser des nanomatériaux radiomarqués réside dans leur capacité à pouvoir contenir et combiner plusieurs éléments radioactifs. De la même façon, différents types de ligands (anticorps, peptides, vitamines) peuvent être conjugués à leur surface afin de délivrer de façon plus précise la radioactivité au niveau des sites tumoraux, en plus de l'effet EPR dont disposent naturellement les NP.

A notre connaissance, il n'existe encore aucune NP radiomarquée qui soit utilisée en clinique dans ce domaine mais des recherches *in vitro* et *in vivo* sont en cours. Dans le cas de l'iode-131, les NP tentent d'être utilisées afin de résoudre les problèmes de déiodation des molécules radiomarquées qui entraînent l'accumulation d'iode-131 dans certains organes comme la thyroïde ou l'estomac. La plupart des NP utilisées sont organiques (albumine, dendrimères, polymères) et incorporent l'iode à leur surface par liaison covalente [150]. Les différentes études *in vivo* réalisées démontrent que l'utilisation de NP pour transporter l'iode-131 se traduit par une augmentation de l'efficacité thérapeutique en partie due à une meilleure pénétration intratumorale [151].

Les émetteurs β^- sont généralement introduits sur les NP par chélation grâce à des chélateurs bifonctionnels (Yttrium-90, Lutécium-177, Holmium-166) ou par encapsulation (Rhénium-188, l'or-198). D'après la revue de Jeon *et al.*, cela concerne plus particulièrement des études précliniques menées sur des NP d'or et lipidiques. Grâce au succès rencontré avec les marqueurs à la somatostatine, des études menées sur des NP d'or radiomarquées au lutécium-177 et comportant comme ligand le peptide Tyr³-octréoate ; se sont montrées particulièrement efficaces dans le traitement de tumeurs gliales *in vivo* [152].

Concernant les émetteurs α , leur coût de production plus élevé et leur disponibilité plus restreinte, rendent les études précliniques encore peu fréquentes dans le domaine des NP. De plus, ces isotopes radioactifs ne pouvant pas être chélatés, des méthodes comme l'encapsulation (Actinium-225) ou bien l'adsorption (Astate-211, Radium-223) sont plutôt utilisées. Depuis quelques années de nombreuses recherches ont été menées sur l'utilisation de l'astate-211 dans le cadre de la radiothérapie vectorisée avec des anticorps. Cependant, ce radionucléide n'a toujours pas d'application en clinique en raison de la mauvaise stabilité de la liaison entre le vecteur et l'astate-211 induisant *de facto* l'irradiation des tissus sains. Récemment, un groupe de recherche a conçu des NP d'or modifiées avec du trastuzumab et radiomarquées à l'astate-211 par adsorption pour le traitement de cancer du sein. Les résultats *in vitro* (cellules SKOV-3) montrent que ces NP sont efficacement internalisées et possèdent une cytotoxicité significativement plus élevée par rapport aux NP non ciblantes [153]. Bien que les NP radiomarquées aient montré des résultats prometteurs pour une utilisation en radiothérapie pour le traitement du cancer, d'autres études sont encore à mener afin d'envisager un passage en clinique. La toxicité à long terme de ces nanomatériaux et l'efficacité de clairance des produits radiomarqués sont des éléments clés qu'il reste à approfondir dans ce domaine [150].

4.4 La radiothérapie externe (RE)

La RE intervient principalement dans le traitement des cancers broncho-pulmonaires, de la vessie, digestifs, gynécologiques, lymphomes, sarcomes et tumeurs osseuses, mais aussi de tumeurs cutanées et cérébrales [114]. Elle est aussi appelée radiothérapie « transcutanée » et utilise un générateur de rayonnement, généralement un « accélérateur linéaire de particules » de haute énergie qui émet les rayons (photons de haute énergie ou électrons) en faisceaux. Ce sont les faisceaux de radiations émis par ce générateur, situé en dehors du corps, qui vont traverser la peau pour atteindre et traiter la tumeur.

Plusieurs techniques de RE peuvent-être appliquées en fonction de la tumeur à traiter. Leur but est d'optimiser la destruction des cellules cancéreuses en augmentant la dose délivrée à la tumeur tout en diminuant celle délivrée aux tissus sains afin de réduire les risques de toxicité et de cancers radio-induits. Ces technologies permettent une approche personnalisée du traitement en fonction de chaque patient (morphologie, pathologie et radiosensibilité).

On distingue la **radiothérapie conformationnelle 3D** (RC-3D), il s'agit de la technique la plus utilisée qui consiste à faire correspondre le plus précisément possible le volume irradié au volume de la tumeur tout en limitant l'exposition des tissus et des organes sains avoisinants à partir d'un accélérateur linéaire d'électrons. Pour ce faire, elle nécessite au préalable une reconstruction 3D des contours du patient, de sa tumeur et de ses organes sains à partir d'images scanner et/ou IRM. Toutes ces données permettent grâce à des logiciels de déterminer les doses de traitement adaptées au volume exact de la tumeur à irradier et d'utiliser les paramètres de faisceaux d'irradiation appropriés (placement, orientation, forme, énergie et intensité) [154]. Ce type d'irradiation est d'une très grande précision pour les tumeurs de formes complexes (prostate, thorax, abdomen, pelvis, ORL et cerveau).

La **radiothérapie par modulation d'intensité** (RCMI) est l'une des technologies de radiothérapie les plus modernes actuellement. Elle permet de faire varier en cours de séance le débit de dose administré par les faisceaux pour s'adapter précisément au volume et à la forme de la tumeur à traiter.

La technique de **radiothérapie asservie à la respiration** (RAR) a été développée comme un outil d'optimisation complémentaire des autres types de radiothérapie. Elle permet de réduire et maîtriser les incertitudes liées aux mouvements respiratoires, principalement dans le cas des cancers pulmonaires, mammaires et hépatiques [155]. La marge liée aux mouvements respiratoires est précisément déterminée permettant ainsi l'irradiation sélective de la tumeur et l'exposition moins importante des tissus sains aux rayonnements ionisants. En fonction des objectifs cliniques et de l'état général du patient, deux approches existent actuellement pour détecter les mouvements parasites de la respiration. Pour la technique *active breathing control* (ABC), par blocage en inspiration, le patient lui-même est sollicité, il doit bloquer puis relâcher sa respiration en temps donné pendant l'acquisition des images scanographiques et pendant l'irradiation [156]. A l'inverse, le système *real time position management* (RPM) permet d'analyser en temps réel la respiration du patient [157]. Ce sont les mouvements de réflecteurs disposés sur le thorax du patient qui envoient un signal lumineux ensuite analysé par un logiciel piloté par ordinateur. Ces données permettent ensuite le déclenchement du scanner et/ou de l'accélérateur à un moment défini du cycle respiratoire.

La **radiothérapie stéréotaxique** (radiochirurgie) est une technique de haute précision guidée par l'image consistant à utiliser des microfaisceaux convergents de photons ou de protons afin de délivrer de fortes doses de radiations au centre des petites lésions. Elle est particulièrement utilisée pour les tumeurs de faible volume notamment cérébrales. Ce système de traitement est réalisé par tomothérapie (gamma-kife) ou bien à l'aide d'un accélérateur linéaire de type Cyberknife® (**Figure 18**). La tomothérapie, aussi appelée radiothérapie hélicoïdale, associe un scanner et un accélérateur linéaire de petite dimension qui tourne autour du patient en même temps que la table de traitement se déplace longitudinalement. La dose d'irradiation est ainsi administrée sur 360° autour du patient permettant une meilleure répartition de la dose. L'intensité du rayonnement délivrée peut aussi être modulée en faisant varier l'ouverture du collimateur au cours de l'irradiation [158]. Le Cyberknife® est un accélérateur linéaire tenu par un robot (assisté par ordinateur) capable de le déplacer dans toutes les directions possibles afin de traiter des tumeurs dans tout l'organisme généralement en 2 à 5 séances. Ce système combiné à l'imagerie médicale permet de détecter et de corriger en temps réel à la fois les mouvements du patient et le déplacement de la tumeur avec une précision millimétrique [159].



Figure 18 : Système Cyberknife®

4.5 Limite de la radiothérapie externe

L'un des facteurs limitant l'utilisation de la RE concerne en particulier le manque de sélectivité des rayonnements émis vis-à-vis des tissus tumoraux. De ce fait, des faibles radiations sont généralement administrées aux patients afin de modérer autant que possible les dommages pouvant être engendrés sur les tissus sains avoisinants. Cependant, l'utilisation de la radiothérapie à des doses inférieures à celles préconisées pour irradier toute la tumeur est souvent la cause de certaines récurrences tumorales. Par ailleurs, l'environnement hypoxique commun à toutes les tumeurs est aussi à l'origine de phénomènes de résistance pour un certain nombre de tumeurs et nécessite de délivrer des doses plus fortes souvent intolérables pour les tissus sains.

C'est dans ce contexte qu'ont été développées de nouvelles approches thérapeutiques permettant de limiter la dose à administrer grâce à la radiosensibilisation des tumeurs dites radio-résistantes. En effet, les rayonnements émis vont occasionner des lésions au sein de l'ADN des cellules ; dans le cas des cellules saines ces lésions pourront être réparées par des voies spécifiques pour qu'elles puissent de nouveau se diviser. Pour les cellules tumorales, la réparation des lésions ne sera pas complète à cause de la division cellulaire plus rapide ; les cassures s'accumuleront et les cellules finiront par mourir. De nos jours, de nombreuses tumeurs sont cependant radio-résistantes et nécessitent de délivrer des doses plus importantes et de ce fait d'irradier davantage les tissus sains environnants. Environ 20% des patients traités en radiothérapie seraient résistants.

5. Alternative actuelle à l'amélioration de la radiothérapie : la radiosensibilisation

De nouveaux traitements de radiosensibilisation sont développés pour accroître la réponse à la radiothérapie et l'efficacité d'irradiation en rendant les cellules cancéreuses plus sensibles aux rayons. La radiorésistance des tumeurs s'appuie essentiellement sur la capacité des cellules cancéreuses à reconnaître les détériorations causées à l'ADN et à initier les mécanismes pour la réparer [160]. C'est pourquoi, la stratégie principale pour rendre les cellules cancéreuses plus vulnérables aux rayonnements ionisants repose sur l'inhibition des mécanismes biologiques impliqués dans la réparation de l'ADN.

5.1 Molécules Dbait

Dans la littérature, des études réalisées par Dutreix et *al.* (Institut Curie) ont mis en évidence le potentiel intéressant des molécules Dbait. Ces molécules mimant des ADN de petite taille et possédant des cassures double brin vont permettre d'induire des faiblesses dans les processus de réparation des cellules tumorales en étant injectées avant la radiothérapie [161]. Les Dbait vont jouer le rôle de leurres en interférant au niveau de la détection, de la signalisation et de la réparation des cassures double brin de l'ADN. Ces molécules vont notamment engendrer l'activation des deux enzymes de signalisation des lésions de l'ADN, à savoir la kinase dépendante de l'ADN (ADN-PK) [161] et la poly-ADP ribose polymérase (PARP) [162]. Ces enzymes vont réparer les lésions présentées par les leurres au lieu de réparer les lésions radio-induites.

De cette façon, les Dbait inhibent leur activité et les deux principaux mécanismes de réparation possibles, comprenant : la réparation des cassures simple brin (par excision de bases ou de nucléotides) et la réparation des cassures double brin (par jonctions des extrémités non-homologues (NHEJ) ou par recombinaison homologue) (**Figure 19**) [163].

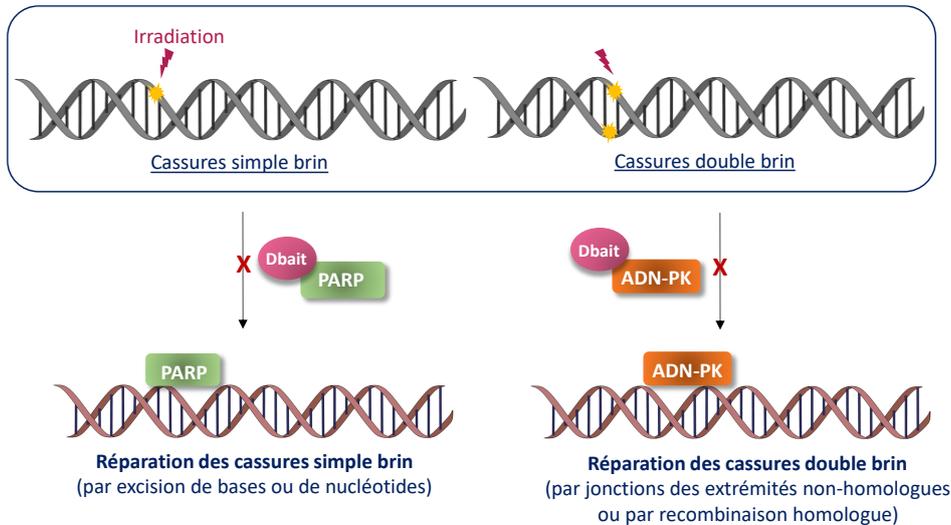


Figure 19 : Inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN par les Dbait.

Des études préliminaires ont été effectuées pour mieux comprendre le mécanisme d'action et l'effet des Dbait sur la réparation de l'ADN et la survie cellulaire. En définitive, il a été prouvé *in vitro* que ces molécules induisent dans les cultures cellulaires et dans les tumeurs xénotransplantées la phosphorylation de l'histone H2AX (γ -H2AX), un des acteurs impliqués dans la réparation de l'ADN endommagé [164]. L'hyperphosphorylation spécifique de cette histone lors de radiations ionisantes diminue le recrutement d'autres complexes engagés dans la réparation comme la protéine de liaison p53. Comme précisé précédemment, les Dbait activent une kinase (ADN-PK) engagée dans la voie de signalisation des cassures double brin. Deux hypothèses sont alors émises concernant leur mécanisme d'action : (1) les Dbait se fixent à l'ADN-PK pour l'isoler ou (2) ces molécules signalent de « fausses » cassures de l'ADN faisant croire aux cellules qu'elles sont nettement plus endommagées qu'elles ne le sont réellement. L'organisation et le fonctionnement des complexes impliqués sont alors perturbés ce qui entraîne la mort des cellules tumorales. Contrairement aux inhibiteurs de kinase qui ciblent une protéine d'intérêt, les Dbait vont perturber l'ensemble du complexe impliqué dans la réparation de l'ADN. Ceci a pour avantage de diminuer le risque de développer une résistance pendant le traitement. De plus, ces molécules sont intéressantes en termes de propriétés pharmacocinétiques puisqu'elles possèdent une activité et une stabilité durable dans les cellules tumorales.

Les Dbait (DT01, conjugué à un dérivé du cholestérol) ont fait l'objet d'un essai clinique de phase I (NCT01469455) sur des patients atteints de mélanome cutané métastatique afin d'évaluer la tolérance du traitement et la dose optimale à utiliser en association à la radiothérapie. Dès à présent, il a été prouvé que l'association Dbait/RE était bien tolérée, les tests confirmant l'absence d'effets indésirables sur les tissus sains. Un essai sur 21 patients (76 lésions au total) a permis de mettre en avant l'efficacité de ce traitement avec 30% de réponses complètes obtenues pour les lésions traitées [165].

Aussi, de nouvelles perspectives d'utilisation de ces molécules sont en cours pour envisager de les appliquer non plus seulement en radiothérapie mais également en chimiothérapie et pour d'autres types de cancers que le mélanome.

5.2 Association Dabir/Inhibiteurs de PARP pour contourner la génétique des cellules tumorales

La PARP est une enzyme qui intervient dans la réparation de l'ADN lors de cassures simple brin. Elle va se lier à l'ADN endommagée et recruter les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN du site altéré. Si ces lésions ne sont pas directement prises en charge, elles conduisent à une instabilité génomique et induisent l'apoptose de la cellule [166]. Les inhibiteurs de PARP vont bloquer le recrutement de ces enzymes, et ont pour effet d'augmenter la quantité de lésions simples brins et entraînent à terme des cassures double brin issues des cassures simple brin non réparées avant la réplication de l'ADN. Un des principaux mécanismes de réparation de ces lésions double brin sera la recombinaison homologue. Ce système de réparation de l'ADN consiste à remplacer le brin endommagé par une copie absolue d'un autre brin d'ADN après réplication.

Il a été démontré que les inhibiteurs de PARP étaient particulièrement efficaces pour les patients présentant des mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2*, principalement pour les cancers de l'ovaire, du sein et de la prostate. Les cellules présentant ce type de mutations sont dénuées de recombinaison homologue. Les cassures doubles brins engendrées ne sont donc pas réparées et s'accumulent, entraînant leur mort. L'intérêt de ces inhibiteurs est qu'ils sont sélectifs de ce type de mutations, ils empêchent ainsi la détérioration de l'ADN des cellules saines qui ne les possèdent pas [167,168]. Cependant, aucune efficacité n'a été démontrée pour les tumeurs présentant des réparations actives par recombinaison homologue.

Une étude réalisée par Jedey et *al.* met en avant une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur la combinaison de molécules de type Dabir avec des inhibiteurs de PARP pour obtenir une efficacité thérapeutique indépendante de la génétique tumorale [169]. Ils utilisent pour cela un inhibiteur de la recombinaison homologue (l'AsiDNA) associé avec un inhibiteur de PARP (olaparib). L'AsiDNA permet de réduire le mécanisme de réparation des cassures double brin d'ADN et augmente la sensibilité à l'olaparib. L'association de ces deux molécules sans RE permet de contourner la restriction génétique, c'est-à-dire de causer la mortalité des cellules tumorales qu'elles présentent ou non la possibilité de réparer l'ADN endommagé par recombinaison homologue.

5.3 Inhibiteurs de l'ADN-PK

L'ADN-PK est une sérine/thréonine kinase activée lors de cassures double brin de l'ADN suite à l'irradiation par des rayonnements ionisants. Elle est à l'origine de nombreuses résistances puisqu'elle participe activement à la réparation des lésions de l'ADN en s'autophosphorylant et en phosphorylant d'autres protéines comme l'histone H2AX. C'est pourquoi, l'inhibition de cette enzyme est une autre alternative intéressante pour sensibiliser les tumeurs aux radiations. Il existe des inhibiteurs spécifiques de l'ADN-PK tels que le NU7026 et le NU7441 qui permettent une radiosensibilisation en retardant la réparation des cassures double brin [170]. Toutefois aucun de ces deux inhibiteurs n'a été jusqu'en essais cliniques.

Récemment, le CC-115, un nouvel inhibiteur de mTOR et de la DNA-PK, est lui en cours d'évaluation clinique de Phase I sur plusieurs types de cancers solides et hématopoïétiques [171]. Ces inhibiteurs agissent en bloquant les mécanismes de réparations NHEJ *via* l'inhibition de l'autophosphorylation d'une sous-unité de l'ADN-PK.

5.4 Inhibiteurs d'Histone Désacétylase (HDACi)

Les enzymes HDAC et les acétyltransférases d'histones (HAT) fonctionnent en symbiose et qui jouent un rôle important dans l'expression génétique en modifiant le degré d'acétylation des histones. Les HAT catalysent l'ajout d'un groupement acétyle (acétylation) sur les lysines situées sur l'extrémité amino-terminale des histones alors que les HDAC enlèvent ce type de groupements (désacétylation). Dans ce dernier cas, les lysines se retrouvent chargées favorisant ainsi la compaction de la chromatine (hétérochromatine), alors moins accessible, et empêchant la transcription génique d'avoir lieu. A l'inverse, la perte de charge des lysines lors de l'acétylation induit une décondensation de la chromatine (euchromatine) permettant la transcription de l'ADN (**Figure 20**) [172].

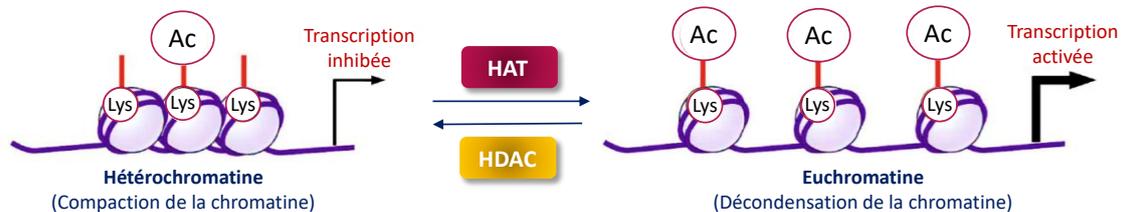


Figure 20 : Acétylation/désacétylation des histones. Adaptée de Kazantsev et Thompson, 2008 [173].

Ainsi, les HDACi en induisant une hyper acétylation des histones vont être capables de provoquer une activation ou une répression de certains gènes dans différents types de tumeurs. Ces gènes peuvent être spécifiquement impliqués dans l'arrêt de la croissance et la différenciation cellulaire, l'inhibition de l'angiogénèse ou encore l'induction de l'apoptose.

Il existe quatre grandes familles d'HDACi, classées en fonction de leur structure chimique et capables d'inhiber les HDAC de classe I, II et IV [174]. Les acides gras à chaîne courte (dérivés de l'acide butyrique), les dérivés d'acide hydroxamique, les benzamides et les tétrapeptides cycliques. La liste présentée dans le **Tableau 9** n'est pas exhaustive, il existe bien d'autres HDACi actuellement utilisés en clinique et également en cours d'évaluation clinique [175].

Classification	Classe	Inhibiteur	Indication thérapeutique principale	Phase clinique
Acides gras	I, IIa	Acide valproïque	Cancer de l’ovaire et cervical	III
Dérivés d’acide hydroxamique	I, II	Vorinostat (Zolinza®)	Lymphome T cutané	Approuvé par la FDA (2006)
	I, II	Belinostat (PXD-101)	Lymphome T périphérique	Approuvé par la FDA (2014)
	I, II	Panobinostat (LBH-589)	Myélomes multiples/ Lymphome T cutané	Approuvé par la FDA (2015)/III
Benzamides	I	Tacedinaline (CI-994)	Cancer du poumon et myélomes multiples	III
	I	Entinostat (MS-275)	Cancer du sein	III
Tétrapeptides cycliques	I	Romidepsine (Istodax®)	Lymphome T cutané	Approuvé par la FDA (2009)

Tableau 9 : Exemples d’HDACi utilisés en clinique ou en phase d’essais cliniques.

Ces inhibiteurs sont souvent administrés en combinaison avec d’autres thérapies cancéreuses telles que des molécules de chimiothérapie ou sont aussi utilisés en association avec la radiothérapie afin de radiosensibiliser les cellules cancéreuses. Le premier groupe à avoir utilisé les HDACi en combinaison avec la RE utilisait de l’acide valproïque en association à la fois avec le cisplatine et la doxorubicine, la radiothérapie (40 Gy) et la chirurgie pour traiter avec succès un patient atteint d’un cancer anaplasique de la thyroïde [176]. L’utilisation des HDACi a démontré qu’ils permettaient de diminuer la capacité des cellules à réparer les dommages induits à l’ADN en affectant certaines voies de signalisation de réparation de ces lésions comme la recombinaison homologe ou la NHEJ. C’est notamment le cas du panobinostat (LBH589) qui s’est avéré efficace à de faibles concentrations (IC₂₀) pour le traitement du cancer de la prostate *in vitro*. Les auteurs ont pu démontrer que cet inhibiteur associé à la radiothérapie conduisait à l’arrêt du cycle cellulaire et entraînait plus de dommages à l’ADN. LBH589 est maintenant utilisé dans des études cliniques de phases I et II pour plusieurs types de tumeurs solides et hémopathies malignes [177]. Une autre étude de phase I portant sur cet HDACi est aussi réalisée pour le traitement des cancers de la prostate, de l’œsophage et de la tête et du cou (NCT00670553). D’autres phases cliniques sont menées sur l’association d’HDACi avec la radiothérapie [175]. Par exemple, une étude de phase I est en cours sur l’association du vorinostat avec de la radiothérapie palliative chez des patients atteints de tumeurs stromales gastro-intestinales (NCT00455351) ou du cancer du poumon (NCT00821951). Ainsi, d’après les premiers essais précliniques et cliniques, l’utilisation d’HDACi en tant que radiosensibilisants semble une stratégie prometteuse pour augmenter l’efficacité de la radiothérapie.

5.5 Les atomes lourds

Une autre stratégie repose sur l’administration d’éléments possédant un numéro atomique (Z) élevé (Z = 60-80) au sein même du tissu tumoral. Dans ce cadre, les NP inorganiques et métalliques constituées d’éléments de haut numéro atomique comme l’or (Z= 79), le platine (Z= 78), l’hafnium (Z= 72) ou encore le gadolinium (Z= 64), suscitent un intérêt grandissant pour leur capacité à renforcer l’efficacité thérapeutique des radiations *via* l’amplification des dommages causés aux tissus tumoraux par rapport aux tissus sains.

Lorsque la concentration en NP est maximale dans la tumeur, il est possible d'irradier le volume tumoral à traiter sans affecter les tissus sains. En effet, les propriétés d'absorption des NP contenant un élément de haut numéro atomique sont différentes de celles des tissus mous ce qui permet d'augmenter le dépôt de dose locale. Elles possèdent une importante faculté d'absorption des photons de basse énergie (~ 100 keV) par effet photoélectrique.

Ces NP sont capables de transférer de l'énergie dans le milieu à partir de rayonnements, beaucoup plus efficacement que l'eau. Cette différence peut notamment être observée grâce au coefficient d'absorption masse-énergie (énergie déposée par unité de masse) comparé au tissu mou. Cette valeur est généralement représentée en fonction de l'énergie du photon incident. Les ratios de l'eau contenant 1% d'or ou 1% de gadolinium par rapport à l'eau seule en fonction de l'énergie des rayons X incidents sont donnés sur la **Figure 21**. Ces deux modèles mettent en évidence que pour une énergie inférieure à 150 KeV, l'effet photoélectrique est prédominant et induit un coefficient d'absorption d'énergie de masse plus élevé et donc une radiosensibilisation plus importante pour les éléments de haut numéro atomique par rapport à l'eau. Pour des énergies plus hautes (>500 keV), l'effet Compton est prédominant et le coefficient d'absorption masse-énergie est similaire.

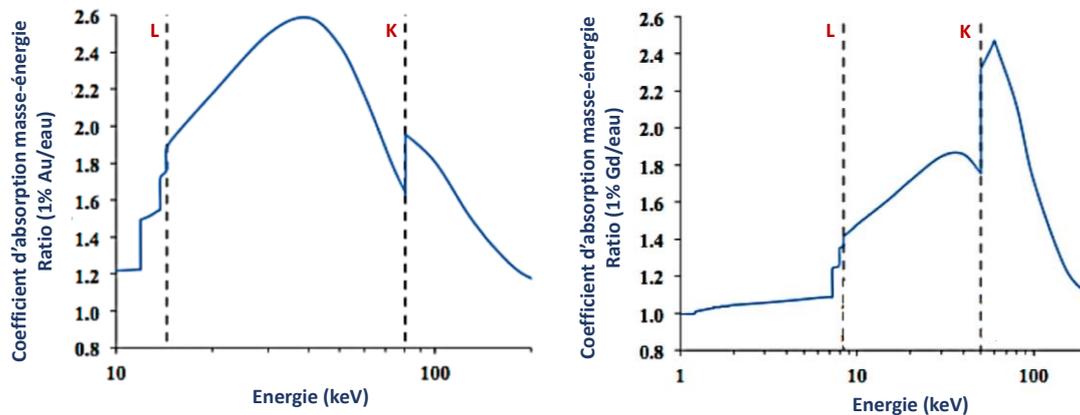


Figure 21 : Comparaison du coefficient d'absorption de l'énergie de masses des photons pour l'or et le gadolinium par rapport à l'eau. Les couches électroniques K et L de chaque élément sont représentées. Adaptée de Kuncic et Lacombe, 2018 [178].

Les NP possèdent l'avantage de rassembler une très grande concentration d'éléments avec un Z élevé au sein d'un même objet. Ainsi, les nombreux photoélectrons éjectés issus de plusieurs atomes lourds proches les uns des autres donnent lieu à une augmentation considérable de l'énergie pouvant être déposée au sein d'une tumeur. Aussi, ce phénomène est renforcé lors de processus de désexcitation atomique en ayant un effet supplémentaire (perturbation électronique) dans le voisinage direct des NP (**Figure 22**) [178]. C'est-à-dire que les électrons émis vont aussi exciter les atomes lourds des NP voisines et engendrer un processus d'excitation en cascade responsable du dépôt de dose élevé autour des NP.

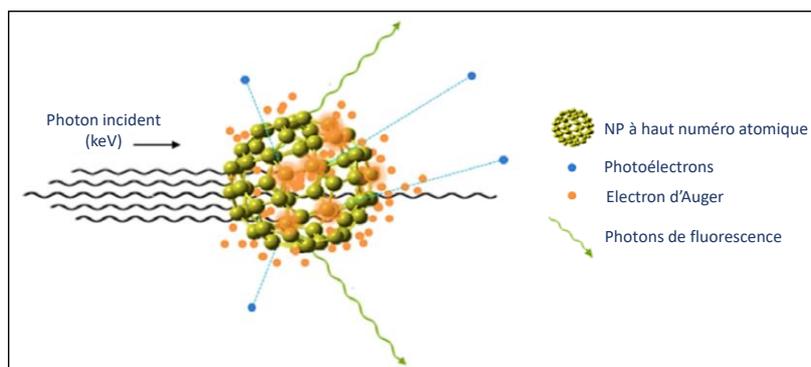


Figure 22 : Processus d'interaction des photons (KeV) avec des NP à haut numéro atomique. Adaptée de Kuncic et Lacombe, 2018 [178].

Les preuves de concept de l'effet radiosensibilisant des NP à Z élevé ont d'abord été menées sur les NP d'or en 2004 par Hainfeld *et al.* pour le traitement *in vivo* par voie intraveineuse de carcinomes mammaires chez des souris [179]. Malgré les nombreux résultats précliniques positifs sur la capacité des NP d'or à améliorer l'effet thérapeutique des radiations, aucune n'a encore franchi le pas des essais cliniques chez l'homme [178]. A ce jour, deux nouvelles NP à base de gadolinium et d'hafnium ont conduit à des transferts cliniques.

a. La NP NBTXR3 à base d'oxyde d'hafnium

Les NBTXR3 développées par la société Nanobiotix (Paris) sont des NP à base d'oxyde d'hafnium (HfO_2) mises au point pour une injection intratumorale et dont le diamètre hydrodynamique n'excède pas 50 nm. L'association de ces NP avec la RE a fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. Elles ont été les premières NP dans ce domaine en évaluation clinique chez l'homme.

Les premières études *in vitro* ont été réalisées en 2012 par Magggiorella *et al.* sur une lignée cellulaire de fibrosarcome humain HT1080 permettant de montrer une augmentation significative de la mort cellulaire en combinant la NBTXR3 avec l'irradiation gamma (source de cobalt-60) ou l'irradiation par des rayons X (6 MV). A la suite, des tests clonogéniques *ex vivo* réalisés à partir d'un modèle de sarcome humain A673 ont également permis de mettre en évidence un effet radiosensibilisant de ces NP irradiées à 15 Gy 24 h après leur injection intratumorale. L'inhibition de la croissance tumorale est augmentée de 10% par rapport aux souris uniquement traitées par radiothérapie seule [180]. Cette même équipe a aussi étudiée *in vivo* un modèle de tumeur épithéliale (HCT116) en traitant des souris par curiethérapie avec de l'iridium-192 (2x4 Gy ou 1x8 Gy), 24 h après l'injection intratumorale de NBTXR3. L'association de la curiethérapie et des NP a permis une rémission complète de la tumeur 20 jours après le traitement, alors que la croissance tumorale se poursuivait pour les souris uniquement traitées par curiethérapie.

Les NBTXR3 ont été les premières NP radiosensibilisantes utilisées en tant que dispositif médical chez l'homme (Phase I) pour une utilisation en RE dans le cadre du traitement de sarcomes suivi d'une chirurgie. La faisabilité, avec une réduction moyenne de 40% du volume tumoral, ainsi que le profil de tolérance évalué sur 22 patients ont permis de retenir dans les études ultérieures un volume d'injection correspondant à 10% du volume tumoral [181].

Depuis, 7 essais cliniques de phases I, II et III sont en cours en France et à l'international. Ils concernent des cancers tels que ceux du rectum, de la prostate mais aussi les sarcomes, les carcinomes hépatocellulaires et les tumeurs ORL [182].

b. La NP AGuIX® à base de gadolinium

Parmi ces NP radiosensibilisantes, les NP à base de gadolinium sont particulièrement adaptées pour des applications biomédicales. En plus des propriétés radiosensibilisantes du gadolinium mentionnées précédemment, il est aussi l'élément le plus largement utilisé pour l'IRM en tant qu'agent de contraste paramagnétique. Dans ce cadre, une start-up de Lyon Nano-H (maintenant NH TherAGuIX, Lyon) a développé une NP théranostique à base de gadolinium (AGuIX®) administrée par voie intraveineuse et permettant de fournir à la fois une meilleure efficacité en RE et d'augmenter la précision en IRM [183]. Elles sont composées d'une matrice de polysiloxane (APTES et TEOS) portant des ligands macrocycliques de type DOTA incorporés à la surface de manière covalente. Ces ligands DOTA permettent de chélater les ions Gd^{3+} pour une utilisation comme agent de contraste en IRM. Ces NP, d'un diamètre hydrodynamique de $3,0 \pm 1,0$ nm, sont constituées d'un cœur d'oxyde de gadolinium qui se dissout lors de son passage dans l'eau favorisant ainsi la chélation par les DOTA (environ 10 DOTA/NP) (Figure 23) [184].

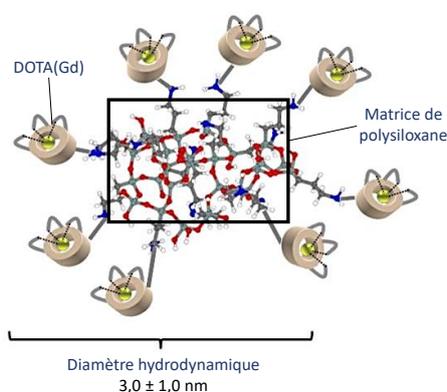


Figure 23 : Représentation schématique des NP AGuIX®. Adaptée de NH TherAGuIX [185].

L'effet radiosensibilisant des NP AGuIX® a été démontré *in vitro* sur plusieurs types de lignées cellulaires (HeLa, U87MG, panc1) à différentes concentrations ($[Gd^{3+}] = 0.1-0.5$ mM) et aussi avec différentes énergies d'irradiations (de la dizaine de kiloélectronvolts à plusieurs mégaélectronvolts) [186]. Mais aussi *in vivo* sur différents modèles précliniques de cancers tels que le glioblastome, les métastases cérébrales, le mélanome, le chondrosarcome, le cancer du pancréas, du foie, du poumon et de la tête et du cou.

La petite taille de ces NP leur confère une accumulation passive au sein des tumeurs après injection intraveineuse ainsi qu'une élimination principalement rénale comme le montre les études de biodistribution et de pharmacocinétique menées *in vivo* chez des souris saines. En 2014, une première preuve de concept de l'effet radiosensibilisant des NP AGuIX® a été réalisée pour le traitement du cancer du poumon en les administrant par voies aériennes [187]. L'irradiation à 10 Gy de souris porteuses de tumeurs aux poumons a permis d'augmenter de 45% la médiane survie, alors qu'aucune différence significative n'a été obtenue pour les contrôles irradiés et non irradiés sans NP.

En 2016, une autre preuve de concept de l'effet radiosensibilisant de ces NP sur des tumeurs cérébrales (gliosarcomes 9L) a montré une augmentation de la médiane de survie 2,5 fois supérieure par rapport à une irradiation sans NP [188]. Dans la même étude, ils ont mis en avant l'importance d'utiliser des NP pour un effet radiosensibilisant par rapport aux agents de contraste moléculaires. L'injection de Dotarem® à la même concentration et en irradiant dans les mêmes conditions, n'a montré aucune différence significative par rapport à la RE seule. En effet, les NP sont bien plus volumineuses et ont tendance à être retenues plus longtemps dans les tumeurs.

Les propriétés de radiosensibilisation élevées de cette NP à base de gadolinium obtenues à faible concentration dans de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*, en font un agent thérapeutique très prometteur pour améliorer l'efficacité de la RE. La première administration chez l'homme des NP AGuIX® est en cours avec l'essai clinique NanoRAD (NCT02820454) au CHU de Grenoble pour le traitement de métastases cérébrales [189]. Cet essai clinique de phase I vise à utiliser les NP AGuIX® en RE selon un schéma d'escalade de doses de 15, 40, 50, 75 and 100 mg.kg⁻¹. Récemment, un autre essai clinique, NanoCOL (NCT03308604) a été accepté en phase I et est en cours à l'institut Gustave Roussy (Villejuif) afin de traiter le cancer du col utérin avancé par RE et par curiethérapie (cisplatine).

Par ailleurs, les ligands DOTA présents à la surface des NP AGuIX® permettent de complexer d'autres atomes comme des radionucléides tels que l'indium-111 notamment utilisé pour réaliser des études de biodistribution par imagerie TEMP de ces NP [190] ou encore le gallium-68 qui leur permet de combiner l'imagerie TEP et l'IRM [191]. Des fonctions amine primaire issues de la matrice de polysiloxane permettent aussi de conjuguer des fluorophores (Cy5.5) pour des études d'imagerie de fluorescence. De plus, deux types de peptides ont déjà été incorporés à la surface des AGuIX® afin d'augmenter leur accumulation dans des tumeurs de type glioblastomes. Le peptide cRGDfK, qui permet de cibler de façon plus significative l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (deux fois plus de signal fluorescent dans la tumeur), par rapport à leur contrôle négative comportant le peptide cRADfK [192] ; et le peptide ATWLPPR ciblant la neuropiline 1 pour des applications en PDT chez des rats [193].

III. Ce qu'il faut retenir

L'oncologue dispose d'un arsenal thérapeutique important pour traiter les différents types de cancers même si pour certains le pronostic est fortement défavorable. Le traitement et la diminution d'effets secondaires s'améliorent notamment grâce aux nanomédicaments. Il existe d'énormes preuves (précliniques et cliniques) témoignant du potentiel prometteur des nanotechnologies pour améliorer de manière significative l'effet thérapeutique des modalités de traitement habituellement utilisés (chirurgie, chimiothérapie, thérapie ciblée et radiothérapie). À l'heure actuelle, les nanomédicaments les plus performants en utilisation clinique sont des NP organiques conjuguées à des anticancéreux (liposomes). Leur efficacité dans le traitement du cancer a été largement prouvée et d'autres formulations continuent d'entrer en essais cliniques.

Au cours de ces dernières années, une très grande variété de NP a également été développée et étudiée pour leur activité anticancéreuse mais aussi pour leur capacité à améliorer l'effet de la radiothérapie. Cela concerne les NP inorganiques et métalliques constituées d'atomes de haut numéro atomique tels que l'or et le gadolinium qui permettent d'augmenter la dose délivrée dans la tumeur et par conséquent d'améliorer l'index thérapeutique de la RE. Les premiers résultats probants obtenus sur deux NP (AGuIX® et NBTXR3) ont prouvé qu'un transfert chez l'homme était possible, même si la relation entre leurs effets physiques et les mécanismes biologiques impliqués reste encore un aspect à élucider.

De plus, la capacité de ces nanomédicaments à pouvoir intégrer aussi bien le diagnostic que la thérapie au sein d'une même structure, ouvrent de nouvelles perspectives de leur utilisation à des fins théranostiques et laisse envisager la possibilité d'une médecine personnalisée. Maintenant tout l'enjeu pour le développement de NP thérapeutiques efficaces repose sur l'évaluation de leur biodistribution et de leur toxicité éventuelle dans l'organisme mais surtout sur leur capacité de ciblage des cellules cancéreuses.

Chapitre 2. Les stratégies de ciblage tumoral des NP

La conception de NP répondant spécifiquement au microenvironnement tumoral peut significativement réduire les effets secondaires sur les tissus sains. L'environnement tumoral est très complexe et différent des tissus normaux ; il entraîne une augmentation de la pression interstitielle, une acidification locale du milieu, induit des irrégularités dans les flux sanguins, de l'hypoxie et surexprime certains récepteurs et facteurs de croissance [194]. Ce sont ces différentes caractéristiques du microenvironnement tumoral qui sont exploitées afin de délivrer des NP thérapeutiques qui iront préférentiellement s'accumuler dans la zone tumorale et faiblement dans les tissus sains. Il existe à ce jour deux façons différentes pour les NP de s'accumuler dans les tumeurs soit par ciblage passif ou bien par ciblage actif.

I. Le ciblage tumoral passif : l'effet EPR

Bien que les vaisseaux sanguins tumoraux comme les normaux soient composés de cellules endothéliales, de cellules murales (péricytes) et d'une membrane basale, les vaisseaux sanguins des tumeurs se différencient par la présence de multiples anomalies structurelles et fonctionnelles [194]. Ils sont endommagés, désorganisés, de formes irrégulières et tortueuses (**Figure 24**) [195]. En effet, les tissus tumoraux possèdent un faible drainage lymphatique et une importante perméabilité vasculaire permettant aux macromolécules et notamment aux NP de traverser la barrière vasculaire tumorale *via* les jonctions intercellulaires pour s'accumuler dans la tumeur (extravasation). Ce phénomène que l'on appelle effet EPR est largement exploité pour la délivrance de NP au niveau tumoral. Il concerne en particulier les NP dont la taille est comprise entre 100 et 200 nm échappant à l'élimination hépatique [196].

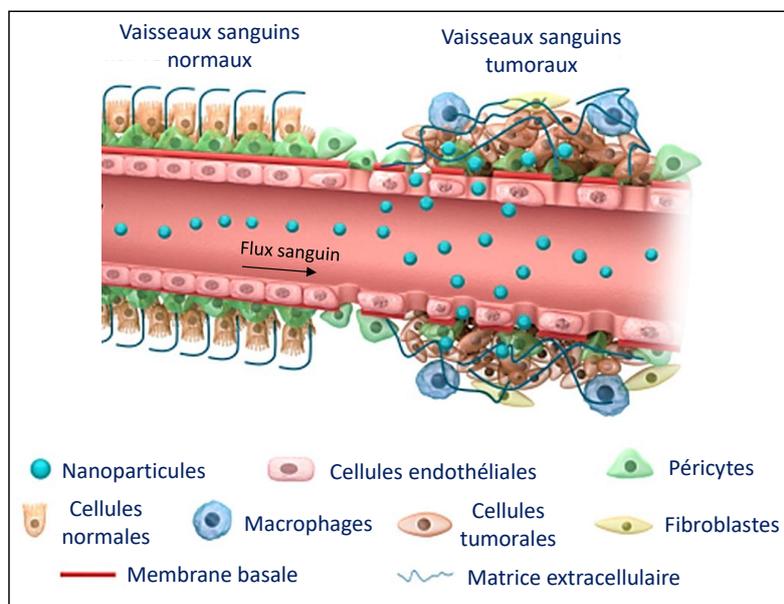


Figure 24 : Représentation schématique de l'accumulation des NP dans les tissus tumoraux par effet EPR. Adaptée de Abdalla et al., 2018 [197].

1. La biodistribution des NP par effet EPR

Les NP seront contraintes de passer les barrières biologiques avant d'atteindre les cellules cancéreuses cibles, comme le sang, le foie, les reins, la rate, et en particulier la barrière hémato-encéphalique [198]. Une fois les NP injectées, elles doivent notamment faire face aux phénomènes d'agrégation, d'adsorption par des protéines (opsonisation), de séquestration phagocytaire et de clairance hépatique et rénale, qui affectent le pourcentage de NP atteignant les tissus et les cellules tumorales [199]. Pour appuyer ce propos, une récente méta-analyse regroupant des articles sur dix ans (2005-2015) a démontré que seulement 0,7% de la dose administrée en NP par effet EPR se concentre au niveau tumoral [12]. En effet, la plupart des NP sont séquestrées par le système phagocytaire mononucléé (SPM) constitué de macrophages qui détruisent les NP dès leur injection avant même qu'elles n'aient le temps d'atteindre la tumeur. Ce processus est généralement engagé suite à l'adsorption de protéines (opsonines) à la surface des NP, ensuite reconnues par des cellules exprimant les récepteurs de ces protéines (ex : cellules de Kupffer au niveau hépatique). Dans ce contexte, il a été démontré que les propriétés physico-chimiques des NP constituent un facteur majeur à prendre en compte puisqu'elles influencent fortement l'efficacité de l'effet EPR et par conséquent l'efficacité thérapeutique.

1.1 L'influence des paramètres physico-chimiques

a. La taille et la forme

La taille et la forme des NP peuvent affecter de manière significative leur biodistribution et leur accumulation dans le tissu tumoral. Leur taille devrait être supérieure à 4-5 nm pour éviter l'élimination rénale et avoir une circulation sanguine plus longue. Mais il faudrait aussi qu'elle soit inférieure à 200 nm afin qu'elles puissent pénétrer le système vasculaire tumoral (**Figure 25**) [195,200]. Par exemple, une étude menée par Kim *et al.* réalisée sur des NP de silice mésoporeuses PEGylées a démontré que les particules avec une taille comprise entre 100 et 150 nm possèdent une accumulation tumorale 4 à 5 fois plus importante que les particules de diamètre plus petit (< 30 nm) ou beaucoup plus grand (>300 nm) [201].

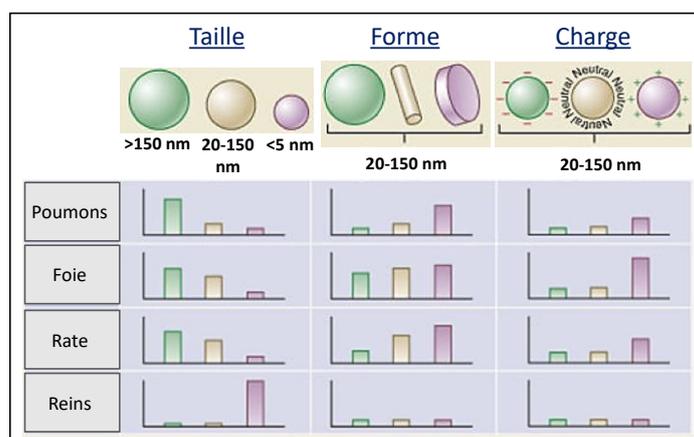


Figure 25 : Les paramètres physico-chimiques (taille, forme et charge) des NP influençant leur biodistribution dans les différents organes (poumons, foie, rate et reins). Adaptée de Blanco *et al.*, 2015 [196].

La biodistribution des NP est également très dépendante de leur forme. Il a notamment été démontré par Alexis *et al.* que des micelles en forme allongée circulent plus longtemps dans le sang par rapport à des micelles sphériques éliminées plus rapidement par le SPM [202]. Discher et son équipe ont aussi constaté que les NP allongées telles que les micelles polymères en forme de filaments possédaient un temps de demi-vie dans le sang supérieur aux mêmes micelles mais de formes sphériques (1 semaine vs 3-4 jours) [203]. Des NP de silice mésoporeuses PEGylées sous forme de bâtonnets ont également démontré qu'elles étaient plus rapidement éliminées [204]. Les NP discoïdales sont celles qui potentiellement sont éliminées le plus rapidement, elles possèdent une surface plus large et plane qui offre de nombreux points d'ancrage et favorise ainsi les interactions avec les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins ou les protéines du sang [196].

b. Influence des propriétés de surface

La charge de surface des NP est un autre paramètre important à prendre en compte qui peut permettre d'améliorer le temps de circulation dans le sang et l'accumulation tumorale des NP. De façon générale, les NP chargées positivement ont une affinité pour les parois vasculaires chargées négativement et sont par conséquent rapidement éliminées de la circulation sanguine. Il est donc préférable d'utiliser des NP neutres ou chargées négativement pour lesquelles il est démontré qu'elles interagissent moins avec les protéines du sang. Pour prévenir l'élimination rapide des NP, les stratégies consistent à les enrober de polymères synthétiques neutres (PEG), de membranes cellulaires ou de molécules zwitterioniques afin d'éviter l'adsorption non spécifique par des protéines ou des cellules avant qu'elles n'atteignent le tissu tumoral [13]. L'utilisation de PEG permet de réduire l'adhérence indésirable de certaines protéines mais également d'apporter de l'hydrophilie aux NP. Ces polymères approuvés par la FDA, sont considérés comme sûrs et actuellement impliqués dans l'élaboration de nombreuses NP thérapeutiques [205–208].

Les nanomatériaux zwitterioniques, à la fois chargés positivement et négativement, sont également une alternative prometteuse pour contrer efficacement l'adsorption non spécifique des protéines plasmatiques [209,210]. Il existe de nombreux polymères zwitterioniques tels que la polyphosphorylcholine, la polysulfobétaïne ou encore la polycarboxybétaïne qui permettent d'augmenter la demi-vie des NP dans le sang [210]. Une autre approche efficace consiste à utiliser des membranes cellulaires. Il est possible de piéger les NP dans différents types de membranes comme celles des plaquettes humaines [211], des globules rouges [212], des leucocytes [213,214] et des cellules cancéreuses [215]. Cette stratégie permet d'imiter les cellules et d'échapper au SPM. De plus en plus de recherches exploitent également les caractéristiques spécifiques du microenvironnement tumoral pour améliorer l'effet EPR. Elles se basent sur l'utilisation de thérapies anti-angiogéniques ou sur l'amélioration de la perméabilité des vaisseaux tumoraux [216]. Ainsi, différentes méthodes permettent d'optimiser la biodistribution des NP sur le site tumoral par effet EPR. Néanmoins, l'utilisation de cet effet pour une efficacité thérapeutique chez l'homme reste encore un sujet très contesté. Il existe une inhomogénéité tumorale importante entre les modèles animaux et les patients. L'effet EPR dépend fortement du type et de la taille de la tumeur, l'angiogénèse et la vascularisation étant très différentes d'une tumeur à l'autre [194,217].

II. Le ciblage tumoral actif

Afin d'améliorer l'accès des NP à la tumeur, de nombreuses études s'intéressent au ciblage actif nommé ainsi puisque contrairement au ciblage passif il s'appuie sur l'ajout d'un ligand à la surface de la NP pour cibler spécifiquement une fonction biologique (récepteur cellulaire, enzyme, protéine...). Ainsi, au cours des dix dernières années, de nombreuses études ont été menées sur l'utilisation de cette approche pour cibler et accumuler spécifiquement les NP dans les cellules cancéreuses et espérer de cette façon limiter les effets secondaires.

Deux méthodes de ciblage actif se distinguent : il est possible selon le type cellulaire de cibler soit les cellules cancéreuses ou bien les cellules endothéliales (**Figure 26**). Dans le premier cas, il s'agit de cibler les récepteurs spécifiquement (sur)exprimés en surface des cellules tumorales. Dans le second cas, les ligands utilisés vont principalement cibler les vaisseaux sanguins et inhiber leur croissance pour conduire à la destruction tumorale. Cela concerne par exemple des cibles comme les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), les intégrines $\alpha_v\beta_3$, les molécules d'adhésion des cellules vasculaires ou encore les Métalloprotéinases Matricielles (MMPs) [216].

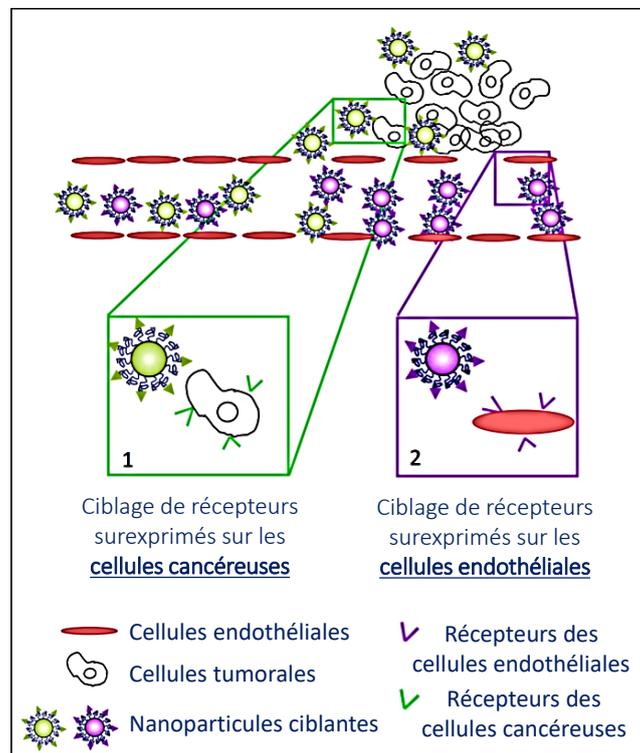


Figure 26 : Stratégies de ciblage actif. Adaptée de Danhier et al., 2016 [216].

III. La chimie click et bioorthogonale dans le ciblage tumoral des NP

La littérature récente relate que les réactions chimiques de type click et bioorthogonales sont de plus en plus utilisées dans l'ingénierie des nanomédicaments afin de leur apporter des propriétés spécifiques et multiples pour l'imagerie et le traitement du cancer. Ces réactions chimiques très performantes ont été développées pour répondre à certaines exigences non respectées par les réactions chimiques traditionnellement utilisées telles que la sélectivité, la biocompatibilité et une vitesse de réaction rapide en milieu biologique. À ce jour, de nombreux articles ont rapporté l'utilisation de la chimie click et bioorthogonale en vue de la conception et de la fonctionnalisation pour le ciblage passif ou actif de NP pour des applications biomédicales.

Il nous a donc semblé important et utile de mettre en avant dans cette partie, présentée sous forme de revue bibliographique, les nouvelles tendances apportées par la chimie click pour la préparation de différents types de nanomatériaux et son implication dans leur ciblage passif ou actif. Dans une première partie, une analyse approfondie de la place occupée par la chimie click dans le domaine de la nanomédecine de 2014 à 2018 a d'abord été menée à partir de la base de données PubMed. L'étude détaillée des différents articles sélectionnés a permis d'identifier les principales stratégies apportées par la chimie click pour la conception et la fonctionnalisation de surface de NP dans le cadre d'un ciblage passif et actif. Dans la suite de la revue, ces différentes stratégies sont présentées et comprennent :

- * **L'utilisation de la chimie click pour l'élaboration de NP non ciblantes en vue d'un ciblage passif (effet EPR).** Nous verrons plus particulièrement que ce type de chimie est utilisé pour l'incorporation d'agents thérapeutiques anticancéreux et d'agents d'imagerie. Nous verrons notamment qu'elle permet soit de les encapsuler (ajout de polymères, PEG), de les complexer (incorporation de fonctions chimiques chargées) ou bien de les greffer directement à la surface des NP.
- * **L'utilisation de la chimie click pour la conception de NP ciblantes en vue d'un ciblage actif.** Dans cette partie, les différents types de ligands les plus utilisés et conjugués à la surface des NP par chimie click sont présentés (peptides, protéines, oligomères, anticorps). Par ailleurs, une vue d'ensemble des articles comparant le ciblage actif et l'effet EPR mettent en avant l'intérêt d'ajouter des ligands pour améliorer l'efficacité de ciblage et thérapeutique des NP.
- * **L'utilisation de la chimie bioorthogonale pour la délivrance tumorale des NP par une approche de préciblage.** Nous verrons dans cette dernière partie que cette approche de préciblage, utilisée dans le cadre de cette thèse, représente une alternative prometteuse pour améliorer la délivrance des NP au niveau tumorale. Le principe de cette stratégie ainsi que l'ensemble des études répertoriées de 2010 à 2018 sont présentés plus en détails dans cette revue.

Review

Click and bioorthogonal chemistry: the future of active targeting of nanoparticles for nanomedicines

Ludivine Taiariol¹, Carole Chaix^{2*}, Carole Farre² and Emmanuel Moreau¹

¹Université Clermont Auvergne, Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, BP 184, F-63005 Clermont-Ferrand, France. Inserm, U 1240, F-63000 Clermont-Ferrand, France. Centre Jean Perrin, F-63011 Clermont-Ferrand, France.

²Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France

*Corresponding authors:

Emmanuel MOREAU
Tel.: + (33) 4 73 17 80 12,
Email: Emmanuel.MOREAU@uca.fr

And

Carole CHAIX
Tel.: + (33) 4 37 42 35 57,
Email: carole.chaix-bauvais@univ-lyon1.fr

Key words

Nanomedicines, nanoparticles, click chemistry, bioorthogonal chemistry, active targeting

Introduction	61
1. Meta-analysis from PubMed database about term “click chemistry and nanoparticles” .	62
1.1 Type of NPs	63
1.2 Nature of click chemistry	64
1.1.1. Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne [3+2] Cycloaddition (CuAAC)	66
1.1.2. Strain-Promoted Alkyne-Azide cycloaddition (SPAAC).....	67
1.1.3. Photoinitiated thiol-ene reaction	67
1.1.4. Inverse-electron-demand Diels-Alder [4+2] (IEDDA)	68
1.3 Role of click chemistry in NPs functionalization.....	68
2. Click chemistry and passive targeting NPs	70
2.1 Passive targeting with NPs encapsulating or complexing payloads	70
2.1.1 Encapsulation approaches	72
2.1.2 Complexation approaches	73
2.2 Passive targeting with NPs functionalized on surface	74
2.2.1 Surface functionalization with anticancer drugs.....	74
2.2.2 Surface functionalization with imaging agents	77
3. Influence of active targeting using click chemistry on tumor accumulation and cellular uptake: non-targeting vs targeting NPs.....	79
3.1 Vitamins	84
3.1.1 Folic acid	84
3.1.2 Biotin	86
3.2 Carbohydrates or polysaccharides	86
3.2.2 Glycosides.....	87
3.3 Peptides	87
3.3.1 Aptamer ligands.....	87
3.3.2 RGD peptides	88
3.3.3 Cell-penetrating peptide (CPP)	90
3.3.4 Other peptides.....	91
3.4 Protein ligands	92
3.5 Monoclonal antibodies (mAbs).....	92
3.6 Other nano-conjugates	94
4. Bioorthogonal chemistry and pretargeting systems (PT) for NP delivery	95
4.1 PT approach with ligands as targeting agents	96
4.2 PT approach with NPs as “platform”	102
References	106

Introduction

Nanotechnologies are an integral part of our daily life, whether at work, at home or on holidays. As an emerging strategy for development, nano-based ingredients (nanomaterial) have found a place as consumer products in the market such as paints, building materials, cosmetics, food industry, automobile, electronics, pharmaceutical industry, energy, cosmetics, materials and so much more [1]. The ISO/TS 800004-1 (2015) standard defines a nanomaterial as a: “material with any external dimension in the nanoscale (size range from approximately 1 – 100 nm) or having internal structure or surface structure in the nanoscale” and providing unique physicochemical properties (*e.g.* large surface area, high loading capacity, controlled size and shape). We can distinguish two main categories of nanomaterial at this nanoscale: (i) nano-objects (nanoparticles, nanofibers, nanotubes and nano-sheets); and (ii) nano-structured materials (aggregates and agglomerates of nano-objects, nanocomposites and nanoporous materials [2]. In two decades, NPs have emerged as promising tools in many scientific fields. Before 2000, developments first concerned basic researches in the field of chemistry, physics, material sciences and geosciences. Then, the domains of interest have gradually evolved and nowadays, an increasing share of the research is devoted to the development of NPs for applications in environmental sciences, biology and medicine [3]. The search term “nanoparticles” in PubMed databases covers a large numbers of 169,903 references (July 16, 2019). Among these articles, 485 were published before 2000 whereas 169,410 and 103,579 can be identified from 2000 to 2018 and 2014 to 2018, respectively. These represent more 98% of published articles since 2000 and about 60% for 2014 to 2018 (Figure 1).

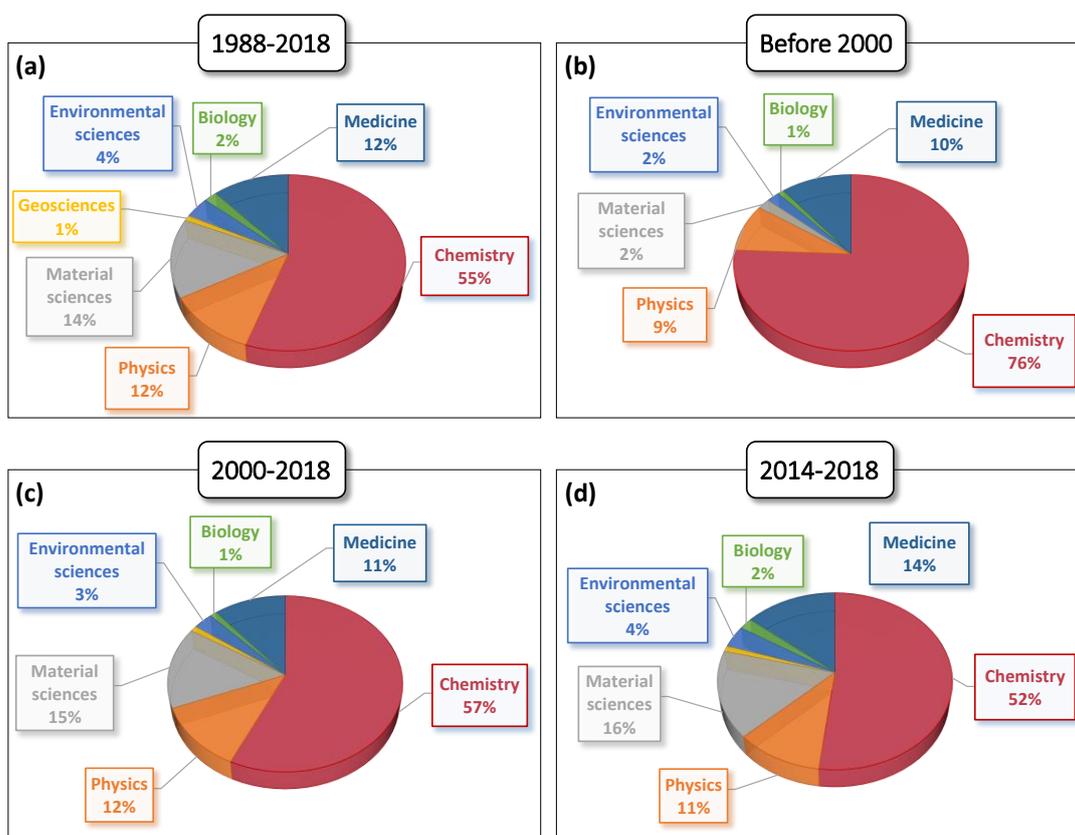


Figure 1. Analysis of search term “nanoparticle and appropriated applications in various fields”. (a) From 1988 to 2018, (b) Before 2000, (c) From 2000 to 2018, (d) From 2014 to 2018.

Figure 1 showed that chemistry, physics, material sciences and medicine are the most studied areas whatever the period concerned. It is not surprising to identify medicine as an important field because the branch of nanomedicine has revolutionized the treatment of several pathologies such as atherosclerosis [4], cardiovascular [5], neurological disorders [6], infectious diseases [7], diabetes [8] and endocrine disorders [9], arthritis [10], osteoarticular pathologies [11] and cancer [12,13]. Moreover, oncology represents 70% of nanomedical products among medical specialties mentioned above with 31% of them in phase III of clinical stages [2], including the diagnosis, imaging and treatment [14,15]. However, only 15 anticancer drugs have reached the market since 2017 [16]. Different aspects can help to explain this unexpected outcome: (i) results obtained in preclinical stage can be different at the clinical level because EPR effect is highly dependent on tumor micro environmental heterogeneity between models and individuals. Indeed, several works of the past decade indicate that only 0.7% of the injected NPs are found within tumor [16,17]; and (ii) the lack of reproducibility can be attributed to multiple factors including design studies, protocols, materials quality or purity.

In parallel to the huge development of nanomaterials, another revolution in the field of biology and medicine has been the advent of the bioorthogonal chemistries. These highly effective chemical reactions, also called with the generic name of click reactions, have been developed to achieve the stringent requirements of rate, selectivity, and biocompatibility for targeting and labelling biomolecules in biological media.

Based on these observations, we have chosen to present an overview of the impact of click chemistry in the field of nanomedicine. Indeed, click reactions demonstrated a growing interest in the biomedical field for the formation of new chemicals and covalent bonds to design NPs of interest. Click chemistry was first described in 2001 by Sharpless *et al.* as highly selective reactions occurring in mild aqueous conditions with good yields and providing favorable reaction rate compared to traditional reactions [18,19]. In this review, we thus choose to describe new modifications possibilities for NPs and highlight the contribution of click chemistry (*i.e.* copper catalyst and copper catalyst-free reactions) in order to register functional organic and inorganic NPs for cancer imaging and therapy. This includes recent applications in which reactions, themselves, have been used for functionalizing and coupling ligands to NPs. Finally, we discuss the impact and future of click chemistry in the area of NPs.

1. Meta-analysis from PubMed database about term “click chemistry and nanoparticles”

To determine the role of click chemistry in the world of NPs, we first used the search term “bioorthogonal chemistry nanoparticles” in PubMed database, because bioorthogonal reactions are normally defined as copper-free and therefore facilitate nanomedicines application. Surprisingly, we identified only 73 articles for the period 2010-2018 and only 48 from 2014 to 2018 (May 21, 2018). Hence, we next used the search term “click chemistry nanoparticles” and identified 827 total articles including 430 for the period 2014-2018. We suggested that this major difference between search terms can be attributed to the inappropriate use of the “click” term by authors even if their article concerns bioorthogonal chemistry. Indeed, several articles were common to both search terms while 25 other articles, included in this analysis, did not emerge in “click chemistry”.

Finally, the more representative panel of 827 articles was classified according to several criteria such as the type of NPs (liposomes, dendrimers, quantum dots, silica NPs, gold NPs...), the nature and the role of click chemistry: “decoration” or molecules grafting, passive targeting, and in case of active targeting, the nature of the used targeting molecules. This led to 284 selected articles; the others were excluded because they did not fall within the oncology field or because of lack of information.

1.1 Type of NPs

Tendencies may be observed in data concerning the different types of nanomaterials used for click chemistry (**Figure 2**). Polymeric NPs and dendrimers tend to be the most commonly used and represent approximately 72% of the references when combined as organic nanomaterials, contrary to micelles and liposomes, which reflect only 16%. This is certainly due to the widely use of polymers to coat NPs in order to make them biocompatible and easily functionalizable on surface. Polymers are soft materials that circulate more easily in blood vessels, avoiding risks of aggregation and clogging. In addition, dendrimers are excellent agents for *in vivo* diagnostic by imaging and therapy because of their high number of reactive groups to be functionalized and strong solubility in aqueous phase. This thereby lead to a high functionalization capacity for targeted cancer treatments and for bioimaging devices [20–23]. Concerning liposomes, their high solubility and rapid elimination from systemic circulation could be an advantage for biological applications.

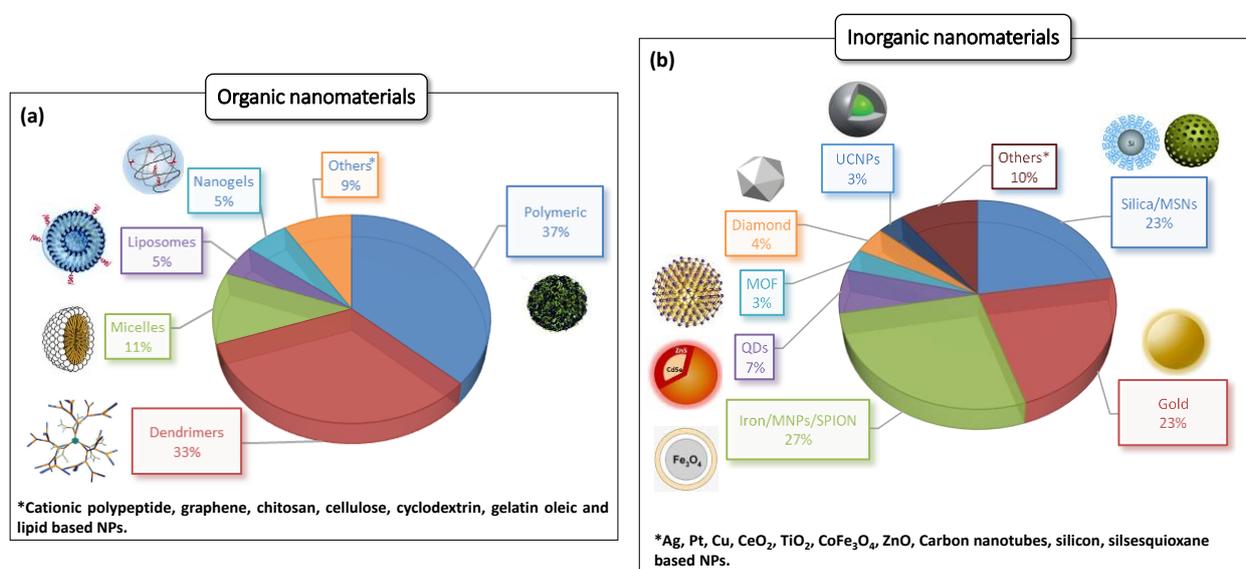


Figure 2. Analysis of the different types of NPs using search term “click chemistry and nanoparticles” according to articles for the period 2014 to 2018. (a) Organic materials, (b) Inorganic materials.

Silica (SiO₂), gold (Au) and iron oxide (Fe₃O₄) NPs constitute 75% of the inorganic NPs and are interesting click chemistry modification platform for both imaging and therapy. AuNPs are widely used as multifunctional NPs due to the possibility to incorporate targeting, therapeutic, fluorescent molecules and at the same time to use them for photothermal (PT) or photodynamic therapy (PDT) because of surface plasmon resonance properties [24] and as contrast agent for CT imaging [25]. Silica is a material of choice for biomedical applications thanks to its stability, versatility and biocompatibility. This material is described to improve the biocompatibility by coating several metallic systems such as Fe₃O₄ NPs and AuNPs [26–29].

Among stable SiO₂ NPs, mesoporous silica NPs (MSNs) are commonly employed for their capacity to encapsulate or absorb cargo (*e.g.* anticancer drugs, siRNA, plasmid DNA and peptides) into a large porous volume (> 0.9 cm³/g) for stimuli-responsive drug release [30]. Indeed, MSNs are particularly used to improve drug accumulation and therapeutic effect of hydrophobic anticancer insoluble drugs [31]. They provide adaptable pore size, wide surface area for functionalization (> 900 m²/g), and are especially thermally and chemically stable [32,33].

These numerous properties highlight the advantages of this gatekeepers for imaging [34], targeting [35] and therapy [36]. Fe₃O₄ NPs also referred as “Ultra Small SuperParamagnetic Iron Oxide” NPs (USPION, diameter < 50 nm) or “SuperParamagnetic Iron Oxide” NPs (SPION, diameter with a range of 50-500 nm). Those have shown a great interest in the field of click chemistry due to their numerous biomedical applications. These nanomaterials have magnetic properties that have been largely exploited for magnetic-resonance imaging (MRI) [37], sometimes combined with positron-emission tomography (PET) [38] and/or optical imaging [39]. For therapeutic approaches, those are used either for the delivery of conventional gene [40], chemotherapies [41], or for the hyperthermal destruction of cancer cells [42]. Their surface usually surrounded by a matrix of silica, polysaccharides (*e.g.* dextran) or polymers (*e.g.*, polyethylene glycol, PEG) is suitable to be functionalized by a large variety of targeting or therapeutic molecules [43,44].

1.2 Nature of click chemistry

The surface chemical modification of a wide variety of nanomaterials, either organic or inorganic NPs, have been extensively investigated over the past years. The incorporation of chemical functions on the NPs surfaces allows their subsequent functionalization to gain either stability or specific properties. Attachment of oligonucleotides, monoclonal antibodies (mAbs), proteins and peptides for instance, can be performed *via* electrostatic interactions or by covalent linkage. Thiol, phosphine oxide, phosphonate and carboxylate groups are employed too, especially in metal oxide NPs [45]. Usually, the surface modification can be carried out either by multi-step or one-step functionalization [46]. Chemistries such as carbodiimide-mediated coupling between carboxyl and amine, succinimidyl ester-amine and maleimide-thiol are standard bioconjugation reactions used (**Figure 3**) [47,48]. For more detailed information on functionalization strategies for the incorporation of multiple functions and/or biomolecules on the surface of nanomaterials is available in the review by De Crozals *et al.* [32].

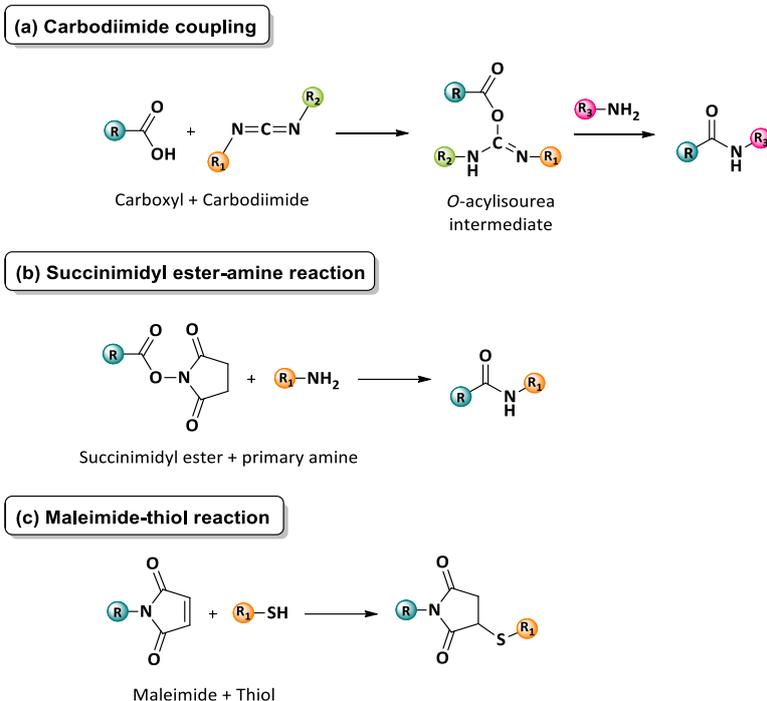


Figure 3. Traditional reactions for NPs bioconjugation. (a) Carbodiimide coupling, (b) Succinimidyl ester-amine reaction, (c) Maleimide-thiol reaction. In the schemes, the symbols **R**, **R₁**, **R₂** and **R₃** refer to any substituent.

Classical reactions such as amine-activated ester acylations are widely used for derivatizing NPs with proteins *in vitro*. Nevertheless, reaction conditions such as temperature and pH need to be considered. For instance, the use of carbodiimide coupling reactions can be subject to hydrolysis after formation of the reactive intermediate *o*-acylisourea using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) thus limiting overall yields [49]. Furthermore, the latter having a slight solubility, the number of activated carboxyl groups present onto the NPs need to be controlled to avoid the risk of losing colloidal stability and encouraging aggregation. Coupling chemistries are not specific enough to ensure binding strength of conjugations and biomolecules orientation, which is essential for biological functions. For instance, mAbs and proteins possess many different amino acids functional groups (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid) which can react with each other thus producing undesirable byproducts and competing with NP-protein binding. Development of more specific reactions could help to control specific binding sites. In the same way, multifunctional NPs with several functional molecules often generate non-specific adsorption, uncontrolled grafting and also lead to not expected hydrophobic or electrostatic interactions [32]. In fact, the functional group may react with particle surface, for instance back bonding of amino or ammonium groups with the negatively charged NPs [46]. Thus, the development of simple and more efficient reactions is required for giving heteroatom-linked molecular system in a specific way. In this context, click chemistry demonstrated its ability to provide all these properties compared to traditional chemistries. This attracting chemistry representing the focus of this review, the different types of click chemistry commonly used are presented in more details in the following sections.

1.2.1 Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne [3+2] Cycloaddition (CuAAC)

This meta-analysis highlights that the most documented click reactions in literature for NPs is the copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) representing more than the half of the listed publications (**Figure 4a**).

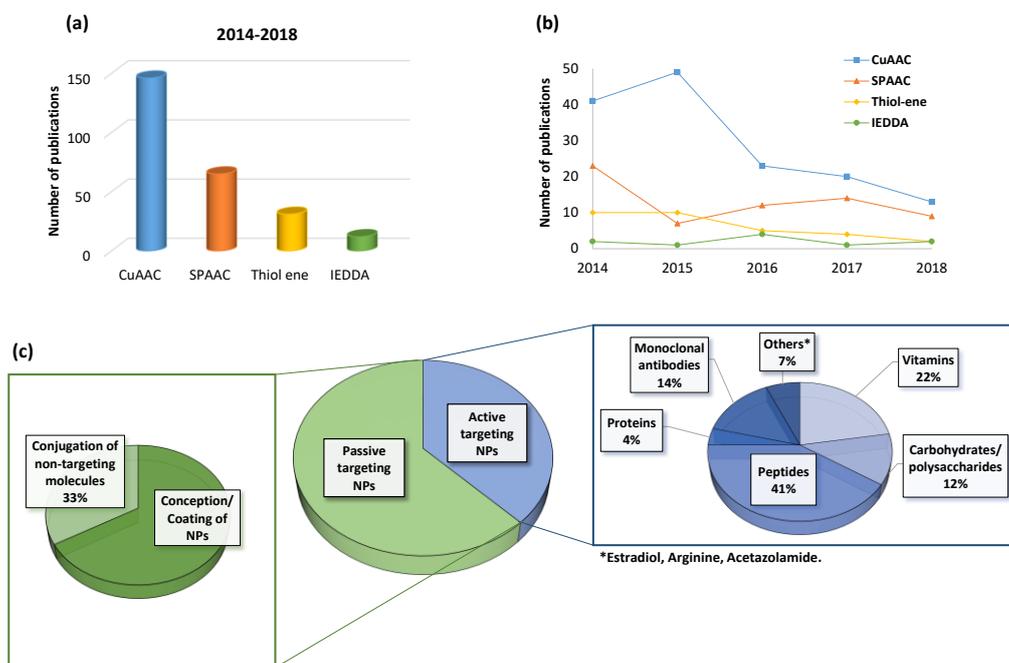


Figure 4. Graphical representations of CuAAC, SPAAC, thiol-ene and IEDDA applications for NPs according to publications from 2014 to 2018. **(a)** Total number of publications for each type of click chemistry, **(b)** Evolution over time of the total number of publications for each type of click chemistry, **(c)** Proportion of publications concerning active and passive targeting NPs.

For several years, many studies investigated the Cu-catalyzed cycloaddition and demonstrated its effectiveness for surface modified organic and inorganic NPs by molecules and biomolecules. CuAAC occurring between an azide and a terminal alkyne allow generating a stable 1,2,3 triazole [18] with a fast reaction speed (second-order rate constant k_2 up to $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [50] and reproducible results in physiological conditions (**Figure 5**) [19]. Modifications of NPs' surface for specific cell interactions mostly involved a first step allowing the chemically binding of an alkyne or azide on the surface followed by a second step allowing the addition of biomolecules. However, CuAAC was less used since 2016 (**Figure 4b**). This could be due to Cu(I) as metal catalyst which strongly limits its use either for biological settings because of cytotoxicity induced by possible interaction or chelation with biomolecules [51] or for the preparation of imaging tools due to the reduction of fluorescence for some proteins (*e.g.* green fluorescent protein, GFP) and quantum dots (QDs) [50,52,53]. CuAAC can also form *in situ* complexes with compounds thus possibly making more difficult to quantify the reaction product and purity [54]. For example, Williams and co-workers described a reduction of cell viability due to inadequate methods for removing the totality of Cu ions after functionalization of nanoporous silica NPs with polysialic acid [55]. Moreover, Cu(I) may be unstable in aqueous solution under this degree of oxidation.

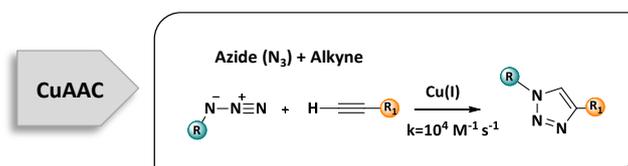


Figure 5. Copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition (CuAAC) reaction scheme. In the scheme, the symbols **R** and **R₁** refer to any substituent.

1.2.2 Strain-Promoted Alkyne-Azide cycloaddition (SPAAC)

Due to copper drawbacks, many researches then focused on biocompatible catalyst-free click reaction such as SPAAC, developed in 2010 by Bertozzi and coworkers [56]. From 2014 to 2018, approximately 20% of the studies recorded were based on SPAAC cycloaddition (**Figure 4a**) consisting to use strain stable carbocyclic alkynes, called cyclooctynes, to allow the reaction with azide moieties (**Figure 6**). SPAAC do not require catalyst and is inert towards either biomolecule functional groups or other functions found in the biological environment. However, the slower reaction rate of azides (N_3) with dibenzocyclooctyne groups (DBCO) ($k_2= 0.2-0.5 M^{-1}s^{-1}$) [50] can limit *in vivo* applications. That's why, increasingly studies are carry out using another stable aliphatic cyclooctyne called bicyclo[6.1.0]nonyne (BCN) because of accelerated reaction rate constants up to $2.9 M^{-1}s^{-1}$ [57].

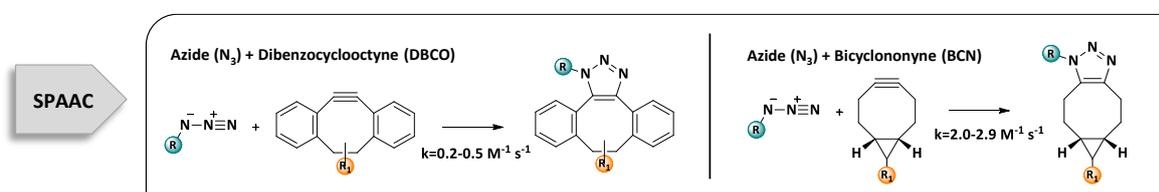


Figure 6. Strain-promoted alkyne-azide cycloaddition (SPAAC) reaction scheme. In the scheme, the symbols **R** and **R₁** refer to any substituent.

1.2.3 Photoinitiated thiol-ene reaction

The thiol-ene reaction was also investigated by scientists for NPs functionalization [58,59]. Thiol-ene involved a reaction between a thiol (SH) and an alkene group to form an alkyl sulfide and can be initiated by free-radical additions (photoinitiation, thermal or redox) (**Figure 7**). This reaction is mainly involved in the synthesis of dendrimers and polymers [60] due to the fact that it can effectively perform radical-based photopolymerization reactions for step growth (propagation and chain transfer) and chain growth (polymerization) by combining all the benefits of the click chemistry [61].

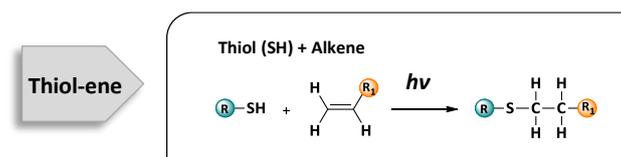


Figure 7. Photoinitiated thiol-ene reaction scheme. In the scheme, the symbols **R** and **R₁** refer to any substituent.

1.2.4 Inverse-electron-demand Diels-Alder [4+2] (IEDDA)

IEDDA cycloaddition occurring between an electron-rich dienophile as *trans*-cyclooctene (TCO) or norbornene and an electron-poor diene called 1,2,4,5-tetrazine (Tz) (**Figure 8**). This is another click reaction of interest for nanomaterials with excellent reaction rate ($k_2 = 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Despite IEDDA is the fastest click chemistry reaction, it is poorly described for NPs functionalization (**Figure 4a,b**), remaining most commonly used for two-step protocols (*i.e.* pretargeting strategies), for the delivery of NPs on cells (see **Part 4** of this manuscript) [62,63].

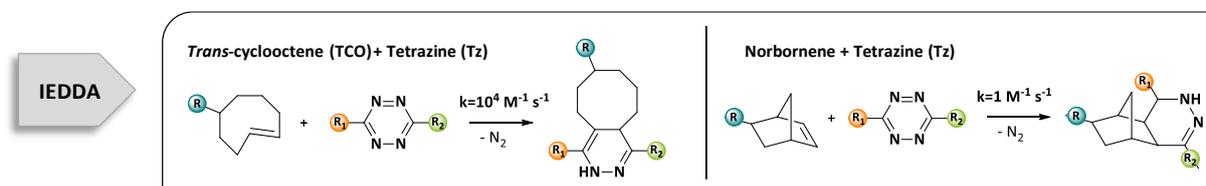


Figure 8. Inverse-electron-demand Diels-Alder [4+2] (IEDDA)

1.3 Role of click chemistry in NPs functionalization

Besides, several trends can be observed in the five years analysis concerning the field of nanomedicines (**Figure 4c**). First of all, it should be noted that 38% of click chemistry reactions described above are used for active targeting allowing NPs to achieve specific cell targeting prior to functionalization by several ligands/biomarkers of interest such as peptides, vitamins, mAbs, carbohydrates and proteins [64,65]. Then, 62% of publications use click reactions for passive targeting, this category refers to: (i) the conception of the entire NPs (*e.g.* dendrons assembly for dendrimers, polymers assembly for polymeric NPs) and the coating of NPs (*e.g.* by polymers or polyethylene glycol units) just as proof of concept (without any particular applications), it represents 67% of the articles; (ii) the conjugation of non-targeting molecules. Firstly, for encapsulation (*e.g.* polymers, polyethylene glycols, stimuli-responsive molecules) or complexation (*e.g.* amylose and carboxylic functions). Secondly, for surface functionalization (*e.g.* anti-cancer drugs, contrast agents and stimuli-responsive linkers) constituting 33% of the listed articles (**Figure 9**).

CuAAC, SPAAC, Thiol-ene, IEDDA
for NPs functionalization

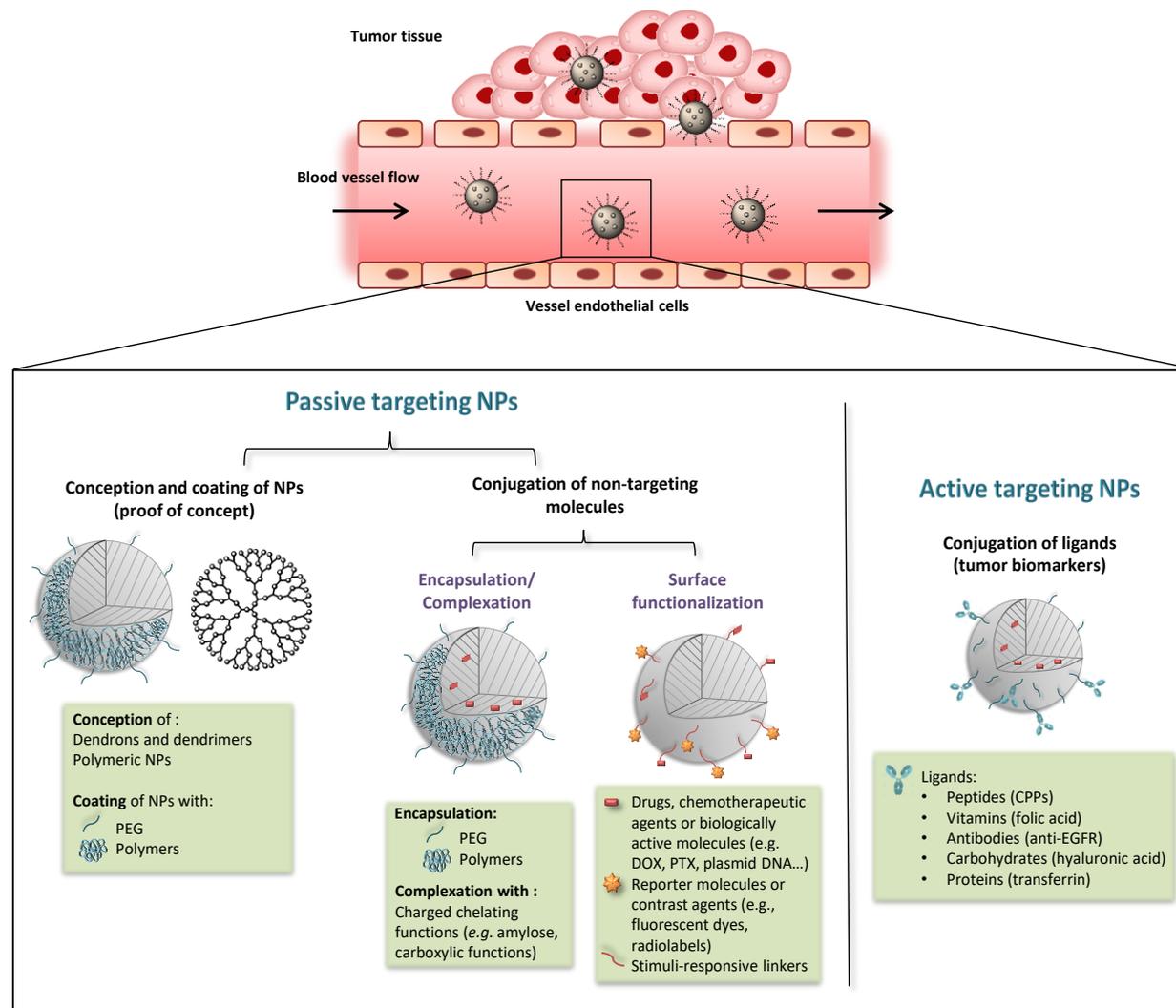


Figure 9. Different applications of click chemistry reactions for NPs functionalization.

2. Click chemistry and passive targeting NPs

Two main strategies are reported to achieve site-specific delivery of NPs: the active targeting and the passive targeting, called EPR effect, described for the first time in 1986 by Maeda and co-workers [66]. Most of researches concerning nanomedicines has been devoted to passive targeting. Indeed, the tumor microenvironment (TME) has numerous functional abnormalities which enable NPs in the size range of 20-200 nm to diffuse into tissues and to be concentrated in the tumor region. Tumor tissue include an unnatural vasculature barrier, poorly organized and irregular in shape; once the NPs crossed this barrier through intercellular gaps (*i.e.* extravasation), the weak lymphatic drainage allow retaining those in the tumor [17,67,68]. For most investigated articles, click chemistry has been used to develop passive targeting NPs to incorporate therapeutic agents either by: (i) encapsulation, complexation and/or (ii) by adding them to the surface of the nanoparticles. These two aspects are more comprehensively developed in the following sections.

2.1 Passive targeting with NPs encapsulating or complexing payloads

Based on the EPR effect for effective transfer into tumor, NPs have been firstly exploited due to their capacity to encapsulate drugs. The first passively targeted nanomedicine approved by the FDA for clinical use which is now considered as one of the most competitive chemotherapeutic systems was PEGylated liposome embedding doxorubicin (DOXIL™ in the US, Caelyx™ in other countries), in 1995. This nanocarrier has shown to increase blood circulation time and its potential to enhance tumor accumulation in a broad type of cancers (sarcoma, breast, myeloma and ovarian) [69]. Other successful liposomal drug deliveries are currently used in clinic such as Abraxane™, an albumin-bound-particle, for metastatic breast cancer and pancreatic adenocarcinoma [70]. Liposomal encapsulation of paclitaxel highlights more effective response rates compared to the free drug. Similarly, DaunoXome™ and Myocet™, a non-PEGylated 50 nm liposomal daunorubicin and 150 nm liposomal doxorubicin, respectively, have also been developed as NPs to enhance the EPR effect. Among cancer therapies, polymeric micelles loaded paclitaxel (*i.e.* Genexol®-PM), has been approved in Korea for breast, lungs and pancreatic cancers [71]. As mentioned above, paclitaxel (PTX), daunorubicin, doxorubicin (DOX) are the most commonly embedded anti-cancer drugs; but some others have recently emerged such as cisplatin (CDDP), methotrexate (MTX) or docetaxel. Over the two last decades, various nanocarrier systems encapsulating chemotherapeutic drugs have been developed for improving anti-cancer effects, while reducing their potential toxicity. Indeed, an encapsulating system present major advantages: i) it extends the half-life of the loaded drug, ii) it increases drug exposure to tumors by exploiting the EPR effect, iii) it improves bioavailability and so consequently therapeutic index. The increasing extent of preclinical *in vitro* and *in vivo* studies describing passively and non-targeted nanocarriers is encouraging for clinic transfer.

In this study, the listed articles highlighted that click chemistry contribute to encapsulate therapeutic agents by adding polymers, PEG or by being involved in dendrimers and NPs polymeric formation as well as contributing to complex drugs by incorporating molecules such as amylose or carboxylic functions (**Table 1**). Generally, the encapsulated therapeutic drugs are released through endogenous or exogenous stimuli for efficient tumor accumulation such as pH, temperature, redox, enzyme or combination of triggers [72].

MSNs, polymeric NPs and micelles are the most commonly employed NPs described in the publications as pH-responsive drug carriers using click chemistry. Indeed, they are usually designed to encapsulate therapeutic molecules and intended to be taken up by endocytosis route, then hydrolyzed by endosomes or lysosomes resulting in a higher toxicity in tumor cells than free drugs.

Table 1. General overview of passive targeting NPs (as drug carrier) using click chemistry for encapsulation and complexation of drugs, from period 2014 to 2018.

Type of click chemistry and use (grafted click function)	Type of NPs (grafted click function)	Drug loading	Release mechanism	Effects	<i>In vitro/In vivo</i> studies	Refs.
CuAAC , formation of micelles	Nanomicelles (Alkyne/N₃)	DOX, MPLA adjuvant	n.d	Cytotoxicity and anticancer activity	yes/yes	[73,74]
CuAAC , synthesis of dendrimers	β -cyclodextrin dendrimers	MTX	Acidic release	Cytotoxicity	yes/no	[75]
CuAAC , ring-opening metathesis copolymerization (ROMP)	Polymeric	Vorinostat	Acidic release	Cytotoxicity and anticancer activity	yes/yes	[76]
CuAAC , incorporation of labile Schiff base for acidic control release	Polymeric	DOX	Acidic release	Cytotoxicity	yes/no	[77]
CuAAC , incorporation of Pt(IV) prodrug (Alkyne)	Nanomicelles (N₃)	Pt(IV), DOX	Endosome degradation	Cytotoxicity	yes/no	[78]
CuAAC , incorporation of photo-responsive molecules (N₃/Alkyne)	MSNs (N₃/Alkyne)	DOX	Photo-responsive release	Cytotoxicity	yes/no	[79]
CuAAC , modification of side chain polymeric NPs with PEG (Alkyne)	Polymeric (N₃)	CPT	Ester linker hydrolysis	Cytotoxicity and anticancer activity	yes/yes	[80]
CuAAC , surface incorporation of PEG (Alkyne)	NMOFs (N₃)	Dichloroacetic acid	pH-responsive release	Cytotoxicity	yes/no	[81]
CuAAC , incorporation of amylose (N₃)	Cationic amylose-based dendrimers (Alkyne)	Plasmid DNA	n.d	Gene transfection efficacy	yes/no	[82]
CuAAC , conjugation of dextran (N₃)	Dextran-based PAMAM dendrimers (Alkyne)	Plasmid DNA	n.d	Gene transfection efficacy	yes/no	[83]
CuAAC , incorporation of amylose (N₃)	Cationic amylose-based dendrons (Alkyne)	Thrombin	n.d	Hemostatic activity	yes/yes	[84]
Thiol-ene , incorporation of the silyl ether produg (Allyl)	MSNs (SH)	CPT	Acidic release	Cytotoxicity	yes/no	[85]
Thiol-ene , incorporation of carboxyl groups (SH) for CDDP chelation	Dendrimers (Allyl)	CDDP, PTX	n.d	Cytotoxicity and anticancer activity	yes/yes	[86]
Thiol-ene , incorporation of carboxyl group (maleic anhydride) for drug chelation	MSNs (SH)	DACH-Pt	n.d	Cytotoxicity	yes/no	[87]

n.d: not determined, N₃: azide, SH: thiol, DOX: doxorubicin, MTX: methotrexate, CPT: camptothecin, CDDP: cisplatin, Pt(IV): Platinum(IV), DACH-Pt: dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II), MSNs: mesoporous silica nanoparticles, NMOFs : metal-organic framework nanoparticles.

"Effects" indicate the NP effects on cancer cells *in vitro* and/or *in vivo*.

"*In vitro/in vivo* studies" indicate if *in vitro* or *in vivo* tests were achieved (yes) or not achieved (no) in the article.

2.1.1 Encapsulation approaches

Examples of CuAAC

In a recent study, Mei *et al.* described azide and alkyne micellar nanocarriers embedding PTX and demonstrated an improvement of tumor retention and anti-tumor effect to treat lymph node metastasis of breast cancer [73]. After the micelles of 25 nm (S-PTX) are accumulated in the tumor, catalysts (copper sulfate and sodium ascorbic acid) was directly injected intra-tumorally in order to initiate the CuAAC between micelles. This process enables to form larger micelles (S-PTX (+), 100 nm) better retained into the tumor by EPR effect 12h post-injection compared to S-PTX and pre-formed larger micelles (L-PTX) ($p < 0.1$). These S-PTX (+) nanomicelles showed significant antitumor activity with 76% tumor suppression vs 49% for L-PTX and 57% for S-PTX.

The same authors also applied this strategy for immunochemotherapy through a co-delivering of DOX and monophosphoryl lipid A (MPLA) and demonstrated effective tumor volume suppression when combined with anti-PD-L1 (M-DOX/MPLA(+) + anti-PD-L1) contrary to M-DOX/MPLA(+) without anti-PD-L1 for which tumors restart to progress at 10 days post inoculation [74]. In 2015, Toomari and co-workers developed β -cyclodextrin (β -CD) dendrimers based on CuAAC click chemistry [75]. The encapsulation properties of the β -CD enable the loading of numerous MTX drugs then better released over time in acidic condition (pH 3) than in physiological pH.

Other researches based on the use of NPs for encapsulating bioactive molecules in order to improve their pharmacokinetics were also performed. pH-responsive polymeric NPs were developed to embed Vorinostat [76]. This molecule is known to treat cutaneous T-cell lymphoma by inhibiting protein histone deacetylases (HDAC) overexpressed in cancer cells. CuAAC reaction was thereby used to incorporate alkyne Vorinostat on azidomacromonomer before ring-opening metathesis copolymerization, a process for chain-growth polymerization, by using norbornene as the driving force of the reaction. The authors thus developed a successful triggered-delivery system which enhances the delivery in tumors thanks to the EPR effect and the cellular internalization by endocytosis under acid environment ($pH < 6$).

The same year, Yu *et al.* developed another biodegradable pH-responsive polymeric NP encapsulating DOX [77]. The CuAAC is of interest for this study because it does not need any protection and deprotection step of aliphatic polyesters (polylactide, PLA) scaffolds typically used after polymerization. Alkyne-functionalized PLA were prepared for the incorporation of azido-acid-labile Schiff base permitting the control release of DOX (pH 5.5). Nanoprecipitation approach and then addition of biocompatible PEG surfactant enabled the formation of dispersible DOX-loaded NPs and presenting maleimide functions available for potential incorporation of targeting moieties *via* thiol-maleimide chemistry. *In vitro* studies on MCF-7 breast cancer cells showed a slightly higher decrease of cell viability compared to the free drug, suggesting promising results *in vivo* using passive tumor targeting. In another study, pH-responsive micelles were synthesized for the co-delivery of chemotherapeutic drugs. While the Pt(IV) prodrug was anchored through CuAAC, DOX was embedded in the core *via* physicochemical interactions [78]. Internalized nanomicelles were then deteriorated in endosomes allowing DOX release (pH 5.5). The synergistic effect of both drugs released resulted in better cytotoxic activity (IC_{50} up to 0.02 μ M at 72 h post incubation in A357 cells) compared to the free drug (IC_{50} free DOX: up to 0.13 μ M at 72 h post incubation in A357 cells) or micelles with only one drug (IC_{50} DOX-loaded micelles: up to 0.14 μ M at 72 h in A357 cells).

This system has shown to improve the therapeutic efficacy of drugs (IC_{50} MSN-Pt: 25.95 μ M vs IC_{50} oxaliplatin : 39.29 μ M) thanks to a higher cellular uptake (80.11 ng Pt/mg protein at 4 h post incubation) compared to the free drug (0.69 ng Pt/mg protein at 4 h incubation) in HepG-2 cells.

In 2015, Nouredine and co-workers emphasize the benefits of developing CuAAC reaction to obtain homogenous multi-functionalizable NPs structures. Those carried azide and alkyne groups in comparison to conventional grafting methods for which uncontrolled loading and functionalization are often obtained [79]. Click chemistry was used to develop light and consequently pH-triggered MSNs containing DOX. Upon blue irradiation (at 365 nm), the two moieties interact by energy transfer (FRET), inducing, upon protonation, the dissociation of the acceptor, the decluttering of the pores and finally the release of DOX.

In another study, Cai *et al.* demonstrated the utility of CuAAC reaction for modifying side chain polymeric NPs with PEG-containing alkynes [80]. Drug polymers (SS-CSPT) were covalently assembled through CuAAC with PEG followed by the self-assembly by nanoprecipitation to form particles. These thiol redox-responsive polymeric NPs provided an efficient controlled drug release system dependent on ester linker hydrolysis. They provided a significant higher cytotoxicity on HeLa cells compared to irinotecan but similar to SN-38 (IC_{50} : 19 nM, 14 nM and 2800 nM, respectively) usually used in clinics, and efficient anticancer efficacy *in vivo* on MCF-7 cells (8.6% vs 5.3% of irinotecan).

CuAAC was also employed with pH-responsive NMOFs to attach PEG at the surface to improve stability and cellular uptake. This also allowed incorporation of fluorescent calceins for endocytosis studies or for therapeutic studies investigating anticancer drugs (*e.g.* dichloroacetic acids) [81]. The resulting PEGylated NPs (*i.e.* PEG550 and PEG2000) enhanced cellular uptake and therefore decreased cell viability at 0.75 mg/mL on HeLa cells compared to non-PEGylated NPs (50% vs 125%).

Examples of thiol-ene chemistry

In 2017, camptothecin (CPT) prodrug-functionalized MSNs obtained by thiol-ene click reaction demonstrated efficient release in acidic conditions (pH 4.0) of the drug thanks to the presence of cleavable silyl ether bonds with similar inhibition of tumor cells compared to the free drug (40% of cell growth inhibition) [85].

2.1.2 Complexation approaches

Examples of CuAAC

Natural linear polysaccharide are widely used in the biomedical field for their interesting biodegradability and biocompatibility [88]. In 2015, Mai *et al.* performed CuAAC chemistry to synthesize safe dendrimers structure based on amylose from potatoes. The positively charged nanocarriers enable the complexation of anionic plasmid DNA and *in vitro* studies confirmed the efficient transfection (up to 70% of transfection efficiency) without the use of a targeting ligand [82]. The same authors made effective gene transfection in serum with high generation of PAMAM dendrons nanocomplexes conjugated with dextran by CuAAC [83].

Another team performed this strategy with clicked amylose dendrons for haemostatic action through thrombin complexation [84]. Nanocomplexation of thrombin ensure better stability compared to native thrombin (activity retention percentage > 50% vs < 5% after 60 days, respectively).

Moreover, they demonstrated the same haemostatic effect; firstly, *in vitro* with fibrinogen coagulation tests and *in vivo* on artery haemorrhage rat model.

Examples of thiol-ene chemistry

Because of the tumor heterogeneity and the increase of drug resistance in cancer cells, the combination chemotherapy became a common strategy to treat tumors. Cai *et al.* described dendrimer micelles containing two types of anti-tumor drugs: CDDP and PTX [86]. The first one is chelated by carboxyl groups being incorporated by thiol-ene chemistry and inhibits DNA synthesis; while the second one is only encapsulated and inhibits cell cycle mitosis. *In vitro* studies made on ovarian cancer cells (SKOV-3) demonstrated a decrease of the IC_{50} due to combination of 2:1 ratio CDDP/PTX (IC_{50} : 39/19.5 ng/mL) compared to the free CDDP and PTX (IC_{50} : 1354 and 32 ng/mL, respectively). *In vivo*, this synergistic effect significantly increased tumor growth inhibition (relative tumor volume ($RTV_{CDDP/PTX}$) = 2 vs RTV_{CDDP} = 4 and RTV_{PTX} = 11) and medium survival time (40 days) compared to PTX (23 days) or CDDP (34 days) alone at the same dosage of drugs (6 mg/kg CDDP and 3 mg/kg PTX).

