



HAL
open science

Conception de nanoparticules de seconde génération issues d'AGuIX® pour une application en oncologie

Paul Rocchi

► **To cite this version:**

Paul Rocchi. Conception de nanoparticules de seconde génération issues d'AGuIX® pour une application en oncologie. Chimie thérapeutique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. ⟨NNT : 2022LYO10055⟩. ⟨tel-04082443⟩

HAL Id: tel-04082443

<https://theses.hal.science/tel-04082443v1>

Submitted on 26 Apr 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.



HAL Authorization



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

**Ecole Doctorale N° 206
Chimie de Lyon**

Discipline : Chimie

Soutenue publiquement le 06/10/2022, par :
Paul Rocchi

Conception de nanoparticules de seconde génération issues d'AGuIX® pour une application en oncologie

Devant le jury composé de :

Mignet Nathalie, Directrice de recherche, CNRS, Univ. Paris Descartes
Roux Stéphane, Professeur, Université de Franche-Comté

Rapporteuse
Rapporteur

Millot Nadine, Professeure, Université de Bourgogne
David Laurent, Professeur, Université Lyon 1

Présidente du jury
Examineur

Tillement Olivier, Professeur, Université Lyon 1
Lux François, Maître de conférence, Université Lyon 1

Directeur de thèse
Co-directeur de thèse

Doussineau Tristan, Développement CMC, NH Theraguix

Invité

Remerciements

Ces trois années et demie de thèse ont représenté pour moi un très grand enrichissement sur le plan scientifique et personnel. J'ai tendance à l'oublier dans le quotidien du laboratoire, mais en faisant le bilan j'ai énormément appris de toutes les personnes que j'ai pu rencontrer grâce à la thèse. Je tiens ici à les remercier et à témoigner ma plus grande reconnaissance à celles et ceux qui m'ont conseillé et soutenu dans cette aventure.

En premier lieu je tiens à remercier Nathalie Mignet et Stéphane Roux pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également Nadine Millot, Laurent David et Tristan Doussineau d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie tout particulièrement François Lux et Olivier Tillement pour leur encadrement durant cette période. Merci à François pour tes conseils, ta disponibilité sans faille et ton utilisation avisée du code « Dalila », tu n'avais plus le choix ! Merci à Olivier pour ton innovation débordante à l'origine des travaux de cette thèse. On oubliera cependant volontiers tes 2-3 conseils boursiers aux résultats douteux ... mauvaise conjoncture macro-économique dira-t-on.

Je souhaite remercier très chaleureusement Marco Natuzzi, de notre premier jour de stage à notre dernier de thèse tu as toujours été là. Tu m'as formé, accompagné et supporté pendant toutes ces années. Si cette thèse est un succès c'est en grande partie grâce à toi. J'ai beau « avoir fait la guerre », des camarades comme toi sont rares ! Je note cependant que 4 ans de League of Legends n'auront pas suffi pour que tu me boost jusqu'à gold. Après t'avoir initié je pense qu'il est temps pour moi de quitter la faille de l'invocateur.

Je souhaite remercier aussi l'équipe FENNEC. En plus d'avoir appris énormément au contact de ses membres j'ai aussi passé d'excellents moments qui ont rendu cette thèse beaucoup plus simple. Merci à Lena Carmès, nous formons une très bonne équipe. Vraiment, c'est si simple de travailler avec toi. J'ai été très inspiré de choisir l'excellence de l'ENSCBP pour m'assister dans mes projets. Tu les as poussés à un point que je n'aurais sûrement pas atteint. J'aurais attendu un maximum pour qu'on soutienne ensemble mais mon temps est venu. Merci à Fabien Rossetti, tous ces repas partagés à la maison d'hôtes où l'eau coulait à flot, ces paris sportifs, ta bonne humeur quotidienne ont rendu mes journées exceptionnelles. Merci à Mr. Thomas Google Brichart, une telle amitié n'arrive pas souvent tu le sais aussi. Je te remercie sincèrement pour ton savoir partagé, les moments de rigolade, mais aussi pour ta franchise et ton aide dans les moments importants. Ton mariage avec le Dr. Delphine Vernos Brichart restera l'un des meilleurs souvenirs de cette thèse, quelle soirée ! Merci à Benoit Hautefeuille, tu es le seul qui m'a écouté parler de cryptomonnaie, souvent à tes frais, tu verras on a fait le bon choix ! Votre passion commune avec Thomas pour les formes masculines combiné à votre amour pour la technologie ont toujours mené à des projets d'une finesse inégalée, c'était un immense honneur que de les voir se réaliser sous mes yeux. Petite déception au sujet de ma lampe particulière que j'attends toujours. Merci à Arthur Marais, simplement toujours présent à n'importe quel moment pour aider, partager, rigoler, tu auras été d'un grand soutien. Merci à Matteo Martini, toujours désespéré par mon comportement dans le laboratoire, tu veilles à ce qu'on travaille en toute sécurité, et tu es toujours là pour répondre à mes questions. Merci au reste de l'équipe : Coralie, Juan, Jordyn, Elise, Alice, Axel, Nadjib, Thomas, Arthur. Une très bonne équipe avec qui j'ai eu plaisir de partager mes journées. Je remercie aussi Dalila Nezar, par sincérité ou par crainte de son courroux, j'hésite encore. Elle a