Thiol-ene chemistry has also been investigated for the design of MSNs containing 1,2-bidentate carboxyl groups for efficient anticancer drug chelation of the dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACH-Pt) [87].

2.2 Passive targeting with NPs functionalized on surface

Apart from encapsulation and complexation, some articles are related to the use of click chemistry for: (i) conjugating anticancer drugs and chemotherapeutic agents on the surface of NPs; (ii) adding stimuli-responsive linkers; and (iii) incorporating reporter molecules or contrast agents at NPs surface (**Table 2**).

2.2.1 Surface functionalization with anticancer drugs

In general, passive targeting NPs are subsequently intratumorally delivered after EPR accumulation and drugs specifically released by pH or enzyme responsive linkages. Indeed, nanomaterials with enzyme responsive linkages are one of the advantageous ways to selectively deliver drugs into tumor cells because of their up-regulation and cellular activities in tumor tissue. Tumor-associated enzyme matrix metalloproteinases (MMP) are one of these enzymes of interest overexpressed in cancer cells and able to selectively cleave peptide sequences in the TME for controlled drug delivery [89]. The specific peptide substrates are usually associated onto nanoscale vehicles and act as linkers for the conjugation of antitumor drugs.

Table 2. General overview of passive targeting NPs using click chemistry to incorporate drugs on surface, from 2014 to 2018.

Type of click chemistry and use (grafted click function)	Type of NPs (grafted click function)	Drug loading	Release mechanism	Effects	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i> studies	Refs.
CuAAC , incorporation of bile acid (Alkyne)	Dendrimers (N₃)	Bile acid	n.d	Cytotoxicity	yes/no	[21]
CuAAC , incorporation of MMP-2 peptide (Alkyne) and formation of nanoclusters	AuNPs (N₃)	DOX	Enzymatic cleavage (MMP cleavage)	Anticancer activity	no/yes	[25]
CuAAC , formation of nanoclusters between DOX-AuNPs and MMP-QDs	AuNPs (N₃) and QDs (Alkyne)	DOX	Enzymatic cleavage (MMP cleavage)	Cytotoxicity and anticancer activity	yes/yes	[90]
CuAAC , incorporation of gemcitabine	Dendrimers (Alkyne)	Gemcitabine (N₃)	Enzymatic cleavage (Cathepsin-sensitive linker)	Cytotoxicity and anticancer activity	yes/yes	[91]
CuAAC , incorporation of DOX at the surface	Dendrons (Alkyne)	DOX (N₃)	Enzymatic cleavage (Cathepsin-sensitive linker)	Cytotoxicity and anticancer activity	yes/yes	[92]
CuAAC , incorporation of the neuroprotective drug (minocycline)	Dendrimers (Alkyne)	Minocycline (N₃)	Ester linker hydrolysis	Treatment of neuroinflammation	yes/yes	[93]
CuAAC , incorporation of oligonucleotides (Alkyne) during nanogels formation	Nanogels (N₃)	DOX	Hybridization reaction and oligonucleotide degradation	Cytotoxicity	yes/no	[94]
CuAAC , incorporation of HDACi (Alkyne)	Polymeric (N₃)	HDACi	Acid-responsive release	Cytotoxicity and anticancer activity	yes/yes	[95,96]
SPAAC , Incorporation of immune cells and possibility to incorporate drugs (N₃)	Dendrimers (DBCO)	Immune cells (RAW 264.7)	n.d	n.d	yes/no	[97]

n.d: not determined, N₃: azide, DBCO: dibenzocyclooctyne, DOX: doxorubicin, HDACi: histone deacetylase inhibitor, MMP: matrix metalloproteinases, AuNPs: gold nanoparticles.

"Effects" indicate the NP effects on cancer cells *in vitro* and/or *in vivo*.

"*In vitro*/*in vivo* studies" indicate if *in vitro* or *in vivo* tests were achieved (yes) or not achieved (no) in the article.

Examples of CuAAC

In 2017, a bile acid was efficiently grafted by CuAAC click reaction on dendrimers and demonstrated higher cytotoxicity against glioma cells with second generation dendrimers (up to 99.31 % of inhibition at 50 μ M; IC₅₀: 10.68 μ M) compared to first generation (up to 94.1 % of inhibition at 50 μ M; IC₅₀: 14.86 μ M) [21].

Recently, Mao *et al.* used click chemistry in order to form nanoclusters (DOX@AuNCs) between azide-modified AuNPs bearing DOX (DOX/N₃@AuNPs) and MMP-2 cleavable peptides framed by alkyne group at each end [25]. Intravenously injection of DOX@AuNCs *in vivo* demonstrated an efficient tumor suppression 28 days post-injection on human lung carcinoma tumors compared to DOX@AuNPs and free DOX (tumor volume for DOX@AuNCs, DOX@AuNPs and DOX : 50 mm³, 250 mm³ and 280 mm³, respectively). This anticancer effect was evaluated by *in vivo* CT images of tumors after accumulation of Gd-functionalized nanoclusters (Gd@AuNCs). Due to their size (250-300 nm) DOX@AuNCs were 150 times higher retained in the tumor site compared to DOX@AuNPs alone (20-30 nm). This suggested that DOX@AuNCs are preferentially accumulated by EPR effect at the tumor site, which facilitate release of DOX (pH < 5.5) after nanocluster dissociation by MMP cleavage.

Similarly, Kim and colleagues described clicked-DOX nanoclusters composed of AuNPs and QDs for imaging and therapy [90]. They also used a MMP-cleavable peptide in order to selectively cleave the particles and release DOX onto AuNPs at reducing conditions through glutathione. They highlighted, *in vivo*, the advantage of using passively targeted NPs for a prolonged anticancer effect. After 15 days, nanoclusters demonstrated a higher tumor regression compared to DOX alone (relative tumor volume: 0.8% at 15 days to 0.4% at 28 days vs 0.8% at 28 days).

Another similar study used CuAAC reaction for synthesizing PEGylated dendrimer-gemcitabine (dendrimer-GEM) conjugates also to control the release of gemcitabine by cathepsin B [91], a cysteine protease known to be implicated in cancer and metastatic cell progression and to be an activator of MMPs [98]. They demonstrated *in vivo* on 4T1 murine breast cancer cells and enhanced tumor growth inhibition of 89.92% compared to free GEM with only 44.59% inhibition. This was due to the local concentration of dendrimer-GEM in tumors by EPR effect and enzyme-responsive drug release.

Same observations were made in 2017 on PEGylated dendrons conjugated to DOX (mPEGylated dendron-GFLG-DOX) *via* cathepsin-sensitive linker using CuAAC chemistry [92]. They showed an efficient antitumoral efficacy on breast cancer compared to the free drug with much higher tumor growth inhibition (80.3% vs 57.3%, respectively).

Sharma and co-workers demonstrated the ability of fluorescent PAMAM dendrimers known to cross the impaired BBB in order to target specific mediators of neuroinflammation [93]. A neuroprotective drug (*i.e.* minocycline) was introduced using CuAAC (D-mino) and was selectively released in acidic condition (pH 5.5) through the cleavage of the amide bond by esterase. These D-mino showed superior anti-inflammatory and antioxidant activities in microglial cells by significantly inhibiting inflammatory cytokine tumor necrosis factor α (TNF- α) and nitric oxide (NO) production than the free minocycline at the same 500 μ M concentration (TNF- α released: 566.5 pg/mL vs 1150 pg/mL (no reduction); NO released: 0.12 μ M vs 2.92 μ M).

In another report, CuAAC performed controlled release of DOX after hybridization with complementary ODN duplex-modified hydrogel and then nuclease degradation of the oligonucleotides [94]. The reversible hybridization platform demonstrated a decrease of 10% of the cell viability compared to the same one but with unloaded DOX nanogels.

Otherwise, CuAAC was used to introduce histone deacetylases inhibitor (HDACi) acid-responsive prodrug on polymeric NPs [95,96]. These exhibited successful antitumor effect *in vivo* on AK7 murine mesothelioma cells with 80% tumor weight regression thanks to the passive targeting induced by NPs.

Examples of SPAAC

SPAAC chemistry has also been investigated for the design of cell-dendrimer hybrids [97]. SPAAC occurred between N₃-modified immune cells (RAW264.7) obtained by metabolic glycol-engineering and clickable DBCO-dendrimers. Importantly, the newly functionalized RAW cells preserved their viability and their intracellular pathway highlighting future potential applications of these cell-NPs hybrids as drug delivery system. Moreover, these dendrimers offered the possibility to include other molecules of interest as drugs and imaging agents.

2.2.2 Surface functionalization with imaging agents

Emergence of nanomedicines have offered new opportunities to use them as imaging probes. These represent appropriate candidates for either molecular or cellular imaging [99]. In this context, the use of click chemistry for imaging through the introduction of contrast agents and functionalization by a variety of molecules has been widely developed in recent years [48]. In the recorded articles of this study, several nanomaterials combined multiple imaging modalities in order to improve diagnostic efficiency. Notably, single-photon emission computed tomography (SPECT), computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography (PET) and also optical imaging (fluorescence) are major techniques used for multimodal cancer imaging [100–102]. In particular, light in the near infrared (NIRF: 650-900 nm) is quite frequently combined with PET or MR functionalities according to its ability to allow a deeper tissue penetration thus improving *in vivo* detection of tumors (Table 3).

Table 3. General overview of passive targeting NPs using click chemistry to incorporate imaging agents on surface, from 2014 to 2018.

Type of click chemistry and use (grafted click function)	Type of NPs (grafted click function)	Imaging agent (grafted click function)	Type of imaging	<i>In vitro/In vivo</i> studies	Refs.
CuAAC, incorporation of the NIR dye	Fe ₃ O ₄ (N ₃)	IR675 (Alkyne)	MR, NIRF	yes/yes	[103]
CuAAC, incorporation of dyes	Polymeric (Alkyne)	Dyes (Cy3, ATTO-740, coumarin 343) (N ₃)	Optical	yes/no	[104]
CuAAC, incorporation of metalloporphyrins	Fe ₃ O ₄ (N ₃)	Metalloporphyrin complexed with Zn (Alkyne)	Photonic, optical	no/no	[105]
SPAAC, incorporation of imaging probes	Glycol chitosan (N ₃)	⁶⁴ Cu-DOTA, Cy5.5-MMP (DBCO)	PET, NIRF	yes/yes	[106]
SPAAC, incorporation of the chelated ⁸⁹ Zr	Liposomes (DBCO)	⁸⁹ Zr-CLL (N ₃), Cy5	PET, NIRF	no/yes	[107]
SPAAC, incorporation of the imaging probe	AuNPs (DBCO)	¹²⁵ I (N ₃)	PET	no/yes	[108]
SPAAC, incorporation of the IR dye	Gold nanorods (N ₃)	IRDye 800CW (DBCO)	Optical	no/no	[29]

N₃: azide, DBCO: dibenzocyclooctyne, Fe₃O₄: iron oxide nanoparticles, AuNPs: gold nanoparticles, MMP: matrix metalloproteinases, MR: magnetic resonance, NIR: near infrared, PET: positron emission tomography.

"*In vitro/in vivo* studies" indicate if *in vitro* or *in vivo* tests were achieved (yes) or not achieved (no) in the article.

Examples of CuAAC

This click chemistry was explored for efficient preparation of bimodal NPs consisted of combining MR and NIRF imaging to improve *in vivo* imaging [103].

Use of CuAAC for the post-functionalization of copolymeric NPs by diverse organic dyes (either Cy3, ATTO-740 or coumarin 343) allowed fluorescence signal localization [104]. Mild conditions used in copper-free click reactions enhanced the stability of dye-labeled SPION, by reducing aggregation and allowing *in vivo* detection, which was not achievable with other initially used conjugation processes.

Hollingsworth *et al.* synthesized metalloporphyrin-modified superparamagnetic, silica-coated Fe₃O₄ NPs by CuAAC for photonic and optical applications [105].

Examples of SPAAC

Bimodal nanotherapeutics combining two types of imaging such as PET/NIRF were successfully demonstrated. Lee and co-workers developed glycol chitosan NPs (CNP) as imaging probes combining PET and NIRF [106]. SPAAC was thereby used for both functionalizing azide CNPs with ⁶⁴Cu through radiolabeling of DOTA-Lys-PEG₄-DBCO and for Cy5.5 labeling with MMP activable peptide (**Figure 10**). The latter is conjugated to a dark quencher (BHQ3) and released in presence of specific MMP (MMP-2, 13 and 9 particularly) for enhancing fluorescence signals. The formed bimodal imaging probe is able to give information about both biodistribution and accumulation of NPs in tumor site, but also to provide information concerning the activity of MMP biological marker overexpressed in cancer cells. Thanks to the dual-modality imaging, NPs can provide high sensitivity associated with a good depth penetration *via* PET as well as specific molecular detection through optical imaging.

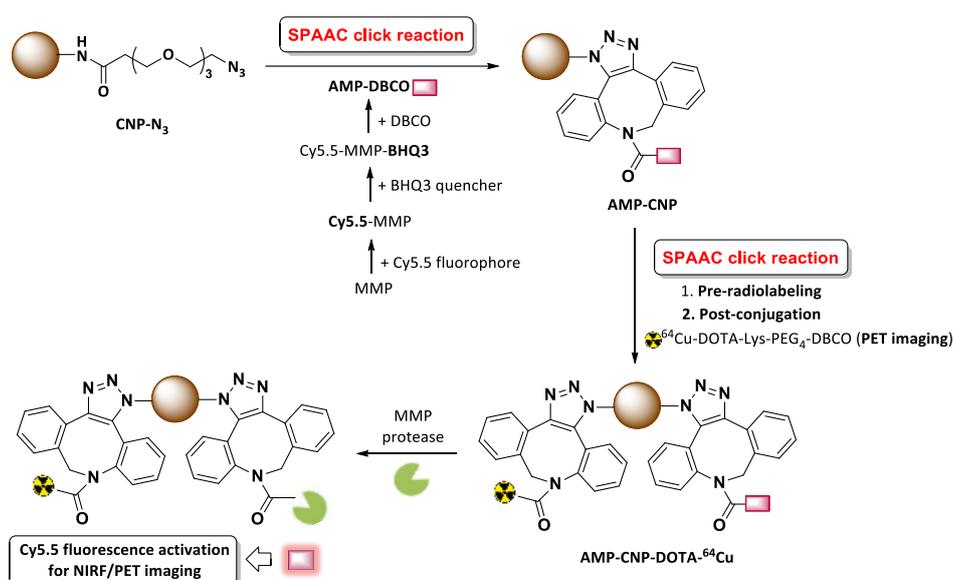


Figure 10. Schematic representation of MMP-sensitive NPs labeled via copper free click chemistry (SPAAC) with AMP-DBCO (comprising MMP-specific peptide, Cy5.5 NIRF dye and BHQ-3 (dark quencher) and ⁶⁴Cu-DOTA-Lys-PEG₄-DBCO. Figure modified from Ref. [106].

CNP : chitosan nanoparticles, MMP: matrix metalloproteinases, AMP: Activatable MMP-specific peptide probe, Lys: Lysine, DOTA: 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid ; NIRF: near infrared, PET: positron emission tomography.

In 2015, SPAAC was then employed in order to link DBCO-modified AuNPs with ¹²⁵I-labeled azide leading to excellent radiochemical yield (> 95%) for potential application as imaging probe [108]. SPAAC was otherwise used for the development of ⁸⁹Zr-labeled liposomal NPs (⁸⁹Zr-CLL) using the *in vivo* dual PET/ NIRF imaging [107].

In another study, silica-coated gold nanorods combining fluorescence and surface plasmon resonance (SPR) showed attractive fluorescent properties for future biomedical applications [29].

The benefits of passive targeting NPs obtained by click chemistry demonstrated interesting therapeutic and imaging efficacy. However, it has been recently mentioned in a meta-analysis from Wilhelm *et al.* that a median of only 0.7% ID of NPs are accumulated in tumors after injection [17]. In fact, it has been demonstrated in numerous studies that EPR effect is highly dependent on TME heterogeneity between models and individuals but relies also on physicochemical properties of NPs [72,109,110].

For this reason, various studies tried to improve tumor accumulation and biodistribution by taking into account these parameters and the TME heterogeneity [67,111,112]. The effect of size, shape and surface properties have been investigated to design smart and effective therapeutic NPs [113]. For example, rod-shaped NPs induced a higher cell uptake compared to cubes, cylinders or even spheres. Positively charged NPs are also preferred because of possible electrostatic interaction with negatively charged cell-membranes [114].

Another promising strategy to overcome TME heterogeneity consists to develop active targeting NPs. Unlike passive targeting, the active targeting relies on the conjugation of tumor specific biomarkers onto particles, generally overexpressed in the TME. Therefore, an important question remains: could the NPs be considered as a “miracle recipe” if we could address them specifically by grafting the targeting molecule with click chemistry?

3. Influence of active targeting using click chemistry on tumor accumulation and cellular uptake: non-targeting vs targeting NPs

It has been largely reported that active targeting can facilitate the specific uptake in cancer cells, although very few active targeting nanomedicines are under clinical trial (e.g. MCC-465, SGT-53, CALAA-01 in phase I and BIND-014 in phase II) [115]. Many different kinds of targeting moieties overexpressed on tumor cells are usually used and introduced by click chemistry for specific cellular interaction. Thereby, click chemistry is considered as a carefully engineered approach towards the development of new molecular delivery systems and represents 38% of the listed articles in this review. The most investigated molecules for targeting include folates, carbohydrates, cell-binding peptides (*e.g.* integrin ligands and cell-penetrating peptides), proteins, mAbs and oligonucleotides. Many studies describing click chemistry for this purpose highlighted efficient preparations of NP-conjugates to target cancer cells and compare effects of active targeting NPs on cancer cells (**Table 4**).

Table 4. General overview of articles comparing active targeting NPs and passive targeting NPs functionalized by click chemistry, from 2014 to 2018.

	Type of click chemistry and use (grafted click function)	Targeting molecule	Target	Type of NPs (grafted click function)	Drug loading	Effects compared to passive targeting NPs	Refs.
VITAMINS	CuAAC, incorporation of folic acid	Folic acid (N₃)	Folate receptor	Cerium oxide (Alkyne)	DOX and Ganetespiib	Higher cellular uptake	[116]
	CuAAC, incorporation of folic acid	Folic acid (Alkyne)	Folate receptor	Polymeric (N₃)	MTX	17% higher cellular uptake 3-fold higher cytotoxicity	[117]
	CuAAC, incorporation of folic acid	Folic acid (N₃)	Folate receptor	Micelles (Alkyne)	DOX	2.2-fold higher cellular uptake	[118]
	CuAAC, incorporation of folic acid	Folic acid (Alkyne)	Folate receptor	MSNs (N₃)	DOX	7% higher cytotoxicity	[36]
	CuAAC, incorporation of PEG-biotin on PLGA polymer	Biotin (N₃)	Biotin receptor	Polymeric (Alkyne)	DOX	2-fold higher cellular uptake 1.4-fold higher cytotoxicity 2.2-fold higher tumor uptake 2.3-fold higher antitumor activity	[119]
	SPAAC, incorporation of folic acid	Folic acid (BCN)	Folate receptor	AuNPs (N₃)		Up to 4.3-fold higher cellular binding	[120]
	SPAAC, incorporation of folic acid	Folic acid (BCN)	Folate receptor	Polymeric (N₃)		2.5-fold higher cellular binding	[121]
	IEDDA, incorporation of folic acid	Folic acid (Tz)	Folate receptor	MSNs (Norbornene)	Actinomycin D	Higher cellular uptake	[35]

	Type of click chemistry and use (grafted click function)	Targeting molecule	Target	Type of NPs (grafted click function)	Drug loading	Effects compared to passive targeting NPs	Refs.
CARBOHYDRATES	CuAAC, incorporation of HA polymer	Hyaluronic acid (Alkyne)	CD44 receptor	Lipidic (N ₃)	siRNA	1.8-fold higher cellular uptake 10% higher cytotoxicity 15% higher gene-silencing <i>in vitro</i> 2-fold higher tumor uptake and antitumor activity 30% higher gene-silencing <i>in vivo</i>	[122]
PEPTIDES	CuAAC, incorporation of iRGD, RGDS and poly(glutamic acid)	iRGD, RGDS and poly(glutamic acid) (N ₃)	Integrin β_3 and γ -glutamyl transpeptidase	PSi (Alkyne)		Higher cellular uptake	[123]
	CuAAC, incorporation of RGE	RGE (N ₃)	Neuropilin-1	Exosomes (Alkyne) embedding SPION NPs	Curcumin	60% higher cellular targeting 20% higher cytotoxicity 3-fold higher tumor targeting 1.34-fold higher antitumor activity	[124]
	CuAAC, incorporation of RGD	RGD (Alkyne)	Integrin β_3	Micelles (N ₃)	PTX	3-fold higher cellular uptake 14-fold higher cytotoxicity Higher antitumor activity	[125]
	CuAAC, incorporation of RGD	RGD (N ₃)	Integrin β_3	Fe ₃ O ₄ (Alkyne)		1.4-fold higher cellular binding	[166]
	CuAAC, incorporation of cRGD	cRGD (N ₃)	Integrin β_3	NDs (Alkyne)		12-fold higher cellular binding	[127]
	CuAAC, incorporation of cRGD and BODIPY	cRGD (Alkyne)	Integrin β_3	Fe ₃ O ₄ (N ₃)		Higher cellular uptake	[128]
	CuAAC, incorporation of F3-peptide	F3-peptide (Alkyne)	Nucleolin	Polymeric (N ₃)	DOX	10 to 20-fold higher cellular uptake	[176]

	Type of click chemistry and use (grafted click function)	Targeting molecule	Target	Type of NPs (grafted click function)	Drug loading	Effects compared to passive targeting NPs	Refs.
PEPTIDES	SPAAC, incorporation of DNA	AS14111 (DBCO)	Nucleolin receptor	NMOFs (N ₃)	DOX	10% higher cytotoxicity	[130]
	SPAAC, incorporation of DNA	DNA (DBCO)	Class A scavenger receptor	NMOFs (N ₃)		5-fold higher cellular uptake	[131]
	SPAAC, incorporation of iRGD and DOTA	iRGD (N ₃)	Integrin β ₃	PSi (DBCO)	Sorafenib	No difference in cytotoxicity 1.63-fold higher tumor accumulation No difference in tumor growth inhibition	[132]
	SPAAC, incorporation of RGDS	iRGD and RGDS (N ₃)	Integrin β ₃	PSi (BCN)	Sorafenib	20% higher cellular uptake for RGDS 15% higher cytotoxicity for RGDS	[167]
	SPAAC, incorporation of GLA	GLA peptide (N ₃)	PSMA receptor	Dendrimers (Cyclooctyne)	MTX	8-fold higher cellular uptake	[133]
	SPAAC, incorporation of LHRH	LHRH peptide (DBCO)	LHRH receptor	Polymeric (N ₃)	p53	Up to 70% higher cytotoxicity	[134]
MONOCLONAL ANTIBODIES	CuAAC, incorporation of anti-HER-2	Anti-HER-2 (N ₃)	HER-2	Dendrimers (Alkyne)		Higher cellular uptake	[135]
	CuAAC, incorporation of anti-HER-2	Anti-HER-2 (Alkyne)	HER-2	Polymeric (N ₃)	DOX	1.5-fold higher cellular uptake on SK-BR-3 and 1.3-fold higher on MCF-7 20% higher cytotoxicity on SK-BR-3 and MCF-7	[136]

	Type of click chemistry and use (grafted click function)	Targeting molecule	Target	Type of NPs (grafted click function)	Drug loading	Effects compared to passive targeting NPs	Refs.
OTHERS	CuAAC, incorporation of arginine	Arginine (N ₃)	n.d	Hydrogels (Alkyne)	pMMP-9	13% higher transfection efficiency 20% higher MMP-9 protein expression inhibition No difference in antitumor activity	[137]
	CuAAC, incorporation of arginine 8	Arginine 8 (Alkyne)	n.d	Mesoporous bioactive glass (N ₃)	pOA-GFP	No difference in transfection efficiency	[138]
	CuAAC, incorporation of Nuclear localization sequences	Nuclear localization sequences (Alkyne)	Nucleus	QDs (N ₃)		Up to 44% higher nucleus targeting	[139]
	SPAAC, incorporation of acetazolamide	Acetazolamide (DBCO)	Carbonic anhydrase IX	Micelles (N ₃)	PTX	1.22-fold higher cellular uptake in MDA-MB-231 and 1.28-fold higher in MDA-MB-468 28.5% higher cytotoxicity in MDA-MB-231 and 26.1% MDA-MB-468	[140]
	SPAAC, incorporation of DNA	Anti-HER2 DNA (DBCO)	HER2	ICP (N ₃)		6-fold higher gene knockdown	[141]

n.d: not determined, N₃: azide, DBCO: dibenzocyclooctyne, RGD: Arginine-Glycine-Aspartic acid, iRGD: Cystein-Arginine-Glycine-Aspartic acid-Lysine-Glycine-Proline-Aspartic acid-Cystein, RGDS: H-Arginine-Glycine-Aspartic acid-Serine-OH, LHRH: luteinizing hormone releasing hormone, siRNA: Small interfering RNA, DNA: deoxyribonucleic acid, PSMA: prostate-specific membrane antigen, HER2: human epidermal growth factor receptor 2, GLA: glutamate urea, DOX: doxorubicin, MTX: methotrexate, PTX: paclitaxel, pOA-GFP: green fluorescent protein, MMP: matrix metalloproteinases, Psi: porous silicon, MSNs: mesoporous silica nanoparticles, AuNPs: gold nanoparticles, NMOFs: metal-organic framework nanoparticles, ICP: infinite-coordination-polymer, QDs: quantum dots

3.1 Vitamins

Vitamins represent vital nutrient internalized during the metabolic activity of cancer cells through the presence of specific overexpressed receptors on the cell surface [142]. Regarding the specific recognition of vitamins by cell surface receptors, vitamin-functionalized NPs constitute an attractive strategy for targeting tumor cells and have been employed in several targeted drug delivery approaches.

3.1.1 Folic acid

Folic acid (FA) also called folate or vitamin B9 is a non-immunogenic water-soluble vitamin involved in the synthesis of purines and pyrimidines of DNA as well as in cellular growth [143]. This molecule once attached to its folate receptor (FR) will be internalized by endocytosis. As FRs are overexpressed in a variety of tumors (*e.g.* ovarian, colorectal, breast, brain, lung, etc.) and slightly in normal cells they were one the most used ligands widely exploited for active targeting of nanomaterials. While click chemistry has been used to conjugate many ligands to nanomaterials, this approach was also adapted to attach other frequently used biomarkers of cancer cells such as FA.

Examples of CuAAC

Several FA-based drug nanocarriers conjugated by CuAAC click reaction have revealed to improve cellular uptake and therefore the therapeutic efficacy in a variety of studies. For instance, the folate-decorated nanoceria (FNC) co-encapsulated DOX and Ganetespib (GT) (FNC-Doxo-GT) showed to induce more A549 cell death within 48 h of incubation due to synergistic effect compared to FNC-Doxo and FNC-GT (90%, 70% and 75% cytotoxicity, respectively) [116]. Moreover, fluorescence microscopy images demonstrated specific cellular uptake of FNC-Doxo-GT compared to the non-targeted PNC-Doxo-GT for which any fluorescence was detected.

Likewise, folate conjugated NPs decorated with MTX along poly(ϵ -caprolactone)-co-methoxy-poly(ethyleneglycol) (P(MTXCLCL)-mPEG) showed to enhance cellular uptake compared to the non-targeted P(MTXCLCL)-mPEG (51.8% vs 34.7% uptake after 120 min of incubation) and also the cytotoxic effect on MCF-7 cells (IC_{50} : 0.053 μ g/mL vs 0.167 μ g/mL) [117].

In another article, Wu and co-workers synthesized FA-modified core-shell nanomicelles encapsulating simultaneously DOX and P-glycoprotein siRNA [118]. Fluorescent images of micelles confirmed the FR-mediated pathway in MCF-7 cells with a significant decrease of cellular uptake when cells were treated with FA (95.4% vs 65.1% of DOX positive cells). Moreover, relevant synergistic cytotoxic effect of DOX and siRNA was obtained *in vitro* compared to nanomicelles alone and free DOX (85.3%, 41.3% and 15.7%, respectively). In addition, these nanomicelles induced *in vivo* a significant increase of tumor growth inhibition compared to free DOX ($p < 0.05$). Delivery of siRNA exerts a down regulation of P-gp protein and therefore inhibits DOX efflux from the cells. Other FA-conjugated hollow ZnO NPs delivering PTX (FCPZnO) exhibited higher cytotoxic activity compared with the free PTX on MDA-MB-231 cells (IC_{50} : 11.84 nM vs 7.21 nM) and MCF-7 cells (IC_{50} : 14.02 nM vs 8.06 nM) [144]. In murine MDA-MB-231 tumor xenografts, FCPZnO also demonstrated 4-fold higher tumor growth regression compared to PTX alone after 35 days.

In another study, the FA-modified multiblock polyurethane micelles loading DOX (SSPHPU-FA-DOX) demonstrated significant 2.2-fold superior cellular uptake on HeLa cells compared to SSPHPU-DOX as determined by both confocal microscopy images and flow cytometry [145]. *In vivo*, DOX/SPION@SSPHPU-FA decrease the tumor weight up to 98.6% thanks to magnetically targeted drug delivery.

Zhang *et al.* synthesized FA and Cy7-modified chitosan NPs (CF7Ns) capable of both PDT and NIRF imaging [146]. *In vitro*, HeLa cells showed higher fluorescence intensity with CF7Ns than the non-targeted C7Ns on fluorescence microscopy images and in flow cytometry. They also proved to significantly enhanced cytotoxic effect *in vitro* with NIR laser irradiation cells compared to C7Ns (75% vs 65% for 24 h at 2.8 µg/mL) and improved apoptosis cells for 48 h (70.4% vs 27.8%).

In 2016, FA-MSNs delivering DOX (NP2-BZ-FA-DOX) upon photoactivation (by UV or blue irradiation) exhibited superior cytotoxic activity against MCF-7 cells compared to the non-targeted NP2-BZ-DOX (37% vs 30%) [36]. These results suggested that the targeting abilities of FA directly influenced drug efficiency because of superior internalization and therefore photoactivation in the cells.

Examples of SPAAC

Similarly, BCN-FA anchored on hollow AuNPs (HAuNP-DNBA-FA) highlighted an improvement in SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) imaging on FR-positive cancer cells (i.e. KB, HeLa and A549 cell lines) compared to the non-targeted HAuNP-DNBA-N₃ (Raman intensity: up to 650 vs 150 on KB cells) [120].

Another study employing BCN-FA for SPAAC with N₃-polymeric NPs (NPs-PEG-FA) revealed also higher binding on HeLa cells compared to untargeted one NPs-PEG in fluorescence microscopy study (Mean fluorescence intensity (MFI): 25 vs 10) [121].

Example of IEDDA

Other MSNs anchoring FA (MSN-pHSA-CA-FA) by norbornene/tetrazine click chemistry demonstrated results *in vitro* for specific cell recognition and carbonic anhydrase-based pH-responsive drug delivery [35]. The controlled drug release is ensured by the detachment in acidic conditions (pH=5.5) of carbonic anhydrase during endosomal internalization. Fluorescence microscopy images of KB cells treated with MSN-pHSA-CA-FA showed higher cellular uptake compared to MSN-CA.

3.1.2 Biotin

Among the other vitamins, biotin is essential for tumor cellular growth and few examples of conjugation onto NPs for tumor-targeting exist in the literature.

Examples of CuAAC

T2-weighted magnetic resonance images of A549 cell phantoms incubated with Pyrene-Biotin-Fe₃O₄ NPs revealed specific cell internalization. In this case, click reactions serve to develop biofunctional Fe₃O₄ NPs. Pyrene and biotin were grafted on the NP surface through Diels-Alder and azide-alkyne cycloaddition respectively, with high control of reactivity.

Moreover, proof-of-concept of pyrene release by external magnetic field demonstrated their potential application as controlled drug delivery platforms [147].

In 2017, biotinylated-PEG-PLGA NPs containing DOX (BPNP) showed to improve 4T1 cellular uptake in flow cytometry compared to the non-biotinylated DPNP (MFI of 214 vs 113) and to be more cytotoxic after 24 h (IC₅₀: 91.5 nM vs 131.8 nM) [119]. *In vivo*, BPNP demonstrated higher tumor uptake on mice bearing 4T1 breast tumor cells than DPNP (Maximum tumor concentration: 49.4 ng/mg vs 22.45 ng/mg); and also superior antitumoral activity with increased tumor volume regression (99.36 to 29.74 mm³) compared with DPNP (102.72 to 68.43 mm³) and the free DOX (100.43 to 76.38 mm³).

Examples of SPAAC

Other articles mentioned biotin-clicked NPs by SPAAC for biosensing applications to amplify RNA and DNA detection with AuNPs [148] or UCNPs [149].

3.2 Carbohydrates or polysaccharides

One possibility to prepare drug delivery targeting NPs is the use of carbohydrates specifically directed against cell surface receptor (*i.e.* lectins). Different classes of targeting molecules for binding lectins exist such as monosaccharides (*e.g.*, galactose, mannose, fucose, sialic acid), disaccharides (*e.g.*, lactose and N-acetyllactosamine), or polysaccharides (*e.g.*, hyaluronic acid, pullulan, dextran, chitosan). Indeed, lectins are known to be involved in growth and metastasis of tumors and constitute an interesting targeting approach through the use of endocytosis process [150,151]. Several carbohydrate NPs have thus been synthesized *via* click chemistry for specific targeting therapy and were for example recently reported to obtain glyco-gold NPs [152]. Functionalization *via* the CuAAC click chemistry have been only reported for the studied period.

3.2.1 Hyaluronic acid

NPs containing hyaluronic acid (HA) are attractive candidates for therapeutic applications. Indeed, HA is a natural anionic polysaccharide, extracellular constituent of connective tissues and is able to bind CD44 receptor overexpressed in several tumor cells. Furthermore, HA is often used as a carrier for intracellular controlled drug release through degradation by hyaluronidase (HAase) [153].

Examples of CuAAC

Sun *et al.* investigated this strategy for engineering tumor-targeted siRNA delivery nanosystems [122]. Thanks to CuAAC, they easily conjugated the alkyne-HA polymer onto lipid-based complexes encapsulating siRNA (RSC) *via* N₃-modified cholesterol present on the surface (RSC-HA). They revealed by flow cytometry significant improvement in cellular uptake of the RSC-HA compared to RSC *in vitro* on A549 cells (MFI 140 vs 80). They also improved significantly siRNA gene-silencing efficiency with 55% down-regulation of mRNA expression for RSC-HA compared to 40% for RSC; and anticancer activity *in vitro* (total apoptotic ratio: 23.48% vs 13.36%). Moreover, vectors with HA polymer grafted on the liposome *via* click chemistry showed greater *in vivo* stability in the blood for efficient tumor targeting, compared with RSC/HA in which HA was physically adsorbed on the complex. 2-fold higher tumor uptake and tumor growth inhibition were obtained after 10 days of treatment compared to the non-targeted RSC with approximately 30% superior gene-silencing efficiency.

3.2.2 Glycosides

Sugars are able to enhance the binding affinity towards lectin receptors thanks to a phenomenon called the “cluster glycoside effect”, where diverse copies of glycoside clusters interact together to enhance the recognition [154]. In this context, dendritic multivalent glycosides were familiar to biomedical approaches [155]. Only examples of CuAAC click chemistry were described for the studied period.

Examples of CuAAC

Rajakumar *et al.* incorporated glucose on dendrimers by CuAAC and showed cardio protective and anti-diabetic properties [156].

Interestingly, Kong *et al.* realized on mannose and galactose-modified SiO₂ NPs, and demonstrated the concept of a quantitative fluorine NMR method to determine the density of carbohydrates incorporated by CuAAC [157]. CuAAC was also used to incorporate thiosialoside on fullerenes directed against the influenza virus neuraminidase, implicated in virus replication despite moderate antiviral activity [158].

3.3 Peptides

3.3.1 Aptamer ligands

Nucleic acid aptamers are single-stranded oligonucleotides (DNA or RNA) widely used as therapeutic molecules. They can target a large variety of specific proteins overexpressed by cancer cells leading to a possible internalization. In addition, aptamers can be chemically synthesized and easily modified with a broad range of chemical functions [159]. Aptamers-decorated nanocarriers are thus promising assemblies as drug delivery systems. Nevertheless, most of the strategy employed for surface functionalization are based on electrostatic interaction and suffer from possible instability. In this context, click chemistry was able to ensure DNA/RNA surface functionalization of nanomaterials. For instance, CuAAC demonstrated the effective bioconjugation of DNA on polymeric QDs for hybridization without disturbing the biological molecule [160].

Examples of SPAAC

Among aptamers currently employed, the AS14111 aptamer is specific to the nucleolin receptor [129]. AS14111 was conjugated by SPAAC on metal-organic framework NPs (NMOFs) for specific DOX release in acidic conditions (pH 5.0) [130]. Targeted NMOFs demonstrated higher cytotoxicity than the non-targeted one *in vitro* on MDA-MB-231 cancer cells after three days (45% vs 35%). In another study, SPAAC was also investigated to conjugate DNA on NMOFs (MOF-DNA) and highlighted 5-fold higher cellular uptake of 14 nm MOF-DNA than MOF alone [131].

In 2016, UCNPs delivering DOX towards TK1 mRNA and showed 57% specific cytotoxicity on MCF-7 cancer cells compared to any cytotoxicity for LO2 normal cells [161].

Due to high affinity and specificity of aptamers, they have been widely investigated for protein detection assays. For instance, Chen *et al.* designed double stranded DNA-MSNs embedding FITC (dsDNA-FITC-MSN) to elaborate thrombin biosensor. Indeed, FITC was released from the pores only after specific dsDNA-thrombin recognition making them potential stimulus responsive system to detect thrombin in serum samples [34].

Akiel *et al.* used SPAAC to functionalize N₃-NDs with DBCO-single strand DNA for subsequent hybridization to complementary strands [162]. Specific DNA association can be characterized by a different X-band EPR spectroscopy profile compared to the non-hybridized nanomaterial making them promising sensor platforms.

Examples of thiol-ene

Other authors anchored aptamers on NPs through thiol-ene click reaction in order to detect and capture bovine serum-albumin (BSA) [27]. NPs were combined with a molecularly imprinted polymers layer able to entrap molecule as proteins in a complex matrix. Thiol-ene click chemistry was also successfully applied on colloidal NPs for aptamer bioconjugation [44].

3.3.2 RGD peptides

Among the various types of peptides, integrins are a large class of cell adhesion receptors including 24 different peptides. They are very attractive for targeting tumor site due to their role in disease progression [163]. The tripeptide sequence Arg-Gly-Asp (**RGD**) is usually used as ligand owing to its affinity with a wide variety of integrins which promotes cellular adhesion and internalization [164].

Examples of CuAAC

In 2018, Jia and co-workers improved the targeting ability of exosomes embedding RGE-modified SPION (SuperParamagnetic Ion Oxide Nanoparticle) and Curcumin (RGE-Exo-SPION/Cur) against glioma cancer cells [124]. They demonstrated a significant higher targeting ability with RGE-Exo *in vitro* on U251 cells compared to free-Exo (close to 100% vs 40%) and 3-fold higher tumor targeting *in vivo* on glioma tumor-bearing mice 4h post-intravenous injection. They revealed significant superior cytotoxicity using RGE-Exo compared to free-Exo (60% cell inhibition vs 40%) and higher tumor volume suppression (70 mm³ to 3 mm³ vs 70 mm³ to 20 mm³) with no tumor regression until 28 days.

Conjugation of RGD peptides using CuAAC is usually performed through polymers and PEG-coated NPs having alkynes peripheral functional groups. In a recent study, the potential of targeting RGD has been reported on micelles loading PTX composed of polymer and N₃-PEG [125]. RGD mediated 3-fold higher 4T1 cellular uptake compared to non-targeted NPs thanks to MMP-2 proteolytic cleavage together with superior cytotoxicity (IC₅₀: 79 ng/mL vs 1130 ng/mL). *In vivo*, RGD-NPs exhibited higher tumor growth inhibition with only 1.9-fold volume increase after 24 days compared to 16-fold for non-targeted NPs.

In 2016, Arriortua *et al.* investigated the conjugation of N₃-RGD with amino-alkyne polymeric iron NPs (Fe₃O₄@PMAO_RGD) [126]. Hyperthermia properties of Fe₃O₄@PMAO_RGD NPs increased significantly liver colorectal tumor necrosis to 16% compared to saline group under magnetic field without damaging hepatic tissues.

Fluorescent probes have been successfully used in the field of targeting NPs and afford new opportunities in biomedicine such as specific cancer diagnosis. In this context, nanodiamonds (NDs) constitute interesting fluorescent systems for bioimaging applications because of optical crystal properties responsible for the NIRF. Slegerova *et al.* described fluorescent NDs coated with an alkyne-copolymer allowing both incorporation of N₃-cyclic RGD peptide and fluorescent molecule (Alexa Fluor 488) (FNDs-cRGD) for glioma cancer cell imaging [127]. These FNDs-cRDG demonstrated 12-fold higher U-87 MG cellular binding compared to FNDs. A similar strategy was applied by Rehor *et al.* with NDs coated with alkyne-PEGs and polymers to introduce N₃-labeled ¹²⁵I-RGD or FITC probes for prostate cancer cells imaging [165].

In 2017, multifunctional RGD- Fe₃O₄ NPs also showed 1.4-fold higher cellular binding compared to non-targeted NPs on BT-20 cells [166].

Another study demonstrated enhance cellular uptake of porous silicon (PSi) NPs loading three different molecular weight targeting peptides (*i.e.* N₃-functionalized iRGD, RGDS and poly(glutamic acid)) on endothelial EA.hy926 and U87 MG cells [123]. Oz *et al.* synthesized NPs conjugated to cRGD and fluorescent dye BODIPY by CuAAC and thiol-maleimide click chemistry for imaging MDA-MB-231 breast adenocarcinoma cells [128]. They demonstrated higher cellular uptake in fluorescence microscopy with the targeting cRGD peptide.

Examples of SPAAC

Wang *et al.* compared active and passive cellular targeting for improving retention and efficacy of the therapy at the target site. They reported a new theranostic and multifunctional porous silicon (PSi) NPs able to realize both imaging and delivery of a therapeutic agent (*i.e.* sorafenib) [132]. The surface was modified using SPAAC in order to introduce the DOTA chelators necessary for ¹¹¹In-radiolabeling for SPECT/CT imaging. In a second step, the targeting peptide iRGD was inserted to design PSi-iRGD-NPs (**Figure 11**). PSi-iRGD-NPs exhibited superior tumor specific accumulation in prostate cancer cells (PC3-MM2) compared to PSi-NPs 27h post-intravenous injection (4.4 vs 2.7 tumor-to-muscle ratios of the radioactivity). However, NPs demonstrated a similar tumor growth inhibition both after intravenous and intratumoral injection.

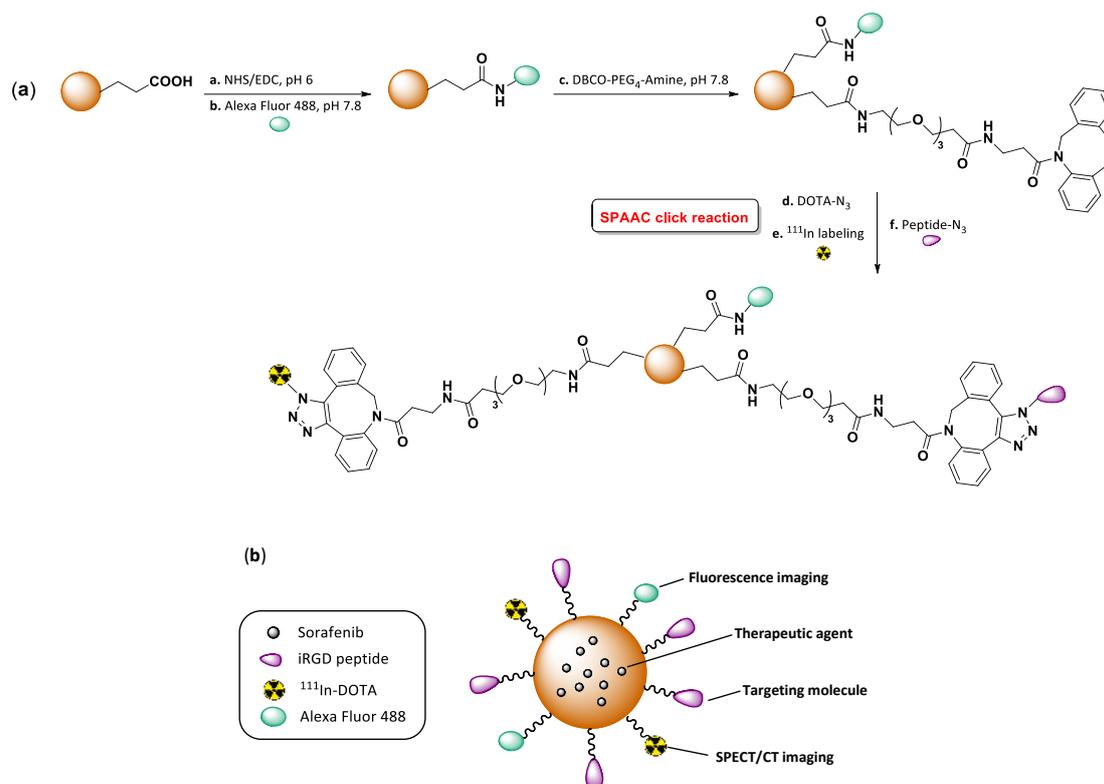


Figure 11. (A) Synthesis and (B) schematic structure of the multifunctional nanocarrier encapsulated Sorafenib, functionalized with Alexa Fluor 488 and labeled ^{111}In -DOTA and iRGD peptide *via* SPAAC click chemistry. Figure modified from Ref. [132].

An efficient drug delivery system was also created by using BCN-functionalized PSi-NPs for the conjugation of N_3 -RGD derivatives (TCPSi-RGDS/iRGD) [167]. This approach led to a significant 20% higher cellular uptake for TCPSi-RGDS and 15% higher cells growth inhibition with sorafenib on EA.hy926 endothelial cells compared to the non-targeted NPs.

3.3.3 Cell-penetrating peptide (CPP)

Cell penetrating peptide (CPP) appeared recently to be a promising ligand for targeting cancer therapy. Natural or synthetic peptides are highly used to enhance cellular uptake through endocytosis process and are conjugated especially to deliver cargo based nanomedicines [168]. Trans-activating transcriptional activator (Tat) is one of the CPPs existing and used for targeting delivery systems. CPP is a positively charged peptide derived from the Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) and has the ability to access the cell nuclei for exercising its translocation activity [169].

Examples of CuAAC

Liu *et al.* described in 2015 PSi nanocomposites constituted of an acetalated dextran matrix (AcDX) degradable in acidic conditions and embedding three therapeutic molecules (*i.e.* Sorafenib, MTX and PTX) currently used in breast cancer treatment [170]. They included through an oxime click chemistry, cell-penetrating peptides (CPP) for receptor internalization pathway to finally obtain PSi@AcDX-CPP NPs. Experiments made at two different pH (*i.e.* pH 7.4 and pH 5.0) indicated a controlled release of the cargos at only pH 5.0 because of hydrolysis of the polymeric matrix.

The advantage of adding CPP-targeting moieties for improving internalization was supported by cell uptake studies on two breast cancer cell lines by comparing PSi@AcDX-CPP and PSi@AcDX NPs (MCF-7: MFI of 2000 vs 250; MDA-MB-231: MFI of 1550 vs 250). As a direct consequence, PSi@AcDX-CPP significantly improved the proliferation inhibition compared to the non-targeting one PSi@AcDX (cell viability for MCF-7 and MDA-MB-231: ~ 60% vs no cytotoxic effect).

The same year, N₃-Tat was used to functionalize micelles loading DOX *via* the CuAAC [171]. The drug could be specifically released through the hydrolysis of two types of amides. The first one was carried out by the positively charged amphiphilic diblock copolymer poly(L-lysine)-block-poly(L-leucine) (PLL-PLLeu) of the nanocarrier. This polymer became negatively charged at pH ~ 6.5 in the tumor extracellular microenvironment allowing internalization by tumor cells. The second one was carried out by the Tat peptide amidated by succinyl chloride (Tat(SA)). After uptake by cells, this peptide was activated at pH 5.0 in the endosome through SA hydrolysis. This pH sensitive amide allowed subsequent nuclear targeting activation and DOX released. Confocal images of HeLa cells showed higher red fluorescence of DOX with targeting NPs compared to the non-targeting and demonstrated higher nuclear delivery of DOX for 24 h (400 ng vs 140 ng of DOX/10⁶ cells respectively).

Among the robust applications of nanomedicines, the delivery of small interfering RNA (siRNA) represents a promising tool for silencing genes overexpressed in cancer. *In vitro* studies on neurotropic rabies virus have supported the ability of CPP anandamide and siRNA-functionalized dendrimers to be more delivered to neural stem cells [172]. They efficiently transfect siRNA (up to 2-fold higher relative mRNA concentration) leading to 2-fold higher decrease of the virality compared to the non-targeting anandamide.

3.3.4 Other peptides

Other bioactive peptide ligands are intended to be used for different pathologies and applications. Wan's group demonstrated high efficient and high chemoselective peptide conjugation to dendrimers using SPAAC associated with no alteration of the *in vitro* and *in vivo* bioactivity [173].

Alkyne-functionalized polylysine dendrons were prepared for click chemistry with N₃-PEG-chain-modified χ -MriA analogues, a disulfide-rich χ -conotoxin peptide implicated in the treatment of neurological disorders by inhibiting selectively the human norepinephrine transporter [174]. Other alkyne-functionalized lysine dendrons using a solid-phase Cu(I)-catalyzed for azide peptide conjugation carried out great potential for future immunoassays [175]. Targeting potential of peptide for vectorized drug delivery into prostate cancer cells using PSMA-targeted PAMAM dendrimers has also been reported by other investigators [133]. These nanocarriers were obtained by SPAAC conjugation of N₃-glutamate urea (GLA) targeting peptides and N₃-MTX. They demonstrated approximately 8-fold higher cellular uptake compared to the non-targeted NPs. In another study, synthesis of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) peptide-functionalized NPs encapsulating recombinant human tumor suppressor proteins (p53) showed enhance anticancer effects *in vitro* on MDA-MB-231 cells compared to the non-targeted ones (close to 100% vs up to 30% cell growth inhibition) [134]. Another article showed also enhance cellular uptake with polymeric DOX-NPs conjugated to a nucleolin-targeting F3-peptide overexpressed in tumor cells (9L, MCF-7 and NCI/ADR-RES cells) [176].

For more examples using click reactions for peptide-functionalized nanomaterials before 2014, you can refer to one following review published by Tang and Beker [177].

3.4 Protein ligands

Glycoprotein transferrin is one type of protein used as targeting ligands due to the fact that human transferrin receptors is abundantly expressed in tumor cells [178].

Examples of SPAAC

Protein ligands allow reducing side effects and improving the delivery of therapeutics thanks to the receptor-mediated endocytosis pathway after bioconjugation with quantum dots [179] and magnetic nanogels [180] using SPAAC. Epifluorescence images of HeLa cells showed that bioconjugation of N₃-QDs with DBCO-transferrin promoted the cellular uptake. In the second study, SPAAC was achieved between N₃-PEG-transferrin and bicyclononyne-NPs (BCN-NPs) with up to 90% conjugation efficiency. Magnetic NPs were thus used to detect and capture circulating tumor cells overexpressing transferrin receptors.

Example of IEEDA

Furthermore, Tz-norbornene click chemistry was also successfully applied on hydrogel NPs to anchor protein such as fluorescent ovalbumin (Tz-Oval), alkaline phosphatase (Tz-ALP) and glucose oxidase (Tz-GOx), for potential applications in tissue engineering and glucose biosensing [181]. These protein-functionalized NPs showed higher bioactivity compared to their non-functionalized analog NF-Oval, NF-ALP and NF-GOx (5-fold, 12-fold and 9-fold increase bioactivity, respectively) at their higher concentration.

3.5 Monoclonal antibodies (mAbs)

Monoclonal antibodies are immunoglobulin (Ig) proteins whose IgG form remains key element of many targeted therapies. The growing interest of exploiting mAb-conjugated NPs for active targeting is mainly due to their ability to improve tumor accumulation. Full mAbs can be used for tumors targeting as well as mAbs fragments, such as F'(ab)₂, F'(ab) or diabody structures. Many strategies are employed to attach these mAbs or mAbs fragments to NPs and must ensure optimal orientation for subsequent functional binding and antigen (Ag) recognition. The thiol-maleimide reaction is easily employed with mAb because of thiol groups naturally existing in cysteine residues [182]. However, the main significant restriction to use this reaction is imposed by potential hydrolysis of the maleimide into unreactive maleic acid amide that may reduce conjugation efficiency. In this context, click chemistry has been widely used for covalent linkage through prior mAb derivatization with click functions [183–185]. This conjugation strategy offers the possibility to generate stable and efficient interactions between the two entities with minimal purification steps and high yields [28,186]. Among mAbs conjugated by click chemistry anti-EGFR are those widely previously studied [187]. They are used to target and treat tumors thanks to their involvement in cancer progression.

Examples of CuAAC

In 2016, the N₃-anti-HER-2 mAb was covalently introduced on alkyne PAMAM dendrimers through CuAAC; AuNPs and Gd were also entrapped in the dendrimer and DOTA, respectively (Au-G5-Gd-Herceptin) (**Figure 12**) [135]. Confocal images of A549 cells exhibited higher internalization with Au-G5-Gd-Herceptin compared to Au-G5-PEG-Alkyne-DOTA-Gd-NHAc.

Same observations were made with PLGA-Phis-PEG NPs conjugated to anti-HER-2 (PNH) by CuAAC and encapsulating DOX [136]. These PNH showed approximately 1.5-fold and 1.3-fold higher cellular uptake on SK-BR-3 and on MCF-7 cells lines respectively compared to PN after 120 min of incubation. They also demonstrated higher cytotoxicity effects (SK-BR-3: 70% vs 50%; MCF-7: 65% vs 45% cell growth inhibition) at 0.5 µg DOX/well.

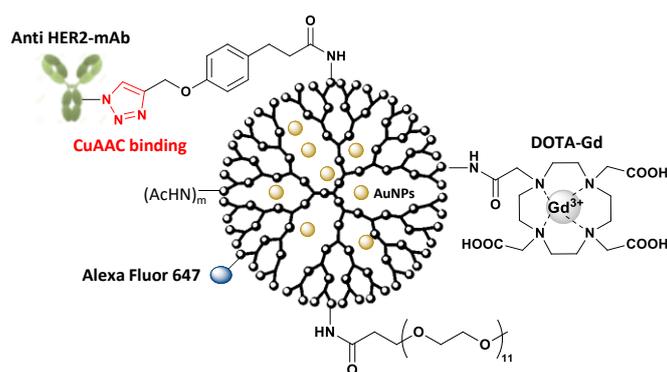


Figure 12. Schematic structure of the multifunctional NPs-imaging agent Au-G5-Gd-Herceptin. Figure modified from Ref. [135].

Examples of SPAAC

For instance, Kotagiri *et al.* demonstrated that SPAAC reaction allowed to obtain anti-EGFR-QDs with higher yield compared to anti-EGFR-QDs obtained through traditional thiol-maleimide conjugation rather subject to hydrolysis (88% vs 60%) [53]. Moreover, thanks to the stability of DBCO and azide functions in aqueous solution superior number of mAb per QDs was achieved (up to 8.4 vs 3.9). Confocal images of BxPC-3 and MDA-MB-231 cells showed higher fluorescence intensity for the click conjugated mAb-QDs. This was also supported with SiO₂ NPs where higher amount of anti-HER-2 (Trastuzumab) was conjugated thanks to SPAAC compared to EDC/NHS coupling (50 to 70% vs 1 to 20%) resulting *in a* targeting capacity 8-fold higher on MDA-MB-231 breast cancer cells [188].

In 2016, Ma *et al.* described efficient synthesis of polymeric-coated QDs bioconjugated to anti-EGFR (QD-EGFR Ab) through SPAAC, able to selectively attach the membrane region compared to QD-IgG control [160]. SPAAC was also performed with anti-VEGFR-functionalized QDs for *in vitro* imaging of angiogenic receptors [189]. Qiao and his team synthesized NaGdF₄:Yb,Er@NaGdF₄ upconversion NPs (UCNPs) conjugated to antigastric tumor antibody MGB₂ and demonstrated both specific optical and MR imaging properties *in vivo* on implanted SGC7901-Luc cells thanks to their targeting ability [190].

Moreover, mAb-conjugated NPs were also investigated for biosensing applications because of their high affinity and specificity towards biomarkers of interest. Thereby, click chemistry showed to be a promising strategy for immobilization of such probes for immunoassays [28,191].

3.6 Other nano-conjugates

Examples of CuAAC

In another study, the authors synthesized dendrons and α -cyclodextrin-based hydrogels including arginine conjugated by CuAAC for pMMP-9 plasmid delivery (MPEG-PLLD-Arg/pMMP-9 and MPEG-PLLD-Arg/pMMP-9/ α -CD) [137]. They demonstrated significantly higher transfected HNE-1 cells with MPEG-PLLD-Arg/pMMP-9 than PEI-25k/pMMP-9 (up to 62% vs 49%) and consequently higher inhibition of MMP-9 protein expression (70% vs 50%).

In vitro transfection assays with MPEG-PLLD-Arg/pMMP-9/ α -CD revealed to transfect up to 72% of cells at 12 h and to induce superior HNE-1 cells apoptosis compared to PEI-25k/pMMP-9 (46% vs 31%). However, similar tumor growth inhibition was observed *in vivo* with the two formulations. In 2017, Li *et al.* also conjugated octaarginine 8 on mesoporous bioactive glass (MBG-PG-Arg8) by CuAAC for gene transfection but revealed any significant difference in transfection efficiency with MBG-PG-Arg8 compared to MBG-NH₂ (32% vs 29%) [138].

Targeting efficiency and intracellular internalization have also been achieved by Maity and Stepensky [139]. They designed efficient QDs decorated with nuclear localization sequences (QD-NLS) *via* CuAAC conferring specific nucleus accumulation. Intracellular efficiency of three different QDs formulations was compared on HeLa cells: QD-COOH, QD-azide and QD-NLS. QD-NLS improved up to 44.2% the targeting efficiency of cell compared to QD-COOH and QD-N₃ (MFI of 11.4, 3.60 and 6.07, respectively).

Examples of SPAAC

In 2018, Tatiparti *et al.* described PTX-loaded nanomicelles (HSA-PTX-AZT) targeting carbonic anhydrase IX (CA IX), and by directed against triple negative breast cancer cells [140]. The NPs functionalized by acetazolamide (AZT, hypoxia marker of CA IX) through SPAAC showed higher apoptosis compared to the non-targeted one *in vitro* on MDA-MB-231 and MDA-MB-468 (MDA-MB-231: 74.8% vs 46.3%; MDA-MB-468: 75.3% vs 49.2%) due to receptor-mediated cell uptake. Indeed, fluorescence spectroscopic studies also demonstrated significantly higher cellular uptake (MDA-MB-231: MFI \sim 120 vs 98; MDA-MB-468: MFI superior to 100 vs \sim 78) at 16 h.

In 2015, anti-HER2 DNA labeled ferric nitrate infinite-coordination-polymer NPs (HER2-ICP) were developed and showed to reduce up to 80% of HER2 expression with 10 μ M DNA on SKOV-3 cells compared to any efficient gene knockdown with the NonTarget-ICP [141].

4. Bioorthogonal chemistry and pretargeting systems (PT) for NP delivery

In this part, we decided to employ the term of bioorthogonal chemistry and not click chemistry. The use of bioorthogonal chemistry means that the formation of the covalent link between the two entities does not need of catalyst and may occur in physiological conditions. We have also cited in the previous parts of this manuscript several articles mentioned SPAAC and IEDDA systems that are characteristic of bioorthogonal chemistry. In these previous examples, the click reaction occurred to build the NP both in the case of passive or active targeting. In this fourth part, bioorthogonal chemistry has been used for pretargeting (PT) systems. PT approach using bioorthogonal chemistry is another extremely promising alternative to improve tumor targeting.

Indeed, because of limited amount of cellular receptors and the heterogeneity of the TME there is a growing interest for bioorthogonal chemistry since the last few years. The delivery of NPs on the surface of living cells improved targeting efficiency and delivery of imaging agents or drugs [10,209]. This two-step approach offers several advantages compared to classical and direct covalent coupling of targeting ligands. It prevents NP aggregation and cross-linking between macromolecular entities (mAbs, avidin...). Often, NPs with bioorthogonal functions are easier to synthesize and to purify by simple removal centrifugation compared to direct conjugates, which often require optimization processes to maximize ligand-to-NP ratio while maintaining the colloidal stability. In case of direct labeling of mAbs/avidin on NPs, this can induce a decrease of Ag recognition because of steric hindrance compared to a single mAb. Moreover, for larger NPs this can lead to massive conjugates less easily delivered to the TME. In addition, this strategy could improve the number of NPs to each mAb and therefore amplified the signal *per* biomarker. Compared to traditional antibody-NP conjugation, this method can be applied to a broader range of pathologies depending on the suitable mAb.

PT approaches applied to NPs relies on specific and covalent interactions between two reactive groups (*i.e.* bioorthogonal entity or tag), one usually carried by the nanomaterial reacting with another one incorporated on the molecule of interest (*e.g.* imaging, therapeutic agent or targeting molecule). This two-step strategy consists firstly in the injection of a tagged-targeting agent (*i.e.* NP or molecule of interest) which will sufficiently accumulate on cells, followed by the injection of a second tagged-agent (*i.e.* NP or molecule of interest) which specifically and covalently bind through the bioorthogonal reaction. The different PT approaches concerning potential imaging, diagnosis and drug delivery from 2010 to nowadays are summarized in **Figure 13** and detailed in section below. In most studies, mAbs are widely used as primary targeting agents (**Figure 13a**), but NPs are also increasingly exploited as primary targeting agent playing the role of platform for imaging and therapeutic agents (**Figure 13b**).

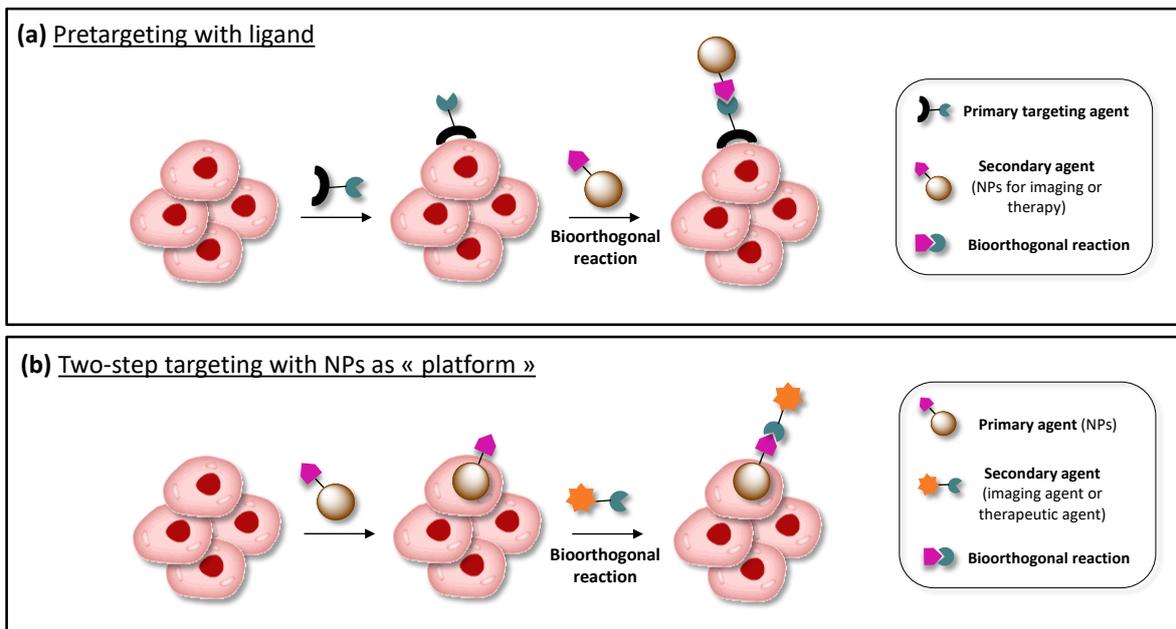


Figure 13. Different pretargeting strategies for imaging, diagnosis and therapy. **(a)** Firstly, targeting ligands are injected in order to specifically accumulate in tumors. Secondly, NPs are administered and will covalently bind to the suitable tag on the targeting ligands. **(b)** Firstly, NPs are administered to accumulate in cancer cells either by passive or active targeting. Secondly, imaging or therapeutic agents are injected and will bind to the reactive and complementary tag prior introduced on NPs.

4.1 PT approach with ligands as targeting agents

An overview of recent reports using PT approaches with ligands as targeting agents are more detailed in this section and summarized in **Table 5**.

Table 5. General overview of PT approaches using ligands as pretargeting agents.

Bioorthogonal system	Primary tumor-targeting agent for the first step of PT approach	Complementary agent for the second step of PT approach	Application	Refs.	
SPAAC	DBCO/N ₃	Ac ₄ MANNAz (N ₃)	Liposomes (DBCO)	<i>In vitro/in vivo</i> optical imaging and drug delivery	[193]
		Ac ₄ MANNAz (N ₃)	Gelatin-oleic-DOX NPs (DBCO)	Drug delivery and anticancer effect	[43]
		Ac ₄ ManDBCO (DBCO)	QDs (N ₃)	<i>In vitro</i> optical imaging	[194]
		Rituximab (DBCO)	Dendrimers (N ₃)	<i>In vivo</i> imaging and therapy	[195]
	BCN/N ₃	Ac ₄ MANNAz (N ₃)	Chitosan NPs (BCN)	<i>In vivo</i> optical imaging, MR and CT imaging	[196]
IEDDA	Tz/TCO	mAbs (anti-HER-2, anti-EGFR and anti-EpCAM) (TCO)	MFNPs (Tz) QDs (Tz)	<i>in vitro</i> fluorescence imaging <i>In vitro</i> detection of intracellular biomarkers	[197] [198]
		Antibiotics (Vancomycin and Daptomycin) (TCO)	MFNPs (Tz)	μNMR detection of Gram-positive bacteria/Bactericidal treatment	[199]
		Crystal violet (TCO)	MFNPs (Tz)	Detection of Gram-positive bacteria	[200]
		Antigen-glutathione-S-transferase (GST) (TCO/Tz)	NPs (TCO/Tz)	SPR sensor chip (interaction, kinetics and functionalization studies)	[201]
		mAbs (anti-EGFR, Anti-EpCAM, Anti-HER-2 and Anti-MUC-1) (TCO)	MFNPs (Tz)	μNMR detection of intracellular cancer biomarkers / Profiling of tumor cells	[202]
		pHLIP (Tz)	HSA-NPs (TCO)	<i>In vivo</i> photothermal therapy	[203]
Tz/Norbornene	Anti-EGF (Tz)	QDs (Norbornene)	<i>In vitro</i> optical imaging	[52]	

N₃: azide, DBCO: dibenzocyclooctyne, BCN: bicyclononyne, Tz: tetrazine, TCO: *trans*-cyclooctene, MFNPs: magneto-fluorescent nanoparticles, QDs: quantum dots, Ac₄MANNAz: tetraacetylated N-azidoacetyl-D-mannosamine, HSA: human serum albumin nanoparticles, pHLIP: low pH insertion peptide.

Examples of SPAAC

SPAAC approach have recently attracted increasing attention for enhancing the targeting ability without using biological targeting moieties such as mAbs. The metabolic glycoengineering method was widely studied in order to incorporate bioorthogonal functional groups on cell surfaces of interest for further conjugation of NPs, fluorescent dyes or drugs. Usually, the specific delivery of functionalized synthetic sugars is achieved into targeted cells with N₃-modified sugar molecules loaded in nanocarriers *via* the EPR effect or alternatively, by the direct intratumoral injection of these synthetic sugars.

DBCO/N₃ cycloaddition

In 2012, Koo *et al.* designed SPAAC click chemistry and metabolic glycoengineering for NPs in order to produce artificial glycan receptors [193]. They selected tetraacetylated N-azidoacetyl-D-mannosamine (Ac₄ManNAz), an unnatural sialic acid with N₃ reactive groups, to generate targetable azido-glycans on cell surface specifically recognized by PEGylated liposomes modified with DBCO (DBCO-lipo). Flow cytometry studies on 50 μM Ac₄ManNAz-treated A549 cells showed 13.8-fold higher cellular uptake of DBCO-lipo compared to PEG-lipo. These liposomes were intravenously administered and *ex vivo* tumor tissue analysis highlighted the interest of NP multivalency properties (*e.g.* several reactive DBCO *per* NP) and long circulation time in blood for enhancing tumor targeting compared to DBCO-Cy5 (NIRF intensity: 180% vs 6%). They also confirmed the possibility to control the expression of these azide chemical precursors in a dose dependent manner for enough delivery of DBCO-lipo. They revealed approximately 1.8-fold and 1.5-fold higher tumor accumulation for 50 mM and 5 mM Ac₄ManNAz-treated tumor-bearing mice, respectively. Moreover, this bioorthogonal based tumor-targeting strategy was validated in three other tumor cell lines expressing Ac₄MANNAz (U87MG, MCF-7 and KB).

In 2018, Meghani *et al.* have developed clickable NPs for cancer therapy [43]. Ac₄MANNAz was used, as well as N₃-sialic acid precursors specifically recognized by prior synthesized gelatin-oleic-DBCO nanomaterials embedded DOX (GON-DBCO-DOX). *In vitro*, GON-DBCO-DOX improved A549 and MCF-7 cells cytotoxicity compared to GON-DOX after 24 h with 10 μg/mL of DOX (for A549: 80% vs 50%; for MCF-7: 70% vs 50%). Furthermore, confocal images after 4 h of incubation demonstrated 2.4-fold and 4-fold higher cellular uptake on A549 and MCF-7 cells, respectively. Pretargeting strategy of QD-N₃ able to specifically bind cells metabolically modified with ManDBCO, an unnatural analogue sugar of Ac₄ManDBCO, was then reported [194]. Cells were first labeled with DBCO followed by the addition of QD-N₃ as secondary fluorescent imaging agent. Confocal images of ManDBCO-treated 4T1 cells showed specific and increasing cellular uptake (*i.e.* 30% at 2 h vs 45% at 4 h) compared to any cellular uptake for cells only treated with QD-N₃.

Pretargeted nanoradioimmunotherapy strategy was investigated by Au *et al.* in order to specifically deliver radiolabeled PAMAM dendrimers for targeting and therapeutic effect on Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) [195]. The authors expected to drop off high amount of ionizing radiation in the tumor site for efficient tumor cell death while minimizing effects on normal tissues. First, DBCO-Rituximab, a commonly used anti-CD20 antibody (α -CD20) in NHL immunotherapy, was intravenously injected. After a delay of 24 h, N₃-Y-90 dual-modified dendrimers were administered to react with modified mAb previously injected. Different amounts of DBCO (2, 5, 10, 15 and 18 DBCO per mAb) were conjugated *per* α -CD20 : the α -CD20 grafted with 10 DBCO (*i.e.* α -CD20(DBCO)₁₀) demonstrating to be the most appropriate to react towards N₃-dendrimers. In the other hand, the dendrimer conjugated with 29 N₃-oligoethylene glycol (*i.e.* PAMAM D-(⁹⁰Y)₈(N)₂₉) was selected as it is able form hyper-cross-linked with α -CD20(DBCO)₁₀ thus improving activation of the complement-dependent cytotoxicity (CDC). The bioorthogonal reaction between PAMAM D-(⁹⁰Y)₈(N)₂₉ and the DBCO-labeled Raji cells was confirmed using both confocal microscopy and flow cytometry with MFI almost twice as high as the direct labeling strategy (117 vs 68). Apoptosis study also showed 10-fold higher therapeutic efficiency with the pretargeted approach compared to the direct labeling; and β^- radiation demonstrated 3.3-fold higher cell proliferation inhibition.

In vivo experiments performed on Raji tumor-bearing mice revealed significant higher DNA damages associated with an increase of 17% of the survival median compared to 10% for clinical Rituximab and α -CD20(DBCO)₁₀ alone. In addition, about 67% of the treated mice demonstrated a decrease in tumor growth. *In vivo* therapeutic studies on a more aggressive disseminated lymphoma model confirmed higher tumor growth inhibition over time compared to direct labeling method (46 days vs 25 days).

BCN/N₃ cycloaddition

In 2017, Lee *et al.* also generated artificial N₃-glycans (Ac₄MANNAz) to deliver bicyclononyne-functionalized chitosan NPs (BCN-CNPs) on human mesenchymal stem cells (hMSCs). They intended to realize stem cells imaging using optical imaging (BCN-CNP-Cy5.5), MR and CT imaging (BCN-CNP-IRON and BCN-CNP-GOLD) [196]. *In vitro*, confocal images showed higher cellular binding with Ac₄MANNAz/BCN-CNP-Cy5.5 with 99% labeled vs 31.6% for BCN-CNP-Cy5.5-treated stem cells. *In vivo* optical imaging confirmed SPAAC between N₃ groups on cell surface and BCN with NIRF intensity 15-fold higher compared to BCN-CNP-Cy5.5 alone. Moreover, imaging signal of hMSCs remained up to 15 days post-transplantation compared to 5 days for BCN-CNP-Cy5.5. Finally, MR and CT images comforted those observations with a 5.4-fold higher and a 2.5-fold higher signal, respectively.

Examples of IEDDA

Tetrazine/TCO cycloaddition

Among bioorthogonal reactions, the Tz/TCO reaction was well documented for the two-step NP delivery strategy. Most of publications reported the use of TCO-mAbs in the first step for specific cell recognition then facilitating attachment of NPs for imaging, diagnostic or drug delivery.

In 2010, Weissleder and co-workers named this approach 'bioorthogonal NP detection' (BOND) and more precisely two-step bond (BOND-2) [197]. In their study, they designed Tz-magneto-fluorescent NPs (Tz-MFNPs) and test their targeting ability on extracellular cancer cell receptors using mAbs (anti-HER-2, anti-EGFR and anti-EpCAM) containing TCO (TCO-mAbs). They compared this BOND-2 method, where cells were first incubated with TCO-mAbs and subsequently with MFNPs, with BOND-1 consisting in direct labeling of the mAb on the NPs before cell contact. They highlighted that BOND-2 was up to 15-fold higher compared to the mAb-MFNPs leading to a strong fluorescence signal at the cell membranes. This amplification can be explained by the small size and the high valencies (up to 30 TCO/mAb) of the bioorthogonal functions allowing covalent binding of several NPs *per* mAb. They applied this two-step strategy using avidin/biotin interaction and demonstrated approximately 2-fold lower signal compared to BOND-2 on HER-2 and EpCAM cells. Steric hindrance of avidin (66-kDa) and inferior valency compared to Tz-MFNPs (8 biotin vs 84 Tz, respectively) could explain these results. They successfully adapted this strategy with same Tz-MFNPs, *in situ*, to detect intracellular biomarkers on prior fixed and permeabilized cells using TCO-anti-CK Ab (SK-OV-3, HeLa, SK-BR-3 and PANC-1) or TCO-anti-Ki-67 Ab (S-KOV-3, SK-BR-3, A549, HT-29 and PANC-1) [198]. Fluorescent images were also performed with Tz-QDs and TCO-anti-CK Ab or TCO-anti-Ki-67 Ab on PANC-1 cells.

In 2014, pretargeting NPs was employed for detecting intracellular cancer biomarkers of human cells. Ghazani and his team used TCO-mAbs and Tz-MFNPs for profiling lung tumor cells using the μ NMR technology [202]. A cohort of 35 patients was enrolled in order to obtain fine needle aspiration (FNA) and peripheral blood samples during their routine biopsy. The four biomarkers previously identified (EGFR, EpCAM, HER-2 and MUC-1) allowed to establish the type of lung malignancy. Concordance of cancer biomarkers between circulating tumor cells (CTC) and FNA was demonstrated as well as a better diagnostic accuracy compared to conventional histopathology.

A two-step tumor-targeting strategy was described based on artificial chemical receptor expression onto tumor cell surface [203]. Tz was conjugated to a low pH insertion peptide (pHLIP) known to cross the membrane bilayer in acidic conditions. The Tz-derivated pHLIP (pTz) was successfully anchored to HeLa cells, vascular endothelial cells (VEC) and tumor-associated fibroblasts (TAF). TCO-conjugated human serum albumin NPs were synthesized and modified with indocyanine green (TCO-HSA-ICG NPs = THI) to specifically bind pTz. *In vivo* studies on mice bearing HeLa tumor showed 2.6-fold and 1.7-fold higher tumor accumulation with pTz/THI compared to THI and direct active targeting HSA-ICG NPs modified with FA, respectively. This revealed superior photothermal therapeutic efficiency with 100% of survival rate after 50 days and negligible tumor relapse.

Some investigations were further performed for the detection of different gram-positive bacteria [199]. In 2011, the current vancomycin and daptomycin antibiotics were modified with TCO (*i.e.* vanc-TCO and dapt-TCO) for subsequent bioorthogonal labeling with Tz-MFNPs. These antibiotics were able to bind the specific peptidoglycan layer of gram-positive bacteria for inhibiting cell wall synthesis. Micro-nuclear magnetic resonance system (μ NMR) studies revealed up to 6-fold higher bacterial targeting on *Staphylococcus aureus* compared to direct conjugates. These results reflected the ability of the chemically modified antibiotics to preserve their bactericidal activity. PT was also successfully applied for intracellular detection of bacteria in live macrophages in combination with permeabilizing agents.

In 2012, this technique was extended to detect and classify bacteria by μ NMR and optical imaging using a crystal violet modified with TCO (CV-TCO) and Tz-MFNPs [200]. Tassa *et al.* reported the Tz/TCO cycloaddition to perform sensor chips using Surface Plasmon Resonance (SPR) [201]. This system is based on the specific recognition of mAbs prior immobilized on the gold layer of the SPR sensor surface with antigen-glutathione-S-transferase (GST) modified with TCO or Tz. Modifications allowed the subsequent bioorthogonal reaction with Tz derivatives or TCO-NPs, respectively. This sensor chip was able to achieve successful interaction and kinetic studies but also to functionalize NPs for molecular imaging using the rapid and highly specific IEDDA cycloaddition.

Tz/norbornene cycloaddition

In 2010, Han *et al.* developed norbornene-coated QDs for live-cell imaging [52]. Reaction of Tz-Alexa 594 with norbornene-QDs revealed that approximately 16 norbornene *per* QDs were incorporated. This strategy was applied for A431 human carcinoma cells targeting after functionalization of epidermal growth factor (EGF) with Tz (Tz-EGF). Higher fluorescence intensity was observed on cells for *in situ* conjugation (Tz-EGF/norbornene-QD) compared to direct labelling (QD-EGF).

Other reactions

PT based on non-covalent interaction between large structures was recently reported. Supramolecular bindings such as 'host-guest' interactions are known to have faster reaction rate (*i.e.* $k_2 = 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) compared to traditional bioorthogonal covalent reactions (*i.e.* $k_2 = 1-10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [204]. Some mAb targeting vectors (*e.g.* anti-HER-2, anti-EGFR and anti-EpCAM) functionalized with β -cyclodextrin (CD) was used in pair with adamantane-MFNPs as secondary imaging agent for profiling cancer cells. They demonstrated, *in vitro*, that this kind of labeling was 15-fold higher compared to the direct conjugation method (mAb-MFNPs) and 2-fold higher compared to the non-covalent avidin-biotin system. The labeling protocol was finally assessed to QDs and magnetic beads demonstrating highly specific interactions allowing for example separation of HER-2-positive and negative cells by magnetic sorting process.

The covalent oxime click chemistry was described in another publication to selectively and efficiently deliver nucleic acids to cells [205]. Thereby, cell surface was first engineered with ketone through the fast fusion of ketone-functionalized liposomes. Then, cells expressing ketones were specifically recognized by additional oxyamine/nucleic acid lipoplex subsequently internalized and released for transfection in the cells. They demonstrated *in vitro* using flow cytometry, that the number of ketone groups expressed on cell surface was dependent on keto-liposomes time exposure. This system presented higher selectivity and efficiency on fibroblast cells compared to conventional reagent transfection (*i.e.* 68% vs 29% and 19% for Viafect and Lipofectamine 3000, respectively).

4.2 PT approach with NPs as “platform”

Recent studies based on PT approaches using NPs as “platform” are summarized in **Table 1**.

Table 1. General overview of PT approaches using NPs as “platform”.

	Bioorthogonal system	Primary tumor-targeting agent for the first step of PT approach	Complementary agent for the second step of PT approach	Application	Refs.
SPAAC	DBCO/N ₃	Ac ₄ MANNAz-liposomes (N ₃)	Zinc(II)-phthalocyanine liposomes (DBCO)	<i>In vitro/in vivo</i> photothermal, photodynamic, photoacoustic imaging and therapy	[206]
		MIL-100 (Fe) NPs embedding 3-azido-D-alanine (N ₃)	Ultrasml photsensitizer NPs embedding TPETM molecules (DBCO)	<i>In vivo</i> imaging and PDT of bacteria	[207]
		MSNs (DBCO)	¹⁸ F (N ₃)	<i>In vivo</i> PET imaging	[208]
		MSNs-RAW (DBCO)	¹⁸ F (N ₃)	<i>In vivo</i> PET-CT imaging	[209]
	BCN/N ₃	Ac ₄ MANNAz-chitosan NPs (N ₃)	Ce6-chitosan NPs (BCN)	<i>In vivo</i> photodynamic therapy	[210]
IEDDA	Tz/TCO	⁸⁹ Zr-liposomes (TCO)	PDA@CoCrMo (Tz)	Specific removal of long-circulating radiopharmaceuticals	[211]
		Tz-MFNPs with Cy5.5	DOX (TCO)	<i>In vitro</i> optical Imaging and anticancer therapy	[212]
		TCO-SiO ₂ NPs	¹³ C (Tz)	<i>In vivo/ex vivo</i> PET imaging	[213]
		SMNPs (TCO)	¹¹¹ In-Tz-DOTA	<i>In vivo</i> optical and SPECT imaging	[214]

N₃: azide, DBCO: dibenzocyclooctyne, BCN: bicyclononyne, Tz: tetrazine, TCO: *trans*-cyclooctene, Ac₄MANNAz: tetraacetylated N-azidoacetyl-D-mannosamine, TPETM: 2-(1-(5-(4-(1,2,2-tris(4-methoxyphenyl)vinyl)phenyl)thiophen-2-yl)ethylidene)malononitrile), MSNs: mesoporous silica nanoparticles, SMNPs : small molecule-based nanoparticles, PDA : polydopamine, CoCrMo : cobalt chromium molybdenum alloy.

Examples of SPAAC

DBCO/N₃ cycloaddition

In 2017, Du *et al.* also investigated the two-step tumor-targeting strategy based on metabolic glycoengineering and SPAAC to deliver their multifunctional nanoagent to combine PTT, PDT, PA imaging and PAT [206]. First, Ac₄MANNAz was encapsulated by self-assembly in nanomicelles (Ac₄MANNAz-LP) to generate after intravenous injection and EPR effect the artificial chemical-receptor in tumor cells. Second, DBCO-nanomicelles embedded near infrared dyes zinc(II)-phthalocyanine (DBCO-ZnPc-LP) was designed for both PTT and PA imaging. *In vitro*, PTT performed with 0.4 W/cm² continuous laser on A549 cells showed higher cytotoxicity for Ac₄MANNAz-LP/DBCO-ZnPc-LP than DBCO-ZnPc-LP alone (80% vs 35%). Moreover, Ac₄MANNAz-LP/DBCO-ZnPc-LP-treated cells demonstrated superior cytotoxicity with combination of PTT/PAT compared to PTT and PAT alone with 63%, 22% and 20% of cytotoxicity, respectively. *In vivo* experiments revealed by PA imaging 3-fold higher tumor uptake after 24 h for Ac₄MANNAz-LP/DBCO-ZnPc-LP compared to DBCO-ZnPc-LP.

ICP-MS analyzes showed that mice pre-treated with Ac₄MANNAz-LP for 3 days had higher tumor uptake than no pre-treated ones at 6 h post injection (6.30% IA/g vs 1.85% IA/g); and exerted tumor growth inhibition over time (18 days) with synergistic PTT/PAT.

In 2018, Mao *et al.* performed *in vivo* specific imaging of bacteria and antibacterial treatment using clickable NPs [207]. Two different NPs were administered for subsequent bioorthogonal conjugation. Firstly, MIL-100 (Fe) NPs encapsulating the 3-azido-D-alanine metabolic precursor (D-AzAla@MIL-100 (Fe)) was injected and accumulated in the infected region of mice bearing methicillin-resistant *Staphylococcus aerus* (MRSA). These NPs were decomposed in the presence of H₂O₂ secreted by immune cells and released unnatural azido groups then metabolically expressed on MRSA bacterial walls. In the second step, a DBCO-modified ultrasmall photosensitizer NPs integrating TPETM molecules (US-TPETM NPs) was administered for both imaging and photodynamic therapy (PDT). *In vivo* azido incorporation efficiency was first checked with a DBCO-Cy5 fluorophore and demonstrated a 3.2-fold higher fluorescence *via* H₂O₂ responsiveness compared to normal tissues. *In vivo*, higher fluorescent signal was obtained after 24 h in bacteria-bearing mice pre-treated with D-AzAla@MIL-100 (Fe) compared to mice only treated with US-TPETM NPs. This also proved to significantly enhance the antibacterial effect after irradiation by white light for 10 min ($p < 0.05$).

In 2013, Lee *et al.* described the first preclinical pretargeting application of SPAAC in PET imaging [208]. The *in situ* formation of ¹⁸F-DBCOT-PEG-MSNs *via* the two-step strategy was reported for *in vivo* real-time tracking imaging (pharmacokinetic studies). DBCO-PEG-MSNs were firstly injected intravenously to U87MG tumor-bearing mice to accumulate by EPR effect. Then, 24 h later [¹⁸F]fluoropentaethylene glycolic N₃ ([¹⁸F]2) was administered and clicked specifically to NPs within 2 h. Biodistribution studies showed significant higher signal for DBCO-PEG-MSNs-pre-treated tumor (250 µg, 30 nmol DBCO) compared to [¹⁸F]2 alone, at 2.6 MBq (1.4% IA/g vs 0.6% IA/g).

Pretargeting PET imaging strategy was also assessed in 2019 for macrophage cell tracking in tumor and atherosclerosis plaque using ¹⁸F labeling [209]. The macrophage ability to accumulate in tumor and atherosclerotic plaque area was of interest. DBCO-MSN cells were thus incubated with RAW 264.7 macrophage cells for 2 h at 37 °C to obtain desired DBCO-MSN-RAW cells. DBCO-MSN-RAW cells were then intravenously injected in U87MG tumor-bearing mice.

One to 8 days later, mice were injected with 11.1 MBq of the ¹⁸F-N₃. PET-CT images demonstrated higher accumulation of radioactivity at the tumor-site compared to ¹⁸F-N₃ alone (3.8% IA/g vs 2.5% IA/g). Finally, this specific binding and macrophage tracking method was also assessed on mice with atherosclerosis and showed similar efficient accumulation in atherosclerotic aorta area.

BCN/N₃ cycloaddition

Otherwise, one study reported that the tumor accumulation of glycol chitosan NPs (CNPs) was increased using the metabolic glycoengineering [210]. Indeed, CNPs functionalized with Ac₄MANNAz (Ac₄MANNAz-CNP) by hydrophobic interaction were intravenously injected in order to accumulate by EPR effect into mice bearing A549 tumor. Afterwards, other CNPs functionalized with BCN and chlorin e6 photosensitizers (BCN-Ce6-CNPs) were injected as secondary agents.

In vitro, the pre-targeting strategy showed significant higher cytotoxicity on A549 cells compared to the no pre-treated BCN-Ce6-CNPs after laser irradiation (90% vs 40%). *In vivo*, biodistribution study revealed significant 2-fold higher tumor uptake for Ac₄MANNAz-CNP/BCN-Ce6-CNPs compared to BCN-Ce6-CNPs.

Moreover, efficient photodynamic therapy was observed after 21 days post laser irradiation with any tumor-relapse compared to BCN-Ce6-CNPs (p<0.01) which restarted to growth after 4 days.

Examples of IEDDA

Tetrazine/TCO cycloaddition

Recently, Tz/TCO interaction was reported for ‘click-to-release’ in order to activate DOX prodrugs (**Figure 14**) [212]. Tz-MFNPs modified with Cy5.5 was first uptake by cancer cells and then covalently bound to TCO-DOX by IEDDA. This ‘click’ step *in situ* demonstrated successful release of DOX and significantly higher apoptosis on MDA-MB-231 cells compared to DOX-TCO alone (100% vs 90%) and showed superior cytotoxicity (35% vs 5%).

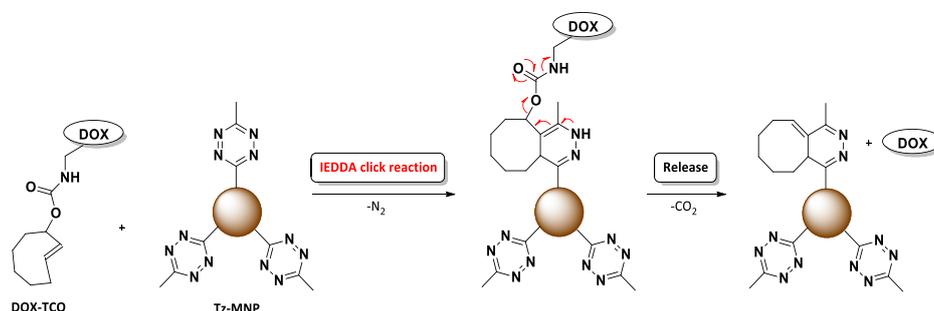


Figure 14. Mechanism of the *in situ* ‘click-to-release’ performed between Tz-MNPs and DOX-TCO. Figure modified from Ref [212].

In 2016, Denk *et al.* realized *in vivo* click experiments using TCO-SiO₂ NPs and low-molecular weight ¹¹C-tetrazine for PET imaging [213]. They employed the ability of these NPs to rapidly and exclusively accumulate in the lungs for investigating the pretargeted PET imaging using bioorthogonal chemistry. TCO-MSNs were first administered for effective accumulation in lungs followed by the injection 5 min later of the ¹¹C-Tz. PET imaging realized in two-step protocol demonstrated 3-fold higher increase activity concentration and therefore in gamma counter signal compared to ¹¹C-Tz.

In recent years, pretargeting NPs have been introduced as a suitable tool for nuclear imaging and radiotherapy [62].

In 2019, van Onzen *et al.* used the IEDDA cycloaddition to radiolabel π -conjugated small molecule-based NPs (SMNPs) for both optical and SPECT imaging [214]. The covalent conjugation between the ¹¹¹In-radiolabeled Tz-DOTA and TCO-NPs was confirmed intrinsically. SMNPs were used as dual-imaging agent for biodistribution studies and showed accumulation in liver and spleen (80.4% IA/g and 34.8% IA/g, respectively) at 4 h post injection but were efficiently cleared from blood after 10 min (0.9% IA/g).

However, this imaging strategy is limited for long-lived radionuclides (e.g. ^{64}Cu and ^{89}Zr) which could drop off high amount of radiation in non-targeted organs (e.g. liver and spleen). To circumvent this drawback, Brand *et al.* recently designed an IEDDA-based platform for specific removal of long-circulating radiopharmaceuticals from the systemic circulation [211]. Thereby, Tz-polydopamine-coated metal disks (Tz-PDA@CoCrMo) were developed to remove TCO- ^{89}Zr -radiolabeled liposomes (^{89}Zr -TCO-LNP) remaining in the blood after EPR accumulation in tumor cells. Phosphor autoradiography assays demonstrating 2-fold higher radioactivity on the disk for ^{89}Zr -TCO-LNP compared to PDA@CoCrMo.

References

- [1] Dr. Niranjani Chaurasia, Nanotechnology and Nanomaterials in Everyday Life, *Int. J. Sci. Res. IJSR*. 6 (2017) 1560–1562.
- [2] K.-M. Weltring, N. Gouze, N. Martin, N. Pereira, I. Baanante, F. Gramatica, Nanomedicine Strategic Research and Innovation Agenda, (2016).
- [3] A.L. Porter, J. Youtie, How interdisciplinary is nanotechnology?, *J. Nanoparticle Res.* 11 (2009) 1023–1041. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9607-0>.
- [4] A. Nakhband, M. Eskandani, Y. Omid, N. Saeedi, S. Ghaffari, J. Barar, A. Garjani, Combating atherosclerosis with targeted nanomedicines: recent advances and future prospective, *BiolImpacts*. 8 (2018) 59–75. <https://doi.org/10.15171/bi.2018.08>.
- [5] W. Jiang, D. Rutherford, T. Vuong, H. Liu, Nanomaterials for treating cardiovascular diseases: A review, *Bioact. Mater.* 2 (2017) 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.11.002>.
- [6] J.R. Kanwar, X. Sun, V. Punj, B. Sriramoju, R.R. Mohan, S.-F. Zhou, A. Chauhan, R.K. Kanwar, Nanoparticles in the treatment and diagnosis of neurological disorders: untamed dragon with fire power to heal, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 8 (2012) 399–414. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.08.006>.
- [7] H. Zazo, C.I. Colino, J.M. Lanao, Current applications of nanoparticles in infectious diseases, *J. Controlled Release*. 224 (2016) 86–102. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.008>.
- [8] R.M. DiSanto, V. Subramanian, Z. Gu, Recent advances in nanotechnology for diabetes treatment: Nanotechnology for Diabetes Treatment, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 7 (2015) 548–564. <https://doi.org/10.1002/wnan.1329>.
- [9] I. Iavicoli, L. Fontana, V. Leso, A. Bergamaschi, The Effects of Nanomaterials as Endocrine Disruptors, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 16732–16801. <https://doi.org/10.3390/ijms140816732>.
- [10] I.M. Oliveira, C. Gonçalves, R.L. Reis, J.M. Oliveira, Engineering nanoparticles for targeting rheumatoid arthritis: Past, present, and future trends, *Nano Res.* 11 (2018) 4489–4506. <https://doi.org/10.1007/s12274-018-2071-3>.
- [11] M. Riffault, J.-L. Six, P. Netter, P. Gillet, L. Grossin, PLGA-Based Nanoparticles: a Safe and Suitable Delivery Platform for Osteoarticular Pathologies, *Pharm. Res.* 32 (2015) 3886–3898. <https://doi.org/10.1007/s11095-015-1748-5>.
- [12] R. Awasthi, A. Roseblade, P.M. Hansbro, M.J. Rathbone, K. Dua, M. Bebawy, Nanoparticles in Cancer Treatment: Opportunities and Obstacles, *Curr. Drug Targets*. 19 (2018) 1696–1709. <https://doi.org/10.2174/1389450119666180326122831>.
- [13] K. Riehemann, S.W. Schneider, T.A. Luger, B. Godin, M. Ferrari, H. Fuchs, Nanomedicine-Challenge and Perspectives, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 872–897. <https://doi.org/10.1002/anie.200802585>.
- [14] P. Prabhu, V. Patravale, The Upcoming Field of Theranostic Nanomedicine: An Overview, *J. Biomed. Nanotechnol.* 8 (2012) 859–882. <https://doi.org/10.1166/jbn.2012.1459>.
- [15] S.C. Baetke, T. Lammers, F. Kiessling, Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer, *Br. J. Radiol.* 88 (2015) 20150207. <https://doi.org/10.1259/bjr.20150207>.
- [16] K. Greish, A. Mathur, M. Bakhiet, S. Taurin, Nanomedicine: is it lost in translation?, *Ther. Deliv.* 9 (2018) 269–285. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0118>.
- [17] S. Wilhelm, A.J. Tavares, Q. Dai, S. Ohta, J. Audet, H.F. Dvorak, W.C.W. Chan, Analysis of nanoparticle delivery to tumours, *Nat. Rev. Mater.* 1 (2016) 16014. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>.
- [18] M. Meldal, C.W. Tornøe, Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2952–3015. <https://doi.org/10.1021/cr0783479>.
- [19] Q. Wang, T.R. Chan, R. Hilgraf, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, M.G. Finn, Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide–Alkyne [3 + 2] Cycloaddition, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 3192–3193. <https://doi.org/10.1021/ja021381e>.

- [20] E. Ladd, A. Sheikhi, N. Li, T.G.M. van de Ven, A. Kakkar, Design and Synthesis of Dendrimers with Facile Surface Group Functionalization, and an Evaluation of Their Bactericidal Efficacy, *Mol. Basel Switz.* 22 (2017). <https://doi.org/10.3390/molecules22060868>.
- [21] D. Anandkumar, P. Rajakumar, Synthesis and anticancer activity of bile acid dendrimers with triazole as bridging unit through click chemistry, *Steroids.* 125 (2017) 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.06.007>.
- [22] L.P. Sadowski, P.E. Edem, J.F. Valliant, A. Adronov, Synthesis of Polyester Dendritic Scaffolds for Biomedical Applications, *Macromol. Biosci.* 16 (2016) 1475–1484. <https://doi.org/10.1002/mabi.201600154>.
- [23] G. Fischer, B. Wängler, C. Wängler, Optimized solid phase-assisted synthesis of dendrons applicable as scaffolds for radiolabeled bioactive multivalent compounds intended for molecular imaging, *Mol. Basel Switz.* 19 (2014) 6952–6974. <https://doi.org/10.3390/molecules19066952>.
- [24] P. Singh, S. Pandit, V.R.S.S. Mokkaapati, A. Garg, V. Ravikumar, I. Mijakovic, Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19071979>.
- [25] W. Mao, H.S. Kim, Y.J. Son, S.R. Kim, H.S. Yoo, Doxorubicin encapsulated clicked gold nanoparticle clusters exhibiting tumor-specific disassembly for enhanced tumor localization and computerized tomographic imaging, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 269 (2018) 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.003>.
- [26] S. Tural, M.Ş. Ece, B. Tural, Synthesis of novel magnetic nano-sorbent functionalized with N-methyl-D-glucamine by click chemistry and removal of boron with magnetic separation method, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 162 (2018) 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.066>.
- [27] E. Shoghi, S.Z. Mirahmadi-Zare, R. Ghasemi, M. Asghari, M. Poorebrahim, M.-H. Nasr-Esfahani, Nanosized aptameric cavities imprinted on the surface of magnetic nanoparticles for high-throughput protein recognition, *Mikrochim. Acta.* 185 (2018) 241. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2745-2>.
- [28] C. Finetti, L. Sola, M. Pezzullo, D. Prospero, M. Colombo, B. Riva, S. Avvakumova, C. Morasso, S. Picciolini, M. Chiari, Click Chemistry Immobilization of Antibodies on Polymer Coated Gold Nanoparticles, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids.* 32 (2016) 7435–7441. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01142>.
- [29] N.S. Abadeer, M.R. Brennan, W.L. Wilson, C.J. Murphy, Distance and plasmon wavelength dependent fluorescence of molecules bound to silica-coated gold nanorods, *ACS Nano.* 8 (2014) 8392–8406. <https://doi.org/10.1021/nn502887j>.
- [30] F. Tang, L. Li, D. Chen, Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery, *Adv. Mater.* 24 (2012) 1504–1534. <https://doi.org/10.1002/adma.201104763>.
- [31] J. Lu, M. Liong, J.I. Zink, F. Tamanoi, Mesoporous Silica Nanoparticles as a Delivery System for Hydrophobic Anticancer Drugs, *Small.* 3 (2007) 1341–1346. <https://doi.org/10.1002/sml.200700005>.
- [32] G. De Crozals, R. Bonnet, C. Farre, C. Chaix, Nanoparticles with multiple properties for biomedical applications: A strategic guide, *Nano Today.* 11 (2016) 435–463. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.07.002>.
- [33] I. Slowing, J. Viveroescoto, C. Wu, V. Lin, Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers☆, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1278–1288. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.012>.
- [34] Z. Chen, M. Sun, F. Luo, K. Xu, Z. Lin, L. Zhang, Stimulus-response click chemistry based aptamer-functionalized mesoporous silica nanoparticles for fluorescence detection of thrombin, *Talanta.* 178 (2018) 563–568. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.043>.
- [35] S. Datz, C. Argyo, M. Gattner, V. Weiss, K. Brunner, J. Bretzler, C. von Schirnding, A.A. Torrano, F. Spada, M. Vrabel, H. Engelke, C. Bräuchle, T. Carell, T. Bein, Genetically designed biomolecular capping system for mesoporous silica nanoparticles enables receptor-mediated cell uptake and controlled drug release, *Nanoscale.* 8 (2016) 8101–8110. <https://doi.org/10.1039/c5nr08163g>.

- [36] A. Nouredine, M. Gary-Bobo, L. Lichon, M. Garcia, J.I. Zink, M. Wong Chi Man, X. Cattoën, Bisclickable Mesoporous Silica Nanoparticles: Straightforward Preparation of Light-Actuated Nanomachines for Controlled Drug Delivery with Active Targeting, *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 22 (2016) 9624–9630. <https://doi.org/10.1002/chem.201600870>.
- [37] B. Chertok, B.A. Moffat, A.E. David, F. Yu, C. Bergemann, B.D. Ross, V.C. Yang, Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors, *Biomaterials.* 29 (2008) 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.050>.
- [38] H.-Y. Lee, Z. Li, K. Chen, A.R. Hsu, C. Xu, J. Xie, S. Sun, X. Chen, PET/MRI Dual-Modality Tumor Imaging Using Arginine-Glycine-Aspartic (RGD)-Conjugated Radiolabeled Iron Oxide Nanoparticles, *J. Nucl. Med.* 49 (2008) 1371–1379. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.051243>.
- [39] J. Xie, K. Chen, J. Huang, S. Lee, J. Wang, J. Gao, X. Li, X. Chen, PET/NIRF/MRI triple functional iron oxide nanoparticles, *Biomaterials.* 31 (2010) 3016–3022. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.010>.
- [40] L. Massaad-Massade, S. Boutary, M. Caillaud, C. Gracia, B. Parola, S.B. Gnaouiya, B. Stella, S. Arpicco, E. Buchy, D. Desmaële, P. Couvreur, G. Urbinati, New Formulation for the Delivery of Oligonucleotides Using “Clickable” siRNA-Polyisoprenoid-Conjugated Nanoparticles: Application to Cancers Harboring Fusion Oncogenes, *Bioconjug. Chem.* 29 (2018) 1961–1972. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00205>.
- [41] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, T. Sen, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 24–46. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.05.006>.
- [42] O.K. Arriortua, M. Insausti, L. Lezama, I. Gil de Muro, E. Garaio, J.M. de la Fuente, R.M. Fratila, M.P. Morales, R. Costa, M. Eceiza, M. Sagartazu-Aizpurua, J.M. Aizpurua, RGD-Functionalized Fe₃O₄nanoparticles for magnetic hyperthermia, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 165 (2018) 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.031>.
- [43] N.M. Meghani, H.H. Amin, C. Park, J.-B. Park, J.-H. Cui, Q.-R. Cao, B.-J. Lee, Design and evaluation of clickable gelatin-oleic nanoparticles using fattigation-platform for cancer therapy, *Int. J. Pharm.* 545 (2018) 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.047>.
- [44] Y. Liu, W. Hou, H. Sun, C. Cui, L. Zhang, Y. Jiang, Y. Wu, Y. Wang, J. Li, B.S. Sumerlin, Q. Liu, W. Tan, Thiol-ene click chemistry: a biocompatible way for orthogonal bioconjugation of colloidal nanoparticles, *Chem. Sci.* 8 (2017) 6182–6187. <https://doi.org/10.1039/c7sc01447c>.
- [45] M.-A. Neouze, U. Schubert, Surface Modification and Functionalization of Metal and Metal Oxide Nanoparticles by Organic Ligands, *Monatshefte Für Chem. - Chem. Mon.* 139 (2008) 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00706-007-0775-2>.
- [46] R. Subbiah, M. Veerapandian, K. S. Yun, Nanoparticles: Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 4559–4577. <https://doi.org/10.2174/092986710794183024>.
- [47] G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Acad. Press. (2013).
- [48] W.R. Algar, D.E. Prasuhn, M.H. Stewart, T.L. Jennings, J.B. Blanco-Canosa, P.E. Dawson, I.L. Medintz, The controlled display of biomolecules on nanoparticles: a challenge suited to bioorthogonal chemistry, *Bioconjug. Chem.* 22 (2011) 825–858. <https://doi.org/10.1021/bc200065z>.
- [49] N. Nakajima, Y. Ikada, Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media, *Bioconjug. Chem.* 6 (1995) 123–130.
- [50] M.K. Rahim, R. Kota, S. Lee, J.B. Haun, Bioorthogonal chemistries for nanomaterial conjugation and targeting, *Nanotechnol. Rev.* 2 (2013). <https://doi.org/10.1515/ntrev-2012-0083>.
- [51] G.K. Such, A.P.R. Johnston, K. Liang, F. Caruso, Synthesis and functionalization of nanoengineered materials using click chemistry, *Prog. Polym. Sci.* 37 (2012) 985–1003. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.12.002>.
- [52] H.-S. Han, N.K. Devaraj, J. Lee, S.A. Hilderbrand, R. Weissleder, M.G. Bawendi, Development of a Bioorthogonal and Highly Efficient Conjugation Method for Quantum Dots Using

- Tetrazine–Norbornene Cycloaddition, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 7838–7839. <https://doi.org/10.1021/ja101677r>.
- [53] N. Kotagiri, Z. Li, X. Xu, S. Mondal, A. Nehorai, S. Achilefu, Antibody quantum dot conjugates developed via copper-free click chemistry for rapid analysis of biological samples using a microfluidic microsphere array system, *Bioconjug. Chem.* 25 (2014) 1272–1281. <https://doi.org/10.1021/bc500139u>.
- [54] V. Kaplun, D. Stepensky, Efficient decoration of nanoparticles intended for intracellular drug targeting with targeting residues, as revealed by a new indirect analytical approach, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 2906–2914. <https://doi.org/10.1021/mp500253r>.
- [55] S. Williams, A. Neumann, I. Bremer, Y. Su, G. Dräger, C. Kasper, P. Behrens, Nanoporous silica nanoparticles as biomaterials: evaluation of different strategies for the functionalization with polysialic acid by step-by-step cytocompatibility testing, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2015) 125. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5409-3>.
- [56] J.C. Jewett, C.R. Bertozzi, Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1272. <https://doi.org/10.1039/b901970g>.
- [57] J. Dommerholt, O. van Rooijen, A. Borrmann, C.F. Guerra, F.M. Bickelhaupt, F.L. van Delft, Highly accelerated inverse electron-demand cycloaddition of electron-deficient azides with aliphatic cyclooctynes, *Nat. Commun.* 5 (2014) 5378. <https://doi.org/10.1038/ncomms6378>.
- [58] B. Korthals, M.C. Morant-Miñana, M. Schmid, S. Mecking, Functionalization of Polymer Nanoparticles by Thiol–Ene Addition, *Macromolecules.* 43 (2010) 8071–8078. <https://doi.org/10.1021/ma100966w>.
- [59] L. Ruizendaal, S.P. Pujari, V. Gevaerts, J.M.J. Paulusse, H. Zuilhof, Biofunctional Silicon Nanoparticles by Means of Thiol-Ene Click Chemistry, *Chem. - Asian J.* 6 (2011) 2776–2786. <https://doi.org/10.1002/asia.201100375>.
- [60] C.E. Hoyle, C.N. Bowman, Thiol-Ene Click Chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 1540–1573. <https://doi.org/10.1002/anie.200903924>.
- [61] C.E. Hoyle, A.B. Lowe, C.N. Bowman, Thiol-click chemistry: a multifaceted toolbox for small molecule and polymer synthesis, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1355–1387. <https://doi.org/10.1039/b901979k>.
- [62] E.J.L. Stéen, P.E. Edem, K. Nørregaard, J.T. Jørgensen, V. Shalgunov, A. Kjaer, M.M. Herth, Pretargeting in nuclear imaging and radionuclide therapy: Improving efficacy of theranostics and nanomedicines, *Biomaterials.* 179 (2018) 209–245. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.021>.
- [63] N.K. Devaraj, R. Weissleder, Biomedical applications of tetrazine cycloadditions, *Acc. Chem. Res.* 44 (2011) 816–827. <https://doi.org/10.1021/ar200037t>.
- [64] M. Gregoritz, F.P. Brandl, The Diels-Alder reaction: A powerful tool for the design of drug delivery systems and biomaterials, *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV.* 97 (2015) 438–453. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.06.007>.
- [65] G. Yi, J. Son, J. Yoo, C. Park, H. Koo, Application of click chemistry in nanoparticle modification and its targeted delivery, *Biomater. Res.* 22 (2018). <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0123-0>.
- [66] Y. Matsumura, H. Maeda, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer Res.* 46 (1986) 6387–6392.
- [67] Y. Dai, C. Xu, X. Sun, X. Chen, Nanoparticle design strategies for enhanced anticancer therapy by exploiting the tumour microenvironment, *Chem Soc Rev.* (2017). <https://doi.org/10.1039/C6CS00592F>.
- [68] H. Kobayashi, R. Watanabe, P.L. Choyke, Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target?, *Theranostics.* 4 (2014) 81–89. <https://doi.org/10.7150/thno.7193>.
- [69] Y. (Chezy) Barenholz, Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *J. Controlled Release.* 160 (2012) 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.

- [70] E. Miele, G.P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao, S. Tomao, Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer, *Int. J. Nanomedicine*. 4 (2009) 99–105.
- [71] K. Zhang, X. Tang, J. Zhang, W. Lu, X. Lin, Y. Zhang, B. Tian, H. Yang, H. He, PEG–PLGA copolymers: Their structure and structure-influenced drug delivery applications, *J. Controlled Release*. 183 (2014) 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.026>.
- [72] D. Rosenblum, N. Joshi, W. Tao, J.M. Karp, D. Peer, Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics, *Nat. Commun.* 9 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03705-y>.
- [73] L. Mei, J. Rao, Y. Liu, M. Li, Z. Zhang, Q. He, Effective treatment of the primary tumor and lymph node metastasis by polymeric micelles with variable particle sizes, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.053>.
- [74] L. Mei, Y. Liu, J. Rao, X. Tang, M. Li, Z. Zhang, Q. He, Enhanced Tumor Retention Effect by Click Chemistry for Improved Cancer Immunotherapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 10 (2018) 17582–17593. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b02954>.
- [75] Y. Toomari, H. Namazi, E.A. Akbar, Synthesis of the dendritic type β -cyclodextrin on primary face via click reaction applicable as drug nanocarrier, *Carbohydr. Polym.* 132 (2015) 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.087>.
- [76] I. Denis, F. El Bahhaj, F. Collette, R. Delatouche, F. Gueugnon, D. Pouliquen, L. Pichavant, V. Héroguez, M. Grégoire, P. Bertrand, C. Blanquart, Vorinostat-polymer conjugate nanoparticles for Acid-responsive delivery and passive tumor targeting, *Biomacromolecules*. 15 (2014) 4534–4543. <https://doi.org/10.1021/bm501338r>.
- [77] Y. Yu, C.-K. Chen, W.-C. Law, E. Weinheimer, S. Sengupta, P.N. Prasad, C. Cheng, Polylactide-graft-doxorubicin nanoparticles with precisely controlled drug loading for pH-triggered drug delivery, *Biomacromolecules*. 15 (2014) 524–532. <https://doi.org/10.1021/bm401471p>.
- [78] C. Zhu, J. Xiao, M. Tang, H. Feng, W. Chen, M. Du, Platinum covalent shell cross-linked micelles designed to deliver doxorubicin for synergistic combination cancer therapy, *Int. J. Nanomedicine*. 12 (2017) 3697–3710. <https://doi.org/10.2147/IJN.S130938>.
- [79] A. Nouredine, L. Lichon, M. Maynadier, M. Garcia, M. Gary-Bobo, J.I. Zink, X. Cattoën, M. Wong Chi Man, Controlled multiple functionalization of mesoporous silica nanoparticles: homogeneous implementation of pairs of functionalities communicating through energy or proton transfers, *Nanoscale*. 7 (2015) 11444–11452. <https://doi.org/10.1039/c5nr02620b>.
- [80] K. Cai, J. Yen, Q. Yin, Y. Liu, Z. Song, S. Lezmi, Y. Zhang, X. Yang, W.G. Helderich, J. Cheng, Redox-Responsive Self-Assembled Chain-Shattering Polymeric Therapeutics, *Biomater. Sci.* 3 (2015) 1061–1065. <https://doi.org/10.1039/C4BM00452C>.
- [81] I. Abánades Lázaro, S. Haddad, S. Sacca, C. Orellana-Tavra, D. Fairen-Jimenez, R.S. Forgan, Selective Surface PEGylation of UiO-66 Nanoparticles for Enhanced Stability, Cell Uptake, and pH-Responsive Drug Delivery, *Chem.* 2 (2017) 561–578. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2017.02.005>.
- [82] K. Mai, J. Lin, B. Zhuang, X. Li, L.-M. Zhang, Cationic dendronization of amylose via click chemistry for complexation and transfection of plasmid DNA, *Int. J. Biol. Macromol.* 79 (2015) 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.04.064>.
- [83] K. Mai, S. Zhang, B. Liang, C. Gao, W. Du, L.-M. Zhang, Water soluble cationic dextran derivatives containing poly(amidoamine) dendrons for efficient gene delivery, *Carbohydr. Polym.* 123 (2015) 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.042>.
- [84] R. Chen, B. Zhunang, Z. Li, W. Li, P. Huang, J. Pang, Y. Zhou, Q. Lin, Q. Zhou, X. Ye, H. Ye, Y. Liu, L. Zhang, J. Wang, Nanocomplexation of thrombin with cationic amylose derivative for improved stability and hemostatic efficacy, *Int. J. Nanomedicine*. (2015) 939. <https://doi.org/10.2147/IJN.S72553>.
- [85] Y. Yan, J. Fu, T. Wang, X. Lu, Controlled release of silyl ether camptothecin from thiol-ene click chemistry-functionalized mesoporous silica nanoparticles, *Acta Biomater.* 51 (2017) 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.062>.

- [86] L. Cai, G. Xu, C. Shi, D. Guo, X. Wang, J. Luo, Telodendrimer nanocarrier for co-delivery of paclitaxel and cisplatin: A synergistic combination nanotherapy for ovarian cancer treatment, *Biomaterials*. 37 (2015) 456–468. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.044>.
- [87] H. He, H. Xiao, H. Kuang, Z. Xie, X. Chen, X. Jing, Y. Huang, Synthesis of mesoporous silica nanoparticle-oxaliplatin conjugates for improved anticancer drug delivery, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 117 (2014) 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.014>.
- [88] M. S. Eroglu, E. Toksoy Oner, E. Cansever Mutlu, M. Sennaroglu Bostan, Sugar Based Biopolymers in Nanomedicine; New Emerging Era for Cancer Imaging and Therapy, *Curr. Top. Med. Chem.* 17 (2017) 1507–1520. <https://doi.org/10.2174/1568026616666161222101703>.
- [89] D. Bacinello, E. Garanger, D. Taton, K.C. Tam, S. Lecommandoux, Enzyme-degradable self-assembled nanostructures from polymer-peptide hybrids, *Biomacromolecules*. 15 (2014) 1882–1888. <https://doi.org/10.1021/bm500296n>.
- [90] H.S. Kim, S. Yoon, Y.J. Son, Y. Park, Y.M. Jung, H.S. Yoo, High-yield clicking and dissociation of doxorubicin nanoclusters exhibiting differential cellular uptakes and imaging, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 217 (2015) 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.037>.
- [91] C. Zhang, D. Pan, J. Li, J. Hu, A. Bains, N. Guys, H. Zhu, X. Li, K. Luo, Q. Gong, Z. Gu, Enzyme-responsive peptide dendrimer-gemcitabine conjugate as a controlled-release drug delivery vehicle with enhanced antitumor efficacy, *Acta Biomater.* 55 (2017) 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.02.047>.
- [92] N. Li, N. Li, Q. Yi, K. Luo, C. Guo, D. Pan, Z. Gu, Amphiphilic peptide dendritic copolymer-doxorubicin nanoscale conjugate self-assembled to enzyme-responsive anti-cancer agent, *Biomaterials*. 35 (2014) 9529–9545. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.059>.
- [93] R. Sharma, S.-Y. Kim, A. Sharma, Z. Zhang, S.P. Kambhampati, S. Kannan, R.M. Kannan, Activated Microglia Targeting Dendrimer-Minocycline Conjugate as Therapeutics for Neuroinflammation, *Bioconjug. Chem.* 28 (2017) 2874–2886. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00569>.
- [94] P. Jiang, S. Li, J. Lai, H. Zheng, C. Lin, P. Shi, Y. Wang, Nanoparticle-Programmed Surface for Drug Release and Cell Regulation via Reversible Hybridization Reaction, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9 (2017) 4467–4474. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b14355>.
- [95] I. Denis, F. el Bahhaj, F. Collette, R. Delatouche, F. Gueugnon, D. Pouliquen, L. Pichavant, V. Héroguez, M. Grégoire, P. Bertrand, C. Blanquart, Histone deacetylase inhibitor-polymer conjugate nanoparticles for acid-responsive drug delivery, *Eur. J. Med. Chem.* 95 (2015) 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.03.037>.
- [96] F. El Bahhaj, I. Denis, L. Pichavant, R. Delatouche, F. Collette, C. Linot, D. Pouliquen, M. Grégoire, V. Héroguez, C. Blanquart, P. Bertrand, Histone Deacetylase Inhibitors Delivery using Nanoparticles with Intrinsic Passive Tumor Targeting Properties for Tumor Therapy, *Theranostics*. 6 (2016) 795–807. <https://doi.org/10.7150/thno.13725>.
- [97] L. Xu, O.Y. Zolotarskaya, W.A. Yeudall, H. Yang, Click hybridization of immune cells and polyamidoamine dendrimers, *Adv. Healthc. Mater.* 3 (2014) 1430–1438. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300515>.
- [98] C.S. Gondi, J.S. Rao, Cathepsin B as a cancer target, *Expert Opin. Ther. Targets*. 17 (2013) 281–291. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.740461>.
- [99] Y. Lyu, X. Zhen, Y. Miao, K. Pu, Reaction-Based Semiconducting Polymer Nanoprobes for Photoacoustic Imaging of Protein Sulfenic Acids, *ACS Nano*. 11 (2017) 358–367. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.6b05949>.
- [100] Y. Xing, J. Zhu, L. Zhao, Z. Xiong, Y. Li, S. Wu, G. Chand, X. Shi, J. Zhao, SPECT/CT imaging of chemotherapy-induced tumor apoptosis using ^{99m}Tc-labeled dendrimer-entrapped gold nanoparticles, *Drug Deliv.* 25 (2018) 1384–1393. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474968>.
- [101] Z. Wei, M. Wu, Z. Li, Z. Lin, J. Zeng, H. Sun, X. Liu, J. Liu, B. Li, Y. Zeng, Gadolinium-doped hollow CeO₂-ZrO₂ nanoplatform as multifunctional MRI/CT dual-modal imaging agent and drug delivery vehicle, *Drug Deliv.* 25 (2018) 353–363. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1428241>.

- [102] B. Zhou, Z. Xiong, P. Wang, C. Peng, M. Shen, S. Mignani, J.-P. Majoral, X. Shi, Targeted tumor dual mode CT/MR imaging using multifunctional polyethylenimine-entrapped gold nanoparticles loaded with gadolinium, *Drug Deliv.* 25 (2018) 178–186. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1422299>.
- [103] W. He, L. Cheng, L. Zhang, X. Jiang, Z. Liu, Z. Cheng, X. Zhu, Bifunctional nanoparticles with magnetism and NIR fluorescence: controlled synthesis from combination of AGET ATRP and “click” reaction, *Nanotechnology.* 25 (2014) 045602. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/4/045602>.
- [104] N.S. Teske, J. Voigt, V.P. Shastri, Clickable degradable aliphatic polyesters via copolymerization with alkyne epoxy esters: synthesis and postfunctionalization with organic dyes, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 10527–10533. <https://doi.org/10.1021/ja505629w>.
- [105] J.V. Hollingsworth, N.V.S.D.K. Bhupathiraju, J. Sun, E. Lochner, M.G.H. Vicente, P.S. Russo, Preparation of Metalloporphyrin-Bound Superparamagnetic Silica Particles via “Click” Reaction, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8 (2016) 792–801. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b10034>.
- [106] S. Lee, S.-W. Kang, J.H. Ryu, J.H. Na, D.-E. Lee, S.J. Han, C.M. Kang, Y.S. Choe, K.C. Lee, J.F. Leary, K. Choi, K.-H. Lee, K. Kim, Tumor-homing glycol chitosan-based optical/PET dual imaging nanoprobe for cancer diagnosis, *Bioconjug. Chem.* 25 (2014) 601–610. <https://doi.org/10.1021/bc500020g>.
- [107] C. Pérez-Medina, D. Abdel-Atti, Y. Zhang, V.A. Longo, C.P. Irwin, T. Binderup, J. Ruiz-Cabello, Z.A. Fayad, J.S. Lewis, W.J.M. Mulder, T. Reiner, A modular labeling strategy for in vivo PET and near-infrared fluorescence imaging of nanoparticle tumor targeting, *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 55 (2014) 1706–1711. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.141861>.
- [108] J. Jeon, J.A. Kang, H.E. Shim, Y.R. Nam, S. Yoon, H.R. Kim, D.E. Lee, S.H. Park, Efficient method for iodine radioisotope labeling of cyclooctyne-containing molecules using strain-promoted copper-free click reaction, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 3303–3308. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.04.045>.
- [109] A.G. Arranja, V. Pathak, T. Lammers, Y. Shi, Tumor-targeted nanomedicines for cancer theranostics, *Pharmacol. Res.* 115 (2017) 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.014>.
- [110] T. Lammers, F. Kiessling, W.E. Hennink, G. Storm, Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress, *J. Controlled Release.* 161 (2012) 175–187. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.063>.
- [111] Q. Sun, T. Ojha, F. Kiessling, T. Lammers, Y. Shi, Enhancing Tumor Penetration of Nanomedicines, *Biomacromolecules.* 18 (2017) 1449–1459. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00068>.
- [112] S.K. Golombek, J.-N. May, B. Theek, L. Appold, N. Drude, F. Kiessling, T. Lammers, Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.007>.
- [113] S. Salatin, S. Maleki Dizaj, A. Yari Khosroushahi, Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles, *Cell Biol. Int.* 39 (2015) 881–890. <https://doi.org/10.1002/cbin.10459>.
- [114] A. Albanese, P.S. Tang, W.C.W. Chan, The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 14 (2012) 1–16. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124>.
- [115] F. Danhier, To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine?, *J. Controlled Release.* 244 (2016) 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.015>.
- [116] S. Sulthana, T. Banerjee, J. Kallu, S.R. Vuppala, B. Heckert, S. Naz, T. Shelby, O. Yambem, S. Santra, Combination Therapy of NSCLC Using Hsp90 Inhibitor and Doxorubicin Carrying Functional Nanoceria, *Mol. Pharm.* 14 (2017) 875–884. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01076>.
- [117] V.B. Junyaprasert, S. Dhanahiranpruk, J. Suksiriworapong, K. Sripha, P. Moongkarndi, Enhanced toxicity and cellular uptake of methotrexate-conjugated nanoparticles in folate receptor-positive cancer cells by decorating with folic acid-conjugated d- α -tocopheryl polyethylene

- glycol 1000 succinate, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 136 (2015) 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.09.013>.
- [118] Y. Wu, Y. Zhang, W. Zhang, C. Sun, J. Wu, J. Tang, Reversing of multidrug resistance breast cancer by co-delivery of P-gp siRNA and doxorubicin via folic acid-modified core-shell nanomicelles, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 138 (2016) 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.041>.
- [119] Y. Singh, K.K. Durga Rao Viswanadham, A. Kumar Jajoriya, J.G. Meher, K. Raval, S. Jaiswal, J. Dewangan, H.K. Bora, S.K. Rath, J. Lal, D.P. Mishra, M.K. Chourasia, Click Biotinylation of PLGA Template for Biotin Receptor Oriented Delivery of Doxorubicin Hydrochloride in 4T1 Cell-Induced Breast Cancer, *Mol. Pharm.* 14 (2017) 2749–2765. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00310>.
- [120] R. Liu, J. Zhao, G. Han, T. Zhao, R. Zhang, B. Liu, Z. Liu, C. Zhang, L. Yang, Z. Zhang, Click-Functionalized SERS Nanoprobes with Improved Labeling Efficiency and Capability for Cancer Cell Imaging, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9 (2017) 38222–38229. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b10409>.
- [121] J. Olejniczak, G. Collet, V.A. Nguyen Huu, M. Chan, S. Lee, A. Almutairi, Biorthogonal click chemistry on poly(lactic-co-glycolic acid)-polymeric particles, *Biomater. Sci.* 5 (2017) 211–215. <https://doi.org/10.1039/c6bm00721j>.
- [122] Q. Sun, Z. Kang, L. Xue, Y. Shang, Z. Su, H. Sun, Q. Ping, R. Mo, C. Zhang, A Collaborative Assembly Strategy for Tumor-Targeted siRNA Delivery, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 6000–6010. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b01435>.
- [123] C.-F. Wang, E.M. Mäkilä, C. Bonduelle, J. Rytönen, J. Raula, S. Almeida, A. Närvänen, J.J. Salonen, S. Lecommandoux, J.T. Hirvonen, H.A. Santos, Functionalization of Alkyne-Terminated Thermally Hydrocarbonized Porous Silicon Nanoparticles With Targeting Peptides and Antifouling Polymers: Effect on the Human Plasma Protein Adsorption, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 7 (2015) 2006–2015. <https://doi.org/10.1021/am507827n>.
- [124] G. Jia, Y. Han, Y. An, Y. Ding, C. He, X. Wang, Q. Tang, NRP-1 targeted and cargo-loaded exosomes facilitate simultaneous imaging and therapy of glioma in vitro and in vivo, *Biomaterials*. 178 (2018) 302–316. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.029>.
- [125] W. Ke, Z. Zha, J.F. Mukerabigwi, W. Chen, Y. Wang, C. He, Z. Ge, Matrix Metalloproteinase-Responsive Multifunctional Peptide-Linked Amphiphilic Block Copolymers for Intelligent Systemic Anticancer Drug Delivery, *Bioconjug. Chem.* 28 (2017) 2190–2198. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00330>.
- [126] O.K. Arriortua, E. Garaio, B. Herrero de la Parte, M. Insausti, L. Lezama, F. Plazaola, J.A. García, J.M. Aizpurua, M. Sagartzazu, M. Irazola, N. Etxebarria, I. García-Alonso, A. Saiz-López, J.J. Echevarria-Uraga, Antitumor magnetic hyperthermia induced by RGD-functionalized Fe₃O₄ nanoparticles, in an experimental model of colorectal liver metastases, *Beilstein J. Nanotechnol.* 7 (2016) 1532–1542. <https://doi.org/10.3762/bjnano.7.147>.
- [127] J. Slegerova, M. Hajek, I. Rehor, F. Sedlak, J. Stursa, M. Hruby, P. Cigler, Designing the nanobiointerface of fluorescent nanodiamonds: highly selective targeting of glioma cancer cells, *Nanoscale*. 7 (2015) 415–420. <https://doi.org/10.1039/c4nr02776k>.
- [128] Y. Oz, M. Arslan, T.N. Gevrek, R. Sanyal, A. Sanyal, Modular Fabrication of Polymer Brush Coated Magnetic Nanoparticles: Engineering the Interface for Targeted Cellular Imaging, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 8 (2016) 19813–19826. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b04664>.
- [129] H. Li, Y. Mu, S. Qian, J. Lu, Y. Wan, G. Fu, S. Liu, Synthesis of fluorescent dye-doped silica nanoparticles for target-cell-specific delivery and intracellular microRNA imaging, *The Analyst*. 140 (2015) 567–573. <https://doi.org/10.1039/c4an01706d>.
- [130] W.-H. Chen, X. Yu, A. Cecconello, Y.S. Sohn, R. Nechushtai, I. Willner, Stimuli-responsive nucleic acid-functionalized metal-organic framework nanoparticles using pH- and metal-ion-dependent DNazymes as locks, *Chem. Sci.* 8 (2017) 5769–5780. <https://doi.org/10.1039/c7sc01765k>.

- [131] W. Morris, W.E. Briley, E. Auyeung, M.D. Cabezas, C.A. Mirkin, Nucleic acid-metal organic framework (MOF) nanoparticle conjugates, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 7261–7264. <https://doi.org/10.1021/ja503215w>.
- [132] C.-F. Wang, M.P. Sarparanta, E.M. Mäkilä, M.L.K. Hyvönen, P.M. Laakkonen, J.J. Salonen, J.T. Hirvonen, A.J. Airaksinen, H.A. Santos, Multifunctional porous silicon nanoparticles for cancer theranostics, *Biomaterials*. 48 (2015) 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.008>.
- [133] B. Huang, J. Otis, M. Joice, A. Kotlyar, T.P. Thomas, PSMA-targeted stably linked “dendrimer-glutamate urea-methotrexate” as a prostate cancer therapeutic, *Biomacromolecules*. 15 (2014) 915–923. <https://doi.org/10.1021/bm401777w>.
- [134] M. Zhao, Y. Liu, R.S. Hsieh, N. Wang, W. Tai, K.-I. Joo, P. Wang, Z. Gu, Y. Tang, Clickable protein nanocapsules for targeted delivery of recombinant p53 protein, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 15319–15325. <https://doi.org/10.1021/ja508083g>.
- [135] J.B. Otis, H. Zong, A. Kotlyar, A. Yin, S. Bhattacharjee, H. Wang, J.R. Baker, S.H. Wang, Dendrimer antibody conjugate to target and image HER-2 overexpressing cancer cells, *Oncotarget*. 7 (2016) 36002–36013. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9081>.
- [136] Z. Zhou, A. Badkas, M. Stevenson, J.-Y. Lee, Y.-K. Leung, Herceptin conjugated PLGA-PHis-PEG pH sensitive nanoparticles for targeted and controlled drug delivery, *Int. J. Pharm.* 487 (2015) 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.081>.
- [137] Q. Lin, Y. Yang, Q. Hu, Z. Guo, T. Liu, J. Xu, J. Wu, T.B. Kirk, D. Ma, W. Xue, Injectable supramolecular hydrogel formed from α -cyclodextrin and PEGylated arginine-functionalized poly(L-lysine) dendron for sustained MMP-9 shRNA plasmid delivery, *Acta Biomater.* 49 (2017) 456–471. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.062>.
- [138] X. Li, L. Zhao, Q. Liang, Q. Liang, J. Ye, N. Komatsu, Q. Zhang, W. Gao, M. Xu, X. Chen, Cationic Polyarginine Conjugated Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles with Polyglycerol Coating for Efficient DNA Delivery, *J. Biomed. Nanotechnol.* 13 (2017) 280–289.
- [139] A.R. Maity, D. Stepensky, Efficient Subcellular Targeting to the Cell Nucleus of Quantum Dots Densely Decorated with a Nuclear Localization Sequence Peptide, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 8 (2016) 2001–2009. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b10295>.
- [140] K. Tatiparti, S. Sau, K.A. Gawde, A.K. Iyer, Copper-Free “Click” Chemistry-Based Synthesis and Characterization of Carbonic Anhydrase-IX Anchored Albumin-Paclitaxel Nanoparticles for Targeting Tumor Hypoxia, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19030838>.
- [141] C.M. Calabrese, T.J. Merkel, W.E. Briley, P.S. Randeria, S.P. Narayan, J.L. Rouge, D.A. Walker, A.W. Scott, C.A. Mirkin, Biocompatible infinite-coordination-polymer nanoparticle-nucleic-acid conjugates for antisense gene regulation, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 54 (2015) 476–480. <https://doi.org/10.1002/anie.201407946>.
- [142] S. Collina, New Perspectives in Cancer Therapy: The Biotin-Antitumor Molecule Conjugates, *Med. Chem. S* (2014). <https://doi.org/10.4172/2161-0444.S1-004>.
- [143] G.L. Zwicke, G. Ali Mansoori, C.J. Jeffery, Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics, *Nano Rev.* 3 (2012) 18496. <https://doi.org/10.3402/nano.v3i0.18496>.
- [144] N. Puvvada, S. Rajput, B.N.P. Kumar, S. Sarkar, S. Konar, K.R. Brunt, R.R. Rao, A. Mazumdar, S.K. Das, R. Basu, P.B. Fisher, M. Mandal, A. Pathak, Novel ZnO hollow-nanocarriers containing paclitaxel targeting folate-receptors in a malignant pH-microenvironment for effective monitoring and promoting breast tumor regression, *Sci. Rep.* 5 (2015) 11760. <https://doi.org/10.1038/srep11760>.
- [145] J. Wei, X. Shuai, R. Wang, X. He, Y. Li, M. Ding, J. Li, H. Tan, Q. Fu, Clickable and imageable multiblock polymer micelles with magnetically guided and PEG-switched targeting and release property for precise tumor theranosis, *Biomaterials*. 145 (2017) 138–153. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.08.005>.
- [146] Y. Zhang, T. Lv, H. Zhang, X. Xie, Z. Li, H. Chen, Y. Gao, Folate and Heptamethine Cyanine Modified Chitosan-Based Nanotheranostics for Tumor Targeted Near-Infrared Fluorescence

- Imaging and Photodynamic Therapy, *Biomacromolecules*. 18 (2017) 2146–2160. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00466>.
- [147] N. Guldris, J. Gallo, L. García-Hevia, J. Rivas, M. Bañobre-López, L.M. Salonen, Orthogonal Clickable Iron Oxide Nanoparticle Platform for Targeting, Imaging, and On-Demand Release, *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 24 (2018) 8624–8631. <https://doi.org/10.1002/chem.201800389>.
- [148] D. Kato, M. Oishi, Ultrasensitive detection of DNA and RNA based on enzyme-free click chemical ligation chain reaction on dispersed gold nanoparticles, *ACS Nano*. 8 (2014) 9988–9997. <https://doi.org/10.1021/nn503150w>.
- [149] D. Mendez-Gonzalez, M. Laurenti, A. Latorre, A. Somoza, A. Vazquez, A.I. Negredo, E. López-Cabarcos, O.G. Calderón, S. Melle, J. Rubio-Retama, Oligonucleotide Sensor Based on Selective Capture of Upconversion Nanoparticles Triggered by Target-Induced DNA Interstrand Ligand Reaction, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9 (2017) 12272–12281. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b00575>.
- [150] N.D.S. Rambaruth, M.V. Dwek, Cell surface glycan-lectin interactions in tumor metastasis, *Acta Histochem.* 113 (2011) 591–600. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.03.001>.
- [151] S. Nakahara, A. Raz, Biological modulation by lectins and their ligands in tumor progression and metastasis, *Anticancer Agents Med. Chem.* 8 (2008) 22–36.
- [152] V. Poonthiyil, T.K. Lindhorst, V.B. Golovko, A.J. Fairbanks, Recent applications of click chemistry for the functionalization of gold nanoparticles and their conversion to glyco-gold nanoparticles, *Beilstein J. Org. Chem.* 14 (2018) 11–24. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.2>.
- [153] K.Y. Choi, H.Y. Yoon, J.-H. Kim, S.M. Bae, R.-W. Park, Y.M. Kang, I.-S. Kim, I.C. Kwon, K. Choi, S.Y. Jeong, K. Kim, J.H. Park, Smart Nanocarrier Based on PEGylated Hyaluronic Acid for Cancer Therapy, *ACS Nano*. 5 (2011) 8591–8599. <https://doi.org/10.1021/nn202070n>.
- [154] J.J. Lundquist, E.J. Toone, The Cluster Glycoside Effect, *Chem. Rev.* 102 (2002) 555–578. <https://doi.org/10.1021/cr000418f>.
- [155] K. Bezouska, Design, functional evaluation and biomedical applications of carbohydrate dendrimers (glycodendrimers), *J. Biotechnol.* 90 (2002) 269–290.
- [156] P. Rajakumar, R. Anandhan, G.P. Vadla, E. Vellaichamy, Synthesis and cardio protective biological applications of glucodendrimers by H9C2 cell studies, *Carbohydr. Polym.* 99 (2014) 403–414. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.040>.
- [157] N. Kong, J. Zhou, J. Park, S. Xie, O. Ramström, M. Yan, Quantitative fluorine NMR to determine carbohydrate density on glyconanomaterials synthesized from perfluorophenyl azide-functionalized silica nanoparticles by click reaction, *Anal. Chem.* 87 (2015) 9451–9458. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02507>.
- [158] S. Tollas, I. Bereczki, A. Borbás, G. Batta, E. Vanderlinden, L. Naesens, P. Herczegh, Synthesis of a cluster-forming sialylthio-D-galactose fullerene conjugate and evaluation of its interaction with influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 2420–2423. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.04.032>.
- [159] A.D. Keefe, S. Pai, A. Ellington, Aptamers as therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 537–550. <https://doi.org/10.1038/nrd3141>.
- [160] L. Ma, C. Tu, P. Le, S. Chittoor, S.J. Lim, M.U. Zahid, K.W. Teng, P. Ge, P.R. Selvin, A.M. Smith, Multidentate Polymer Coatings for Compact and Homogeneous Quantum Dots with Efficient Bioconjugation, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 3382–3394. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b12378>.
- [161] Q. Ding, Q. Zhan, X. Zhou, T. Zhang, D. Xing, Theranostic Upconversion Nanobeacons for Tumor mRNA Ratiometric Fluorescence Detection and Imaging-Monitored Drug Delivery, *Small Weinh. Bergstr. Ger.* 12 (2016) 5944–5953. <https://doi.org/10.1002/sml.201601724>.
- [162] R.D. Akiel, X. Zhang, C. Abeywardana, V. Stepanov, P.Z. Qin, S. Takahashi, Investigating Functional DNA Grafted on Nanodiamond Surface Using Site-Directed Spin Labeling and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*. 120 (2016) 4003–4008. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b00790>.

- [163] M. Barczyk, S. Carracedo, D. Gullberg, Integrins, *Cell Tissue Res.* 339 (2010) 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>.
- [164] G. Thumshirn, U. Hersel, S.L. Goodman, H. Kessler, Multimeric Cyclic RGD Peptides as Potential Tools for Tumor Targeting: Solid-Phase Peptide Synthesis and Chemoselective Oxime Ligation, *Chem. - Eur. J.* 9 (2003) 2717–2725. <https://doi.org/10.1002/chem.200204304>.
- [165] I. Rehor, J. Slegerova, J. Kucka, V. Proks, V. Petrakova, M.-P. Adam, F. Treussart, S. Turner, S. Bals, P. Sacha, M. Ledvina, A.M. Wen, N.F. Steinmetz, P. Cigler, Fluorescent nanodiamonds embedded in biocompatible translucent shells, *Small* 10 (2014) 1106–1115. <https://doi.org/10.1002/smll.201302336>.
- [166] H. Yuan, M.Q. Wilks, G. El Fakhri, M.D. Normandin, C. Kaittanis, L. Josephson, Heat-induced-radiolabeling and click chemistry: A powerful combination for generating multifunctional nanomaterials, *PLoS One* 12 (2017) e0172722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172722>.
- [167] C.-F. Wang, E.M. Mäkilä, M.H. Kaasalainen, D. Liu, M.P. Sarparanta, A.J. Airaksinen, J.J. Salonen, J.T. Hirvonen, H.A. Santos, Copper-free azide-alkyne cycloaddition of targeting peptides to porous silicon nanoparticles for intracellular drug uptake, *Biomaterials* 35 (2014) 1257–1266. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.065>.
- [168] M. Lindgren, M. Hällbrink, A. Prochiantz, Ü. Langel, Cell-penetrating peptides, *Trends Pharmacol. Sci.* 21 (2000) 99–103. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01447-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01447-4).
- [169] E. Vivès, P. Brodin, B. Lebleu, A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16010–16017. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.25.16010>.
- [170] D. Liu, H. Zhang, E. Mäkilä, J. Fan, B. Herranz-Blanco, C.-F. Wang, R. Rosa, A.J. Ribeiro, J. Salonen, J. Hirvonen, H.A. Santos, Microfluidic assisted one-step fabrication of porous silicon@acetalated dextran nanocomposites for precisely controlled combination chemotherapy, *Biomaterials* 39 (2015) 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.079>.
- [171] S.-S. Han, Z.-Y. Li, J.-Y. Zhu, K. Han, Z.-Y. Zeng, W. Hong, W.-X. Li, H.-Z. Jia, Y. Liu, R.-X. Zhuo, X.-Z. Zhang, Dual-pH Sensitive Charge-Reversal Polypeptide Micelles for Tumor-Triggered Targeting Uptake and Nuclear Drug Delivery, *Small* 11 (2015) 2543–2554. <https://doi.org/10.1002/smll.201402865>.
- [172] K. Brunner, J. Harder, T. Halbach, J. Willibald, F. Spada, F. Gnerlich, K. Sparrer, A. Beil, L. Möckl, C. Bräuchle, K.-K. Conzelmann, T. Carell, Cell-penetrating and neurotargeting dendritic siRNA nanostructures, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 54 (2015) 1946–1949. <https://doi.org/10.1002/anie.201409803>.
- [173] J. Wan, A. Brust, R.F. Bholá, P. Jha, M. Mobli, R.J. Lewis, M.J. Christie, P.F. Alewood, Inhibition of the norepinephrine transporter by χ -conotoxin dendrimers, *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 22 (2016) 280–289. <https://doi.org/10.1002/psc.2857>.
- [174] E.S. Lovelace, C.J. Armishaw, M.L. Colgrave, M.E. Wahlstrom, P.F. Alewood, N.L. Daly, D.J. Craik, Cyclic MriA: A Stable and Potent Cyclic Conotoxin with a Novel Topological Fold that Targets the Norepinephrine Transporter, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 6561–6568. <https://doi.org/10.1021/jm060299h>.
- [175] C. Hüttel, C. Hettrich, M. Riedel, P. Henklein, H. Rawel, F.F. Bier, Development of peptidyl lysine dendrons: 1,3-dipolar cycloaddition for peptide coupling and antibody recognition, *Chem. Biol. Drug Des.* 85 (2015) 565–573. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12444>.
- [176] M. Qin, H. Zong, R. Kopelman, Click conjugation of peptide to hydrogel nanoparticles for tumor-targeted drug delivery, *Biomacromolecules* 15 (2014) 3728–3734. <https://doi.org/10.1021/bm501028c>.
- [177] W. Tang, M.L. Becker, “Click” reactions: a versatile toolbox for the synthesis of peptide-conjugates, *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 7013–7039. <https://doi.org/10.1039/c4cs00139g>.
- [178] D.R. Nogueira-Librelotto, C.F. Codevilla, A. Farooqi, C.M.B. Rolim, Transferrin-Conjugated Nanocarriers as Active-Targeted Drug Delivery Platforms for Cancer Therapy, *Curr. Pharm. Des.* 23 (2017) 454–466. <https://doi.org/10.2174/1381612822666161026162347>.

- [179] W. Wang, A. Kapur, X. Ji, B. Zeng, D. Mishra, H. Mattoussi, Multifunctional and High Affinity Polymer Ligand that Provides Bio-Orthogonal Coating of Quantum Dots, *Bioconjug. Chem.* 27 (2016) 2024–2036. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00309>.
- [180] M. Asadian-Birjand, C. Biglione, J. Bergueiro, A. Cappelletti, C. Rahane, G. Chate, J. Khandare, B. Klemke, M.C. Strumia, M. Calderón, Transferrin Decorated Thermoresponsive Nanogels as Magnetic Trap Devices for Circulating Tumor Cells, *Macromol. Rapid Commun.* 37 (2016) 439–445. <https://doi.org/10.1002/marc.201500590>.
- [181] F. Jivan, R. Yegappan, H. Pearce, J.K. Carrow, M. McShane, A.K. Gaharwar, D.L. Alge, Sequential Thiol-Ene and Tetrazine Click Reactions for the Polymerization and Functionalization of Hydrogel Microparticles, *Biomacromolecules.* 17 (2016) 3516–3523. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00990>.
- [182] L. Martínez-Jothar, S. Doukeridou, R.M. Schiffelers, J. Sastre Torano, S. Oliveira, C.F. van Nostrum, W.E. Hennink, Insights into maleimide-thiol conjugation chemistry: Conditions for efficient surface functionalization of nanoparticles for receptor targeting, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 282 (2018) 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.03.002>.
- [183] D. Estupiñán, M.B. Bannwarth, S.E. Mylon, K. Landfester, R. Muñoz-Espí, D. Crespy, Multifunctional clickable and protein-repellent magnetic silica nanoparticles, *Nanoscale.* 8 (2016) 3019–3030. <https://doi.org/10.1039/c5nr08258g>.
- [184] R.K. Pathak, C.D. McNitt, V.V. Popik, S. Dhar, Copper-free click-chemistry platform to functionalize cisplatin prodrugs, *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 20 (2014) 6861–6865. <https://doi.org/10.1002/chem.201402573>.
- [185] J.Z. Hui, A. Al Zaki, Z. Cheng, V. Popik, H. Zhang, E.T. Luning Prak, A. Tsourkas, Facile method for the site-specific, covalent attachment of full-length IgG onto nanoparticles, *Small Weinh. Bergstr. Ger.* 10 (2014) 3354–3363. <https://doi.org/10.1002/sml.201303629>.
- [186] H.T. Ta, Z. Li, C.E. Hagemeyer, G. Cowin, S. Zhang, J. Palasubramaniam, K. Alt, X. Wang, K. Peter, A.K. Whittaker, Molecular imaging of activated platelets via antibody-targeted ultra-small iron oxide nanoparticles displaying unique dual MRI contrast, *Biomaterials.* 134 (2017) 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.04.037>.
- [187] M. Colombo, S. Sommaruga, S. Mazzucchelli, L. Polito, P. Verderio, P. Galeffi, F. Corsi, P. Tortora, D. Prospero, Site-specific conjugation of ScFvs antibodies to nanoparticles by bioorthogonal strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 51 (2012) 496–499. <https://doi.org/10.1002/anie.201106775>.
- [188] S. Jeong, J.Y. Park, M.G. Cha, H. Chang, Y.-I. Kim, H.-M. Kim, B.-H. Jun, D.S. Lee, Y.-S. Lee, J.M. Jeong, Y.-S. Lee, D.H. Jeong, Highly robust and optimized conjugation of antibodies to nanoparticles using quantitatively validated protocols, *Nanoscale.* 9 (2017) 2548–2555. <https://doi.org/10.1039/c6nr04683e>.
- [189] F.T. Lee-Montiel, P. Li, P.I. Imoukhuede, Quantum dot multiplexing for the profiling of cellular receptors, *Nanoscale.* 7 (2015) 18504–18514. <https://doi.org/10.1039/c5nr01455g>.
- [190] R. Qiao, C. Liu, M. Liu, H. Hu, C. Liu, Y. Hou, K. Wu, Y. Lin, J. Liang, M. Gao, Ultrasensitive in vivo detection of primary gastric tumor and lymphatic metastasis using upconversion nanoparticles, *ACS Nano.* 9 (2015) 2120–2129. <https://doi.org/10.1021/nn507433p>.
- [191] K.C. Sanjaya, A. Ranzoni, D. Watterson, P. Young, M.A. Cooper, Evaluation of direct versus multi-layer passivation and capture chemistries for nanoparticle-based biosensor applications, *Biosens. Bioelectron.* 67 (2015) 769–774. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.048>.
- [192] G.B. Cserép, A. Herner, P. Kele, Bioorthogonal fluorescent labels: a review on combined forces, *Methods Appl. Fluoresc.* 3 (2015) 042001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/3/4/042001>.
- [193] H. Koo, S. Lee, J.H. Na, S.H. Kim, S.K. Hahn, K. Choi, I.C. Kwon, S.Y. Jeong, K. Kim, Bioorthogonal copper-free click chemistry in vivo for tumor-targeted delivery of nanoparticles, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 51 (2012) 11836–11840. <https://doi.org/10.1002/anie.201206703>.
- [194] Y. Chen, J.M. Cordero, H. Wang, D. Franke, O.B. Achorn, F.S. Freyria, I. Coropceanu, H. Wei, O. Chen, D.J. Mooney, M.G. Bawendi, A Ligand System for the Flexible Functionalization of

- Quantum Dots via Click Chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 57 (2018) 4652–4656. <https://doi.org/10.1002/anie.201801113>.
- [195] K.M. Au, A. Tripathy, C.P.-I. Lin, K. Wagner, S. Hong, A.Z. Wang, S.I. Park, Bespoke Pretargeted Nanoradioimmunotherapy for the Treatment of Non-Hodgkin Lymphoma, *ACS Nano.* (2018). <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08122>.
- [196] S. Lee, H.I. Yoon, J.H. Na, S. Jeon, S. Lim, H. Koo, S.-S. Han, S.-W. Kang, S.-J. Park, S.-H. Moon, J.H. Park, Y.W. Cho, B.-S. Kim, S.K. Kim, T. Lee, D. Kim, S. Lee, M.G. Pomper, I.C. Kwon, K. Kim, In vivo stem cell tracking with imageable nanoparticles that bind bioorthogonal chemical receptors on the stem cell surface, *Biomaterials.* 139 (2017) 12–29. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.05.050>.
- [197] J.B. Haun, N.K. Devaraj, S.A. Hilderbrand, H. Lee, R. Weissleder, Bioorthogonal chemistry amplifies nanoparticle binding and enhances the sensitivity of cell detection, *Nat. Nanotechnol.* 5 (2010) 660–665. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.148>.
- [198] J.B. Haun, N.K. Devaraj, B.S. Marinelli, H. Lee, R. Weissleder, Probing Intracellular Biomarkers and Mediators of Cell Activation Using Nanosensors and Bioorthogonal Chemistry, *ACS Nano.* 5 (2011) 3204–3213. <https://doi.org/10.1021/nn200333m>.
- [199] H.J. Chung, T. Reiner, G. Budin, C. Min, M. Liong, D. Issadore, H. Lee, R. Weissleder, Ubiquitous detection of gram-positive bacteria with bioorthogonal magnetofluorescent nanoparticles, *ACS Nano.* 5 (2011) 8834–8841. <https://doi.org/10.1021/nn2029692>.
- [200] G. Budin, H.J. Chung, H. Lee, R. Weissleder, A magnetic Gram stain for bacterial detection, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 51 (2012) 7752–7755. <https://doi.org/10.1002/anie.201202982>.
- [201] C. Tassa, M. Liong, S. Hilderbrand, J.E. Sandler, T. Reiner, E.J. Keliher, R. Weissleder, S.Y. Shaw, On-chip bioorthogonal chemistry enables immobilization of in situ modified nanoparticles and small molecules for label-free monitoring of protein binding and reaction kinetics, *Lab. Chip.* 12 (2012) 3103–3110. <https://doi.org/10.1039/c2lc40337d>.
- [202] A.A. Ghazani, M. Pectasides, A. Sharma, C.M. Castro, M. Mino-Kenudson, H. Lee, J.-A.O. Shepard, R. Weissleder, Molecular characterization of scant lung tumor cells using iron-oxide nanoparticles and micro-nuclear magnetic resonance, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 10 (2014) 661–668. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.10.008>.
- [203] G. Lu, F. Li, F. Zhang, L.-L. Huang, L. Zhang, Y. Lv, W. Wei, H.-Y. Xie, Amplifying Nanoparticle Targeting Performance to Tumor via Diels-Alder Cycloaddition, *Adv. Funct. Mater.* (2018) 1707596. <https://doi.org/10.1002/adfm.201707596>.
- [204] S.S. Agasti, M. Liong, C. Tassa, H.J. Chung, S.Y. Shaw, H. Lee, R. Weissleder, Supramolecular host-guest interaction for labeling and detection of cellular biomarkers, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 51 (2012) 450–454. <https://doi.org/10.1002/anie.201105670>.
- [205] P.J. O'Brien, S. Elahipanah, D. Rogozhnikov, M.N. Yousaf, Bio-Orthogonal Mediated Nucleic Acid Transfection of Cells via Cell Surface Engineering, *ACS Cent. Sci.* 3 (2017) 489–500. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00132>.
- [206] L. Du, H. Qin, T. Ma, T. Zhang, D. Xing, *In Vivo* Imaging-Guided Photothermal/Photoacoustic Synergistic Therapy with Bioorthogonal Metabolic Glycoengineering-Activated Tumor Targeting Nanoparticles, *ACS Nano.* 11 (2017) 8930–8943. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b03226>.
- [207] D. Mao, F. Hu, null Kenry, S. Ji, W. Wu, D. Ding, D. Kong, B. Liu, Metal-Organic-Framework-Assisted In Vivo Bacterial Metabolic Labeling and Precise Antibacterial Therapy, *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla.* (2018). <https://doi.org/10.1002/adma.201706831>.
- [208] S.B. Lee, H.L. Kim, H.-J. Jeong, S.T. Lim, M.-H. Sohn, D.W. Kim, Mesoporous Silica Nanoparticle Pretargeting for PET Imaging Based on a Rapid Bioorthogonal Reaction in a Living Body, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 10549–10552. <https://doi.org/10.1002/anie.201304026>.
- [209] H.J. Jeong, R.J. Yoo, J.K. Kim, M.H. Kim, S.H. Park, H. Kim, J.W. Lim, S.H. Do, K.C. Lee, Y.J. Lee, D.W. Kim, Macrophage cell tracking PET imaging using mesoporous silica nanoparticles via in vivo bioorthogonal F-18 labeling, *Biomaterials.* 199 (2019) 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.01.043>.

- [210] S. Lee, H. Koo, J.H. Na, S.J. Han, H.S. Min, S.J. Lee, S.H. Kim, S.H. Yun, S.Y. Jeong, I.C. Kwon, K. Choi, K. Kim, Chemical tumor-targeting of nanoparticles based on metabolic glycoengineering and click chemistry, *ACS Nano*. 8 (2014) 2048–2063. <https://doi.org/10.1021/nn406584y>.
- [211] C. Brand, P. Iacono, C. Pérez-Medina, W.J.M. Mulder, M.F. Kircher, T. Reiner, Specific Binding of Liposomal Nanoparticles through Inverse Electron-Demand Diels-Alder Click Chemistry, *ChemistryOpen*. (2017). <https://doi.org/10.1002/open.201700105>.
- [212] I. Khan, P.F. Agris, M.V. Yigit, M. Royzen, In situ activation of a doxorubicin prodrug using imaging-capable nanoparticles, *Chem. Commun. Camb. Engl.* 52 (2016) 6174–6177. <https://doi.org/10.1039/c6cc01024e>.
- [213] C. Denk, D. Svatunek, S. Mairinger, J. Stanek, T. Filip, D. Matscheko, C. Kuntner, T. Wanek, H. Mikula, Design, Synthesis, and Evaluation of a Low-Molecular-Weight ¹¹C-Labeled Tetrazine for Pretargeted PET Imaging Applying Bioorthogonal in Vivo Click Chemistry, *Bioconjug. Chem.* 27 (2016) 1707–1712. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00234>.
- [214] A.H.A.M. van Onzen, R. Rossin, A.P.H.J. Schenning, K. Nicolay, L.-G. Milroy, M.S. Robillard, L. Brunsveld, Tetrazine— *trans* -Cyclooctene Chemistry Applied to Fabricate Self-Assembled Fluorescent and Radioactive Nanoparticles for *in Vivo* Dual Mode Imaging, *Bioconjug. Chem.* (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00038>.

I. Ce qu'il faut retenir

Ces dix dernières années, la chimie click et bioorthogonale connaissent un essor important pour la conception de NP (théranostiques ou non) dédiées au diagnostic et à la thérapie du cancer. Par rapport aux stratégies classiquement utilisées, cette chimie hautement sélective permet de lier de façon covalente des entités macromoléculaires. Les rendements élevés (souvent supérieurs à 95%), la spécificité et les conditions de réaction simples et variées sont les atouts majeurs de ce type de chimie.

Dans un premier temps, les nombreuses études publiées soulignent l'intérêt de la chimie click et bioorthogonale comme outil pour la conception de NP non ciblant. Ces réactions présentent un intérêt pour l'incorporation en surface de molécules telles que des fluorophores et des agents de contraste pour l'imagerie ; mais également pour encapsuler de manière spécifique et efficace des agents chimiothérapeutiques insolubles afin d'améliorer l'index thérapeutique. Ainsi, les micelles, les liposomes, les dendrons, les dendrimères et les NP polymères restent les particules les plus utilisées dans ce domaine. Ces nanomatériaux démontrent une activité antiproliférative *in vitro* ; cependant, pour la plupart l'efficacité *in vivo* et/ou clinique reste à évaluer.

Ce type de chimie permet également de greffer des ligands à la surface des NP pour un ciblage actif et une accumulation spécifique au niveau des cellules tumorales. Parmi les quelques articles retenus comparant le ciblage actif et passif de NP, il semble que le ciblage actif facilite l'interaction des NP avec leur cible biologique. Les ligands permettent de limiter l'accès uniquement aux cellules cancéreuses pour la délivrance intracellulaire de gènes (inactivation génique), d'agents thérapeutiques ou d'agents d'imagerie. Ils améliorent de manière importante l'absorption et l'internalisation cellulaire, permettant dans la plupart des cas de promouvoir la cytotoxicité, l'apoptose et l'efficacité de la transfection des cellules cancéreuses, le plus souvent par le biais de la voie endocytaire médiée par les récepteurs ciblés. De plus, certaines études *in vivo* démontrent également une amélioration de la rétention tumorale des NP ciblant et par conséquent de l'inhibition de la croissance tumorale.

Enfin, il semble que l'utilisation de la chimie bioorthogonale avec les systèmes de ligation SPAAC et IEDDA caractérise indéniablement l'avenir des NP anticancéreuses via le ciblage actif. En effet, même si elles permettent de greffer une molécule de ciblage à la surface des NP comme avec la chimie click (ex : CuAAC), elles peuvent également être utilisées selon une approche de préciblage actif en deux temps très prometteur :

(1) Dans le cas où les NP modifiées seraient administrées lors de la seconde étape, cette approche permettrait d'envisager l'utilisation des mêmes NP pour différents cancers ou pour le même type de cancer mais avec des biomarqueurs d'intérêt différents : seul le ligand, administré en première étape, devrait être modifié avec l'entité bioorthogonale correspondante.

(2) Dans le cas où les NP modifiées agiraient en tant que «plateformes», cette approche pourrait également être appliquée à différents cancers si l'effet EPR permet une absorption tumorale efficace. Une fois situées au niveau de la tumeur, les NP serviraient de « plateformes » théranostiques appropriées selon les sondes administrées dans un deuxième temps [213, 215]. D'autres études commencent à utiliser ces systèmes bioorthogonaux pour la libération contrôlée de prodrogues après ligation chimique [216, 217]. Finalement, tout ceci nous amène à nous demander si l'utilisation de cette approche de préciblage bioorthogonal pourrait constituer le paradigme du ciblage actif des NP ?

Partie 2. Objectifs

La RE constitue une approche thérapeutique très utilisée au cours du parcours de soins des patients atteints de cancer. Toutefois, les doses de radiations délivrées au sein de la tumeur sont souvent limitées du fait des dommages subis par les tissus sains environnants inévitablement irradiés. L'utilisation de NP à base d'atomes lourds absorbant fortement les rayonnements ionisants et réémettant localement l'énergie reçue au sein du foyer tumoral semble une alternative pertinente pour améliorer l'efficacité de la RE [178]. Cependant, la majorité des NP développées à ce jour sont principalement distribuées par effet EPR [16]. Or, l'accumulation tumorale après administration systémique de NP reste transitoire et dépendante de la perméabilité accrue des vaisseaux sanguins tumoraux ; il est à noter que seules 0,7% des NP injectées semblent atteindre réellement le foyer tumoral *in vivo* (1 sur 100 000) [12]. L'une des stratégies largement développée à ce jour pour améliorer leur ciblage tumoral consiste à greffer des ligands capables de reconnaître des biomarqueurs tumoraux (biomolécules, petites molécules) de manière à obtenir un ciblage actif et spécifique des cellules tumorales. A l'heure actuelle, la majorité des recherches se concentrent sur les AcM qui présentent des résultats prometteurs à la fois *in vitro* et *in vivo* [218,219]. Le ciblage actif doit cependant constituer un réel bénéfice car souvent le greffage de tels ligands à la surface des NP induit une forte augmentation de la taille de la NP pouvant induire une augmentation de la dégradation hépatique. Dissocier l'administration des AcM de celle des NP semble donc une stratégie appropriée pour s'affranchir de cet inconvénient. Ce concept récent dans le domaine des nanomédecines, appelé immunopréciblage de NP, permet de cibler spécifiquement les tumeurs sans que l'AcM soit pour autant directement greffé sur les NP [86,220].

Ainsi, l'objectif au cours de ce travail de thèse serait de pouvoir cibler spécifiquement les tumeurs grâce à l'utilisation de cette stratégie de « préciblage » réalisée selon une réaction de chimie bioorthogonale pour former une liaison covalente irréversible et spécifique entre l'AcM préalablement administré et la NP porteuse d'atomes lourds tels que le gadolinium. Cette stratégie consiste dans un premier temps à administrer les AcM préalablement modifiés par une entité bioorthogonale () pour qu'ils permettent un ciblage tumoral actif (**Figure 27, étape 1**). Puis dans un second temps, d'administrer les NP fonctionnalisées par une autre entité bioorthogonale () (**Figure 27, étape 2**), complémentaire de celle portée par l'AcM d'ores et déjà présent dans l'environnement tumoral *via* la ligation bioorthogonale () (**Figure 27, étape 3**). L'effet radiosensibilisant apporté par les NP permettrait dans une dernière étape d'appliquer une dose d'irradiation pour traiter la tumeur () (**Figure 27, étape 4**). Cette approche d'immunopréciblage aurait pour but d'augmenter la sélectivité et l'accumulation tumorale des NP constituées d'atomes lourds afin d'améliorer l'efficacité de la RE. De plus, ce type de stratégie permettrait d'envisager le ciblage actif des NP pour différentes pathologies cancéreuses sans avoir à modifier la NP ; seul l'AcM adapté à la pathologie concernée aura besoin d'être fonctionnalisé. Pour réaliser la preuve de concept de cette approche, notre choix s'est porté sur l'utilisation d'une réaction bioorthogonale de type SPAAC qui fait partie des systèmes de chimie click les plus étudiés à l'heure actuelle [220–222]. La réaction a lieu entre un groupement azoture (N₃) porté par l'AcM et un dérivé cyclooctyne contraint (ADIBO) porté par la NP pour former un triazole (**Figure 27, étape 3**).

Dans cette optique, la méthodologie de travail de ce projet de thèse s'est articulée autour de trois principaux objectifs :

- (1) **La conception des NP radiosensibilisantes**, réalisée en collaboration avec l'équipe « Interfaces et Biocapteurs » dirigée par le Dr Carole Chaix de l'Institut des Sciences Analytiques (ISA/UMR 5280) de Villeurbanne.

Cette équipe a développé une méthode innovante de fonctionnalisation supportée [223] qui permet d'élaborer des NP hautement fonctionnalisées et de manière contrôlée possédant de multiples propriétés. Les NP utilisées pour ce projet sont des NP de silice constituées d'un cœur fluorescent de rhodamine. Ainsi, la première tâche consistera à utiliser cette technique novatrice pour mettre au point l'ingénierie de ces NP afin qu'elles disposent à la fois d'entités bioorthogonales (**ADIBO**) et d'entités chélatantes (**DOTA**) complexant les ions Gd^{3+} . Nous appellerons ces particules dans la suite du manuscrit **NP-ADIBO/DOTA(Gd)**. Pour obtenir ces NP, il faudra procéder à la synthèse des différents éléments de chimie bioorthogonale nécessaires à la fonctionnalisation des NP. Cela comprendra notamment la synthèse du macrocycle azoté DOTA qui permettra la chélation des atomes de gadolinium. Les différents lots de NP obtenues seront ensuite caractérisés par DLS (diamètre hydrodynamique, indice de polydispersité et potentiel zêta), MET, spectrophotométrie UV-visible, fluorescence ainsi que par ICP-MS.

- (2) **Le développement d'AcM modifiés** par des entités bioorthogonales, réalisé au sein de l'équipe IMoST dirigée par le Dr Elisabeth Miot-Noirault de l'INSERM (UMR 1240/UCA) de Clermont-Ferrand.

Nous avons décidé de travailler avec le Rituximab (RTX), un AcM dirigé contre les antigènes de surface CD20 surexprimés dans les modèles de lymphome. Ce projet a été mené sur un modèle de lymphome en particulier (Granta-519) pour deux raisons : (a) tout d'abord, parce que c'est un cancer radiosensible qui peut être traité cliniquement avec le RTX ; (b) cet AcM ne s'internalise pas après fixation à l'antigène, ce qui constitue un avantage important permettant la ligation bioorthogonale de la NP injectée dans un second temps. Dans cette partie, l'AcM devra être modifié chimiquement. Pour cela, l'entité bioorthogonale azoture sera synthétisée pour ensuite être introduite sur les AcM (RTX-**N₃**). Dès lors que les RTX-**N₃** seront synthétisés, des approches de fluorescence à la fois par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et *in vitro* par cytométrie en flux seront utilisées pour évaluer la fonctionnalisation effective des RTX-**N₃**. Ces tests seront réalisés grâce à un ADIBO fluorescent commercial et permettront de sélectionner le meilleur conjugué RTX-**N₃** utilisé ensuite pour les études d'interaction avec les NP par microscopie confocale.

- (3) **L'évaluation biologique *in vitro*** de l'approche d'immunoprécipilage, également réalisée au sein de l'équipe IMoST.

Ces tests consisteront à étudier le précipilage des NP par imagerie confocale pour mettre en évidence la fixation membranaire spécifique ou non des NP sur les cellules.

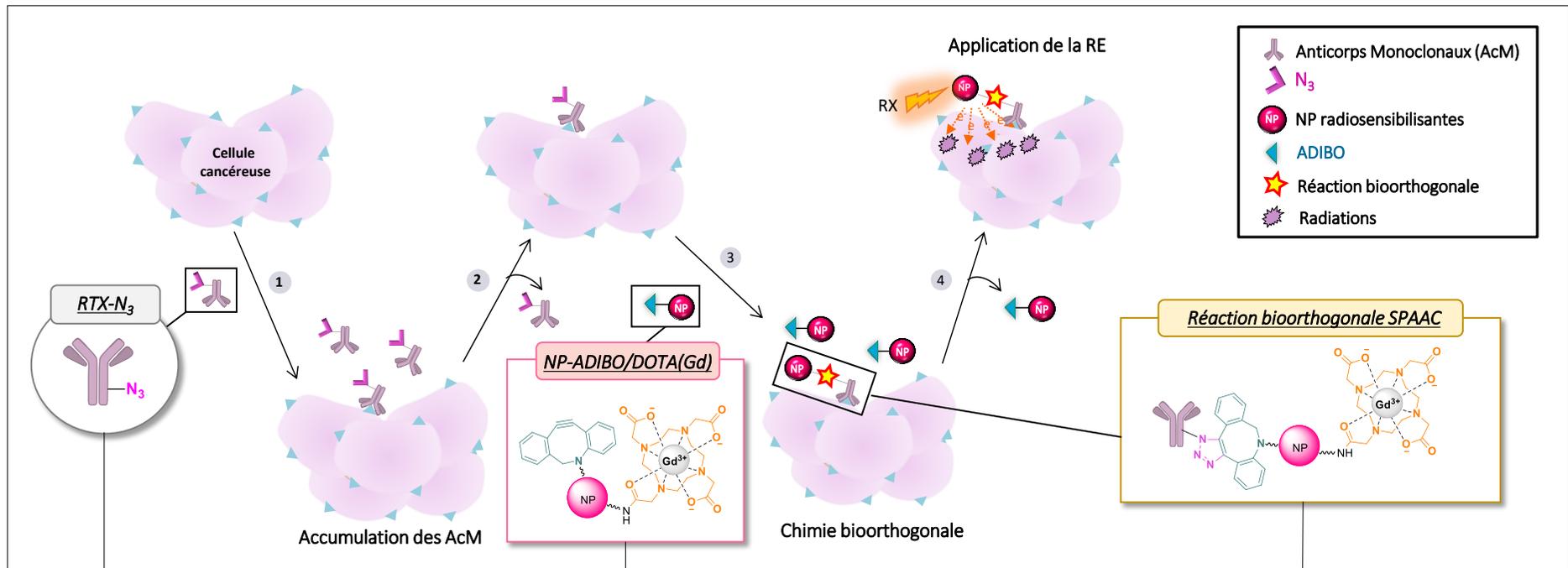


Figure 27 : Stratégie de vectorisation de NP de silice par immunoprécipitation médié par la chimie bioorthogonale de type SPAAC, suivi d'une irradiation par RE.

Partie 3. Résultats et Discussion

Chapitre 1. Conception des NP radiosensibilisantes à base de gadolinium : NP-ADIBO/DOТА(Gd)

Le premier objectif de cette thèse a consisté à fonctionnaliser la surface de NP de silice possédant un cœur fluorescent de rhodamine B ($\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 582 \text{ nm}$ dans l'eau) par des entités bioorthogonales de type ADIBO et des macrocycles azotés de type DOТА pouvant complexer les ions Gd^{3+} (Figure 28). Pour cela, nous avons utilisé une méthode de synthèse supportée d'oligonucléotides basée sur la chimie dite « aux phosphoramidites » employée pour la modification de surface des NP.

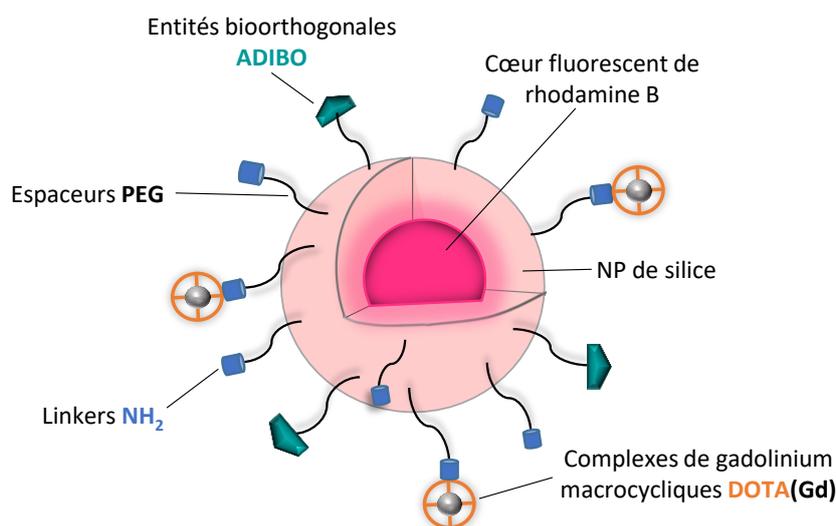


Figure 28 : Structure schématique d'une NP de silice fluorescente à base de rhodamine fonctionnalisée en surface par des entités bioorthogonales de type ADIBO et des complexes de gadolinium macrocycliques DOТА(Gd).

I. Synthèse supportée automatisée d'oligonucléotides appliquée à la fonctionnalisation de surface des NP de silice

De nombreuses approches sont continuellement développées pour permettre la préparation de NP comportant une grande diversité de fonctions chimiques et biologiques. Les stratégies de fonctionnalisation employées doivent répondre à des critères importants tels que des méthodes simples procurant de bons rendements de greffage, reproductibles et nécessitant peu d'étapes de synthèse et de purification. C'est dans ce contexte que la synthèse supportée automatisée classiquement utilisée pour les oligonucléotides fut appliquée à la fonctionnalisation de surface des NP de silice dans l'équipe de Carole Chaix [224]. Des études antérieures réalisées au sein du groupe (Interfaces et Biocapteurs de l'Institut des Sciences Analytiques de Villeurbanne) ont démontré que cette stratégie de synthèse supportée pouvait être transposable à la fonctionnalisation de NP de silice par des oligonucléotides [224] faisant l'objet d'un brevet en 2012 [223] ; mais aussi par des fonctions chimiques et biologiques pour des applications biomédicales [225,226].

Cette méthode a notamment permis de développer des NP de silice fonctionnalisées en surface par des molécules complexantes de type diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA), qui permettent à la fois l'incorporation d'une protéine thérapeutique, le G-CSF, pour la stimulation de cellules immunitaires, et la fixation d'un radionucléide tel que l'indium-111 pour des études de biodistribution (**Figure 29**).

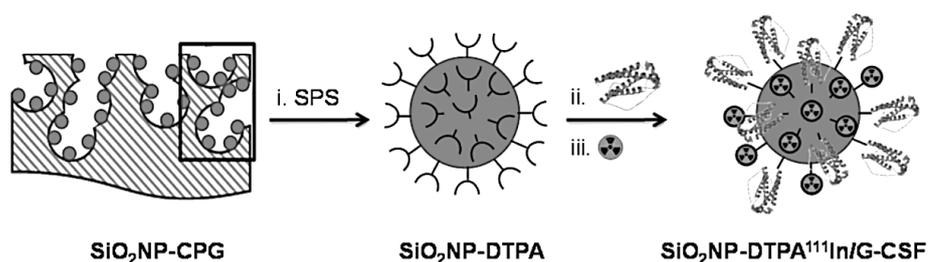


Figure 29 : Synthèse sur phase solide (SPS) de NP de silice fluorescentes fonctionnalisées par une protéine G-CSF couplée en solution sur les DTPA pour une application en immunostimulation [225,226].

La synthèse utilisée est dite supportée puisqu'elle utilise un support constitué de billes micrométriques de verre à porosité contrôlée, appelée *Controlled Pore Glass (CPG)*, à l'intérieur et à la surface desquelles les NP vont être immobilisées de manière réversible (**Figure 30**, ①). L'obtention de ce support, que l'on appellera **CPG-NP**, permet de fonctionnaliser de manière efficace la surface des NP par de nombreuses fonctions chimiques et molécules (entités chélatantes, fluorophores, ligands) autres que les nucléotides classiquement utilisés. Les différentes fonctions sont incorporées selon la chimie dite « aux phosphoramidites » et grâce à un synthétiseur d'oligonucléotides (②). Les NP souhaitées sont ensuite décrochées de ce support dans des conditions basiques (DBU 0,1M) (③), laissant l'opportunité de pouvoir les modifier également une fois en suspension.

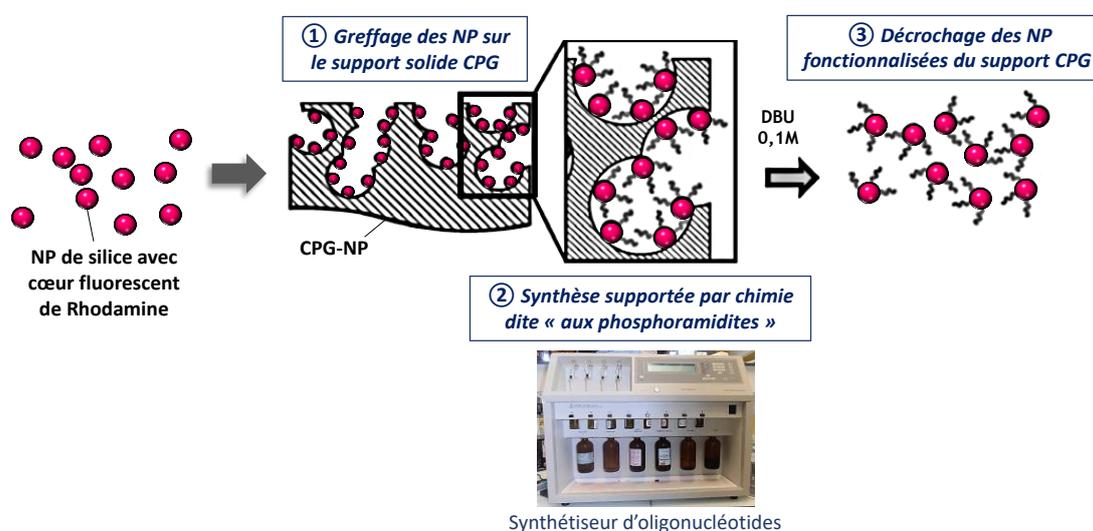


Figure 30 : Stratégie de synthèse supportée automatisée appliquée aux NP de silice.

Dans le cadre de ce projet doctoral, nous souhaitons appliquer cette méthode efficace de synthèse supportée pour le développement de NP thérapeutiques radiosensibilisantes. Ces NP seront fonctionnalisées dans un premier temps par des entités de chimie bioorthogonale de type ADIBO (notées **NP-ADIBO/NH₂**) puis par des macrocycles azotés de type DOTA qui permettront de chélater les ions Gd³⁺ (notées **NP-ADIBO/DOТА(Gd)**). Les différentes étapes effectuées pour l'obtention des NP-ADIBO/DOТА(Gd) sont données en **Figure 31** et comprennent deux grandes parties basées sur la méthode précédemment décrite :

(1) La fonctionnalisation de surface des NP par synthèse supportée, comprenant :

- ① La préparation du support CPG-NP, c'est-à-dire le greffage préalable des NP de silice sur le support solide CPG.
- ② La synthèse supportée automatisée des NP-ADIBO/NH₂ par chimie dite « aux phosphoramidites » grâce à un synthétiseur d'oligonucléotides, avec des fonctions ADIBO impliquées dans la reconnaissance avec l'anticorps, et des fonctions NH₂ jouant le rôle de linkers pour l'incorporation des macrocycles de type DOTA.
- ③ La synthèse supportée des NP-ADIBO/DOТА *via* le couplage des DOTA sur les amines primaires libres des NP encore fixées sur le support CPG.

(2) La complexation du gadolinium par les ligands macrocycliques DOТА, comprenant :

- ④ Le décrochage en milieu basique (DBU 0,1M) des **NP-ADIBO/DOТА** du support CPG.
- ⑤ La synthèse des NP-ADIBO/DOТА(Gd) par complexation des atomes lourds de gadolinium au sein des ligands DOТА.

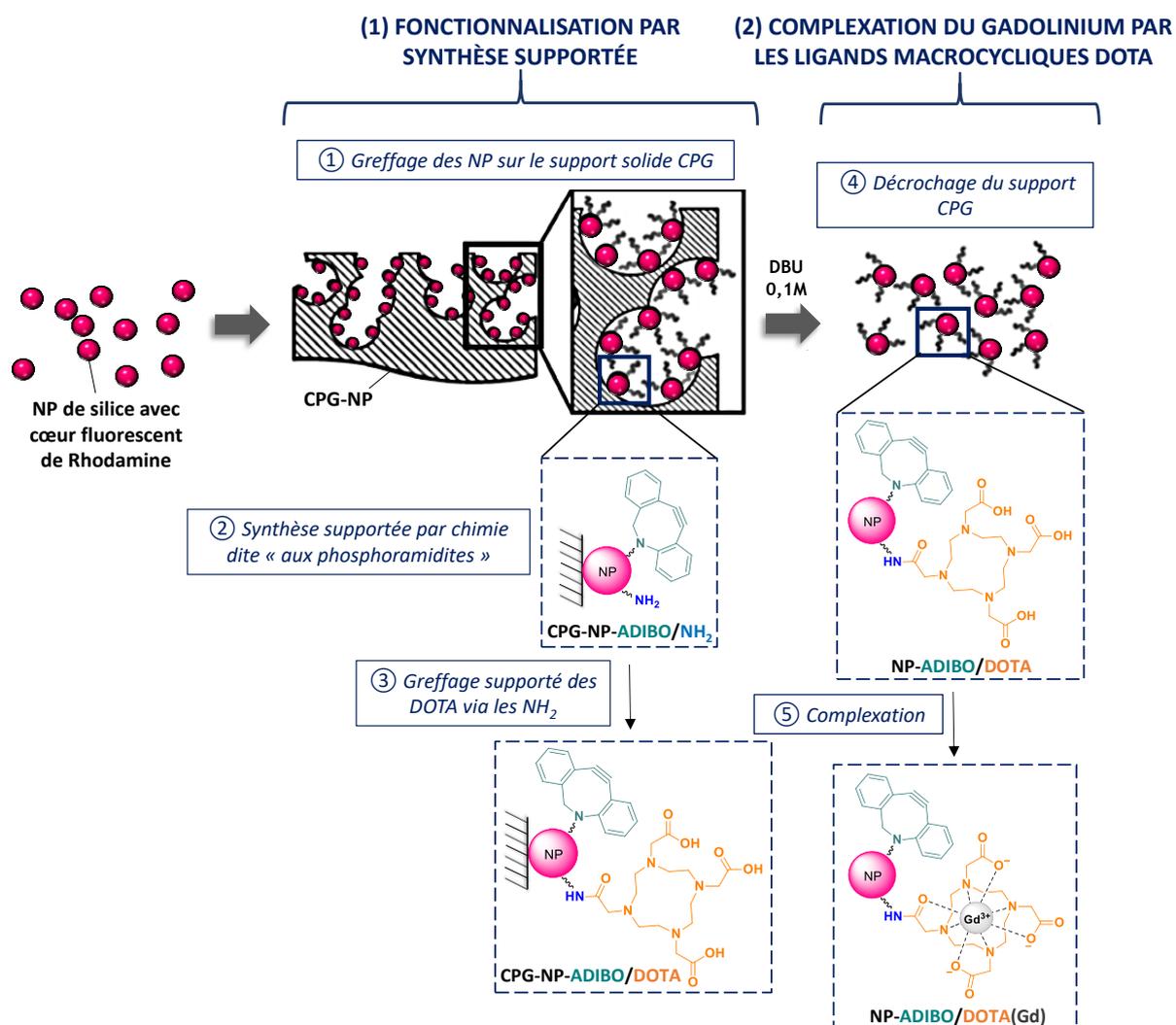


Figure 31 : Schéma de synthèse des NP-ADIBO/DOTA(Gd). 1) Immobilisation des NP de silice sur le support CPG ; 2) Fonctionnalisation des NP via la chimie dite « aux phosphoramidites » par synthèse supportée automatisée pour l'obtention des NP-ADIBO/NH₂ ; 3) Greffage supporté de l'entité chélatante DOTA via les amines (NP-ADIBO/DOTA) ; 4) Décrochage des NP-ADIBO/DOTA du support CPG ; 5) Complexation des ions Gd³⁺.

Toutes les étapes menant à ces NP sont présentées plus en détails dans la suite de ce chapitre. Dans une première partie, la fonctionnalisation de surface des NP par synthèse supportée sera abordée. Elle présentera de manière plus précise les étapes de préparation du support **CPG-NP**, la chimie dite « aux phosphoramidites » utilisée pour l'obtention des **NP-ADIBO/NH₂** ainsi que les différentes stratégies mises en place pour le greffage supporté des DOTA *via* les amines des NP. L'incorporation du gadolinium sur les NP sera détaillée dans une dernière partie.

II. Synthèse supportée automatisée des NP-ADIBO/NH₂ par la chimie dite « aux phosphoramidites »

1. Préparation du support solide CPG-NP

La méthode de synthèse supportée nécessite dans un premier temps de greffer les NP de façon covalente et réversible sur le support solide CPG (**CPG-NP**). Pour cela, des modifications chimiques sont apportées à la fois au niveau des NP, avec l'ajout de groupements silanique porteurs de fonctions hydroxyle (**NP-TESPHU**), et sur le support solide lui-même, avec des fonctions acide carboxylique (**CPG-Q-linker**). Le greffage des NP sur le support est réalisé par formation d'une liaison ester, clivable en milieu basique (**Figure 32**).

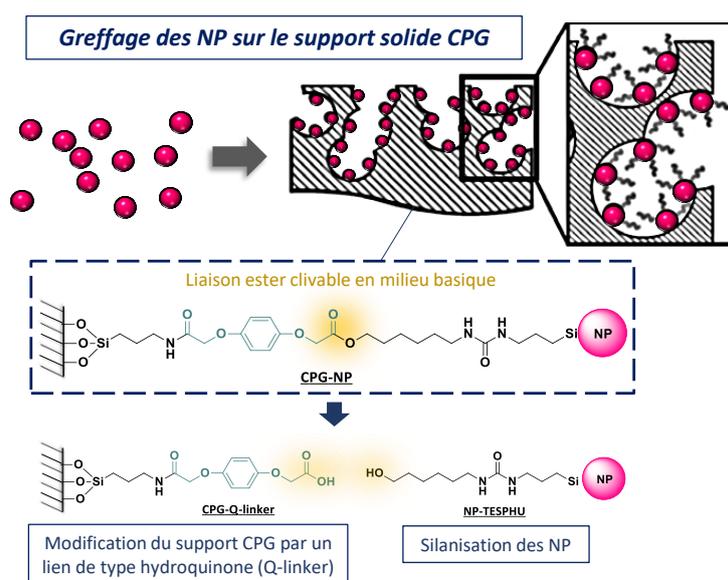


Figure 32 : Représentation schématique de la stratégie de greffage des NP de silice sur le support solide CPG.

1.1 Fonctionnalisation du support CPG (CPG-Q-linker)

Les synthèses supportées d'acides nucléiques ont été développées sur plusieurs types de support. Parmi ceux classiquement utilisés il est possible de trouver des matrices polymères à base de polystyrène et des supports à base de verre à porosité contrôlée (CPG : « Controlled Pore Glass ») que nous utilisons dans le cadre de notre approche pour greffer les NP. Ces derniers supports sont compatibles avec n'importe quels solvants et réactifs et restent stables dans des conditions de température et de pression élevées. La CPG est très utilisée en synthèse d'oligonucléotides puisqu'elle présente des caractéristiques intéressantes telles qu'une surface facilement fonctionnalisable ainsi qu'une porosité qui peut être choisie en fonction de la taille des oligonucléotides à synthétiser. Pour notre application, la surface spécifique élevée de la CPG (allant de 5 à 80 m²/g) va nous permettre d'immobiliser un nombre important de NP par gramme de support.

Les pores possèdent généralement une taille comprise entre 50 et 300 nm. Dans notre cas, nous utilisons une CPG dont la taille des pores est de 300 nm. Ainsi, le principal avantage à utiliser ce support micrométrique pour la fonctionnalisation des NP est qu'il permet d'ancrer de manière efficace les NP à l'intérieur des pores pour les protéger des mécanismes de friction engendrés lors de la synthèse.

Pour la synthèse d'oligonucléotides classique, le support est généralement fonctionnalisé par un lien succinyle présentant l'avantage de pouvoir être rompu lors de la dernière étape du cycle pour libérer l'oligonucléotide par un traitement ammoniacal. Ce lien est introduit en faisant réagir les fonctions hydroxyle présentes à la surface du support avec le dérivé silylé $\text{EtO}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, dont les amines peuvent ensuite réagir avec le premier nucléoside (**Figure 33**).

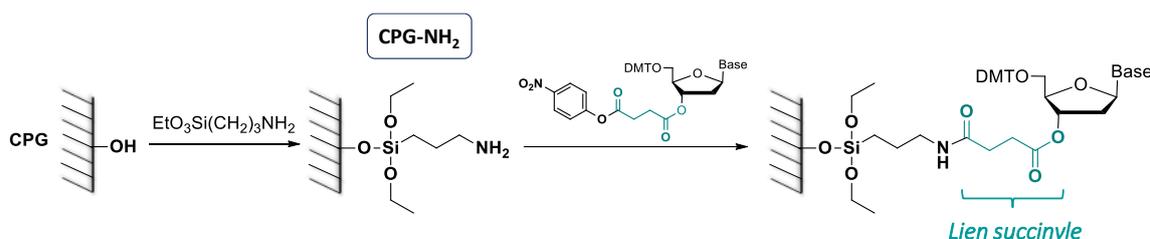


Figure 33 : Fonctionnalisation d'un support solide utilisé pour la synthèse d'oligonucléotides.

Cependant, les travaux préliminaires menés durant la thèse de Gabriel De Crozals [227] ont montré que les NP de silice se dégradent dans les conditions classiques de décrochage en présence d'ammoniaque concentrée, par hydrolyse progressive de la matrice de silice très sensible aux acides et bases fortes. Un autre lien, de type hydroquinone (**Q-linker**) (**Figure 34**), a donc été incorporé à la surface du support CPG afin d'effectuer la phase de décrochage des particules dans des conditions plus douces et plus rapides d'hydrolyse basique. En effet, l'introduction de ce lien ester s'est révélée primordiale pour garder l'aspect intact des NP et pour permettre leur fonctionnalisation de surface une fois en suspension.

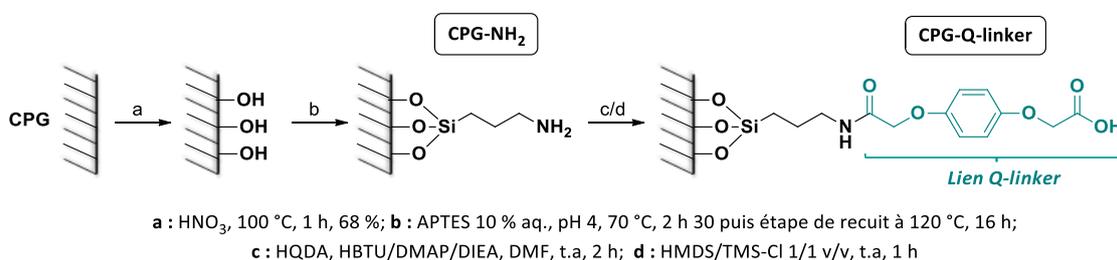


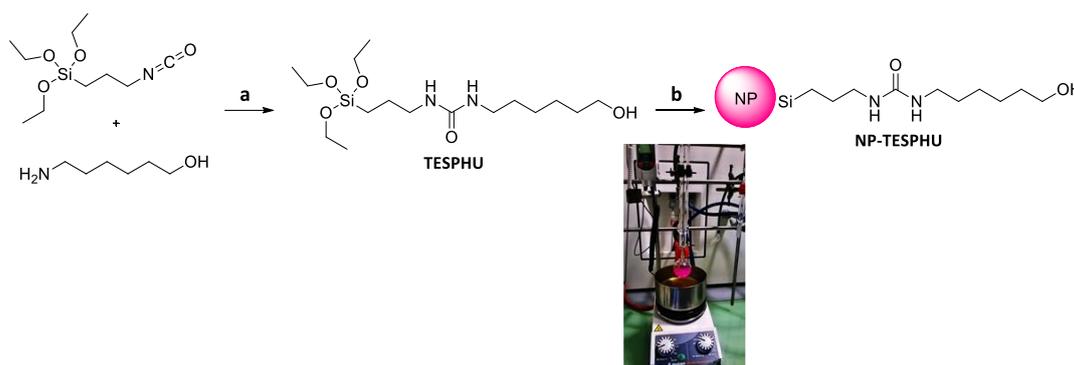
Figure 34 : Fonctionnalisation du support CPG par un lien Q-linker.

L'obtention du **CPG-Q-linker** comprend une première étape d'activation des fonctions silanol grâce à un traitement en milieu acide concentré permettant ensuite la silanisation du support dans une solution d'APTES (**Figure 34**). Les supports CPG obtenus subissent une étape de recuit en étant placés dans un four à 120°C pendant une nuit pour stabiliser les silanes préalablement greffés.

Le support **CPG-NH₂** résultant est ensuite fonctionnalisé par le **Q-linker** en faisant réagir la HQDA avec les amines du support dans des conditions basiques classiquement utilisées pour le couplage peptidique sur phase solide (HBTU, DMAP et DIEA). Après greffage du Q-linker (**CPG-Q-linker**), une dernière étape de capping avant le greffage des NP permet de protéger les fonctions silanol et les amines résiduelles du support avec des groupements triméthylsilyles (HMDS et TMS-Cl, respectivement) afin de limiter les réactions secondaires pendant la phase de synthèse automatisée.

1.2 Silanisation des NP (**NP-TESPHU**)

Parallèlement, les NP de silice sont silanisées par une urée de type hydroxysilane (**TESPHU**) préalablement synthétisée par réaction du 6-amino-1-hexanol et du 3-(triéthoxysilyl)propyl isocyanate dans l'isopropanol à température ambiante pendant 30 min (**Figure 35**).



a : Isopropanol, t.a, 30 min; b : NP-OH, Bissilane 5 %, TEA, DMF, 120 °C, 16 h.

Figure 35 : Silanisation des NP par un espaceur de type TESPHU.

La quantité de TESPHU à synthétiser (95 éq.) est déterminée par rapport au nombre de fonctions silanol présentes à la surface du nombre total de NP en suspension (**Tableau 10**). Elle est déterminée d'après différents paramètres dont :

- **Masse totale des NP** : $m_{NP} = V_{sphère} \times \rho \times N_{NP}$
- **Surface totale des NP** : $S_{NP} = S_{sphère} \times N_{NP}$
- **Nombre de fonctions silanol en surface** : $N_{SiOH} = N_{SiOH/mm^2} \times S_{NP}$

Avec : $V_{sphère}$: volume d'une sphère ($= 4/3\pi \times r^3$; en nm^3), $S_{sphère}$: surface d'une sphère ($= 4\pi \times r^2$; en nm^2), ρ : masse volumique d'une NP (en $g.cm^{-3}$), N_{NP} : nombre de NP, N_{SiOH/mm^2} : nombre de fonctions silanol par mm^2 .

Concentration de la solution de NP (NP.mL ⁻¹) :	6,27.10 ¹³
Volume de la solution de NP (mL) :	8
Nombre de NP :	5,02.10 ¹⁴
Rayon d'une NP (nm) :	30,5
Masse volumique d'une NP (g.cm ⁻³) :	1,75
Masse totale de NP (mg) :	104,32
Surface totale des NP (nm²) :	5,86.10 ¹⁸
Nombre de fonctions silanol par nm ² :	4,5
Nombre de fonctions silanol en surface :	2,64.10 ¹⁹
Quantité en mole de fonctions silanol (mol) :	4,38.10 ⁻⁵
Nombre d'équivalents de TESPBU :	95
Quantité en mole de TESPBU nécessaire (mmol) :	4,16

Tableau 10 : Calcul de la quantité de TESPBU à synthétiser pour la silanisation des NP de silice.

La silanisation des NP par le bras espaceur TESPBU est réalisée dans le *N,N*-diméthylformamide en présence de bissilane 5 %, qui permet de réduire la dégradation de la surface des NP de silice par les ions hydroxydes, et de triéthylamine à 120 °C pendant une nuit. Les **NP-TESPBU** obtenues doivent être suffisamment silanisées afin d'assurer ensuite un bon recouvrement du support CPG.

1.3 Greffage des NP sur le support CPG (CPG-NP)

L'étape de greffage des NP sur le support CPG nécessite une activation des acides carboxyliques des bras espaceurs **Q-linker** en présence de HBTU, DMAP, DIEA dans l'acétonitrile pendant 3 h. La solution de NP de silice (13 mg/mL) est ensuite ajoutée goutte-à-goutte sur le support dans le *N,N*-diméthylformamide puis laissée sous agitation pendant 16 h à température ambiante. Enfin, une étape de capping des acides carboxyliques activés résiduels du support CPG est effectuée par traitement à la pipéridine 10 % pendant 1 h à température ambiante afin de s'affranchir des éventuelles réactions secondaires avec les phosphoramidites lors de la synthèse supportée automatisée (**Figure 36**).

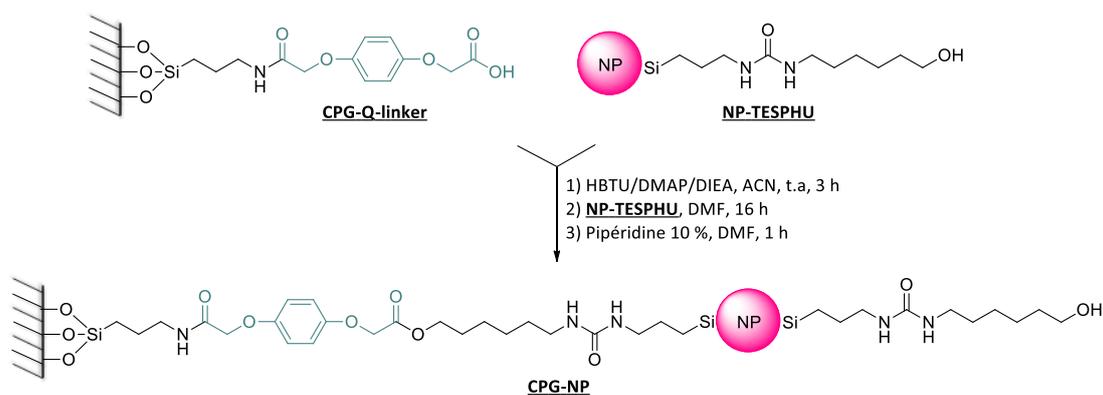


Figure 36 : Greffage des NP sur le support CPG.

Le nombre de NP immobilisées sur le support CPG correspond à la différence entre la concentration en NP-TESPHU mise en réaction au départ et la concentration restante après le greffage. La concentration restante en NP est déterminée en mesurant l'absorbance de la suspension au spectrophotomètre UV-visible à 554 nm (longueur d'onde maximum de l'absorption de la rhodamine dans le *N,N*-diméthylformamide). La valeur d'absorbance obtenue permet d'en déduire la concentration restante en NP après greffage grâce à une courbe d'étalonnage tracée en fonction de différentes concentrations en NP dans le *N,N*-diméthylformamide (cf. Partie Expérimentale). Finalement, 43 % des NP ont pu être greffées sur le support CPG, représentant $2,0 \cdot 10^{14}$ NP/g de support. Par ailleurs, l'efficacité du greffage des NP au sein des pores CPG a également été mise en évidence par microscopie électronique à balayage (MEB) (Figure 37).

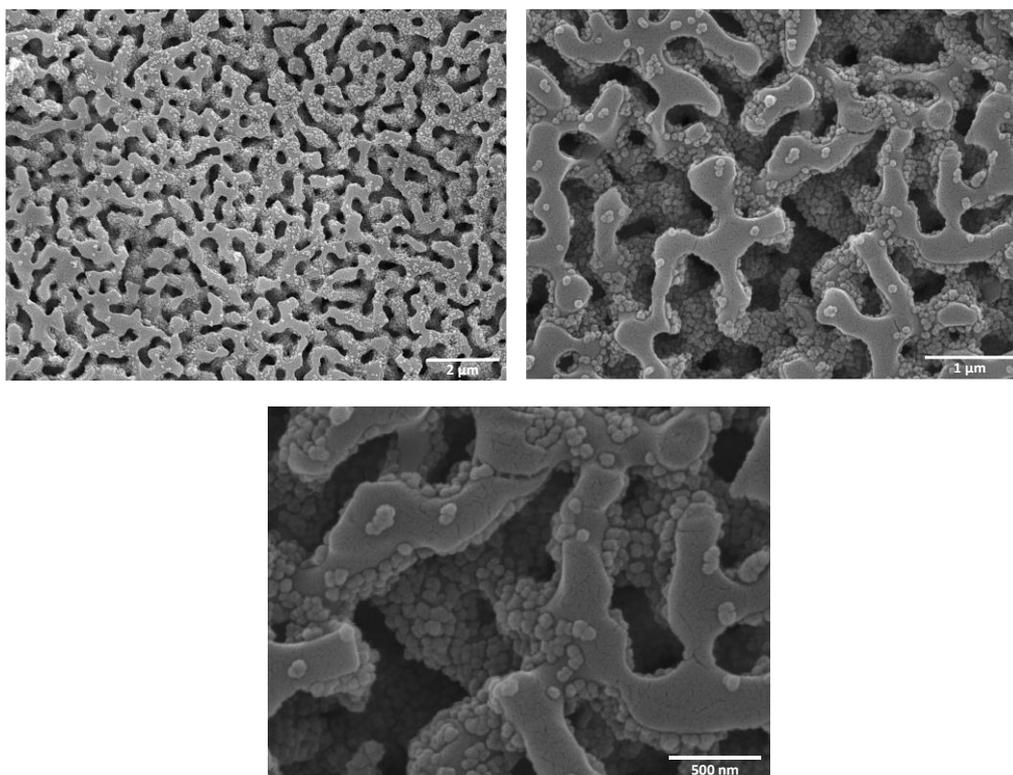


Figure 37 : Observation du support CPG par microscopie électronique à balayage après greffage des NP.

2. Synthèse supportée automatisée des NP-ADIBO/NH₂

La synthèse supportée automatisée a été développée au début des années 80. Elle représente actuellement le procédé de synthèse couramment employé pour la conception de peptides et d'oligonucléotides du fait de l'obtention de meilleurs rendements de couplage par rapport à la synthèse en solution. L'utilisation d'un support va permettre de faciliter l'étape de purification du produit synthétisé, celui-ci pourra aisément être séparé des excès de réactifs et des solvants du milieu réactionnel. Pour rappel, le but ici est d'appliquer cette méthode de synthèse supportée pour greffer les fonctions d'intérêt à la surface des NP selon la chimie dite « aux phosphoramidites » et grâce à un synthétiseur automatisé.

2.1 La chimie dite « aux phosphoramidites »

Par cette méthode, nous avons entrepris de fonctionnaliser les NP par 1) les entités bioorthogonales ADIBO impliquées dans la reconnaissance avec l'anticorps modifié, et 2) les linkers amines (NH₂) qui permettront de lier par la suite les macrocycles DOTA. Nous avons également décidé de séparer ces deux fonctions d'intérêt des NP par deux espaceurs de type polyéthylène glycol (PEG) possédant chacun une longueur de trois unités oligomériques (PEG₃) (**Figure 38**).

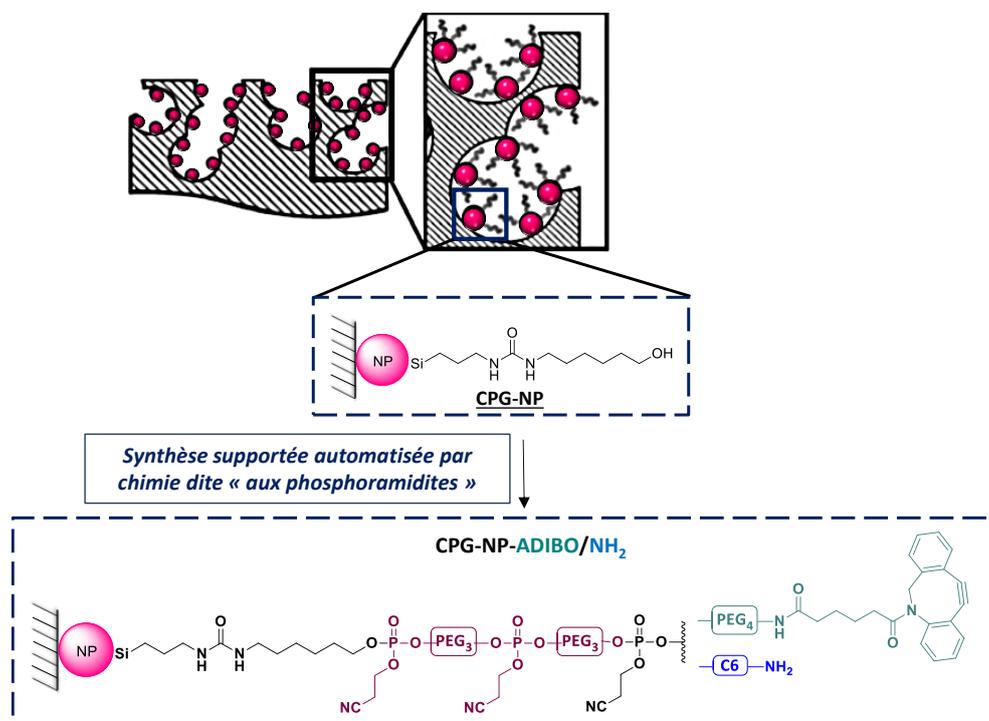


Figure 38 : Structure chimique détaillée des NP-ADIBO/NH₂ conçue par synthèse supportée automatisée.

a. Nature des synthons phosphoramidites utilisés

Les temps de couplage plus rapides et les rendements plus élevés obtenus *via* l'approche des phosphoramidites, en font la méthode de synthèse supportée la plus utilisée à l'heure actuelle. En effet, les synthons utilisés possèdent des fonctions phosphoramidite constituées d'un phosphore très réactif, au degré d'oxydation (+III), permettant de les coupler de manière plus rapide et efficace. Les fonctions hydroxyle et amine seront respectivement protégées par des groupements protecteurs de type 4,4'-diméthoxytrityles (DMT) et 4-monométhoxytrityles (MMT) (**Figure 39**).

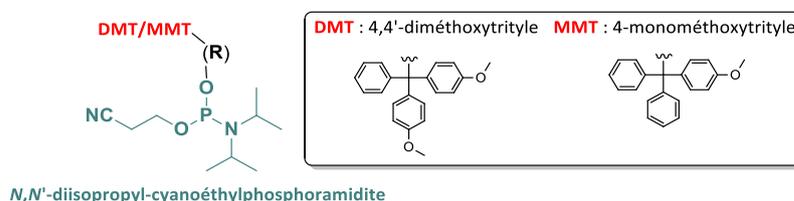


Figure 39 : Structure générale des synthons phosphoramidites utilisés.

Pour la fonctionnalisation de nos NP de silice, trois types de synthons phosphoramidite commerciaux ont été utilisés : le triéthylène glycol (PEG₃), l'aminohexyl (NH₂) et l'azadibenzocyclooctyne (ADIBO). Les fonctions hydroxyle des dérivés PEG₃ et NH₂ sont respectivement protégés par les groupements protecteurs DMT et MMT, alors que l'ADIBO n'en possède pas (**Figure 40**).

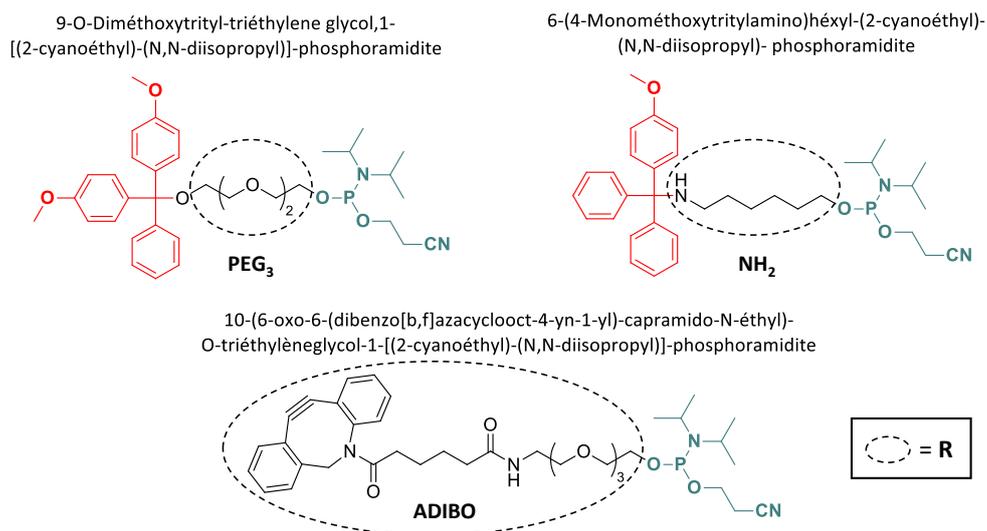


Figure 40 : Structure des phosphoramidites utilisés pour la fonctionnalisation des NP.

Avant d'incorporer le phosphoramidite ADIBO par synthèse supportée sur nos NP, nous avons voulu vérifier qu'il résistait aux conditions de décrochage des NP du support CPG. En effet, la libération des NP du support CPG est une étape importante dans l'obtention des particules fonctionnalisées souhaitées. Il est possible que les conditions utilisées dégradent certaines fonctions chimiques.

Dans notre cas, ce sont les fonctions ADIBO incorporées sur les NP qui sont potentiellement les plus sensibles. Un test de stabilité a donc été réalisé sur 24 h, non pas avec le synthon ADIBO, les phosphoramidites étant coûteux et peu stables à l'air libre, mais avec un ADIBO-PEG₅-COOH commercial dont la structure est similaire. L'analyse HRMS a permis de confirmer la stabilité de cette molécule en milieu basique (DBU 0,1M) : masse attendue [M+H]⁺ pour C₃₂H₄₁N₂O₈ de 581,2857 ; mesurée 581,2850 au bout de 24 h (**Figure 41**).

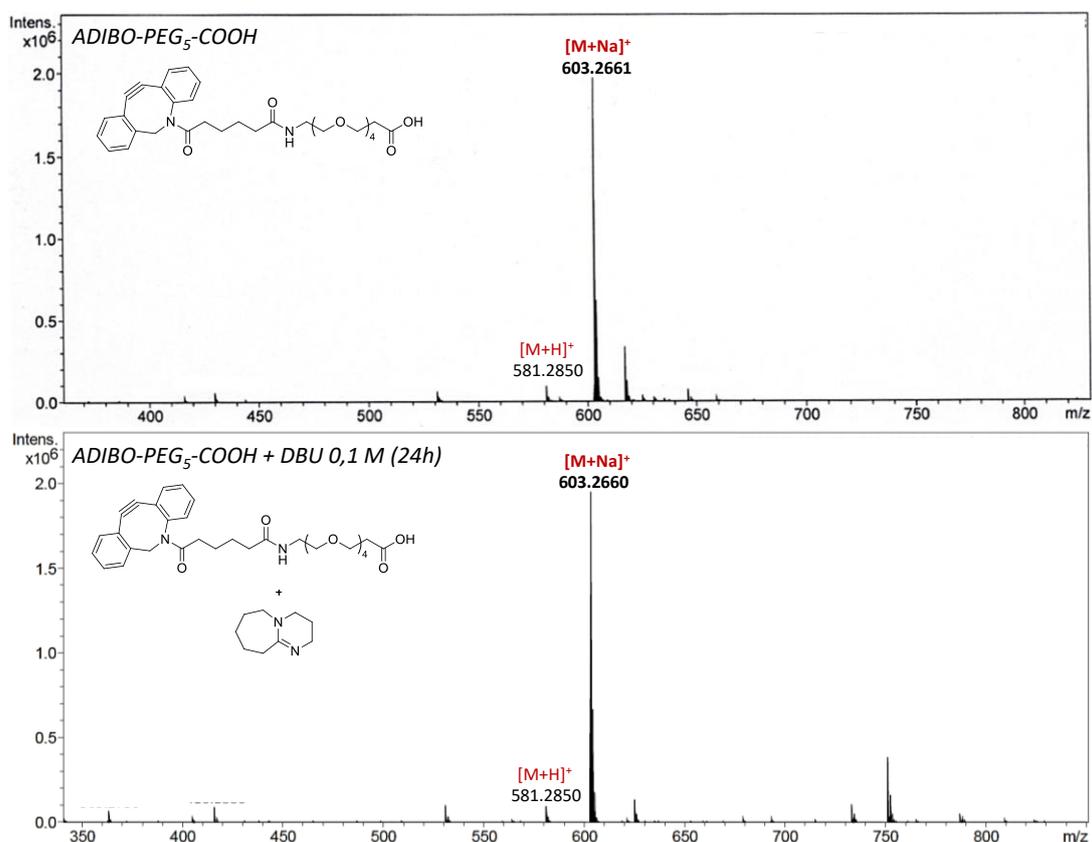


Figure 41 : Spectre de masse de l'ADIBO-PEG₅-COOH au bout de 24 h dans une solution de DBU 0,1 M.

b. Le cycle de synthèse

Le cycle de synthèse tel qu'il est effectué par le synthétiseur automatisé pour la fonctionnalisation des NP de silice par les synthons phosphoramidite repose sur quatre grandes étapes détaillées précisément ci-dessous (**Figure 42**). Nous avons pris l'exemple de l'incorporation d'un phosphoramidite possédant une extrémité hydroxyle protégée par un DMT, ce qui correspond dans notre cas à l'espaceur triéthylène glycol (PEG₃). Par souci de clarté, la structure du motif PEG₃ n'est pas représentée et correspond à « R » sur notre schéma.

② Couplage

Une fois le groupement protecteur DMT éliminé, la fonction hydroxyle libre du phosphoramidite lié au support solide est alors capable de réagir avec le synthon phosphoramidite suivant. Cette étape est catalysée grâce à l'utilisation du tétrazole permettant de protoner le groupement diisopropylamino du second groupement phosphoramidite à incorporer. Cette protonation permet ainsi l'attaque nucléophile du groupement hydroxyle du résidu n-1 déjà lié au support solide. Cette réaction génère finalement une liaison phosphite triester entre les deux synthons et conduit à la production de diisopropylamine (**Figure 44**). Les rendements de couplages effectués dans ces conditions sont en général de l'ordre de 98 %.

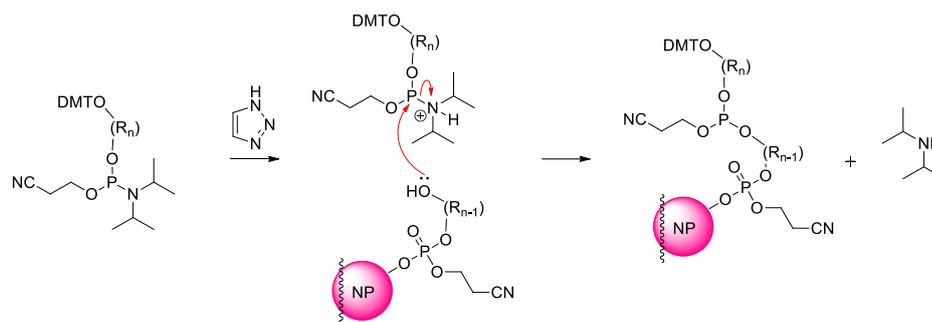


Figure 44 : Mécanisme réactionnel de couplage des phosphoramidites.

③ Capping

L'étape de capping permet de bloquer l'extrémité hydroxyle des phosphoramidites liés au support solide qui n'auraient pas réagi. S'ils ne sont pas bloqués, ces fonctions hydroxyle seront aptes à réagir au cours du prochain cycle et entraîneront donc la formation de séquences avec des synthons manquants. Pour cela, l'anhydride phénoxyacétique et le *N*-méthylimidazole réagissent pour former un intermédiaire capable d'acétyle la position hydroxyle du phosphoramidite lié au support solide (**Figure 45**). Cette acétylation est réalisée dans un mélange THF/pyridine, la pyridine permettant de maintenir un pH basique pour empêcher la détritulation du phosphoramidite qui pourrait avoir lieu en présence d'acide phénoxyacétique libre.

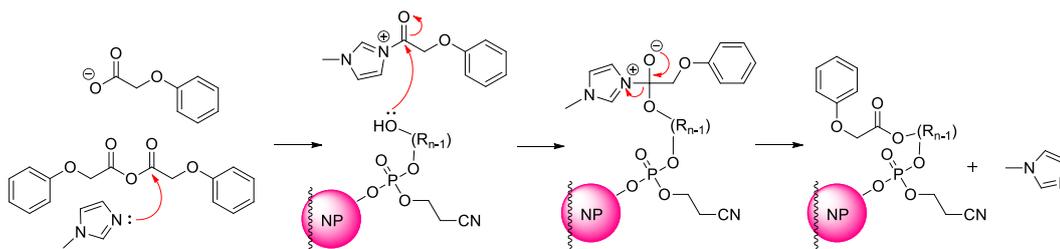


Figure 45 : Mécanisme réactionnel de l'étape de capping.

④ Oxydation

Le phosphite triester formé lors de la réaction de couplage est instable et doit par conséquent être converti en une espèce phosphore plus stable avant le début du cycle suivant. L'oxydation permet de convertir le phosphite triester (Phosphore +III) en phosphate triester penta-coordonné stable (Phosphore +V). L'oxydation est réalisée en présence d'iode et d'eau en solution dans la pyridine et le THF (**Figure 46**).

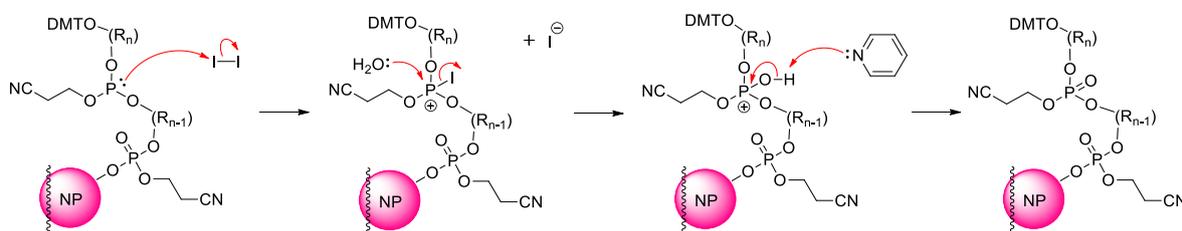


Figure 46 : Mécanisme réactionnel d'oxydation.

A la fin de cette étape, une nouvelle détritulation est engagée et permet soit : 1) de coupler le phosphoramidite suivant ou bien 2) de terminer le cycle de synthèse en éliminant le groupement protecteur du dernier phosphoramidite incorporé afin qu'il puisse être engagé dans d'autres réactions (supportées ou non).

Le cycle de synthèse est assuré par le synthétiseur d'oligonucléotides automatisé sur lequel sont introduits les colonnes de synthèse contenant le support **CPG-NP** préalablement préparé ainsi que les bouteilles des différents réactifs et solvants (**Figure 47**). Des colonnes de 1 μmol comportant 45-50 mg de **CPG-NP** ont été utilisées et permettent de confiner le support entre deux filtres comme le montre la **Figure 48**. Il existe différents formats de colonne (40 nmol, 200 nmol, 1 μmol et 10 μmol) utilisés en fonction de la capacité de synthèse souhaitée en surface du support.



Figure 47 : Synthétiseur à oligonucléotides utilisé pour la fonctionnalisation des NP de silice.

Les différentes solutions de réactifs telles que l'acide trichloroacétique (détritylation), le tétrazole (couplage), l'anhydride phénoxyacétique, *N*-méthylimidazole (capping), l'iode (oxydation) nécessaires à l'enchaînement des différentes étapes du cycle ainsi que les colonnes sont ainsi chargées sur le synthétiseur (**Figure 47**).

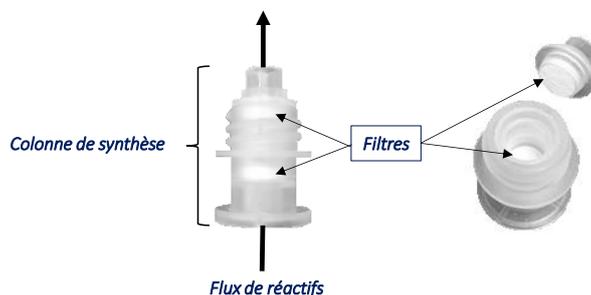


Figure 48 : Colonne utilisée pour la synthèse supportée.

La programmation en amont du synthétiseur, avec un cycle et une séquence prédéfinie, permet d'injecter les réactifs et les solvants du bas vers le haut de la colonne et d'incorporer les différents synthons phosphoramidite. Ce type de synthèse est réalisé en circuit fermé sous atmosphère inerte (sous argon), afin de travailler avec des réactifs et des solvants possédant un très faible taux d'humidité et assurant ainsi de bons rendements de synthèse. De plus, l'élimination des réactifs ainsi que le lavage du support solide entre chacune des étapes du cycle, sont réalisés grâce au passage de solvants (« washing ») et de courant d'argon (« flush »).

Dans un premier temps, deux cycles de synthèse sont réalisés et permettent de fonctionnaliser successivement les NP par les deux espaceurs triéthylène glycol (PEG₃) ; puis un dernier cycle permet d'incorporer de façon simultanée le linker NH₂ et l'entité bioorthogonale ADIBO (**Figure 49**). Les temps de couplage optimum de ces synthons phosphoramidite sont donnés par le fournisseur et sont respectivement de 120, 60 et 600 secondes pour le PEG₃, l'amine et l'ADIBO. Ces temps sont adaptés en regard des réactivités variables de chaque phosphoramidite utilisé à une concentration de 0,1 M dans l'acétonitrile anhydre. Une concentration effective deux fois moins élevée en amine (0,05 M) a été utilisée afin d'assurer un greffage optimale des fonction ADIBO en surface des NP. Nous avons aussi effectué un double passage de tétrazole mais également de ces phosphoramidites pour éviter leur dégradation dans la colonne (cf. Partie expérimentale).

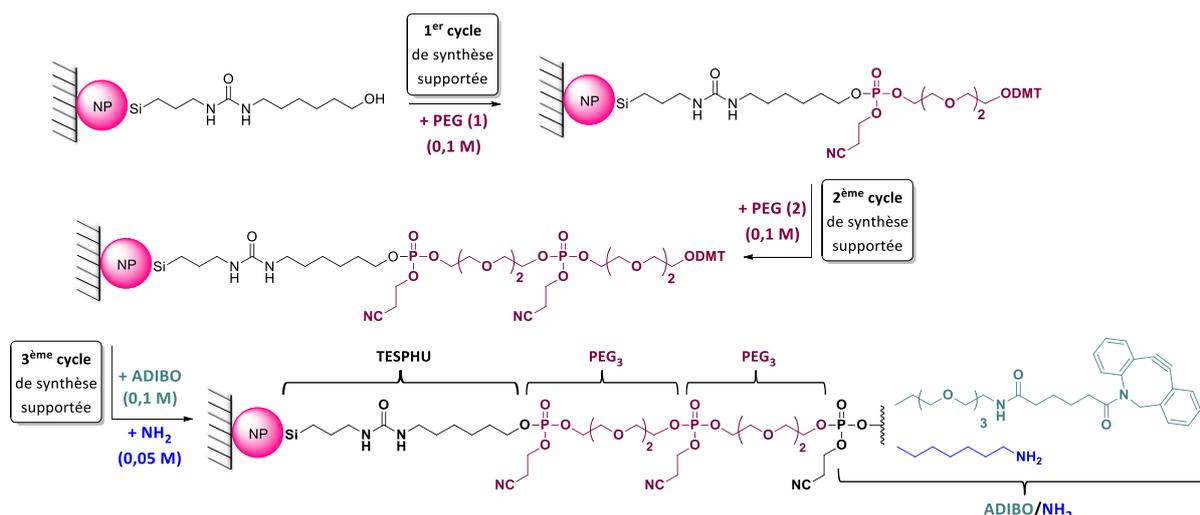


Figure 49 : Incorporation des différents synthons phosphoramidites par synthèse supportée automatisée.

Une fois le cycle de synthèse terminé, il est possible de déterminer la densité de fonctionnalisation X du support solide, c'est-à-dire le nombre de fonctions de surface PEG₃ et NH₂ incorporé par masse de support CPG-NP (en nmol.mg⁻¹). Cette valeur est respectivement calculée à partir de la mesure d'absorbance des cations DMT ($\epsilon_{498\text{nm}} = 70000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et MMT ($\epsilon_{477\text{nm}} = 56000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) libérés lors de l'étape de détrituration de ces phosphoramidites (Équation 1). Cette valeur permet ensuite d'en déduire le rendement couplage pour le dernier PEG₃ (PEG (2)) et l'amine (NH₂) (Tableau 11).

$$\text{Rendement de couplage} = \frac{X_{\text{NH}_2}}{X_{\text{PEG (2)}}} \times 100$$

$$\Rightarrow X_{\text{NH}_2} = \frac{A_{\text{MMT}} \times V_{\text{MMT}}}{\epsilon_{\text{MMT}} \times l \times m_{\text{CPG}}} \quad \Rightarrow X_{\text{PEG (2)}} = \frac{A_{\text{DMT}} \times V_{\text{DMT}}}{\epsilon_{\text{DMT}} \times l \times m_{\text{CPG}}}$$

Équation 1 : Calcul de la densité de fonctionnalisation du support solide et du rendement de couplage par la méthode du dosage des cations DMT ou MMT. Avec : A_{DMT} ou A_{MMT} : absorbance mesurée respectivement à 498 nm ou 477 nm, V_{DMT} ou V_{MMT} : volume total de la solution de DMT ou MMT (en L), ϵ_{DMT} ou ϵ_{MMT} : coefficient d'extinction molaire des cations DMT ou MMT (en L.mol⁻¹.cm⁻¹), l : largeur de la cuve (en cm), m_{CPG} : masse de CPG introduite dans la colonne de synthèse (en g), X_{NH_2} et $X_{\text{PEG (2)}}$: densité de fonctionnalisation du support solide pour l'amine et le dernier PEG incorporé (mol.g⁻¹).

Les couplages de ces synthons phosphoramidite sur plusieurs lots de support CPG-NP ont montré que les synthèses étaient très reproductibles avec des rendements de couplage similaires pour les deux PEG₃ successifs incorporés (96,3 % en moyenne) ainsi que pour l'amine (78,9 % en moyenne). Les densités de fonctionnalisation finales des CPG-NP-ADIBO/NH₂ étaient de $5,91 \pm 0,17 \text{ nmol.mg}^{-1}$ pour le dernier PEG (2) incorporé et de $4,65 \pm 0,21 \text{ nmol.mg}^{-1}$ pour l'amine.

Lots CPG NP-ADIBO/NH ₂	Masse de CPG (mg)	Phosphoramidites incorporés	Absorbance mesurée	X (nmol.mg ⁻¹)	Rendement de couplage (%)
A	47,5	PEG ₃ (1)	2,11	6,35	
		PEG ₃ (2)	2,01	6,05	95
		NH ₂	1,25	4,70	78*
B	47,1	PEG ₃ (1)	1,92	5,82	
		PEG ₃ (2)	1,95	5,91	102
		NH ₂	1,14	4,32	73*
C	45	PEG ₃ (1)	1,99	6,32	
		PEG ₃ (2)	1,85	5,87	93
		NH ₂	1,18	4,68	80*
D	48,1	PEG ₃ (1)	1,98	5,88	
		PEG ₃ (2)	1,97	5,85	99
		NH ₂	1,26	4,68	80*
E	45,1	PEG ₃ (1)	1,89	5,99	
		PEG ₃ (2)	1,89	5,99	100
		NH ₂	1,19	4,71	79*
F	45,6	PEG ₃ (1)	1,95	6,11	
		PEG ₃ (2)	1,91	5,98	98
		NH ₂	1,21	4,74	79*
G	45,4	PEG ₃ (1)	2,03	6,39	
		PEG ₃ (2)	1,87	5,88	92
		NH ₂	1,2	4,72	80*
H	45,8	PEG ₃ (1)	1,98	6,18	
		PEG ₃ (2)	1,83	5,71	92
		NH ₂	1,2	4,68	82*

*Rendement d'incorporation du second synthon (NH₂) estimé par rapport au couplage du 1^{er} synthon (PEG).

Tableau 11 : Densité de fonctionnalisation du support solide CPG et rendements de couplage obtenus suite à la synthèse supportée des NP-ADIBO/NH₂.

c. Caractérisations des NP-ADIBO/NH₂

i. Décrochage et analyse des NP par DLS et MET

Afin de pouvoir caractériser les NP-ADIBO/NH₂ par les méthodes de diffusion dynamique de la lumière (DLS) et microscopie électronique en transmission (MET), elles doivent être en suspension et par conséquent être au préalable décrochées du support CPG. Les NP-ADIBO/NH₂ sont libérées du support grâce à un traitement dans des conditions basiques dites "ultramild", c'est-à-dire utilisant de la DBU 0,1 M dans un mélange équimolaire eau/acétonitrile dans un temps le plus court possible afin de ne pas dégrader les particules de silice. La DBU joue le rôle de base, permettant à la fois d'hydrolyser le lien **Q-linker** qui lie les NP au support solide et d'effectuer la β-élimination du groupe cyanoéthyle pour former la liaison phosphodiester (**Figure 50**).

La surface des **NP-ADIBO/NH₂** qui était en contact avec le support CPG reste alors la seule partie non fonctionnalisée des particules lorsqu'elles sont en suspension.

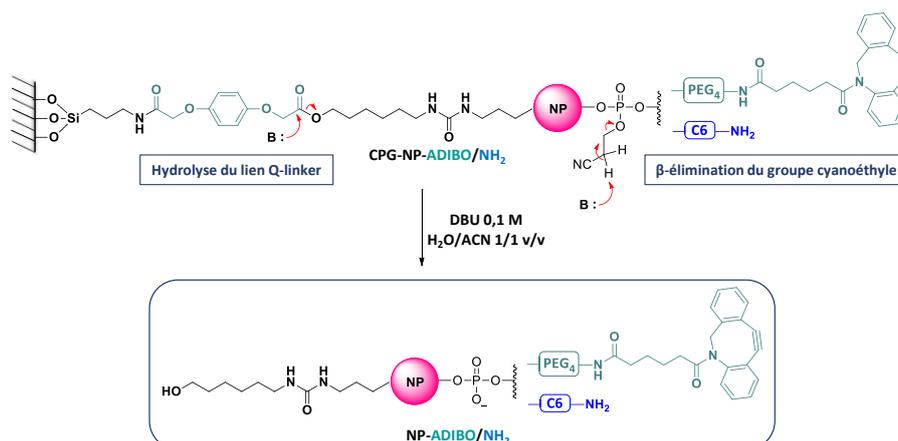


Figure 50 : Mécanisme réactionnel de décrochage des NP du support CPG et formation de la liaison phosphodiester.

La suspension de **NP-ADIBO/NH₂** est agitée à température ambiante et l'avancement de la réaction de décrochage peut être suivi visuellement. En effet, le relargage des NP du support se caractérise par une coloration rose du surnageant alors que le support CPG devient lui de plus en plus blanc (**Figure 51**). Le surnageant rose contenant les **NP-ADIBO/NH₂** en suspension est ensuite prélevé et transféré dans un filtre Amicon 30K afin de purifier les NP par des étapes successives de lavage à l'eau et de centrifugation (5000 G, 10 min). La concentration en **NP-ADIBO/NH₂** est déterminée en mesurant l'absorbance de la rhodamine dans l'eau à 561 nm. La valeur d'absorbance obtenue permet ensuite d'en déduire la concentration en NP.mL⁻¹ grâce à une courbe d'étalonnage tracée en fonction de différentes concentrations en NP dans l'eau (cf. Partie Expérimentale). Après chaque prélèvement du surnageant, la cinétique de décrochage des NP se poursuit par un nouvel ajout de la solution de DBU 0,1 M à la suspension de CPG-NP.

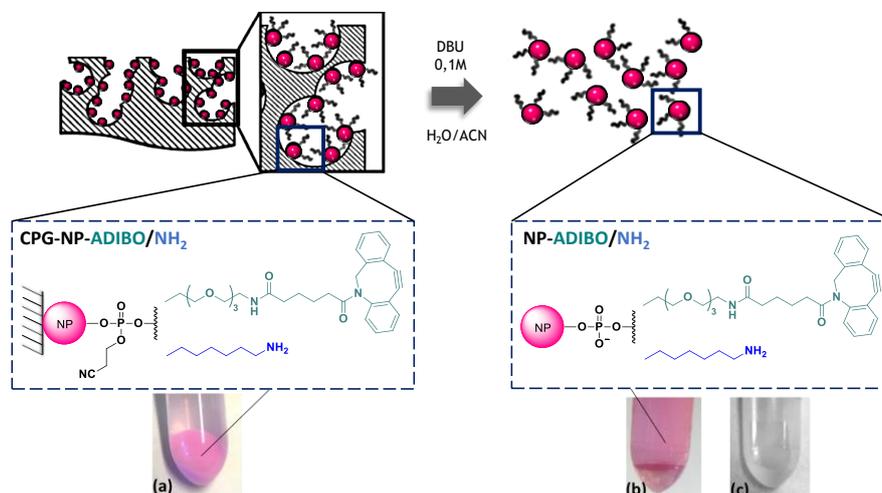


Figure 51 : Décochage des NP du support CPG par traitement en milieu basique DBU 0,1 M. (a) Support CPG rose avant décrochage des NP, (b) relargage en solution des NP après traitement à la DBU 0,1M, (c) Support CPG devenu blanc après décrochage des NP.

La quasi-totalité des **NP-ADIBO/NH₂** se décrochent au bout de 8 h de traitement en milieu basique comme l'illustre la cinétique de décrochage effectuée à différents temps (70, 180, 270, 360, 450, 510 et 1380 min). Pour ce faire, le surnageant contenant les NP décrochées est prélevé au temps voulu puis passé sur filtre Amicon 30K afin de mesurer l'absorbance des NP à 561 nm en suspension dans l'eau. Cela permet ensuite d'avoir la concentration de NP décrochées pour chaque temps ou bien de tracer une courbe représentant les concentrations cumulées de NP décrochées dans le temps (**Figure 52**).

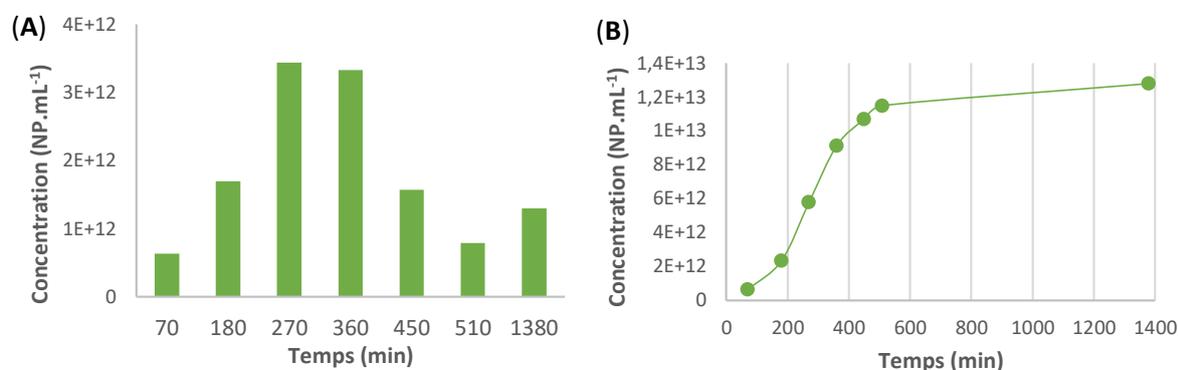
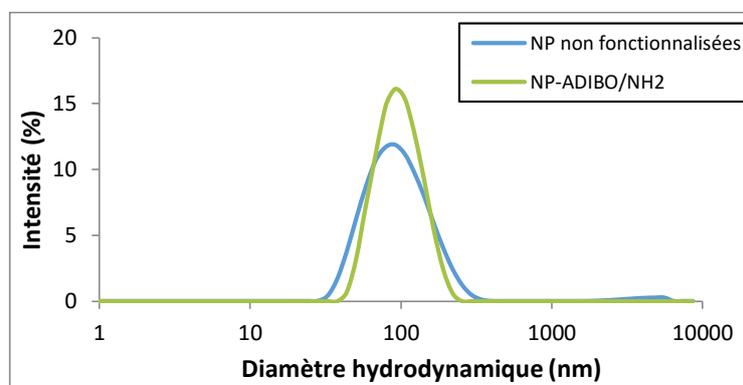


Figure 52 : Cinétique de décrochage des NP-ADIBO/NH₂ en présence de DBU 0,1 M. (A) Concentrations de NP décrochées pour chaque temps, (B) Concentrations cumulées de NP décrochées dans le temps.

Les analyses de DLS montrent que la fonctionnalisation des NP par deux espaceurs PEG portant des fonctions terminales amine et ADIBO se traduit par une faible augmentation du diamètre hydrodynamique par rapport aux NP de départ non fonctionnalisées. De plus, les liaisons phosphodiester entre ces différentes fonctions rendent les NP chargées négativement (-43 mV) (**Figure 53**). Par ailleurs, l'observation des particules en microscopie ainsi que leur indice de polydispersité (Pdl = 0,1) confirment qu'il n'y a pas d'agrégation et que les **NP-ADIBO/NH₂** sont bien dispersées dans l'eau. Les images obtenues démontrent également le bon état des **NP-ADIBO/NH₂** après 8 h de traitement en milieu basique.



	Diamètre hydrodynamique (nm)	Indice de polydispersité (Pdl)	Potentiel zêta (mV)
NP non fonctionnalisées	87,34	0,177	-
NP-ADIBO/NH ₂	90,46 ± 4,0	0,104	-42,8 ± 1,4

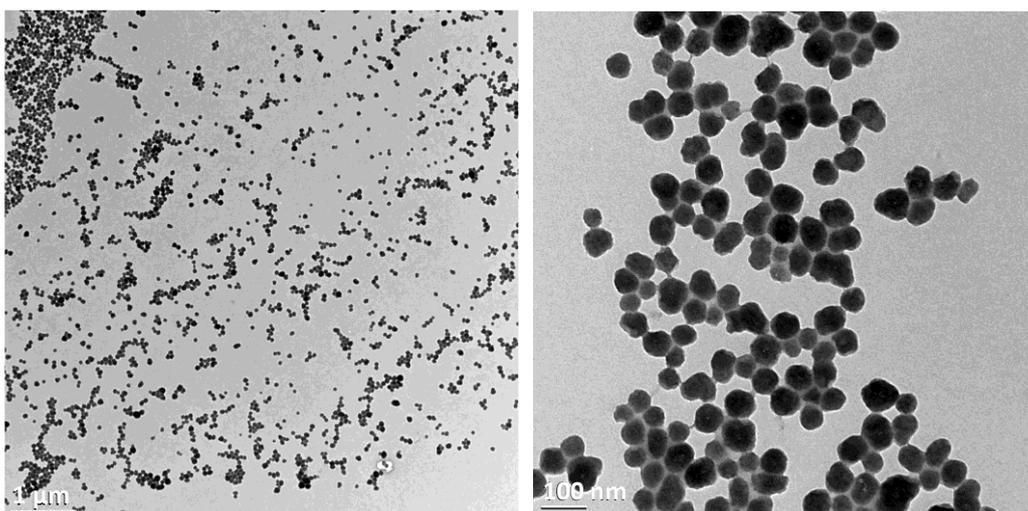


Figure 53 : Analyses de DLS et de MET des NP-ADIBO/NH₂.

ii. Estimation du nombre de fonctions ADIBO par NP

La stratégie consiste à faire réagir les fonctions ADIBO des **NP-ADIBO/NH₂** avec une sonde fluorescente de type fluorescéine/azoture (FITC-N₃) préalablement synthétisée selon la chimie bioorthogonale de type SPAAC. Le but étant ensuite de mesurer l'absorbance à 495 nm ainsi que la fluorescence à 520 nm de la FITC-N₃ immobilisée à la surface des NP pour en déduire le nombre de fonctions ADIBO présentes sur les NP. La fluorescéine azoture a donc dans un premier temps été synthétisée en couplant la fluorescéine isothiocyanate commerciale (FITC-NCS) avec le **N₃-PEG₄-NH₂** dont la synthèse est décrite plus loin dans ce manuscrit (cf. page 173) dans un mélange anhydre dichlorométhane/*N,N*-diméthylformamide (1/1, v/v) à température ambiante pendant 1 h, sous atmosphère inerte et à l'abri de la lumière (**Schéma 1**). Le produit a été obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 73%.

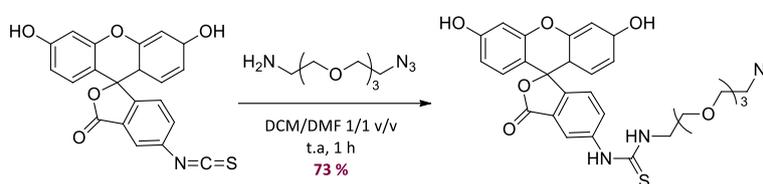


Schéma 1 : Synthèse de la FITC-N₃.

La formation de ce fluorophore a été confirmée par RMN ¹H et HSQC avec la présence à 3,81 ppm d'un singulet élargi intégrant pour deux protons et correspondant aux protons en alpha de la liaison thiourée. Mais également en ¹³C avec la présence à 181,43 ppm du carbone quaternaire de la fonction C=S. La présence de la fonction azoture a été validée par spectroscopie infrarouge avec la présence à 2099 cm⁻¹ d'une bande d'absorption relativement forte caractéristique de la vibration d'élongation du groupement azoté.

Par ailleurs, l'analyse HRMS a permis de confirmer la masse de la molécule attendue, $[M+H]^+$ calculée pour $C_{29}H_{29}N_5O_8S$ 608,1809 ; mesurée 608,1797 ; mais également de valider par la suite sa réactivité en solution dans un mélange équimolaire eau/acétonitrile avec l'ADIBO-PEG₅-COOH pendant 16 h à température ambiante (masse attendue pour $C_{61}H_{71}N_7O_{16}S$ $[M+2H]^{2+}$: 594,7334 ; mesurée : 594,7324) (Figure 54).

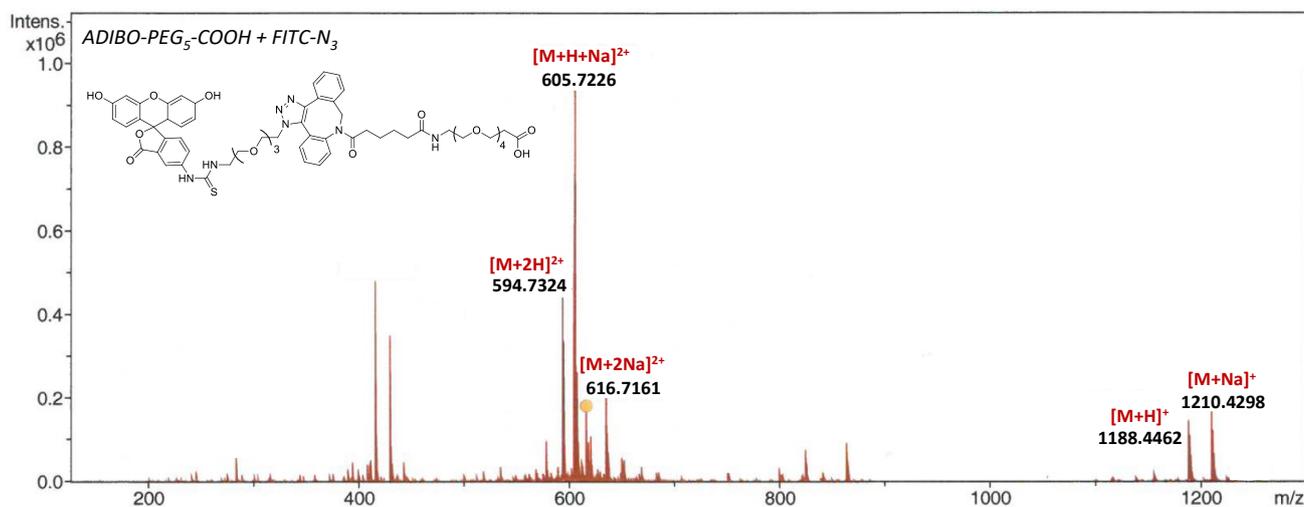


Figure 54 : Spectre de masse validant la réactivité de la FITC-N₃ synthétisée vis-à-vis de l'ADIBO-PEG₅-COOH.

Une fois la sonde FITC-N₃ à notre disposition, celle-ci est mise en réaction avec les CPG-NP-ADIBO/NH₂ dans un mélange équimolaire eau/acétonitrile à température ambiante pendant une nuit (Figure 55). Le surnageant contenant la FITC qui n'a pas réagi est ensuite éliminé et le support rincé avec le mélange eau/ acétonitrile.

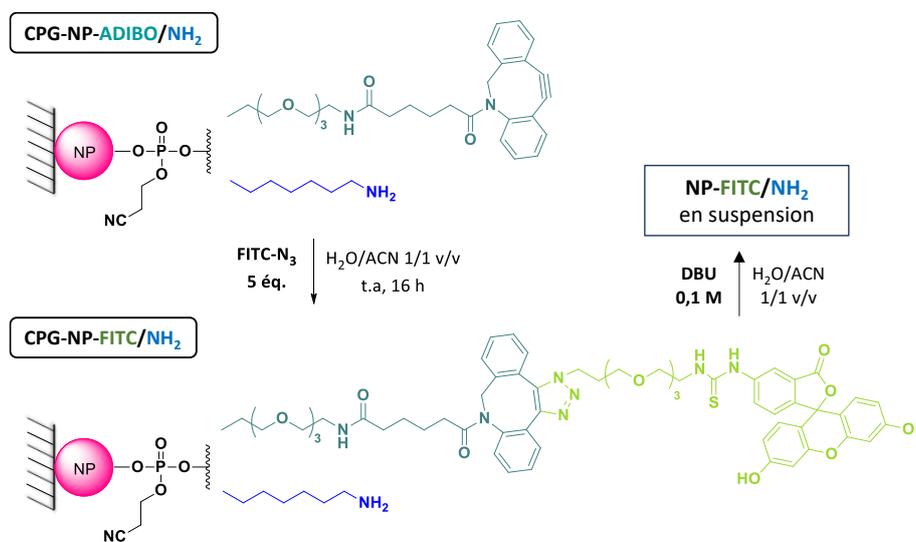


Figure 55 : Quantification du nombre d'ADIBO sur les NP-ADIBO/NH₂.

Les mesures d'absorbance et de fluorescence sont réalisées par dosage direct sur les **NP-FITC/NH₂** en suspension, c'est-à-dire une fois qu'elles sont décrochées du support CPG et purifiées sur filtre Amicon 30K. Les longueurs d'onde maximum d'excitation et d'émission de la rhodamine des NP sont respectivement de 561 nm et 582 nm, et celles de la FITC-N₃ de 495 nm et 520 nm. Cependant, n'ayant observé aucune absorbance à 495 nm, nous avons décidé de nous tourner vers les mesures de fluorescence, ces dernières étant 1000 à 10 000 fois plus sensibles que les mesures d'absorbance (**Figure 56**). La fluorescence des **NP-FITC/NH₂** en suspension a été mesurée à la longueur d'onde d'émission maximum de la FITC-N₃ à 520 nm et ont permis de confirmer de façon qualitative la présence des fonctions ADIBO sur les particules.

Il semble qu'une faible quantité d'ADIBO ait été greffée à la surface des NP rendant les concentrations en fluorescéine difficilement détectables par spectrophotométrie. Toutefois, le nombre de fonctions présentes à la surface des NP semble suffisant pour réagir avec la sonde fluorescente et donner une intensité de fluorescence non négligeable, qui de plus est atténuée par le transfert d'énergie (FRET) de la fluorescéine vers la rhodamine. Comme les mesures spectrophotométriques ne permettant pas de quantifier le nombre d'ADIBO, seule des mesures qualitatives de fluorescence ont donc été prises en compte.

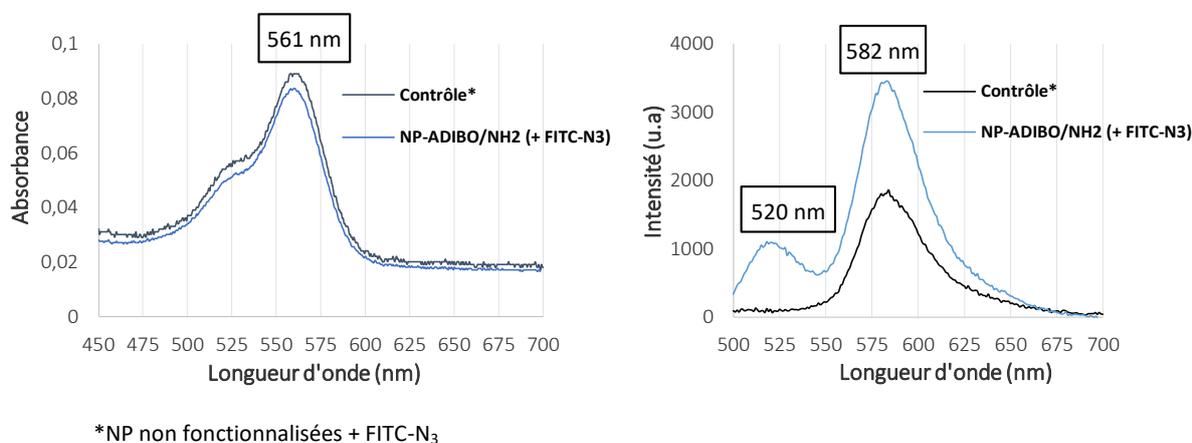


Figure 56 : Spectres d'absorbance et de fluorescence des NP-ADIBO/NH₂ après réaction avec la FITC-N₃.

iii. Estimation du nombre de fonctions NH₂ par NP

Dans ce cas, ce sont les fonctions amine des **NP-ADIBO/NH₂** que l'on a fait réagir avec la sonde fluorescente fluorescéine isothiocyanate (FITC-NCS). La FITC-NCS se lie de façon covalente en formant une liaison thiourée avec les amines des **NP-ADIBO/NH₂**. La **CPG-NP-ADIBO/NH₂** est mise en réaction avec la FITC-NCS dans un mélange équimolaire eau/acétonitrile à température ambiante pendant 16 h (**Figure 57**).

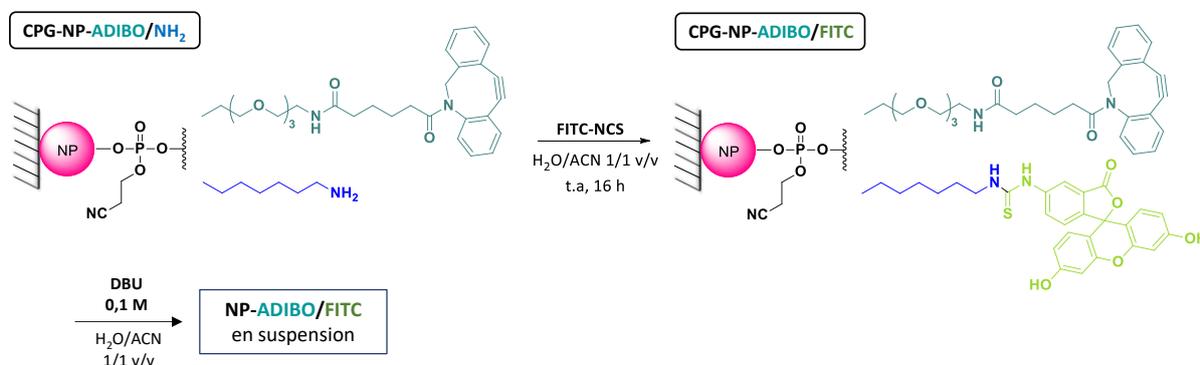


Figure 57 : Quantification du nombre total de NH₂ sur les NP-ADIBO/NH₂.

Une fois les **NP-ADIBO/FITC** décrochées et purifiées, leur absorbance est mesurée aux longueurs d'onde maximum d'absorbance de la FITC à 495 nm et de la rhodamine à 561 nm. La valeur d'absorbance à 495 nm permet d'en déduire la concentration en FITC immobilisée à la surface des NP, celle mesurée à 561 nm nous donne la concentration en rhodamine et par conséquent la quantité de NP dans la solution. Les concentrations sont déterminées par rapport à des courbes d'étalonnage (cf. Partie expérimentale). Contrairement aux NP précédentes misent en présence de FITC-N₃, nous avons pu mesurer une absorbance à 495 nm. La concentration en FITC immobilisée correspond après calcul au nombre total d'amines (N_{NH_2}) présentes à la surface des NP. Cette quantité d'amine est ensuite rapportée au nombre total de NP en suspension (N_{NP}), ce qui permet d'obtenir le nombre de NH₂ par **NP-ADIBO/NH₂** ($R_{NP-ADIBO/NH_2}$). D'après les mesures d'absorbance effectuées à 495 nm et 561 nm et grâce aux courbes d'étalonnage, le ratio $R_{NP-ADIBO/NH_2}$ peut-être calculé de la façon suivante (**Équation 2**) :

$$R_{NP-ADIBO/NH_2} = \frac{N_{NH_2}}{N_{NP}} = \frac{(A_{495\text{ Flu0}} - A_{495\text{ Rho}}) \times N_A \times \epsilon_{561\text{ NP}}}{\epsilon_{495\text{ FITC}} \times A_{561}}$$

Équation 2 : Calcul du ratio de NH₂ par NP. $A_{495\text{ Flu0}}$: absorbance de la fluorescéine mesurée à 495 nm et $A_{495\text{ Rho}}$: absorbance de la rhodamine sur la courbe contrôle mesurée à 495 nm, A_{561} : absorbance mesurée à 561 nm, N_A : nombre d'Avogadro (en mol⁻¹), $\epsilon_{561\text{ NP}}$: coefficient d'extinction des NP à 561 nm (en L.NP⁻¹.cm⁻¹), $\epsilon_{495\text{ FITC}}$: coefficient d'extinction molaire de la fluorescéine à 495 nm (en L.mol⁻¹.cm⁻¹).

Le coefficient d'extinction des **NP-ADIBO/NH₂** à 561 nm ($\epsilon_{561\text{ NP}} = 8,32 \cdot 10^{-14}$ L.mol⁻¹.cm⁻¹) ainsi que le coefficient d'extinction molaire de la FITC ($\epsilon_{495\text{ FITC}} = 641,72$ L.mol⁻¹.cm⁻¹) ont été calculés à partir des pentes des droites des gammes étalons. Les mesures directement effectuées sur les NP en suspension donnent finalement une valeur de 31 540 NH₂/NP après calcul du ratio (**Figure 58**).

Là encore, le spectre de fluorescence confirme la présence d'amines sur les NP mais ne permet pas leur quantification en raison du transfert d'énergie important observé entre la rhodamine et la FITC.

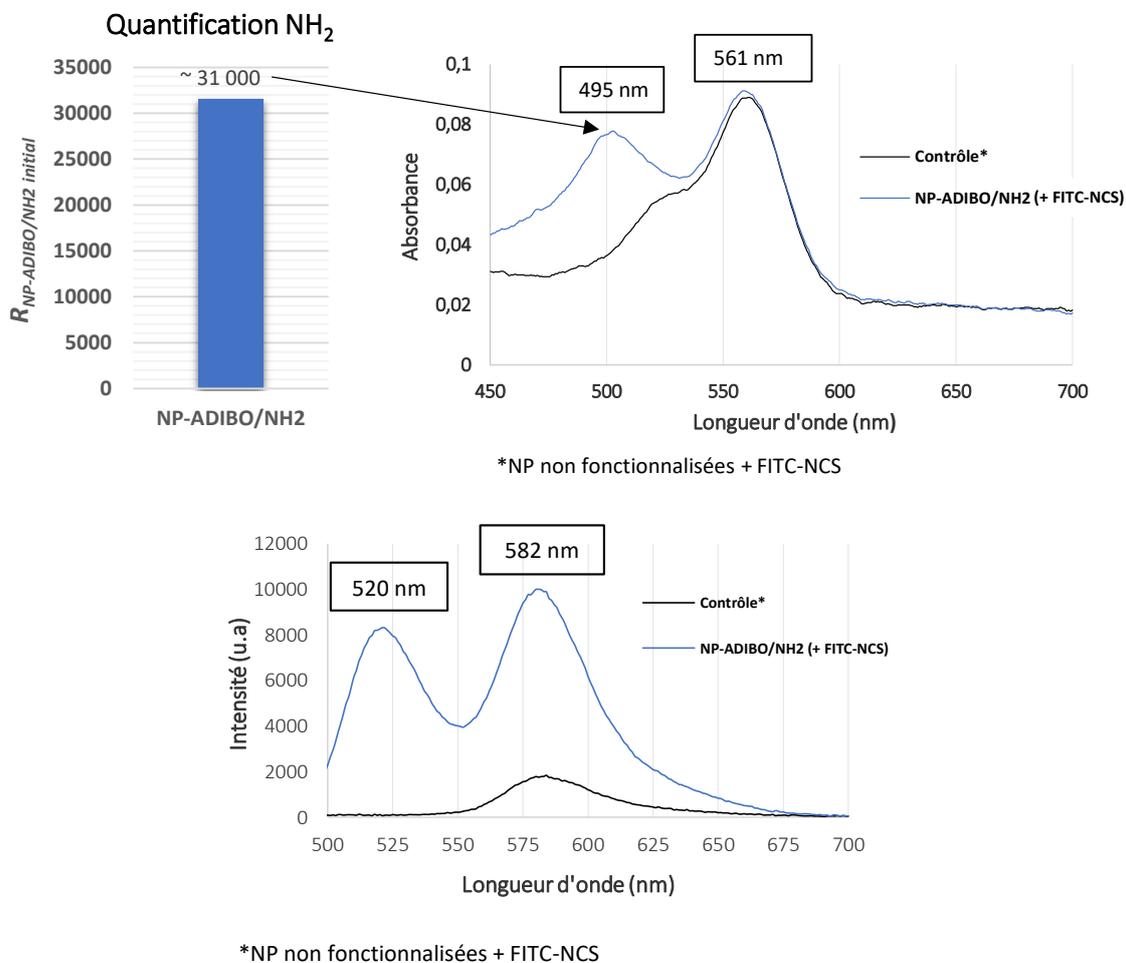


Figure 58 : Spectres d'absorbance et de fluorescence des NP-ADIBO/NH₂ après réaction avec la FITC-NCS.

III. Synthèse supportée des NP-ADIBO/DOTA

1. Choix du précurseur chélatant macrocyclique DOTA pour fonctionnaliser les NP-ADIBO/NH₂ via les fonctions amine primaire

Une fois les NP-ADIBO/NH₂ obtenues, l'objectif était d'incorporer des macrocycles azotés de type DOTA par couplage peptidique entre les amines primaires des NP et la fonction acide activée des cages chélatantes (DOTA-NHS ester). Cependant, il s'avère qu'une autre forme de ce macrocycle, le mDOTA, soit plus réactive et surtout plus stable dans le temps que le DOTA-NHS. La stabilité plus importante de cet ester a notamment été démontrée par Mier *et al.* en 2005 pour des valeurs de pH allant de 7 à 9 et a été comparée à celle du DOTA-NHS [228]. A pH neutre l'ester de NHS est totalement hydrolysé au bout de 10 min alors que le mDOTA est encore présent à 90 % sous sa forme activée. Nous avons donc essayé de greffer ces deux types de DOTA afin de comparer leur réactivité sur les NP. Les deux macrocycles azotés utilisés sont représentés sur la **Figure 59**. Le DOTA-NHS comportant un ester activé de type N-hydroxysuccinimide a été acheté chez Chematech alors que le mDOTA comportant un ester activé de type tétrafluorophényle a été synthétisé au laboratoire.

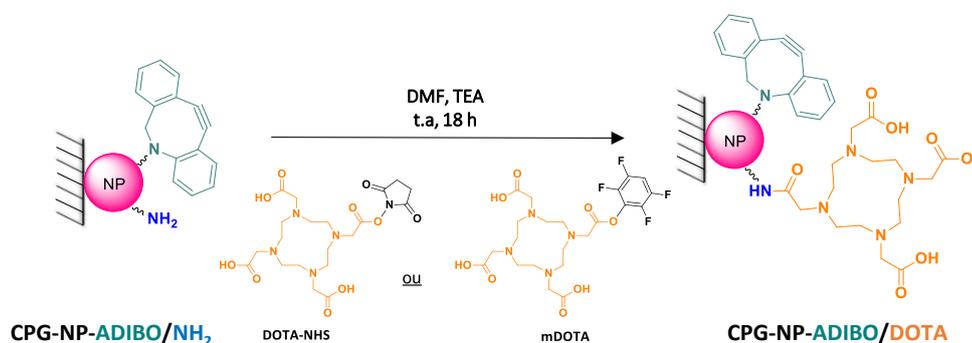


Figure 59 : Synthèse des NP-ADIBO/DOTA par couplage peptidique supporté du DOTA-NHS et du mDOTA avec les amines primaires des NP-ADIBO/NH₂.

1.1 Préparation du mDOTA

Tout d'abord, le DO3A-3tBu est synthétisé d'après une procédure déjà décrite par D.A. Moore [229]. Le cyclène est couplé avec le bromoacétate de *tert*-butyle dans le diméthylacétamide en présence d'acétate de sodium, permettant de tamponner le milieu réactionnel, à température ambiante pendant 3 jours (**Schéma 2**). Le produit est obtenu avec un rendement de 47 % après recristallisation. D'après un protocole préalablement décrit par Mukai *et al.* en 2002 [230], le DO3A-3tBu est ensuite mis en présence de bromoacétate de benzyle et de carbonate de potassium dans l'acétonitrile chauffé à 70 °C pour conduire après purification par chromatographie sur gel de silice au DO3A-3tBu-Bn avec un rendement de 89 %.

L'ester de benzyle est ensuite déprotégé par hydrogénation pallado-catalysée dans le méthanol pour conduire au **DOTA-3tBu-COOH**. Ce produit est mis en réaction avec le tétrafluorophénol en présence de dicyclohexylcarbodiimide dans le chloroforme anhydre à température ambiante pendant 20 h afin d'obtenir le macrocycle sous sa forme activée et protégée (**mDOTA-3tBu**) avec un rendement de 71 % après purification par chromatographie sur gel de silice.

Les groupements protecteurs *tert*-butyle des fonctions carboxylique sont ensuite éliminées par un traitement en milieu acide (TFA/anisole ; 95/5 ; v/v) pendant 20 h à température ambiante. Dans cette réaction, l'anisole joue le rôle de « scavenger » : il est utilisé comme piège à carbocations en réagissant avec les entités électrophiles *t*Bu⁺ relargués au cours du traitement acide. Finalement, le **mDOTA** souhaité est obtenu avec un rendement global de 27 % sur cinq étapes.

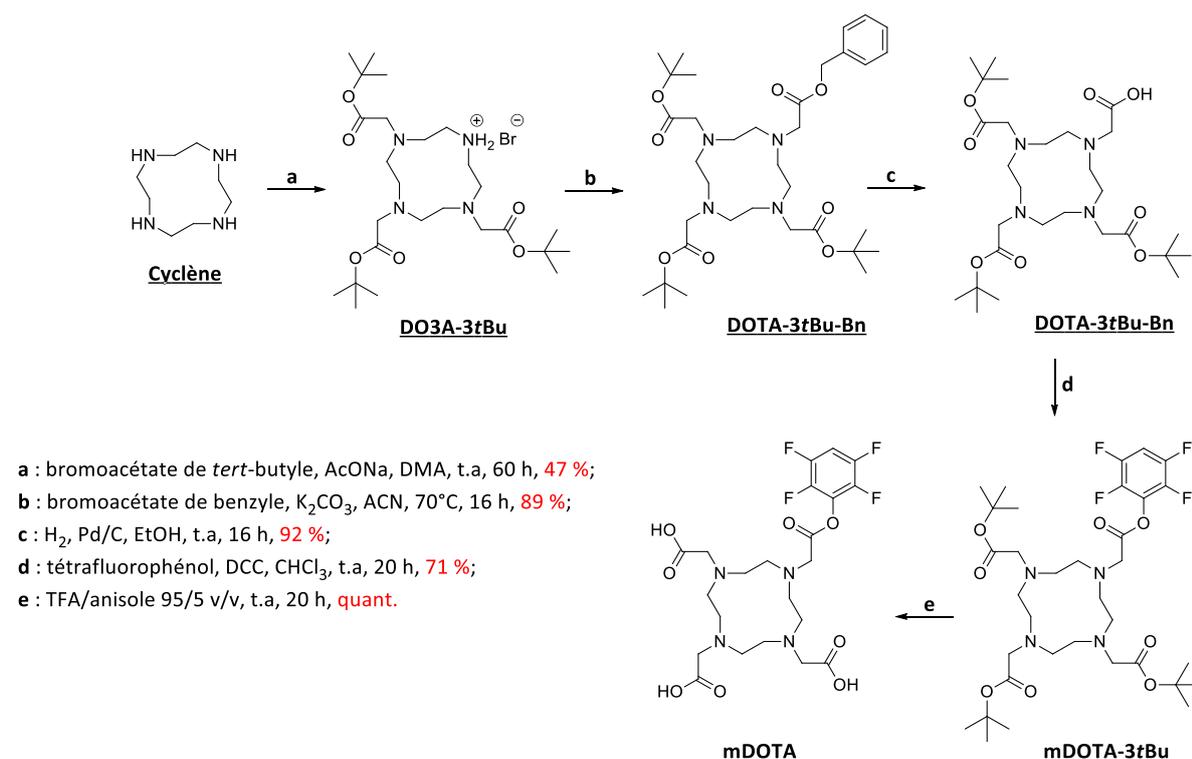


Schéma 2 : Synthèse du mDOTA.

1.2 Greffage des DOTA *via* le DOTA-NHS et le mDOTA

Le couplage peptidique entre les DOTA « activés » et les amines des **NP-ADIBO/NH₂** est effectué dans les conditions préalablement décrites par De Crozals *et al.* pour l'incorporation d'un autre chélatant azoté, le DTPA, *via* les amines libres des NP [225]. Le support **CPG-NP-ADIBO/NH₂** est mis en suspension dans une solution de DOTA approprié (DOTA-NHS ou mDOTA) à 10 mM (en très large excès, 80 éq. par rapport au nombre de mole d'amine) dans le *N,N*-diméthylformamide en présence de triéthylamine à température ambiante et sous atmosphère inerte. Afin d'optimiser au maximum le rendement de couplage entre les amines des **NP-ADIBO/NH₂** et les DOTA, les réactions sont effectuées dans des conditions dites « anhydres ».

En effet, les atomes d'oxygène de l'eau comme les amines primaires sont d'excellents nucléophiles et peuvent conduire en présence de traces d'eau à l'hydrolyse possible des esters activés du DOTA rendant alors impossible la formation de liaisons amide avec les NP (**Figure 60**).

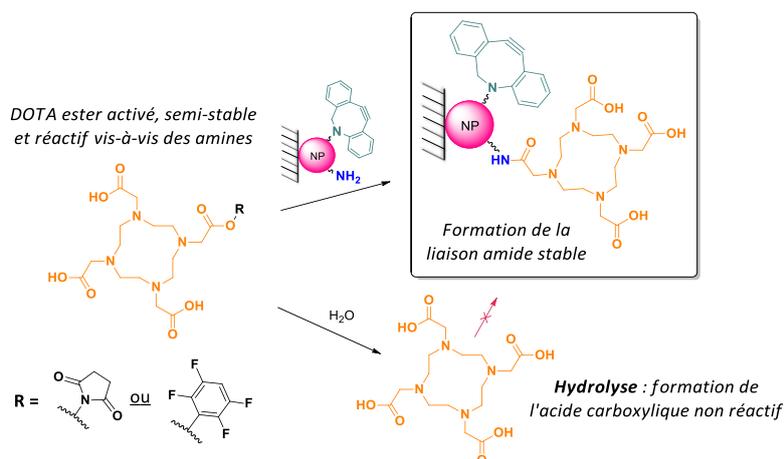


Figure 60 : Hydrolyse possible des esters activés du DOTA en milieu non anhydre.

1.3 Caractérisation des NP-ADIBO/DOTA

a. Estimation du nombre de ligands DOTA

L'objectif consistait à estimer le nombre de DOTA immobilisés à la surface des différents lots de **NP-ADIBO/DOTA**. Pour cela, l'approche repose sur la réaction entre les fonctions amines avec la sonde fluorescente FITC-NCS avant (**CPG-NP-ADIBO/NH₂**) et après greffage (**CPG-NP-ADIBO/DOTA**) afin d'évaluer le nombre total d'amines restantes après réaction avec les DOTA. Cette approche revient à utiliser le protocole décrit précédemment (cf. page 152) servant à quantifier le nombre total d'amines présentes au départ sur les **NP-ADIBO/NH₂**. Le support **CPG-NP-ADIBO/DOTA** est donc mis en réaction avec la sonde FITC-NCS (5 éq.) dans un mélange équimolaire eau/acétonitrile à température ambiante pendant 16 h. De manière similaire, le surnageant contenant la FITC-NCS qui n'a pas réagi est éliminé, le support lavé et enfin les **NP-ADIBO/DOTA/FITC** décrochées puis purifiées avant d'être passées au spectrophotomètre UV-visible (**Figure 61**).

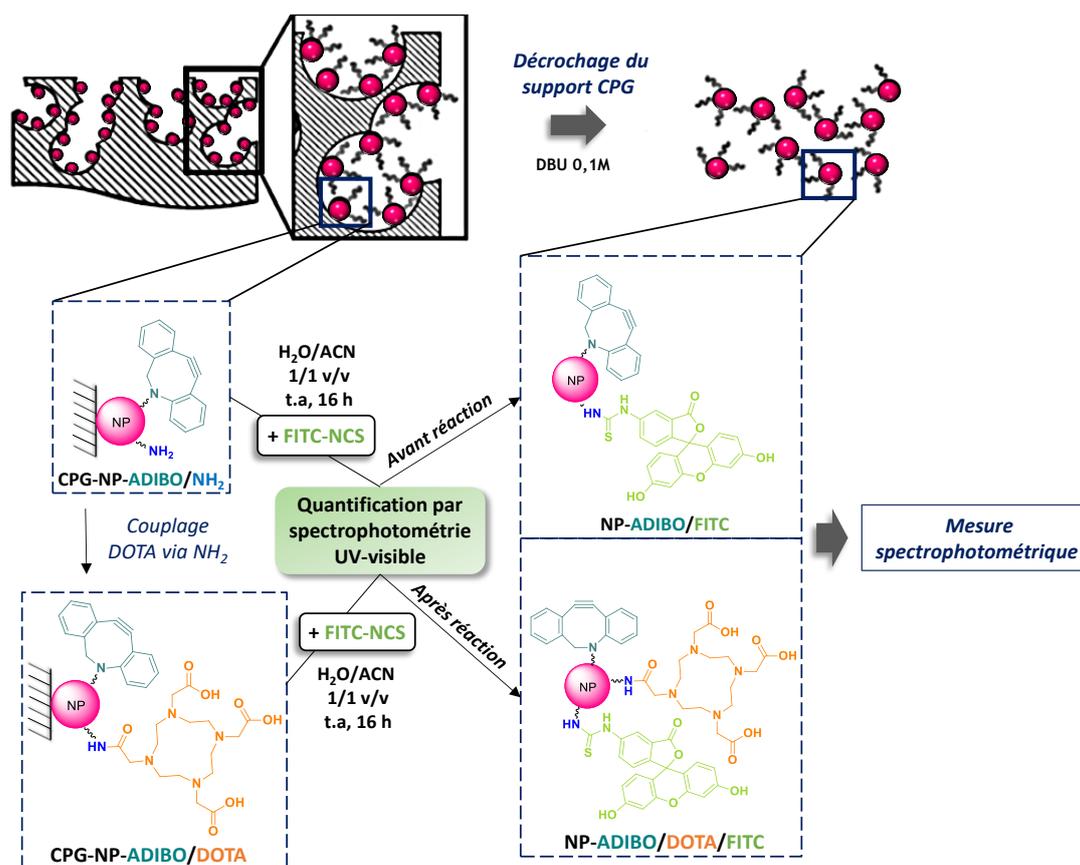


Figure 61 : Stratégie employée pour l'estimation du nombre de ligands DOTA par NP.

Toutes les mesures d'absorbance réalisées sur les différents lots de NP en suspension sont effectuées à la même concentration de $1,0 \cdot 10^{12}$ NP.mL⁻¹ dans un mélange équimolaire eau/acétonitrile. La quantité de DOTA par NP ($R_{NP-ADIBO/DOTA}$) est calculé d'après l'Équation 3 et correspond à la différence entre le nombre de total d'amines initialement disponibles ($R_{NP-ADIBO/NH_2}$ initial) et le nombre restant après greffage ($R_{NP-ADIBO/NH_2}$ final). Ces deux ratios sont calculés grâce à l'Équation 2 précédemment décrite (cf. page 152) en mesurant l'absorbance des NP-ADIBO/FITC et NP-ADIBO/DOTA/FITC à 495 nm.

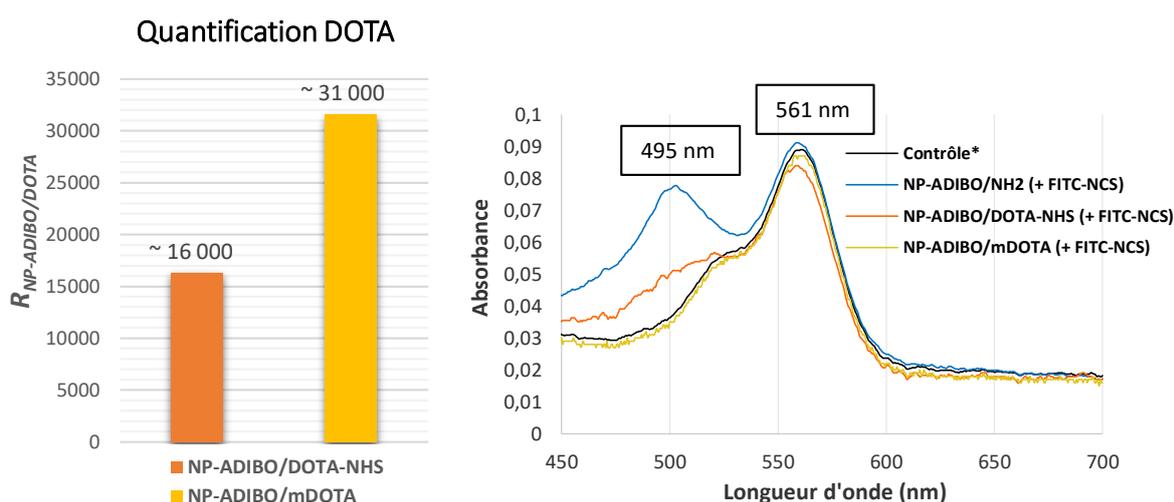
$$R_{NP-ADIBO/DOTA} = \frac{N_{DOTA}}{N_{NP}} = R_{NP-ADIBO/NH_2} \text{ initial} - R_{NP-ADIBO/NH_2} \text{ final}$$

Pour rappel : $R_{NP-ADIBO/NH_2} = \frac{N_{NH_2}}{N_{NP}} = \frac{(A_{495 \text{ Fluor}} - A_{495 \text{ Rho}}) \times N_A \times \epsilon_{561 \text{ NP}}}{\epsilon_{495 \text{ FITC}} \times A_{561}}$

Équation 3 : Calcul du ratio de DOTA par NP.

La concentration en sonde FITC immobilisée sur les NP (avant et après réaction avec le DOTA) confirme l'efficacité du greffage des deux types de ligand DOTA. En effet, après le greffage du DOTA-NHS sur les fonctions amine, celles-ci sont moins disponibles pour réagir avec la sonde FITC entraînant une diminution de leur greffage sur les NP (Figure 62).

Il y a 2,5 fois moins de FITC sur les **NP-ADIBO/DOТА-NHS** (—; $2,5 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) que sur les **NP-ADIBO/NH₂** initiales (—; $6,2 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$), signifiant que plus de la moitié des amines des NP ($\sim 31\ 000$ NH₂ au total par NP) ont réagi avec le DOТА-NHS, soit une valeur moyenne de 16 000 DOТА par NP. L'incorporation de DOТА sur les NP est déjà visuellement observable après réaction du support **CPG-NP-ADIBO/DOТА-NHS** avec la sonde FITC comme l'illustre la **Figure 63**. Après élimination du surnageant de réaction et plusieurs lavages, il est possible de voir que la **CPG-NP-ADIBO/DOТА-NHS** conserve une couleur plus rosée due à la fixation moins importante de FITC par rapport à la **CPG-NP-ADIBO/NH₂**. Des mesures similaires ont également été effectuées avec les **NP-ADIBO/mDOТА** et les résultats obtenus démontrent la réactivité encore plus importante de ce chélatant avec approximativement $\sim 31\ 000$ DOТА par NP. Ces résultats corroborent le fait que le composé mDOТА est donc plus réactif que le dérivé DOТА-NHS.



*NP non fonctionnalisées + FITC-NCS

	NP-ADIBO/DOТА-NHS	NP-ADIBO/mDOТА
$R_{\text{NP-ADIBO/NH}_2}$ initial	$\sim 31\ 000$	$\sim 31\ 000$
$R_{\text{NP-ADIBO/NH}_2}$ final	$\sim 15\ 000$	ND*
$R_{\text{NP-ADIBO/DOТА}}$	$\sim 16\ 000$	$\sim 31\ 000$

*ND : non déterminé, la faible quantité d'amines restantes n'est pas quantifiable.

Figure 62 : Spectres d'absorbance des NP misent en présence de FITC-NCS et quantification du nombre de fonctions amine disponibles avant et après couplage du DOТА.

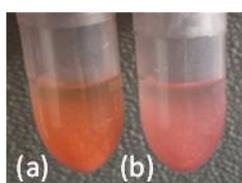
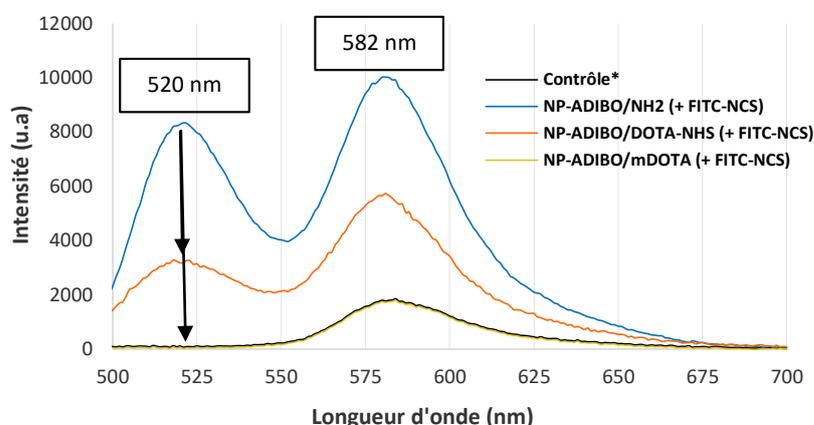


Figure 63 : (a) CPG-NP-ADIBO/NH₂ et (b) CPG-NP-ADIBO/DOТА-NHS en suspension ayant réagi avec la FITC-NCS.

Le spectre de fluorescence des **NP-ADIBO/mDOTA** donné en **Figure 64** démontre également une réactivité bien plus élevée du mDOTA puisqu'aucune fluorescence n'est reportée à 520 nm. Les mesures de fluorescence semblent également confirmer une diminution de la quantité d'amines disponibles sur les **NP-ADIBO/DOTA-NHS** par rapport aux **NP-ADIBO/NH₂** avec une intensité de fluorescence deux fois moins élevée.



*NP non fonctionnalisées + FITC-NCS

Figure 64 : Spectres de fluorescence des NP après réaction la FITC-NCS.

Ainsi, les diminutions d'absorbance observées à 495 nm pour les **NP-ADIBO/DOTA-NHS** et **NP-ADIBO/mDOTA** par rapport aux **NP-ADIBO/NH₂** initiale ont permis :

- de confirmer la réactivité importante des deux formes « activées » du DOTA sur les amines caractérisée par une très forte fonctionnalisation des NP,
- d'estimer la quantité de DOTA incorporée par NP,
- de conclure que la réactivité du mDOTA est plus importante que celle du DOTA-NHS.

b. Vérification de l'accessibilité des entités bioorthogonales ADIBO

La démarche consiste cette fois-ci à faire réagir les fonctions ADIBO des **NP-ADIBO/DOTA** avec la sonde fluorescente FITC-N₃ pour confirmer a posteriori que ces fonctions sont toujours réactives une fois les macrocycles immobilisés à la surface des NP. La **CPG-NP-ADIBO/DOTA** est mise en réaction avec la sonde FITC-N₃ dans un mélange équimolaire eau/acétonitrile à température ambiante pendant 16 h (**Figure 65**).

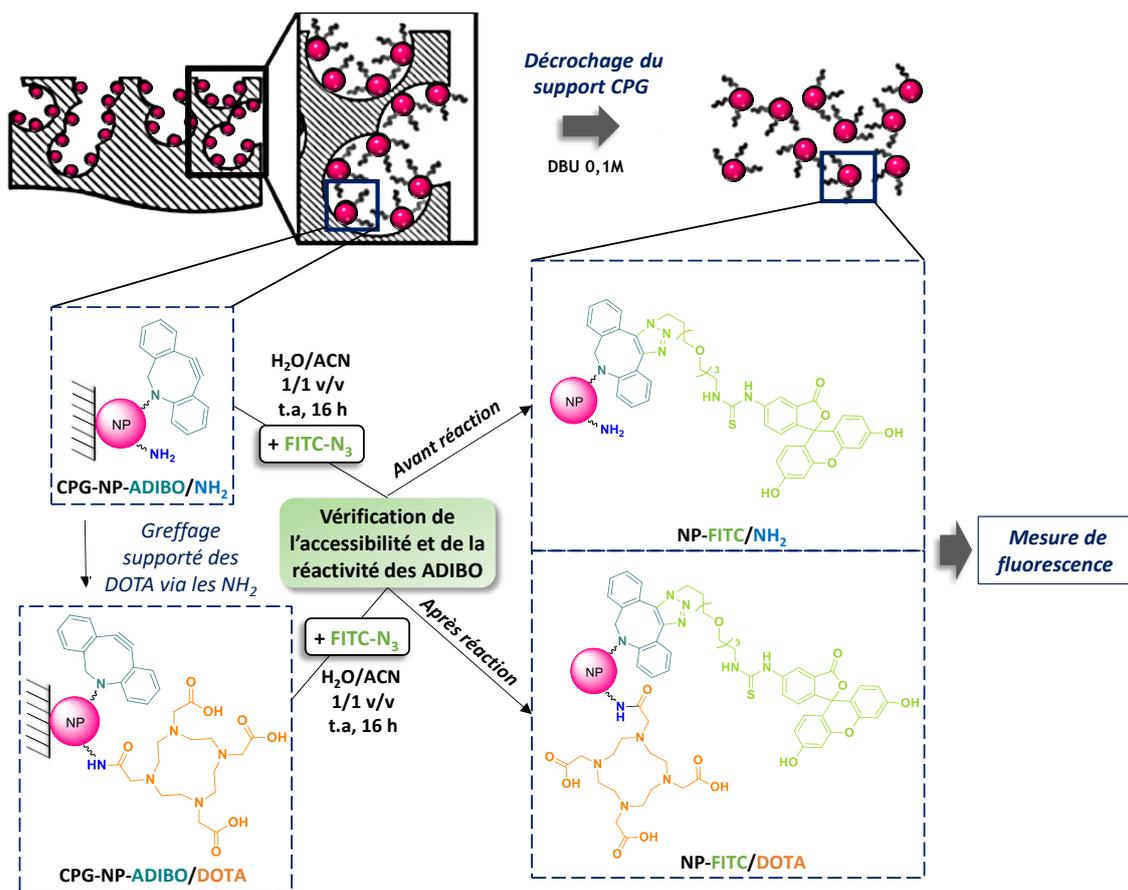


Figure 65 : Stratégie employée pour vérifier l'accessibilité et la réactivité des fonctions ADIBO après greffage des DOTA.

Compte tenu des observations faites précédemment, seules les mesures de fluorescence ont été prises en compte afin de vérifier que les fonctions ADIBO restaient accessibles et réactives malgré l'encombrement stérique potentiel pouvant être induit par les macrocycles DOTA. Nous pouvons voir qu'aucune fluorescence à 520 nm n'est visible après le greffage des DOTA alors que la mesure de fluorescence sur le lot initial (NP-ADIBO/NH₂ + FITC-N₃) confirme bien la présence de fonctions ADIBO. Il semble donc que l'encombrement stérique engendré par les entités chélatantes présente à la surface des NP diminue l'accessibilité des fonctions ADIBO expliquant ainsi la perte de fluorescence observée à la fois pour les NP-ADIBO/DOTA-NHS et NP-ADIBO/mDOTA (Figure 66).

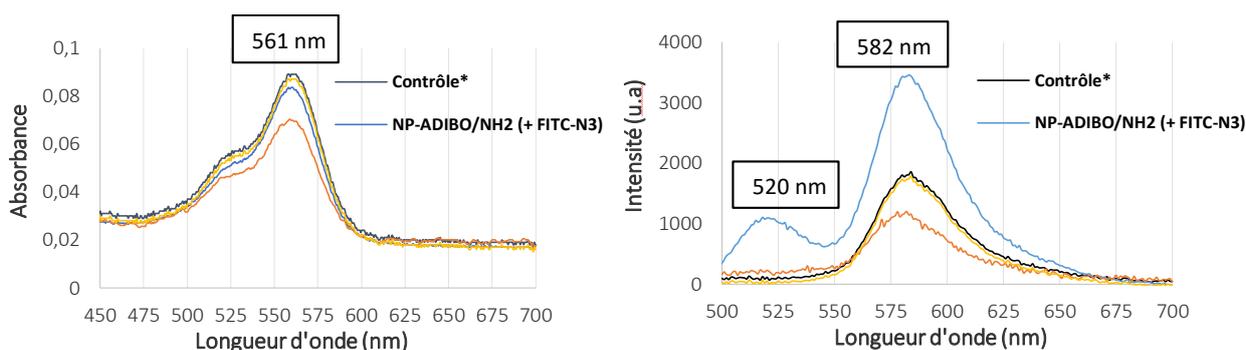


Figure 66 : Spectres d'absorbance et de fluorescence des NP misent en présence de FITC-N₃ pour valider la présence et la réactivité des fonctions ADIBO avant et après couplage des DOTA. *Contrôle : NP non fonctionnalisées + FITC-N₃.

L'absence de FITC-N₃ sur les **NP-ADIBO/DOTA** est déjà observable visuellement au moment de la réaction avec le support **CPG-NP-ADIBO/DOTA**. En effet, le support conservait sa couleur rose habituelle au lieu de prendre une couleur plus orangée comme le montre la **Figure 67** pour la **CPG-NP-ADIBO/NH₂**.

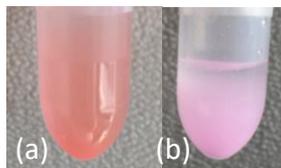


Figure 67 : (a) **CPG-NP-ADIBO/NH₂** et (b) **CPG-NP-ADIBO/DOTA-NHS** en suspension ayant réagi avec la FITC-N₃.

c. Décrochage et analyse des NP par DLS et MET

Les NP une fois fonctionnalisées avec le DOTA sont décrochées du support CPG dans les conditions décrites précédemment (cf. page 147) afin d'être caractérisées par DLS et MET. En parallèle, une cinétique de décrochage pour ces nouveaux lots de **NP-ADIBO/DOTA-NHS** et **NP-ADIBO/mDOTA** a également été réalisée et comparée avec celle des **NP-ADIBO/NH₂**.

Nous constatons que la majeure partie des **NP-ADIBO/NH₂** et **NP-ADIBO/DOTA-NHS** sont libérées en solution après 8 h 30. A l'inverse, les **NP-ADIBO/mDOTA** se décrochent principalement pendant la nuit, soit au bout de 23 h de traitement dans la DBU 0,1 M. Compte tenu des résultats précédemment obtenus, il semble que la présence plus importante de mDOTA (plus réactif) à la surface des NP augmente leur temps de décrochage. Toutefois, l'observation des particules en MET confirme le bon état de ces différents lots de NP après quelques heures de traitement en milieu basique (**Figure 68**).

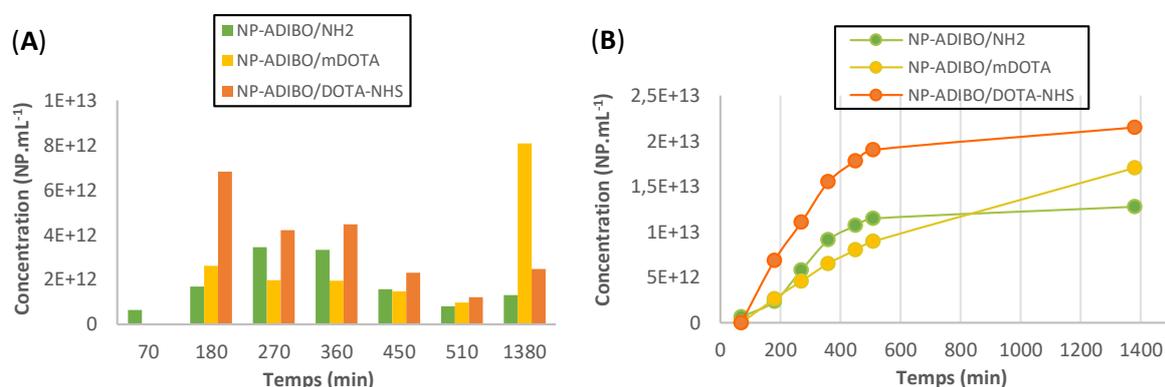
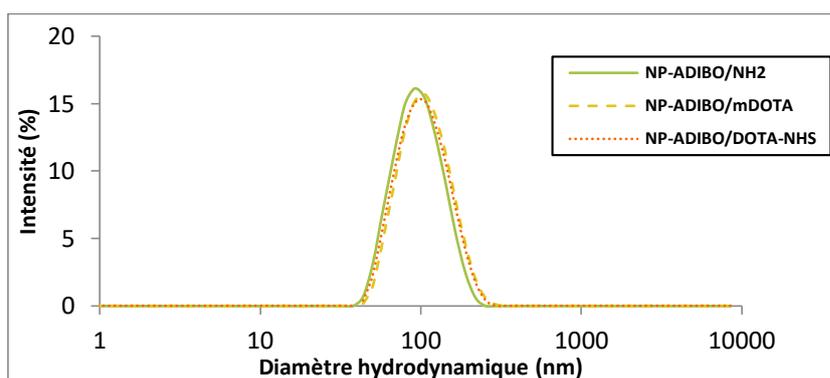


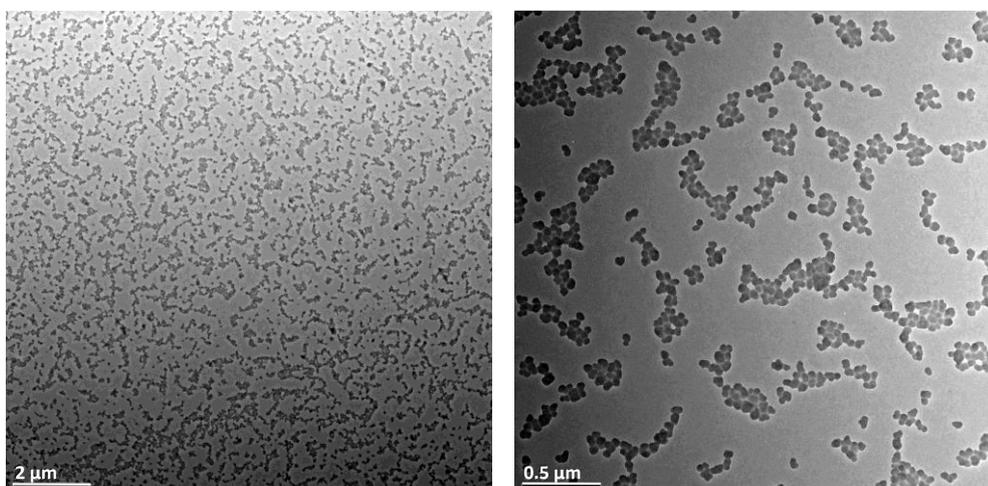
Figure 68 : Cinétique de décrochage des **NP-ADIBO/NH₂**, **NP-ADIBO/mDOTA**, **NP-ADIBO/DOTA-NHS** en présence de DBU 0,1 M. (A) Concentrations de NP décrochées pour chaque temps, (B) Concentrations cumulées de NP décrochées dans le temps.

Le greffage des deux types de ligands DOTA sur les NP a aussi été confirmé par DLS (Figure 69). Nous avons pu comparer les diamètres hydrodynamiques des **NP-ADIBO/NH₂**, **NP-ADIBO/mDOTA** et **NP-ADIBO/DOTA-NHS** et une très légère augmentation du diamètre hydrodynamique, seulement de 10 %, a pu être observée sur les NP comportant du DOTA. Les potentiels zêta de chaque lot ont également été mesurés et comparés. Les **NP-ADIBO/mDOTA** et **NP-ADIBO/DOTA-NHS** donnent des valeurs plus négatives par rapport aux **NP-ADIBO/NH₂** dues à la présence des fonctions acide des DOTA chargées négativement. Les mesures des potentiels zêta ainsi que celles des diamètres hydrodynamiques des différents lots sont en accord et permettent de confirmer l'efficacité de couplage de deux DOTA différents sur les **NP-ADIBO/NH₂**. Par ailleurs, l'indice de polydispersité de 0,1 montre que les suspensions de NP sont bien dispersées dans l'eau. Les images de MET confirment la morphologie sphérique et intacte des **NP-ADIBO/DOTA-NHS** mais aussi des **NP-ADIBO/mDOTA**, malgré un temps de décrochage plus long pour ces dernières.



	Diamètre hydrodynamique (nm)	Indice de polydispersité (Pdl)	Potentiel zêta (mV)
NP-ADIBO/NH ₂	90,46 ± 4,0	0,104	-42,8 ± 1,4
NP-ADIBO/mDOTA	99,77	0,106	-62,3
NP-ADIBO/DOTA-NHS	96,52	0,103	-63,5

(A)



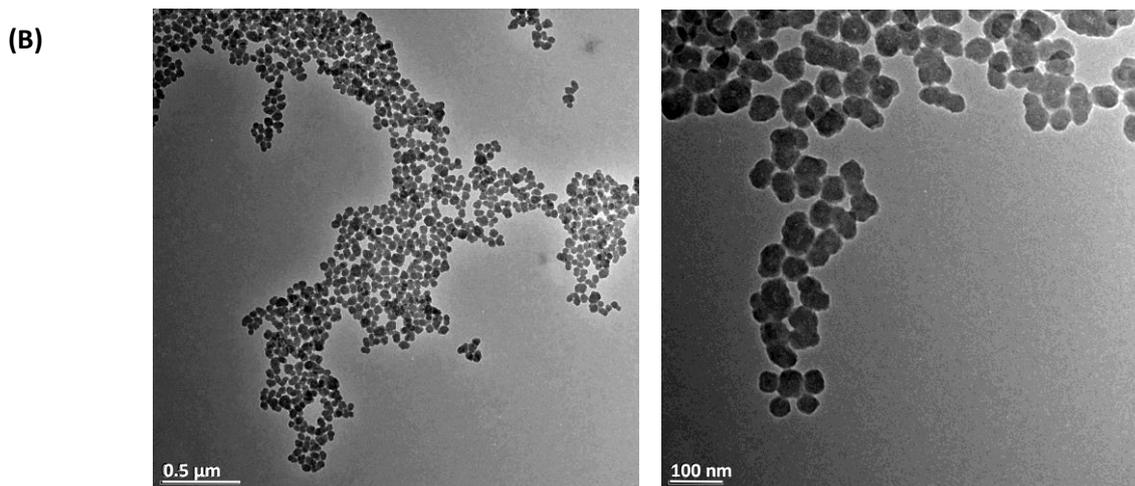


Figure 69 : Analyses de DLS et de MET (A) des NP-ADIBO/mDOTA et (B) des NP-ADIBO/DOTA-NHS.

1.4 Conclusion

En résumé, la réaction de couplage peptidique entre les amines libres des NP et deux types de DOTA présents sous la forme d'ester « activé » (DOTA-NHS et mDOTA) a permis la conception de **NP-ADIBO/DOTA**. Ces entités chélatantes ont montré qu'elles résistaient aux conditions basiques de décrochage et leur présence à la surface des particules a été confirmée par différentes méthodes d'analyse :

- De façon qualitative :
 - Les cinétiques de décrochage réalisées sur les différents lots de NP ont révélé que l'immobilisation importante de DOTA à la surface des particules induisait des temps de décrochage globalement plus lents par rapport aux particules **NP-ADIBO/NH₂** initiales.
 - Les mesures de DLS ont montré une augmentation du diamètre hydrodynamique (~ 90 nm vs ~ 100 nm) ainsi qu'une diminution du potentiel zêta due aux fonctions carboxylate portées par les DOTA (-40 mV vs -60 mV).
- De façon quantitative :
 - Les mesures d'absorbance à 495 nm de la sonde FITC incorporée sur les amines des particules ont permis d'estimer le nombre de ligands DOTA par NP. La réactivité du mDOTA s'est révélée plus efficace que celle du DOTA-NHS avec respectivement ~ 31 000 DOTA par NP et ~ 16 000 DOTA par NP. Cette dernière méthode paraît être la plus fiable puisque la présence de FITC est directement mesurée sur les NP en suspension et permet de déterminer de façon précise le nombre de DOTA incorporés.

Cependant, nous avons également été confrontés à des problèmes concernant :

- La limite de sensibilité du spectrophotomètre UV-visible qui n'a pas permis de visualiser les faibles quantités de fonctions ADIBO présentes sur les NP. Seules les mesures de fluorescence *via* la sonde FITC-N₃ ont donc été exploitées, cependant, uniquement de façon qualitative à cause de la présence de FRET entre la rhodamine et la fluorescéine qui ont rendu la quantification impossible.
- L'immobilisation trop importante de DOTA à la surface des NP qui empêche les fonctions ADIBO d'être réactives.

2. Optimisation de la conception des NP-ADIBO/DOTA pour rendre accessible les fonctions ADIBO

2.1 Greffage des DOTA *via* le mDOTA (1 éq. et 10 éq.)

Dans cette partie, l'objectif a été de rendre accessible les fonctions ADIBO des NP en vue de l'obtention de **NP-ADIBO/DOTA** a posteriori réactives dans la reconnaissance avec l'anticorps modifié RTX-N₃. Dans cette optique, l'une des stratégies consiste à immobiliser des quantités moins importantes de DOTA afin de minimiser l'encombrement stérique à la surface des particules de silice. En raison d'une meilleure stabilité dans le temps de l'ester activé de type tétrafluorophényle, notre choix s'est porté sur l'utilisation du mDOTA pour la suite des synthèses concernant les **NP-ADIBO/DOTA**. Le couplage peptidique a donc été réalisé en parallèle avec 1 et 10 équivalents de mDOTA (au lieu de 80 éq.) par rapport au nombre de mole d'amine engagé, noté **NP-ADIBO/DOTA(1)** et **NP-ADIBO/DOTA(10)**, dans le *N,N*-diméthylformamide en présence de triéthylamine à température ambiante et sous atmosphère inerte. De plus, le temps de réaction a été ajusté à 5 h (au lieu de 16 h) pour tenter de greffer le moins de DOTA possible (**Figure 70**).

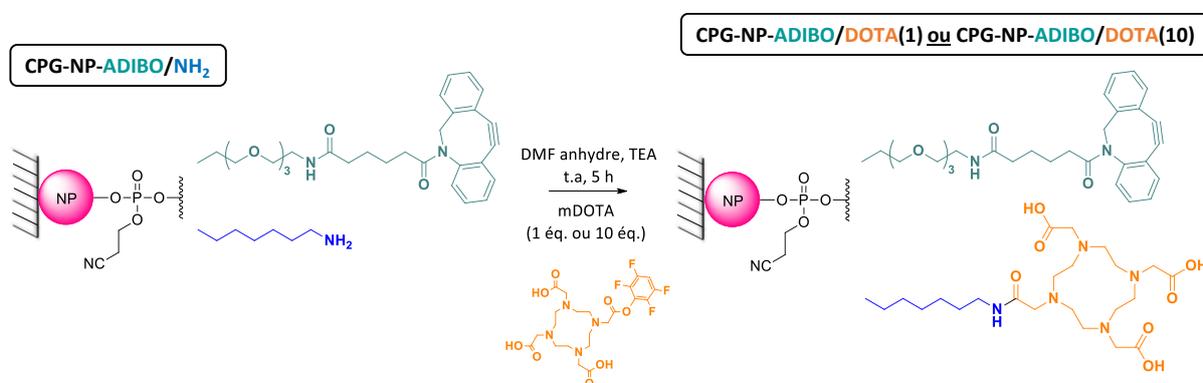


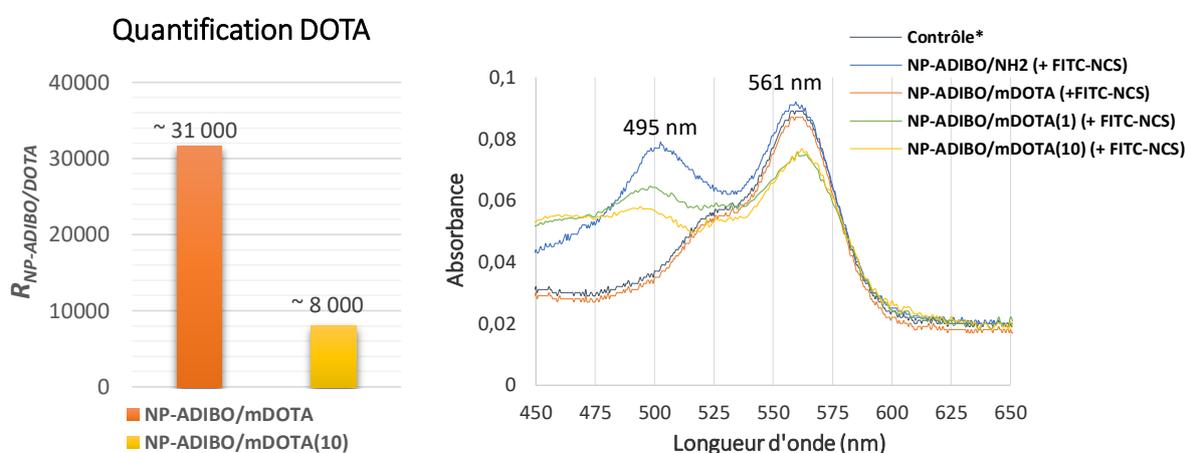
Figure 70 : Préparation des NP-ADIBO/mDOTA(1) et NP-ADIBO/mDOTA(10).

2.2 Caractérisation des NP-ADIBO/DOTA

a. Estimation du nombre de ligands DOTA

Comme pour les **NP-ADIBO/DOTA** de la partie précédente, la quantification du nombre d'amines avant et après réaction avec le mDOTA nous a permis de déterminer la quantité de macrocycles greffés sur les NP. Le support **CPG-NP-ADIBO/DOTA(1)** ou **CPG-NP-ADIBO/DOTA(10)** est mis en réaction avec la sonde FITC-NCS dans un mélange équimolaire eau/acétonitrile à température ambiante pendant 16 h. De la même façon, le surnageant contenant la FITC-NCS n'ayant pas réagi est éliminé, le support lavé et enfin les NP décrochées puis purifiées avant d'être passées au spectrophotomètre UV-visible. L'absorbance des **NP-ADIBO/DOTA(1)** et **NP-ADIBO/DOTA(10)** mesurées à 495 nm avant et après le greffage du mDOTA confirme la présence moins importante de ligands DOTA à la surface des NP comme le montre le spectre de la **Figure 71**.

D'après l'Équation 3 (cf. page 157), approximativement 8 000 DOTA par NP sont incorporés sur les **NP-ADIBO/DOTA(10)**. À l'inverse, l'absorbance mesurée à 495 nm pour les **NP-ADIBO/DOTA(1)** démontre qu'aucun macrocycle ne semble avoir été greffé par cette méthode.



*NP non fonctionnalisées + FITC-NCS

	NP-ADIBO/mDOTA (80 éq.)	NP-ADIBO/mDOTA (1 éq.)	NP-ADIBO/mDOTA (10 éq.)
$R_{NP-ADIBO/NH_2}$ initial	~ 31 000	~ 31 000	~ 31 000
$R_{NP-ADIBO/NH_2}$ final	ND*	~ 32 000	~ 23 000
$R_{NP-ADIBO/DOTA}$	~ 31 000	ND*	~ 8 000

*ND : non déterminé, la faible quantité d'amines restantes n'est pas quantifiable.

Figure 71 : Spectres d'absorbance des NPs mis en présence de FITC-NCS et quantification du nombre total d'amines avant et après couplage avec le mDOTA.

b. Vérification de l'accessibilité des entités bioorthogonales ADIBO

L'étape suivante a consisté à vérifier par fluorescence l'accessibilité et la réactivité des fonctions ADIBO après avoir greffé moins de DOTA sur les NP. Le support CPG comportant les **NP-ADIBO/DOTA(1)** ou les **NP-ADIBO/DOTA(10)** est mis en suspension dans une solution de sonde FITC-N₃ dans un mélange équimolaire eau/acétonitrile à température ambiante pendant 16 h (cf. page 160). Les NP ainsi décrochées et purifiées sont ensuite analysées en fluorescence. Les spectres de fluorescence obtenus pour les deux types de NP sont présentés en **Figure 72** : ils confirment d'une part l'accessibilité des entités bioorthogonales ADIBO à la surface des NP et d'autre part l'hypothèse préalablement faite sur l'encombrement stérique apporté par les macrocycles. En effet, la présence du pic d'émission de la fluorescéine à 520 nm démontre la capacité des fonctions ADIBO à réagir avec la sonde FITC-N₃ du fait de la présence moins importante de DOTA sur les NP. Néanmoins, l'incorporation de DOTA a tendance à diminuer la quantité d'ADIBO initialement disponible : l'intensité de fluorescence mesurée pour la solution de **NP-ADIBO/DOTA(10)** est en effet presque deux fois moins importante que celle mesurée pour les **NP-ADIBO/DOTA(1)**.

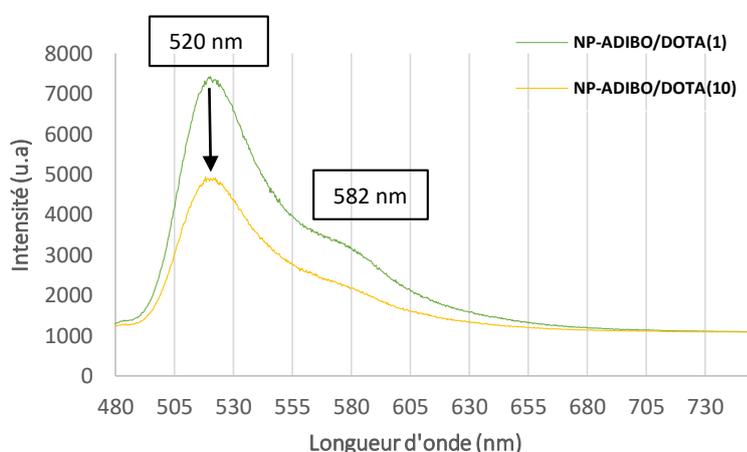


Figure 72 : Spectres de fluorescence des NP-ADIBO/DOTA(1) et NP-ADIBO/DOTA(10) après réaction avec la FITC-N₃.

c. Décrochage et analyse des NP par DLS et MET

Les NP ont ensuite été libérées du support CPG dans les conditions classiquement utilisées (DBU 0,1 M). Les études de cinétique de décrochage faites en amont sur les **NP-ADIBO/mDOTA** (cf. page 161) ont montré que la plus grande proportion de NP est décrochée au bout de 23 h de traitement en milieu basique. Une cinétique semblable est obtenue pour les **NP-ADIBO/DOTA(10)** potentiellement due au greffage des entités chélatantes à la surface des NP (**Figure 73**). A l'inverse, la courbe des **NP-ADIBO/DOTA(1)** présente une allure similaire à celle des **NP-ADIBO/NH₂** initiales et semblent confirmer qu'aucun ligand DOTA n'a été incorporé à la surface de ces NP.

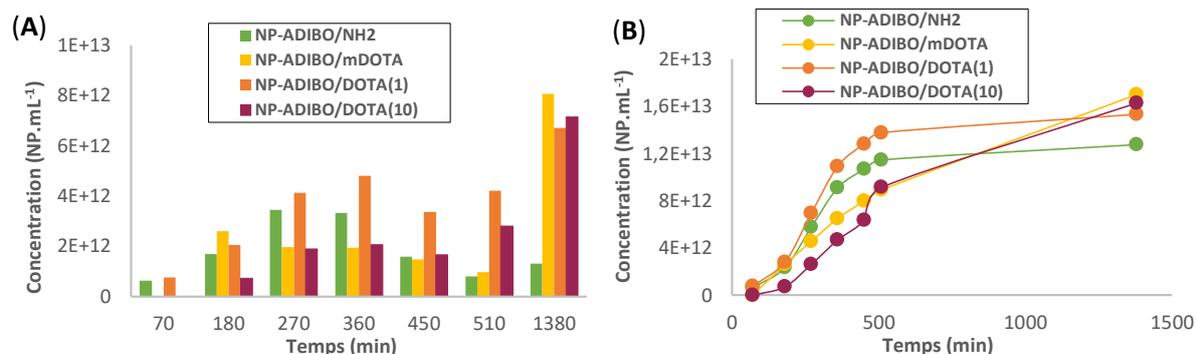
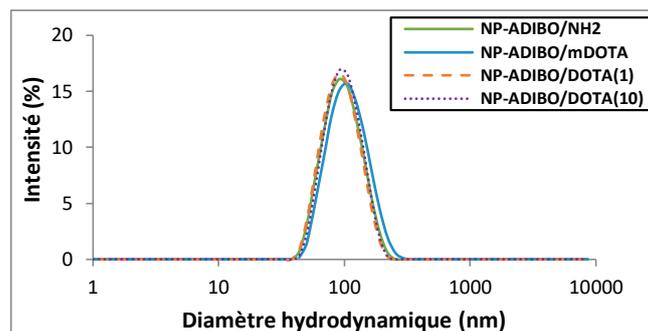


Figure 73 : Cinétique de décrochage des NP-ADIBO/DOTA(1) et NP-ADIBO/DOTA(10) en présence de DBU 0,1 M. (A) Concentrations de NP décrochées pour chaque temps, (B) Concentrations cumulées de NP décrochées dans le temps.

Par ailleurs, le greffage en présence de 10 équivalents de mDOTA sur les NP a aussi pu être démontré avec les analyses de DLS (**Figure 74**). En comparant les différents diamètres hydrodynamiques des NP, nous observons que celui des **NP-ADIBO/DOTA(10)** reste inchangé. Seule la diminution du potentiel zêta permet de confirmer le greffage de mDOTA sur ces NP.

De plus, les mesures de DLS obtenues avec les **NP-ADIBO/DOTA(1)** semblent corrélérer avec les observations faites lors des études de quantification et de cinétique de décrochage : les valeurs du diamètre hydrodynamique et du potentiel zêta sont en effet semblables à celles mesurées pour les **NP-ADIBO/NH₂** initiales suggérant qu'aucun DOTA n'a pu être incorporé sur les particules en présence d'un seul équivalent de mDOTA. Les différents lots de NP ont aussi été analysés en MET et démontrant le bon état de ces NP après quelques heures de traitement en milieu basique.



	Diamètre hydrodynamique (nm)	Pdl	Zeta (mV)
NP-ADIBO/NH ₂	90,46 ± 4,0	0,104	-42,8 ± 1,4
NP-ADIBO/mDOTA	99,77	0,106	-62,3
NP-ADIBO/mDOTA(1)	88,45	0,09	-42,1
NP-ADIBO/mDOTA(10)	92,57	0,081	-58,6

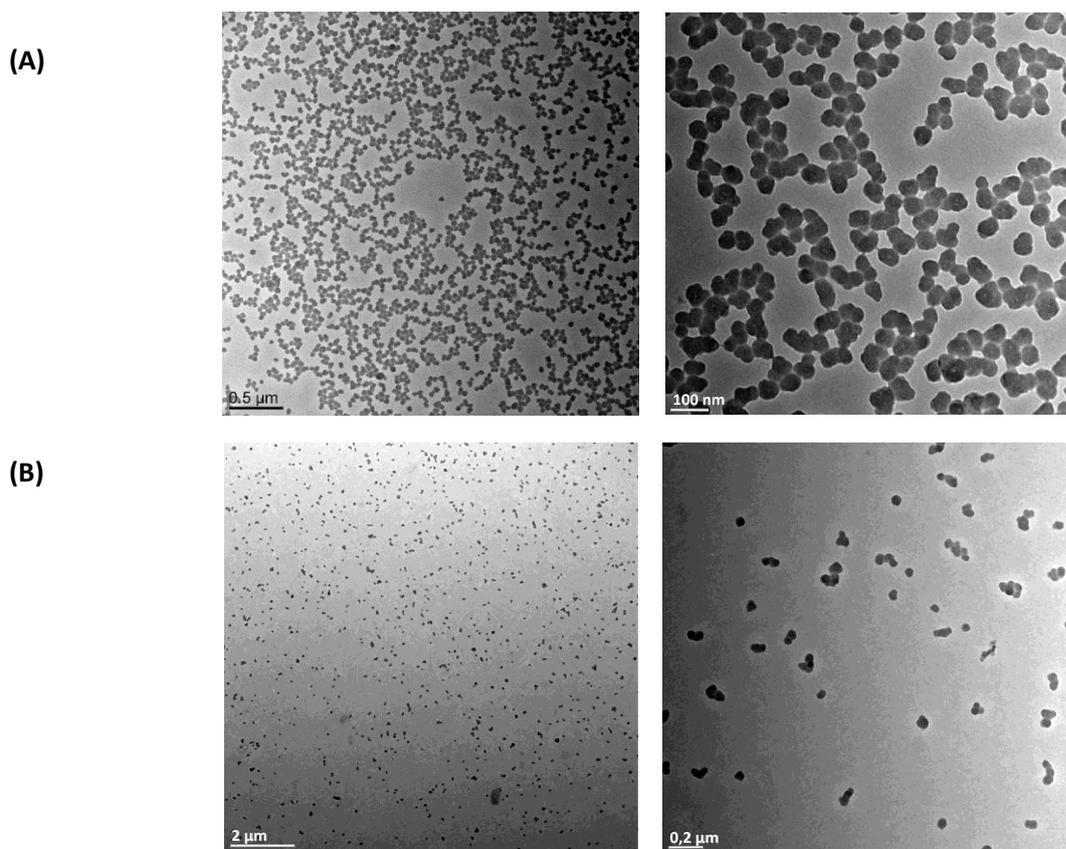


Figure 74 : Analyses de DLS et de MET (A) des NP-ADIBO/DOTA(1) et (B) des NP-ADIBO/DOTA(10).

2.3 Conclusion

La synthèse de deux lots différents de NP basée sur le greffage d'un équivalent (**NP-ADIBO/DOTA(1)**) ou de 10 équivalents (**NP-ADIBO/DOTA(10)**) de mDOTA a permis de valider l'hypothèse préalablement faite sur l'encombrement stérique apporté par les macrocycles qui empêchent les fonctions ADIBO d'être réactives. Tandis qu'aucun mDOTA ne semble avoir été greffé dans le cas des **NP-ADIBO/DOTA(1)**, la seconde approche concernant les **NP-ADIBO/DOTA(10)** s'est révélée plus efficace.

Une quantité moins importante de DOTA (~ 8000 par NP) a pu être incorporée avec succès à la surface des NP permettant la conception de **NP-ADIBO/DOTA** de 90 nm avec des entités bioorthogonales ADIBO réactives. La présence de DOTA sur les NP a été validée par DLS avec une diminution du potentiel zêta due aux fonctions carboxylate portées par les DOTA (-40 mV vs -60 mV). Les quantifications réalisées par spectrophotométrie UV/visible et les observations des temps de décrochage du support solide ont permis de confirmer la présence des DOTA en surface des NP. Les tests de fluorescence ont quant à eux permis de confirmer l'accessibilité et la réactivité des fonctions ADIBO vis-à-vis de la sonde fluorescente FTIC-N₃.

IV. Synthèse des NP-ADIBO/DOTA(Gd)

En vue du développement de NP radiosensibilisantes, le travail de fonctionnalisation des NP s'est poursuivi par l'étape de complexation d'ions Gd^{3+} par les macrocycles DOTA.

Pour réaliser une complexation, la partie chélatante doit être choisie avec soin pour maximiser les interactions ligand-métal et assurer la totale chélation du métal. Le chélate formé doit posséder une bonne stabilité thermodynamique et cinétique pour notamment éviter l'éventuelle dissociation du complexe conduisant au relargage du métal dans le milieu biologique. Dans le cas d'un métal lourd comme le gadolinium, sa dissociation peut entraîner une toxicité accrue dans les zones non cibles [231]. La dissociation du complexe ligand-ion peut être causée en présence de cations métalliques compétiteurs (Zn(II) et Ca(II)), à cause d'une variation de pH du milieu biologique provoquant une démétallation ou bien en milieu réducteur ou oxydant. C'est pourquoi, différents critères fondamentaux sont à respecter pour une complexation efficace telle que la charge, le nombre approprié d'atomes donneurs (coordinnence) et la taille de la cavité du macrocycle qui doit être adaptée au rayon ionique du métal utilisé.

Le gadolinium est un lanthanide (degré d'oxydation +III) signifiant qu'il possède une densité de charge élevée et qu'il est par conséquent peu polarisable. D'après la classification de Pearson, ce cation métallique est considéré comme un acide dur qui va donc être complexé par des atomes donneurs dits durs (théorie HSAB) comme l'oxygène ou l'azote pour former des liaisons à caractère électrostatique [232]. Les complexes les plus stables avec ce type de cation sont ceux adoptant une coordinnence 9. De ce fait, des ligands fonctionnalisés par des carboxylates, des phosphonates, des amines, des phénolates ou des thiols vont favoriser la formation de complexes stables thermodynamiquement avec le gadolinium. Plusieurs familles de ligands macrocycliques sont connues pour complexer efficacement les ions Gd^{3+} . C'est notamment le cas du DOTA qui possède la constante de stabilité la plus élevée avec un $\log K_{LM}$ élevé de 25,3 [233]. Ce ligand octadenté complexe les ions Gd^{3+} en réalisant une sphère de coordination N_4O_4 avec les quatre atomes d'azote du cycle ainsi que les quatre atomes d'oxygène des fonctions acide carboxylique. La dernière coordination est assurée par une molécule d'eau. Sa structure à l'état solide est connue et est représentée dans la **Figure 75** suivante :

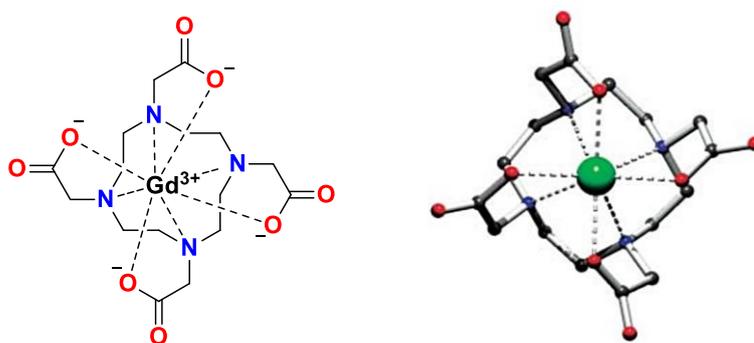


Figure 75 : Sphère de coordination du ligand DOTA [233]. Les atomes d'oxygène sont représentés en rouge et les atomes d'azote en bleu. La molécule d'eau n'est pas représentée pour plus de clarté.

1. Complexation du gadolinium *via* les NP-ADIBO/DOTA(10) en suspension

Dans un premier temps, des tests de complexation ont été effectués avec les **NP-ADIBO/DOTA(10)**. Pour cela, les NP sont d'abord libérées du support solide CPG afin d'éviter toute éventuelle décomplexation du gadolinium dans les conditions de décrochage utilisées. Des premiers essais de complexation ont été effectués avec les **NP-ADIBO/DOTA(10)** en suspension dans les conditions classiquement utilisées pour chélater le DOTA en solution ; à savoir dans l'eau en présence de chlorure de gadolinium, à pH 6,5 et à température ambiante. Cependant, les **NP-ADIBO/DOTA(10)** ne semblent pas stables et tendent à s'agréger dans ces conditions de réaction. En effet, elles sédimentent quasi instantanément après ajustement du pH à 6,5 avant même que le chlorure de gadolinium n'ait été ajouté (**Figure 76**). La charge de surface très négative stabilise les NP par répulsion électrostatique. En cas de variation de pH ces équilibres changent et peuvent déstabiliser les suspensions, pouvant expliquer l'agrégation observée dans notre cas. Fort de ces constatations, nous avons finalement réalisé la complexation des ions Gd^{3+} dans des conditions de pH un peu plus élevé (pH 8,0) qui permettent également la formation du complexe [234] (**Figure 77**). La quantité de gadolinium complexé par les DOTA présent sur les **NP-ADIBO/DOTA(10)** a ensuite été déterminée par dosage retour des filtrats de lavage issu de la purification des NP sur filtre Amicon 30K.



Figure 76 : Sédimentation des NP-ADIBO/DOTA(10) après ajustement du pH à 6,5.

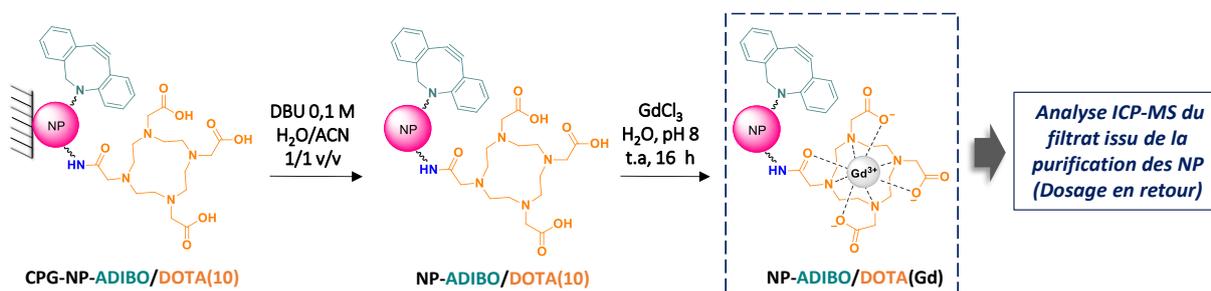


Figure 77 : Synthèse des NP-ADIBO/DOTA(Gd) par complexation du Gd(III) sur les NP-ADIBO/DOTA(10).

1.1 Quantification du nombre de gadolinium immobilisés sur les NP par ICP-MS

L'analyse ICP-MS est une technique analytique très sensible et idéale dans le cadre de notre étude puisqu'elle permet de détecter les métaux présents dans un échantillon à de très faibles concentrations (de l'ordre du ppb, partie par billion) afin d'en déterminer quantitativement la teneur. Dans notre cas, la quantité de gadolinium finalement chélaté est estimée par dosage retour en mesurant la quantité n'ayant pas réagi lors de la complexation.

Pour cela, les **NP-ADIBO/DOTA(Gd)** sont d'abord purifiées sur filtre Amicon 30K par des lavages successifs, puis l'eau et les différents filtrats de lavage sont regroupés afin d'être analysés. La quantité résiduelle de gadolinium dans le filtrat a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage en gadolinium, les valeurs obtenues lors de ce dosage étant données dans le **Tableau 12**.

Une diminution importante de la quantité de gadolinium est observée dans le surnageant. Une quantité finale de 0,019 nmol de gadolinium a été mesurée après contact avec les **NP-ADIBO/DOTA(10)** correspondant à une chélation (non totale) de 85 % (0,104 nmol) de gadolinium sur les particules. Toutefois, s'agissant de mesures réalisées par dosage retour des surnageants de lavage après réaction, nous nous sommes demandés si cette quantité chélatée *via* les DOTA présents sur les **NP-ADIBO/DOTA(10)** correspondait à du gadolinium réellement complexé ou bien à de l'adsorption non spécifique de celui-ci sur la silice des NP. Pour vérifier cette hypothèse, la complexation a également été réalisée sur un lot de **NP-ADIBO/NH₂** ne comportant pas de DOTA. Comme suspectée, une diminution importante de la quantité initiale de gadolinium, comme celle observée précédemment, a été obtenue. Il reste dans le surnageant 0,023 nmol de gadolinium après réaction avec les **NP-ADIBO/NH₂** correspondant à une immobilisation de 95% (0,407 nmol) de gadolinium et confirmant l'adsorption non spécifique sur les NP.

		[Gd] (ng/mL)	Quantité (nmol/mL)	Quantité (nmol)	Quantité de Gd immobilisé (%)
NP-ADIBO/NH ₂	Initiale	110,44	0,702	0,430	95
	Finale	5,94	0,038	0,023	
NP-ADIBO/DOTA(10)	Initiale	93,05	0,590	0,123	85
	Finale	3,57	0,023	0,019	

Tableau 12 : Résultats des analyses ICP-MS après réaction des NP-ADIBO/NH₂ ou NP-ADIBO/DOTA(10) avec le gadolinium.

Au vu des résultats obtenus, cette stratégie a été mise de côté au profit d'autres méthodes décrites dans la suite de ce manuscrit. En effet, cette approche reste trop incertaine et nécessite encore quelques mises au point afin d'assurer la complexation totale du gadolinium au sein des macrocycles. Pour pallier à l'adsorption, il serait notamment possible de rajouter dans la suspension de NP une solution de DOTA après réaction du gadolinium. Ces derniers joueraient le rôle de « scavengers » et pourrait permettre d'envisager un déplacement préférentiel du gadolinium vers ces entités chélatantes pour éliminer le gadolinium adsorbé.

2. Incorporation du gadolinium par chimie bioorthogonale sur les NP-ADIBO/NH₂

Dans la plupart des articles faisant référence à des NP de silice comportant du gadolinium, le métal est complexé au sein du chélatant avant d'être introduit sur les particules. Bien que la majorité des études concernent les NP de silice mésoporeuses, quelques-unes utilisent des NP de silice simples pour lesquelles l'entité chélatante est introduite à la surface des particules ou bien encapsulée pendant la procédure de formation des NP [235–238]. Notre seconde stratégie pour l'obtention de **NP-ADIBO/DOTA(Gd)** a donc consisté à incorporer le gadolinium en utilisant des molécules porteuses de DOXA préalablement complexés. Pour ce faire, nous avons décidé de mettre à profit les fonctions ADIBO des NP afin de greffer ces complexes par chimie bioorthogonale. Il est intéressant d'exploiter ici ce type de réaction, qui offre les avantages d'être hautement spécifique, irréversible et surtout rapide pour la fonctionnalisation des NP.

2.1 Incorporation du complexe N₃-PEG₄-DOXA(Gd) par ligation SPAAC

Notre première approche a été d'utiliser la réaction de type SPAAC pour introduire le gadolinium. Pour cela, nous avons décidé d'utiliser un complexe, noté **N₃-PEG₄-DOXA(Gd)**, porteur d'un motif bioorthogonal de type azoture (N₃) séparé du macrocycle DOXA par l'intermédiaire d'un espaceur de type tétraéthylène glycol (PEG₄) afin de faciliter la ligation ADIBO/N₃. Celle-ci est synthétisée à partir du **mDOXA** dont la préparation a déjà été décrite précédemment (cf. page 155) et du **N₃PEG₄NH₂** synthétisé en trois étapes à partir du tétraéthylène glycol commercial (**Schéma 3**) introduit *via* une liaison peptidique. La fonctionnalisation du DOXA par des fonctions acides carboxyliques permet de complexer efficacement le gadolinium, sa coordination est assurée par les trois oxygènes des bras acides, les 4 azotes du macrocycle, ainsi que l'oxygène ou l'azote de la liaison peptidique.

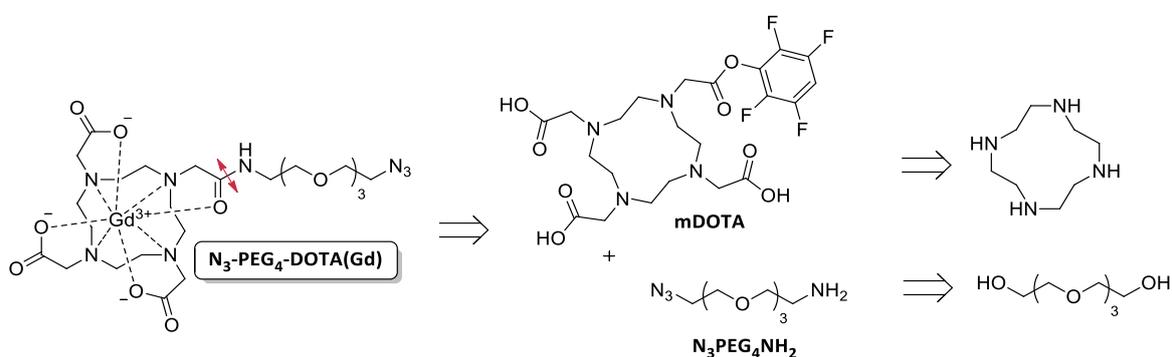
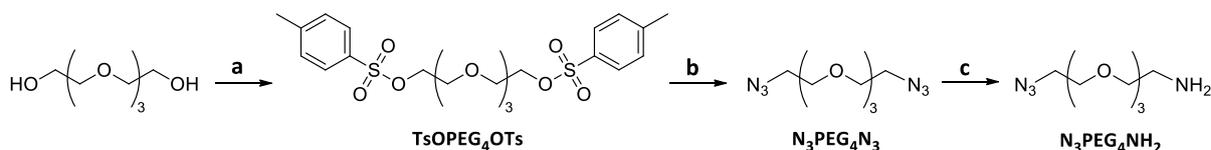


Schéma 3 : Schéma rétrosynthétique d'obtention du complexe N₃-PEG₄-DOXA(Gd).

Nous présenterons d'abord la synthèse de l'espaceur tétraéthylène glycol puis celle du ligand **N₃-PEG₄-DOXA** pour terminer par sa complexation avec le gadolinium.

a. Synthèse de l'espaceur $N_3PEG_4NH_2$

Ce composé est synthétisée en trois étapes avec un rendement global de 49% à partir du tétraéthylène glycol (**Schéma 4**) [239].



a : TsCl, TEA, DCM, t.a, 16 h, 98 %; b : NaN_3 , $NaHCO_3$ sat., 120 °C, 20 h, 99 %; c : PPh_3 , H_3PO_4 , H_2O , Et_2O , t.a, 20 h, 50 %.

Schéma 4 : Synthèse de l'espaceur tétraéthylène glycol $N_3PEG_4NH_2$.

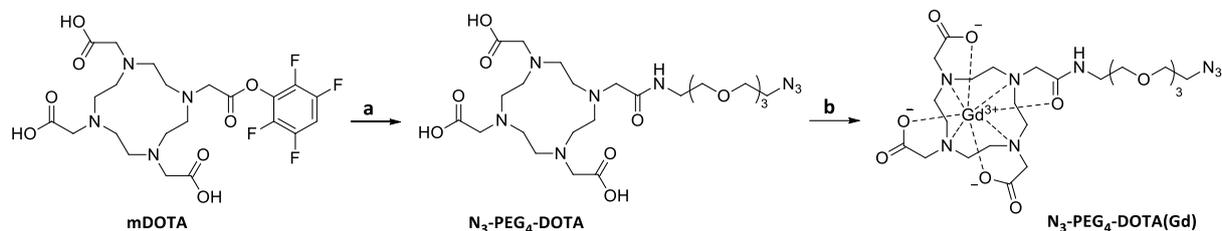
Dans un premier temps, les deux fonctions alcool du tétraéthylène glycol commercial sont activées sous forme de tosylates, en présence de chlorure de tosylate, de triéthylamine et d'une quantité catalytique de diméthylaminopyridine pour conduire au ditosylate correspondant (**TsO-PEG₄-OTs**) avec un rendement de 98 % après purification par chromatographie sur gel de silice.

Le ditosylate est ensuite mis en présence d'un excès d'azoture de sodium dans une solution aqueuse saturée de $NaHCO_3$ à reflux afin d'obtenir le diazoture correspondant (**N_3 -PEG₄- N_3**) qui est utilisé dans l'étape suivante sans purification. Dans un dernier temps, une des fonctions azoture du composé **N_3 -PEG₄- N_3** est réduite en fonction amine de façon sélective grâce à la réaction de type Staudinger, et ce, en présence de triphénylphosphine dans une solution d'acide phosphorique 0,65 M. Le plus difficile dans cette réaction est de réussir à éliminer la totalité de l'oxyde de phosphine formé lors de l'hydrolyse. Des basifications successives à l'hydroxyde de potassium suivies d'extractions de la phase aqueuse au dichlorométhane permettent finalement de conduire au composé **N_3 -PEG₄- NH_2** avec un rendement de 50 % sans purification supplémentaire.

b. Synthèse du complexe N_3 -PEG₄-DOTA(Gd)

Une fois l'espaceur **N_3 -PEG₄- NH_2** en notre possession, nous avons pu faire réagir la fonction amine de ce composé avec l'ester activé du DOTA. Afin d'obtenir le **N_3 -PEG₄-DOTA**, nous avons envisagé une première voie de synthèse dans laquelle l'amine réagit avec le mDOTA protégé (**mDOTA-3tBu**), cette forme étant plus stable et pouvant se conserver plus longtemps. Le composé issu de cette réaction a pu être obtenu en présence de triéthylamine avec un rendement de 56 % de rendement après purification par chromatographie sur gel de silice. Cependant, les conditions acides utilisées lors de l'étape de déprotection des *tert*-butyles semblaient entraîner la coupure de la liaison amide située entre le DOTA et l'espaceur PEGylé. En effet, le spectre RMN 1H ne présentait plus les signaux spécifiques du « massif PEG » normalement situés dans la zone de 3,5 à 3,6 ppm. De plus, aucune bande d'absorption à 2100 cm^{-1} caractéristique de la fonction azoture n'était visible en spectroscopie IR.

Ces résultats nous ont donc conduit à effectuer l'étape de déprotection avant d'envisager le couplage du N_3 -PEG₄-NH₂ (Schéma 5). Cette nouvelle voie de synthèse permet finalement d'obtenir le N_3 -PEG₄-DOTA avec 65 % de rendement après purification par HPLC préparative sur phase inverse. Ce composé est ensuite engagé dans la réaction de complexation, en présence de chlorure de gadolinium dans l'eau à pH 6,5. A ce pH les acides carboxyliques du DOTA sont déprotonés ce qui favorise la chélation des ions Gd³⁺. Le N_3 -PEG₄-DOTA(Gd) est obtenu après purification par HPLC préparative sur phase inverse avec 76 % de rendement. L'analyse HRMS a permis de confirmer la masse attendue pour ce complexe, [M+H]⁺ calculée pour C₂₄H₄₂GdN₈O₁₀ 760,2265; mesurée 760,2274 (Figure 78).



a : N_3 PEG₄NH₂, TEA, DMF, t.a, 16 h, 65 %; b : GdCl₃, H₂O, pH 6,5, 16 h, 76 %.

Schéma 5 : Synthèse du complexe N_3 -PEG₄-DOTA(Gd).

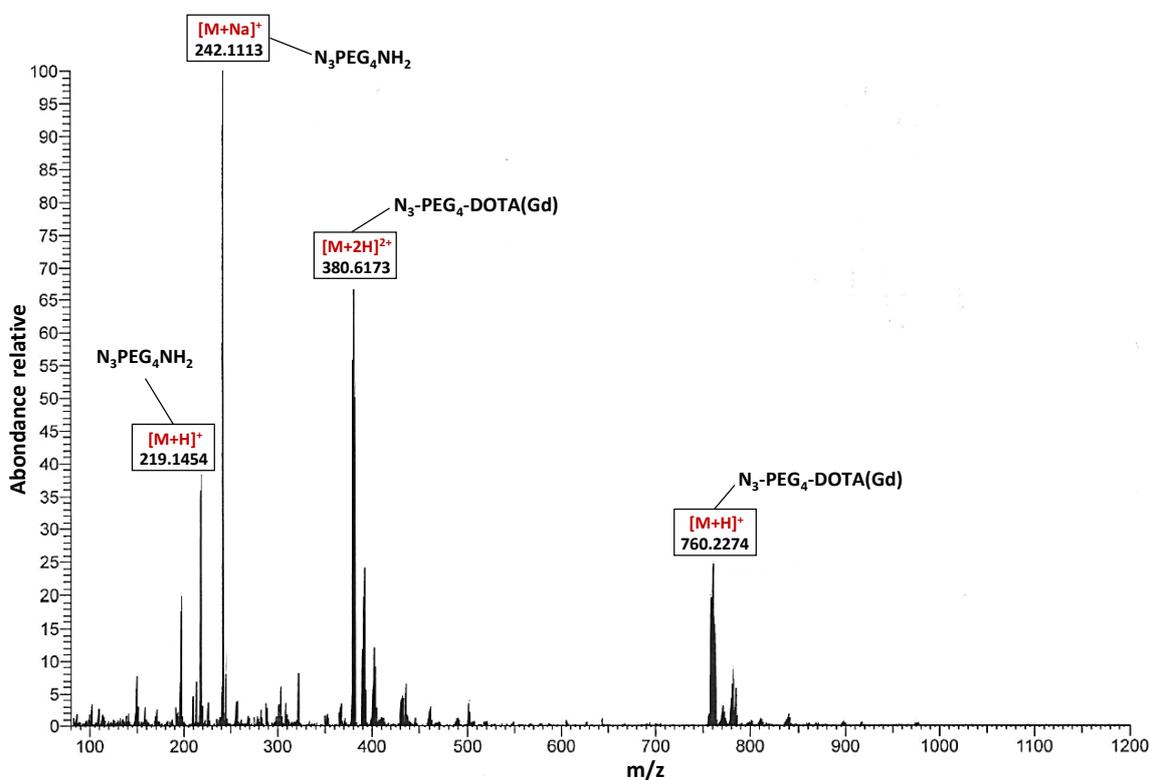


Figure 78 : Spectre de masse du complexe N_3 -PEG₄-DOTA(Gd).

Par ailleurs, le complexe a également été analysé par ICP-MS couplé à l'HPLC en phase inverse qui permet de donner de bonnes informations sur la qualité du complexe synthétisé. Cette étude est le fruit d'une collaboration avec le Dr Agnès Hagège, chercheur à l'ISA de Villeurbanne.

Grâce à cette technique il a été possible de distinguer les proportions de gadolinium complexé de celles du gadolinium libre. Les chromatogrammes obtenus après trois injections successives d'une solution de N_3 -PEG₄-DOTA(Gd) à 11 mM confirment l'efficacité de la complexation (aires sous les pics, temps de rétention) (Figure 79).

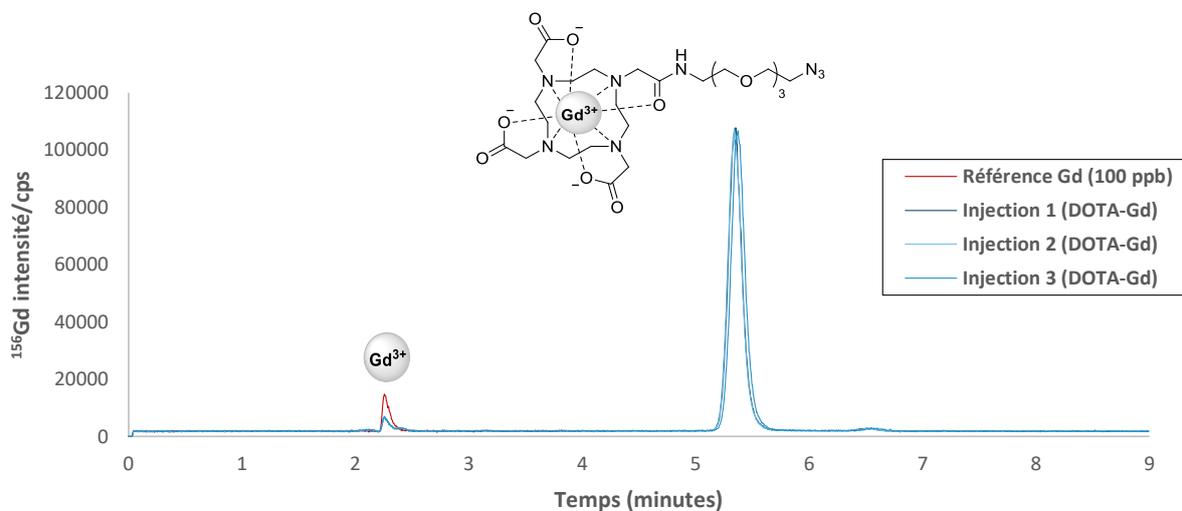


Figure 79 : Chromatogramme HPLC-ICP-MS de la solution de N_3 -PEG₄-DOTA(Gd) à 11 mM.

Après analyse des aires sous les pics, nous observons que 97 % du gadolinium est présent sous la forme complexée avec un temps de rétention moyen de 5,35 min alors que seulement 3 % de gadolinium est présent sous la forme libre avec un temps de rétention moyen en de 2,26 min (Tableau 13). Le temps de rétention du gadolinium non complexé a pu être confirmé après injection d'une solution standard de l'isotope du ¹⁵⁶Gd à 100 ppb comme indiqué par le pic en rouge sur le chromatogramme.

	Injection	Temps de rétention (min) ^a	Aire	Aire (%)	Concentration (ppb)
Gd libre	1	2,25	28205	2,93	44,52
	2	2,26	29570	3,05	46,67
	3	2,26	29287	2,99	46,22
Gd complexé	1	5,35	932926	97,07	1464,26
	2	5,34	940838	96,95	1476,68
	3	5,37	949863	97,01	1490,84

Tableau 13 : Proportion de Gd libre et complexé après analyse HPLC-ICP-MS de la solution de N_3 -PEG₄-DOTA(Gd).

c. Greffage supporté du complexe N_3 -PEG₄-DOTA(Gd)

La première stratégie envisagée a été de greffer le composé N_3 -PEG₄-DOTA(Gd) par voie supportée, c'est-à-dire sur les CPG-NP-ADIBO/NH₂. Pour cela, la CPG-NP-ADIBO/NH₂ est mis en réaction avec un équivalent du complexe N_3 -PEG₄-DOTA(Gd) (calculé par rapport au nombre de mole d'ADIBO) dans l'eau à température ambiante pendant 16 h, afin de ne pas saturer la totalité des fonctions ADIBO disponibles (Figure 80). La procédure habituelle est ensuite réalisée, à savoir que le surnageant contenant le complexe n'ayant pas réagi est éliminé, puis le support est lavé et enfin les NP correspondantes sont décrochées (DBU 0,1 M). Le surnageant de réaction ainsi que les eaux de lavage sont regroupés puis analysés par ICP-MS afin de d'estimer la quantité de complexe finalement incorporé par dosage en retour.

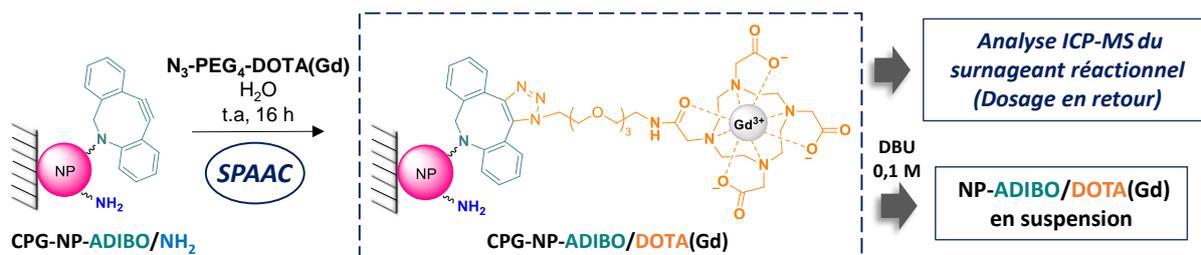


Figure 80 : Greffage supporté du complexe N_3 -PEG₄-DOTA(Gd) par liaison SPAAC.

Cependant, les analyses réalisées sur le surnageant après contact de N_3 -PEG₄-DOTA(Gd) avec le support CPG-NP-ADIBO/NH₂ ont révélé l'absence de gadolinium. Nous avons alors émis deux hypothèses auxquelles l'ICP-MS ne peut pas répondre ; soit le complexe N_3 -PEG₄-DOTA(Gd) ne réagit pas avec les ADIBO présents sur CPG-NP-ADIBO/NH₂, soit la réaction a effectivement lieu mais le gadolinium se décomplexe dans les conditions de décrochage utilisées (DBU 0,1 M). Pour répondre à ces suppositions, nous avons décidé d'utiliser la sonde fluorescente FITC-N₃ afin de vérifier si la fixation du complexe N_3 -PEG₄-DOTA(Gd) sur CPG-NP-ADIBO/NH₂ induisait ou non une diminution de la quantité de fonctions ADIBO par rapport au CPG-NP-ADIBO/NH₂ initiales.

La sonde FITC-N₃ est ainsi mise en réaction avec le support solide avant (CPG-NP-ADIBO/NH₂) et après réaction (CPG-NP-ADIBO/DOTA(Gd)) avec le complexe. Cette stratégie revient finalement à suivre le protocole expérimental décrit en page 160. Une fois, les NP décrochées du support, celles-ci sont analysées en fluorescence afin de comparer l'intensité de fluorescence initiale (NP-ADIBO/NH₂) et finale (NP-ADIBO/DOTA(Gd)) de la FITC mesurée à 520 nm. Le spectre de fluorescence obtenu semble confirmer l'incorporation du complexe azoture sur les NP. En effet, nous observons une diminution de la fluorescence à 520 nm avec les NP-ADIBO/DOTA(Gd) validant la présence moins importante de fonctions ADIBO par rapport aux NP-ADIBO/NH₂ initiales (Figure 81).

Il semble donc que N_3 -PEG₄-DOTA(Gd) ait bien réagi avec les groupements ADIBO présents sur les NP mais que les ions Gd³⁺ se décomplexent lors du décrochage des NP. Face à ces observations, nous avons envisagé d'incorporer le complexe N_3 -PEG₄-DOTA(Gd) directement sur les NP-ADIBO/NH₂ en suspension et non plus de façon supportée.

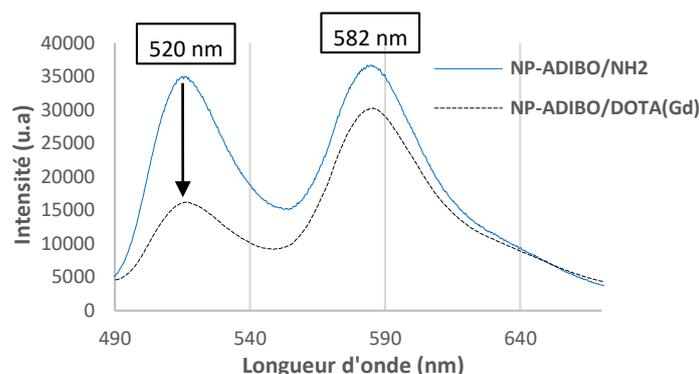


Figure 81 : Spectre de fluorescence des NP mises en présence de FITC- N_3 avant et après incorporation du complexe N_3 -PEG $_4$ -DOTA(Gd).

d. Greffage du complexe N_3 -PEG $_4$ -DOTA(Gd) sur les NP-ADIBO/ NH_2 en suspension

Dans cette partie, la première voie envisagée pour la synthèse des NP-ADIBO/DOTA(Gd) en suspension a consisté à faire réagir un équivalent de N_3 -PEG $_4$ -DOTA(Gd) par rapport au nombre de mole d'ADIBO avec les NP-ADIBO/ NH_2 préalablement décrochées, dans l'eau à température ambiante pendant 16 h. Les NP sont ensuite purifiées sur filtre Amicon 30K par des lavages successifs à l'eau puis les filtrats de lavage contenant le complexe qui n'a pas réagi sont réunis afin d'être analysés en ICP-MS (Figure 82).

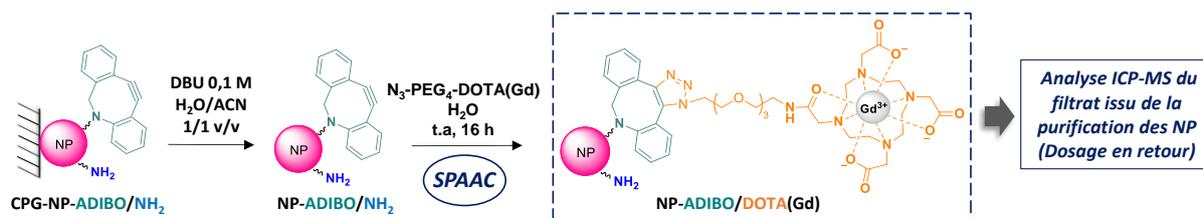


Figure 82 : Greffage du complexe N_3 -PEG $_4$ -DOTA(Gd) sur les NP-ADIBO/ NH_2 en suspension par ligation SPAAC.

Dans ce cas, les analyses HPLC-ICP-MS du surnageant démontre qu'il y a autant de gadolinium avant et après réaction avec les NP-ADIBO/ NH_2 (Tableau 14). Comme pour la synthèse supportée précédente, nous pouvons supposer que le complexe N_3 -PEG $_4$ -DOTA(Gd) ne réagit pas avec les fonctions ADIBO présentes sur les NP après décrochage. Or, les mesures de fluorescence avec la FITC- N_3 sur les NP en suspension ont été un échec et ne nous ont pas permis de valider cette supposition. En présence de fluorescéine, les NP restent absorbées sur le filtre Amicon 30K lors de l'étape de purification.

		[Gd] (ng/mL)	Quantité (nmol/mL)	Quantité (nmol)	Quantité de Gd immobilisé (%)
NP-ADIBO/DOTA(Gd) 1 éq. de <i>N</i> ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd)	Initiale	5338	33,9	17	ND*
	Finale	3746	23,8	18,9	
NP-ADIBO/DOTA(Gd) 5 éq. de <i>N</i> ₃ -PEG ₄ -DOTA(Gd)	Initiale	20 606	131	26,9	2 (non significatif)
	Finale	6277	39,9	26,3	

*ND : non déterminé.

Tableau 14 : Résultats des analyses ICP-MS des filtrats de lavage après réaction des NP-ADIBO/NH₂ avec 1 éq. ou 5 éq. du complexe *N*₃-PEG₄-DOTA(Gd).

Par ailleurs, nous avons également émis l'hypothèse que le gadolinium pouvait se décomplexer dans ces conditions de réaction ou bien que le nombre d'équivalent utilisé n'était peut-être pas suffisamment élevé. C'est pourquoi nous avons finalement décidé de refaire cette réaction en faisant réagir cinq équivalents de *N*₃-PEG₄-DOTA(Gd) avec les NP-ADIBO/NH₂ et d'analyser les filtrats de lavage en HPLC-ICP-MS afin de distinguer les proportions de gadolinium libre/complexé. Les résultats ICP-MS semblent démontrer qu'une infime quantité de gadolinium (0,6 nmol) se soit cette fois-ci immobilisée sur les NP (**Tableau 14**) ; cependant, cette valeur ne paraît pas assez significative compte tenu des possibles erreurs de pipetage à prendre en compte. De plus, le chromatogramme obtenu par HPLC-ICP-MS démontre qu'il ne s'agit pas d'un problème de décomplexation du gadolinium, le complexe étant stable dans ces conditions de réaction (**Figure 83**).

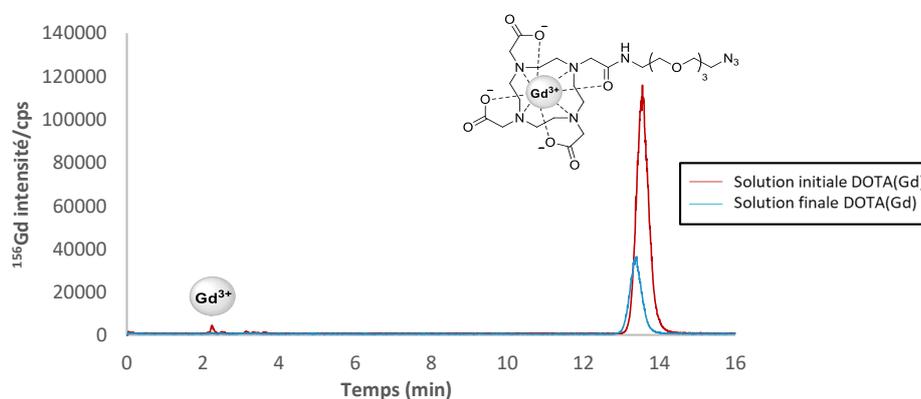


Figure 83 : Chromatogramme HPLC-ICP-MS de la solution de *N*₃-PEG₄-DOTA(Gd) avant et après réaction avec les NP-ADIBO/NH₂.

Il semble donc que cette méthode ne permette pas l'immobilisation efficace du complexe *N*₃-PEG₄-DOTA(Gd) à la surface des NP. Il est possible que la charge négative portée par l'azoture sous sa forme zwitterionique (-N=N⁺=N⁻) soit engagée dans la sphère de coordination du gadolinium, le rendant ensuite indisponible pour réagir avec les fonctions ADIBO (**Figure 84**).

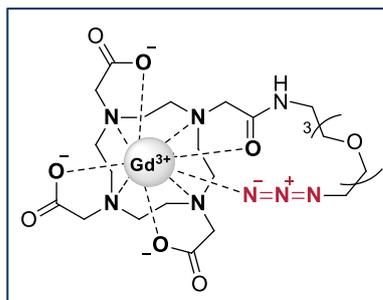


Figure 84 : Sphère de coordination supposée du complexe $N_3\text{-PEG}_4\text{-DOTA}(\text{Gd})$.

Ceci reste une simple supposition puisque seule la structure cristalline peut permettre de mieux connaître les propriétés coordinantes de notre ligand. A ce jour, un seul essai de cristallisation par évaporation lente a été réalisé mais n'a permis d'aboutir à la cristallisation du complexe.

2.2 Incorporation du complexe Tz-PEG₄-DOTA(Gd) par ligation IEDDA

Face aux différents résultats obtenus avec la ligation de SPAAC, notre seconde approche a été d'utiliser la réaction bioorthogonale de type IEDDA pour incorporer le gadolinium. Il s'agit en effet de la dernière réaction bioorthogonale envisageable vis-à-vis des fonctions ADIBO des NP. Pour cela, un autre complexe, noté **Tz-PEG₄-DOTA(Gd)**, porteuse d'un motif bioorthogonal de type tétrazine (Tz) a été synthétisée. Comme pour le complexe azoture précédent, l'entité bioorthogonale est séparée du macrocycle DOTA par l'intermédiaire d'un espaceur de type tétraéthylène glycol (PEG₄) afin de faciliter la ligation ADIBO/Tz. Notre choix s'est porté sur l'utilisation de la **Tz-PEG₄-DOTA**, celle-ci ayant déjà été utilisée par notre laboratoire dans une étude de radioimmunothérapie préciblée [240]. Ce ligand est certes plus difficile à synthétiser mais nous espérons *via* l'utilisation de cette réaction augmenter les chances de ligation de notre complexe avec les fonctions ADIBO. La IEDDA possède une cinétique de réaction 1000 fois plus importante que la SPAAC utilisée précédemment ($10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ vs $10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [220]. De plus, la tétrazine n'étant pas sous forme zwitterionique, elle ne pourra pas participer à la complexation du gadolinium comme nous le supposons avec le groupement azoture pour le **N₃-PEG₄-DOTA(Gd)**.

Le complexe **Tz-PEG₄-DOTA(Gd)** est constitué de l'assemblage du DOTA-NHS commercial et de la **Tz-PEG₄-NH₂** *via* une liaison peptidique. Cette dernière est issue du couplage entre un espaceur tétraéthylène glycol diaminé (PEG₄) dont l'une des amines est protégée par un groupe fonctionnel *tert*-butoxycarbonyle (**NH₂-PEG₄-NHBoc**) et le motif bioorthogonal tétrazine constitué d'un bras acide (**Tz-COOH**) (Schéma 6).

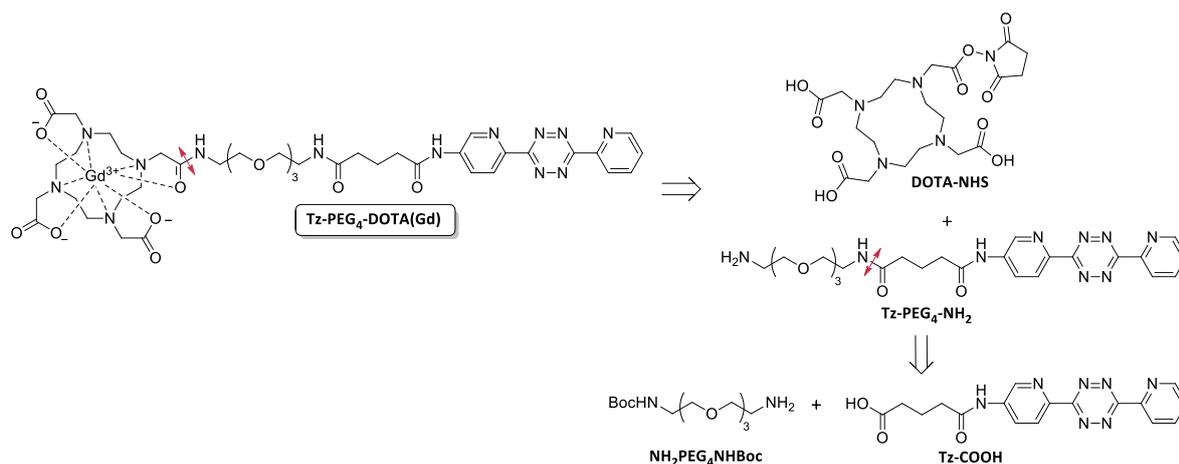


Schéma 6 : Schéma rétrosynthétique d'obtention du complexe Tz-PEG₄-DOTA(Gd).

Les synthèses de ces différentes molécules sont présentées plus en détails ci-dessous. Nous présenterons la synthèse de l'espaceur tétraéthylène glycol en premier, suivie de celle de la tétrazine, pour terminer par la synthèse du ligand **Tz-PEG₄-DOTA** et sa complexation.

a. Synthèse de l'espaceur NH₂-PEG₄-NHBoc

La synthèse de cet espaceur reprend le **N₃-PEG₄-NH₂** dont la synthèse en trois étapes a été décrite précédemment (cf. page 173). Le **NH₂-PEG₄-NHBoc** est donc obtenu en cinq étapes avec un rendement global de 33 % à partir du tétraéthylène glycol commercial (**Schéma 7**).

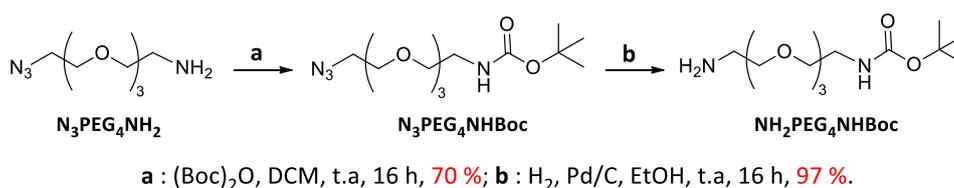
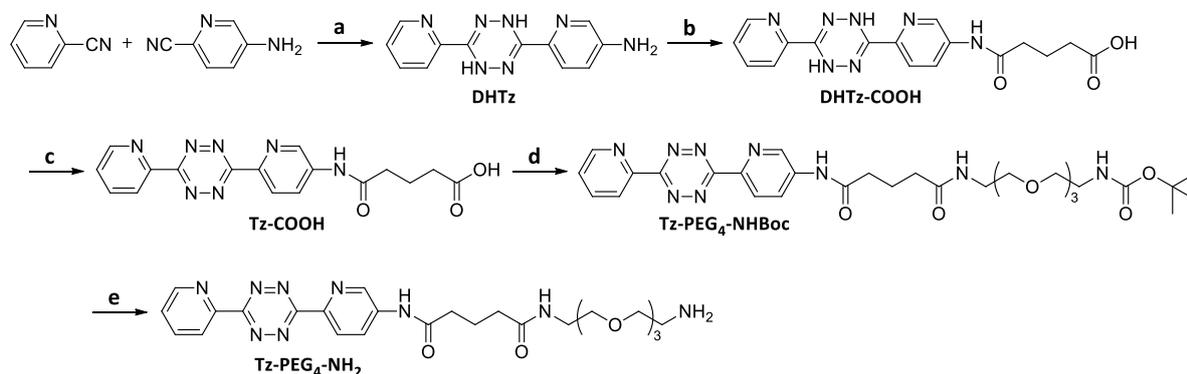


Schéma 7 : Synthèse de l'espaceur tétraéthylène glycol NH₂PEG₄NHBoc.

Dans un premier temps, la fonction amine du dérivé **N₃-PEG₄-NH₂** est protégée en présence de carbonate de di-*tert*-butyle dans le dichlorométhane à température ambiante pendant 16 h pour conduire après purification par chromatographie sur gel de silice à l'espaceur **N₃-PEG₄-NHBoc** avec un rendement de 70 % [241]. Le produit finalement souhaité (**NH₂-PEG₄-NHBoc**) est obtenu avec un rendement de 97 % après réduction de la fonction azoture en amine par hydrogénation pallado-catalysée (palladium sur charbon) pendant 16 h à température ambiante dans l'éthanol [242].

b. Synthèse de l'entité bioorthogonale Tz-PEG₄-NH₂

Une fois l'espaceur PEGylé synthétisé, nous avons pu nous focaliser sur la synthèse du motif tétrazine nécessaire à l'obtention du ligand **Tz-PEG₄-DOTA** et en particulier à la ligation avec les fonctions ADIBO des NP (**Schéma 8**).



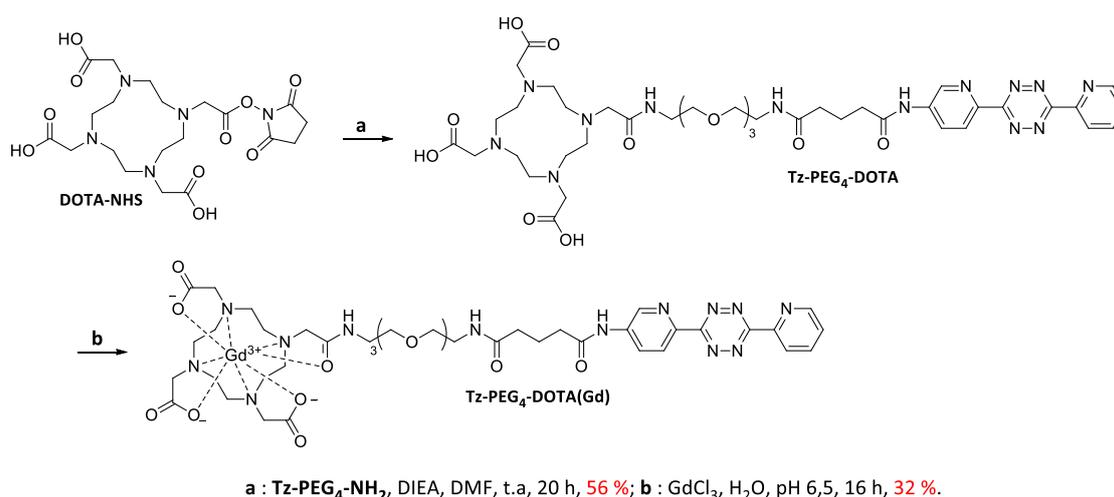
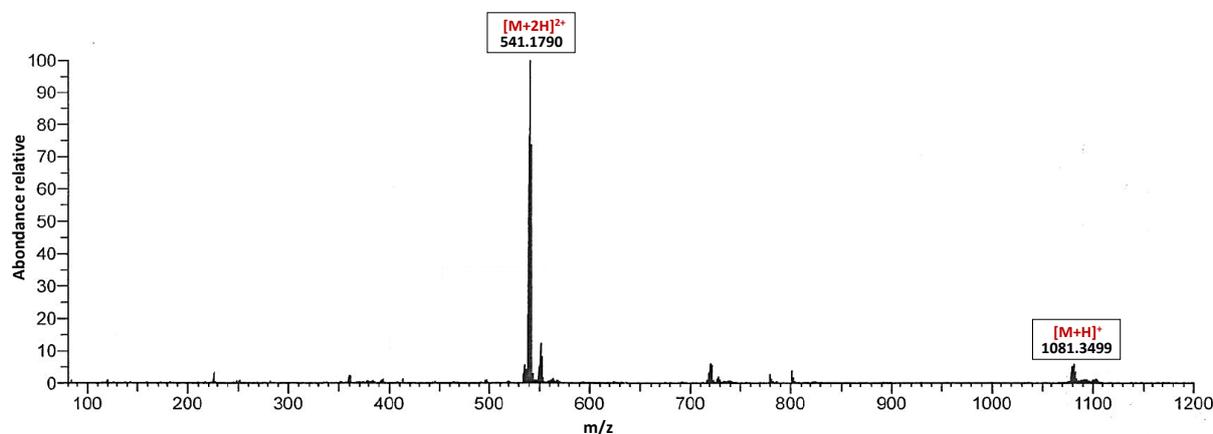
a : NH₂NH₂, 90°C, 12 h, **24 %**; b : anhydride glutarique, ACN, 60°C, 16 h, **82 %**;
 c : NaNO₂, AcOH, t.a, 10 min, **89 %**; d : NH₂PEG₄NHBoc, BOP, DIEA, t.a, 22 h, **52 %**;
 e : TFA, DCM, 0°C puis t.a, 1 h, **quant.**

Schéma 8 : Synthèse de la Tz-PEG₄-NH₂.

En premier lieu, la dihydratétrazine (**DHTz**) est synthétisée à partir de la 2-cyanopyridine et la 5-amino-2-cyanopyridine commerciales mises en présence d'hydrazine monohydrate chauffée à 90 °C pendant 12 h permettant l'obtention du composé avec un rendement de 24 % après purification par chromatographie sur gel de silice [243]. L'ajout d'un bras acide est ensuite réalisé en faisant réagir la **DHTz** avec de l'anhydride glutarique dans l'acétonitrile pour conduire à la **DHTz-COOH** après un lavage à l'éther avec un rendement de 82 % [244]. Ce composé est ensuite oxydé en présence de NaNO₂ dans l'acide acétique glacial pendant 10 min afin d'obtenir la **Tz-COOH** avec 89 % de rendement sans purification supplémentaire. L'espaceur **NH₂-PEG₄-NHBoc** synthétisé précédemment est couplé avec la **Tz-COOH** en présence de BOP et de DIPEA dans le *N,N*-diméthylformamide à température ambiante pendant 22 h pour conduire à la **Tz-PEG₄-NHBoc** après purification sur gel de silice avec un rendement de 52 % [240]. Dans une dernière étape, l'ester de *tert*-butyle est hydrolysé en présence de TFA pendant 1 h pour fournir quantitativement la tétrazine **Tz-PEG₄-NH₂** sans purification. L'entité bioorthogonale tétrazine a donc pu être synthétisée en cinq étapes avec un rendement global de 9%.

c. Synthèse du complexe Tz-PEG₄-DOTA(Gd)

Une fois la tétrazine en notre possession, nous avons pu procéder à son couplage avec le DOTA-NHS commercial en vue de l'obtention du ligand d'intérêt de type **Tz-PEG₄-DOTA** (Schéma 9). Ce composé est obtenu en faisant réagir la **Tz-PEG₄-NH₂** avec le DOTA-NHS en présence de DIPEA dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre à température ambiante pendant 20 h [240]. Cette voie de synthèse permet de conduire au ligand non complexé avec un rendement de 56 % après purification par HPLC préparative sur phase inverse. Ce ligand est ensuite complexé selon le protocole décrit dans la partie précédente (cf. page 174), à savoir en présence de chlorure de gadolinium dans l'eau à pH 6,5 pour conduire au complexe **Tz-PEG₄-DOTA(Gd)** avec un rendement de 32 % après purification par HPLC préparative sur phase inverse. L'analyse HRMS a permis de confirmer la masse attendue pour ce complexe, $[M+2H]^{2+}$ calculée pour C₄₁H₅₈GdN₁₃O₁₂ 541,1779; mesurée 541,1790 (Figure 85).

Schéma 9 : Synthèse du complexe Tz-PEG₄-DOTA(Gd).Figure 85 : Spectre de masse du complexe Tz-PEG₄-DOTA(Gd).

Ce complexe a donc pu être synthétisé avec un rendement global de 18 % en deux étapes et a pu être engagé dans l'étape de greffage avec les **NP-ADIBO/NH₂** en suspension.

d. Greffage du complexe Tz-PEG₄-DOTA(Gd) sur les NP-ADIBO/NH₂ en suspension

La voie envisagée pour la synthèse des **NP-ADIBO/DOTA(Gd)** en suspension se base sur celle déjà utilisée dans la partie précédente concernant les essais de greffage réalisés avec **N₃-PEG₄-DOTA** (cf. page 177). Elle consiste à faire réagir un équivalent du complexe **Tz-PEG₄-DOTA(Gd)** (par rapport au nombre de mole d'ADIBO) avec les **NP-ADIBO/NH₂** préalablement décrochées, dans l'eau à température ambiante pendant 16 h, en espérant ne pas saturer les fonctions ADIBO présentes sur les NP. Les NP obtenues sont ensuite purifiées sur filtre Amicon 30K par des lavages successifs à l'eau puis les filtrats de lavage contenant le complexe qui n'a pas réagi sont réunies afin d'être analysées par ICP-MS (**Figure 86**).

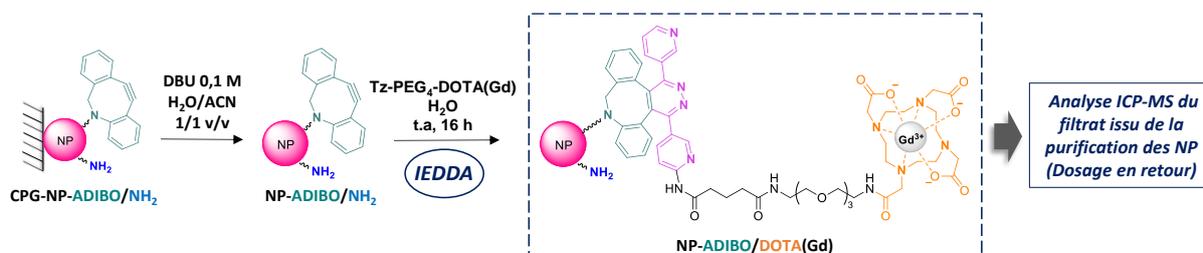


Figure 86 : Greffage du complexe Tz-PEG₄-DOTA(Gd) sur les NP-ADIBO/NH₂ en suspension par ligation IEDDA.

Les analyses ICP-MS démontre une diminution de la quantité de gadolinium dans les filtrats de lavage après réaction avec les **NP-ADIBO/NH₂** (**Tableau 15**). En effet, l'analyse des résultats indique qu'il reste 3,3 nmol de gadolinium dans le filtrat soit 52 % du complexe n'ayant pas réagi, ce qui correspond à une immobilisation 48 % (3,12 nmol) de **Tz-PEG₄-DOTA(Gd)** sur les particules.

		[Gd] (ng/mL)	Quantité (nmol/mL)	Quantité (nmol)	Quantité de Gd immobilisé (%)
NP-ADIBO/DOTA(Gd) 1 éq. de Tz-PEG₄-DOTA(Gd)	Initiale	1378	8,76	6,45	48
	Finale	712	4,53	3,33	

Tableau 15 : Résultats des analyses ICP-MS des filtrats de lavage après réaction des NP-ADIBO/NH₂ avec 1 éq du complexe Tz-PEG₄-DOTA(Gd).

Grâce à ces données, il est ensuite possible d'estimer le nombre total de gadolinium immobilisé par NP ($R_{NP-ADIBO/DOTA(Gd)}$) grâce à l'Équation 4 ci-dessous permettant d'en déduire que ~ 2 000 atomes de gadolinium sont présents par NP.

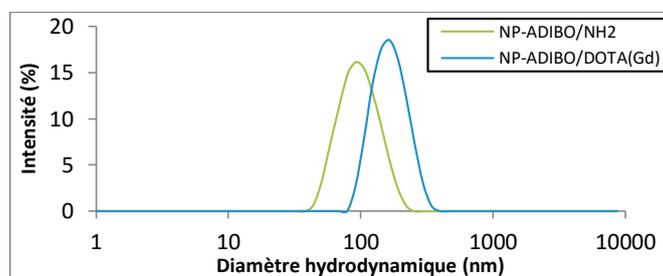
$$R = \frac{N_{Tz-PEG4-DOTA(Gd)}}{N_{NP}} = \frac{(n_{iGd} - n_{fGd}) \times N_A \times \epsilon_{561 NP}}{A_{561}}$$

$$\text{Avec } n_{iGd} \text{ et } n_{fGd} = [Gd]_{i \text{ ou } f} \times M_{Gd} \times V$$

n_{iGd}	n_{fGd}	$N_{Tz-PEG4-DOTA(Gd)}$	N_{NP}	R
6,45	3,33	$1,88 \cdot 10^{15}$	$9,46 \cdot 10^{11}$	$\sim 2\,000$

Équation 4 : Calcul du ratio de Gd par NP. n_{iGd} : quantité de matière de Gd avant réaction avec les nanoparticules (en nmol), n_{fGd} : quantité de matière de Gd après réaction avec les nanoparticules (en nmol), $[Gd]_i$: concentration de Gd avant réaction avec les nanoparticules (en ng/mL), $[Gd]_f$: concentration de Gd après réaction avec les nanoparticules (en ng/mL), M_{Gd} : masse molaire du Gd (en ng.mol⁻¹), V : volume du surnageant de réaction (en mL), N_A : nombre d'Avogadro (en nmol⁻¹), $\epsilon_{561 NP}$: coefficient d'extinction des nanoparticules à 561 nm (en mL.NP⁻¹.cm⁻¹), A_{561} : absorbance mesurée à 561 nm.

Par ailleurs, il est possible grâce à ces résultats d'estimer la quantité de fonctions ADIBO présentes sur nos NP. Si nous prenons en considération qu'il y a approximativement 2 000 atomes de gadolinium par NP correspondant à 48 % d'un équivalent d'ADIBO, cela signifie qu'il y aurait donc environ 4000 ADIBO par NP. Il est également possible d'estimer la quantité d'ADIBO grâce aux rendements d'incorporation du synthon amine (cf. page 146) et aux quantifications par spectrophotométrie (cf. page 152). Les rendements d'incorporation obtenus pour ce synthon sont en moyenne de 79 % correspondant à 31 000 amines dosées par spectrophotométrie, nous pouvons donc espérer avoir incorporé au maximum 21 % de fonctions ADIBO soit 6 000 par NP. Toutefois, cette valeur peut-être amoindrie au vu des faibles rendements d'incorporation généralement obtenus pour les synthons ADIBO. Cette estimation serait donc du même ordre de grandeur que celle calculée par ICP-MS. Le greffage de la **Tz-PEG₄-DOTA(Gd)** sur les nanoparticules a également été confirmé par DLS (**Figure 87**). Cela s'est traduit par une augmentation non négligeable du diamètre hydrodynamique (90 nm à 157 nm) ainsi qu'à une élévation de la charge des NP par rapport aux **NP-ADIBO/NH₂** de départ. L'indice de polydispersité de 0,09 quant à lui démontre la bonne dispersion des **NP-ADIBO/DOTA(Gd)** dans l'eau.



	Diamètre hydrodynamique (nm)	Indice de polydispersité (Pdl)	Potentiel zêta (mV)
NP-ADIBO/NH ₂	90,46 ± 4,0	0,104	-42,8 ± 1,4
NP-ADIBO/DOTA(Gd)	156,6 ± 4,6	0,09	-23,1 ± 2,0

Figure 87 : Analyses DLS des NP-ADIBO/DOTA(Gd).

3. Conclusion

Dans cette partie, notre objectif principal consistait à concevoir des **NP-ADIBO/DOXA(Gd)**. Pour cela, nous avons essayé d'incorporer le gadolinium au sein des macrocycles DOXA *via* l'utilisation de **NP-ADIBO/DOXA(10)** en suspension. Toutefois, cette stratégie n'a pas permis de complexer de façon spécifique le gadolinium, celui-ci possédant une affinité accrue pour la silice des NP. Cette voie a donc été mise de côté mais n'est pas à exclure totalement, des mises au point supplémentaires sont à apporter afin d'en faire une méthode efficace pour l'obtention de NP complexant efficacement le gadolinium.

Partant de ce constat, nous avons développé en parallèle une méthodologie de synthèse permettant de pallier à l'adsorption non spécifique du gadolinium. Cette stratégie a consisté à d'abord complexer le gadolinium par un dérivé DOXA puis de le greffer sur les NP. Disposant de fonctions ADIBO à la surface des NP, notre choix s'est porté sur l'utilisation de la chimie bioorthogonale connue pour permettre une fonctionnalisation efficace des NP. La ligation de type SPAAC a en premier lieu été envisagée, le complexe **N₃-PEG₄-DOXA(Gd)** étant plus simple à concevoir dans un premier temps. Le complexe **N₃-PEG₄-DOXA(Gd)** a pu être synthétisé avec succès mais les essais de greffage (supporté et en suspension) effectués ensuite sur les NP n'ont pas été concluants.

Nous sommes finalement parvenus à obtenir les **NP-ADIBO/DOXA(Gd)** souhaitées grâce à la ligation de type IEDDA entre les fonctions ADIBO des NP et les fonctions tétrazine portées par le complexe **Tz-PEG₄-DOXA(Gd)** que nous avons été en mesure de synthétiser (**Figure 88**). La présence de gadolinium sur les NP a été validée par ICP-MS, nous permettant d'estimer qu'approximativement 2 000 gadolinium ont été immobilisés par NP. Une augmentation du diamètre hydrodynamique de 65 nm amenant les NP à avoir une taille finale de 157 nm a également été mise en évidence par DLS. Par ailleurs, nous avons observé une augmentation de la charge des NP suite à l'incorporation du gadolinium passant de -40 mV à -20 mV. Il nous reste encore à évaluer la reconnaissance de ces NP avec les anticorps modifiés. Suite aux résultats d'ICP-MS, nous avons pu voir que seulement la moitié des fonctions ADIBO ont été engagées dans l'incorporation du gadolinium laissant espérer qu'il en reste suffisamment (~ 2 000 par NP) pour réagir a posteriori avec les anticorps modifiés.

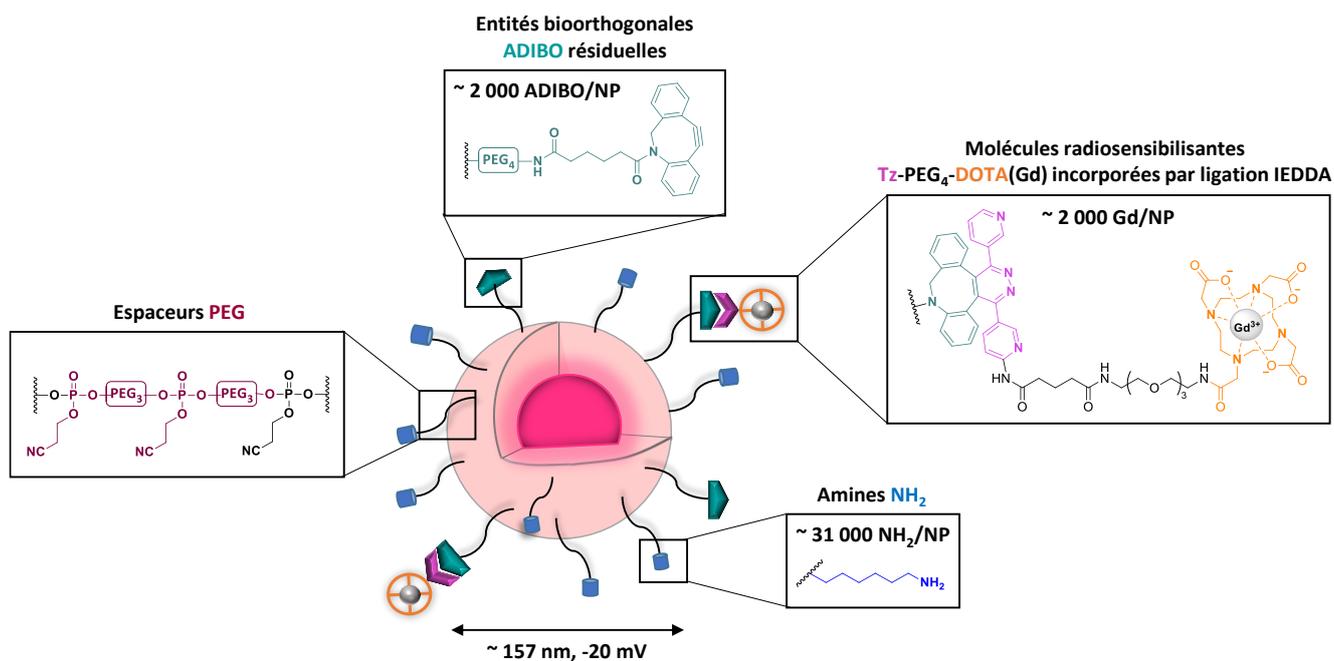


Figure 88 : Structure finale des NP-ADIBO/DOTA(Gd) fonctionnalisées en surface par des amines NH₂, des entités bioorthogonales ADIBO et des macrocycles DOTA complexants les ions Gd³⁺.

Chapitre 2. Synthèse des AcM- N_3 et évaluations in vitro de la stratégie d'immunoprécipilage

Le second chapitre de cette thèse concerne la phase de fonctionnalisation des AcM par l'entité bioorthogonale azoture (N_3) et l'évaluation de l'approche de précipilage des NP par fluorescence.

L'AcM utilisé dans cette étude est le Rituximab (RTX), un AcM chimérique (murin/humain) obtenu par ingénierie génétique. C'est une immunoglobuline (IgG-1) constituée à 75 % de domaines constants humains et 25 % de domaines variables d'origine murine des chaînes légères et lourdes (**Figure 89**). Cet AcM est produit à partir de cultures cellulaires de mammifères (ovaires de hamster chinois). Il est dirigé contre les antigènes CD20 exprimés à la surface de la plupart des lymphocytes B qu'ils soient normaux ou malins. Le RTX a été le premier AcM approuvé par la FDA en 1997 pour le traitement des lymphomes B Non-Hodgkinien (LNH) commercialisé sous le nom de Rituxan. C'est en 1998 qu'il fut approuvé dans toute l'Union Européenne sous le nom de MabThéra[®] comme immunothérapie en association à une chimiothérapie pour la prise en charge de LNH de type folliculaires ou encore à grandes cellules (agressif) en récurrence [245]. A ce jour, il est utilisé pour traiter les leucémies lymphoïdes chroniques en combinaison avec la chimiothérapie uniquement sur les patients n'ayant pas déjà été traités avec des AcM, mais aussi pour des maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde. Cet AcM agit sur la destruction des lymphocytes B tumoraux par trois mécanismes différents qui sont l'apoptose, la cytotoxicité complément-dépendante (CDC) ou la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (ADCC) [246].

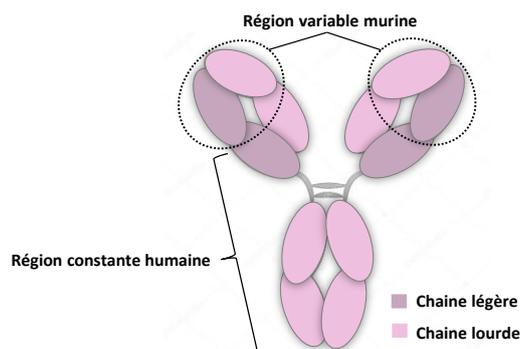


Figure 89 : Structure schématique du Rituximab.

Les AcM porteurs d'azotures synthétisés dans cette partie, que nous appellerons **RTX- N_3** , sont obtenus suite au greffage de l'azoture synthétisé sous forme d'ester activé de type N-hydroxysuccinimide sur les résidus lysine du Rituximab (**Schéma 10**).

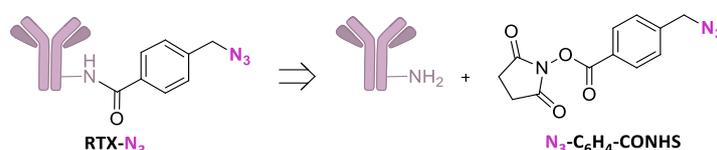
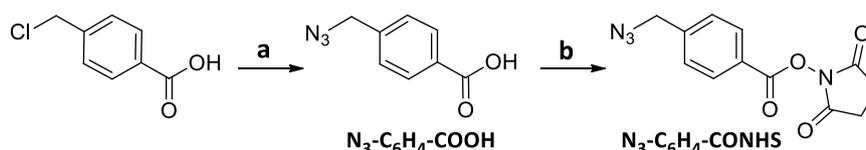


Schéma 10 : Schéma rétrosynthétique d'obtention des AcM- N_3 .

Les modifications chimiques à apporter sur l'AcM nécessitent donc dans un premier temps de synthétiser ce précurseur azoture. L'AcM devra être purifié au préalable par chromatographie d'exclusion stérique afin d'éliminer certains excipients présents dans la formule pharmaceutique pour assurer une conjugaison optimale.

I. Synthèse de l'entité bioorthogonale azoture ($N_3-C_6H_4-CONHS$)

Le précurseur azoture $N_3-C_6H_4-CONHS$ conjugué sur l'AcM a été synthétisé en deux étapes avec un rendement global de 53 % à partir de l'acide 4-chlorobenzoïque commercial (Schéma 11).



a : NaN_3 , EtOH, 80°C, 16 h, 75 %; b : NHS, EDC, DCM, t.a, 15 min, 70 %.

Schéma 11 : Synthèse de l'entité bioorthogonale $N_3-C_6H_4-CONHS$ conjuguée sur l'AcM.

La première étape de cette réaction consiste à substituer l'atome de chlore porté par l'acide 4-chlorométhylbenzoïque en présence d'azoture de sodium dans l'éthanol à reflux pendant 16 h pour conduire au $N_3-C_6H_4-COOH$ avec un rendement de 75 % après précipitation en milieu acide [247]. Dans un second temps, l'acide est activé sous forme d'ester de *N*-hydroxysuccinimide en présence d'EDC afin d'obtenir après purification par chromatographie sur gel de silice le précurseur d'intérêt $N_3-C_6H_4-CONHS$ avec 70 % de rendement [248]. La pureté de l'entité bioorthogonale est contrôlée par HPLC après purification mais aussi avant chaque couplage sur l'AcM afin de vérifier la stabilité de l'ester (Figure 90). Ce composé est conservé sur de longues périodes en étant stocké sous forme d'aliquots à 50 mM dans le DMSO anhydre au congélateur.

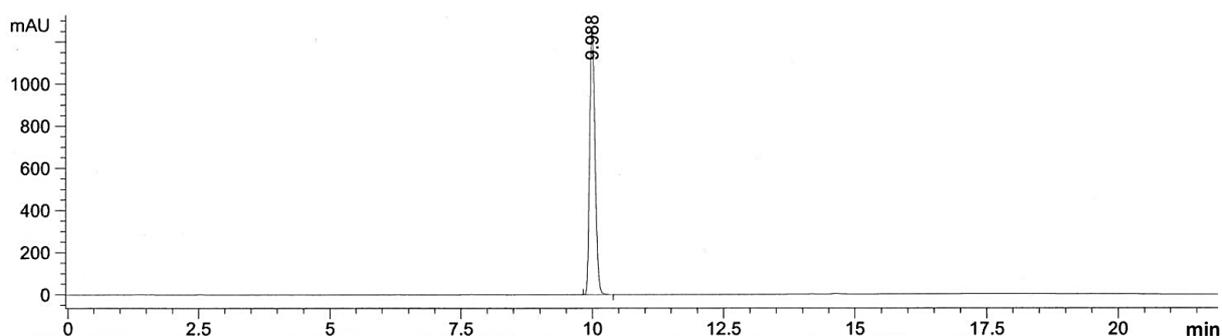


Figure 90 : Chromatogramme de l'entité bioorthogonale $N_3-C_6H_4-CONHS$. Conditions expérimentales : Colonne Zorbax Extend-C18 (4,6 x 150 mm², granulométrie 5 μm), volume d'injection : 20 μL, débit 1 mL/min, solvant A : H₂O + 0,1% TFA, solvant B : ACN + 0,1% TFA, méthode : 0-15 min 20 à 70 % B, 15-18 min 70 % B isocratique, 18-20 min 70 à 20 % B, 20-22 min 20 % B isocratique. Temps de rétention du composé de 9,99 min dans ces conditions (λ = 254 nm).

II. Fonctionnalisation du RTX

1. Purification du RTX

L'AcM est dans un premier temps purifié par chromatographie d'exclusion stérique (colonne Superose 12 10/300, GE Healthcare) selon une méthode de 50 min utilisant comme phase mobile du PBS (50 mM de tampon phosphate avec 150 mM de NaCl, pH 7,0) permettant de purifier jusqu'à 4 mg d'AcM. Cette méthode permet d'obtenir l'AcM pur comme le montre l'analyse HPLC d'un lot de Rituximab après purification (**Figure 91**).

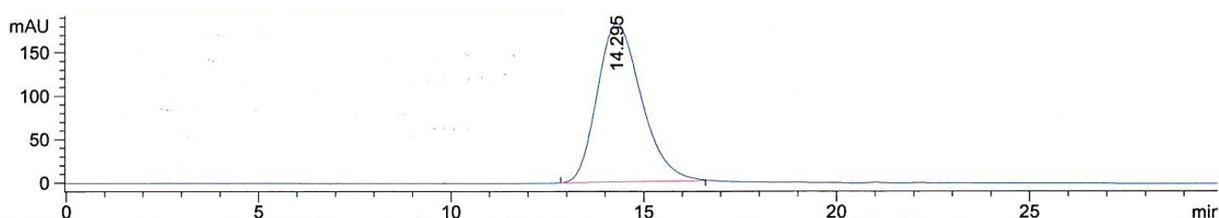


Figure 91 : Chromatogramme du RTX après purification par chromatographie d'exclusion stérique. **Conditions expérimentales** : Colonne Superose 12 3.2x300 mm ; particule 11 μm ; éluant : 50 mM de tampon phosphate avec 150 mM de NaCl, pH 7,0 ; débit : 0,1 mL/min. Temps de rétention de l'AcM de 14,3 min dans ces conditions ($\lambda = 288 \text{ nm}$).

Une fois que nous disposons de l'entité bioorthogonale azoture et de l'AcM pur, nous pouvons procéder à l'étape de fonctionnalisation de l'AcM. L'enjeu principal de cette phase est d'incorporer un maximum de N_3 sur les AcM afin d'obtenir a posteriori une efficacité optimale de la chimie bioorthogonale. Pour cela, le nombre de fonctions greffées doit être choisi avec soin; c'est-à-dire que les modifications chimiques apportées sur l'AcM doivent être suffisamment importantes pour induire une réponse qui soit la meilleure possible sans pour autant affecter la capacité de l'AcM à reconnaître sa cible antigénique (fraction immunoréactive).

Afin d'obtenir le meilleur compromis, il est possible d'ajuster le nombre de N_3 greffés sur les AcM en réalisant des gammes qui permettent de déterminer le nombre optimum de fonctions que l'on peut incorporer sur un AcM. Pour ce faire, des quantités croissantes d'ester activé sont mises en réaction avec le Rituximab soit 5, 10, 15, 20 et 30 équivalents de $\text{N}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CONHS}$ pour 1 équivalent d'AcM. Un lot de contrôle est également réalisé pour lequel l'AcM est traité selon le protocole de greffage, mais avec 0 équivalent d'ester activé. Les conjugués **RTX- N_3** obtenus sont ensuite purifiés et les concentrations finales déterminées par NanoDrop. En parallèle, la gamme est analysée par MALDI-TOF afin de déterminer le nombre moyen d'entités bioorthogonales N_3 greffées par AcM (**Schéma 12**).

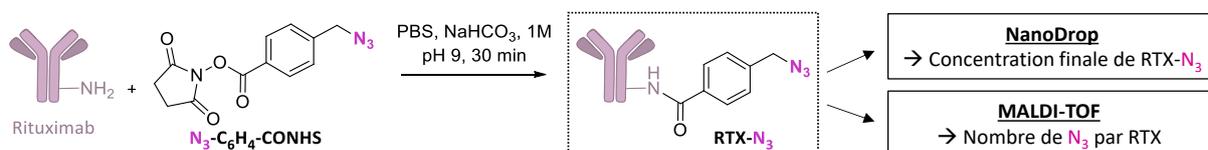


Schéma 12 : Protocole de fonctionnalisation du RTX par l'entité bioorthogonale N_3 .

2. Modification du RTX par l'entité bioorthogonale N₃

La gamme est obtenue en mettant en réaction 100 µg de **RTX** en présence d'un nombre d'équivalents croissants de **N₃-C₆H₄-CONHS** (0, 5, 10, 15, 20, 30 éq.) en milieu basique (pH 9) tamponné à l'aide d'une solution de bicarbonate de sodium 1M. Après 30 min d'agitation à 4 °C, les mélanges réactionnels sont purifiés à l'aide de colonnes de dessalage Zeba permettant de récupérer après centrifugation les **RTX-N₃** en solution dans le PBS.

Suite à cela, les concentrations des différentes solutions de **RTX-N₃** (en µg/µL) sont déterminées par NanoDrop, ce qui permet ensuite d'en déduire grâce au volume de solution la quantité d'AcM finalement récupérée après purification et par conséquent d'estimer le rendement de purification de l'AcM modifié. Nous observons dans le **Tableau 16** que les rendements sont relativement élevés et qu'ils varient de 80 % à 98 % en fonction du nombre d'équivalent mis en réactions avec l'AcM. Des quantités plus importantes d'AcM sont récupérées pour les conditions 5, 10 et 15 équivalents puis tendent à diminuer pour les conditions 20 et 30 équivalents. En effet, des concentrations plus faibles en AcM sont généralement récupérées pour ces équivalents après purification pouvant être dues à l'agrégation de l'AcM dans le milieu réactionnel à cause de quantités d'azotures greffées plus importantes.

Equivalents de N ₃ -C ₆ H ₄ -CONHS mis en réaction	0 éq.	5 éq.	10 éq.	15 éq.	20 éq.	30 éq.
Quantité recouvrée de RTX (%) Moyenne (n = 3)*	98	98	97	90	85	80

Tableau 16 : Quantité recouvrée de RTX après contact avec différents équivalents du dérivé azoture activé.
*Gamme de RTX-N₃ réalisée en triplicata.

3. Analyses par MALDI-TOF

Le spectromètre MALDI-TOF est un appareil analytique qui va permettre d'ioniser des molécules (>1000 Da) préalablement purifiées sans les fragmenter. Cette technique est classiquement utilisée pour l'identification de protéines puisqu'elle possède une résolution élevée permettant de mesurer très précisément la masse de macromolécules.

Cette méthode d'analyse est donc d'intérêt ici puisqu'elle va nous permettre de déterminer le nombre moyen d'entités bioorthogonales N₃ incorporées par AcM pour chaque échantillon de la gamme de **RTX-N₃**. Ce nombre est établi en calculant la différence de masse moyenne entre le **RTX-N₃** modifié et le **RTX** natif (148,119 kDa) puis en divisant cette valeur par la masse moléculaire de l'adduit N₃ incorporé (160,15 Da) (**Figure 92**). Nous pouvons constater que le nombre moyen de N₃ incorporés par AcM est croissant avec le nombre d'équivalents (**Figure 93**). Les résultats obtenus confirment l'efficacité et la reproductibilité de cette méthode de greffage permettant de coupler de 1 à 17 équivalents de N₃ par RTX.

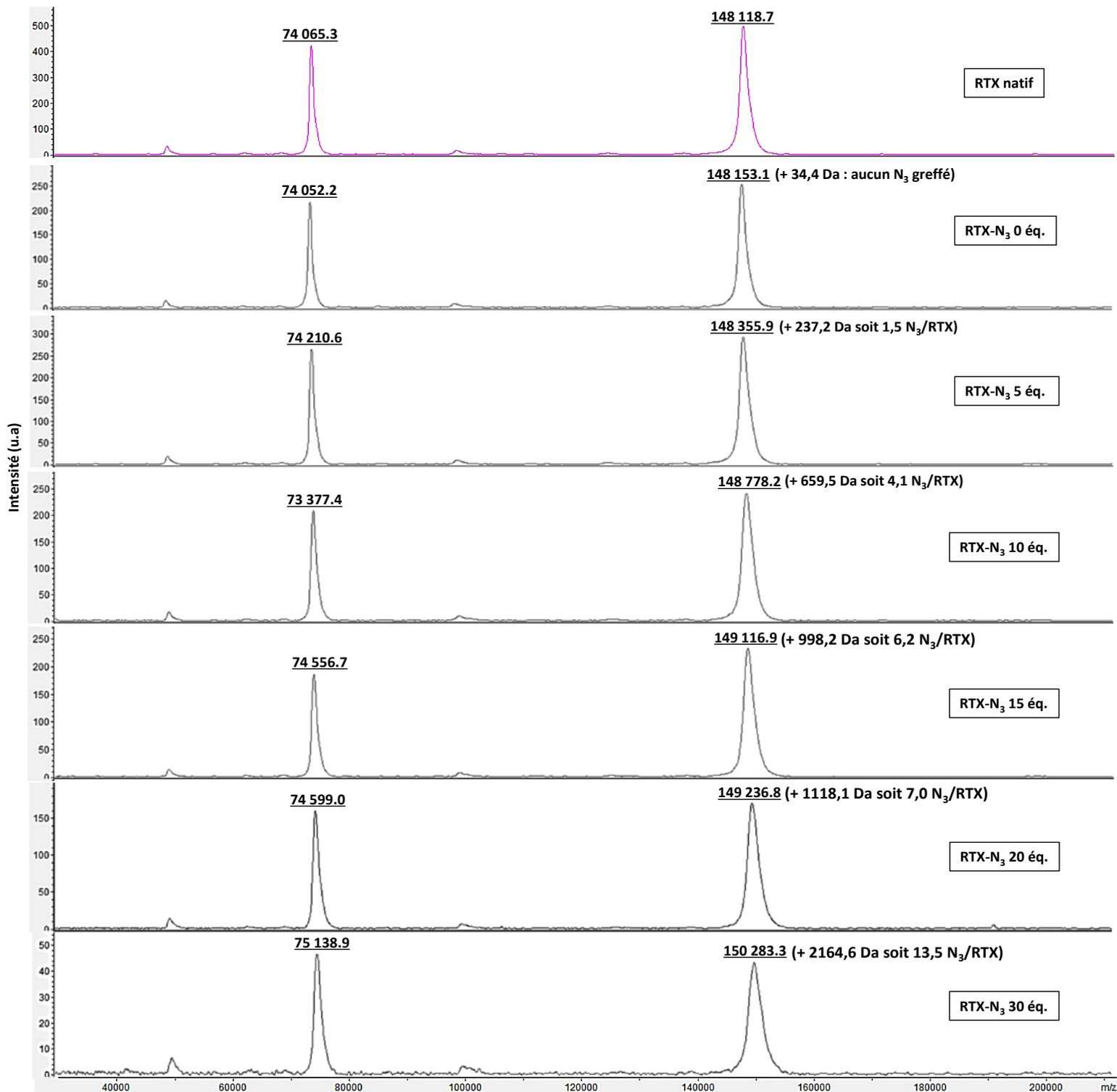


Figure 92 : Exemple de spectres de masse obtenus pour la gamme 1 des différents conjugués RTX-N₃.

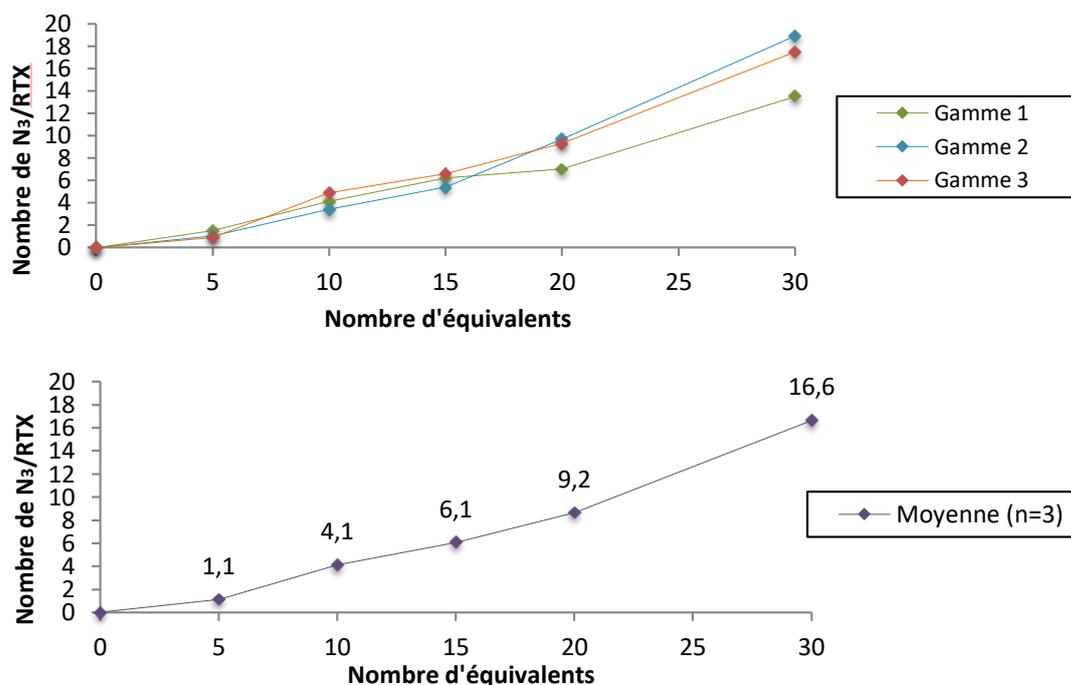


Figure 93 : Représentations graphiques du nombre de N_3 greffés par RTX en fonction du nombre d'équivalents d'esters activés $N_3-C_6H_4-CONHS$ mis en réaction.

III. Analyses des conjugués RTX- N_3

1. Analyses par fluorescence

1.1 Etudes moléculaires par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les études moléculaires ensuite effectuées nous permettent à la fois de vérifier la réactivité des différents RTX- N_3 modifiés mais aussi de déterminer leur stabilité dans le temps. Cette technique consiste à faire migrer les RTX- N_3 dans un gel par électrophorèse. Pour cela, le gel de polyacrylamide déjà préfabriqué sous forme de cassette contenant les puits pour nos dépôts est introduit dans la cuve à électrophorèse. Le tampon d'électrophorèse conducteur pour la migration est mis dans la cuve puis les différents échantillons de RTX et RTX- N_3 sont déposés dans les puits (Figure 94).

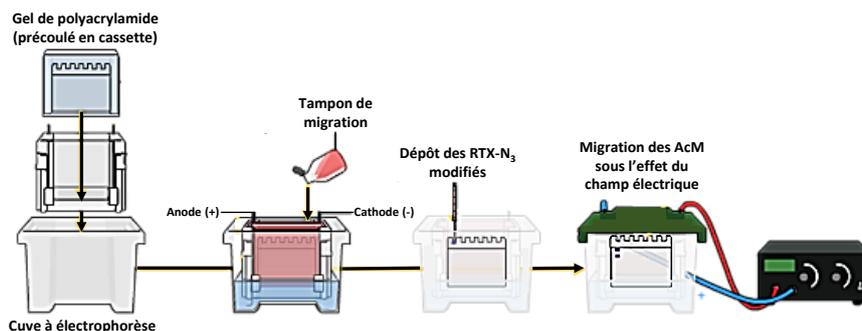


Figure 94 : Procédure employée pour la migration des AcM par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Une fois la migration terminée, le gel est démoulé et ensuite incubé avec une sonde fluorescente de type Cy5.5 porteuse d'une fonction ADIBO (ADIBO-Cy5.5, λ_{ex} = 678 nm, λ_{em} = 694 nm) en excès vis-à-vis du nombre de N_3 présents. Le gel est ensuite imagé par fluorescence afin de valider l'interaction de la sonde fluorescente avec chaque échantillon de RTX modifiés. De cette façon il a été possible de réaliser une cinétique concernant la réactivité de l'ADIBO-Cy5.5 pour les **RTX-N₃** en mesurant l'intensité de fluorescence à différents temps (10, 75, 90, 120 et 180 min). Enfin, la quantité totale de protéine déposée est révélée ensuite par coloration du gel au bleu de Coomassie permettant d'établir un ratio entre l'intensité de fluorescence et la quantité totale de protéine mesurée. Les bandes des **RTX-N₃** se situent à environ 150 kDa et confirment bien la réactivité des N_3 envers l'ADIBO fluorescent avec une intensité de fluorescence qui augmente avec le nombre de N_3 greffés sur les AcM. Cette réactivité est d'autant plus spécifique qu'aucune fluorescence n'est reportée pour le **RTX** contrôle (0 éq.). (**Figure 95**). Après fonctionnalisation, les **RTX-N₃** sont conservés à 4 °C et la réactivité des N_3 vis-à-vis de l'ADIBO est évaluée avant chaque test entrepris.

Par ailleurs, la cinétique de réactivité est un autre point important qu'il est nécessaire de prendre en compte puisqu'elle influence l'efficacité d'interaction ADIBO/ N_3 . Afin d'obtenir un signal de fluorescence optimal, la sonde fluorescente ADIBO doit être mise suffisamment longtemps en réaction avec les **RTX-N₃**. C'est pourquoi nous avons réalisé une étude cinétique afin de déterminer le temps au bout duquel un plateau de fluorescence est atteint signifiant que la totalité des N_3 a réagi. Les résultats de l'étude cinétique réalisée montre que l'intensité de fluorescence augmente progressivement au cours du temps jusqu'à atteindre un maximum au bout de 120 min d'incubation du gel avec l'ADIBO-Cy5.5 (**Figure 96**). La sonde devra donc être incubée au minimum 2 h avec les **RTX-N₃** pour les autres tests *in vitro*.

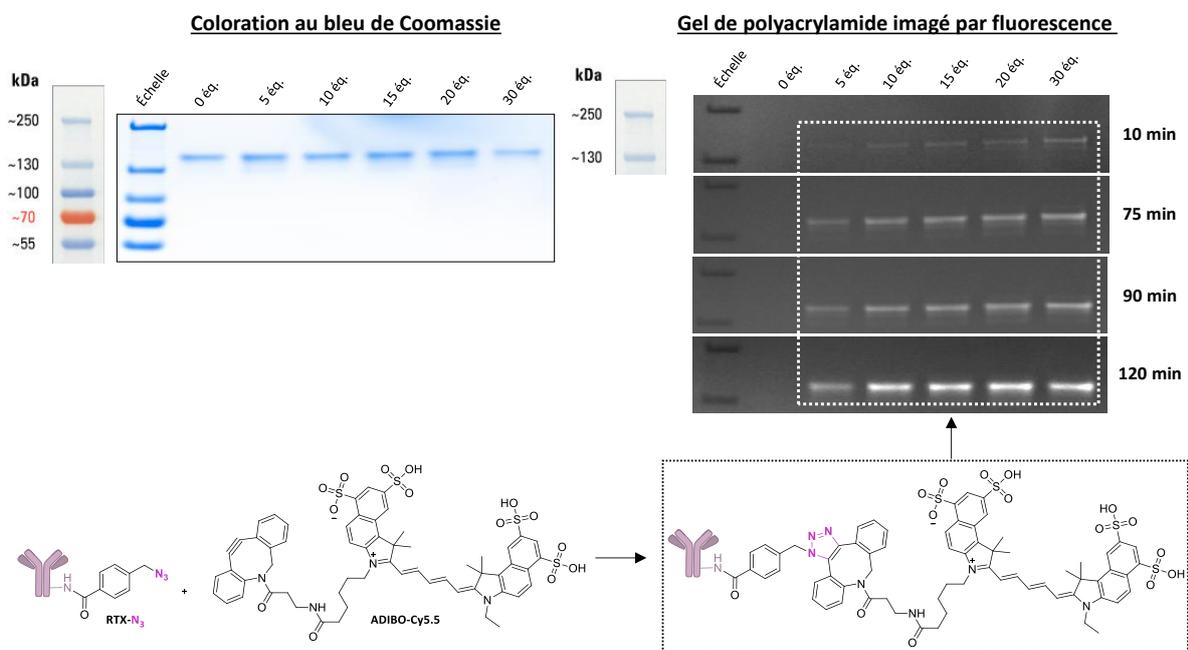


Figure 95 : Révélation du gel de polyacrylamide par fluorescence après incubation avec la sonde fluorescente ADIBO-Cy5.5 à différents temps et coloration du gel au bleu de Coomassie.

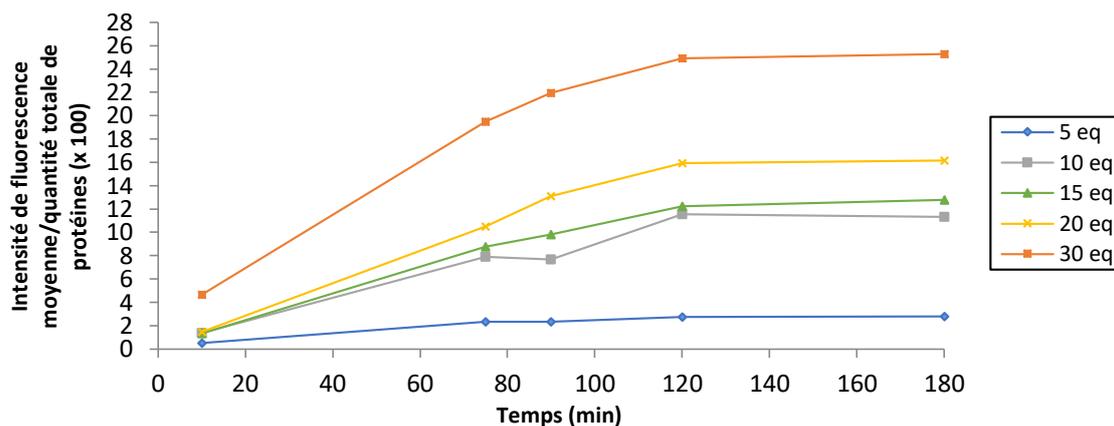


Figure 96 : Étude cinétique de la réaction SPAAC entre les différents conjugués RTX-N₃ et la sonde fluorescente ADIBO-Cy5.5.

1.2 Études *in vitro* par cytométrie en flux

Les RTX-N₃ étant bien réactifs vis-à-vis des sondes ADIBO-Cy5.5, des premiers tests ont pu être menés par cytométrie en flux. Cela devrait nous permettre de confirmer la réactivité des conjugués RTX-N₃ *in vitro* et de sélectionner le meilleur conjugué pour la suite des études sur cellules. De plus, ces tests nous donneront une indication supplémentaire quant aux conditions réactionnelles à mettre en œuvre lorsque nous serons amenés à tester les NP *in vitro*. Nous avons dû au préalable sélectionner la lignée de lymphome la plus adaptée, déterminer la concentration saturante et choisir le conjugué RTX-N₃ à utiliser par la suite pour les tests *in vitro* avec les NP.

a. Sélection de la lignée cellulaire de lymphome

La cytométrie en flux nous a ainsi permis dans un premier temps de sélectionner la lignée cellulaire de lymphome ayant le plus d'affinité pour le RTX et avec laquelle il sera possible d'effectuer toutes les études *in vitro* par la suite. Pour ce faire, nous avons testé la reconnaissance du RTX sur 4 lignées cellulaires issues de différents types de LNH exprimant l'antigène CD20. La reconnaissance antigénique du RTX commercial (MabThéra®) a notamment été testée sur les cellules de type Raji et Ramos (lymphome de Burkitt) ainsi que GRANTA-519 et Z-138 (lymphome du manteau).

Les cellules de lymphome sont d'abord incubées avec le RTX (anticorps primaire) puis avec l'anticorps secondaire fluorescent (Ac II, Anti-Human Kappa PE-conjugate) spécifique de RTX, permettant de marquer les cellules et de mesurer l'intensité de fluorescence correspondant directement à la quantité de RTX fixés sur les cellules. Finalement, l'intensité de fluorescence la plus élevée est obtenue pour les cellules de type GRANTA-519 avec une MFI de 676, nous conduisant à utiliser cette lignée pour tester les différents RTX-N₃ en cytométrie (Figure 97).

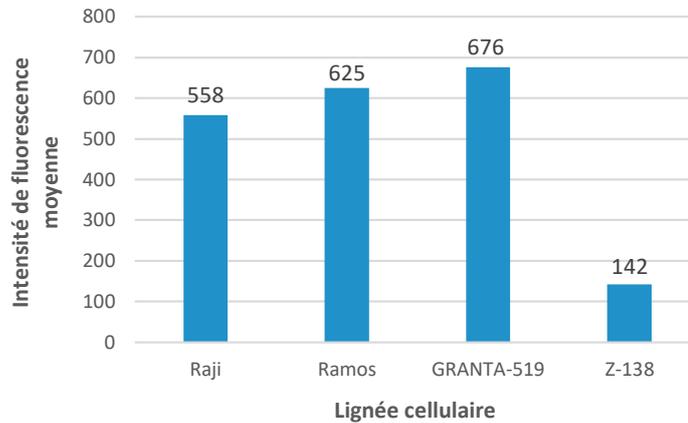


Figure 97 : Intensités de fluorescence moyenne mesurées pour chaque lignée cellulaire.

b. Détermination de la concentration saturante en RTX

La quantité de **RTX** disponible à la surface des cellules est un paramètre important qui peut influencer l'efficacité de la chimie bioorthogonale. Afin d'obtenir une réponse optimale lors des tests avec les conjugués **RTX-N₃**, il faut s'assurer qu'une quantité optimum de **RTX-N₃** soit fixée à la surface des cellules. Pour cela, il est nécessaire de connaître la concentration maximale de RTX à utiliser pour fixer le plus possible d'AcM au niveau membranaire. Pour ce faire, les cellules GRANTA-519 sont d'abord incubées avec des concentrations croissantes en RTX non modifié soit 1, 5, 10, 20, 40, 60 $\mu\text{g/mL}$ puis avec l'Ac II (Anti-Human Kappa PE-conjugate). Un maximum d'intensité de fluorescence est obtenu pour 10 $\mu\text{g/mL}$ de RTX (Figure 98). Nous avons donc utilisé cette concentration pour tester les différents AcM modifiés (**RTX-N₃**) en cytométrie.

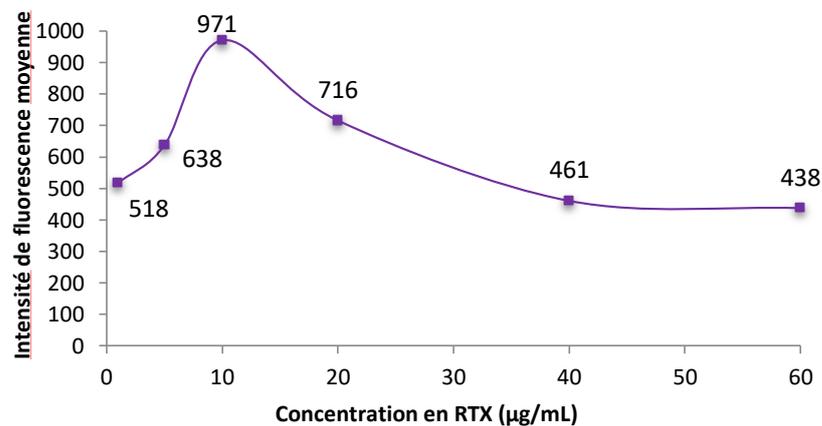


Figure 98 : Courbe de saturation en RTX (MabThera®) sur la lignée de lymphome GRANTA-519 par cytométrie en flux.

c. Evaluation de la réactivité des RTX-N₃ modifiés

La réactivité des **RTX-N₃** a ensuite pu être évaluée vis-à-vis d'une sonde fluorescente de type ADIBO porteur d'un groupement fluorescent Alexa Fluor 488 (ADIBO-AF488, $\lambda_{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 517 \text{ nm}$). Les cellules GRANTA-519 sont incubées avec les **RTX-N₃** (0, 5, 10, 15, 20 et 30 équivalents) puis avec un excès de la sonde ADIBO-AF488 par rapport au nombre de N₃ présents sur l'AcM. Les cellules de lymphome en suspension sont ensuite analysées au cytomètre en flux (**Figure 99**).

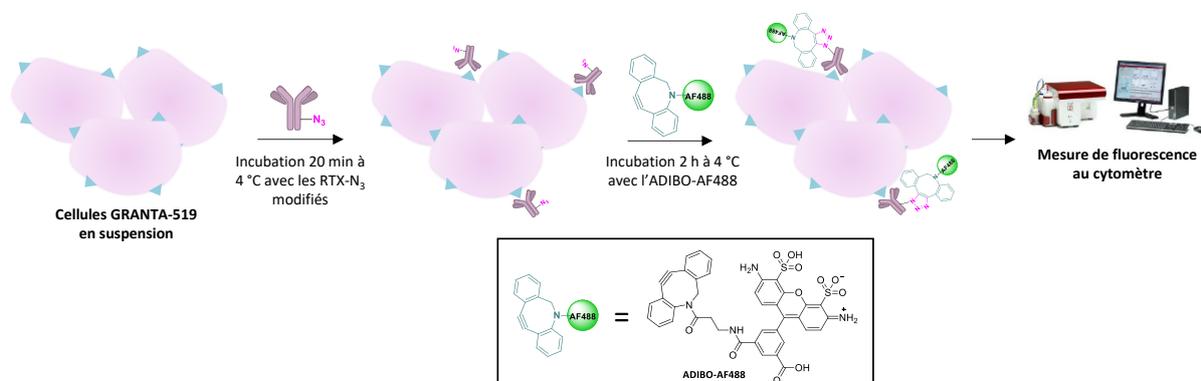


Figure 99 : Protocole de cytométrie en flux des cellules GRANTA-519 incubées avec les RTX-N₃ modifiés et l'ADIBO-AF488.

Les résultats obtenus montrent que l'intensité de fluorescence augmente significativement pour les conjugués **RTX-N₃** 5, 10 et 15 équivalents puisque la fluorescence cesse d'augmenter avec une MFI qui tente à diminuer pour les conjugués 20 et 30 équivalents (**Figure 100**). Afin de comparer les différents échantillons de **RTX-N₃** entre eux, les intensités de fluorescence mesurées ont été rapportées au nombre moyen de N₃ greffés par AcM de façon à obtenir une valeur par N₃. Après normalisation, cette analyse montre que les meilleurs conjugués sont le **RTX-N₃** 5 équivalents puis les 10 et 15 équivalents (**Figure 101**). Pour choisir le conjugué le plus approprié, nous avons dû choisir celui qui présentait le meilleur compromis entre intensité de fluorescence et nombre de N₃ par RTX. En effet, le conjugués 5 équivalents présente une intensité de fluorescence intéressante mais possède une moyenne de seulement 1 N₃ par AcM. Notre choix s'est donc porté sur le **RTX-N₃(10)** qui présente une moyenne plus importante de N₃ par AcM (4 N₃/RTX) pouvant augmenter les chances d'interaction ADIBO/N₃.

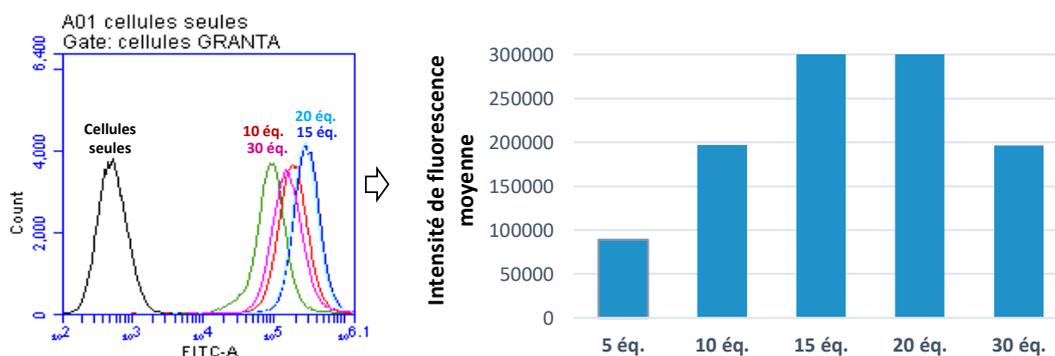


Figure 100 : Intensité de fluorescence moyenne pour les différents échantillons de RTX-N₃.

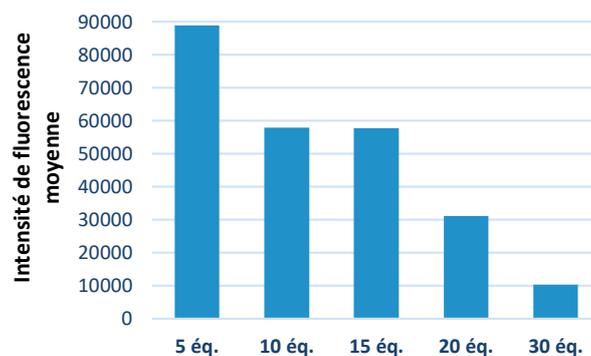


Figure 101 : Intensité de fluorescence moyenne pour les RTX-N₃ rapportée au nombre de N₃/RTX.

La fraction immunoréactive du conjugué **RTX-N₃(10)** a été évaluée en cytométrie avec un Ac II porteur d'un fluorophore de type Alexa Fluor 488 (Ac II-AF488) et confirme que ni les conditions de couplage et de purification ni l'addition de groupements N₃ n'altère la reconnaissance antigénique (**Figure 102**). Cela se traduit par une augmentation de l'intensité de fluorescence mesurée par rapport aux cellules seules comme le démontre le spectre de cytométrie ci-dessous.

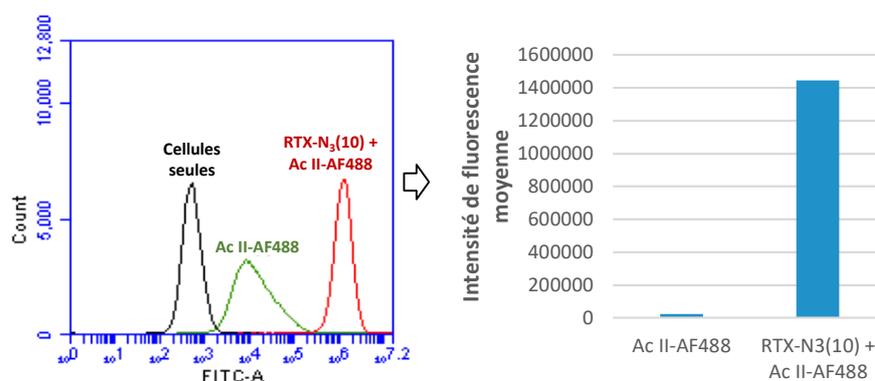


Figure 102 : Contrôle de la reconnaissance antigénique du conjugué RTX-N₃(10).

1.3 Etudes *in vitro* par microscopie confocale

Une fois la lignée de lymphome et le conjugué **RTX-N₃(10)** sélectionné, notre but a été de pouvoir tester *in fine* l'interaction de nos NP avec les AcM modifiés par microscopie confocale. Pour cela, un protocole a d'abord dû être mis au point afin d'imager de façon efficace les cellules GRANTA-519. Ces cellules sont cultivées en suspension et non de façon adhérente sur un support comme la plupart des cellules cancéreuses. Nous avons donc effectué un premier essai en testant l'interaction de **RTX-N₃(10)** avec l'ADIBO-AF488 utilisé précédemment pour la cytométrie en flux. Les cellules GRANTA-519 sont incubées avec le **RTX-N₃(10)** puis avec un excès d'ADIBO-AF488 ou avec l'Ac II-AF488 pour vérifier également la reconnaissance de **RTX-N₃(10)** vis-à-vis des récepteurs CD20. Après dépôt de la suspension de cellules sur lames, celles-ci sont observées au microscope confocal (**Figure 103**).

Les images témoignent de l'interaction spécifique du **RTX-N₃(10)** avec l'ADIBO-AF488. En effet, nous observons un marquage membranaire fluorescent uniquement lorsque les cellules sont préalablement incubées avec **RTX-N₃(10)** (**Figure 103.b**), dans le cas contraire, aucune fluorescence n'apparaît (**Figure 103.c**). De plus, ces images valident également que malgré la présence des groupements azotures sur **RTX-N₃(10)**, l'AcM modifié reconnaît les récepteurs membranaires CD20 (**Figure 103.d, e**). Ainsi, un protocole efficace a pu être établi sur cette lignée cellulaire en suspension, nous permettant d'envisager l'évaluation biologique *in vitro* de l'approche d'immunopréciblage des NP par cette méthode.

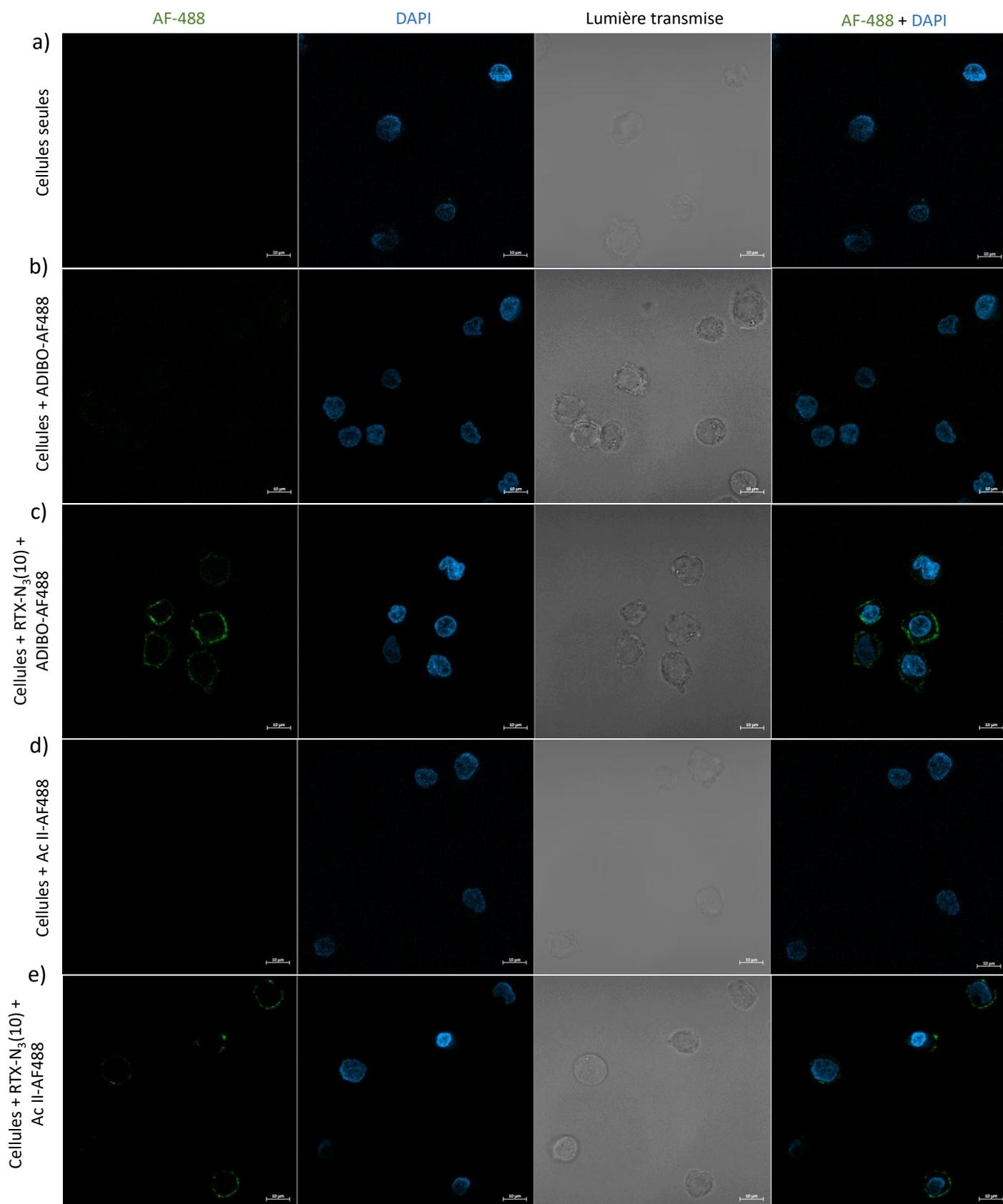


Figure 103 : Images en microscopie confocale en fluorescence (a) de cellules GRANTA-519 incubées (b) avec l'ADIBO-AF488 sans le RTX-N₃ modifié ou (c) avec le RTX-N₃(10). Cellules GRANTA-519 incubées avec (d) l'Ac II-AF488 sans le RTX-N₃ modifié ou (e) avec le RTX-N₃(10). Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu (DAPI), l'ADIBO-AF488 et l'Ac-II AF488 en vert (Alexa Fluor 488).

IV. Evaluation *in vitro* de la stratégie d'immunopréciblage des NP

1. Vérification de la reconnaissance des NP avec les conjugués RTX-N₃ 10 éq. par microscopie confocale

Maintenant que nous savons que les **RTX-N₃(10)** sont réactifs *in vitro* vis-à-vis d'une sonde fluorescente ADIBO-AF488, il est possible d'envisager une première série de tests en fluorescence par microscopie confocale avec les NP. Ces tests doivent permettre d'évaluer l'efficacité de la ligation SPAAC en deux temps, entre les dérivés ADIBO présents en surface des NP et les fonctions N₃ des **RTX-N₃(10)** préalablement fixés sur les cellules. Le but serait notamment de mettre en évidence une fixation membranaire spécifique des NP. Les cellules GRANTA-519 sont tout d'abord incubées avec les **RTX-N₃(10)** pendant 30 min puis 2 h avec les NP qui doivent se lier spécifiquement aux AcM *via* la ligation ADIBO/N₃. Nous avons choisi de tester à la fois les **NP-ADIBO/NH₂** et les **NP-ADIBO/DOXA(Gd)** afin d'établir un comparatif. En effet, nous pouvons nous attendre à une diminution de la fixation membranaire des **NP-ADIBO/DOXA(Gd)** voire même à n'avoir aucune fixation : (1) les **NP-ADIBO/DOXA(Gd)** comporte moins de fonctions ADIBO à leur surface suite au greffage de la sonde **Tz-PEG₄-DOXA(Gd)** ; (2) la gêne stérique apportée par les DOXA(Gd) peut fortement impacter la reconnaissance ADIBO/N₃. Après dépôt de la suspension de cellules sur lames, celles-ci sont observées au microscope confocal (**Figure 104**).

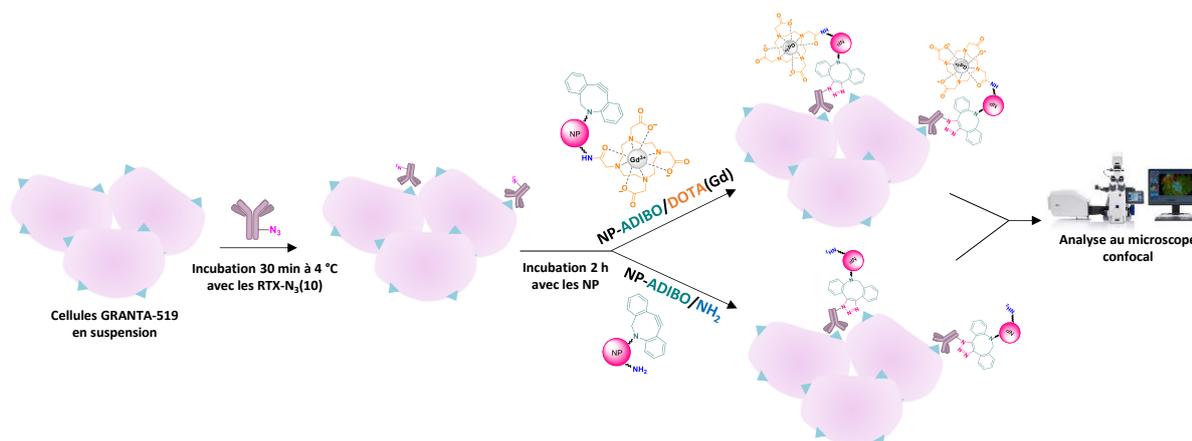


Figure 104 : Protocole de microscopie confocale des cellules GRANTA-519 incubées avec les RTX-N₃ modifiés et les NP-ADIBO/NH₂ ou NP-ADIBO/DOXA(Gd).

Nous avons décidé de tester deux conditions différentes pour chaque type de NP utilisées comprenant un contrôle négatif afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de fixation membranaire non spécifique des NP sans la présence de l'AcM modifié (**Figure 105.b et d**). L'autre condition se base sur l'approche de préciblage, c'est-à-dire que les cellules sont dans un premier temps incubées avec les **RTX-N₃(10)** puis avec les **NP-ADIBO/NH₂** (**Figure 105.c**) ou **NP-ADIBO/DOXA(Gd)** (**Figure 105.e**). Concernant les contrôles, les différentes images obtenues mettent en avant une interaction non spécifique des NP sur la membrane des cellules et ceci malgré les nombreux lavages effectués après avoir incubé les NP avec les cellules.

En effet, nous observons un marquage fluorescent à certains endroits de la membrane des cellules pour les deux types de NP en l'absence d'AcM. De plus, il ne semble pas que l'ajout des conjugués **RTX-N₃(10)** augmente la fixation membranaire des NP par rapport aux cellules sans AcM aussi bien pour les **NP-ADIBO/NH₂** que pour les **NP-ADIBO-DOTA/Gd**.

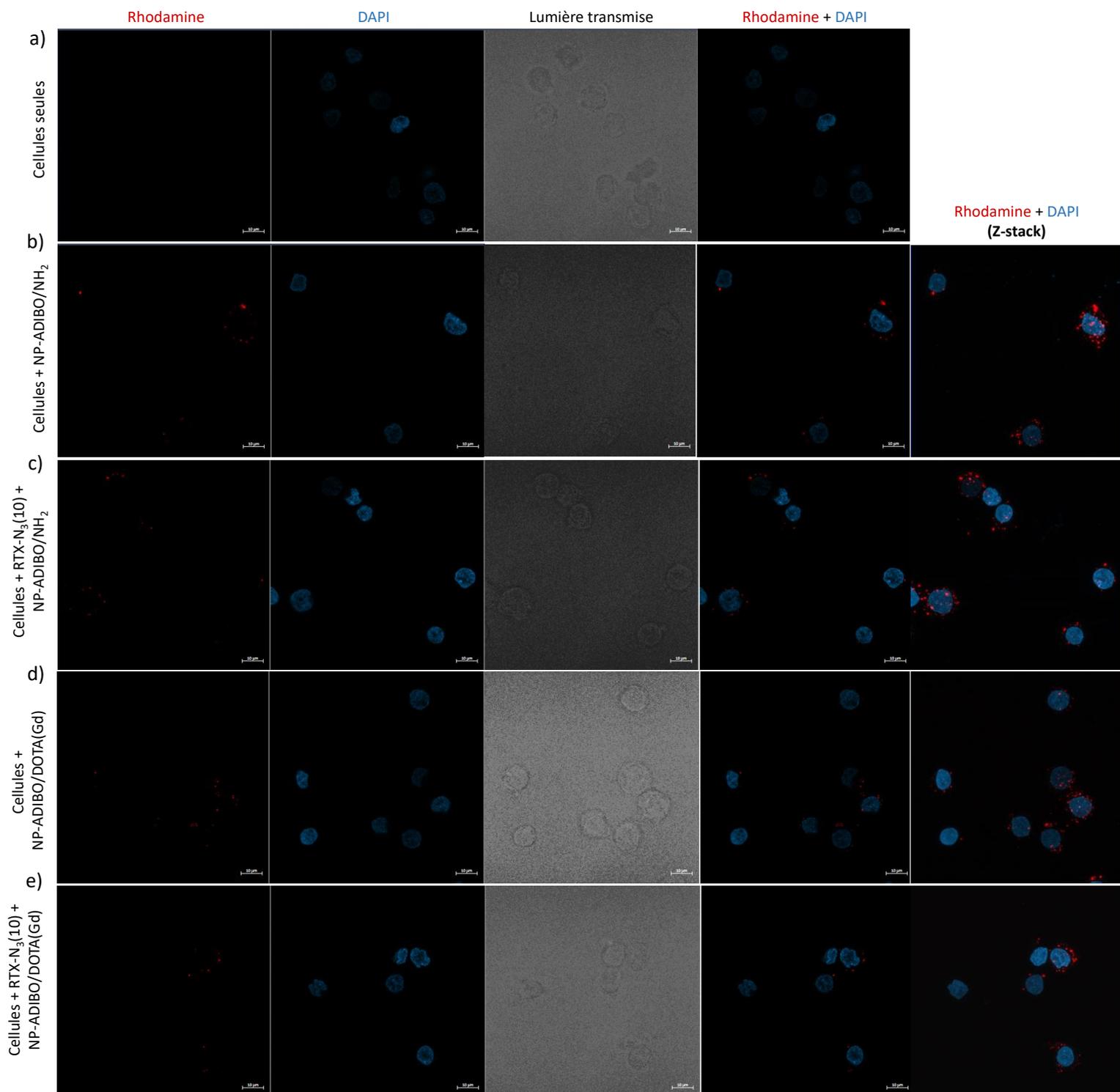


Figure 105 : Images en microscopie confocale en fluorescence (a) de cellules GRANTA-519 incubées avec (b) les NP-ADIBO/NH₂ sans le RTX-N₃ modifié ou (c) avec le RTX-N₃(10). Cellules GRANTA-519 incubées avec (d) les NP-ADIBO/DOTA(Gd) sans le RTX-N₃ modifié ou (e) avec le RTX-N₃(10). Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu (DAPI) et les NP en rouge (Rhodamine). Z-stack : combinaison de plusieurs images dont le plan focal varie.

2. Amélioration de la reconnaissance RTX-NP par ajout d'un espaceur sur l'AcM

Pour essayer d'améliorer la capacité de reconnaissance entre les **RTX-N₃(10)** et les NP, nous avons envisagé de séparer le motif bioorthogonal N₃ de l'AcM par un espaceur. Pour cela, nous avons décidé de mettre à profit une approche largement étudiée et maîtrisée au sein de l'unité IMoST, qui consiste à modifier les AcM par des entités bioorthogonales de type *trans*-cyclooctène (TCO). De cette façon, il est possible d'incorporer l'espaceur par une ligation de type IEDDA, en faisant réagir une tétrazine porteuse d'un tétraéthylène glycol azoture, notée **Tz-PEG₄-N₃**, sur les TCO portés par les RTX (**RTX-TCO**) pour donner des AcM que nous appellerons **RTX-PEG₄-N₃** (**Schéma 13**). La tétrazine est obtenue par couplage peptidique entre le **N₃-PEG₄-NH₂** et la **Tz-COOH** dont les synthèses sont déjà décrites précédemment (cf. page 173 et 181, respectivement). Les **RTX-TCO** quant à eux sont obtenus par condensation de la molécule TCO sous forme d'ester activé de N-hydroxysuccinimide (**TCO-NHS**).

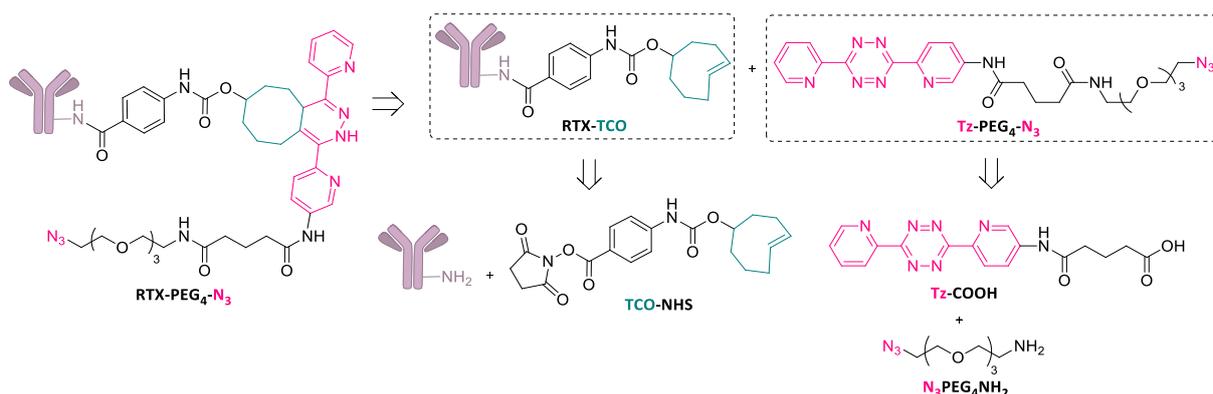


Schéma 13 : Schéma rétrosynthétique d'obtention des RTX-PEG₄-N₃.

2.1 Synthèse de l'entité bioorthogonale *trans*-cyclooctène (TCO-NHS)

Le **TCO-NHS** conjugué sur l'AcM est synthétisé selon une procédure déjà employée dans la littérature [249] qui consiste à faire réagir la fonction alcool du TCO (**TCO-OH**) en présence d'un dérivé isocyanate sous la forme d'un ester activé de NHS (**OCN-C₆H₄-CONHS**) (**Schéma 14**).

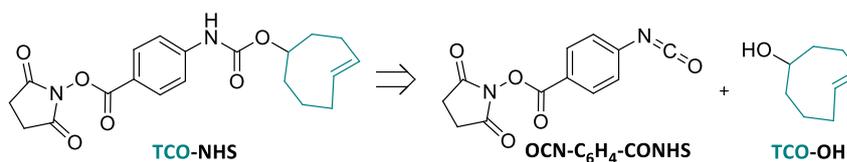


Schéma 14 : Schéma rétrosynthétique d'obtention du TCO-NHS.

a. Synthèse du TCO-OH

Le **TCO-OH** est obtenu selon une méthode efficace développée par Royzen *et al.* [250] qui consiste à synthétiser ce composé par voie photochimique en irradiant à 254 nm à l'aide d'une lampe UV son isomère *cis* commercial, le *cis*-cyclooct-4-enol (**CCO-OH**) en présence de benzoate de méthyle pendant 24 h (**Schéma 15**).

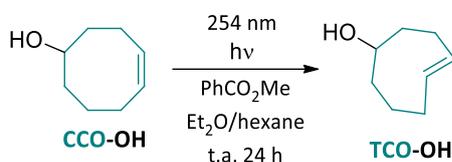


Schéma 15 : Synthèse photochimique du TCO-OH.

La synthèse du **TCO-OH** nécessite de mettre en place un montage particulier illustré sur la **Figure 106** ci-dessous :

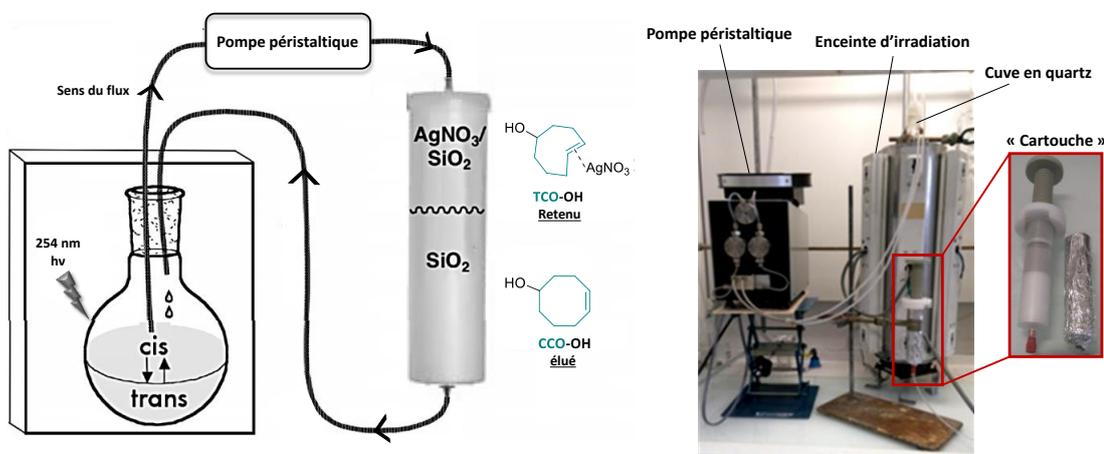
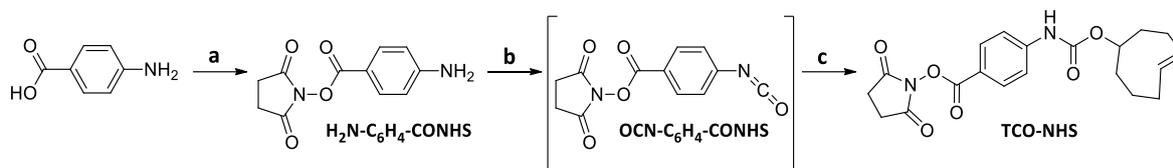


Figure 106 : Montage photochimique pour l'obtention du TCO-OH. Schéma adapté de Royzen *et al.*, 2008 [250].

Le mélange réactionnel contenant du **CCO-OH** et du benzoate de méthyle dans un mélange d'éther diéthylique et d'hexane (90/10 ; v/v) est introduit dans la cuve en quartz située dans l'enceinte d'irradiation. Pendant l'irradiation, le mélange réactionnel est continuellement pompé et envoyé sur une « cartouche » constituée dans sa partie supérieure de silice imprégnée d' $AgNO_3$ (10% m/m) et dans sa partie inférieure de silice normale. L' $AgNO_3$ possédant une forte affinité pour la double liaison du cyclooctène en configuration *trans*, il permet de le complexer et ainsi de retenir sélectivement le **TCO-OH** d'intérêt sur la cartouche. L'isomère *cis* est quant à lui élué et renvoyé au réacteur où il est de nouveau isomérisé et ce jusqu'à son épuisement total du milieu réactionnel. Après 24 h de réaction, la silice imprégnée de $AgNO_3$ est récupérée puis traitée avec de l'ammoniaque 37% permettant de dissocier le **TCO-OH** de $AgNO_3$ par complexation des ions Ag^+ . Le **TCO-OH** est finalement isolé après extraction puis purifié par chromatographie sur gel de silice.

b. Synthèse du TCO-NHS

L'entité bioorthogonale **TCO-NHS** est synthétisée en trois étapes à partir l'acide 4-aminobenzoïque commercial (**Schéma 16**).



a : NHS, DCC, THF, t.a, 16 h, **47 %**; **b** : Triphosgène, DCM, t.a, 16 h; **c** : **TCO-OH**, DCM, t.a, 48 h, **51 %**.

Schéma 16 : Synthèse du TCO-NHS.

La première étape de cette réaction consiste à activer l'acide 4-aminobenzoïque sous forme d'ester de *N*-hydroxysuccinimide en présence de NHS et de DCC pour conduire au **H₂N-C₆H₄-CONHS** avec 47 % de rendement après purification par chromatographie sur gel de silice. Ensuite, la fonction amine située en position 4 est convertie en isocyanate en présence de triphosgène afin d'obtenir l'intermédiaire **OCN-C₆H₄-CONHS**. Ce produit très instable est directement engagé dans la réaction avec le **TCO-OH** permettant de conduire au produit souhaité avec 51 % de rendement après purification par chromatographie sur gel de silice.

La pureté de cette entité bioorthogonale est contrôlée par HPLC après chaque purification mais aussi avant chaque couplage sur l'AcM afin de vérifier la stabilité du **TCO-NHS** synthétisé. Ce composé est en effet très sensible à la lumière, à la chaleur ou encore aux milieux acides qui favorisent son isomérisation en configuration *cis*, certes plus stable mais chimiquement inerte avec la tétrazine. De plus, le **TCO-NHS** peut également être sujet à une hydrolyse de l'ester de NHS. Dans le cas de lots **TCO-NHS** isomérisés et présentant des impuretés, ceux-ci sont de nouveaux purifiés afin d'assurer une ligation TCO/Tz optimale pour l'insertion de notre espaceur sur le **RTX**. Une méthode, développée en amont dans la thèse de Jean-Baptiste Béquignat [251], permet notamment de séparer le TCO du motif CCO grâce à l'utilisation d'une « cartouche » comme celle précédemment utilisée pour séparer le **TCO-OH** du **CCO-OH** (cf. page 203).

Cette technique efficace permet dans un premier temps d'éliminer les impuretés ainsi que l'isomère *cis* non retenus sur la « cartouche » grâce à une élution à l'acétate d'éthyle pur (**Figure 107.①**). Le **TCO-NHS** est finalement décroché de la silice imprégnée d'AgNO₃ avec un mélange acétate d'éthyle/triéthylamine 80/20 v/v (**Figure 107.②**). Dans cette dernière étape, l'ammoniaque a été remplacée par la triéthylamine, une base non nucléophile, permettant de réduire les risques d'hydrolyse de l'ester activé.

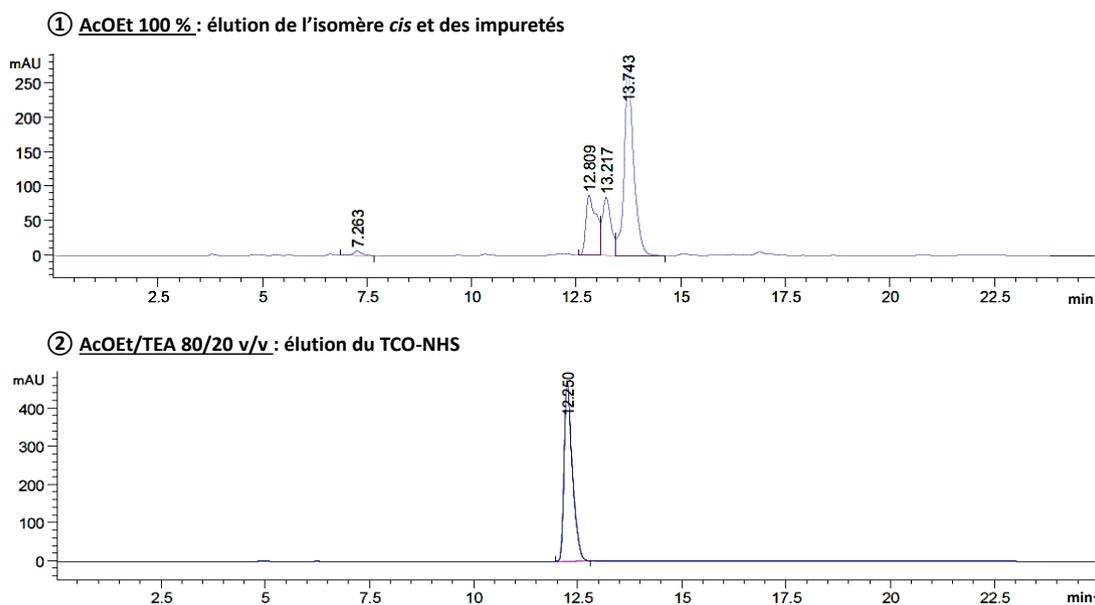


Figure 107 : Chromatogrammes de la première fraction après élution à l'AcOEt, et de la seconde fraction après élution avec le mélange AcOEt/TEA. **Conditions expérimentales** : Colonne Zorbax Extend-C18 (4,6 x 150 mm², granulométrie 5 μm), volume d'injection : 20 μL, débit 1 mL/min, solvant A : H₂O + 0,1% TFA, solvant B : ACN + 0,1% TFA, méthode : 0-20 min 40 à 70 % B, 20-22 min 70 à 40 % B, 22-25 min, 40 % B isocratique. Temps de rétention du TCO-NHS de 12,25 min dans ces conditions (λ = 286 nm).

2.2 Modification du RTX par l'entité bioorthogonale TCO

Les **RTX-TCO** sont obtenus selon le même protocole utilisé précédemment pour l'obtention des gammes de **RTX-N₃** (cf. page 189) ; à savoir en mettant en réaction le **RTX** en présence d'un nombre d'équivalents croissants de **TCO-NHS** (0, 5, 10, 15, 20, 30 éq.) en milieu basique (pH 9) tamponné à l'aide d'une solution de bicarbonate de sodium 1M (**Schéma 17**). Après 30 min d'agitation à 4 °C dans l'obscurité, les mélanges réactionnels sont purifiés à l'aide de colonnes de dessalage Zeba permettant de récupérer après centrifugation les **RTX-TCO** en solution dans le PBS. De la même façon, il est possible de déterminer les concentrations des différentes solutions de **RTX-TCO** (en μg/μL) par NanoDrop afin d'estimer la quantité d'AcM récupérée après purification.

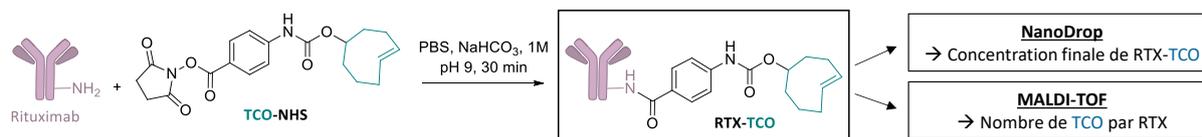


Schéma 17 : Protocole de fonctionnalisation du RTX par l'entité bioorthogonale TCO.

Nous avons cependant observé des comportements différents par rapport aux gammes de **RTX-N₃**. L'analyse des résultats démontre une plus grande variabilité des quantités recouvrées d'AcM (12 % à 100 %) : la totalité de l'AcM est récupérée pour les conditions 5 et 10 équivalents (100 %) puis nous notons une diminution à partir de 15 équivalents de **TCO-NHS** mis en contact avec l'AcM (**Tableau 17**). Par ailleurs, de très faibles concentrations en AcM ont été recouvrées pour les conditions 20 et 30 équivalents (respectivement 31 % et 12 %).

Equivalents de TCO-NHS mis en réaction	0 éq.	5 éq.	10 éq.	15 éq.	20 éq.	30 éq.
Quantité recouvrée de RTX (%)	100	100	100	66	31	12

Tableau 17 : Quantité recouvrée de RTX après contact avec différents équivalents du dérivé TCO activé.

a. Analyse par MALDI-TOF

L'analyse MALDI-TOF nous permet ici aussi de déterminer le nombre d'entités bioorthogonales **TCO** incorporées par AcM pour chaque échantillon de la gamme de **RTX-TCO**. Le nombre moyen de **TCO** par **RTX** est obtenu en faisant la différence de masse entre le **RTX-TCO** modifié et le **RTX** natif puis en divisant la masse obtenue par la masse moléculaire de l'adduit **TCO** greffé (272,32 Da).

Comme pour les gammes de **RTX-N₃** nous pouvons constater que le nombre moyen de **TCO** incorporés par AcM est croissant avec le nombre d'équivalents (**Figure 108**). Cependant, nous obtenons une moins bonne fonctionnalisation du **RTX** avec l'entité bioorthogonale TCO par rapport au **N₃** avec un nombre de TCO greffés inférieur à nombre d'équivalent similaire. Toutefois, le nombre moyen de **TCO** greffés reste largement suffisant pour les études que nous souhaitons faire; de plus, ces résultats démontrent l'efficacité et l'application possible de cette méthode de greffage pour différentes structures moléculaires.

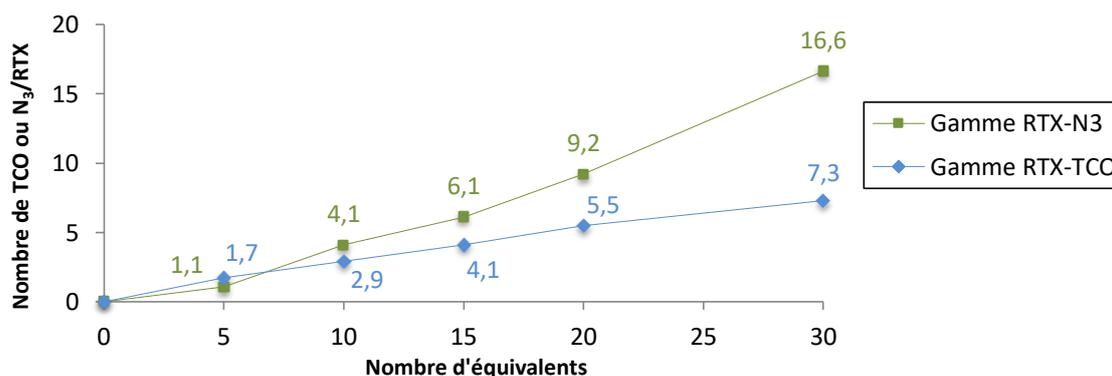


Figure 108 : Comparaison graphique du nombre de TCO et **N₃** greffés par RTX en fonction du nombre d'équivalents d'esters activés TCO-NHS ou **N₃-C₆H₄-CONHS** mis en réaction.

b. Analyses par fluorescence

i. Etudes moléculaires par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Une fois les différents **RTX-TCO** à notre disposition, nous avons vérifié leur réactivité sur gel de polyacrylamide vis-à-vis d'une sonde fluorescente de type Cy3 porteuse d'une fonction tétrazine (Tz-Cy3, $\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$).

Le gel imagé par fluorescence confirme l'interaction très rapide et spécifique de cette sonde avec les **TCO** greffés sur les **RTX** (**Figure 109**). L'intensité de fluorescence mesurée augmente bien avec le nombre de **TCO** incorporés confirmant la réactivité des différents échantillons de **RTX** modifiés.

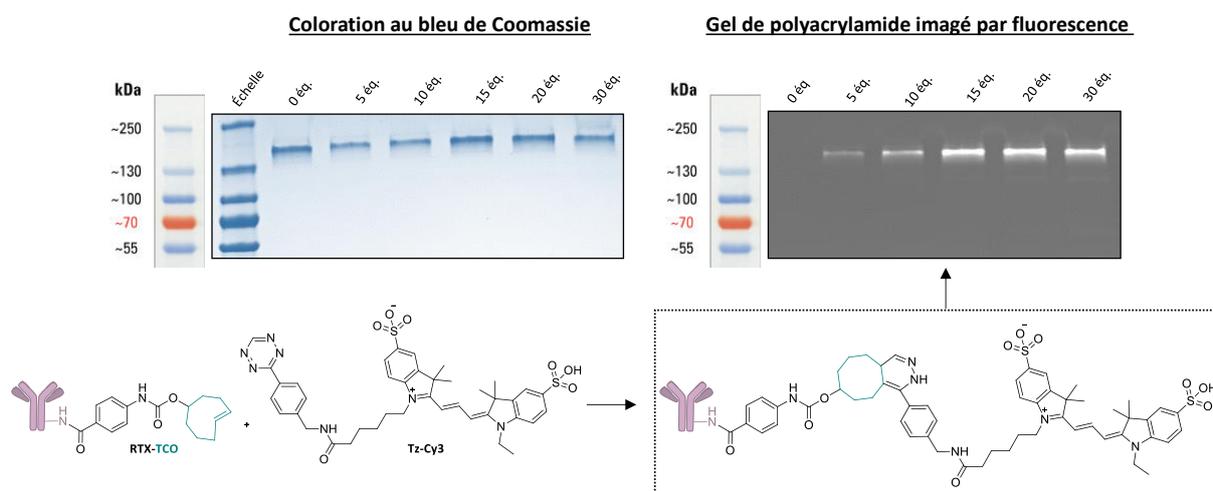


Figure 109 : Révélation du gel de polyacrylamide par fluorescence après incubation avec la sonde fluorescente Tz-Cy3 à 5 min et coloration du gel au bleu de Coomassie.

ii. Etudes in vitro par cytométrie en flux

La présence de TCO réactifs sur nos AcM étant confirmée, l'objectif a ensuite été de sélectionner le meilleur conjugué **RTX-TCO** permettant de greffer de façon efficace l'espaceur **Tz-PEG₄-N₃** sur l'AcM. Pour cela, les cellules GRANTA-519 sont incubées avec les différents lots de **RTX-TCO** (0, 5, 10, 15 et 20 équivalents) puis avec un excès d'une Tz porteuse d'un groupement fluorescent de type fluorescéine (Tz-5-FAM, $\lambda_{ex} = 492$ nm, $\lambda_{em} = 517$ nm) par rapport au nombre de **TCO** présents (**Figure 110**). La condition 30 équivalents n'a pas pu être testée compte tenu de la très faible concentration en AcM récupérée après purification.

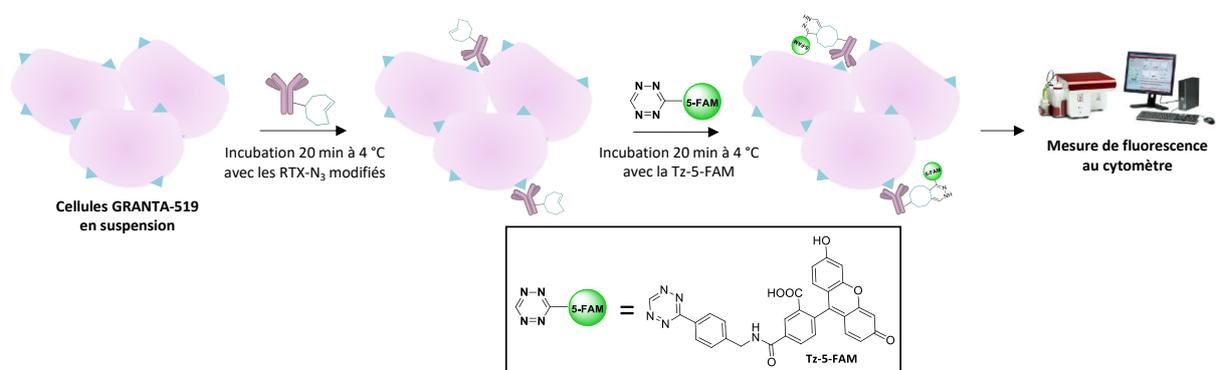


Figure 110 : Protocole de cytométrie en flux des cellules GRANTA-519 incubées avec les RTX-TCO modifiés et la sonde fluorescente Tz-5-FAM.

L'analyse des résultats obtenus démontre que l'intensité de fluorescence augmente significativement pour les conjugués RTX-TCO 5, 10 et 15 équivalents avant de diminuer pour le conjugué 20 équivalents (**Figure 111**). Notre choix s'est finalement porté sur le conjugué **RTX-TCO(15)** qui présente la meilleure intensité de fluorescence et une moyenne de 4 TCO par AcM.

Ce conjugué devrait nous permettre de greffer suffisamment d'espaceurs **Tz-PEG₄-N₃** pour augmenter les chances d'interaction avec les NP. Concernant la fraction immunoréactive de ce conjugué, l'ajout de TCO n'entraîne pas de perte de reconnaissance antigénique (**Figure 112**).

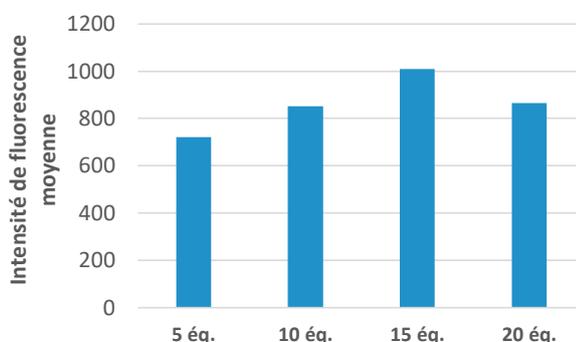


Figure 111 : Intensité de fluorescence moyenne pour les différents échantillons de RTX-TCO.

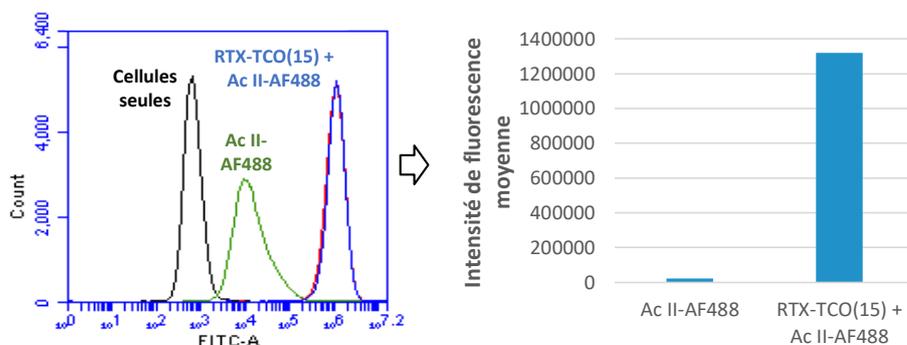


Figure 112 : Contrôle de la reconnaissance antigénique du conjugué RTX-TCO(15).

2.3 Préparation du RTX-PEG₄-N₃

Une fois le **RTX-TCO** synthétisé, notre but a ensuite été d'introduire l'espaceur **Tz-PEG₄-N₃** sur l'AcM grâce à la ligation IEDDA et de vérifier ensuite la réactivité de l'entité bioorthogonale **N₃** par cytométrie en flux. Cette réaction étant extrêmement rapide, nous avons pu nous permettre de d'incorporer l'espaceur sur les AcM modifiés directement *in tubo* pendant le protocole de cytométrie en flux, c'est-à-dire une fois les **RTX-TCO(15)** fixés sur les cellules. Pour cela, les cellules sont d'abord incubées avec **RTX-TCO(15)** puis avec un excès de **Tz-PEG₄-N₃** pour conduire au **RTX-PEG₄-N₃**; et enfin avec le fluorophore ADIBO-AF488 pour confirmer l'insertion de l'espaceur **N₃**. Les cellules sont ensuite analysées au cytomètre en flux (**Figure 113**).

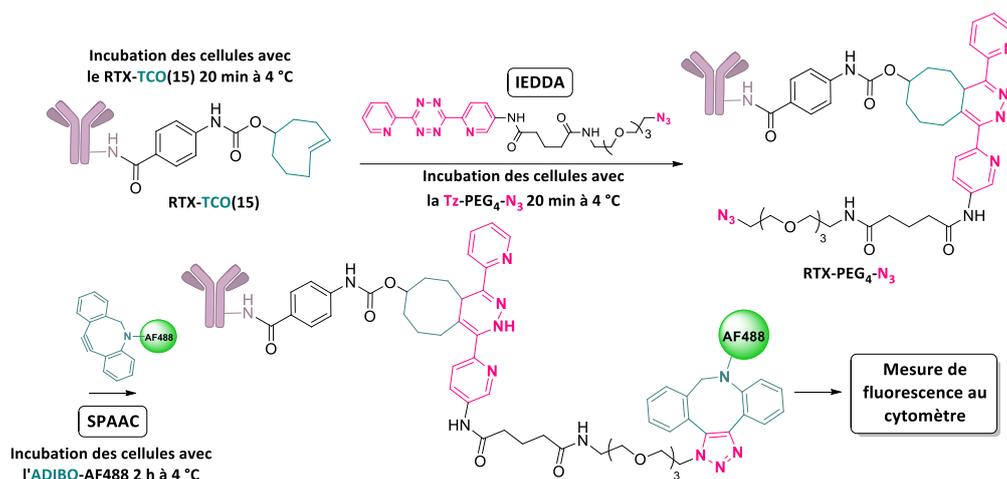


Figure 113 : Protocole de cytométrie en flux des cellules GRANTA-519 d'abord incubées avec les RTX-TCO(15) puis avec l'espaceur Tz-PEG₄-N₃ et enfin avec l'ADIBO-AF488. Les cellules ne sont pas représentées pour plus de clarté.

Les résultats obtenus confirment l'incorporation de l'espaceur sur RTX-TCO(15) par ligation IEDDA ; en effet, nous observons une réactivité ainsi qu'une interaction spécifique du RTX-PEG₄-N₃ avec l'ADIBO-AF488 (Figure 114). Afin de vérifier que l'espaceur soit bien greffé de façon spécifique *via* les entités bioorthogonales TCO de l'AcM, nous avons réalisé un contrôle négatif en incubant les cellules avec le RTX natif (absence de TCO). L'intensité de fluorescence deux fois moins élevée qu'avec les RTX-TCO(15) témoigne du greffage spécifique de la Tz-PEG₄-N₃ sur l'AcM par IEDDA.

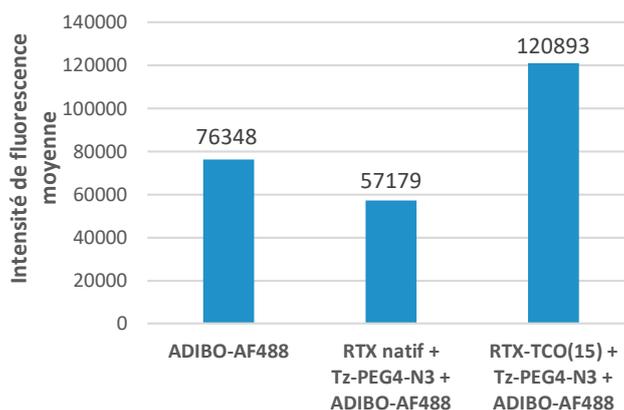


Figure 114 : Intensité de fluorescence moyenne mesurée par cytométrie en flux pour les différentes conditions testées.

Cette stratégie basée sur une double ligation bioorthogonale a également été validée *in vitro* par imagerie confocale. Les images témoignent de l'interaction spécifique du RTX-PEG₄-N₃ avec l'ADIBO-AF488 (Figure 115.d). En effet, nous observons un marquage membranaire fluorescent uniquement lorsque les cellules sont préalablement incubées avec le RTX-TCO(15), sinon aucune fluorescence n'est visible (Figure 115.c). Nous avons donc entrepris d'utiliser ces conditions réactionnelles pour vérifier ensuite la reconnaissance des NP avec les RTX-PEG₄-N₃ par imagerie confocale.

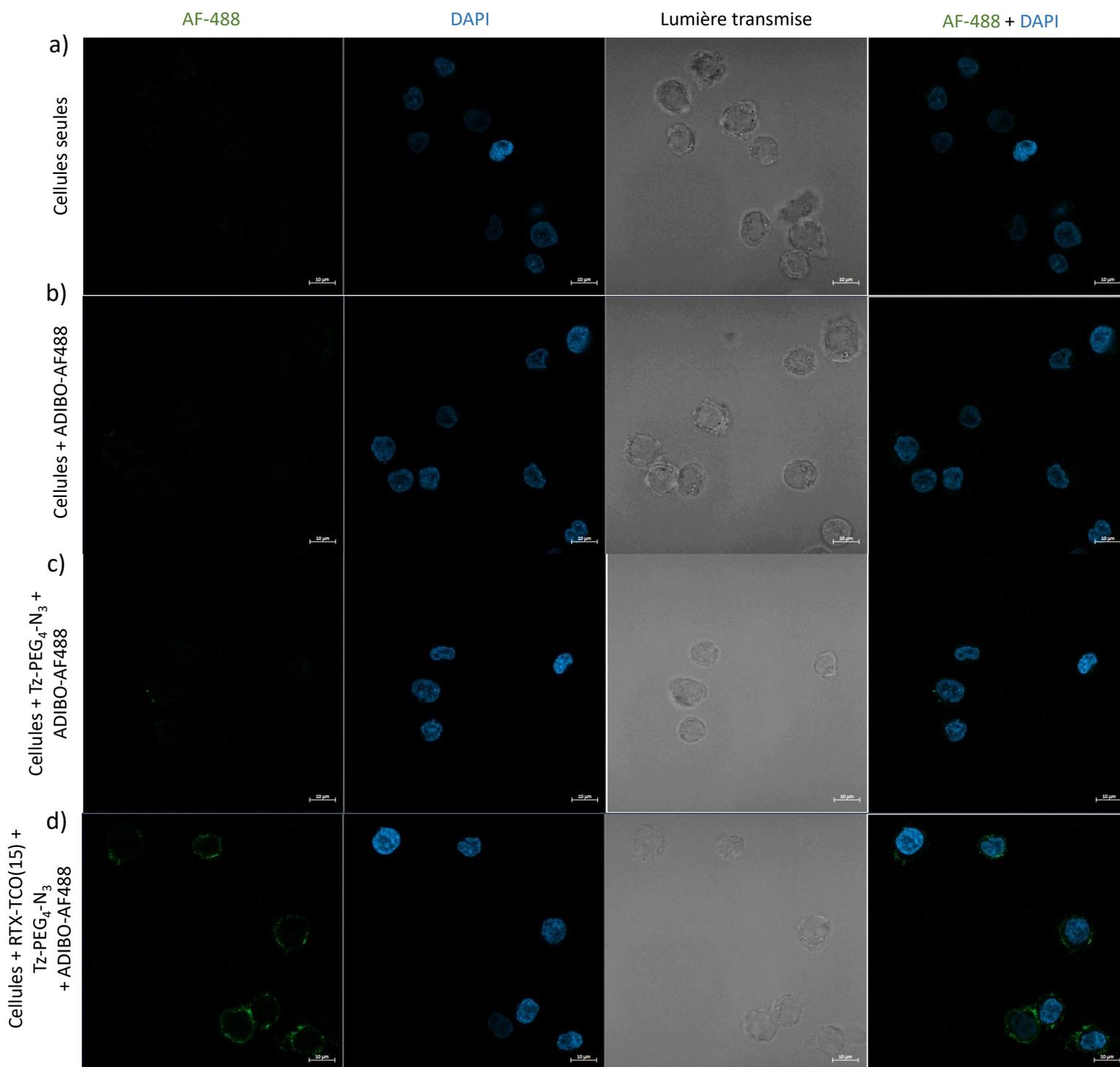


Figure 115 : Images en microscopie confocale en fluorescence (a) de cellules GRANTA-519 incubées (b) avec l'ADIBO-AF488, (c) avec la Tz-PEG₄-N₃ puis l'ADIBO-AF488 ou (d) avec le RTX-TCO(15), la Tz-PEG₄-N₃ puis l'ADIBO-AF488. Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu (DAPI) et l'ADIBO-AF488 en vert (Alexa Fluor 488).

2.4 Vérification de la reconnaissance des NP avec les conjugués RTX-PEG₄-N₃ par microscopie confocale

La réactivité des RTX-PEG₄-N₃ vis-à-vis d'une sonde fluorescente ADIBO étant avérée, nous avons voulu vérifier si l'ajout de l'espaceur entre le motif bioorthogonale N₃ et l'AcM pouvait permettre la réaction entre les ADIBO présents en surface des NP et les dérivés azotures de RTX-PEG₄-N₃. Les cellules GRANTA-519 sont tout d'abord incubées avec le RTX-TCO(15) puis avec la Tz-PEG₄-N₃ venant se lier de façon covalente à l'AcM modifié par chimie bioorthogonale IEDDA (Figure 116). Les NP (NP-ADIBO/NH₂ et NP-ADIBO/DOTA(Gd)) sont ajoutés dans un dernier temps et doivent se fixer spécifiquement par ligation SPAAC aux RTX-PEG₄-N₃ formés *in vitro*.

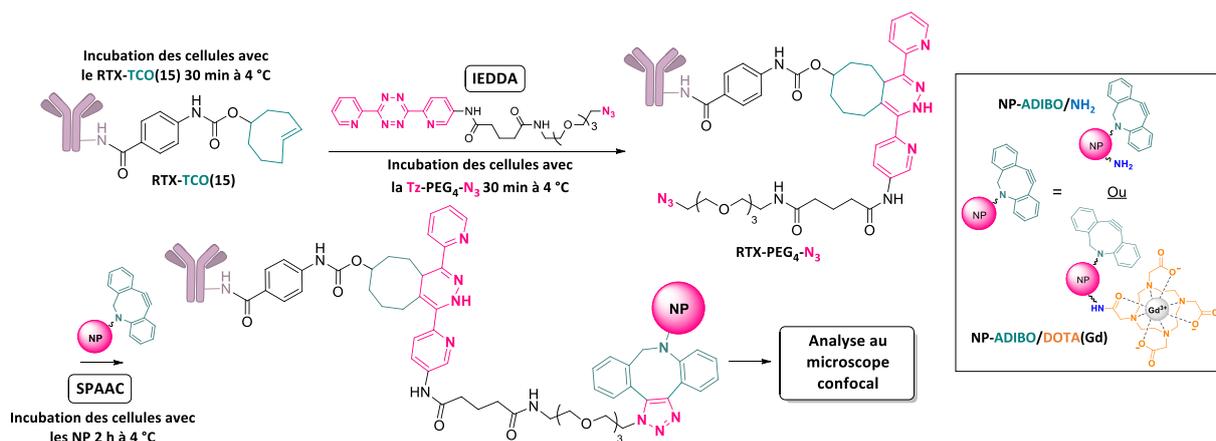


Figure 116 : Protocole de microscopie confocale des cellules GRANTA-519 incubées avec le RTX-TCO(15) modifiés, la Tz-PEG₄-N₃ et les NP-ADIBO/NH₂ ou NP-ADIBO/DOTA(Gd). Les cellules ne sont pas représentées pour plus de clarté.

Trois conditions différentes pour chaque type de NP ont été testées comprenant deux contrôles négatifs, permettant de s'assurer qu'il n'y ait pas de fixation membranaire non spécifique des NP seules (Figure 117.b/e) ou de la Tz-PEG₄-N₃ avec les NP (Figure 117.c/f), sans incubation préalable du RTX-TCO(15). L'autre condition consiste à tester l'approche de précipilage avec RTX-PEG₄-N₃ (formé *in tubo*) et les NP (Figure 117.d/g).

Les clichés des contrôles démontrent de nouveau la fixation membranaire non spécifique des NP que ce soit avec ou sans la Tz-PEG₄-N₃. Par ailleurs, il ne semble pas que l'ajout de l'espaceur sur RTX augmente l'interaction spécifique des NP par rapport aux contrôles.

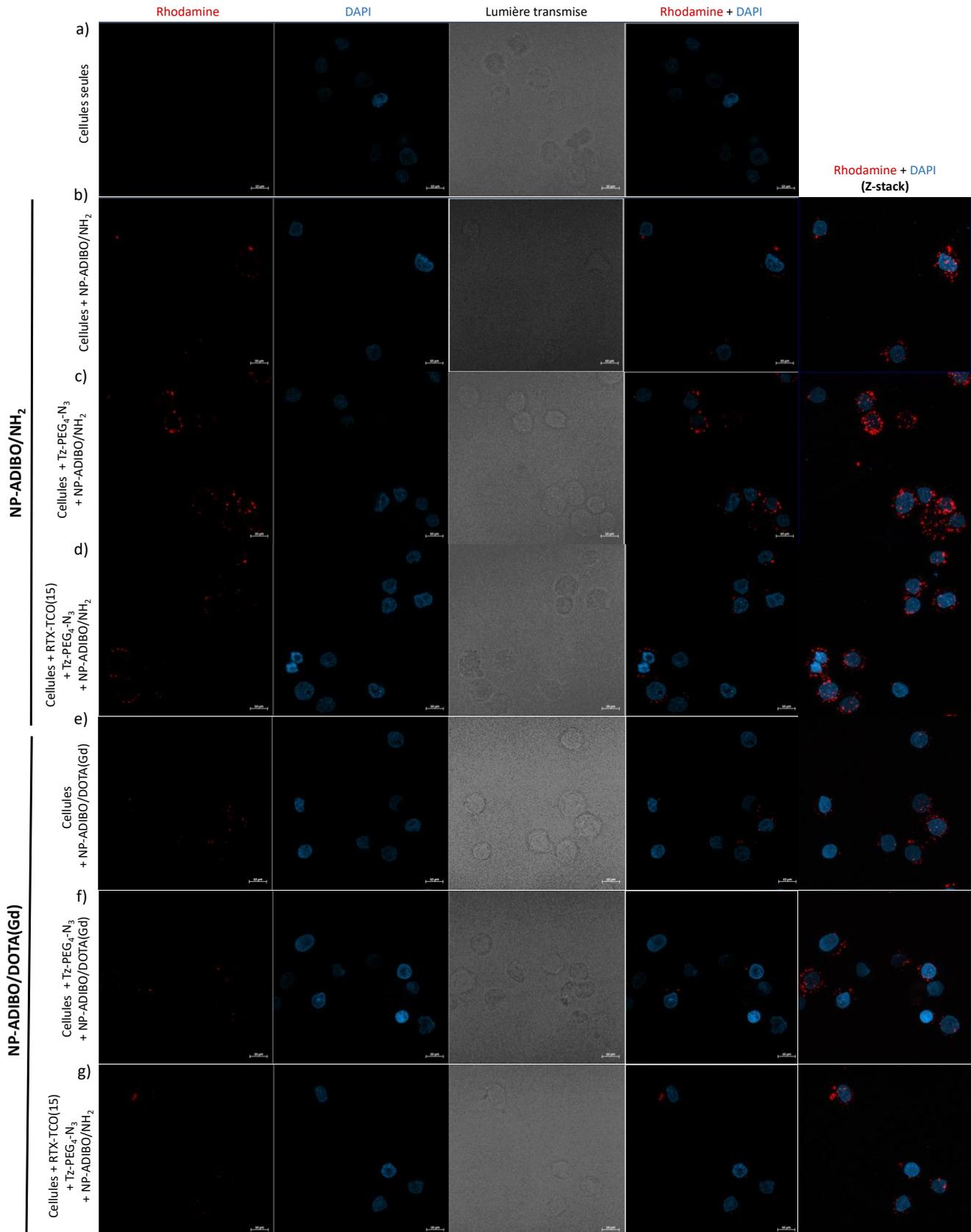


Figure 117 : Images en microscopie confocale en fluorescence (a) de cellules GRANTA-519 incubées (b) avec les NP, (c) avec la Tz-PEG₄-N₃ puis les NP ou (d) avec le RTX-TCO(15), la Tz-PEG₄-N₃ puis les NP. Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu (DAPI) et les NP en rouge (Rhodamine). Z-stack : combinaison de plusieurs images dont le plan focal varie.

V. Etudes préliminaires de radiosensibilité des cellules GRANTA-519

1. Irradiation par immunoprécipilage avec une entité bioorthogonale ADIBO porteuse de gadolinium (ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd))

Avant d'entreprendre des tests d'irradiation avec les NP, nous avons souhaité dans un premier temps évaluer la radiosensibilité des cellules GRANTA-519 *via* la stratégie d'immunoprécipilage en utilisant une fonction ADIBO porteuse de gadolinium. Ces tests doivent aussi permettre un comparatif *a posteriori* quant à l'effet radiosensibilisant thérapeutique apporté par les NP par rapport à une molécule plus simple chélatant du gadolinium. Pour ce faire, nous avons décidé d'utiliser un complexe, appelée **ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)**, qui possède un motif bioorthogonal ADIBO séparée du macrocycle DOTA par l'intermédiaire d'un espaceur de type tétraéthylène glycol (PEG₄) afin de faciliter la ligation avec les conjugués RTX-N₃(10).

1.1 Synthèse du complexe ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)

Le complexe **ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)** est obtenu en faisant réagir l'amine du complexe **NH₂-PEG₄-DOTA(Gd)**, issu du **N₃-PEG₄-DOTA(Gd)** après hydrogénation catalytique et dont la synthèse a déjà était décrite en amont (cf. page 174), sur l'ester activé de l'ADIBO (**ADIBO-NHS**) (**Schéma 18**).

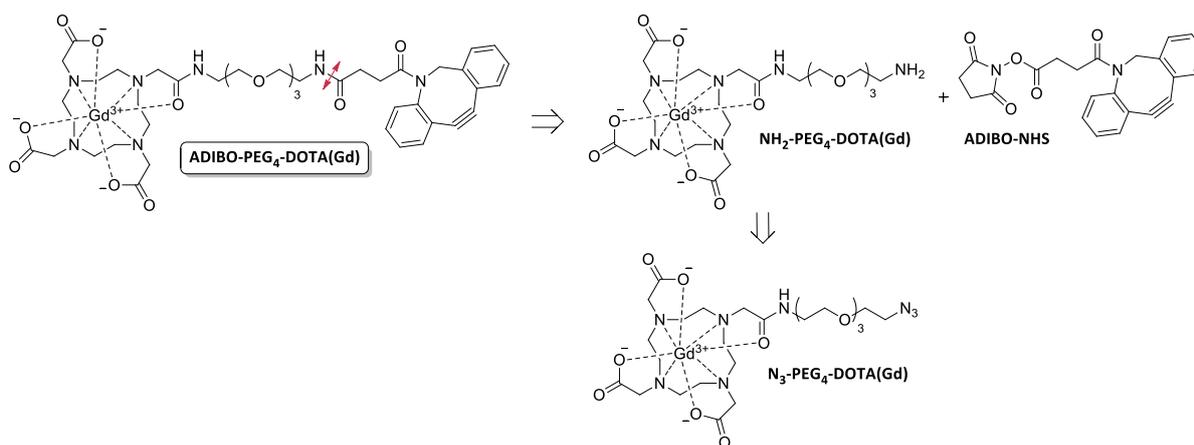
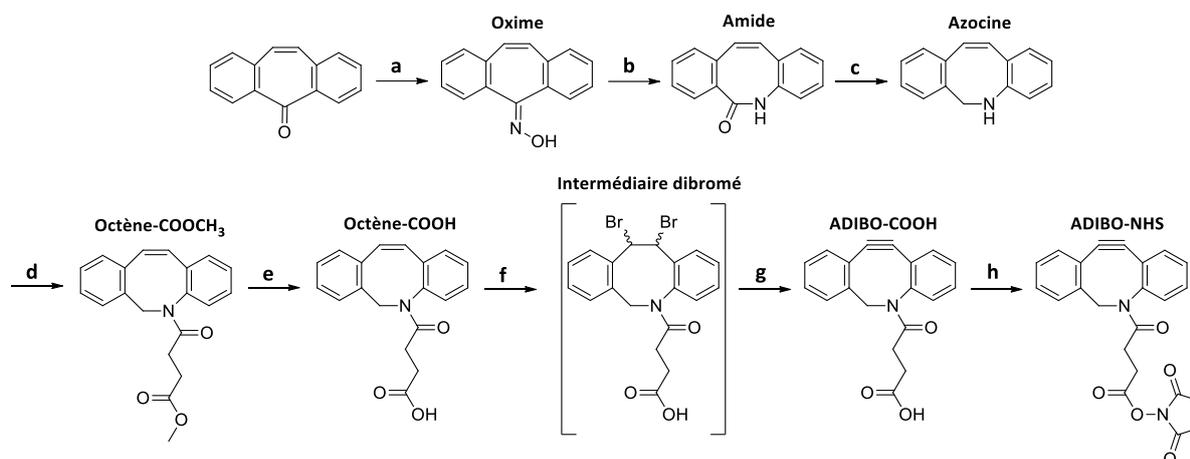


Schéma 18 : Schéma rétrosynthétique d'obtention du complexe ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd).

Nous commencerons donc par détailler la synthèse de l'ADIBO sous sa forme ester activé de type NHS pour finir par son couplage avec le ligand **NH₂-PEG₄-DOTA(Gd)**.

a. Synthèse de l'ADIBO-NHS

L'ADIBO est synthétisé à partir des méthodes de synthèse décrites par Chadwick *et al.* [252] ainsi que Campbell-Verduyn *et al.* [253]. Il est ainsi obtenu en huit étapes avec un rendement global de 25 % à partir de la dibenzosuberone commerciale (**Schéma 19**).



a : $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, Pyridine, Ethanol, 80 °C, 16 h, 97 %; b : Réactif d'Eaton, 100 °C, 1 h, 94 %; c : LiAlH_4 4M, Et_2O , 35 °C, 16 h, 64 %; d : Chlorure de succinyle méthylique, TEA, DCM, 0 °C puis t.a., 16 h, 72 %; e : LiOH , H_2O , MeOH, 100 °C, 18 h, 91 %; f : Br_2 , DCM, 0 °C, 2 h; g : $t\text{-BuOK}$ 1M, THF, -40 °C, 2 h, 78 %; h : EDC, NHS, DCM, t.a., 24 h, 84 %.

Schéma 19 : Synthèse de l'ADIBO-NHS.

Chadwick *et al.* s'inspirent de la méthode de Popik [254], qui propose d'obtenir le cyclooctyne à partir de l'azocine. Cette synthèse débute à partir de la 5-dibenzosuberénone commerciale chauffée à reflux en présence d'hydroxylamine pour former l'oxime correspondante avec 97 % de rendement après précipitation. Selon la méthode de Popik, il s'ensuit alors une étape d'extension du cycle correspondant à un réarrangement de Beckmann normalement catalysé par l'acide polyphosphorique. Les auteurs proposent de remplacer cet acide par le réactif d'Eaton constitué d'un mélange de pentoxyde de phosphore et d'acide méthanesulfonique (1/10, v/v) permettant d'améliorer la solubilité des composés pendant la réaction et de faciliter les étapes de workup par la suite. Cette réaction permet de convertir l'oxime en amide avec un rendement de 94 % après mise en réaction avec le réactif d'Eaton chauffé à 100 °C pendant 1 h. L'azocine souhaitée est alors obtenue par réduction de la fonction lactame (Amide) en présence de LiAlH_4 (4M) dans l'éther diéthylique avec un rendement de 64 % après précipitation. Cette méthode permet d'obtenir l'azocine de façon efficace avec un rendement global de 58 % sur trois étapes.

Ce composé est ensuite acylé avec le chlorure de succinyle méthylique en présence de triéthylamine pour conduire à l'octène porteur d'un bras ester méthylique (Octène- COOCH_3) avec 72 % de rendement. L'ester méthylique est ensuite converti en acide (Octène- COOH) dans des conditions de saponification en présence d'hydroxyde de lithium dans le méthanol à reflux permettant d'obtenir le composé avec un rendement de 91 %.

A partir de ce composé, l'octyne acide (ADIBO- COOH) est synthétisé *via* une étape de dibromation de la fonction alcène intracyclique suivie d'une double élimination des atomes de brome. Lors l'étape de dibromation, l'intermédiaire dibromé formé n'est pas isolé, l'analyse RMN ^1H permet de suivre la disparition des deux protons de l'alcène à 6,77 et 6,57 ppm, et d'engager le produit brut directement dans l'étape suivante.

La double élimination des atomes de brome est réalisée en présence de *tert*-butylate de potassium dans le tétrahydrofurane à -40 °C pendant 2 h pour conduire à l'**ADIBO-COOH** avec un rendement de 78 %. Enfin, la dernière étape consiste à activer l'acide sous forme d'ester de *N*-hydroxysuccinimide en présence d'EDC afin d'obtenir après purification par chromatographie sur gel de silice l'**ADIBO-NHS** avec 84 % de rendement.

b. Synthèse du complexe ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)

Une fois l'**ADIBO-NHS** en notre possession, nous avons pu procéder à son couplage avec le DOTA porteur de la fonction amine en vue de l'obtention du complexe d'intérêt de type **ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)** (Schéma 20). Pour cela, nous avons décidé d'utiliser le **N₃-PEG₄-DOTA(Gd)** préalablement complexé (cf. page 174) afin de réduire la fonction azoture en amine par hydrogénation pallado-catalysée en présence de palladium sur charbon. Le complexe souhaité est finalement obtenu en faisant réagir le **NH₂-PEG₄-DOTA(Gd)** obtenue avec l'**ADIBO-NHS** en présence de DIPEA dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre à température ambiante pendant 16 h [240]. Cette voie de synthèse permet de conduire au complexe avec un rendement faible (30 %) après purification par HPLC sur phase inverse. L'analyse HRMS a permis de confirmer la masse attendue pour ce complexe, $[M+2H]^{2+}$ calculée pour C₄₃H₅₇GdN₇O₁₂ 511.1687; mesurée 511,1703 (Figure 118).

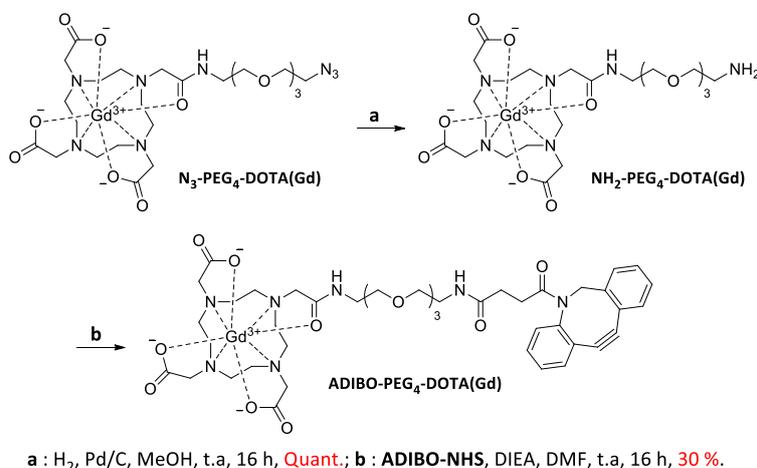


Schéma 20 : Synthèse du complexe ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd).

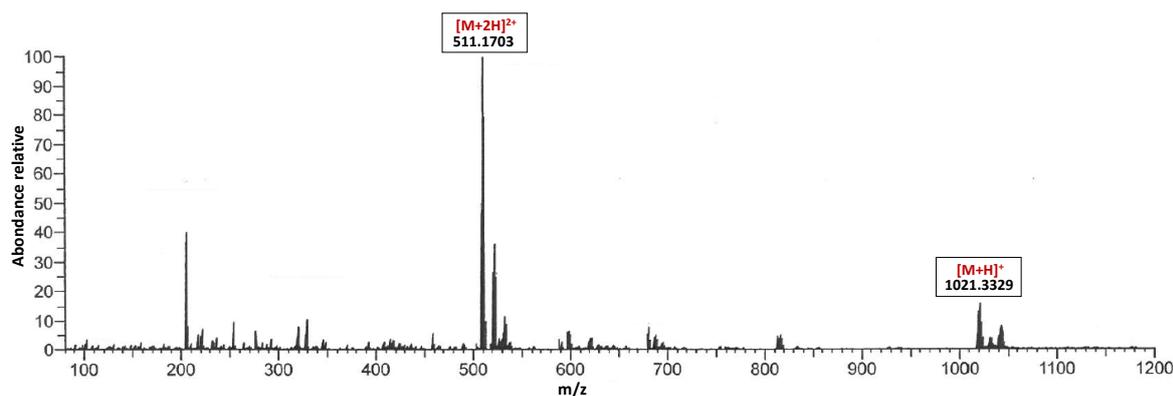


Figure 118 : Spectre de masse de l'ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd).

1.2 Effet du complexe sur les cellules GRANTA-519

Le but ici est d'étudier l'effet induit par l'**ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)** sur des colonies cellulaires suite à une irradiation externe. Avant de mettre l'AcM modifié et le complexe de gadolinium en contact avec les cellules, nous avons voulu vérifier qu'ils n'engendraient pas eux-mêmes une toxicité cellulaire sans irradiation. Les deux études de cytotoxicité ont donc été menées en parallèle sur une période de 24 h à 37 °C en incubant les cellules avec différentes concentrations du complexe (1,6 ; 3,1 ; 6,3 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 et 200 µM) et de **RTX-N₃(10)** (0,4 ; 0,7 ; 1,4 ; 2,8 et 5,7 µg/mL) (**Figure 119**).

L'analyse des résultats montre que l'**ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)** n'est pas cytotoxique pour des concentrations allant de 1,6 à 100 µM avec 100 % de viabilité cellulaire permettant de valider l'utilisation du complexe à 50 µM pour les tests d'irradiation. Une légère toxicité apparaît à partir de 100 µM avec une diminution de 20 % du nombre de cellules viables. Pour le **RTX-N₃(10)**, aucune toxicité n'est apparente sur la lignée cellulaire.

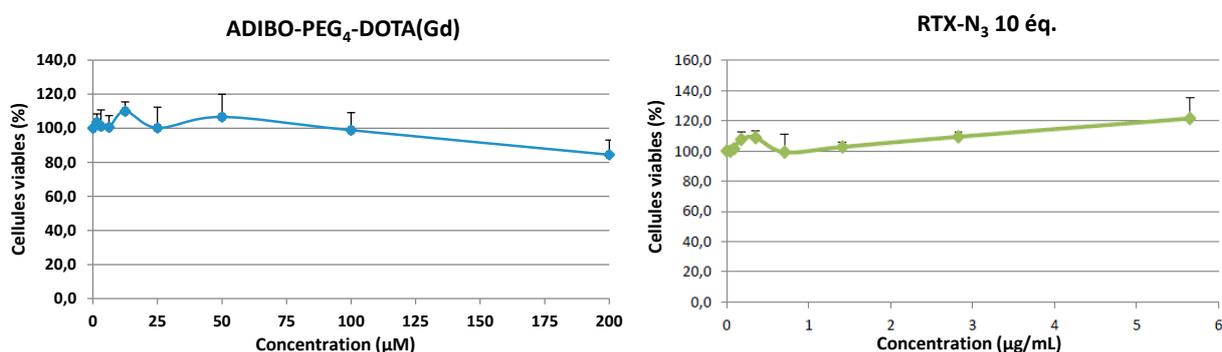


Figure 119 : Représentation graphique du pourcentage de cellules GRANTA-519 encore viables après incubation 24h à 37°C (5% de CO₂) avec différentes concentrations du complexe ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd) ou de RTX-N₃(10).

Afin d'irradier de façon homogène ces cellules qui sont non adhérentes, nous avons utilisé une méthode qui consiste à les ensemercer dans du MéthoCult® (milieu semi-liquide enrichi) [255] une fois les cellules traitées dans les différentes conditions souhaitées. Ce milieu est ensuite introduit dans une plaque 6 puits permettant l'irradiation.

Nous avons choisi de tester 4 conditions différentes comprenant trois contrôles négatifs pour vérifier qu'il n'y ait pas d'effet des radiations sur les cellules seules (**Figure 120.a**), sur les cellules en présence du complexe sans incubation préalable avec l'AcM modifié (**Figure 120.b**) et sur les cellules uniquement incubées avec l'AcM (**Figure 120.c**). Dans la dernière condition, les cellules ont d'abord été incubées avec le **RTX-N₃(10)** puis avec un excès d'**ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)** afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique de la stratégie d'immunopréciblage (**Figure 120.d**). Chaque condition a ensuite été soumise à 3 doses différentes de radiations : 0, 2 et 4 Gray puis les plaques ont été analysées à l'IncuCyte® 9 jours post-irradiation afin de compter le nombre de colonies par puits.

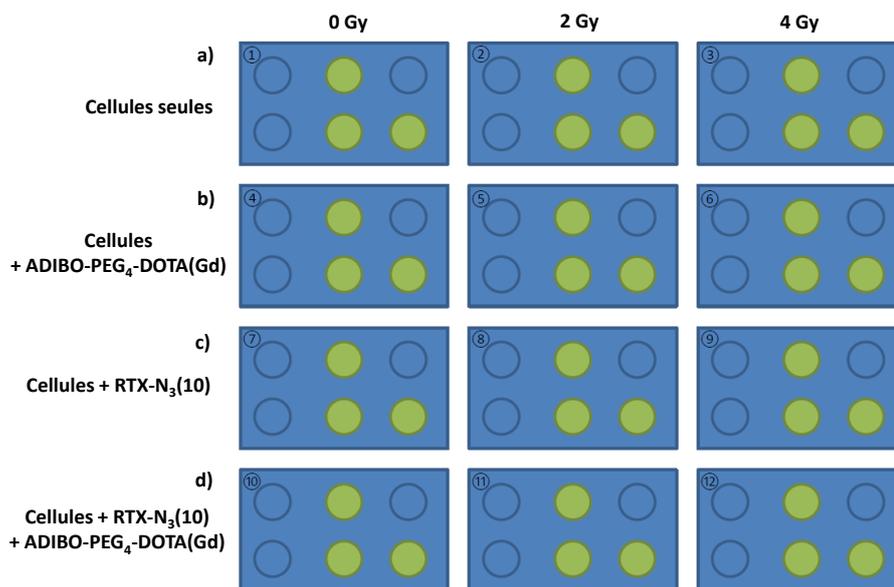


Figure 120 : Plan des plaques 6 puits résumant les différentes conditions testées pour l'étude de radiosensibilité des cellules GRANTA-519. La couleur verte représente les puits pleins.

Les différents résultats post-irradiation soulèvent un problème quant à la radiosensibilité élevée de la lignée cellulaire elle-même. En effet, l'irradiation seule réalisée à 2 Gy a déjà un effet important sur le nombre de colonies avec environ 4 fois moins de cellules qu'au départ (**Figure 121**). Cet effet se confirme à 4 Gy avec la disparition presque totale des cellules. De plus, l'approche d'immunoprécipilage (cellules + **RTX-N₃(10)** + **ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)**) ne montre aucun effet significatif comparativement aux cellules seules.

Une autre évaluation fiable, reproductible et sensible à l'exposition des cellules aux radiations ionisantes consiste à détecter la forme phosphorylée des histones (γ -H2AX) autour desquels l'ADN vient s'enrouler. Ce phénomène hautement amplifié suite à l'irradiation survient spécifiquement au niveau des sites de cassures double brin de l'ADN. De ce fait, les γ -H2AX surexprimés dans la chromatine peuvent facilement être détectés *in situ* notamment par Western Blot grâce à un anticorps spécifique. En parallèle des tests précédents, nous avons donc également réalisé un Western Blot 1 h post-irradiation afin d'évaluer pour chaque condition la quantité de cassures double brin engendrées correspondant à la quantité de γ -H2AX détectée.

Les résultats n'ont pu montrer aucune différence notable entre les irradiations effectuées à 0, 2 et 4 Gy quelles que soient les conditions utilisées (**Figure 122**). Nous pouvons noter une augmentation des cassures double brin en présence du dérivé porteur de gadolinium **ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)** et également en présence de **RTX-N₃** et d'**ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)**. Cependant, ces résultats ne semblent pas significatifs. Compte tenu de ces observations, il semble difficile de potentialiser un quelconque effet radiosensibilisant sur ce type de lignée cellulaire vraisemblablement déjà très sensible aux radiations.

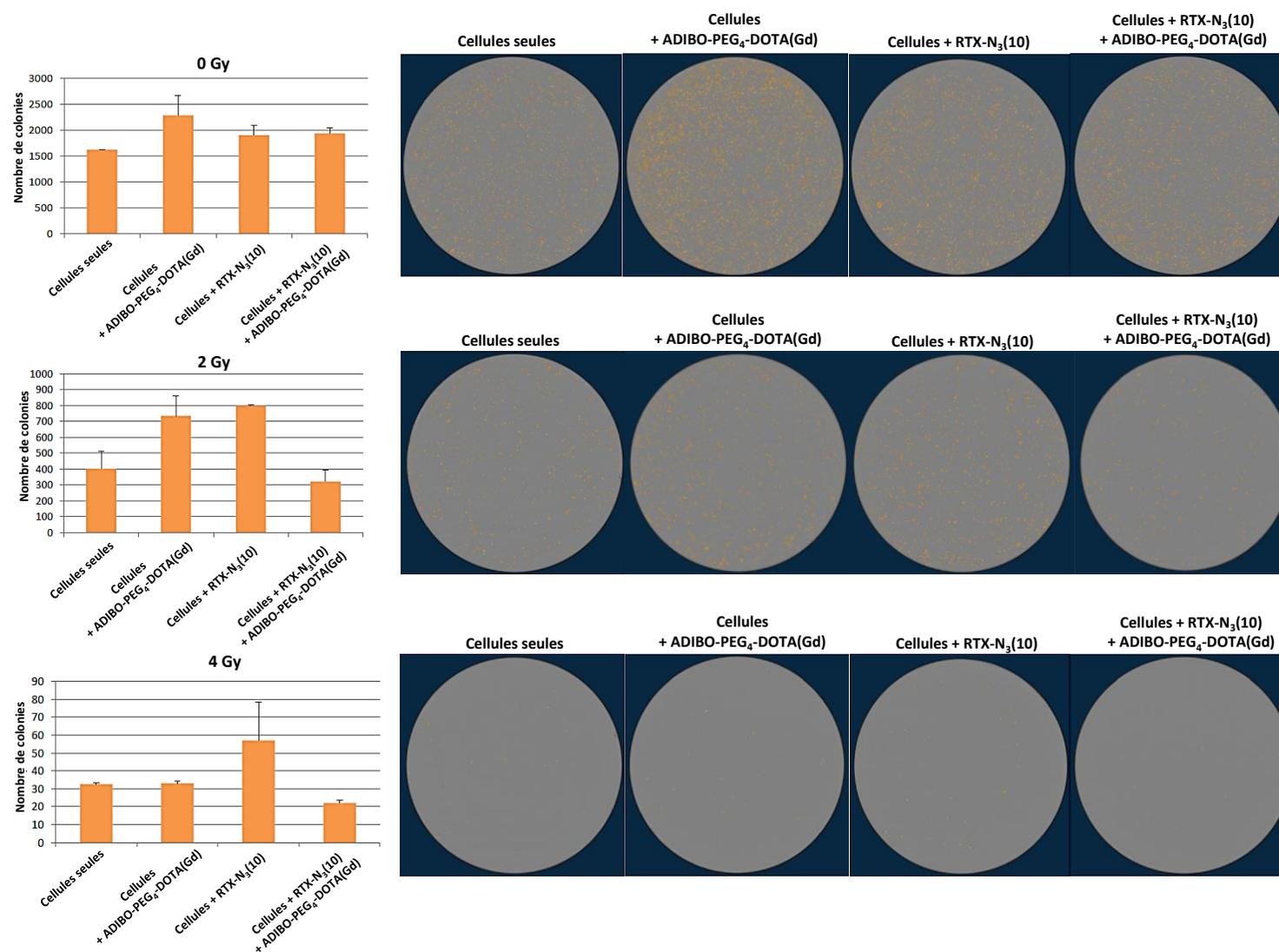


Figure 121 : Nombre de colonies comptées à l'IncuCyte® après irradiation dans différentes conditions à 0, 2 et 4 Gy.

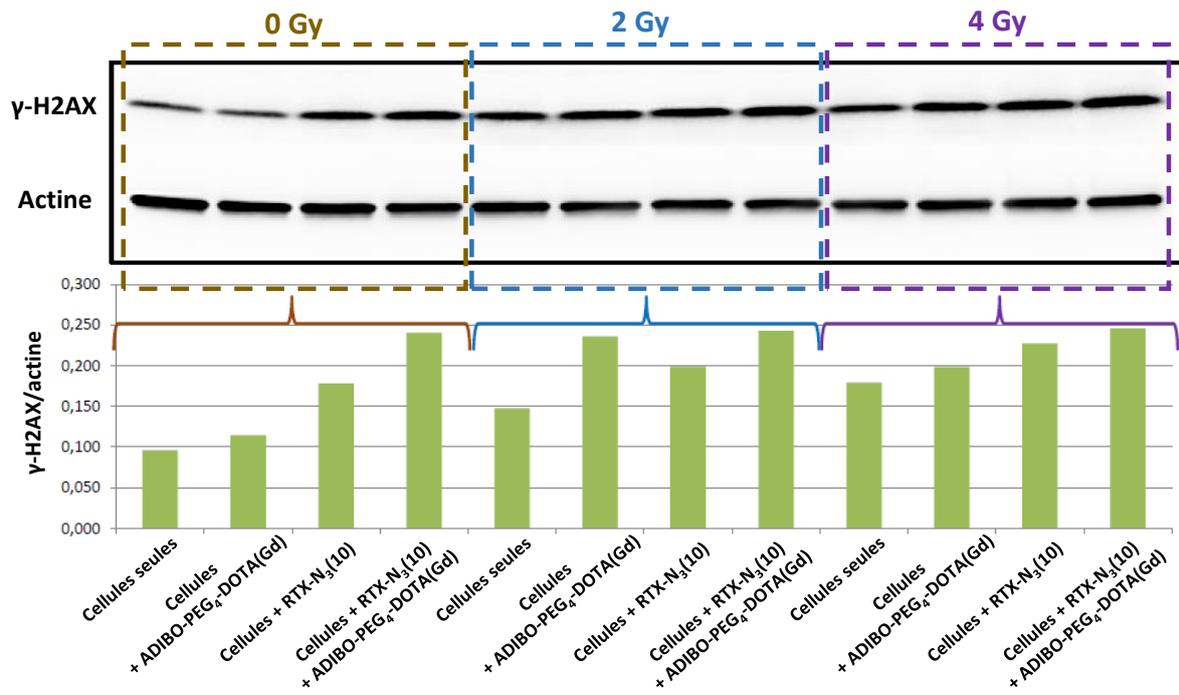


Figure 122 : Quantification des γ -H2AX par Western Blot après irradiations des cellules dans différentes conditions à 0, 2 et 4 Gy.

VI. Conclusion

L'objectif principal de ce chapitre consistait à développer des AcM de type RTX fonctionnalisés avec des fonctions bioorthogonales (N_3) afin d'évaluer *in vitro* l'approche d'immunoprécipilage avec les NP développées dans le chapitre 1 de ce manuscrit. Nous avons été capables de synthétiser le précurseur azoture $N_3-C_6H_4-CONHS$ puis de le greffer de manière efficace et reproductible sur l'AcM. Les différents conjugués **RTX- N_3** ont été analysés par Nanodrop pour déterminer la concentration en AcM fonctionnalisés et par MALDI-TOF pour déterminer le nombre moyen de groupements azoture greffés par AcM. La réactivité des azotures a pu être déterminée par fluorescence à la fois par gel de polyacrylamide et *in vitro* par cytométrie en flux. Nous avons également sélectionné le conjugué **RTX- N_3 (10)** donnant les meilleurs résultats pour les futures études *in vitro* avec les NP par cytométrie en flux. Les premiers tests d'immunoprécipilage effectués par microscopie confocale entre l'AcM sélectionné (**RTX- N_3 (10)**) et les NP (**NP-ADIBO/ NH_2** et **NP-ADIBO/DOTA(Gd)**) n'ont cependant pas été concluants et ont révélé une fixation membranaire non spécifique des NP seules sans l'AcM.

Sur la base de ces résultats, nous avons supposé que les groupements azoture n'étaient peut-être pas suffisamment accessibles pour que la réaction SPAAC ait lieu avec les NP. C'est pourquoi nous avons ensuite envisagé d'ajouter un espaceur sur l'AcM pour tenter de faciliter la ligation entre le motif ADIBO et le motif N_3 . Nous avons entrepris de greffer l'espaceur par chimie bioorthogonale IEDDA grâce au développement de **RTX** modifiés par des entités bioorthogonales **TCO** réagissant spécifiquement avec des motifs Tz porteuses de fonctions N_3 séparées par un espaceur de type PEG₄ (**Tz-PEG₄- N_3**). Dans un premier temps, le **TCO-NHS** greffé sur l'AcM a été produit efficacement grâce à une méthode développée et maîtrisée au sein du laboratoire. Les **RTX-TCO** obtenus ont également été analysés par Nanodrop, MALDI-TOF et cytométrie en flux permettant finalement de sélectionner le conjugué intermédiaire **RTX-TCO(15)**. L'incorporation de **Tz-PEG₄- N_3** sur cet intermédiaire a directement pu être réalisée *in vitro* permettant ainsi l'obtention de **RTX-PEG₄- N_3** avec des fonctions N_3 réactives. Toutefois, les nouveaux tests d'immunoprécipilage réalisés ensuite en microscopie confocale avec les NP n'ont pas permis de mettre en évidence une amélioration de la fixation membranaire spécifique des NP.

Concernant notre approche de radiosensibilisation, des tests préliminaires de la stratégie d'immunoprécipilage utilisant le **RTX- N_3 (10)** et une entité bioorthogonale ADIBO porteuse de gadolinium ont dans un premier temps été envisagés afin d'évaluer la radiosensibilité des cellules GRANTA-519. Nous avons été en mesure de synthétiser le composé **ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)** ; cependant, les tests d'irradiation effectués par la suite ont démontré une forte sensibilité des cellules seules aux radiations à 2 Gy rendant les résultats d'immunoprécipilage difficilement exploitables pour potentialiser un quelconque effet radiosensibilisant sur ce type de lignée cellulaire. Une modification de la lignée cellulaire doit donc être effectuée pour la suite des travaux à réaliser pour cette étude. Des premières modifications chimiques ont été apportées sur des AcM de type Panitumumab (PNT) ciblant le récepteur EGFR de cellules de cancer du sein (MDA-MB-468). A ce jour, seul la réactivité des conjugués **PNT- N_3** synthétisés a pu être validée par gel de polyacrylamide.

Conclusion générale et
perspectives

Les travaux menés dans cette thèse avaient pour objectif principal de concevoir des NP radiosensibilisantes (à base de gadolinium) capables de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses selon une approche d'immunopréciblage par ligation SPAAC (ADIBO/N₃).

Dans le premier chapitre, nous nous sommes d'abord intéressés à l'élaboration de NP porteuses à la fois d'entités bioorthogonales de type ADIBO (pour la reconnaissance avec les AcM-N₃) et de macrocycles DOTA (en tant que chélateurs du gadolinium). L'obtention de ces NP a nécessité d'utiliser une méthode de fonctionnalisation efficace permettant un contrôle précis de leur chimie de surface. Ces NP étant amenées à interagir avec le milieu biologique, des paramètres comme la composition, la taille, la charge, la morphologie et la stabilité intrinsèque ont été à prendre en compte. Des études antérieures réalisées au sein de l'équipe Interfaces et Biocapteurs de l'ISA (Institut des Sciences Analytiques) à Villeurbanne se sont intéressées aux NP à base de silice, et plus particulièrement à leur fonctionnalisation par synthèse supportée. Leur approche permet une fonctionnalisation efficace des NP de silice immobilisées sur un support micrométrique pour la synthèse automatisée par chimie dite « aux phosphoramidites ». Les NP de silice en plus d'être facilement fonctionnalisables, elles sont aussi prometteuses pour des applications en cancérologie puisqu'elles sont biocompatibles, biodégradables et stables en milieux aqueux.

Ainsi, grâce à cette technique de synthèse supportée automatisée nous avons pu élaborer dans un premier temps des NP de silice (**NP-ADIBO/NH₂**) de façon reproductible possédant :

- 1) des fonctions de surface leur permettant d'être furtives et stables (bras espaceurs PEG),
- 2) des entités bioorthogonales pour la ligation SPAAC (fonctions chimiques ADIBO),
- 3) des fonctions amine pour l'incorporation de molécules de radiosensibilisation (macrocycles DOTA pour la complexation du gadolinium).

Le greffage de chacune de ces fonctions chimiques a été mis en évidence par différentes méthodes de caractérisation : qualitatives pour les fonctions ADIBO (par spectroscopie de fluorescence) et quantitatives pour les fonctions NH₂ (par spectrophotométrie d'absorption UV-visible), nous permettant finalement d'estimer ~ 2000 ADIBO et ~ 31 000 NH₂ par NP.

Différentes méthodes de greffage ont ensuite été mises en place pour le couplage covalent de macrocycles DOTA. La première approche de greffage s'est basée sur la formation de liaisons amides entre les fonctions amine des NP et les fonctions esters « activés » des DOTA pour le couplage covalent de différents macrocycles (**DOTA-NHS** et **mDOTA**) de manière supportée. Le **mDOTA** étant plus stable et plus réactif vis-à-vis des amines a plus particulièrement retenu notre attention. Bien qu'il ait été possible de greffer un nombre plus élevé de mDOTA par NP, un ratio de ~ 8000 DOTA par particule s'est révélé être un bon compromis à la fois pour complexer le gadolinium et pour conserver un nombre suffisant de fonctions ADIBO accessibles et réactives ensuite. Cependant, le gadolinium n'a pas pu être complexé de façon efficace au sein des cages DOTA à cause de l'adsorption non spécifique de celui-ci sur la silice des particules en suspension.

De manière très intéressante, nous sommes finalement parvenus à développer les **NP-ADIBO/DOTA(Gd)** d'intérêt *via* l'utilisation de la ligation IEDDA (ADIBO-Tz) grâce à l'incorporation d'entités bioorthogonales tétrazine porteuses de DOTA préalablement chélatés. Le greffage de ces complexes à la surface des NP a été démontré par ICP-MS, nous permettant d'en déduire la présence d'approximativement 2000 Gd par NP.

Le second chapitre de cette partie a porté sur la fonctionnalisation d'AcM de type Rituximab (RTX) par des fonctions N_3 et à leur évaluation *in vitro* avec les NP. Les **RTX- N_3** nécessaire à la stratégie d'immunoprécipilage ont pu être synthétisés avec succès de manière reproductible. Les analyses menées par MALDI-TOF et par fluorescence de ces AcM modifiés sur gel de polyacrylamide ont permis de confirmer le greffage des N_3 sur les AcM. Les tests *in vitro* par cytométrie en flux ont ensuite permis d'identifier le meilleur conjugué RTX- N_3 pour les études avec les NP. Cependant, l'utilisation de la microscopie confocale a ensuite mis en évidence la fixation membranaire non spécifique à la fois des NP fonctionnalisées avec les complexes DOTA(Gd) (**NP-ADIBO/DOTA(Gd)**) et des NP contrôles (**NP-ADIBO/ NH_2**).

Notre seconde approche a donc été d'essayer de faciliter la réaction bioorthogonale entre le motif N_3 et le motif ADIBO par l'ajout d'un espaceur sur l'AcM. Cette stratégie a consisté à mettre à profit une méthode largement étudiée et maîtrisée au sein de l'unité IMoST qui permet la fonctionnalisation des AcM par des entités bioorthogonales TCO (**RTX-TCO**). De cette façon, il a été possible de greffer un espaceur de type **Tz-PEG₄- N_3** par ligation IEDDA (TCO/Tz) pour l'obtention de **RTX-PEG₄- N_3** . Malgré cela, l'ajout d'un espaceur n'a pas permis d'apporter un bénéfice par rapport aux **RTX- N_3** .

Pour ce projet, nous avons choisi le système bioorthogonal complémentaire ADIBO/ N_3 mais pour la suite de ces études, il serait également intéressant d'exploiter le système ADIBO/Tz qui offre une cinétique de ligation plus rapide. Ce système s'est révélé plus efficace pour l'incorporation de tétrazines porteuses de complexes de gadolinium sur les fonctions ADIBO des NP. A ce jour, nous avons pu mettre au point une gamme d'AcM-Tz, les analyses MALDI-TOF confirmant la présence de 2 à 20 Tz par AcM. Il reste à confirmer leur réactivité sur gel de polyacrylamide et à sélectionner le meilleur conjugué *in vitro* par cytométrie en flux. Par ailleurs, il serait aussi possible de revoir la synthèse des NP, notamment en rajoutant des espaceurs pégylés plus importants pour rendre les fonctions ADIBO plus disponibles à la ligation en milieu biologique.

Concernant l'aspect radiosensibilisation de ce projet, les études préliminaires de radiosensibilité menées sur le modèle de lymphome (GRANTA-519) ont démontré la sensibilité accrue des cellules seules (non traitées) dans des conditions classiques d'irradiation à 2 et 4 Gy. Toutefois, l'un des avantages de la stratégie d'immunoprécipilage est qu'elle est transposable à différentes pathologies cancéreuses sans avoir à modifier les NP, seul l'AcM a besoin d'être fonctionnalisé. C'est pourquoi pour les futures études, il a été entrepris de travailler avec le Panitumumab (PNT), un AcM dirigé contre le récepteur à l'EGF afin de mener des études biologiques sur des cellules qui surexpriment ce récepteur, et en particulier sur une lignée cellulaire de cancer du sein de type MDA-MB-468 moins radiosensible. Une gamme de PNT- N_3 a été synthétisée, les analyses MALDI-TOF ont confirmé la présence de 2 à 20 N_3 par AcM et leur réactivité a été confirmée sur gel de polyacrylamide. L'étude pourra donc être réalisée avec ce type de lignée cellulaire afin de potentialiser a posteriori l'effet radiosensibilisant des NP.

In fine, cette stratégie a pour but d'optimiser l'accumulation des NP et leur rétention au sein des tumeurs en se liant de manière covalente aux AcM, pour une meilleure efficacité de la RE. Néanmoins, dans le cas où cette approche ne permettrait pas une amélioration du rapport « captation tumorale/sang » dans les futures études *in vivo*, il serait possible d'envisager d'utiliser les NP comme station d'ancrage au niveau du foyer tumoral *via* l'effet EPR. Cette méthode de ciblage en deux temps que nous avons déjà évoqué à la fin de notre revue apparaît comme une alternative prometteuse à la stratégie de préciblage. Nos NP étant porteuses de plusieurs entités bioorthogonales, elles pourraient permettre une fois les particules localisées au niveau tumoral, l'administration de complexes de gadolinium porteurs d'entités bioorthogonales complémentaires (**Tz-PEG₄-DOTA(Gd)**) pour la fixation de plusieurs atomes de gadolinium pour une application en RE.

Avec cette stratégie, il sera aussi tout à fait possible d'utiliser les NP pour des applications théranostiques. L'administration de sondes bioorthogonales porteuses de radioéléments (émetteurs β^+ ou émetteurs γ et/ou β^-) permettraient le diagnostic et/ou le suivi thérapeutique par imagerie TEP (Fluor-18), TEMP (Indium-111) ou la radiothérapie interne vectorisée (Lutécium-177). Aussi, une perspective intéressante est la possibilité d'appliquer cette méthode à d'autres types de NP constituées d'or ou de fer et avec lesquelles il serait envisageable de combiner l'imagerie avec d'autres thérapies comme l'hyperthermie par exemple.

Part 4. Experimental section

Supported syntheses and functionalization of silica nanoparticles

General informations

I. Materials and reagents

Fluorescent rhodamine B-labeled silica nanoparticles were provided by Nano-H (Lyon, France).

Solid-phase synthesis reagents and phosphoramidites were purchased from Glen Research (Sterling, Virginia, USA). Other reagents as 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES), 6-amino-1-hexanol, controlled pore glass (200-400 Mesh, CPG-3000Å), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), dimethylaminopyridine (DMAP), *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA), hexamethyldisilazane, 37% hydrochloric acid, piperidine, hexamethyldisilazane (HMDS), *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU), 3-(triethoxysilyl)propyl isocyanate, triethylamine, trimethylsilyl chloride (TMSCl), acetonitrile, dichloromethane, Isopropanol, *N,N*-dimethylformamide (DMF) and high quality grade chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Hydroquinone-*O,O'*-diacetic acid (HQDA) and 68% nitric acid were purchased from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany).

Fluorescein 5(6)-isothiocyanate (FITC-NCS) used for fluorescence quantification on nanoparticles and for the synthesis of FITC-N₃ was purchased from Sigma-Aldrich (CAS: 27072-45-3).

II. Instrumentation

Nanoparticle functionalization was achieved with an Applied Biosystems 394 RNA/DNA synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the standard 1 μmol synthesis program for phosphoramidite chemistry.

Absorbance measurements were performed on a Varian Cary 100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) using a quartz cuvette of 1 cm path length. Absorbance and fluorescence intensity measurements of nanoparticle suspensions were achieved with an EnSpire® Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, Massachusetts, USA).

Dynamic light scattering (DLS) measurements were carried out with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

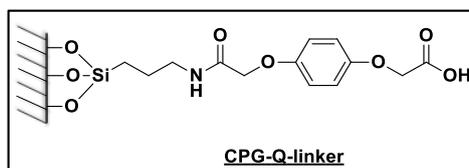
Transmission electron microscopy (TEM) pictures were obtained using a Philips CM120 with an accelerating voltage of 120 kV (Centre Technologique des Microstructures – Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France).

Scanning electron microscopy (SEM) pictures were obtained using a FEI Quanta FEG 250 with an accelerating voltage of 25 Kv (Centre Technologique des Microstructures – Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France). SEM samples were metallized in sputtering mode with a 4 nm layer of gold.

ICP-MS analysis were obtained using microconcentric nebulizer (micromist), and a 7700x ICP/MS (Agilent) as elemental detector.

III. Preparation of the CPG-NP solid support [224]

1. Functionalization of the Controlled Pore Glass (CPG) support (CPG-Q-linker)



2. Functionalization with primary amines (CPG-NH₂)

CPG particles (pore size: 300 nm, 2 g) was suspended in concentrated nitric acid (10 mL). The suspension was refluxed for 1 h. Then, the CPG particles were washed in a fritted-glass filter with distilled water (3x10 mL) until neutral pH of the filtrate.

An aqueous solution of APTES (15 mL, 10% v/v, pH 4) previously prepared was added to the CPG. The suspension was slowly stirred under rotary agitation at 70 °C for 2 h 30. The excess of solution was removed by filtration and the support was placed in an oven at 120°C overnight. The support was rinsed in a fritted-glass filter with acetone (3x10 mL) before being dried in open air.

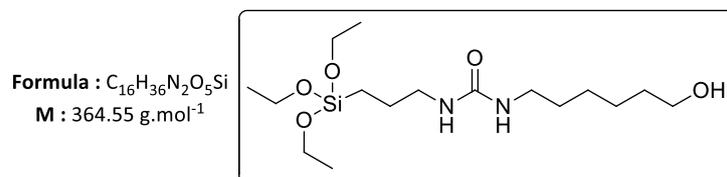
3. Functionalization with carboxylic acids (CPG-Q-linker)

To the dried **CPG-NH₂** beads (1 g) were successively added HQDA (90 mg, 0.4 mmol, 1 eq.), DMAP (46 mg, 0.38 mmol, 0.95 eq.), HBTU (144 mg, 0.38 mmol, 0.95 eq.) and DIEA (140 μL, 0.8 mmol, 2 eq.) in *N,N*-dimethylformamide (10 mL). The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The CPG-Q-linker support was washed in a fritted-glass filter with *N,N*-dimethylformamide (10 mL), acetonitrile (10 mL), and dichloromethane (10 mL).

Finally, TMS-Cl (4.5 mL, 35.6 mmol) and HMDS (7.5 mL, 35.6 mmol) (solution 50/50 in large excess) was added to the solid support and the suspension was stirred at room temperature for 1 h. CPG was washed in a fritted-glass filter with acetonitrile (10 mL), distilled water (10 mL), and then with acetonitrile again (10 mL), dichloromethane (10 mL) and finally dried in an oven.

4. Nanoparticles silanization (NP-TESPHU)

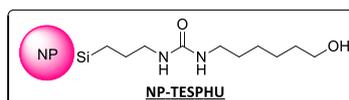
4.1 Synthesis of 3-(triethoxysilyl)propylhydroxyhexyl urea (TESPHU)



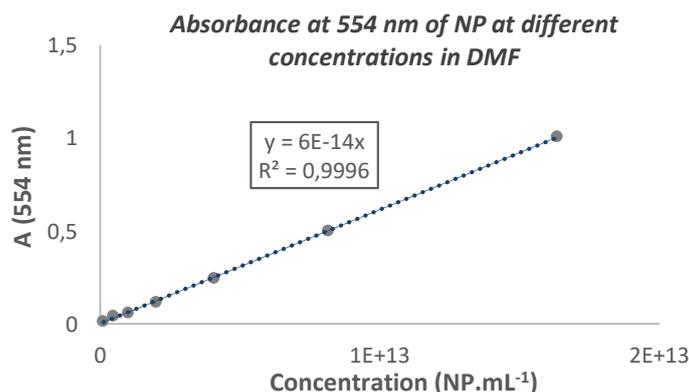
6-Amino-1-hexanol (487 mg, 4.2 mmol, 1 eq.) was dissolved in isopropanol (2.5 mL) and 3-(triethoxysilyl)propyl isocyanate (1 mL, 4.2 mmol, 1 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min under argon atmosphere. The desired product was dried under reduced pressure and used without purification.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) : δ 4.82-4.96 (t, J = 4.8 Hz, 2H, NH), 3.76-3.87 (q, 6H, -CH₃-CH₂-OSi), 3.64 (t, 2H, J = 5.2 Hz, CH₂-OH), 3.10-3.20 (m, 4H, CH₂-NH), 1.35-1.60 (m, 10H, CH₂), 1.19 (t, 9H, J = 5.2 Hz, CH₃), 0.59 (t, 2H, J = 5.2 Hz, CH₂-OSi).

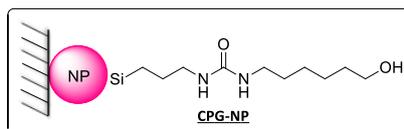
4.2 TESPBU spacer grafting on nanoparticles (NP-TESPBU)



The freshly prepared solution of TESPBU (1.52 g, 4.16 mmol, 95 eq) previously obtained was mixed with bisilane 5% (81 μL, 0.219 mmol, 5 eq) and triethylamine (580 μL, 4.16 mmol, 95 eq). The solution was then added dropwise to the silica nanoparticle suspension (13 mg/mL) in *N,N*-dimethylformamide (8 mL). The mixture was slowly stirred at 120°C for 16 h. The suspension was centrifuged (45 min, 10 000 g), and the supernatant was removed. The particles were washed with three cycles of centrifugation/dispersion in *N,N*-dimethylformamide. For each cycle, a vortex step was performed in order to completely disperse the NP-TESPBU. Nanoparticle concentration ($C = 6.59 \times 10^{13}$ NP.mL⁻¹) was then determined by measuring the absorbance at 554 nm and was correlated with a calibration curve plotted with a suspension of nanoparticles at different concentrations in *N,N*-dimethylformamide.



5. Nanoparticle grafting on CPG support (CPG-NP)



5.1 Carboxylic acid activation of CPG support

The **CPG-Q-linker** beads (1.5 g) were suspended in anhydrous acetonitrile (15 mL) and HBTU (216 mg, 0.57 mmol, 1 eq.), DMAP (69 mg, 0.57 mmol, 1 eq.) and DIEA (210 μ L, 0.57 mmol, 1 eq.) were successively added. The mixture was stirred at room temperature for 3 h. The CPG support was washed with *N,N*-dimethylformamide (2 \times 10 mL) and dichloromethane (2 \times 10 mL).

5.2 Nanoparticle grafting

The CPG beads with activated acids were suspended in *N,N*-dimethylformamide (8 mL) and a suspension of **NP-TESPHU** (6.59×10^{13} NP.mL⁻¹, 5.3×10^{14} NP) in *N,N*-dimethylformamide (8 mL) was added dropwise under manual stirring. The suspension was stirred at room temperature for 16 h. Finally, the CPG-NP assemblies were washed with *N,N*-dimethylformamide (3 \times 20 mL) and acetonitrile (3 \times 20 mL) in order to remove ungrafted nanoparticles and dried in open air.

5.3 « Capping » step

Activated functions of CPG that did not react during nanoparticle grafting were capped with a solution of piperidine 1% (100 μ L) in *N,N*-dimethylformamide (10 mL) at room temperature for 1 h. The CPG-NP support was washed with *N,N*-dimethylformamide (3 \times 20 mL), acetonitrile (3 \times 20 mL) and dried in open air.

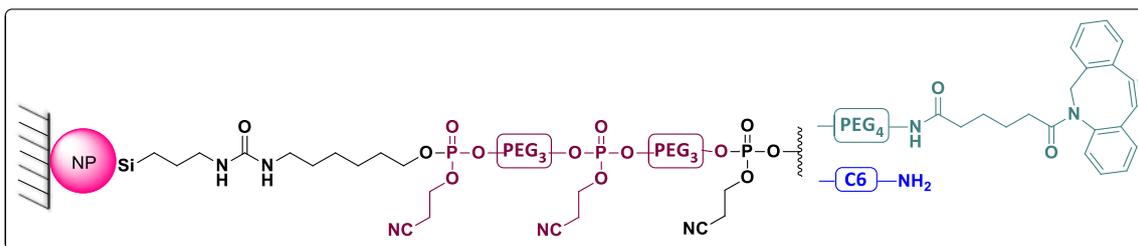
5.4 Quantification of grafted nanoparticles

The number of nanoparticles grafted on the CPG support (1.5 g) was determined by the difference between the number of **NP-TESPHU** in suspension before grafting (5.3×10^{14} NP) and the final number of **NP-TESPHU** which remained in suspension after grafting (2.3×10^{14} NP). Finally, 3.0×10^{14} NP were grafted on the CPG support representing 2.0×10^{14} NP/g.

a. Procedure

The residual nanoparticle suspension (containing **NP-TESPHU** not grafted) was transferred to a volumetric flask (25 mL) then filled with *N,N*-dimethylformamide. Absorbance at 554 nm was measured in a quartz cuvette (1 mL) and was correlated with the calibration curve plotted with a suspension of nanoparticles at different concentrations in *N,N*-dimethylformamide (see the curve above).

IV. Nanoparticle functionalization by automated solid-phase synthesis to obtain NP-ADIBO/NH₂



Once nanoparticles have been immobilized on CPG support, thanks to alcohol functions on the nanoparticle surface they were easily functionalized by phosphoramidite chemistry using a DNA/RNA synthesizer (Applied Biosystems 394 RNA/DNA).

1 μ mol columns were used and filled with approximately 45-48 mg of CPG-NP.

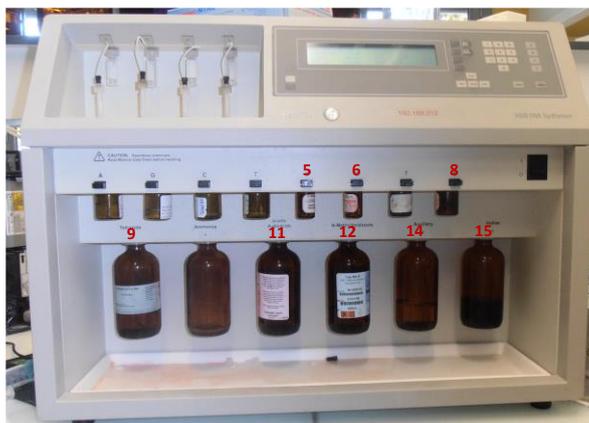
9-O-Dimethoxytrityl-triethylene glycol,1-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite (**Spacer Phosphoramidite 9; PEG₃**) (0.1M in acetonitrile); 6-(4-Monomethoxytritylamino)hexyl-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidite (**5'-Amino-Modifier C6; NH₂**) (0.05M in acetonitrile); 10-(6-oxo-6-(dibenzo[b,f]azacyclooct-4-yn-1-yl)-capramido-N-ethyl)-O-triethyleneglycol-1-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite (**5'-DBCO-TEG Phosphoramidite; ADIBO**) (0.1M in acetonitrile) were incorporated successively using different synthesis programmes taking into account phosphoramidite specifications.

Functionalization was achieved step by step: first nanoparticles were functionalized by incorporating two **PEG₃** spacer phosphoramidites; then a double functionalization was achieved by a simultaneous incorporation of **ADIBO** and **NH₂** phosphoramidites.

Coupling yields for each phosphoramidite were determined by quantifying DMT or MMT groups at 498 nm and 477 nm, respectively.

The different reagents and phosphoramidites were loaded onto the synthesizer at the following positions:

- Position 5 : **NH₂**
- Position 6 : **PEG₃**
- Position 8 : **ADIBO**
- Position 9 : **Activator** (5-ethylthio-1H-tetrazol 0.25 M in anhydrous acetonitrile)
- Position 11 : **Capping solution 1** (acetic anhydride 5% in tetrahydrofuran/pyridine, 90/10, v/v)
- Position 12 : **Capping solution 2** (1-methylimidazole 10% in tetrahydrofuran/pyridine, 80/10, v/v)
- Position 14 : **Detritylation solution** (trichloroacetic acid 3% in anhydrous dichloromethane)
- Position 15 : **Oxidation solution** (Iodine 0.02 M in tetrahydrofuran/H₂O/pyridine, 90/10/1, v/v/v)



Two Applied Biosystems synthesis programs were used, all the synthesis steps were detailed in the following tables:

Incorporation cycle of PEG₃ spacer phosphoramidite

Function N°	Function	Time (s)				
106	BEGIN					
64	18 to waste	3	Column wash with acetonitrile (18) and PEG ₃ phosphoramidite preparation	42	18 to column	10
42	18 to column	20		2	reverse flush	7
4	flush to waste	10		1	block flush	3
2	reverse flush	10		105	start detrityl	
1	block flush	4		64	18 to waste	4
101	phospho prep	3		42	18 to column	10
140	Column ON			2	reverse flush	7
111	block vent	2		1	block flush	3
58	Tet to waste	1,7		44	19 to column	35
33	B+Tet to column	2,5		40	14 to column	5
34	Tet to column	1	116	prep 14	10	
33	B+Tet to column	2,5	40	14 to column	20	
43	push to column		116	prep 14	10	
141	Column OFF		40	14 to column	20	
103	wait	120	40	14 to column	20	
64	18 to waste	4	116	prep 14	10	
2	reverse flush	10	40	14 to column	20	
42	18 to column	20	116	prep 14	10	
4	flush to waste	10	40	14 to column	20	
2	reverse flush	7	40	14 to column	20	
102	cap prep	3	3	trityl flush	20	
1	block flush	3	2	reverse flush	7	
39	cap to column	10	42	18 to column	10	
103	wait	20	2	reverse flush	8	
2	reverse flush	7	110	waste-bottle		
64	18 to waste	4	42	18 to column	20	
42	18 to column	15	2	reverse flush	7	
4	flush to waste	10	1	block flush	4	
2	reverse flush	7	107	END		
1	block flush	3				
41	15 to column	15				
64	18 to waste	4				
1	block flush	3				
103	wait	30				
42	18 to column	15				
4	flush to waste	15				
2	reverse flush	7				

Send of tetrazole activator (**Tet**) and PEG₃ phosphoramidite (**B**) to the column for the coupling step

Send of capping solutions (**cap**) to the column

Send of oxidation solution (**15**) to the column

Send of detritylation solution (**14**) to the column

Incorporation cycle of C₆-NH₂ and PEG₄-ADIBO
phosphoramidites

Function N°	Function	Time (s)
106	BEGIN	
64	18 to waste	3
42	18 to column	20
4	flush to waste	10
2	reverse flush	10
1	block flush	4
101	phospho prep	3
140	Column 1 On	
111	block vent	2
58	Tet to waste	1,7
33	B+Tet to column	2,5
34	Tet to column	1
33	B+Tet to column	2,5
43	push to column	
103	wait	
33	B+Tet to column	2,5
34	Tet to column	1
33	B+Tet to column	2,5
43	push to column	
141	Column 1 OFF	
103	wait	60
103	wait	600
64	18 to waste	4
2	reverse flush	10
42	18 to column	20
4	flush to waste	10
2	reverse flush	7
102	cap prep	3
1	block flush	3
39	cap to column	10
103	wait	20
2	reverse flush	7

Column wash with acetonitrile (18) and C₆-NH₂ et PEG₄-ADIBO phosphoramidite preparation

Send of oxidation solution (15) to the column

2 sends of tetrazole activator (Tet) and phosphoramidites (B) to the column for the coupling step

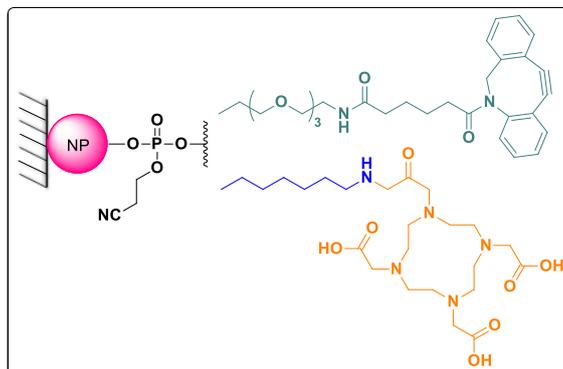
Send of detritylation solution (14) to the column

Send of capping solutions (cap) to the column

64	18 to waste	4
42	18 to column	15
4	flush to waste	10
2	reverse flush	7
1	block flush	3
41	15 to column	15
64	18 to waste	4
1	block flush	3
103	wait	30
42	18 to column	15
4	flush to waste	15
2	reverse flush	7
42	18 to column	10
2	reverse flush	7
1	block flush	3
105	start detrityl	
64	18 to waste	4
42	18 to column	10
2	reverse flush	7
1	block flush	3
44	19 to column	35
40	14 to column	5
116	prep 14	10
40	14 to column	20
116	prep 14	10
40	14 to column	20
116	prep 14	10
40	14 to column	20
116	prep 14	10
40	14 to column	20
116	prep 14	10
40	14 to column	20
3	trityl flush	20
2	reverse flush	7
42	18 to column	10
2	reverse flush	8
110	waste-bottle	
42	18 to column	20
2	reverse flush	7
1	block flush	4
107	END	

V. Preparation of the DOTA-based nanoparticles (NP-ADIBO/DOTA)

1. Incorporation of DOTA on primary amines of NP-ADIBO/NH₂



As mDOTA and DOTA-NHS were incorporated on NH₂ of NP-ADIBO/NH₂ on the CPG support, n_{NH_2} (nmol) was estimated according to the used CPG weight (mg) and the functionalization density obtained for NH₂ (X_{NH_2} , nmol.mg⁻¹) determined by MMT dosage:

$$n_{\text{NH}_2} = X_{\text{NH}_2} \times \text{CPG weight}$$

1.1 General protocol for mDOTA (1 eq., 10 eq. and 80 eq. based on n_{NH_2}) coupling with NP-ADIBO/NH₂

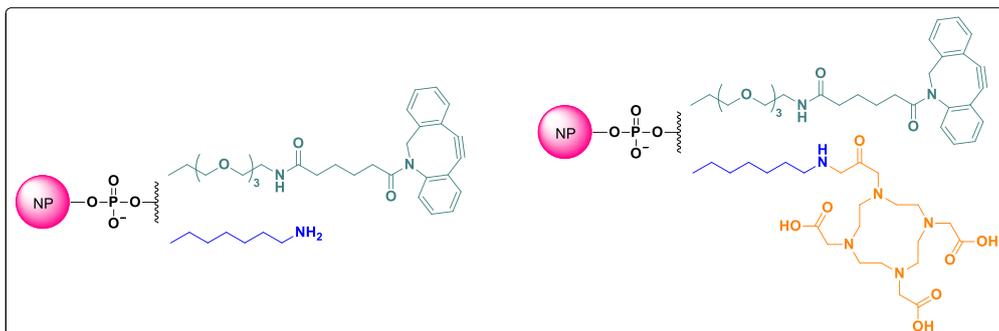
After solid phase-synthesis, the CPG-NP-ADIBO/NH₂ (25-45 mg, 1 eq.) was transferred into a flask (10 mL) under argon and suspended in mDOTA 10 mM solution (1 eq., 10 eq. or 80 eq.) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide followed by the addition of anhydrous triethylamine (0.4% v/v). The suspension was stirred at 25°C for 18 h and the CPG-NP-ADIBO/NH₂ support was washed with *N,N*-dimethylformamide (2×2 mL) and acetonitrile (2×2 mL).

1.2 General protocol for DOTA-NHS (80 eq.) coupling with NP-ADIBO/NH₂

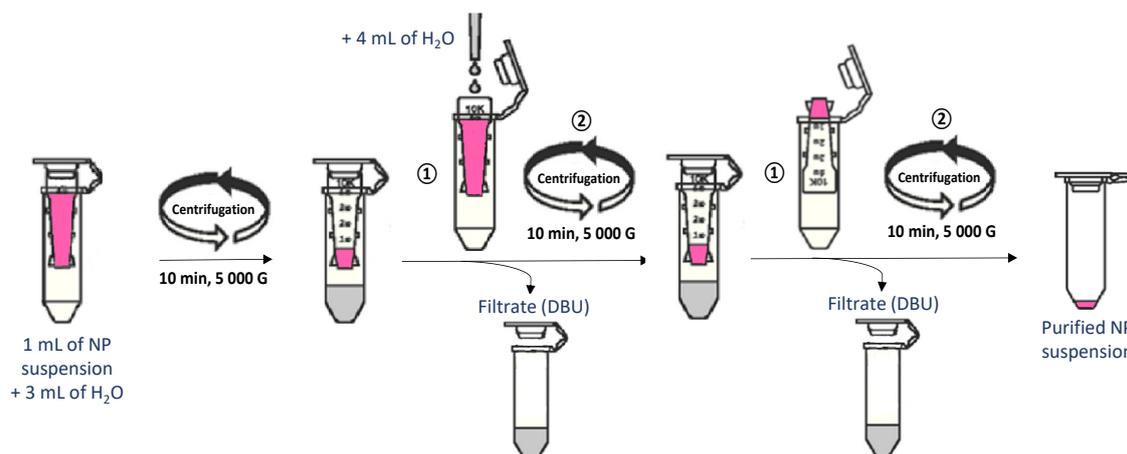
After solid phase-synthesis, the CPG-NP support (25-45 mg, 1 eq.) was transferred into a flask under argon and suspended in DOTA-NHS 10 mM solution (80 eq.) in anhydrous *N,N*-dimethylformamide followed by the addition of anhydrous triethylamine (0.4% v/v). The suspension was stirred at 25°C for 18 h and the CPG-NP support was washed with *N,N*-dimethylformamide (2×2 mL) and acetonitrile (2×2 mL).

2. Release of the nanoparticles from the solid support and kinetic studies

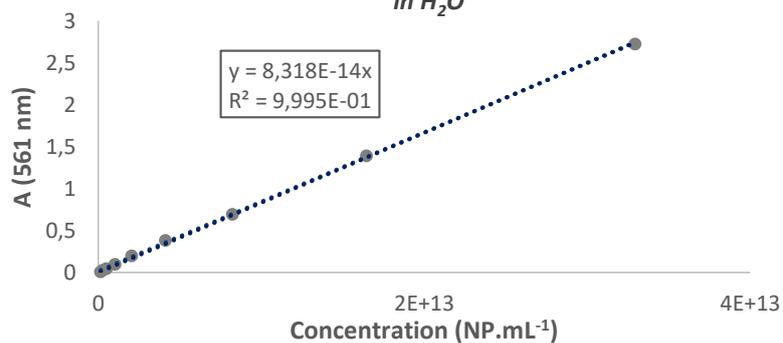
2.1 General protocol for NP-ADIBO/NH₂ and NP-ADIBO/DOTA release from the CPG support



NP-ADIBO/DOTA were released in suspension by treatment under mild basic conditions. The solid support (25-45 mg) was incubated in a DBU solution (1 mL, 0.1 M in a mix of water/acetonitrile (1/1, v/v)). The suspension was stirred on a rotary shaker at room temperature until the supernatant became pink and the support became blank. The nanoparticles were purified by successive centrifugal filtrations with 30K Amicon Ultra 4 centrifugal filters (5000 g, 10 min) and washed three times with distilled water to yield **NP-ADIBO/DOTA** suspension. The **NP-ADIBO/DOTA** concentration was then determined by measuring absorbance at 561 nm and was correlated with a calibration curve plotted with a suspension of nanoparticles at different concentrations in water.



Absorbance at 561 nm of NP at different concentrations in H₂O

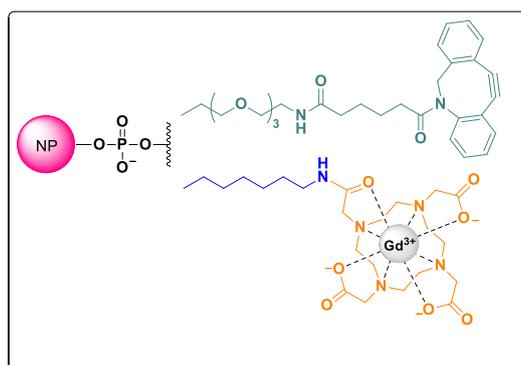


2.2 Kinetic studies of nanoparticle release

Kinetic studies were carried out by measuring absorbance at 561 nm of the supernatant at different times: $t = 70, 180, 270, 360, 450, 510$ and 1380 min and were correlated with the number of nanoparticles released in suspension by direct comparison with the calibration curve plotted with different concentrations of nanoparticles in water (see the curve above).

VI. Preparation of the Gd-based nanoparticles (NP-ADIBO/DOTA(Gd))

1. Gd complexation using NP-ADIBO/DOTA(10) suspension



Complexation of 0.03 eq. of GdCl_3 was realised by reference to the total number of grafted mDOTA ($\sim 8\,000$). This number represents 26% of the total grafted amines ($\sim 31\,000$, $n_{\text{NH}_2} = 16$ nmol, 1 eq.) corresponding to: $n_{\text{DOTA}} = 4.2$ nmol, 0.26 eq.

To a suspension of **NP-ADIBO/mDOTA(10)** ($C = 2.54 \times 10^{12}$ NP.mL⁻¹, $V = 200$ μL , $n_{\text{DOTA}} = 4.2$ nmol) in water adjusted to pH 8.0, was added GdCl_3 0.015 mM solution (8.1 μL , 0.12 nmol, 0.03 eq.). After the addition, the nanoparticle suspension was stirred at room temperature for 16 h. The nanoparticles were purified by successive centrifugal filtrations with 30K Amicon Ultra 0.5 centrifugal filters (14,000 g, 5 min) and washed three times with distilled water (3x200 μL) to yield **NP-ADIBO/DOTA(Gd)** suspension. Supernatants were collected, pooled and then analysed in ICP-MS.

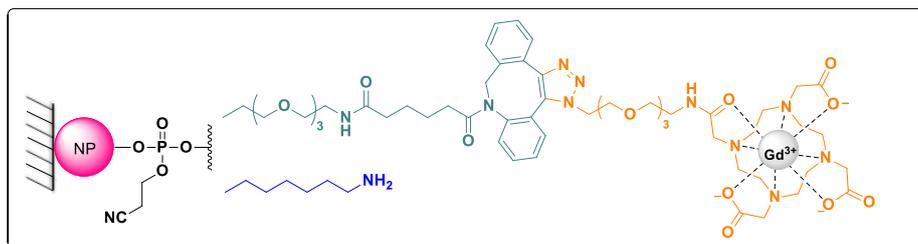
2. Incorporation of Gd-based complexes by bioorthogonal chemistry with ADIBO of NP-ADIBO/NH₂

As Gd-based probes were incorporated on ADIBO of **NP-ADIBO/NH₂**, n_{ADIBO} (nmol) was estimated according to the used CPG weight (mg) and the functionalization density obtained for the last PEG ($X_{\text{PEG3(2)}}$, nmol.mg⁻¹) and NH_2 (X_{NH_2} , nmol.mg⁻¹) determined by DMT and MMT dosage, respectively :

$$n_{\text{ADIBO}} = (X_{\text{PEG3(2)}} - X_{\text{NH}_2}) \times \text{CPG weight}$$

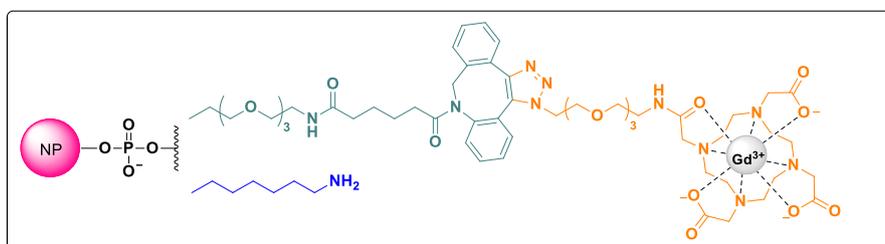
2.1 Incorporation of N_3 -PEG₄-DOTA(Gd) by SPAAC

a. Using NP-ADIBO/NH₂ on CPG support



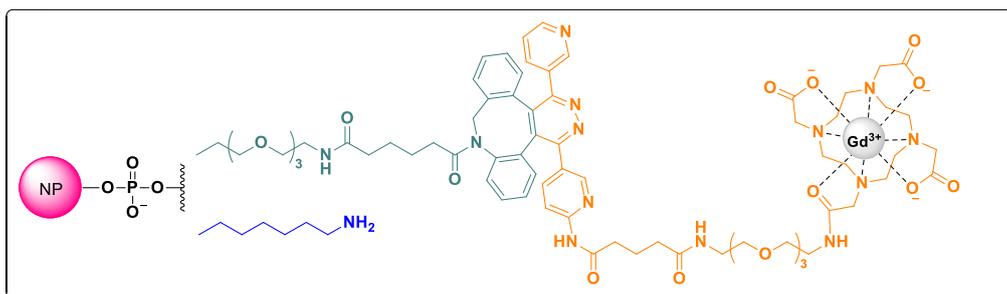
CPG-NP-ADIBO/NH₂ support (23 mg, $X_{ADIBO} = 1.16$ nmol/mg, $n_{ADIBO} = 27$ nmol, 1 eq.) was transferred into an eppendorf tube (2 mL) and was suspended in water (498 μ L). Then, **N_3 -PEG₄-DOTA(Gd)** 11 mM solution was added (2.5 μ L, 27 nmol, 1 eq.). The suspension was stirred on a rotary shaker for 16 h at room temperature, the supernatant was removed and the support was washed with water (2 \times 250 μ L). The estimation of the amount of immobilized **N_3 -PEG₄-DOTA(Gd)** was achieved by ICP-MS on collected and pooled supernatants.

b. Using NP-ADIBO/NH₂ in suspension



To the **NP-ADIBO-NH₂** suspension ($C = 2.86 \times 10^{12}$ NP.mL⁻¹, $V = 498$ μ L) release from the CPG support (16 mg, $X_{ADIBO} = 1.16$ nmol/mg, $n_{ADIBO} = 19$ nmol, 1 eq.) was added **N_3 -PEG₄-DOTA(Gd)** 11 mM solution (1.7 μ L, 19 nmol, **1 eq.** or 8.6 μ L, 95 nmol, **5 eq.**). The nanoparticle suspension was stirred at room temperature for 16 h on a rotary shaker. The nanoparticles were purified by successive centrifugal filtrations with 30K Amicon Ultra 0.5 centrifugal filters (14,000 g, 5 min) and washed three times with distilled water (3 \times 200 μ L) to yield **NP-ADIBO/DOTA(Gd)**. The estimation of the amount of immobilized **N_3 -PEG₄-DOTA(Gd)** was achieved by ICP-MS on collected and pooled supernatants.

2.2 Incorporation of Tz-PEG₄-DOTA(Gd) by IEDDA



To the **NP-ADIBO-NH₂** suspension ($C = 4.46 \times 10^{12}$ NP.mL⁻¹, $V = 212$ μ L) release from the CPG support (6.4 mg, $X_{ADIBO} = 1.03$ nmol/mg, $n_{ADIBO} = 6.6$ nmol, 1 eq.) was added **Tz-PEG₄-DOTA(Gd)** 1.9 mM solution (3.5 μ L, 6.6 nmol, 1 eq.). The nanoparticle suspension was stirred at room temperature for 16 h on a rotary shaker. The nanoparticles were purified by successive centrifugal filtrations with 30K Amicon Ultra 0.5 centrifugal filters (14,000 g, 5 min) washed three times with distilled water (3x200 μ L) to yield **NP-ADIBO/DOTA(Gd)**. The estimation of the amount of immobilized **Tz-PEG₄-DOTA(Gd)** was achieved by ICP-MS on collected and pooled supernatants.

VII. Characterization of nanoparticles

1. Dynamic light scattering (DLS) and Zeta potential

Prior to experiment, the nanoparticles were dispersed in distilled water pH = 7 or DMF (~ 1 mL, $\sim 1.0 \times 10^{12}$ NP.mL⁻¹) at room temperature. Then, DLS measurements were recorded to determine hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI) and zeta potential of nanoparticles. The percentage was recorded in intensity-distribution size value.

2. Transmission electron microscopy (TEM)

Nanoparticles in distilled water (~ 1 mL, $\sim 1.0 \times 10^{12}$ NP.mL⁻¹) were examined after deposition of 5 μ L of the appropriate suspension on a carbon Formvar-coated copper grid (Electron Microscopy Sciences) and evaporation to dryness.

3. ICP-MS

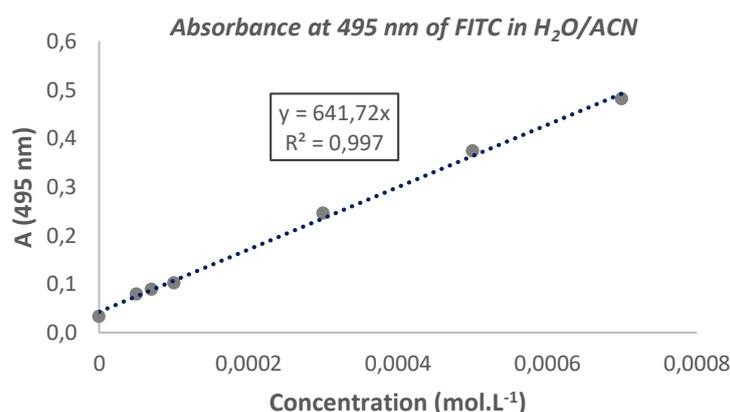
After appropriate dilutions in HNO₃ 1%, samples were injected via a peristaltic pump at 400 μ L min⁻¹ flow rate and nebulized by a microconcentric nebulizer (Micromist). A 7700x ICP/MS (Agilent) was used as elemental detector. Gadolinium was detected at $m/z = 156, 157$ and 158 and quantified using external standards (PlasmaCAL) ranging from 1 ng/mL to 10 ng/mL. Measurements were performed in triplicate. Between analyses, the system was rinsed for 30 s with HNO₃ 1 % and 30 s with ultrapure water and a blank (HNO₃ 1 %) was injected to control the absence of any memory effect.

4. Nanoparticle functions quantification using fluorescent FITC probes

The amount of immobilized **FITC-NCS** or **FITC-N₃** on nanoparticles was estimated by UV-visible spectrophotometric measurements after nanoparticle release from the CPG support.

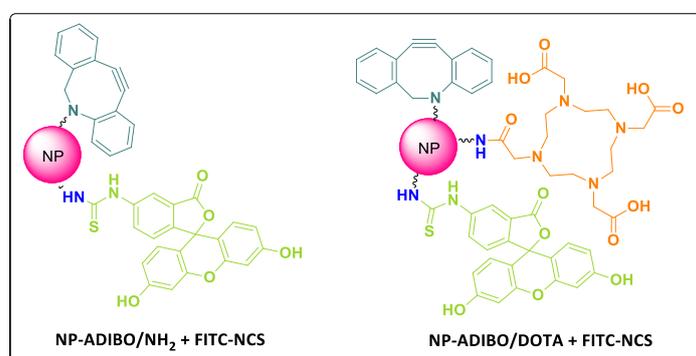
These measurements were realised with a microplate reader in order to work with reduced sample volumes. Flat bottom microplates (96-well) were used to deposit 200 μL of the NPs in suspension.

Absorbance of **NP-FITC** suspensions ($\sim 1.0 \times 10^{12}$ NP.mL⁻¹) were measured at 495 nm. The FITC absorbance measured was correlated with the number of NH₂ or ADIBO functions present on the surface of the nanoparticles by direct comparison with a calibration curve plotted with different concentrations of FITC in a mix of water/acetonitrile (1/1, v/v).



4.1 Quantification of grafted DOTA per nanoparticle

a. General protocol for estimating the total number of NH₂ before and after DOTA coupling on NP-ADIBO/NH₂ and NP-ADIBO/DOTA

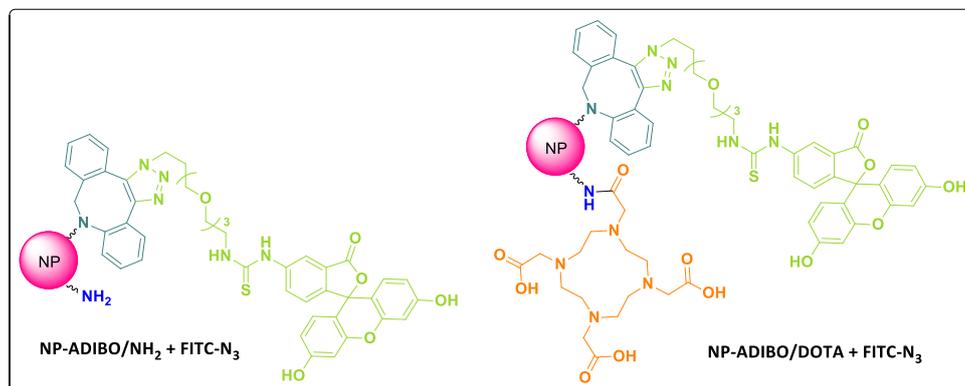


$$n_{\text{NH}_2} = X_{\text{NH}_2} \times \text{CPG weight}$$

CPG-NP-ADIBO/NH₂ or **CPG-NP-ADIBO/DOTA** support (7 mg, $X_{\text{NH}_2} = 4.71$ nmol/mg, $n_{\text{NH}_2} = 33$ nmol, 1 eq.) was transferred into an eppendorf tube (2 mL) and suspended in water/acetonitrile mixture (v/v) (385 μL). Then, **FITC-NCS** 1.4 mM solution was added (118 μL , 165 nmol, 5 eq.). The suspension was stirred on a rotary shaker for 16 h at room temperature, the supernatant was removed and the support was washed with distilled water (2 \times 1 mL) and acetonitrile (2 \times 1 mL).

4.2 Checking the availability of ADIBO functions on nanoparticles

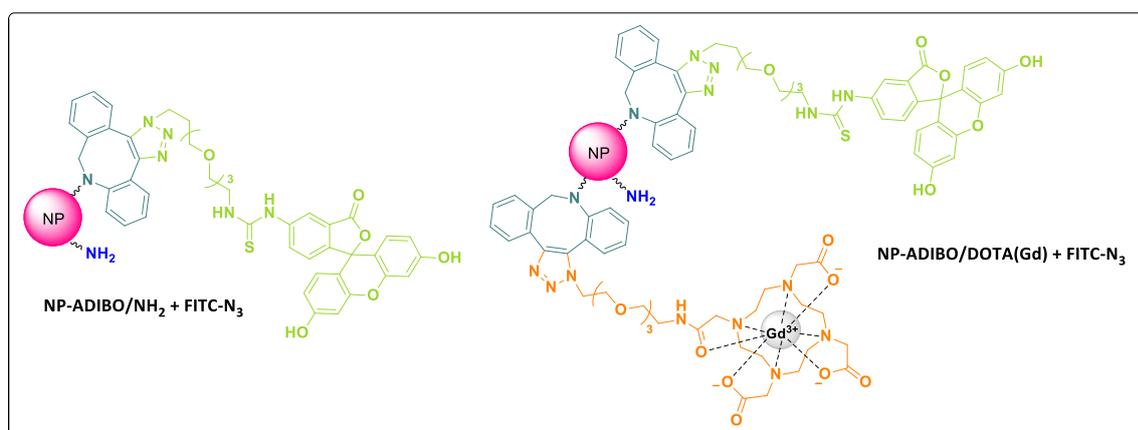
- a. General protocol for checking the availability of ADIBO before and after mDOTA or DOTA-NHS coupling on NP-ADIBO/NH₂



$$\eta_{\text{ADIBO}} = (X_{\text{PEG3(2)}} - X_{\text{NH}_2}) \times \text{CPG weight}$$

CPG-NP-ADIBO/NH₂ or **CPG-NP-ADIBO/DOTA** support (7 mg, $X_{\text{ADIBO}} = 1.28 \text{ nmol/mg}$, $\eta_{\text{ADIBO}} = 9 \text{ nmol}$, 1 eq.) was transferred into an eppendorf tube (2 mL) and suspended in water/acetonitrile mixture (1/1, v/v) (491 μL). Then, **FITC-N₃** 5 mM solution was added (9 μL , 45 nmol, 5 eq.). The suspension was stirred on a rotary shaker for 16 h at room temperature, the supernatant was removed and the support was washed with distilled water (2 \times 1 mL) and acetonitrile (2 \times 1 mL).

- b. General protocol for checking the availability of ADIBO before and after N₃-PEG₄-DOTA(Gd) coupling on NP-ADIBO/NH₂



CPG-NP-ADIBO/NH₂ or **CPG-NP-ADIBO/DOTA(Gd)** support (7 mg, $X_{\text{ADIBO}} = 1.16 \text{ nmo.mg}^{-1}$, $\eta_{\text{ADIBO}} = 8 \text{ nmol}$, 1 eq.) was transferred into an eppendorf tube (2 mL) and suspended in water/acetonitrile mixture (v/v) (188 μL). Then, **FITC-N₃** 3.3 mM solution was added (12 μL , 40 nmol, 5 eq.). The suspension was stirred on a rotary shaker for 16 h at room temperature, the supernatant was removed and the support was washed with distilled water (2 \times 1 mL) and acetonitrile (2 \times 1 mL).

Organic syntheses

General informations

I. Reagents and solvents

Unless otherwise mentioned, all manipulations were performed under argon atmosphere, all reagents were purchased from the following commercial suppliers: Sigma-Aldrich, Acros Organics, Carlo Erba, TCI Europa, or Alfa Aesar. All the PEG derivatives used in synthesis were systematically dried with anhydrous toluene twice by evaporation under reduce pressure and flushed with argon before use, unless otherwise stated.

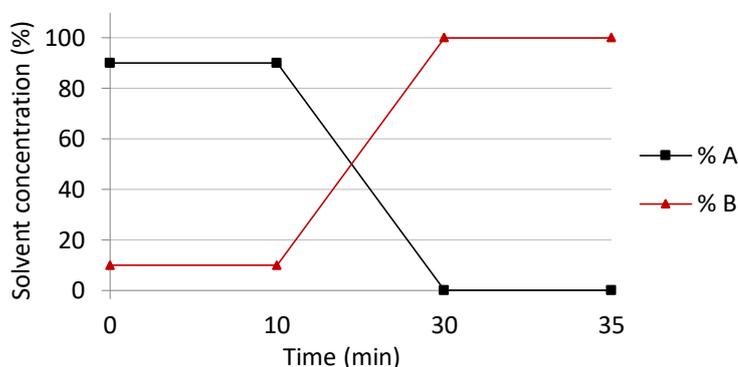
Dichloromethane (VWR, stabilized with amylene) was dried by distillation over hydride calcium under argon atmosphere. Tetrahydrofuran (Acros, HPLC grade, stabilized with BHT) was dried over a Pure Solv™ Micro Solvent Purification System (Sigma-Aldrich) with an alumina column. Triethylamine (Aldrich), diisopropylethylamine (Acros Organics), toluene (Acros Organics), pyridine (Acros Organics), *N,N*-dimethylformamide (Acros Organics), ethanol (Carlo Erba) and methanol (Carlo Erba) were purchase under anhydrous conditions.

II. Chromatographic methods

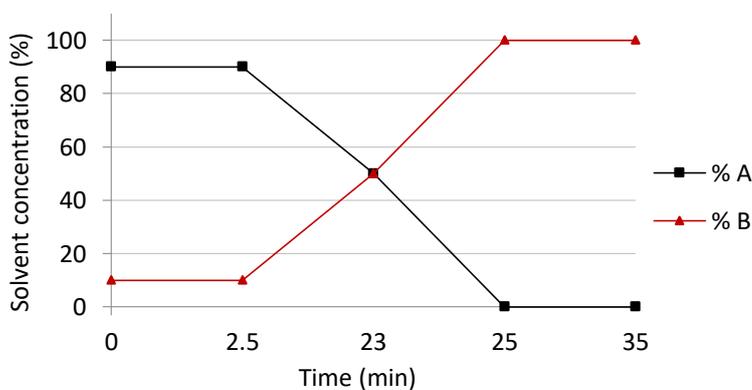
- Reaction progresses were monitored by thin layer chromatography (TLC) performed using silica gel plates (60F254, SDS or Macherey-Nagel) or reverse phase silica gel plates (RP-18W, UV254, Macherey-Nagel). TLC was revealed by UV (254 nm) and/or Dragendorff revelator for polyethylene glycols and macrocycles, with ninhydrin revelator for the compounds containing amine functions, with a basic KMNO₄ solution for compounds having an oxidizable function.
 - **Dragendorff revelator:** Bismuth (III) nitrate (340 mg) was dissolved in glacial acetic acid (4 mL) and water (16 mL). To this solution was added potassium iodide (8 g) dissolved in water (20 mL) and glacial acetic acid (40 mL). The final volume was completed to 200 mL with water.
 - **Ninhydrin revelator:** Ninhydrin (400 mg) was dissolved in ethanol (200 mL).
 - **Basic KMNO₄ revelator:** Potassium permanganate (1.5 g) was dissolved in water (100 mL) followed by the addition of potassium carbonate (10 g) and 10 % sodium bicarbonate solution (2 mL). Finally, the solution was completed to 200 mL with water.
- Column chromatography was performed on silica gel (Chromagel 60 ACC, 40-63 μm, Carlo Erba Reagents).

Purifications by preparative reverse phase HPLC (Combiflash EZ prep system, Teledyne Isco) on a RediSep Prep C18 column (250 mm x 20 mm, pores 100 Å, particles 5 µM), eluted at 15 mL/min with a gradient of ultra-pure water (18 ohms) (solvent A) and acetonitrile (solvent B):

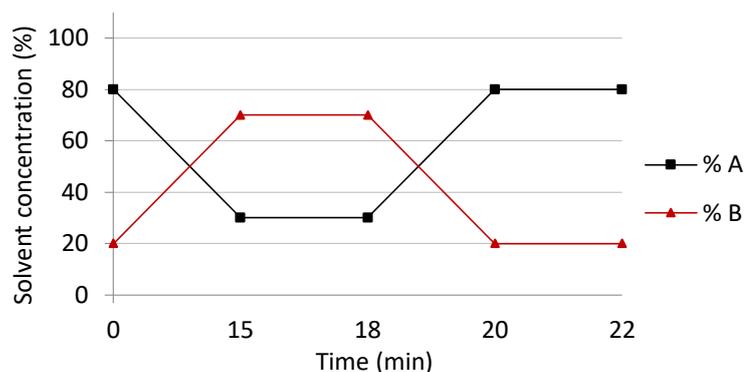
- **Method 1:** an acetonitrile gradient (10 to 100%) consisting of 35 min run: 0-10 min 10% B, 10-30 min 10-100% B, 30-35 min 100% B. The chromatograms were recorded at 254 nm.



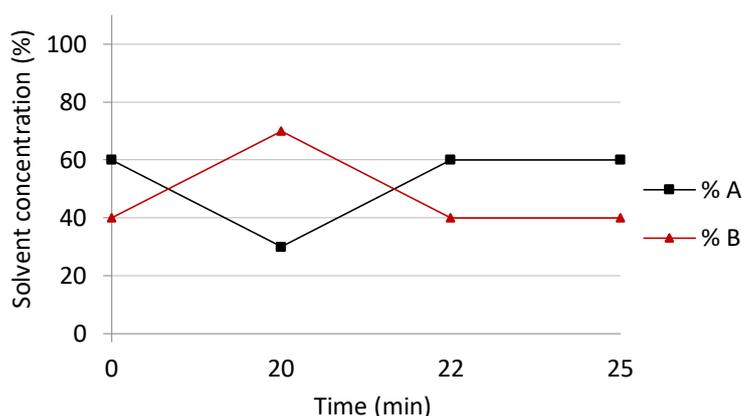
- **Method 2:** an acetonitrile gradient (10 to 100%) consisting of 35 min run: 0-2.5 min 10% B, 2.5-23 min 10-50% B, 23-25 min 50-100% B, 25-35 min 100% B. The chromatograms were recorded at 330 nm.



- Products analyses involving N₃ and TCO precursors were performed by analytical HPLC on an Agilent 1100 HPLC system using an Agilent Zorbax extend C-18 column (4.6 x 150 mm, 5 µm particles), eluted at 1 mL/min with a gradient of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B):
 - **Analytical method 1:** An acetonitrile gradient (20 to 70%) consisting of 22 min run: 0-15 min 20-70% B, 15-18 min 70% B, 18-20 min 70-20% B, 20-22 min 20% B. The chromatograms were recorded at 220 nm and 254 nm.



- **Analytical method 2:** An acetonitrile gradient (40 to 70%) consisting of 25 min run: 0-20 min 40-70% B, 20-22 min 70-40% B, 22-25 min 40% B. The chromatograms were recorded at 254 nm and 286 nm.



III. Instrumentation

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were acquired on Bruker AC-200 or 500 operating at 200 or 500 for ^1H NMR and 50 or 125 MHz for ^{13}C NMR, respectively. All chemical shifts δ were reported in parts per million (ppm). Coupling constants were indicated in Hertz (Hz). The following abbreviations are used for spin multiplicity: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quint. = quintuplet, m = multiplet, brs = broad singlet and Cq = quaternary carbon.

High resolution mass spectra (HRMS) were recorded on an Alliance 2695 (Waters) liquid chromatography coupled with a Q-ToF micro (Waters/Micromass) spectrometer (UCA-START, Clermont-Ferrand, France).

Infrared spectra (IR) were recorded in the range $4000\text{-}440\text{ cm}^{-1}$ on a Nicolet IS10 FT-IR (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France) with attenuated total reflectance (ATR) accessory.

Melting point was acquired on an IA9000 Series Electrothermal Bench (Bibby Scientific Ltd, Stone, Staffordshire, Great Britain) and were uncorrected.

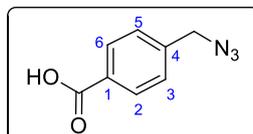
IV. Syntheses of compounds for mAb functionalization

1. RTX-N₃ functionalization

1.1 Synthesis of azide precursor

- 4-Azidomethyl benzoic acid (N₃-C₆H₄-COOH) [256]

Formula : C₈H₇N₃O₂
M : 177.16 g.mol⁻¹



4-Chloromethyl benzoic acid (313 mg, 1.76 mmol, 1 eq.) was dissolved in absolute ethanol (10 mL) followed by the addition of sodium azide (303 mg, 4.6 mmol, 2.6 eq.). The resulting mixture was stirred at reflux for 16 h. After cooling with an ice-bath, water (10 mL) and few drops of hydrochloric acid solution 37% were added. The white precipitate was filtered, dried under reduced pressure and was further used without additional purification (233 mg, 75 %).

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ 7.94 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H_{2,6}), 7.46 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H_{3,5}), 4.56 (s, 2H, CH₂-N₃).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): δ 171.5 (1C, C=O), 141.6 (1C, C₄), 130.9 (2C, C_{2,6}), 129.4 (1C, C₁), 128.2 (2C, C_{3,5}), 54.5 (1C, CH₂-N₃).

IR ν (cm⁻¹): 2963 (C-H), 2108 (N₃), 1678 (C=O).

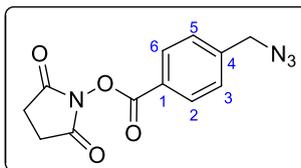
HRMS (ESI-): m/z calculated for C₈H₆N₃O₂ [M-H]⁻ 176.0455, found 176.0460.

Melting point: measured 128 °C ± 1°C, in literature 129-131 °C.¹

¹ HRMS was described in literature [256].

- 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 4-(azidomethyl)benzoate ($N_3-C_6H_4-CONHS$) [248]

Formula : $C_{12}H_{10}N_4O_4$
M : 274.23 g.mol⁻¹



$N_3-C_6H_4-COOH$ (130 mg, 0.73 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous dichloromethane (10mL). N-hydroxysuccinimide (106 mg, 0.8 mmol, 1.1 eq.) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (128 mg, 0.8 mmol, 1.1 eq.) were added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 15 min and evaporated under reduced pressure. The title product was purified as a white solid (105 mg, 70 %) by silica column chromatography (dichloromethane, 100 %).

1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ 8.11 (d, 2H, J = 8.2 Hz, $H_{2,6}$), 7.62 (d, 2H, J = 8.2 Hz, $H_{3,5}$), 4.66 (s, 2H, CH_2-N_3), 2.90 (s, 4H, $CH_2-CONHS$).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$): δ 169.3 (2C, $C=O_{NHS}$), 161.6 (1C, $C=O-NHS$), 142.9 (1C, C_4), 131.0 (2C, $C_{2,6}$), 128.3 (2C, $C_{3,5}$), 125.0 (1C, C_1), 54.2 (1C, CH_2-N_3), 25.6 (2C, $CH_2-CONHS$).

IR ν (cm⁻¹): 2962 (C-H), 2090 (N_3), 1764 (C=O).

HRMS (ESI⁺): m/z calculated for $C_{12}H_{10}N_4O_4Na$ $[M+Na]^+$ 297.0702, found 297.0583.

HPLC (analytical method 1): t_R = 9.99 min (λ = 254 nm).

Melting point: 108 °C \pm 1°C.²

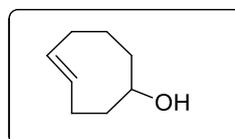
² HRMS was described in literature but not the melting point [248].

2. RTX-TCO functionalization

2.1 Synthesis of *trans*-cyclooctene precursor

- (*E*)-Cyclooct-4-enol (*trans*-cyclooct-4-enol) (TCO-OH) [250]

Formula : C₈H₁₄O
M : 126,20 g.mol⁻¹



A cartridge was filled with 2/3 silica and 1/3 of silica impregnated with silver nitrate (SiO₂-AgNO₃). The quartz reaction flask was filled with a mixture of diethyl ether and hexane (90/10 v / v, 200 mL) and after equilibration of the apparatus, commercial (*Z*)-cyclooct-4-enol (*cis*-cyclooct-4-enol, CCO-OH) (1 g, 7.92 mmol, 1 eq.) and methyl benzoic acid (1.08 g; 7.92 mmol, 1 eq.) were dissolved in diethyl ether/hexane (90/10, v/v). CCO-OH and benzoate solutions were introduced into the quartz reaction flask. The reaction mixture was continuously pumped (100 mL/min) through the cartridge and photoirradiated at 254 nm.

After 24 h, the cartridge was dried with compressed air and the dried silica was suspended in an ammonia solution (37%, 200 mL). Dichloromethane (200 mL) was added to the suspension which was stirred for 10 minutes. The silica was filtered and washed with dichloromethane (3x150 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure in the dark.

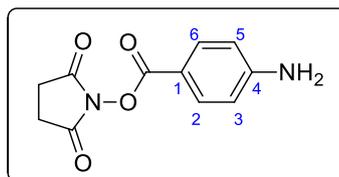
Finally, the crude product was purified on silica gel with a first elution with diethyl ether/cyclohexane (20/80, v/v) to afford the equatorial-(*E*)-cyclo-4-enol (minor isomer, 207 mg, 1.64 mmol, 20%) while a second elution using diethyl ether/cyclohexane (50/50, v/v) gave the desired axial-(*E*)-cyclooct-4-enol (major isomer, 531 mg, 4.21 mmol, 51 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5.51-5.62 (m, 1H), 5.32-5.44 (m, 1H), 3.42-3.49 (m, 1H), 2.21-2.40 (m, 3H), 1.86-2.03 (m, 4H), 1.50-1.75 (m, 3H), 1.40 (brs, 1H).³

³ HRMS and ¹³C NMR were described in literature [250,257].

- 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-aminobenzoate ($H_2N-C_6H_4-CONHS$)

Formula : $C_{11}H_{10}N_2O_4$
M : 234.21 g.mol⁻¹



4-aminobenzoic acid (10.0 g, 73 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous THF (140 mL) and then *N*-hydroxysuccinimide (10.1 g, 87 mmol, 1.2 eq.) was added to the solution. The reaction mixture was cooled to 0 °C with an ice bath and then dicyclohexylcarbodiimide (18.1 g, 87 mmol, 1.2 eq.) was added. The solution was stirred at room temperature for 16 h. The suspension was filtered and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The title product (7.9 g, 47 %) was obtained after silica column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate, 50/50, v/v).

¹H NMR (200 MHz, MeOD): δ 7.92 (d, 2H, J = 8.8 Hz, H_{2,6}), 6.65 (d, 2H, J = 8.8 Hz, H_{3,5}), 4.28 (s, 2H, NH₂), 2.83 (s, 4H, CH₂-CONHS).

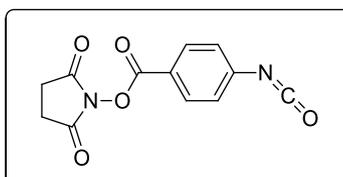
¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): δ 170.8 (2C, C=O_{NHS}), 161.5 (1C, C=O-NHS), 155.4 (1C, C₁), 132.3 (2C, C_{2,6}), 113.0 (2C, C_{3,5}), 109.2 (1C, C₄), 25.5 (2C, CH₂-CONHS).

HRMS (ESI⁺): m/z calculated for C₁₁H₁₀N₂O₄Na [M+Na]⁺ 257.0533, found 257.0521.

Melting point: 185 °C ± 1°C.

- 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-isocyanatobenzoate (OCN-C₆H₄-CONHS)

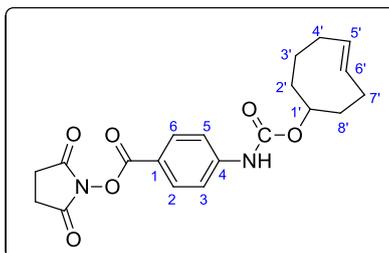
Formula : $C_{12}H_8N_2O_5$
M : 260.20 g.mol⁻¹



The $H_2N-C_6H_4-CONHS$ (2.1 g, 9.1 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous dichloromethane (80 ml), then triphosgene (3.1 g, 10.5 mmol, 1.2 eq.) was added under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h and evaporated under reduced pressure. The residue obtained was not purified and was directly involved in the next reaction.

- 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl (E)-4-(((cyclooct-4-en-1-yloxy)carbonyl)amino)benzoate (TCO-NHS) [257,258]

Formula : $C_{20}H_{22}N_2O_6$
M : $386.40 \text{ g.mol}^{-1}$



OCN-Ph-CONHS (2.10 g, 8.1 mmol, 2.5 eq.) was suspended in anhydrous dichloromethane (30 mL) and cooled to 0 °C with an ice bath. **TCO-OH** (407 mg, 3.2 mmol, 1 eq.) in anhydrous dichloromethane (10 mL) was added dropwise to the isocyanate suspension. The solution was stirred at room temperature for 48 h and evaporated under reduced pressure. The title product was obtained (610 mg, 51 %) after silica column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate, 60/40, v/v).

TCO-NHS (100-120 mg) was then purified again on SiO_2/SiO_2-AgNO_3 column (3 g of SiO_2 and 1.5 g of SiO_2-AgNO_3) to isolate the TCO from the CCO. A first elution with ethyl acetate removed CCO-NHS and impurities. A second elution with ethyl acetate/triethylamine (80/20, v/v) afforded the TCO-NHS. The fractions containing TCO-NHS were combined and washed with 1N HCl (2x 8.5 mL) cooled to 0 °C, then with brine (10 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under reduced pressure.

1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7.91 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz, $H_{2,6}$), 7.45 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz, $H_{3,5}$), 7.41 (s, 1H, NH), 5.50 (ddd, 2H, $J = 16.8$ Hz, $J = 9.6$ Hz, $J = 4.2$ Hz, $H_{5',6'}$), 4.40 (dd, 1H, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.9$ Hz, $H_{1'}$), 2.84 (s, 4H, $H_{3',4'}$), 2.32 (tt, 3H, $J = 11.1$ Hz, $J = 5.5$ Hz), 2.00 (t, 1H, $J = 10.9$ Hz), 1.91 (ddd, 3H, $J = 18.4$ Hz, $J = 11.1$ Hz, $J = 6.2$ Hz), 1.72 (dd, 2H, $J = 15.0$ Hz, $J = 5.7$ Hz), 1.55 (ddd, 1H, $J = 15.4$ Hz, $J = 12.0$ Hz, $J = 6.0$ Hz).⁴

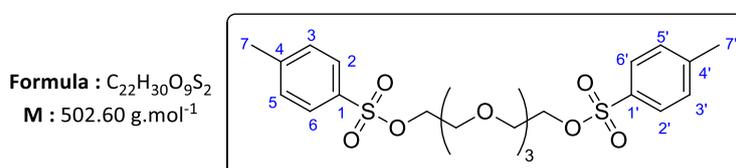
HPLC (analytical method 2): $t_R = 12.52$ min ($\lambda = 286$ nm).

⁴ HRMS and ^{13}C NMR were described in literature [257].

V. Synthesis of tetraethylene glycol derivatives

1. Synthesis of PEG₄ derivatives

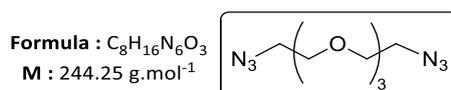
- ((Oxybis(ethane-2,1-diyl))bis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl) bis(4-methylbenzenesulfonate) (TsO-PEG₄-OTs) [239]



To a solution of tetraethylene glycol (18.3 g, 94.2 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous dichloromethane (120 mL), cooled to 0°C with an ice bath, DMAP (0.57 g, 0.47 mmol, 0.05 eq.), triethylamine (7.15 mL, 70.66 mmol, 0.75 eq.) and tosyl chloride (37.7 g, 197.85 mmol, 2.1 eq.) were added keeping the mixture below 5 °C. After stirring at room temperature for 16 h, the resulting mixture was washed with a NaHCO₃ saturated solution (2x50 mL), water (50 mL) and brine (50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduce pressure. The title product (30.2 g, 98 %) was obtained after silica column chromatography (dichloromethane, 100 %).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.78 (d, 4H, *J* = 8.0 Hz, H_{2,6,2',6'}), 7.33 (d, 4H, *J* = 8.0 Hz, H_{3,5,3',5'}), 4.15 (t, 4H, *J* = 4.8 Hz, CH₂-OTs), 3.67 (t, 4H, *J* = 4.8 Hz, -CH₂-CH₂-OTs), 2.44 (s, 6H, H_{7,7'}), 3.47-3.60 (m, 8H, CH₂-O).⁵

- 1-Azido-2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy) (N₃-PEG₄-N₃) [239]



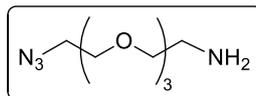
TsO-PEG₄-OTs (11.56 g, 23 mmol, 1 eq.) was solubilized in a saturated NaHCO₃ solution (38 mL) and sodium azide (6 g, 92 mmol, 4 eq.) was added. The resulting solution was refluxed for 20 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was extracted with dichloromethane (4x100 mL). The combined organic layers were washed with brine (200 mL), dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. N₃-PEG₄-N₃ (5.57 g, 99 %) was obtained as a yellow oil without further purification.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 3.52-3.78 (m, 12H, CH₂-O), 3.39 (t, 4H, *J* = 5.0 Hz, CH₂-N₃).⁵

⁵ IR and ¹³C NMR were described in literature [239].

- 2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-amine (**N₃-PEG₄-NH₂**) [239]

Formula : C₈H₁₈N₄O₃
M : 218.25 g.mol⁻¹

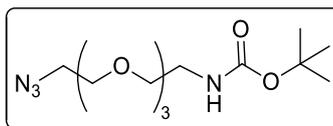


N₃-PEG₄-N₃ (4.01 g, 16.4 mmol, 1 eq.) was dissolved in a solution of 0.65M H₃PO₄ (10 mL) and a solution of triphenylphosphine (4.24 g, 16.4 mmol, 1 eq.) dissolved in diethyl ether (5 mL) was added dropwise. The resulting mixture was stirred under argon at room temperature. After 20 h, the reaction mixture was extracted with diethyl ether (3x30 mL). After evaporation of ether traces, the aqueous layer was basified with potassium hydroxide (3.12 g, 55.76 mmol, 3.4 eq.) and then cooled at 4 °C for 16 h. The precipitate formed was filtered and the filtrate was basified with potassium hydroxide (8.7 g, 155.8 mmol, 10 eq.). The solution was extracted with dichloromethane (3x60 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in dichloromethane (80 mL) and the solution was washed with a solution of 0.65M H₃PO₄ (3x50 mL). The aqueous layers were basified with potassium hydroxide until pH = 14 and then were extracted with dichloromethane (3x60 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The title product (1.8 g, 50 %) was obtained as a yellow oil without further purification.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 3.62 (m, 12H, CH₂-O), 3.37 (t, 2H, J = 5.2 Hz, CH₂-N₃), 2.84 (t, 2H, J = 5.2 Hz, CH₂-NH₂).⁶

- *tert*-Butyl (2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (**N₃-PEG₄-NHBoc**) [241]

Formula : C₁₃H₂₆N₄O₅
M : 318.37 g.mol⁻¹



To a solution of **N₃-PEG₄-NH₂** (600 mg, 2.7 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous dichloromethane (5.5 mL) cooled to 0°C with an ice bath was added di-*tert*-butyl dicarbonate (864 mg, 3.3 mmol, 1.2 eq.). The resulting mixture was stirred at room temperature for 16 h. The reaction solution was then diluted with dichloromethane (10 mL), washed with water (2x10 mL) and brine (10 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The title product (609 mg, 70 %) was obtained as a yellow oil after silica column chromatography (dichloromethane/ethanol, 90/10, v/v).

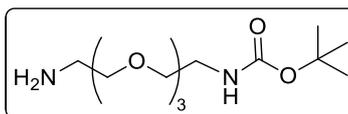
¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 3.59-3.85 (m, 10H, CH₂-O), 3.54 (t, 2H, J = 5.1 Hz, CH₂-CH₂-NHBoc), 3.39 (t, 2H, J = 5.1 Hz, CH₂-N₃), 3.31 (t, 2H, J = 5.2 Hz, CH₂-NHBoc), 1.44 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).⁷

⁶ IR and ¹³C NMR were described in literature [239].

⁷ IR and ¹³C NMR were described in literature [241].

- *tert*-Butyl (2-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (**NH₂PEG₄NHBoc**) [242]

Formula : C₁₃H₂₈N₂O₅
M : 292.37 g.mol⁻¹



N₃-PEG₄-NHBoc (609 mg, 1.9 mmol) was dissolved in absolute ethanol (25 mL) in presence of palladium on carbon 10% w/w (102 mg). The resulting solution was degassed three times. Then, the reaction solution and was stirred at room temperature under hydrogen atmosphere (3.5 bar) for 16 h. The suspension was filtered through a pad of Celite® 545 and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The title product (540 mg, 97 %) was obtained as a yellow oil after silica column chromatography (gradient of dichloromethane/ethanol, 98/2, v/v to 80/20, v/v).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 3.48-3.72 (m, 10H, CH₂-O), 3.27-3.30 (m, 2H), 2.79-2.87 (m, 2H), 2.37 (brs, 2H), 1.42 (s, 9H, CH₃-tBu).⁸

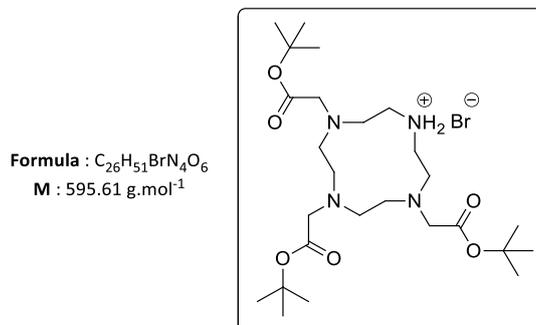
⁸ HRMS and ¹³C NMR were described in literature [242].

VI. Synthesis of DOTA derivatives

1. Synthesis of DOTA chelates for coupling with nanoparticles

1.1 Synthesis of mDOTA for coupling with primary amines of NP-ADIBO/NH₂

- *1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7-tert-butyl triacetate hydrobromide (DO3A-3tBu) [229]*



Cyclene (5 g, 29 mmol) was dissolved in dimethylacetamide (40 mL) and sodium acetate trihydrate (13 g, 96 mmol, 1 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature. A solution of *tert*-butyl bromoacetate (14.2 ml, 96 mmol, 1 eq.) was added dropwise under argon for 30 min while maintaining the temperature between 20 and 25 °C. The mixture was stirred for 60 h at room temperature and then was diluted with cold diethyl ether (20 mL) in an ice/MeOH bath to maintain the temperature at -10 °C. Once the reaction mixture was stirred for 2 h, the white precipitate obtained was filtered to obtain a white powder washed with dimethylacetamide (10 mL) and diethyl ether (2x25 mL). This powder was dissolved in chloroform (100 mL), washed, extracted with distilled water (2x15 ml) and then with a saturated aqueous sodium bromide solution (15 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The obtained oil was dissolved in hexane (80 mL) in order to obtain a precipitate stirred for 12 hours. The suspension was cooled in an ice/MeOH bath, was stirred for 3 h, filtered and washed with hexane/chloroform (4/1, v/v, 25 mL). Finally, the title product (7.88 g, 47 %) was obtained as a white powder after drying to desiccator.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 10.02 (brs, 2H), 2.87-3.36 (m, 22H, CH₂-N, -N-CH₂-COOtBu), 1.44 (s, 27H, CH₃-tBu).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.4 (2C, COOtBu), 169.5 (1C, COOtBu), 81.7 (1C, -O-C-CH₃-tBu), 81.5 (2C, -O-C-CH₃-tBu), 58.0 (3C, -N-CH₂-COOtBu), 51.2 (3C, CH₂-N), 49.1 (2C, CH₂-N), 48.7 (1C, CH₂-N), 47.4 (2C, CH₂-N), 28.1 (9C, CH₃-tBu).

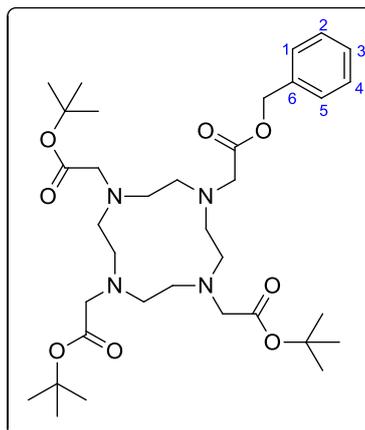
IR ν (cm⁻¹): 2976 (C-H), 1716 (C=O), 1116 (C-N).

HRMS (ESI+): m/z calculated for C₂₆H₅₂N₄O₆ [M+H]⁺ 515.3730 found 515.3781.

Melting point: measured 186 °C ± 1°C, in literature 179-181 °C.

- *N*-(Carbobenzoxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N'*,*N''*,*N'''*-triacetic acid tri-*tert*-butyl ester (**DOTA-3tBu-Bn**) [230]

Formula : C₃₅H₅₈N₄O₈
M : 662.86 g.mol⁻¹



To a solution of **DOTA-3tBu** (4.07 g, 6.83 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous acetonitrile (100mL) potassium carbonate (2.83 g, 20.5 mmol, 3 eq.) and a solution of benzyl bromoacetate (1.3mL, 8.21 mmol, 1.2 eq.) dissolved in anhydrous acetonitrile (15 mL) were successively added. The resulting suspension was stirred under argon at 70 °C for 16 h. The reaction mixture was filtered and evaporated under reduced pressure. The title product (4.1 g, 89 %) was obtained as an oil after silica column chromatography (dichloromethane/methanol, 98/2, v/v).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.27 (m, 5H, CH_{ar}), 5.08 (m, 2H, -CH₂-Ph), 1.75-3.55 (m, 24H, CH₂-N, -N-CH₂-COO-), 1.37 (s, 27H, CH₃-tBu).

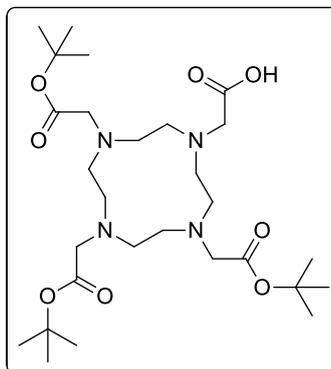
¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 171.0 (2C, C=O), 170.2 (2C, C=O), 133.2 (1C, -CH₂-C₆), 126.5 (2C, C_{1,5}), 126.2 (3C, C_{2,3,4}), 79.7 (3C, -O-C-CH₃-tBu), 64.6 (1C, -CH₂-Ph), 55.0 (8C, -N-CH₂-COOtBu, CH₂-N), 54.2 (4C, CH₂-N), 25.9 (9C, CH₃-tBu).

IR ν (cm⁻¹): 2975 (C-H), 2823 (C-H), 1724 (C=O), 1117 (C-N).⁹

⁹ HRMS was described in literature [230].

- *N*-(Carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N'*,*N''*,*N'''*-triacetic acid tri-*tert*-butyl ester (DOTA-3*t*Bu-COOH) [230]

Formula : C₂₈H₅₂N₄O₈
M : 572.73 g.mol⁻¹



DOTA-3*t*Bu-Bn (750 mg, 1.13 mmol) was dissolved in methanol (20 mL) in presence of palladium on carbon 10 % w/w (75 mg). The resulting solution was degassed three times and then stirred under hydrogen atmosphere (3.5 bar) at room temperature for 16 h. The suspension was then filtered through a pad of Celite® 545 and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The title product (593 mg, 92 %) was obtained as an oil without further purification.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 8.09 (brs, 1H, COOH), 1.90-3.60 (m, 24H, CH₂-N, -N-CH₂-COO-), 1.38 (s, 27H, CH₃-*t*Bu).

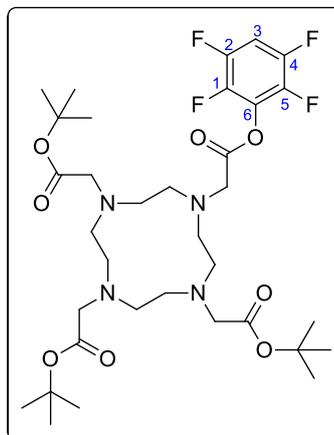
¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 175.0 (1C, C=O), 172.3 (3C, C=O*t*Bu), 82.0 (2C, -O-C-CH₃-*t*Bu), 81.9 (1C, -O-C-CH₃-*t*Bu), 56.2 (1C, CH₂-α-COOH), 55.9 (8C, -N-CH₂-COO*t*Bu, CH₂-N), 55.5 (3C, CH₂-N), 28.0 (9C, CH₃-*t*Bu).

IR ν (cm⁻¹): 2976 (C-H), 1726 (C=O), 1118 (C-N).¹⁰

¹⁰ HRMS was described in literature [230].

- *N*-[Carbo(2,3,5,6-tetrafluorophenoxyl)methyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N'*,*N''*,*N'''*-triacetic acid tri-*tert*-butyl ester (*mDOTA-3tBu*) [230]

Formula : $C_{34}H_{52}F_4N_4O_8$
 M : 720.79 g.mol⁻¹



To a solution of **DOTA-3tBu-COOH** (593 mg, 1.04 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous chloroform (10 mL) was added a solution of tetrafluorophenol (186 mg, 1.12 mmol, 1.1 eq.) dissolved in anhydrous chloroform (10 mL). The resulting mixture was cooled in an ice bath and then dicyclohexylcarbodiimide (242 mg, 1.12 mmol, 1.1 eq.) was added. The solution was stirred at 0 °C for 15 min and then at room temperature for 20 h. The reaction mixture was filtered and evaporated under reduced pressure. The title product (535 mg, 71 %) was obtained as a white powder after purification on silica column chromatography (dichloromethane methanol, 98/2, v/v).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 6.88 (m, 1H, H₃), 1.80-3.18 (m, 24H, CH₂-N, -N-CH₂-COO), 1.00-1.30 (m, 27H, CH₃-*t*Bu).

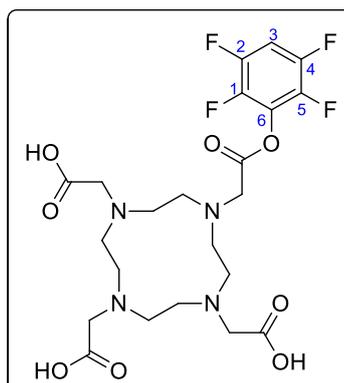
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 172.7 (1C, C=O), 172.6 (2C, C=O), 170.1 (1C, C=O), 146.5 (1C, td, *J* = 7.5 Hz, 11.8 Hz, C_{1/5}), 144.6 (td, 1C, *J* = 7.5, 11.8 Hz, C_{1/5}), 140.9 (1C, C₆), 138.9 (1C, C₃), 128.6 (1C, t, *J* = 3.3 Hz, C_{2/4}), 103.2 (1C, t, *J* = 22.8 Hz, C_{2/4}), 81.7 (3C, -O-C-CH₃-*t*Bu), 55.3 (1C, CH₂-α-tetrafluorophenyl ester), 55.2 (3C, CH₂-N), 54.3 (6C, CH₂-N), 53.3 (2C, CH₂-N), 27.4 (6C, CH₃-*t*Bu), 27.2 (3C, CH₃-*t*Bu).

Melting point: 103 °C ± 1°C.¹¹

¹¹ HRMS was described in literature but not the melting point [230].

- *N*-[Carbo(2,3,5,6-tetrafluorophenoxyl)methyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N'*,*N''*,*N'''*-triacetic acid (**mDOTA**) [230]

Formula : C₂₂H₂₈F₄N₄O₈
M : 552.47 g.mol⁻¹



To a solution of **mDOTA-3tBu** (500 mg, 0.694 mmol) dissolved in anisole (460 μ L) trifluoroacetic acid (9 mL) was slowly added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 20 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure and then triturated with diethyl ether (4x20 mL). The title product (380 mg, Quant.) was obtained as a white powder without further purification.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ 7.46 (m, 1H, H₃), 3.08-4.28 (m, 24H, CH₂-N, -N-CH₂-COO-).

¹³C NMR (125 MHz, MeOD): δ 174.4 (1C, C=O), 169.2 (2C, C=O), 168.8 (1C, C=O), 148.5 (td, 1C, *J* = 7.5, 11.8 Hz, C_{1/5}), 146.5 (td, 1C, *J* = 7.5, 11.8 Hz, C_{1/5}), 142.8 (1C, C₆), 140.6 (1C, C₃), 127.1 (t, 1C, *J* = 3.3 Hz, C_{2/4}), 105.0 (t, 1C, *J* = 22.8 Hz, C_{2/4}), 55.7 (4C, CH₂- α -tetrafluorophenyl ester, CH₂-N), 54.1 (2C, CH₂-N), 53.8 (2C, CH₂-N), 53.2 (2C, CH₂-N), 52.6 (2C, CH₂-N).

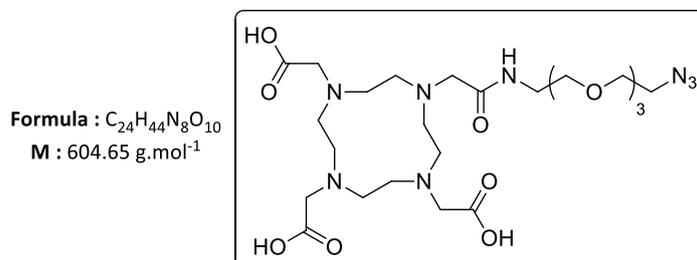
Melting point: 165 °C \pm 1°C.¹²

¹² HRMS was described in literature but not the melting point [230].

1.2 Synthesis of DOTA(Gd) derivatives incorporated by bioorthogonal chemistry on NP-ADIBO/NH₂

a. Synthesis of N₃-PEG₄-DOTA(Gd) incorporated by SPAAC

- 2,2',2''-(10-(17-Amino-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaheptadecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid (N₃-PEG₄-DOTA) [259]



To a solution **mDOTA** (227 mg, 0.41 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (5 mL), **N₃PEG₄NH₂** (98 mg, 0.45 mmol, 1.1 eq.) and triethylamine (63 μL, 0.45 mmol, 1.1 eq.) were added under argon atmosphere. The resulting mixture was stirred at room temperature for 16 h. The reaction solution was evaporated under reduced pressure. The title product (160 mg, 65 %) was obtained as an oil after preparative reverse phase HPLC conducted on a Combiflash *EZ* prep system according to **method 1**.

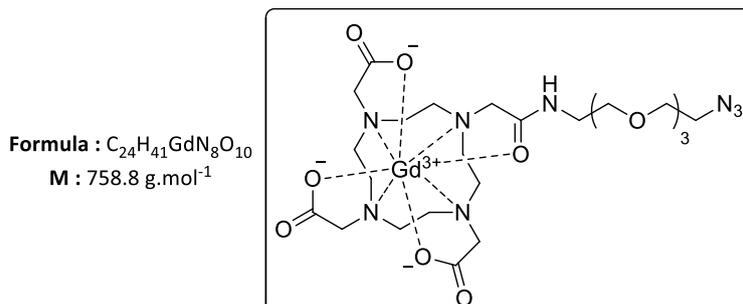
¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 3.76-4.15 (m, 4H, CH₂-N, -N-CH₂-COO-), 3.63-3.65 (t, 2H, *J* = 5.3 Hz, CH₂-CONH), 3.57-3.60 (m, 14H, CH₂-O), 3.51-3.53 (t, 2H, *J* = 5.3 Hz, CH₂-N₃), 3.08-3.38 (m, 18H, CH₂-N, -N-CH₂-COO-).¹³

IR ν (cm⁻¹): 2872 (C-H), 2108 (N₃), 1663 (C=O), 1127 (C-N).

HRMS (ESI⁺): *m/z* calculated for C₂₄H₄₅N₈O₁₀ [M+H]⁺ 605.3180, found 605.3247.

¹³ ¹³C NMR was realised but not mentioned because of missing signals for CH₂-N and C=O of DOTA.

- 2,2',2''-(10-(17-Amino-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaheptadecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid gadolinium complex (N_3 -PEG $_4$ -DOTA(Gd))



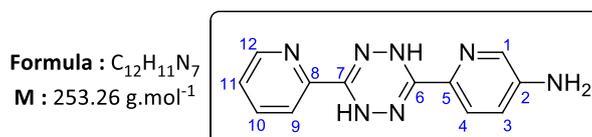
N_3 -PEG $_4$ -DOTA (26 mg, 43 μ mol, 1 eq.) was dissolved in ultra-pure water (18 ohms) (5 mL) and gadolinium chloride (11 mg, 43 μ mol, 1 eq.) was added. The pH was adjusted to 6.5 with 1M NaOH solution. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The pH was then adjusted to 7 with 1M NaOH (5 μ L). The reaction mixture was evaporated under reduced pressure and filtered. The title product (25 mg, 76 %) was obtained as an oil after preparative reverse phase HPLC conducted on a Combiflash EZ prep system according to **method 1**.

IR ν (cm $^{-1}$): 2873 (C-H), 2104 (N $_3$), 1613 (C=O), 1124 (C-N).

HRMS (ESI+): m/z calculated for $C_{24}H_{42}GdN_8O_{10}$ [M+H] $^+$ 760.2265, found 760.2274.

b. Synthesis of Tz-PEG $_4$ -DOTA(Gd) incorporated by IEDDA

- 3-Amino-6-(6-(pyridin-2-yl)-1,4-dihydro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridine (DHTz) [243]



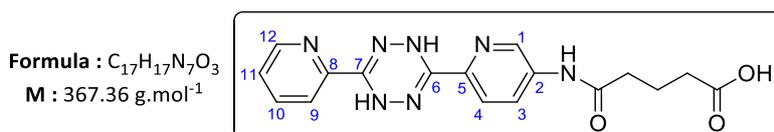
5-Amino-2-cyanopyridine (5 g, 42 mmol, 1 eq.), 2-cyanopyridine (4.8 g, 46 mmol, 1.1 eq.) and hydrazine monohydrate (8.1 mL, 168 mmol, 4 eq.) were mixed and stirred at 90 °C for 12 h. Water (40mL) cooled to 0 °C was added to the reaction and the mixture was filtered. The precipitate was washed with water (50 mL) cooled to 0 °C, dissolved in absolute ethanol (100 mL) and evaporated under reduced pressure. The title product (2.6 g, 24 %) was obtained as an orange solid after silica column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate, 70/30, v/v).

1 H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ 8.72 (s, 1H, H $_1$), 8.67 (brs, 1H, NH), 8.63 (td, 1H, J = 4.8 Hz, J = 1.4 Hz, H $_{10}$), 7.79-8.03 (m, 3H, H $_9$, H $_{12}$, NH), 7.65 (d, 1H, J = 8.6 Hz, H $_4$), 7.51 (ddd, 1H, J = 6.8 Hz, J = 4.9 Hz, J = 2.1 Hz, H $_{11}$), 6.99 (dd, 1H, J = 8.6 Hz, J = 2.7 Hz, H $_3$), 5.90 (brs, 2H, NH $_2$).

Melting point: 175 °C \pm 1°C.¹⁴

¹⁴ HRMS and 13 C NMR were described in literature but not the melting point [243].

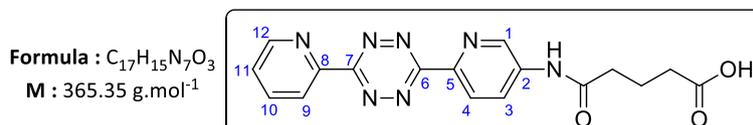
- 5-Oxo-5-((6-(6-(pyridin-2-yl)-1,4-dihydro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridin-3-yl)amino)pentanoic acid (**DHTz-COOH**) [244]



To a solution of **DHTz** (3.8 g, 15 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous acetonitrile (30 mL) glutaric anhydride (2.0 g, 18 mmol, 1.2 eq.) was added. The resulting mixture was stirred at 60 °C for 16 h and then was filtered. After cooling to room temperature, the precipitate was washed with diethyl ether (3x50 mL) in order to obtain the title product (4.5 g, 82 %) as a brown solid without further purification.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ 12.14 (brs, 1H, COOH), 10.38 (brs, 1H, CONH), 8.95 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.82 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 8.63 (d, 1H, *J* = 4.6 Hz), 8.16 (dd, 1H, *J* = 8.9 Hz, *J* = 2.3 Hz, H₃), 7.84-8.02 (m, 3H, H₉, H₁₂, NH), 7.52 (ddd, *J* = 6.8 Hz, 1H, *J* = 5.0 Hz, *J* = 2.1 Hz, H₁₁), 2.43 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, -CONH-CH₂-CH₂), 2.29 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, -CH₂-COOH), 1.82 (quint., 2H, *J* = 7.3 Hz, -CONH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH).

- 5-Oxo-5-((6-(6-(pyridin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridin-3-yl)amino)pentanoic acid (**Tz-COOH**) [244]



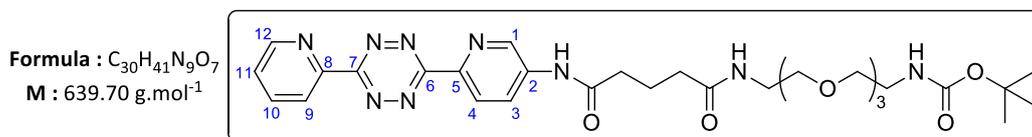
To a suspension of **DHTz-COOH** (4.5 g, 12 mmol, 1 eq.) in acetic acid glacial (140 mL) sodium nitrite (2.6 g, 38 mmol, 3.2 eq.) was added portionwise. After stirring the resulting mixture at room temperature for 10 min, the precipitate was filtered and washed successively with dichloromethane (3x50 mL), ethyl acetate (3x50 mL), water (3x50 mL) and acetonitrile (3x50 mL). The residue was dissolved in acetone (30 mL) and evaporated under pressure. The title product (4.0 g, 89 %) was obtained as a pink solid without further purification.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ 12,13 (brs, 1H, COOH), 10,60 (brs, 1H, CONH), 8,80-9,25 (m, 2H), 8,51-8,80 (m, 2H), 8,42 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz), 8,17 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, H₃), 7,73 (t, 1H, *J* = 6,2 Hz, H₁₁), 3,36 (s, 2H, -CONH-CH₂-CH₂), 2,30 (d, 2H, *J* = 7,3 Hz, -CH₂-COOH), 1,86 (quint., 2H, *J* = 8,8 Hz, -CONH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH).

Melting point: 263 °C ± 1°C.¹⁵

¹⁵ HRMS and ¹³C NMR were described in literature but not the melting point.

- *Tert-Butyl (13,17-dioxo-17-((6-(6-(pyridin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridin-3-yl)amino)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyl)carbamate (Tz-PEG₄-NH₂Boc)* [240]



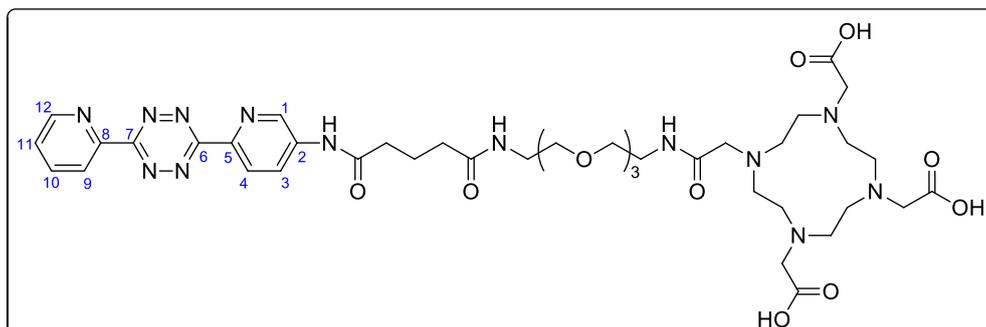
To a solution of **NH₂PEG₄NHBoc** (880 mg, 3.0 mmol, 1.1 eq.) dissolved in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (67 mL) **Tz-COOH** (1 g, 2.7 mmol, 1 eq.), BOP (1.3 g, 3.0 mmol, 1.1 eq.) and *N,N'*-diisopropylethylamine (4.8 mL, 27 mmol, 10 eq.) was successively added. After stirring at room temperature for 22 h, the resulting mixture was then evaporated under reduced pressure. The title product (905 mg, 52 %) was obtained as a fushia solid after silica column chromatography (dichloromethane/ethanol, 90/10, v/v).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 9.79 (s, 1H), 8.86-9.11 (m, 2H), 8.53-8.81 (m, 3H), 8.00 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.49-7.65 (m, 1H), 6.45 (s, 1H), 5.14 (s, 1H), 3.39-3.85 (m, 14H, CH₂-O), 3.28 (t, 2H, *J* = 3.4 Hz), 2.56 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz, -CONH-CH₂-CH₂-CH₂-CONH- PEG₄-), 2.36 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, -CONH-CH₂-CH₂-CH₂-CONH- PEG₄-), 2.08 (quint., 2H, *J* = 6.4 Hz, -CONH-CH₂-CH₂-CH₂-CONH- PEG₄-), 1.42 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).

Melting point: 153 °C ± 1°C.¹⁶

¹⁶ HRMS and ¹³C NMR were described in literature but not the melting point [240].

- 2,2',2''-(10-(2-Oxo-2-((2-(2-(5-oxo-5-((6-(6-(pyridin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridin-3-yl)amino)pentanamido)ethoxy)ethyl)amino)ethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid (**Tz-PEG₄-DOTA**) [240]



Formula : C₄₁H₅₉N₁₃O₁₂
M : 925.99 g.mol⁻¹

To a solution of **Tz-PEG₄-NH₂** (50 mg, 0.08 mmol) dissolved in anhydrous dichloromethane (4 mL), cooled to 0°C with an ice bath, trifluoroacetic acid (488 μL) was added dropwise. The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h and then evaporated under reduce pressure. The title product **Tz-PEG₄-NH₂** was obtained as a red solid after co-evaporation with acetonitrile (5 mL) and ether (5 mL) and the residue was directly engaged in the next reaction.

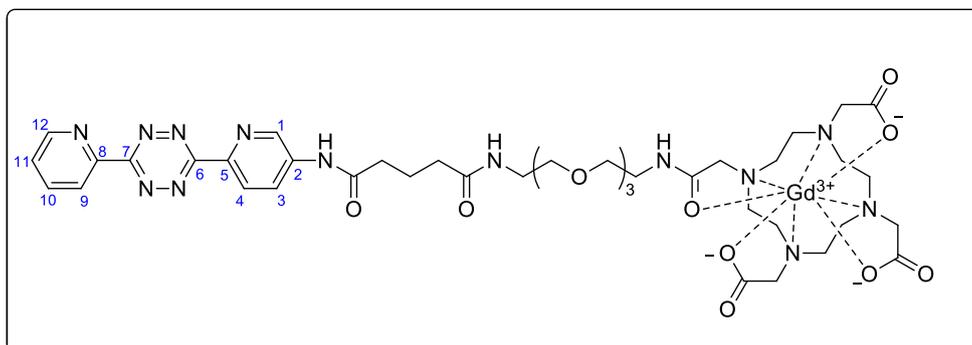
Tz-PEG₄-NH₂ (42 mg, 78 μmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (4 mL) and was cooled to 0°C with an ice bath. *N,N'*-diisopropylethylamine (286 μL, 1.6 mmol, 20 eq.) was added dropwise followed by **DOTA-NHS** ester (95 mg, 125 μmol, 1.6 eq.). The resulting mixture was stirred at room temperature for 20 h. After evaporation of the reaction mixture under reduced pressure, the title product (40 mg, 56 %) was finally obtained as a pink solid after preparative reverse phase HPLC conducted on a Combiflash *EZ* prep system according to **method 2**.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ 9.08 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 8.88 (d, 1H, *J* = 4.2 Hz), 8.75 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 8.70 (dd, 1H, *J* = 8.7 Hz), 8.40 (dd, 1H, *J* = 8.7 Hz, 2.5 Hz), 8.18 (td, 1H, *J* = 7.8 Hz, 1.7 Hz), 7.74 (ddd, 1H, *J* = 7.6 Hz, 4.8 Hz, 1.0 Hz), 3.72-4.13 (m, 9H), 3.56-3.63 (m, 12H, CH₂-O), 3.54 (m, 7H), 3.33-3.47 (m, 12H), 2.53 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, -CONH-CH₂-CH₂-CH₂-CONH-PEG₄-), 2.33 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, -CONH-CH₂-CH₂-CH₂-CONH-PEG₄-), 2.02 (quint., 2H, *J* = 7.4 Hz, -CONH-CH₂-CH₂-CH₂-CONH-PEG₄-).

Melting point: 159 °C ± 1°C.¹⁷

¹⁷ HRMS was described in literature but not the melting point [240]. ¹³C NMR was realised but not mentioned because of missing signals for CH₂-N and C=O of DOTA.

- 2,2',2''-(10-(2-Oxo-2-((2-(2-(5-oxo-5-((6-(6-(pyridin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)pyridin-3-yl)amino)pentanamido)ethoxy)ethyl)amino)ethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid gadolinium complex (Tz-PEG₄-DOTA(Gd))



Formula : C₄₁H₅₆GdN₁₃O₁₂

M : 1080.21 g.mol⁻¹

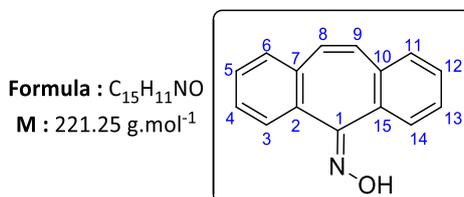
Tz-PEG₄-DOTA (40 mg, 43 μmol, 1 eq.) was dissolved in ultra-pure water (18 ohms) (4 mL) and gadolinium chloride (11 mg, 43 μmol, 1 eq.) was added. The pH was adjusted to 6.5 with a 1M NaOH solution. The resulting mixture was stirred at room temperature for 16 h. The pH was then adjusted to 7 with a 1M NaOH solution (5 μL). The reaction mixture was evaporated under reduced pressure and filtered. The title product (15 mg, 32 %) was obtained as a red oil after preparative reverse phase HPLC conducted on a Combiflash EZ prep system according to **method 2**.

HRMS (ESI+): m/z calculated for C₄₁H₅₈GdN₁₃O₁₂ [M+2H]²⁺ 541.1779, found 541.1790.

2. Synthesis of ADIBO-DOTA(Gd) chelating entities for radiosensitization studies with RTX-N₃

2.1 Synthesis of ADIBO-NHS [252,253]

- *H*-dibenzo[*a,d*][7]annulen-5-one oxime (*Oxime*)



To a solution of hydroxylamine (16.8 g, 242 mmol, 5 eq.) dissolved in absolute ethanol (100 mL) pyridine (26 mL, 322 mmol, 6.5 eq.) and 5-dibenzosuberone (10 g, 49 mmol, 1 eq.) were successively added. The resulting mixture was stirred at reflux under argon atmosphere for 16 h. The reaction solution was then evaporated under reduced pressure and the crude product was precipitated and triturated in water (160 mL). The precipitate was filtered and washed with water (2×40 mL). The title product (10.4 g, 97 %) was obtained without further purification.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 10.10 (brs, 1H, =N-OH), 7.67 (m, 1H, CH_{ar}), 7.57 (m, 1H, H₃), 7.37-7.28 (m, 6H, CH_{ar}), 6.86 (dd, 2H, *J* = 28.0 Hz, 4.0 Hz, H_{8,9}).

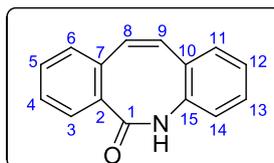
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 156.3 (1C, C₁), 135.4 (2C, C_q), 134.5 (1C, C_q), 133.8 (1C, C_q), 130.8 (1C, CH), 130.7 (1C, CH), 129.5 (1C, CH), 129.2 (1C, CH), 129.1 (1C, CH), 129.0 (2C, CH), 128.8 (1C, CH), 127.8 (1C, CH), 127.7 (1C, CH).

Melting point: measured 184 °C ± 1°C, in literature 187°C.¹⁸

¹⁸ HRMS was described in literature [253].

- (Z)-dibenzo[b,f]azocin-6(5H)-one (Amide)

Formula : C₁₅H₁₁NO
M : 221.25 g.mol⁻¹



To a solution of Eaton's reagent (60 mL) was added **Oxime** (10.4 g, 47 mmol). The resulting mixture was stirred at 100 °C under argon atmosphere for 1 h. After complete reaction, the mixture was cooled to 0 °C with an ice bath and ultra-Pure water (300 mL) was slowly added. The formed precipitate was filtered and washed with water (2×60 mL) and ethyl acetate (2×60 mL). The title product (9.8 g, 94 %) was obtained as in a grey powder without further purification.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ 9.88 (brs, 1H, NH), 7.34-7.08 (m, 8H, CH_{ar}), 6.98 (d, 1H, J = 11.6 Hz, H_{8/9}), 6.86 (d, 1H, J = 11.6 Hz, H_{8/9}).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): δ 171.8 (1C, C₁), 136.3 (1C, C_q), 136.2 (1C, C_q), 134.5 (1C, C_q), 133.5 (1C, C_q), 132.7 (1C, CH), 130.2 (1C, CH), 129.0 (2C, CH), 128.1 (1C, CH), 127.8 (2C, CH), 127.4 (1C, CH), 126.4 (1C, CH), 126.2 (1C, CH).

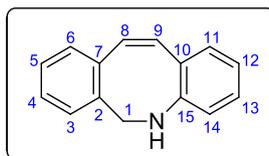
IR ν (cm⁻¹): 3026 (C-H), 1640 (C=O).

Melting point: measured 141 °C ± 1°C, in literature 141-142 °C.¹⁹

¹⁹ HRMS was described in literature [253].

- (Z)-5,6-dihydrodibenzo[b,f]azocine (**Azocine**)

Formula : C₁₅H₁₃N
M : 207.27 g.mol⁻¹



To a solution of **Amide** (9.8 g, 44 mmol, 1 eq.) dissolved in diethyl ether (120 mL), a solution of LiAlH₄ 4M (37 mL, 75 mmol, 1.7 eq.) in diethyl ether was added dropwise under argon atmosphere. The resulting mixture was stirred at reflux for 16 h and then cooled to room temperature before to quench slowly with water (40 mL). The formed precipitate was filtered and washed with diethyl ether (2×200 mL). The filtrate was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The title product (5.8 g, 64 %) was obtained as a yellow powder after silica column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate, 80/20, v/v).

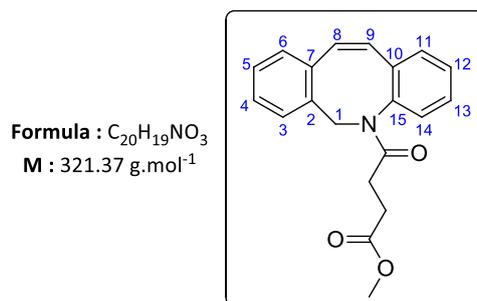
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.29-7.26 (brs, 1H, NH), 7.25-7.17 (m, 3H, CH_{ar}, H_{8,9}), 6.98 (d, 1H, J = 8.0 Hz, CH_{ar}), 6.88 (t, 1H, J = 8.0 Hz, CH_{ar}), 6.62 (t, 1H, J = 7.2 Hz, CH_{ar}), 6.54 (d, 1H, J = 13.2 Hz, CH_{ar}), 6.46 (d, 1H, J = 8.4 Hz, CH_{ar}), 6.36 (d, 1H, J = 13.2 Hz, CH_{ar}), 4.59 (s, 2H, H₁).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 147.3 (1C, C_q), 139.4 (1C, C_q), 138.3 (1C, C_q), 134.8 (1C, CH), 132.9 (1C, CH), 130.3 (1C, CH), 129.0 (1C, CH), 128.1 (1C, CH), 127.8 (1C, CH), 127.5 (1C, CH), 127.4 (1C, CH), 121.9 (1C, C_q), 118.1 (1C, CH), 117.9 (1C, CH), 49.7 (1C, C₁).

Melting point: measured 100 °C ± 1°C, in literature 102-104 °C.²⁰

²⁰ HRMS was described in literature [252].

- Methyl-4-(dibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)-4-oxobutanoate (Octene-COOCH₃)



To a solution of **Azocine** (4.4 g, 21 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous dichloromethane (140 mL) a solution of methyl chloride succinyle in anhydrous dichloromethane (30 mL) cooled to 0 °C and triethylamine (8.5 mL, 61 mmol, 3 eq.) were added successively dropwise. The resulting mixture was stirred at room temperature for 16 h and then extracted with a solution of 2M NaOH (3×70 mL), a solution of 2M HCl (3×70 mL) and brine (160 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The title product (4.9 g, 72 %) was obtained as a yellow powder after silica column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate, 80/20, v/v).

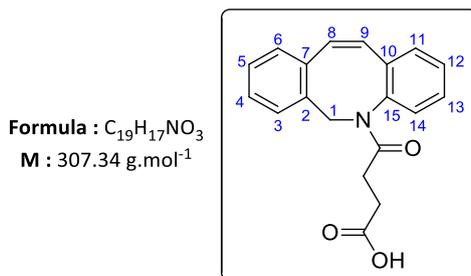
¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.25-7.20 (m, 5H, CH_{ar}), 7.17-7.09 (m, 3H, CH_{ar}), 6.79 (d, 1H, *J* = 17.2 Hz, H_{8/9}), 6.61 (d, 1H, *J* = 17.2 Hz, H_{8/9}), 5.51 (d, 1H, *J* = 20.8 Hz, H₁), 4.25 (d, 1H, *J* = 20.8 Hz, H₁), 3.61 (s, 3H, CH₃), 2.35-2.65 (m, 3H, CH₂-CH₂-C=O), 1.93-2.08 (m, 1H, CH₂-CH₂-C=O).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 173.6 (1C, C=O), 171.0 (1C, C=O), 140.6 (1C, Cq), 136.6 (1C, Cq), 136.0 (1C, Cq), 134.7 (1C, Cq), 132.8 (1C, CH), 131.9 (1C, CH), 131.0 (1C, CH), 130.3 (1C, CH), 128.7 (1C, CH), 128.4 (1C, CH), 128.2 (1C, CH), 127.4 (2C, CH), 127.1 (1C, CH), 54.6 (1C, C₁), 51.8 (1C, CH₃), 29.7 (1C, CH₂-C=O), 29.2 (1C, CH₂-C=O).

Melting point: measured 106 °C ± 1°C, in literature 108 °C.²¹

²¹ HRMS was described in literature [253].

- 4-Dibenzo[*b,f*]azocin-5(6*H*)-yl-4-oxobutanoic acid (*Octene-COOH*)



To a solution of *octene-COOCH*₃ (4.9 g, 15 mmol, 1 eq.) dissolved in methanol (100 mL) a solution of LiOH (3.8 g, 92 mmol, 6 eq.) in water (50 mL) was added. The resulting mixture was stirred at reflux for 18 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with a 1M NaHSO₄ solution (100 mL) and then extracted with dichloromethane (3×100 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The title product (4.3 g, 91 %) was obtained as a white powder after trituration with diethyl ether (40 mL) and without further purification.

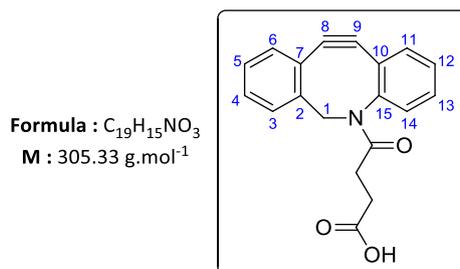
¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.27–7.22 (m, 5H, CH_{ar}), 7.18–7.11 (m, 3H, CH_{ar}), 6.77 (d, 1H, *J* = 12.6 Hz, H₈ or H₉), 6.57 (d, 1H, *J* = 12.6 Hz, H₉ or H₈), 5.48 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, H₁), 4.24 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, H₁), 2.33–2.61 (m, 3H, CH₂-C=O), 2.10–1.98 (m, 1H, CH₂-C=O).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 177.6 (1C, C=O), 171.6 (1C, C=O), 140.3 (1C, Cq), 136.6 (1C, Cq), 135.9 (1C, Cq), 134.3 (1C, Cq), 132.9 (1C, CH), 131.9 (1C, CH), 130.9 (1C, CH), 130.2 (1C, CH), 128.8 (1C, CH), 128.4 (1C, CH), 128.2 (1C, CH), 127.4 (2C, CH), 127.2 (1C, CH), 54.7 (1C, C₁), 29.6 (2C, CH₂-C=O).

Melting point: 127 °C ± 1°C.²²

²² HRMS was described in literature but not the melting point [252].

- 5-(11,12-Didehydrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)-4-oxobutanoic acid (ADIBO-COOH)



To a solution of **acid octene** (4.3 g, 14 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous dichloromethane (190 mL), cooled to 0 °C, dibromine (2.1 mL, 7 mmol, 0.5 eq.) was added dropwise under argon atmosphere. The resulting mixture was stirred at 0°C for 2 h. After complete reaction, dichloromethane (230 mL) was added and the reaction mixture was extracted with a NaHSO₃ saturated solution (3x230 mL), with water (230 mL) and brine (230 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The dibrominated intermediate was obtained as a grey powder directly engaged in the following reaction.

To a solution of the dibrominated intermediate dissolved in anhydrous tetrahydrofuran (230 mL) a 1M solution of potassium *tert*-butyl (50 mL, 50 mmol, 3.5 eq.) was slowly added at -40 °C under argon atmosphere. The resulting mixture was stirred at -40 °C for 2h under argon atmosphere. The reaction mixture was then quenched with a 1M NaHSO₄ solution (60 mL) until pH = 1 and extracted with dichloromethane (3x230 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The title product (3.3 g, 78 %) was obtained after precipitation in diethyl ether without further purification.

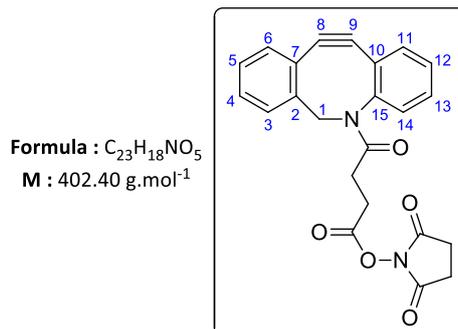
¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ 12.05 (brs, 1H, COOH), 7.68–7.60 (m, 2H, CH_{ar}), 7.54–7.43 (m, 3H, CH_{ar}), 7.41–7.26 (m, 3H, CH_{ar}), 4.99 (d, 1H, *J* = 14.4 Hz, H₁), 3.58 (d, 1H, *J* = 14.4 Hz, H₁), 2.67–2.55 (m, 1H, CH₂-CH₂-C=O), 2.10–2.38 (m, 2H, CH₂-CH₂-C=O), 1.84–1.69 (m, 1H, CH₂-CH₂-C=O).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): δ 173.6 (1C, C=O), 170.8 (1C, C=O), 151.5 (1C, C_{8/9}), 148.5 (1C, C_{9/8}), 132.4 (1C, CH), 129.7 (1C, CH), 128.9 (1C, CH), 128.3 (1C, CH), 128.1 (1C, CH), 127.7 (1C, CH), 126.9 (1C, CH), 125.2 (1C, CH), 122.6 (1C, Cq), 121.6 (1C, Cq), 114.3 (1C, Cq), 108.1 (1C, Cq), 55.0 (1C, C₁), 29.3 (1C, CH₂-C=O), 28.9 (1C, CH₂-C=O).

Melting point: measured 168 °C ± 1°C, in literature 163-164 °C.²³

²³ HRMS was described in literature [252].

- 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-4-(didehydrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)4-oxobutanoate (ADIBO-NHS)



To a solution of **ADIBO-COOH** (200 mg, 0.66 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous dichloromethane (20 mL), *N*-hydroxysuccinimide (93 mg, 0.79 mmol, 1.2 eq.) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (155 mg, 0.79 mmol, 1.2 eq.) were successively added under argon atmosphere. The resulting mixture was stirred at room temperature for 24 h. The title product (223 mg, 84 %) was obtained as a beige powder after silica column chromatography (dichloromethane/ethanol, 99/1, v/v).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.68 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, CH_{ar}), 7.43-7.25 (m, 7H, CH_{ar}), 5.17 (d, 1H, *J* = 14.0 Hz, H₁), 3.67 (d, 1H, *J* = 14.0 Hz, H₁), 2.98-2.93 (m, 1H, CH₂-C=O), 2.82-2.79 (m, 1H, CH₂-C=O), 2.77 (s, 4H, CH₂-CONHS), 2.67-2.62 (m, 1H, CH₂-C=O), 2.12-2.06 (m, 1H, CH₂-C=O).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 170.4 (1C, C=O), 168.9 (2C, C=O_{NHS}), 168.4 (1C, C=O), 151.3 (1C, C_{8/9}), 148.0 (1C, C_{9/8}), 132.5 (1C, CH), 129.2 (1C, CH), 128.8 (1C, CH), 128.5 (2C, CH), 127.9 (1C, CH), 127.4 (1C, CH), 125.7 (1C, CH), 123.2 (1C, Cq), 122.9 (1C, Cq), 115.2 (1C, Cq), 107.7 (1C, Cq), 55.8 (1C, C₁), 29.4 (1C, CH₂-C=O), 26.6 (1C, CH₂-C=O), 25.7 (2C, CH₂-CONHS).

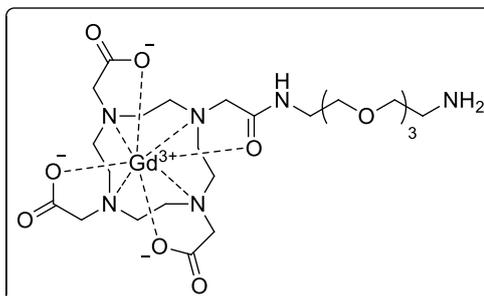
Melting point: 99 °C ± 1°C.²⁴

²⁴ HRMS was described in literature [252].

2.2 Synthesis of ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)

- 2,2',2''-(11-Amino-3,6,9-trioxaundecan-1-amino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid gadolinium complex (**NH₂-PEG₄-DOTA(Gd)**)

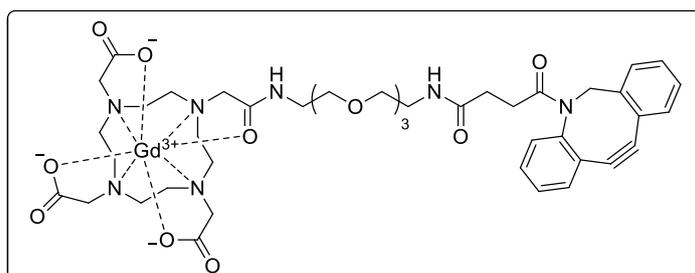
Formula : C₂₄H₄₃GdN₆O₁₀
M : 733.88 g.mol⁻¹



To a solution of **N₃-PEG₄-DOTA(Gd)** (58 mg, 76 μmol) dissolved in anhydrous methanol (10 mL), palladium on carbon 10% w/w (5.8 mg) was added. The resulting solution was degassed three times and was stirred under hydrogen atmosphere (3.5 bar) at room temperature for 16 h. The suspension was filtered through a pad of Celite® 545 and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The title product (53 mg, Quant.) was finally obtained as an oil and was directly engaged in the next reaction.

HRMS (ESI+): m/z calculated for C₂₄H₄₄GdN₆O₁₀ [M+H]⁺ 734.2359, found 734.2374.

- Complexation of ADIBO-PEG₄-DOTA with gadolinium (**ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)**)



Formula : C₄₃H₅₆GdN₇O₁₂
M : 1020.19 g.mol⁻¹

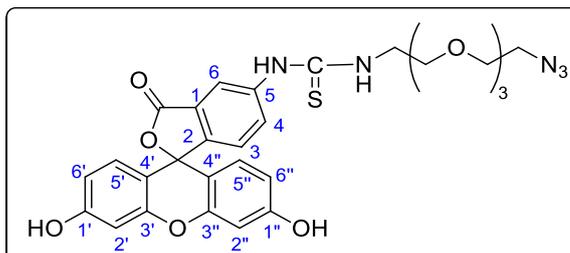
To a solution of **NH₂-PEG₄-DOTA(Gd)** (57 mg, 78 μmol, 1.1 eq.) dissolved in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (2 mL) were successively added *N,N'*-diisopropylethylamine (124 μL, 710 μmol, 10 eq.) and **ADIBO-NHS** (29 mg, 71 μmol, 1 eq.). The resulting mixture was stirred at room temperature for 16 h and then evaporated under reduced pressure. The title product (22 mg, 30 %) was obtained as a yellow oil after preparative reverse phase HPLC conducted on a Combiflash EZ prep system according to **method 1**.

HRMS (ESI+): m/z calculated for C₄₃H₅₇GdN₇O₁₂ [M+2H]²⁺ 511.1687, found 511,1703.

VII. Synthesis of the fluorescent FITC probe

- *Fluorescein azide (FITC-N₃)* [260]

Formula : C₂₉H₂₉N₅O₈S
M : 607.63 g.mol⁻¹



Fluorescein isothiocyanate (72 mg, 0.185 mmol) and **H₂NPEG₄N₃** (40 mg, 0.185 mmol) were dissolved in anhydrous *N,N*-dimethylformamide (1 mL) and anhydrous dichloromethane (1 mL). The resulting mixture was stirred for 1 h at room temperature under argon atmosphere in the dark. The title product (82 mg, 73 %) was obtained as an orange powder after silica column chromatography (dichloromethane/methanol, 90/10, v/v).

¹H NMR (200 MHz, MeOD): δ 3.31 (t, 2H, *J* = 5.0 Hz, CH₂-N₃), 3.60-3.74 (m, 12H, CH₂-O), 3.81 (se, 2H, CH₂-NH-C=S-NH), 6.56 (dd, 2H, *J* = 2.3, 8.7 Hz, H_{2',2''}), 6.66 (d, 2H, *J* = 2.3 Hz, H_{6',6''}), 6.68 (d, 2H, *J* = 2.3 Hz, H_{5',5''}), 7.16 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₃), 7.80 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₄), 8.15 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, H₆).

¹³C NMR (50 MHz, MeOD): δ 181.0 (1C, C=S), 169.9 (1C, O-C=O), 160.2 (2C, C_{1',1''}), 152.9 (3C, C_{3',3'',5}), 148.1 (1C, -C-O-C=O), 141.1 (1C, C₂), 130.4 (1C, C₄), 129.1 (2C, C_{5',5''}), 127.7 (1C, C₁), 124.4 (1C, C₃), 118.4 (1C, C₆), 112.4 (2C, C_{6',6''}), 110.2 (2C, C_{4',4''}), 102.3 (2C, C_{2',2''}), 70.1 (6C, CH₂-O), 50.4 (1C, CH₂-N₃), 44.2 (1C, CH₂-NH-C=S-NH).

IR ν (cm⁻¹): 2901 (C-H), 2098 (N₃), 1730 (C=O), 1107 (C-N).

HRMS (ESI+): *m/z* calculated for C₂₉H₂₉N₅O₈S [M+H]⁺ 608.1809, found 608.1797.

Melting point: 195°C ± 1°C.²⁵

²⁵ Melting point was not described in literature.

Biological assessments on antibodies and nanoparticles

General informations

I. Materials and reagents

Monoclonal antibodies (mAbs) were purified using Zeba desalting columns (40 kDa MW cut-off, 0.5 mL) (Pierce Zeba™ desalting columns, Thermo Scientific).

Reactivity of modified mAbs was assessed on SDS-PAGE acrylamide gels 4-15 % (Biorad, France).

SDS-PAGE acrylamide gels were coloured with Simplyblue™ SafeStain (ThermoFisher Scientific, France).

Fluorescent Tz and ADIBO probes were purchased from JenaBioscience, Germany, namely: N-(3-Aminopropyl)-4-(6-(pyrimidin-2-yl)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzamid (Tz-Cy3), absorbance/emission lengths 550/570 nm, molecular weight (MW) 949.12 g/mol, 3-(p-benzylamino)-1,2,4,5-tetrazine-5-Fluorescein (Tz-5-FAM), absorbance/emission lengths 492/517 nm, molecular weight (MW) 545.50 g/mol, dibenzylcyclooctyne-Cy5.5 (ADIBO-Cy5.5), absorbance/emission lengths 678/694 nm, molecular weight (MW) 1175.37 g/mol and dibenzylcyclooctyne-Alexa Fluor® 488 (ADIBO-AF488), absorbance/emission lengths 494/517 nm, molecular weight (MW) 792.79 g/mol.

Formalin used to fix cells for confocal imaging was purchased from Sigma Aldrich, France.

II. Cell line and antibody

Rituximab solutions (MabThera®) were purchased from Roche and Panitumumab solutions (Vectibix®) were from Carbosynth, France.

Raji, Ramos, GRANTA 519 lymphoma cell lines, expressing CD20, was provided by Pr C. Dumontet, (CRCL, Lyon, France) and SU-DHL-4, Z-138 were purchased from ATCC (Manassas, USA).

MDA-MB-468 negative triple breast cancer cell line, expressing EGFR, was purchased from ATCC (Manassas, USA).

Anti-Human Kappa PE-conjugate secondary antibody (MH10514, Invitrogen) was used for flow cytometry with the different lymphoma cell lines.

Goat anti-Human IgG (H+L) Cross-Adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 488 (A11013, Invitrogen) was used for flow cytometry and confocal imaging with mAb-N₃.

III. Instrumentation

Multiskan GO UV/Vis microplate spectrophotometer (Fisher Scientific, France) was used to measure final concentrations of mAb conjugates.

Chemidoc imager (Biorad, France) was employed for SDS-PAGE acrylamide gels.

Flow cytometry binding experiments on different lymphoma cells and between RTX-TCO and Tz were externally performed on the CICS platform (Clermont-Ferrand, France) using a flow cytometer (BD LSRII, BD Biosciences).

Flow cytometry binding assays between mAb-N₃ and ADIBO were acquired using a flow cytometer (BD Accuri™ C6 Plus, USA).

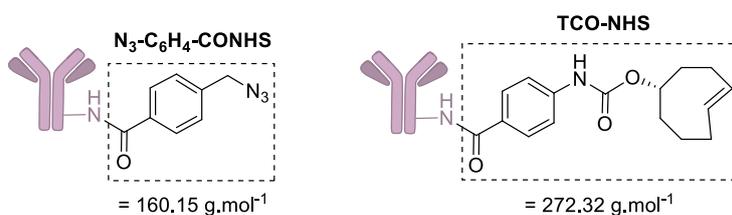
MALDI-TOF MS analyzes were externally assessed at INRA of Theix using a Voyager DE PRO mass spectrometer (AB Sciex LLC, Framingham, Massachusetts, USA)

Confocal imaging was externally performed on the CLIC platform of GReD (Clermont-Ferrand, France) using a confocal imager (Zeiss LSM 800 with AiryScan).

Cell colonies were imaging post-irradiation with an IncuCyte® Live-Cell Imaging System (Essen Bioscience, Hertfordshire, UK).

IV. mAb functionalizations and *in vitro* assessments

1. mAb modification



mAbs were functionalized by addition of different amounts NHS esters (N₃-C₆H₄-CONHS or TCO-NHS) in the reaction, namely 0, 5, 10, 15, 20 or 30 equivalents for 1 equivalent of mAb. An amount of 100 µg of mAb concentrated in Dulbecco's phosphate buffered (DPBS) was buffered with 1 M aqueous NaHCO₃ to adjust the pH to 9. Then, a solution of NHS esters (0, 5, 10, 15, 20 and 30 eq.) dissolved in DMSO was added to the mixture (5 % DMSO final concentration). Reactions were stirred for 30 min in the dark at 4 °C and then purified on Zeba desalting columns. mAbs conjugates were kept in the dark either at -20 °C or 4 °C. We determined a yield of mAb recovery taking into account the starting quantity of mAb and the final one after desalting columns.

2. Determination of the number of N₃ and TCO moieties per mAb

Assessments were made using MALDI-TOF MS analyzes. Sinapinic acid (Sigma, France) was diluted in acetonitrile/water (30/70, v/v) with 0.1 % TFA at 10 mg/mL to obtain the matrix solution. A set of three serial dilutions from 1 mg/mL of mAb in PBS was prepared by mixing those with the matrix solution (2/1, v/v). Acquisitions were performed in a positive linear mode and 600 shots were averaged for each spectrum. The average mAb molecular weight was obtained from the mass of the [M+H]⁺ peak for the dilution set. Calibration settings corresponded to a close external mode using IgG1 (AB Sciex, USA). The number of N₃ and TCO grafted per mAb was quantified using the molecular weight difference between the modified mAbs and the unmodified mAbs, net masses added depending on the modification (about 160 and 272 Dalton for N₃-C₆H₄-CONHS and TCO-NHS, respectively).

3. Assessment of the interaction between mAb-N₃ and fluorescent ADIBO or mAb-TCO and fluorescent Tz

3.1 Polyacrylamide gel electrophoresis

After grafting N₃ and TCO moieties on mAbs, reactivity of mAbs **RTX-N₃** and **PNT-N₃** was assessed on polyacrylamide gel electrophoresis with **ADIBO-Cy5.5** and **RTX-TCO** with Tz-5-FAM.

An amount of 4 µg of mAb was added to Laemli 4X and DPBS for a final volume of 20 µL and samples were loaded on 4-15% SDS-PAGE acrylamide gels. After migration, gels were incubated in a solution containing 0.02 mM of **ADIBO Cy5.5** (2h) or of **Tz-5-FAM** (5 min) diluted in water and then rinsed under gentle shaking 15-20 min in deionized water before being imaged with Chemidoc imager. Gels were finally coloured with Simplyblue™ SafeStain following the manufacturer's instructions and imaged with Chemidoc imager. Major band was quantified using ImageLab software, fluorescence intensity signal being normalized by the total amount of protein loaded.

3.2 Flow cytometry

a. Assessment of the interaction between RTX-N₃ and fluorescent ADIBO probe

2.0 x 10⁵ GRANTA 519 cells were incubated 20 min at 4 °C with 10 µg/mL of **RTX-N₃** then washed in DPBS (1 mL), centrifuged 5 min at 300 g and supernatants were removed to avoid unspecific ligation. Cells were finally incubated 2 h at 4 °C with 0.02 mM of **ADIBO-AF488** with respect to the number of N₃ or with 1 µg/mL goat Anti-Human IgG (H+L) antibody labeled with AlexaFluor 488. After washing with staining buffer (DPBS, 2% Fetal Bovine Serum) (2x1 mL) and centrifugation, cells were resuspended in staining buffer (100 µL) and samples were analysed using flow analyser.

b. Assessment of the interaction between RTX-TCO and fluorescent Tz probe

5.0×10^5 GRANTA 519 cells were incubated 20 min at 4 °C with 10 µg/mL of **RTX-TCO** then washed in DPBS (1 mL), centrifuged (5 min, 300 g, 4°C) and supernatants were removed to avoid unspecific ligation. Cells were finally incubated 20 min at 4 °C in dark with 0.02 mM of **Tz-5-FAM** with respect to the number of TCO or 1 µg/mL Anti-Human Kappa PE-conjugate antibody. After washing with DPBS (1 mL) and centrifugation (5 min, 300 g), cells were resuspended in DPBS (500 µL) and samples were analysed using flow analyser.

c. Assessment of the interaction between RTX-PEG₄-N₃ and fluorescent ADIBO probe

5.0×10^5 GRANTA 519 cells were incubated 20 min at 4 °C with 10 µg/mL of **RTX-TCO(15)** then washed in DPBS (1 mL), centrifuged (5 min, 300 g, 4 °C) and supernatants were removed to avoid unspecific ligation. Cells were incubated 20 min at 4 °C in dark with 0.02 mM of **Tz-PEG₄-N₃** with respect to the number of TCO. After washing with DPBS (1 mL) and centrifugation (5 min, 300 g), cells were finally incubated 2 h at 4 °C with 0.02 mM of ADIBO-AF488. After washing cells were resuspended in DPBS (500 µL) and samples were analysed using flow analyser.

d. Radiosensitization studies on GRANTA-519 cells using RTX-N₃ and ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)

GRANTA 519 cells were incubated 30 min at 37 °C with 1 µg/mL of **RTX-N₃(10)** then centrifuged (5 min, 300 g) and supernatants were removed. Cells were finally incubated 2h at 37 °C in with 50 µM of **ADIBO-PEG₄-DOTA(Gd)**. After centrifugation, 15 000 cells per well (6 well plate) were seeded in MethoCult™ H4435 enriched (StemCell, France), and then irradiated. Radiation doses were: 0, 2 and 4 Gy. Cell colonies were imaging on IncuCyte® Live-Cell Imaging System and counted 9 days post-irradiation.

V. Preliminary *In vitro* assessments of nanoparticles

1. Confocal imaging on GRANTA 519 with RTX-N₃

1.0×10^6 cells were first incubated 30 min with DPBS-BSA 5% (200 µL) at room temperature and then 30 min at 4 °C with 10 µg/mL of **RTX-N₃(10)** or with **RTX-PEG₄-N₃** (10 µg/mL of **RTX-TCO(15)** followed by incubation with 20 µM of **Tz-PEG₄-N₃**). After centrifugation (5 min, 300 g), cells were incubated 2 h at 4 °C with 1 µg/mL goat anti-Human IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody labeled with AlexaFluor 488, 5 µM of **ADIBO-AF488** or with 10^8 NP.mL⁻¹ of **NP-ADIBO/NH₂**, **NP-ADIBO/DOTA(Gd)**. After washing with DPBS (4x500 µL) and centrifugation, cells were fixed 10 min with 10% formalin (500 µL). Finally, after washing with DPBS (2x500 µL) and centrifugation (5 min, 300 g), cell pellets were resuspended in vectashield-DAPI mounting medium (20 µL) and then observed using a confocal imager Zeiss LSM 800. The same settings were applied for acquisitions of all images. We used three lasers: 405 nm for DAPI imaging, 488 nm for FITC and 560 nm for Rhodamine. The same laser intensity was applied for all images.

Références bibliographiques

- [1] A.L. Porter, J. Youtie, How interdisciplinary is nanotechnology?, *J. Nanoparticle Res.* 11 (2009) 1023–1041. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9607-0>.
- [2] Dr. Niranjani Chaurasia, Nanotechnology and Nanomaterials in Everyday Life, *Int. J. Sci. Res. IJSR.* 6 (2017) 1560–1562.
- [3] M.E. Davis, Z. (Georgia) Chen, D.M. Shin, Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 771–782. <https://doi.org/10.1038/nrd2614>.
- [4] B. Pelaz, C. Alexiou, R.A. Alvarez-Puebla, F. Alves, A.M. Andrews, S. Ashraf, L.P. Balogh, L. Ballerini, A. Bestetti, C. Brendel, S. Bosi, M. Carril, W.C.W. Chan, C. Chen, X. Chen, X. Chen, Z. Cheng, D. Cui, J. Du, C. Dullin, A. Escudero, N. Feliu, M. Gao, M. George, Y. Gogotsi, A. Grünweller, Z. Gu, N.J. Halas, N. Hampp, R.K. Hartmann, M.C. Hersam, P. Hunziker, J. Jian, X. Jiang, P. Jungebluth, P. Kadhiresan, K. Kataoka, A. Khademhosseini, J. Kopeček, N.A. Kotov, H.F. Krug, D.S. Lee, C.-M. Lehr, K.W. Leong, X.-J. Liang, M. Ling Lim, L.M. Liz-Marzán, X. Ma, P. Macchiaroni, H. Meng, H. Möhwald, P. Mulvaney, A.E. Nel, S. Nie, P. Nordlander, T. Okano, J. Oliveira, T.H. Park, R.M. Penner, M. Prato, V. Puntès, V.M. Rotello, A. Samarakoon, R.E. Schaak, Y. Shen, S. Sjöqvist, A.G. Skirtach, M.G. Soliman, M.M. Stevens, H.-W. Sung, B.Z. Tang, R. Tietze, B.N. Udugama, J.S. VanEpps, T. Weil, P.S. Weiss, I. Willner, Y. Wu, L. Yang, Z. Yue, Q. Zhang, Q. Zhang, X.-E. Zhang, Y. Zhao, X. Zhou, W.J. Parak, Diverse Applications of Nanomedicine, *ACS Nano.* 11 (2017) 2313–2381. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06040>.
- [5] Y. (Chezy) Barenholz, Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *J. Controlled Release.* 160 (2012) 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
- [6] E. Miele, G.P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao, S. Tomao, Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer, *Int. J. Nanomedicine.* 4 (2009) 99–105.
- [7] R.A. Petros, J.M. DeSimone, Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 615–627. <https://doi.org/10.1038/nrd2591>.
- [8] R. Bardhan, S. Lal, A. Joshi, N.J. Halas, Theranostic Nanoshells: From Probe Design to Imaging and Treatment of Cancer, *Acc. Chem. Res.* 44 (2011) 936–946. <https://doi.org/10.1021/ar200023x>.
- [9] F. Lux, A. Detappe, S. Dufort, L. Sancey, C. Louis, S. Carme, O. Tillement, Nanoparticules ultrafines en radiothérapie : le cas des AGuIX, *Cancer/Radiothérapie.* 19 (2015) 508–514. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2015.05.019>.
- [10] L. Sancey, F. Lux, S. Kotb, S. Roux, S. Dufort, A. Bianchi, Y. Crémillieux, P. Fries, J.-L. Coll, C. Rodriguez-Lafrasse, M. Janier, M. Dutreix, M. Barberi-Heyob, F. Boschetti, F. Denat, C. Louis, E. Porcel, S. Lacombe, G. Le Duc, E. Deutsch, J.-L. Perfettini, A. Detappe, C. Verry, R. Berbeco, K.T. Butterworth, S.J. McMahon, K.M. Prise, P. Perriat, O. Tillement, The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy, *Br. J. Radiol.* 87 (2014) 20140134. <https://doi.org/10.1259/bjr.20140134>.
- [11] R. Baskar, K.A. Lee, R. Yeo, K.-W. Yeoh, Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions, *Int. J. Med. Sci.* 9 (2012) 193–199. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>.
- [12] S. Wilhelm, A.J. Tavares, Q. Dai, S. Ohta, J. Audet, H.F. Dvorak, W.C.W. Chan, Analysis of nanoparticle delivery to tumours, *Nat. Rev. Mater.* 1 (2016) 16014. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>.
- [13] Y. Dai, C. Xu, X. Sun, X. Chen, Nanoparticle design strategies for enhanced anticancer therapy by exploiting the tumour microenvironment, *Chem Soc Rev.* (2017). <https://doi.org/10.1039/C6CS00592F>.

- [14] A.G. Arranja, V. Pathak, T. Lammers, Y. Shi, Tumor-targeted nanomedicines for cancer theranostics, *Pharmacol. Res.* 115 (2017) 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.014>.
- [15] T. Lammers, F. Kiessling, W.E. Hennink, G. Storm, Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress, *J. Controlled Release.* 161 (2012) 175–187. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.063>.
- [16] D. Rosenblum, N. Joshi, W. Tao, J.M. Karp, D. Peer, Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics, *Nat. Commun.* 9 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03705-y>.
- [17] Q. Sun, T. Ojha, F. Kiessling, T. Lammers, Y. Shi, Enhancing Tumor Penetration of Nanomedicines, *Biomacromolecules.* 18 (2017) 1449–1459. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00068>.
- [18] S.K. Golombek, J.-N. May, B. Theek, L. Appold, N. Drude, F. Kiessling, T. Lammers, Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.007>.
- [19] N.K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, Bioorthogonal Turn-On Probes for Imaging Small Molecules inside Living Cells, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 2869–2872. <https://doi.org/10.1002/anie.200906120>.
- [20] M. Malvezzi, G. Carioli, P. Bertuccio, T. Rosso, P. Boffetta, F. Levi, C. La Vecchia, E. Negri, European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias, *Ann. Oncol.* 27 (2016) 725–731. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw022>.
- [21] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA. Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [22] R.J. Gibson, D.M.K. Keefe, Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies, *Support. Care Cancer.* 14 (2006) 890–900. <https://doi.org/10.1007/s00520-006-0040-y>.
- [23] V.H.F. Lee, S.C.Y. Ng, T.W. Leung, G.K.H. Au, D.L.W. Kwong, Dosimetric Predictors of Radiation-induced Acute Nausea and Vomiting in IMRT for Nasopharyngeal Cancer, *Int. J. Radiat. Oncol.* 84 (2012) 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.10.010>.
- [24] M. Venkatesan, B. Jolad, Nanorobots in cancer treatment, in: INTERACT-2010, IEEE, Chennai, India, 2010: pp. 258–264. <https://doi.org/10.1109/INTERACT.2010.5706154>.
- [25] A. Erdemir, C. Donnet, Tribology of diamond-like carbon films: recent progress and future prospects, *J. Phys. Appl. Phys.* 39 (2006) R311–R327. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/39/18/R01>.
- [26] K.K.Y. Wong, X.L. Liu, Nanomedicine: a primer for surgeons, *Pediatr. Surg. Int.* 28 (2012) 943–951. <https://doi.org/10.1007/s00383-012-3162-y>.
- [27] S. Mali, Nanotechnology for Surgeons, *Indian J. Surg.* 75 (2013) 485–492. <https://doi.org/10.1007/s12262-012-0726-y>.
- [28] V. Alt, T. Bechert, P. Steinrücke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, E. Domann, R. Schnettler, An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement, *Biomaterials.* 25 (2004) 4383–4391. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.078>.
- [29] A. Hendi, Silver nanoparticles mediate differential responses in some of liver and kidney functions during skin wound healing, *J. King Saud Univ. - Sci.* 23 (2011) 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2010.06.006>.
- [30] A. Garcia Garcia, A. Hébraud, J.-L. Duval, C.R. Wittmer, L. Gaut, D. Duprez, C. Egles, F. Bedoui, G. Schlatter, C. Legallais, Poly(ϵ -caprolactone)/Hydroxyapatite 3D Honeycomb Scaffolds for a Cellular Microenvironment Adapted to Maxillofacial Bone Reconstruction, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 3317–3326. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.8b00521>.
- [31] I.H.L. Pereira, E. Ayres, L. Averous, G. Schlatter, A. Hebraud, A.C.C. de Paula, P.H.L. Viana, A.M. Goes, R.L. Oréfice, Differentiation of human adipose-derived stem cells seeded on mineralized electrospun co-axial poly(ϵ -caprolactone) (PCL)/gelatin nanofibers, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 25 (2014) 1137–1148. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-5133-9>.

- [32] N. Bhardwaj, S.C. Kundu, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 325–347. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>.
- [33] S. Nedjari, G. Schlatter, A. Hébraud, Thick electrospun honeycomb scaffolds with controlled pore size, *Mater. Lett.* 142 (2015) 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.11.118>.
- [34] S. Nedjari, A. Hébraud, S. Eap, S. Siegwald, C. Mélart, N. Benkirane-Jessel, G. Schlatter, Electrostatic template-assisted deposition of microparticles on electrospun nanofibers: towards microstructured functional biochips for screening applications, *RSC Adv.* 5 (2015) 83600–83607. <https://doi.org/10.1039/C5RA15931H>.
- [35] P. Mohacsi, P. Leprince, The CARMAT total artificial heart, *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 46 (2014) 933–934. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezu333>.
- [36] Z. Jankiewicz, J.K. Jabczyński, R.S. Romaniuk, Development of laser technology in Poland: 2016, in: R.S. Romaniuk, K. Kopczynski, J.K. Jabczyński, Z. Mierczyk (Eds.), Jastarnia, Poland, 2016: p. 1015902. <https://doi.org/10.1117/12.2234061>.
- [37] S.P. Zhong, Y.Z. Zhang, C.T. Lim, Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2 (2010) 510–525. <https://doi.org/10.1002/wnan.100>.
- [38] U.A. Gunasekera, Q.A. Pankhurst, M. Douek, Imaging applications of nanotechnology in cancer, *Target. Oncol.* 4 (2009) 169–181. <https://doi.org/10.1007/s11523-009-0118-9>.
- [39] A.L. Vahrmeijer, M. Hutteman, J.R. van der Vorst, C.J.H. van de Velde, J.V. Frangioni, Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10 (2013) 507–518. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.123>.
- [40] Q.T. Nguyen, R.Y. Tsien, Fluorescence-guided surgery with live molecular navigation — a new cutting edge, *Nat. Rev. Cancer.* 13 (2013) 653–662. <https://doi.org/10.1038/nrc3566>.
- [41] B.E. Schaafsma, J.S.D. Mieog, M. Hutteman, J.R. van der Vorst, P.J.K. Kuppen, C.W.G.M. Löwik, J.V. Frangioni, C.J.H. van de Velde, A.L. Vahrmeijer, The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery, *J. Surg. Oncol.* 104 (2011) 323–332. <https://doi.org/10.1002/jso.21943>.
- [42] F. Acerbi, C. Cavallo, M. Broggi, R. Cordella, E. Anghileri, M. Eoli, M. Schiariti, G. Broggi, P. Ferroli, Fluorescein-guided surgery for malignant gliomas: a review, *Neurosurg. Rev.* 37 (2014) 547–557. <https://doi.org/10.1007/s10143-014-0546-6>.
- [43] T.K. Hill, A.M. Mohs, Image-guided tumor surgery: will there be a role for fluorescent nanoparticles?: Image-guided tumor surgery, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 8 (2016) 498–511. <https://doi.org/10.1002/wnan.1381>.
- [44] N.E. Wojtynek, M.B. Holmes, M.T. Olson, F. Baher, E. Silva, A.M. Mohs, Efficacy of indocyanine green-loaded hyaluronic acid nanoparticles for the surgical resection of orthotopic breast tumors, in: B.W. Pogue, S. Gioux (Eds.), *Mol.-Guid. Surg. Mol. Devices Appl.* V, SPIE, San Francisco, United States, 2019: p. 50. <https://doi.org/10.1117/12.2509991>.
- [45] T.K. Hill, A. Abdulahad, S.S. Kelkar, F.C. Marini, T.E. Long, J.M. Provenzale, A.M. Mohs, Indocyanine Green-Loaded Nanoparticles for Image-Guided Tumor Surgery, *Bioconjug. Chem.* 26 (2015) 294–303. <https://doi.org/10.1021/bc5005679>.
- [46] W. Cai, M. Chen, J. Fan, H. Jin, D. Yu, S. Qiang, C. Peng, J. Yu, Fluorescein sodium loaded by polyethyleneimine for fundus fluorescein angiography improves adhesion, *Nanomed.* (2019) nnm-2019-0008. <https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0008>.
- [47] M.F. Kircher, U. Mahmood, R.S. King, R. Weissleder, L. Josephson, A multimodal nanoparticle for preoperative magnetic resonance imaging and intraoperative optical brain tumor delineation, *Cancer Res.* 63 (2003) 8122–8125.
- [48] G. Nie, H.J. Hah, G. Kim, Y.-E.K. Lee, M. Qin, T.S. Ratani, P. Fotiadis, A. Miller, A. Kochi, D. Gao, T. Chen, D.A. Orringer, O. Sagher, M.A. Philbert, R. Kopelman, Hydrogel Nanoparticles with Covalently Linked Coomassie Blue for Brain Tumor Delineation Visible to the Surgeon, *Small.* 8 (2012) 884–891. <https://doi.org/10.1002/smll.201101607>.
- [49] J. Song, N. Zhang, L. Zhang, H. Yi, Y. Liu, Y. Li, X. Li, M. Wu, L. Hao, Z. Yang, Z. Wang, IR780-loaded folate-targeted nanoparticles for near-infrared fluorescence image-guided surgery and

- photothermal therapy in ovarian cancer, *Int. J. Nanomedicine*. Volume 14 (2019) 2757–2772. <https://doi.org/10.2147/IJN.S203108>.
- [50] M.T. Olson, Q.P. Ly, A.M. Mohs, Fluorescence Guidance in Surgical Oncology: Challenges, Opportunities, and Translation, *Mol. Imaging Biol.* 21 (2019) 200–218. <https://doi.org/10.1007/s11307-018-1239-2>.
- [51] E.K. Rowinsky, MD, THE DEVELOPMENT AND CLINICAL UTILITY OF THE TAXANE CLASS OF ANTIMICROTUBULE CHEMOTHERAPY AGENTS, *Annu. Rev. Med.* 48 (1997) 353–374. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.48.1.353>.
- [52] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity, *Pharmacol. Rev.* 56 (2004) 185–229. <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6>.
- [53] L.H. Hurley, DNA and its associated processes as targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer.* 2 (2002) 188–200. <https://doi.org/10.1038/nrc749>.
- [54] T. Boulikas, M. Vougiouka, Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review), *Oncol. Rep.* 10 (2003) 1663–1682.
- [55] M. Markman, Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of cancers of the breast and ovary, *Expert Opin. Pharmacother.* 7 (2006) 1469–1474. <https://doi.org/10.1517/14656566.7.11.1469>.
- [56] E. Rivera, Current Status of Liposomal Anthracycline Therapy in Metastatic Breast Cancer, *Clin. Breast Cancer.* 4 (2003) S76–S83. <https://doi.org/10.3816/CBC.2003.s.019>.
- [57] E. Rosenthal, I. Poizot-Martin, T. Saint-Marc, J.-P. Spano, P. Cacoub, DNX Study Group, Phase IV study of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in AIDS-related Kaposi sarcoma, *Am. J. Clin. Oncol.* 25 (2002) 57–59.
- [58] E. Gentile, F. Cilurzo, L. Di Marzio, M. Carafa, C. Anna Ventura, J. Wolfram, D. Paolino, C. Celia, Liposomal chemotherapeutics, *Future Oncol.* 9 (2013) 1849–1859. <https://doi.org/10.2217/fon.13.146>.
- [59] J.E. Frampton, Mifamurtide: A Review of its Use in the Treatment of Osteosarcoma, *Pediatr. Drugs.* 12 (2010) 141–153. <https://doi.org/10.2165/11204910-000000000-00000>.
- [60] J.A. Silverman, S.R. Deitcher, Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 71 (2013) 555–564. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-2042-4>.
- [61] K. Kinsley, W. Pritchett, Liposomal Irinotecan: Nursing Considerations in an Outpatient Cancer Center, *Clin. J. Oncol. Nurs.* 22 (2018) 221–224. <https://doi.org/10.1188/18.CJON.221-224>.
- [62] M.L. Crain, Daunorubicin & Cytarabine Liposome (Vyxeos™);, *Oncol. Times.* 40 (2018) 30. <https://doi.org/10.1097/01.COT.0000534146.30839.ec>.
- [63] J. Wolfram, M. Ferrari, Clinical cancer nanomedicine, *Nano Today.* 25 (2019) 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.02.005>.
- [64] M. Roy Chowdhury, C. Schumann, D. Bhakta-Guha, G. Guha, Cancer nanotheranostics: Strategies, promises and impediments, *Biomed. Pharmacother.* 84 (2016) 291–304. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.035>.
- [65] K.L. Aillon, Y. Xie, N. El-Gendy, C.J. Berkland, M.L. Forrest, Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.010>.
- [66] P. Sapra, T.M. Allen, Ligand-targeted liposomal anticancer drugs, *Prog. Lipid Res.* 42 (2003) 439–462. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00032-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00032-8).
- [67] N. Sanvicens, M.P. Marco, Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine, *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.005>.
- [68] A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, J. Huwylar, Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications, *J. Controlled Release.* 200 (2015) 138–157. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.030>.

- [69] J. Shi, P.W. Kantoff, R. Wooster, O.C. Farokhzad, Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities, *Nat. Rev. Cancer.* 17 (2017) 20–37. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>.
- [70] G.J. Weiss, J. Chao, J.D. Neidhart, R.K. Ramanathan, D. Bassett, J.A. Neidhart, C.H.J. Choi, W. Chow, V. Chung, S.J. Forman, E. Garmey, J. Hwang, D.L. Kalinoski, M. Koczywas, J. Longmate, R.J. Melton, R. Morgan, J. Oliver, J.J. Peterkin, J.L. Ryan, T. Schlupe, T.W. Synold, P. Twardowski, M.E. Davis, Y. Yen, First-in-human phase 1/2a trial of CRLX101, a cyclodextrin-containing polymer-camptothecin nanopharmaceutical in patients with advanced solid tumor malignancies, *Invest. New Drugs.* 31 (2013) 986–1000. <https://doi.org/10.1007/s10637-012-9921-8>.
- [71] H. Maeda, T. Sawa, T. Konno, Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS, *J. Controlled Release.* 74 (2001) 47–61. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00309-1](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00309-1).
- [72] T. Okusaka, S. Okada, H. Ishii, M. Ikeda, H. Nakasuka, H. Nagahama, R. Iwata, H. Furukawa, K. Takayasu, Y. Nakanishi, M. Sakamoto, S. Hirohashi, M. Yoshimori, Transarterial Chemotherapy with Zinostatin Stimulamer for Hepatocellular Carcinoma, *Oncology.* 55 (1998) 276–283. <https://doi.org/10.1159/000011863>.
- [73] P.A. Vasey, S.B. Kaye, R. Morrison, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, A.H. Thomson, L.S. Murray, T.E. Hilditch, T. Murray, S. Burtles, D. Fraier, E. Frigerio, J. Cassidy, Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. Cancer Research Campaign Phase I/II Committee, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5 (1999) 83–94.
- [74] Seymour, Phase II studies of polymer-doxorubicin (PK1, FCE28068) in the treatment of breast, lung and colorectal cancer, *Int. J. Oncol.* 34 (2009). https://doi.org/10.3892/ijo_00000293.
- [75] L.W. Seymour, D.R. Ferry, D. Anderson, S. Hesslewood, P.J. Julyan, R. Poyner, J. Doran, A.M. Young, S. Burtles, D.J. Kerr, Hepatic Drug Targeting: Phase I Evaluation of Polymer-Bound Doxorubicin, *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 1668–1676. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.6.1668>.
- [76] R. Plummer, R.H. Wilson, H. Calvert, A.V. Boddy, M. Griffin, J. Sludden, M.J. Tilby, M. Eatock, D.G. Pearson, C.J. Ottley, Y. Matsumura, K. Kataoka, T. Nishiya, A Phase I clinical study of cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumours, *Br. J. Cancer.* 104 (2011) 593–598. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.6>.
- [77] D.D. Von Hoff, M.M. Mita, R.K. Ramanathan, G.J. Weiss, A.C. Mita, P.M. LoRusso, H.A. Burris, L.L. Hart, S.C. Low, D.M. Parsons, S.E. Zale, J.M. Summa, H. Youssoufian, J.C. Sachdev, Phase I Study of PSMA-Targeted Docetaxel-Containing Nanoparticle BIND-014 in Patients with Advanced Solid Tumors, *Clin. Cancer Res.* 22 (2016) 3157–3163. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2548>.
- [78] J.W. Valle, A. Armstrong, C. Newman, V. Alakhov, G. Pietrzynski, J. Brewer, S. Campbell, P. Corrie, E.K. Rowinsky, M. Ranson, A phase 2 study of SP1049C, doxorubicin in P-glycoprotein-targeting pluronics, in patients with advanced adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction, *Invest. New Drugs.* 29 (2011) 1029–1037. <https://doi.org/10.1007/s10637-010-9399-1>.
- [79] R.M. Kannan, E. Nance, S. Kannan, D.A. Tomalia, Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: from design principles to clinical applications, *J. Intern. Med.* 276 (2014) 579–617. <https://doi.org/10.1111/joim.12280>.
- [80] A.M. Scott, J.P. Allison, J.D. Wolchok, Monoclonal antibodies in cancer therapy, *Cancer Immun.* 12 (2012) 14.
- [81] M. Harris, Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer, *Lancet Oncol.* 5 (2004) 292–302. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01467-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01467-6).
- [82] S.J. Goldsmith, Radioimmunotherapy of Lymphoma: Bexxar and Zevalin, *Semin. Nucl. Med.* 40 (2010) 122–135. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2009.11.002>.

- [83] V. Prasad, The Withdrawal of Drugs for Commercial Reasons: The Incomplete Story of Tositumomab, *JAMA Intern. Med.* 174 (2014) 1887. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2014.5756>.
- [84] D.J. Hnatowich, F. Virzi, M. Rusckowski, Investigations of avidin and biotin for imaging applications, *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 28 (1987) 1294–1302.
- [85] D.A. Goodwin, C.F. Meares, M.J. McCall, M. McTigue, W. Chaovapong, Pre-targeted immunoscintigraphy of murine tumors with indium-111-labeled bifunctional haptens, *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 29 (1988) 226–234.
- [86] E.J.L. Stéen, P.E. Edem, K. Nørregaard, J.T. Jørgensen, V. Shalgunov, A. Kjaer, M.M. Herth, Pretargeting in nuclear imaging and radionuclide therapy: Improving efficacy of theranostics and nanomedicines, *Biomaterials.* 179 (2018) 209–245. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.021>.
- [87] R.A. Larson, E.L. Sievers, E.A. Stadtmauer, B. Löwenberg, E.H. Estey, H. Dombret, M. Theobald, D. Voliotis, J.M. Bennett, M. Richie, L.H. Leopold, M.S. Berger, M.L. Sherman, M.R. Loken, J.J.M. van Dongen, I.D. Bernstein, F.R. Appelbaum, Mylotarg Study Group, Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first recurrence, *Cancer.* 104 (2005) 1442–1452. <https://doi.org/10.1002/cncr.21326>.
- [88] S. Ornes, Antibody–drug conjugates:, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) 13695–13695. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314120110>.
- [89] M. Guerin, R. Sabatier, A. Gonçalves, Autorisation de mise sur le marché du trastuzumab emtansine (Kadcyla®) dans les cancers du sein métastatiques HER2-positifs, *Bull. Cancer (Paris).* 102 (2015) 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2015.02.007>.
- [90] A. Bates, C.A. Power, David vs. Goliath: The Structure, Function, and Clinical Prospects of Antibody Fragments, *Antibodies.* 8 (2019) 28. <https://doi.org/10.3390/antib8020028>.
- [91] J.L. Merlin, Les inhibiteurs de tyrosine kinase en oncologie – Tyrosine kinase inhibitors in oncology, (n.d.) 14.
- [92] A. Bozec, Response of endothelial cells to a dual tyrosine kinase receptor inhibition combined with irradiation, *Mol. Cancer Ther.* 4 (2005) 1962–1971. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0108>.
- [93] J.-L. Fischel, P. Formento, G. Milano, Epidermal growth factor receptor double targeting by a tyrosine kinase inhibitor (Iressa) and a monoclonal antibody (Cetuximab). Impact on cell growth and molecular factors, *Br. J. Cancer.* 92 (2005) 1063–1068. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602428>.
- [94] R.S. Herbst, D.H. Johnson, E. Mininberg, D.P. Carbone, T. Henderson, E.S. Kim, G. Blumenschein, J.J. Lee, D.D. Liu, M.T. Truong, W.K. Hong, H. Tran, A. Tsao, D. Xie, D.A. Ramies, R. Mass, S. Seshagiri, D.A. Eberhard, S.K. Kelley, A. Sandler, Phase I/II Trial Evaluating the Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Monoclonal Antibody Bevacizumab in Combination With the HER-1/Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Erlotinib for Patients With Recurrent Non–Small-Cell Lung Cancer, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 2544–2555. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.477>.
- [95] Q. Cheng, X. Shi, M. Han, G. Smbatyan, H.-J. Lenz, Y. Zhang, Reprogramming Exosomes as Nanoscale Controllers of Cellular Immunity, *J. Am. Chem. Soc.* 140 (2018) 16413–16417. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b10047>.
- [96] L. Tang, R. Tong, V.J. Coyle, Q. Yin, H. Pondenis, L.B. Borst, J. Cheng, T.M. Fan, Targeting Tumor Vasculature with Aptamer-Functionalized Doxorubicin–Poly(lactide) Nanoconjugates for Enhanced Cancer Therapy, *ACS Nano.* 9 (2015) 5072–5081. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b00166>.
- [97] Z. Fan, Y. Chang, C. Cui, L. Sun, D.H. Wang, Z. Pan, M. Zhang, Near infrared fluorescent peptide nanoparticles for enhancing esophageal cancer therapeutic efficacy, *Nat. Commun.* 9 (2018) 2605. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04763-y>.

- [98] S. Biffi, R. Voltan, B. Bortot, G. Zauli, P. Secchiero, Actively targeted nanocarriers for drug delivery to cancer cells, *Expert Opin. Drug Deliv.* 16 (2019) 481–496. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1604679>.
- [99] A. Kefayat, F. Ghahremani, H. Motaghi, M.A. Mehrgardi, Investigation of different targeting decorations effect on the radiosensitizing efficacy of albumin-stabilized gold nanoparticles for breast cancer radiation therapy, *Eur. J. Pharm. Sci.* 130 (2019) 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.01.037>.
- [100] N. Mauro, A. Li Volsi, C. Scialabba, M. Licciardi, G. Cavallaro, G. Giammona, Photothermal Ablation of Cancer Cells Using Folate-Coated Gold/ Graphene Oxide Composite, *Curr. Drug Deliv.* 14 (2017) 433–443. <https://doi.org/10.2174/1567201813666160520113804>.
- [101] A. Ito, M. Shinkai, H. Honda, T. Kobayashi, Medical application of functionalized magnetic nanoparticles, *J. Biosci. Bioeng.* 100 (2005) 1–11. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.1>.
- [102] J. Yang, J. Lee, J. Kang, S.J. Oh, H.-J. Ko, J.-H. Son, K. Lee, J.-S. Suh, Y.-M. Huh, S. Haam, Smart Drug-Loaded Polymer Gold Nanoshells for Systemic and Localized Therapy of Human Epithelial Cancer, *Adv. Mater.* 21 (2009) 4339–4342. <https://doi.org/10.1002/adma.200900334>.
- [103] A. Gharatape, R. Salehi, Recent progress in theranostic applications of hybrid gold nanoparticles, *Eur. J. Med. Chem.* 138 (2017) 221–233. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.034>.
- [104] J.D. Mangadlao, X. Wang, C. McCleese, M. Escamilla, G. Ramamurthy, Z. Wang, M. Govande, J.P. Basilion, C. Burda, Prostate-Specific Membrane Antigen Targeted Gold Nanoparticles for Theranostics of Prostate Cancer, *ACS Nano.* 12 (2018) 3714–3725. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b00940>.
- [105] M. Mendt, S. Kamekar, H. Sugimoto, K.M. McAndrews, C.-C. Wu, M. Gagea, S. Yang, E.V.R. Blanco, Q. Peng, X. Ma, J.R. Marszalek, A. Maitra, C. Yee, K. Rezvani, E. Shpall, V.S. LeBleu, R. Kalluri, Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer, *JCI Insight.* 3 (2018) e99263. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99263>.
- [106] C. MOIGNIER, Dosimétrie des faisceaux de photons de petites dimensions utilisés en radiothérapie stéréotaxique, Paris-Sud, 2014.
- [107] Centre régional de lutte contre le cancer Paul Strauss, La radiothérapie externe, (n.d.). http://www.centre-paul-strauss.fr/sites/default/files/documents/documentation/livret_radiotherapie_externe_2011_bat_proteger.pdf (accessed October 24, 2016).
- [108] e-cancer, Qu'est ce que la radiothérapie ?, (n.d.). <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Radiotherapie/Qu-est-ce-que-la-radiotherapie> (accessed September 12, 2016).
- [109] Institut National du Cancer, (n.d.). <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Radiotherapie/Securite-des-pratiques> (consulté le 28 Août 2019).
- [110] Gercor, Principes et méthodes de la radiothérapie, (n.d.). <http://www.canceronet.com/public/traitements/traitemement04.asp> (accessed October 24, 2016).
- [111] J. Laverdière, JoséL. Gomez, L. Cusan, E. Raul Suburu, P. Diamond, M. Lemay, B. Candas, A. Fortin, F. Labrie, Beneficial effect of combination hormonal therapy administered prior and following external beam radiation therapy in localized prostate cancer, *Int. J. Radiat. Oncol.* 37 (1997) 247–252. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(96\)00513-5](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(96)00513-5).
- [112] Institut National du Cancer, Cancer du sein, (n.d.). <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Radiotherapie> (accessed October 24, 2016).
- [113] G.E. Hanks, A.L. Hanlon, W.H. Pinover, E.M. Horwitz, T.E. Schultheiss, Survival advantage for prostate cancer patients treated with high-dose three-dimensional conformal radiotherapy, *Cancer J. Sci. Am.* 5 (1999) 152–158.
- [114] A. Fourquet, Radiothérapie des cancers, (n.d.). http://www.institut-curie.org/sites/default/files/fourquet_radiotherapie_ic.pdf (consulté le 24 Octobre 2016).

- [115] Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, Les bases de la radioactivité, (n.d.). http://www.irsn.fr/FR/connaissances/Nucleaire_et_societe/education-radioprotection/bases_radioactivite/Pages/8-rayonnement-ionisant.aspx#.WA4Mj-WLTct (accessed October 24, 2016).
- [116] Institut National du Cancer, Radiothérapie, (n.d.). <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-poumon/Radiotherapie/En-pratique> (accessed December 15, 2016).
- [117] G.E. Laramore, Role of particle radiotherapy in the management of head and neck cancer:, *Curr. Opin. Oncol.* 21 (2009) 224–231. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e328329b716>.
- [118] P.E. Huber, J. Debus, D. Latz, D. Zierhut, M. Bischof, M. Wannemacher, R. Engenhart-Cabillic, Radiotherapy for advanced adenoid cystic carcinoma: neutrons, photons or mixed beam?, *Radiother. Oncol.* 59 (2001) 161–167. [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(00\)00273-5](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(00)00273-5).
- [119] R. Parker, H. Berry, A. Gerdes, M. Soronen, C. Shaw, Fast neutron beam radiotherapy of glioblastoma multiforme, *Am. J. Roentgenol.* 127 (1976) 331–335. <https://doi.org/10.2214/ajr.127.2.331>.
- [120] R.R. Wilson, Radiological Use of Fast Protons, *Radiology.* 47 (1946) 487–491. <https://doi.org/10.1148/47.5.487>.
- [121] M. Durante, R. Orecchia, J.S. Loeffler, Charged-particle therapy in cancer: clinical uses and future perspectives, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14 (2017) 483–495. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.30>.
- [122] D. Schulz-Ertner, H. Tsujii, Particle Radiation Therapy Using Proton and Heavier Ion Beams, *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 953–964. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.7816>.
- [123] Quantum Diaries, (n.d.). <https://www.quantumdiaries.org/2012/02/page/2/> (accessed September 8, 2019).
- [124] J. Thariat, J.L. Habrand, P. Lesueur, A. Chaikh, E. Kammerer, D. Lecomte, A. Batalla, J. Balosso, T. Tessonier, Apports de la protonthérapie à la radiothérapie d’aujourd’hui, pourquoi, comment ?, *Bull. Cancer (Paris).* 105 (2018) 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2017.12.004>.
- [125] T. Terasawa, Systematic Review: Charged-Particle Radiation Therapy for Cancer, *Ann. Intern. Med.* 151 (2009) 556. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-151-8-200910200-00145>.
- [126] C.A. Tobias, J.T. Lyman, A. Chatterjee, J. Howard, H.D. Maccabee, M.R. Raju, A.R. Smith, J.M. Sperinde, G.P. Welch, Radiological Physics Characteristics of the Extracted Heavy Ion Beams of the Bevatron, *Science.* 174 (1971) 1131–1134. <https://doi.org/10.1126/science.174.4014.1131>.
- [127] M. Durante, J.S. Loeffler, Charged particles in radiation oncology, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7 (2010) 37–43. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.183>.
- [128] A.I. Kassis, Radiotargeting agents for cancer therapy, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2 (2005) 981–991. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.6.981>.
- [129] W.A. Volkert, W.F. Goeckeler, G.J. Ehrhardt, A.R. Ketrang, Therapeutic radionuclides: production and decay property considerations, *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 32 (1991) 174–185.
- [130] P. Treuil, I. Quelven, Radiothérapie métabolique en traitement antalgique des métastases osseuses, *Actual. Pharm. Hosp.* 4 (2008) 33–38. [https://doi.org/10.1016/S1769-7344\(08\)70042-8](https://doi.org/10.1016/S1769-7344(08)70042-8).
- [131] F. Hutchinson, Chemical Changes Induced in DNA by Ionizing Radiation, in: *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, Elsevier, 1985: pp. 115–154. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60347-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60347-5).
- [132] G. Vogin, Radiosensibilité, radiocurabilité et réparation, *Cancer/Radiothérapie.* 15 (2011) 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2010.10.004>.
- [133] D. Eriksson, T. Stigbrand, Radiation-induced cell death mechanisms, *Tumor Biol.* 31 (2010) 363–372. <https://doi.org/10.1007/s13277-010-0042-8>.
- [134] I.R. Radford, T.K. Murphy, J.M. Radley, S.L. Ellis, Radiation Response of Mouse Lymphoid and Myeloid Cell Lines. Part II. Apoptotic Death is Shown by all Lines Examined, *Int. J. Radiat. Biol.* 65 (1994) 217–227. <https://doi.org/10.1080/09553009414550251>.

- [135] E.C. Jonathan, E.J. Bernhard, W.G. McKenna, How does radiation kill cells?, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (1999) 77–83.
- [136] T.M. Pawlik, K. Keyomarsi, Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol.* 59 (2004) 928–942. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.03.005>.
- [137] M. Quintiliani, The oxygen effect in radiation inactivation of DNA and enzymes, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 50 (1986) 573–594.
- [138] E. Lartigau, S. Dewas, L. Gras, L'effet Oxygène, une cible ancienne toujours d'actualité ?, *Cancer/Radiothérapie.* 12 (2008) 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2007.12.003>.
- [139] K.K. Fu, T.F. Pajak, A. Trotti, C.U. Jones, S.A. Spencer, T.L. Phillips, A.S. Garden, J.A. Ridge, J.S. Cooper, K.K. Ang, A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 48 (2000) 7–16.
- [140] A.I. Kassis, S.J. Adelstein, Radiobiologic principles in radionuclide therapy, *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 46 Suppl 1 (2005) 4S-12S.
- [141] A.I. Kassis, Therapeutic Radionuclides: Biophysical and Radiobiologic Principles, *Semin. Nucl. Med.* 38 (2008) 358–366. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2008.05.002>.
- [142] P. Blanchard, P. Graff-Cailleaud, A. Bossi, Curiethérapie de la prostate : évolutions des indications et des techniques, *Cancer/Radiothérapie.* 22 (2018) 352–358. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2017.11.012>.
- [143] V. Marchesi, M. Gautier, N. Villani, J. Feuillade, C. Dejean, Radioéléments, appareillages et contrôle de qualité en curiethérapie, *Cancer/Radiothérapie.* 17 (2013) 85–88. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2013.01.006>.
- [144] C. Do Cao, J.-L. Wémeau, Aspects diagnostiques et thérapeutiques actuels des cancers thyroïdiens, *Presse Médicale.* 38 (2009) 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2008.05.018>.
- [145] L. Giovanella, ed., *Nuclear Medicine Therapy: Side Effects and Complications*, Springer International Publishing, Cham, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-17494-1>.
- [146] D. Bushnell, Y. Menda, T. O'Dorisio, M. Madsen, S. Miller, T. Carlisle, S. Squires, D. Kahn, W. Walkner, M. Connolly, S. O'Dorisio, M. Karwal, J. Ponto, H. Bouterfa, Effects of Intravenous Amino Acid Administration with Y-90 DOTA-Phe1-Tyr3-Octreotide (SMT487[OctreoTher™]) Treatment, *Cancer Biother. Radiopharm.* 19 (2004) 35–41. <https://doi.org/10.1089/108497804773391658>.
- [147] J.C. Reubi, J.-C. Schär, B. Waser, S. Wenger, A. Heppeler, J.S. Schmitt, H.R. Mäcke, Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 27 (2000) 273–282. <https://doi.org/10.1007/s002590050034>.
- [148] D.J. Kwekkeboom, W.W. de Herder, B.L. Kam, C.H. van Eijck, M. van Essen, P.P. Kooij, R.A. Feelders, M.O. van Aken, E.P. Krenning, Treatment With the Radiolabeled Somatostatin Analog [¹⁷⁷Lu-DOTA⁰, Tyr³]Octreotate: Toxicity, Efficacy, and Survival, *J. Clin. Oncol.* 26 (2008) 2124–2130. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.2553>.
- [149] T. Storr, K.H. Thompson, C. Orvig, Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry, *Chem. Soc. Rev.* 35 (2006) 534. <https://doi.org/10.1039/b514859f>.
- [150] J. Jeon, Review of Therapeutic Applications of Radiolabeled Functional Nanomaterials, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 2323. <https://doi.org/10.3390/ijms20092323>.
- [151] X. Song, C. Liang, L. Feng, K. Yang, Z. Liu, Iodine-131-labeled, transferrin-capped polypyrrole nanoparticles for tumor-targeted synergistic photothermal-radioisotope therapy, *Biomater. Sci.* 5 (2017) 1828–1835. <https://doi.org/10.1039/C7BM00409E>.
- [152] E.P. Azorín-Vega, O.D. Zambrano-Ramírez, E.L. Rojas-Calderón, B.E. Ocampo-García, G. Ferro-Flores, Tumoral fibrosis effect on the radiation absorbed dose of ¹⁷⁷Lu–Tyr3-octreotate and ¹⁷⁷Lu–Tyr3-octreotate conjugated to gold nanoparticles, *Appl. Radiat. Isot.* 100 (2015) 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2014.09.005>.

- [153] Ł. Dziawer, A. Majkowska-Pilip, D. Gawęł, M. Godlewska, M. Pruszyński, J. Jastrzębski, B. Wąs, A. Bilewicz, Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Labeled with 211At as a Prospective Tool for Local Treatment of HER2-Positive Breast Cancer, *Nanomaterials*. 9 (2019) 632. <https://doi.org/10.3390/nano9040632>.
- [154] J.C. Rosenwald, G. Gaboriaud, D. Pontvert, La radiothérapie conformationnelle: Principes et classification, *Cancer/Radiothérapie*. 3 (1999) 367–377. [https://doi.org/10.1016/S1278-3218\(00\)87975-5](https://doi.org/10.1016/S1278-3218(00)87975-5).
- [155] P. Giraud, R. Garcia, Contrôle de la respiration en radiothérapie: principaux aspects techniques et intérêts cliniques, *Bull. Cancer (Paris)*. (2010) 847–856. <https://doi.org/10.1684/bdc.2010.1143>.
- [156] J.W. Wong, M.B. Sharpe, D.A. Jaffray, V.R. Kini, J.M. Robertson, J.S. Stromberg, A.A. Martinez, The use of active breathing control (ABC) to reduce margin for breathing motion, *Int. J. Radiat. Oncol.* 44 (1999) 911–919. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(99\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(99)00056-5).
- [157] P. Keall, 4-dimensional computed tomography imaging and treatment planning, *Semin. Radiat. Oncol.* 14 (2004) 81–90. <https://doi.org/10.1053/j.semradonc.2003.10.006>.
- [158] M. Tomsej, Le système de tomothérapie hélicoïdale pour la radiothérapie modulée en intensité et guidée par l'image: développements récents et applications cliniques, *Cancer/Radiothérapie*. 10 (2006) 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2006.07.006>.
- [159] P.-Y. Bondiau, K. Bénézery, V. Beckendorf, D. Peiffert, J.-P. Gérard, X. Mirabel, A. Noël, V. Marchesi, T. Lacornerie, F. Dubus, T. Sarrazin, J. Herault, S. Marcié, G. Angellier, E. Lartigau, Radiothérapie stéréotaxique robotisée par CyberKnife®: aspects techniques et indications, *Cancer/Radiothérapie*. 11 (2007) 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2007.09.146>.
- [160] K. Rass, J. Reichrath, UV Damage and DNA Repair in Malignant Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer, in: J. Reichrath (Ed.), *Sunlight Vitam. Skin Cancer*, Springer New York, New York, NY, 2008: pp. 162–178. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77574-6_13.
- [161] M. Quanz, N. Berthault, C. Roulin, M. Roy, A. Herbette, C. Agrario, C. Alberti, V. Josserand, J.-L. Coll, X. Sastre-Garau, J.-M. Cosset, L. Larue, J.-S. Sun, M. Dutreix, Small-molecule drugs mimicking DNA damage: a new strategy for sensitizing tumors to radiotherapy, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15 (2009) 1308–1316. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2108>.
- [162] F. Devun, J. Biau, M. Huerre, A. Croset, J.-S. Sun, A. Denys, M. Dutreix, Colorectal Cancer Metastasis: The DNA Repair Inhibitor Dbait Increases Sensitivity to Hyperthermia and Improves Efficacy of Radiofrequency Ablation, *Radiology*. 270 (2014) 736–746. <https://doi.org/10.1148/radiol.13130805>.
- [163] S.J. Collis, T.L. DeWeese, P.A. Jeggo, A.R. Parker, The life and death of DNA-PK, *Oncogene*. 24 (2005) 949–961. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208332>.
- [164] E.P. Rogakou, C. Boon, C. Redon, W.M. Bonner, Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo, *J. Cell Biol.* 146 (1999) 905–916.
- [165] C. Le Tourneau, B. Dreno, Y. Kirova, J.J. Grob, T. Jouary, C. Dutriaux, L. Thomas, C. Lebbé, L. Mortier, P. Saiag, M.F. Avril, E. Maubec, P. Joly, P. Bey, J.M. Cosset, J.S. Sun, B. Asselain, F. Devun, M.E. Marty, M. Dutreix, First-in-human phase I study of the DNA-repair inhibitor DT01 in combination with radiotherapy in patients with skin metastases from melanoma, *Br. J. Cancer*. 114 (2016) 1199–1205. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.120>.
- [166] J.H. Hoeijmakers, Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, *Nature*. 411 (2001) 366–374. <https://doi.org/10.1038/35077232>.
- [167] H.E. Bryant, N. Schultz, H.D. Thomas, K.M. Parker, D. Flower, E. Lopez, S. Kyle, M. Meuth, N.J. Curtin, T. Helleday, Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase, *Nature*. 434 (2005) 913–917. <https://doi.org/10.1038/nature03443>.
- [168] H. Farmer, N. McCabe, C.J. Lord, A.N.J. Tutt, D.A. Johnson, T.B. Richardson, M. Santarosa, K.J. Dillon, I. Hickson, C. Knights, N.M.B. Martin, S.P. Jackson, G.C.M. Smith, A. Ashworth, Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy, *Nature*. 434 (2005) 917–921. <https://doi.org/10.1038/nature03445>.

- [169] W. Jdey, S. Thierry, C. Russo, F. Devun, M. Al Abo, P. Noguez-Hellin, J.-S. Sun, E. Barillot, A. Zinovyev, I. Kuperstein, Y. Pommier, M. Dutreix, Drug-Driven Synthetic Lethality: Bypassing Tumor Cell Genetics with a Combination of AsiDNA and PARP Inhibitors, *Clin. Cancer Res.* 23 (2017) 1001–1011. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1193>.
- [170] Y. Zhao, H.D. Thomas, M.A. Batey, I.G. Cowell, C.J. Richardson, R.J. Griffin, A.H. Calvert, D.R. Newell, G.C.M. Smith, N.J. Curtin, Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441, *Cancer Res.* 66 (2006) 5354–5362. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4275>.
- [171] T. Tsuji, L.M. Sapinoso, T. Tran, B. Gaffney, L. Wong, S. Sankar, H.K. Raymon, D.S. Mortensen, S. Xu, CC-115, a dual inhibitor of mTOR Kinase and DNA-PK, blocks DNA damage repair pathways and selectively inhibits ATM-deficient cell growth *in vitro*, *Oncotarget.* 8 (2017). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20342>.
- [172] R. Legastelois, J. Jeanblanc, C. Vilpoux, E. Bourguet, M. Naassila, Mécanismes épigénétiques et troubles de l'usage d'alcool : une cible thérapeutique intéressante?, *Biol. Aujourd'hui.* 211 (2017) 83–91. <https://doi.org/10.1051/jbio/2017014>.
- [173] A.G. Kazantsev, L.M. Thompson, Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders, *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 854–868. <https://doi.org/10.1038/nrd2681>.
- [174] J.E. Bolden, M.J. Peart, R.W. Johnstone, Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 769–784. <https://doi.org/10.1038/nrd2133>.
- [175] A. Suraweera, K.J. O'Byrne, D.J. Richard, Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi, *Front. Oncol.* 8 (2018) 92. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00092>.
- [176] H. Noguchi, H. Yamashita, T. Murakami, K. Hirai, Y. Noguchi, J. Maruta, T. Yokoi, S. Noguchi, Successful Treatment of Anaplastic Thyroid Carcinoma with a Combination of Oral Valproic Acid, Chemotherapy, Radiation and Surgery, *Endocr. J.* 56 (2009) 245–249. <https://doi.org/10.1507/endocrj.K08E-016>.
- [177] H.M. Prince, M.J. Bishton, R.W. Johnstone, Panobinostat (LBH589): a potent pan-deacetylase inhibitor with promising activity against hematologic and solid tumors, *Future Oncol.* 5 (2009) 601–612. <https://doi.org/10.2217/fon.09.36>.
- [178] Z. Kuncic, S. Lacombe, Nanoparticle radio-enhancement: principles, progress and application to cancer treatment, *Phys. Med. Biol.* 63 (2018) 02TR01. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/aa99ce>.
- [179] J.F. Hainfeld, D.N. Slatkin, H.M. Smilowitz, The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice, *Phys. Med. Biol.* 49 (2004) N309–N315. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/49/18/N03>.
- [180] L. Maggiorella, G. Barouch, C. Devaux, A. Pottier, E. Deutsch, J. Bourhis, E. Borghi, L. Levy, Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles, *Future Oncol.* 8 (2012) 1167–1181. <https://doi.org/10.2217/fon.12.96>.
- [181] V. Calugaru, N. Magné, J. Héroult, S. Bonvalot, C. Le Tourneau, J. Thariat, Nanoparticules et radiothérapie, *Bull. Cancer (Paris).* 102 (2015) 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2014.10.002>.
- [182] Professionnels de santé, Nanobiotix. (n.d.). <https://www.nanobiotix.com/fr/professionnels-de-sante/> (accessed September 22, 2019).
- [183] A. Detappe, S. Kunjachan, J. Rottmann, J. Robar, P. Tsiamas, H. Korideck, O. Tillement, R. Berbeco, AGuIX nanoparticles as a promising platform for image-guided radiation therapy, *Cancer Nanotechnol.* 6 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12645-015-0012-3>.
- [184] A. Mignot, C. Truillet, F. Lux, L. Sancey, C. Louis, F. Denat, F. Boschetti, L. Bocher, A. Gloter, O. Stéphane, R. Antoine, P. Dugourd, D. Luneau, G. Novitchi, L.C. Figueiredo, P.C. de Moraes, L. Bonneviot, B. Albel, F. Ribot, L. Van Lokeren, I. Déchamps-Olivier, F. Chuburu, G. Lemerrier, C. Villiers, P.N. Marche, G. Le Duc, S. Roux, O. Tillement, P. Perriat, A Top-Down Synthesis Route

- to Ultrasmall Multifunctional Gd-Based Silica Nanoparticles for Theranostic Applications, *Chem. - Eur. J.* 19 (2013) 6122–6136. <https://doi.org/10.1002/chem.201203003>.
- [185] The drug product – NH TherAguix, a clinical stage company, (n.d.). <http://nhtheraguix.com/the-technology/the-drug-product/> (accessed September 21, 2019).
- [186] F. Lux, V.L. Tran, E. Thomas, S. Dufort, F. Rossetti, M. Martini, C. Truillet, T. Doussineau, G. Bort, F. Denat, F. Boschetti, G. Angelovski, A. Detappe, Y. Crémillieux, N. Mignet, B.-T. Doan, B. Larrat, S. Meriaux, E. Barbier, S. Roux, P. Fries, A. Müller, M.-C. Abadjian, C. Anderson, E. Canet-Soulas, P. Bouziotis, M. Barberi-Heyob, C. Frochot, C. Verry, J. Balosso, M. Evans, J. Sidi-Boumedine, M. Janier, K. Butterworth, S. McMahon, K. Prise, M.-T. Aloy, D. Ardail, C. Rodriguez-Lafrasse, E. Porcel, S. Lacombe, R. Berbeco, A. Allouch, J.-L. Perfettini, C. Chargari, E. Deutsch, G. Le Duc, O. Tillement, AGuIX[®] from bench to bedside—Transfer of an ultrasmall theranostic gadolinium-based nanoparticle to clinical medicine, *Br. J. Radiol.* (2018) 20180365. <https://doi.org/10.1259/bjr.20180365>.
- [187] S. Dufort, A. Bianchi, M. Henry, F. Lux, G. Le Duc, V. Josserand, C. Louis, P. Perriat, Y. Crémillieux, O. Tillement, J.-L. Coll, Nebulized Gadolinium-Based Nanoparticles: A Theranostic Approach for Lung Tumor Imaging and Radiosensitization, *Small.* 11 (2015) 215–221. <https://doi.org/10.1002/sml.201401284>.
- [188] C. Verry, S. Dufort, E.L. Barbier, O. Montigon, M. Peoc'h, P. Chartier, F. Lux, J. Balosso, O. Tillement, L. Sancey, G. Le Duc, MRI-guided clinical 6-MV radiosensitization of glioma using a unique gadolinium-based nanoparticles injection, *Nanomed.* 11 (2016) 2405–2417. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0203>.
- [189] Radiosensitization of Multiple Brain Metastases Using AGuIX Gadolinium Based Nanoparticles, (n.d.). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02820454> (accessed September 21, 2019).
- [190] F. Lux, A. Mignot, P. Mowat, C. Louis, S. Dufort, C. Bernhard, F. Denat, F. Boschetti, C. Brunet, R. Antoine, P. Dugourd, S. Laurent, L.V. Elst, R. Muller, L. Sancey, V. Josserand, J.-L. Coll, V. Stupar, E. Barbier, C. Rémy, A. Broisat, C. Ghezzi, G. Le Duc, S. Roux, P. Perriat, O. Tillement, Ultrasmall Rigid Particles as Multimodal Probes for Medical Applications, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 12299–12303. <https://doi.org/10.1002/anie.201104104>.
- [191] P. Bouziotis, D. Stellas, E. Thomas, C. Truillet, C. Tsoukalas, F. Lux, T. Tsotakos, S. Xanthopoulos, M. Paravatou-Petsotas, A. Gaitanis, L.A. Mouloupoulos, V. Koutoulidis, C.D. Anagnostopoulos, O. Tillement, ⁶⁸Ga-radiolabeled AGuIX nanoparticles as dual-modality imaging agents for PET/MRI-guided radiation therapy, *Nanomed.* 12 (2017) 1561–1574. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0032>.
- [192] J. Morlieras, S. Dufort, L. Sancey, C. Truillet, A. Mignot, F. Rossetti, M. Dentamaro, S. Laurent, L. Vander Elst, R.N. Muller, R. Antoine, P. Dugourd, S. Roux, P. Perriat, F. Lux, J.-L. Coll, O. Tillement, Functionalization of Small Rigid Platforms with Cyclic RGD Peptides for Targeting Tumors Overexpressing $\alpha_v\beta_3$ -Integrins, *Bioconjug. Chem.* 24 (2013) 1584–1597. <https://doi.org/10.1021/bc4002097>.
- [193] F. Lux, L. Sancey, A. Bianchi, Y. Crémillieux, S. Roux, O. Tillement, Gadolinium-based nanoparticles for theranostic MRI-radiosensitization, *Nanomed.* 10 (2015) 1801–1815. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.30>.
- [194] E. Muntimadugu, N. Kommineni, W. Khan, Exploring the Potential of Nanotherapeutics in Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy, *Pharmacol. Res.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.010>.
- [195] V.P. Chauhan, T. Stylianopoulos, J.D. Martin, Z. Popović, O. Chen, W.S. Kamoun, M.G. Bawendi, D. Fukumura, R.K. Jain, Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner, *Nat. Nanotechnol.* 7 (2012) 383–388. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.45>.
- [196] E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari, Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) 941–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>.

- [197] A.M.E. Abdalla, L. Xiao, M.W. Ullah, M. Yu, C. Ouyang, G. Yang, Current Challenges of Cancer Anti-angiogenic Therapy and the Promise of Nanotherapeutics, *Theranostics*. 8 (2018) 533–548. <https://doi.org/10.7150/thno.21674>.
- [198] F.M. Kievit, M. Zhang, Cancer Nanotheranostics: Improving Imaging and Therapy by Targeted Delivery Across Biological Barriers, *Adv. Mater.* 23 (2011) H217–H247. <https://doi.org/10.1002/adma.201102313>.
- [199] A.T. Florence, “Targeting” nanoparticles: The constraints of physical laws and physical barriers, *J. Controlled Release*. 164 (2012) 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.022>.
- [200] H. Kobayashi, R. Watanabe, P.L. Choyke, Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target?, *Theranostics*. 4 (2014) 81–89. <https://doi.org/10.7150/thno.7193>.
- [201] H.L. Kim, S.B. Lee, H.J. Jeong, D.W. Kim, Enhanced tumor targetability of PEGylated mesoporous silica nanoparticles on in vivo optical imaging according to their size, *RSC Adv.* 4 (2014) 31318–31322. <https://doi.org/10.1039/C4RA03905J>.
- [202] D.A. Christian, S. Cai, O.B. Garbuzenko, T. Harada, A.L. Zajac, T. Minko, D.E. Discher, Flexible Filaments for *in Vivo* Imaging and Delivery: Persistent Circulation of Filomicelles Opens the Dosage Window for Sustained Tumor Shrinkage, *Mol. Pharm.* 6 (2009) 1343–1352. <https://doi.org/10.1021/mp900022m>.
- [203] Y. Geng, P. Dalhaimer, S. Cai, R. Tsai, M. Tewari, T. Minko, D.E. Discher, Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 249–255. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.70>.
- [204] X. Huang, L. Li, T. Liu, N. Hao, H. Liu, D. Chen, F. Tang, The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo, *ACS Nano*. 5 (2011) 5390–5399. <https://doi.org/10.1021/nn200365a>.
- [205] T. Geng, X. Zhao, M. Ma, G. Zhu, L. Yin, Resveratrol-Loaded Albumin Nanoparticles with Prolonged Blood Circulation and Improved Biocompatibility for Highly Effective Targeted Pancreatic Tumor Therapy, *Nanoscale Res. Lett.* 12 (2017) 437. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2206-6>.
- [206] B. Thapa, D. Diaz-Diestra, J. Beltran-Huarac, B.R. Weiner, G. Morell, Enhanced MRI T₂ Relaxivity in Contrast-Probed Anchor-Free PEGylated Iron Oxide Nanoparticles, *Nanoscale Res. Lett.* 12 (2017) 312. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2084-y>.
- [207] F. Yu, M. Ao, X. Zheng, N. Li, J. Xia, Y. Li, D. Li, Z. Hou, Z. Qi, X.D. Chen, PEG-lipid-PLGA hybrid nanoparticles loaded with berberine-phospholipid complex to facilitate the oral delivery efficiency, *Drug Deliv.* 24 (2017) 825–833. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1321062>.
- [208] A. Alalaiwe, G. Roberts, P. Carpinone, J. Munson, S. Roberts, Influence of PEG coating on the oral bioavailability of gold nanoparticles in rats, *Drug Deliv.* 24 (2017) 591–598. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1282554>.
- [209] S. Liu, S. Jiang, Zwitterionic polymer-protein conjugates reduce polymer-specific antibody response, *Nano Today*. 11 (2016) 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.05.006>.
- [210] W. Yang, S. Liu, T. Bai, A.J. Keefe, L. Zhang, J.-R. Ella-Menye, Y. Li, S. Jiang, Poly(carboxybetaine) nanomaterials enable long circulation and prevent polymer-specific antibody production, *Nano Today*. 9 (2014) 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.02.004>.
- [211] C.-M.J. Hu, R.H. Fang, K.-C. Wang, B.T. Luk, S. Thamphiwatana, D. Dehaini, P. Nguyen, P. Angsantikul, C.H. Wen, A.V. Kroll, C. Carpenter, M. Ramesh, V. Qu, S.H. Patel, J. Zhu, W. Shi, F.M. Hofman, T.C. Chen, W. Gao, K. Zhang, S. Chien, L. Zhang, Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking, *Nature*. 526 (2015) 118–121. <https://doi.org/10.1038/nature15373>.
- [212] W. Gao, C.-M.J. Hu, R.H. Fang, B.T. Luk, J. Su, L. Zhang, Surface functionalization of gold nanoparticles with red blood cell membranes, *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla.* 25 (2013) 3549–3553. <https://doi.org/10.1002/adma.201300638>.
- [213] L. Gu, D.J. Mooney, Biomaterials and emerging anticancer therapeutics: engineering the microenvironment, *Nat. Rev. Cancer*. 16 (2015) 56–66. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.3>.

- [214] A. Parodi, N. Quattrocchi, A.L. van de Ven, C. Chiappini, M. Evangelopoulos, J.O. Martinez, B.S. Brown, S.Z. Khaled, I.K. Yazdi, M.V. Enzo, L. Isenhardt, M. Ferrari, E. Tasciotti, Synthetic nanoparticles functionalized with biomimetic leukocyte membranes possess cell-like functions, *Nat. Nanotechnol.* 8 (2013) 61–68. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.212>.
- [215] N.E. Toledano Furman, Y. Lupu-Haber, T. Bronshtein, L. Kaneti, N. Letko, E. Weinstein, L. Baruch, M. Machluf, Reconstructed stem cell nanoghosts: a natural tumor targeting platform, *Nano Lett.* 13 (2013) 3248–3255. <https://doi.org/10.1021/nl401376w>.
- [216] F. Danhier, To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine?, *J. Controlled Release.* 244 (2016) 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.015>.
- [217] F. Danhier, O. Feron, V. Pr at, To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 148 (2010) 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.027>.
- [218] F. Fay, C.J. Scott, Antibody-targeted nanoparticles for cancer therapy, *Immunotherapy.* 3 (2011) 381–394. <https://doi.org/10.2217/imt.11.5>.
- [219] T. Carter, P. Mulholland, K. Chester, Antibody-targeted nanoparticles for cancer treatment, *Immunotherapy.* 8 (2016) 941–958. <https://doi.org/10.2217/imt.16.11>.
- [220] M.K. Rahim, R. Kota, S. Lee, J.B. Haun, Bioorthogonal chemistries for nanomaterial conjugation and targeting, *Nanotechnol. Rev.* 2 (2013). <https://doi.org/10.1515/ntrev-2012-0083>.
- [221] G.K. Such, A.P.R. Johnston, K. Liang, F. Caruso, Synthesis and functionalization of nanoengineered materials using click chemistry, *Prog. Polym. Sci.* 37 (2012) 985–1003. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.12.002>.
- [222] G. Yi, J. Son, J. Yoo, C. Park, H. Koo, Application of click chemistry in nanoparticle modification and its targeted delivery, *Biomater. Res.* 22 (2018). <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0123-0>.
- [223] C. Chaix, G.D. Crozals, C. Farre, Material for supported synthesis and method for growing oligonucleotides or peptides, WO Patent 2,013,007,944, 2013.
- [224] G.D. Crozals, C. Farre, G. Hantier, D. L onard, C.A. Marquette, C.A. Mandon, L. Marmuse, C. Louis, J.-J. Toulm e, C. Billotey, M. Janier, C. Chaix, Oligonucleotide solid-phase synthesis on fluorescent nanoparticles grafted on controlled pore glass, *RSC Adv.* 2 (2012) 11858. <https://doi.org/10.1039/c2ra22077f>.
- [225] G. De Crozals, D. Kryza, G.J. Sánchez, S. Roux, D. Math e, J. Taleb, C. Dumontet, M. Janier, C. Chaix, Granulocyte Colony-Stimulating Factor Nanocarriers for Stimulation of the Immune System (Part I): Synthesis and Biodistribution Studies, *Bioconjug. Chem.* 29 (2018) 795–803. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00605>.
- [226] D. Kryza, G. De Crozals, D. Mathe, J. Taleb Sidi-Boumedine, M. Janier, C. Chaix, C. Dumontet, Granulocyte-Colony Stimulating Factor Nanocarriers for Stimulation of the Immune System (Part II): Dose-Dependent Biodistribution and *In Vivo* Antitumor Efficacy in Combination with Rituximab, *Bioconjug. Chem.* 29 (2018) 804–812. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00606>.
- [227] G. De Crozals, Multi-fonctionnalisation par synthèse supportée de nanoparticules de silice pour des applications biomédicales, Thèse en Chimie, Université Claude Bernard Lyon 1.
- [228] W. Mier, J. Hoffend, S. Krämer, J. Schuhmacher, W.E. Hull, M. Eisenhut, U. Haberkorn, Conjugation of DOTA Using Isolated Phenolic Active Esters: The Labeling and Biodistribution of Albumin as Blood Pool Marker, *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 237–240. <https://doi.org/10.1021/bc034216c>.
- [229] D.A. Moore, SELECTIVE TRIALKYLATION OF CYCLEN WITH tert-BUTYL BROMOACETATE, *Org. Synth.* 85 (2008) 10. <https://doi.org/10.15227/orgsyn.085.0010>.
- [230] T. Mukai, S. Namba, Y. Arano, M. Ono, Y. Fujioka, T. Uehara, K. Ogawa, J. Konishi, H. Saji, Synthesis and evaluation of a monoreactive DOTA derivative for indium-111-based residualizing label to estimate protein pharmacokinetics, *J. Pharm. Pharmacol.* 54 (2002) 1073–1081. <https://doi.org/10.1211/002235702320266226>.

- [231] M. Rogosnitzky, S. Branch, Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms, *BioMetals*. 29 (2016) 365–376. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9931-7>.
- [232] M.T. Kaczmarek, M. Zabiszak, M. Nowak, R. Jastrzab, Lanthanides: Schiff base complexes, applications in cancer diagnosis, therapy, and antibacterial activity, *Coord. Chem. Rev.* 370 (2018) 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.05.012>.
- [233] P. Hermann, J. Kotek, V. Kubíček, I. Lukeš, Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes, *Dalton Trans.* (2008) 3027. <https://doi.org/10.1039/b719704g>.
- [234] M.J. Thaning, A.R. Meijer, Formulations of metal complexes, US10314927B2, 2019. <https://patents.google.com/patent/US10314927B2/en> (accessed October 1, 2019).
- [235] M.A. Bruckman, L.N. Randolph, N.M. Gulati, P.L. Stewart, N.F. Steinmetz, Silica-coated Gd(DOTA)-loaded protein nanoparticles enable magnetic resonance imaging of macrophages, *J. Mater. Chem. B*. 3 (2015) 7503–7510. <https://doi.org/10.1039/C5TB01014D>.
- [236] N. Wartenberg, P. Fries, O. Raccurt, A. Guillermo, D. Imbert, M. Mazzanti, A Gadolinium Complex Confined in Silica Nanoparticles as a Highly Efficient T_1/T_2 MRI Contrast Agent, *Chem. - Eur. J.* 19 (2013) 6980–6983. <https://doi.org/10.1002/chem.201300635>.
- [237] W.J. Rieter, J.S. Kim, K.M.L. Taylor, H. An, W. Lin, T. Tarrant, W. Lin, Hybrid Silica Nanoparticles for Multimodal Imaging, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 3680–3682. <https://doi.org/10.1002/anie.200604738>.
- [238] M. Cheng, L. Zhou, J. Ma, J. Mu, C. Yi, M.-J. Li, Iridium(III) and gadolinium(III) loaded and peptide-modified silica nanoparticles for photoluminescence and magnetic resonance (dual) imaging, *Mater. Sci. Eng. C*. 104 (2019) 109972. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109972>.
- [239] M.E. Bakleh, V. Sol, K. Estieu-Gionnet, R. Granet, G. Déléris, P. Krausz, An efficient route to VEGF-like peptide porphyrin conjugates via microwave-assisted ‘click-chemistry,’ *Tetrahedron*. 65 (2009) 7385–7392. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.07.028>.
- [240] A. Rondon, S. Schmitt, A. Briat, N. Ty, L. Maigne, M. Quintana, M. Rosemery, B.M. Zeglis, I. Navarro-Teulon, J.-P. Pouget, J.-M. Chezal, E. Miot-Noirault, E. Moreau, F. Degoul, Pretargeted radioimmunotherapy and SPECT imaging of peritoneal carcinomatosis using bioorthogonal click chemistry: probe selection and first proof-of-concept, *Theranostics*. (2019). <https://doi.org/10.7150/thno.35461>.
- [241] J. Davila, A. Chassepot, J. Longo, F. Boulmedais, A. Reisch, B. Frisch, F. Meyer, J.-C. Voegel, P.J. Mésini, B. Senger, M.-H. Metz-Boutigue, J. Hemmerlé, P. Laval, P. Schaaf, L. Jierry, Cyto-mechanoresponsive Polyelectrolyte Multilayer Films, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 83–86. <https://doi.org/10.1021/ja208970b>.
- [242] M. Vallade, M. Jewginski, L. Fischer, J. Buratto, K. Bathany, J.-M. Schmitter, M. Stupfel, F. Godde, C.D. Mackereth, I. Huc, Assessing Interactions between Helical Aromatic Oligoamide Foldamers and Protein Surfaces: A Tethering Approach, *Bioconjug. Chem.* 30 (2019) 54–62. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00710>.
- [243] M.L. Blackman, M. Royzen, J.M. Fox, Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactivity, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 13518–13519. <https://doi.org/10.1021/ja8053805>.
- [244] C.F. Hansell, P. Espeel, M.M. Stamenović, I.A. Barker, A.P. Dove, F.E. Du Prez, R.K. O’Reilly, Additive-Free Clicking for Polymer Functionalization and Coupling by Tetrazine–Norbornene Chemistry, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 13828–13831. <https://doi.org/10.1021/ja203957h>.
- [245] G.L. Plosker, D.P. Figgitt, Rituximab: A Review of its Use in Non-Hodgkin’s Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukaemia, *Drugs*. 63 (2003) 803–843. <https://doi.org/10.2165/00003495-200363080-00005>.
- [246] J. Sibilía, C. Sordet, Le rituximab : une biothérapie originale dans les maladies auto-immunes, *Rev. Médecine Interne*. 26 (2005) 485–500. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2004.12.013>.

- [247] Z. Zhou, C.J. Fahrni, A Fluorogenic Probe for the Copper(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Ligation Reaction: Modulation of the Fluorescence Emission via $^3(n,\pi^*) - ^1(\pi,\pi^*)$ Inversion, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 8862–8863. <https://doi.org/10.1021/ja049684r>.
- [248] A. Gopin, S. Ebner, B. Attali, D. Shabat, Enzymatic Activation of Second-Generation Dendritic Prodrugs: Conjugation of Self-Immolative Dendrimers with Poly(ethylene glycol) via Click Chemistry, *Bioconjug. Chem.* 17 (2006) 1432–1440. <https://doi.org/10.1021/bc060180n>.
- [249] R. Rossin, S.M. van den Bosch, W. ten Hoeve, M. Carvelli, R.M. Versteegen, J. Lub, M.S. Robillard, Highly Reactive *trans*-Cyclooctene Tags with Improved Stability for Diels–Alder Chemistry in Living Systems, *Bioconjug. Chem.* 24 (2013) 1210–1217. <https://doi.org/10.1021/bc400153y>.
- [250] M. Royzen, G.P.A. Yap, J.M. Fox, A Photochemical Synthesis of Functionalized *trans*-Cyclooctenes Driven by Metal Complexation, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 3760–3761. <https://doi.org/10.1021/ja8001919>.
- [251] J.B. Béquignat, Chimie bioorthogonale appliquée au préciblage de la radioimmunothérapie : synthèses, optimisations et contrôle stéréochimique de dérivés pégylés du transcyclooctène, Thèse en Chimie Organique, Université Clermont-Auvergne.
- [252] R. Chadwick, S. Van Gyzen, S. Liogier, A. Adronov, Scalable Synthesis of Strained Cyclooctyne Derivatives, *Synthesis*. 46 (2014) 669–677. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1340509>.
- [253] L.S. Campbell-Verduyn, L. Mirfeizi, A.K. Schoonen, R.A. Dierckx, P.H. Elsinga, B.L. Feringa, Strain-Promoted Copper-Free “Click” Chemistry for ^{18}F Radiolabeling of Bombesin, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 11117–11120. <https://doi.org/10.1002/anie.201105547>.
- [254] A. Kuzmin, A. Poloukhine, M.A. Wolfert, V.V. Popik, Surface functionalization using catalyst-free azide-alkyne cycloaddition, *Bioconjug. Chem.* 21 (2010) 2076–2085. <https://doi.org/10.1021/bc100306u>.
- [255] M. Luttjeboer, M.V.M. Lafleur, Z.J. Kwidama, J.V. Rijn, J.V.D. Berg, B.J. Slotman, G.J.L. Kaspers, J. Cloos, Strategies for the analysis of in vitro radiation sensitivity and prediction of interaction with potential radiation modifying agents, *Int. J. Radiat. Biol.* 86 (2010) 458–466. <https://doi.org/10.3109/09553000903568019>.
- [256] Z. Zhou, C.J. Fahrni, A Fluorogenic Probe for the Copper(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Ligation Reaction: Modulation of the Fluorescence Emission via $^3(n,\pi^*) - ^1(\pi,\pi^*)$ Inversion, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 8862–8863. <https://doi.org/10.1021/ja049684r>.
- [257] M.S. Robillard, R. Rossin, J. Lub, P.R. Verkerk, D. Burdinski, Pretargeting kit, method and agents used therein, WO2010119389A3, 2010. <https://patents.google.com/patent/WO2010119389A3/ar> (accessed September 17, 2019).
- [258] A. Rondon, N. Ty, J.-B. Bequignat, M. Quintana, A. Briat, T. Witkowski, B. Bouchon, C. Boucheix, E. Miot-Noirault, J.-P. Pouget, J.-M. Chezal, I. Navarro-Teulon, E. Moreau, F. Degoul, Antibody PEGylation in bioorthogonal pretargeting with trans-cyclooctene/tetrazine cycloaddition: in vitro and in vivo evaluation in colorectal cancer models, *Sci. Rep.* 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15051-y>.
- [259] H.L. Evans, L. Carroll, E.O. Aboagye, A.C. Spivey, Bioorthogonal chemistry for ^{68}Ga radiolabelling of DOTA-containing compounds: Biororthogonal chemistry for ^{68}Ga , *J. Label. Compd. Radiopharm.* 57 (2014) 291–297. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3153>.
- [260] C. Denk, D. Svatunek, S. Mairinger, J. Stanek, T. Filip, D. Matscheko, C. Kuntner, T. Wanek, H. Mikula, Design, Synthesis, and Evaluation of a Low-Molecular-Weight ^{11}C -Labeled Tetrazine for Pretargeted PET Imaging Applying Bioorthogonal in Vivo Click Chemistry, *Bioconjug. Chem.* 27 (2016) 1707–1712. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00234>.

Résumé

Les nanoparticules (NP) ont fait l'objet de nombreuses avancées technologiques dans le domaine de la cancérologie au cours de la dernière décennie. Ces NP organiques ou inorganiques permettent ainsi d'améliorer l'efficacité de certains traitements préexistants à la fois en chirurgie, en chimiothérapie anticancéreuse ou encore l'immunothérapie. Concernant la radiothérapie externe, qui représente l'une des modalités de référence pour traiter le cancer au cours du parcours de soin d'un patient, elle se heurte le plus souvent aux tumeurs dites radio-résistantes du fait de l'administration de doses délivrées souvent trop faibles afin de limiter l'irradiation des tissus sains environnants. L'une des stratégies les plus prometteuses consiste ainsi à utiliser des NP à base d'atomes lourds (comme l'or, le platine, l'hafnium ou le gadolinium) en tant qu'agents radiosensibilisants, qui une fois concentrées au niveau tumoral permettent d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie externe. Cette avancée technologique pourrait connaître un essor sans précédent si leur concentration tumorale ne reposait pas simplement sur un ciblage passif *via* l'effet EPR mais sur l'adressage spécifique de ces NP novatrices principalement au niveau tumoral afin de potentialiser l'effet des rayons ionisants tout en limitant les effets secondaires vis-à-vis des tissus sains et ainsi améliorer l'efficacité thérapeutique.

Les travaux présentés dans cette thèse porte ainsi sur l'adressage actif de NP de silice à cœur rhodamine, pouvant chélater plusieurs atomes de gadolinium, selon une approche d'immunopréciblage par chimie bioorthogonale SPAAC (*Strain Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition*). Cette stratégie repose sur un ciblage actif en deux temps : (1) un anticorps modifié par une entité bioorthogonale de type azoture serait tout d'abord administré ; (2) puis, des NP fonctionnalisées avec des entités bioorthogonales complémentaires (azadibenzylcyclooctyne, ADIBO) seraient injectées dans un second temps après clairance de l'anticorps modifié non localisé au niveau tumoral. La liaison covalente spécifique NP/anticorps *via* la ligation SPAAC (ADIBO/N₃) devrait ainsi permettre d'améliorer la concentration tumorale des NPs et ainsi potentialiser leur effet thérapeutique.

La fonctionnalisation de surface des NP a été réalisée selon un procédé automatisé de synthèse supportée utilisant une chimie de synthèse dite « aux phosphoramidites ». Cette technique a permis d'introduire en surface les entités bioorthogonales ADIBO ainsi que des macrocycles DOTA permettant de chélater les atomes de gadolinium. Le greffage de ces différentes molécules ainsi que leur quantification ont ensuite été confirmés par diverses techniques de caractérisation (fluorescence, absorbance, DLS, ICP-MS). Dans la deuxième partie de ces travaux de recherche, les anticorps ont été efficacement modifiés par les entités bioorthogonales de type azoture, complémentaires des ADIBO selon l'approche SPAAC. Après quantification et validation de leur réactivité par étude MALDI-TOF et fluorescence, le meilleur conjugué monoclonal a été sélectionné pour mener des études *in vitro* par microscopie confocale.

Malgré les différentes études effectuées au cours de ce projet, il n'a pas encore été possible de démontrer la faisabilité du concept de préciblage par chimie bioorthogonale de ces NP multimodales. Toutefois, l'obtention de NP comportant à la fois des entités bioorthogonales et du gadolinium laisse entrevoir des perspectives intéressantes pour une application en tant qu'agents théranostiques.

Mots-clés : Nanoparticule, silice, chimie bioorthogonale, radiothérapie, radiosensibilisation, gadolinium, synthèse supportée, modification d'anticorps, immunopréciblage.