toujours su régler les problèmes avec efficacité et avec cette discrétion qui lui est propre. Merci pour ces bons couscous, tiramisus et cette charlotte au sel qui restera dans les mémoires.

Je tiens à remercier tout particulièrement, Lucie Labied avec qui j'ai travaillé sur AGuIX®, j'ai mis à cœur de diminuer ta productivité et ta rigueur au travail quand j'ai pu. C'était toujours un plaisir d'apprendre et de travailler avec toi. Je suis très fier d'être associé à ton travail.

Je remercie aussi Delphine Vernos Brichart avec qui j'ai travaillé sur CuPRiX. Je ne suis pas toujours le meilleur partenaire de travail, j'en ai bien conscience. Alors merci de m'avoir supporté le temps de ce projet. Sans ton travail de biologie mes heures passées au laboratoire ont beaucoup moins de sens. Je suis très heureux que notre travail soit concrétisé par un papier commun. Je m'excuse aussi de tous ces allers-retours sur le projet 'multi-éléments' sache que c'était aussi désespérant pour toi que pour moi.

Un très grand merci à Tristan Doussineau, mon référent chez Nh Théraguix, j'espère que mon travail t'a servi ou te servira un peu à l'avenir. C'était un plaisir de partager ce bureau et ces moments avec toi. J'ai beaucoup appris grâce à toi. J'espère que ça continuera. Un merci particulier à l'équipe Nh Théraguix, pour m'avoir fait confiance pour cette thèse, c'était un plaisir de travailler avec vous. Les quelques moments partagés ont toujours été excellents.

Je n'oublie pas toutes les personnes avec lesquelles j'ai été amené à échanger au cours ma thèse : Agnès Hagège, Clothilde Zerbino, Eloïse Thomas, Joel Daouk. Merci à Laurent David, qui a eu la patience de me partager son savoir sur la mesure SAXS et qui m'a enmené jusqu'à l'ESRF. J'en garde d'excellents souvenirs. Merci à l'équipe d'Havard Medical School : Ross Berbeco, Needa Navirani, Romy Mueller, Meghna Iyer. Nous avons principalement échangé par écrans interposés un jeudi sur deux pendant 3 ans, fidèle au poste, la coloboration s'est toujours très bien passée, j'ai hâte de concrétiser notre travail dans une publication.

Enfin, un immense merci à tous mes amis. Alexandre et Bertrand, mes colocataires pour qui 3 ans de vie commune n'auront pas suffi pour qu'ils puissent expliquer mon travail à qui veut en savoir plus. Ils ont été là dans les bons comme les mauvais moments je les en remercie. Une pensée particulière à mes camarades d'école de l'ENSCBP que j'ai négligé pendant cette dernière année au motif d'une rédaction de thèse compliquée. Ça a été long mais la voici. Je compte bien me rattraper.

Merci enfin à mes parents, mes sœurs, mes grands-parents, ma marraine, mes cousins et leurs petites familles pour leur soutien sans faille. C'était long, c'était dur mais j'y suis enfin et c'est grâce à vous ! Je suis extrêmement chanceux de vous avoir !

Résumé

Avec environ 19,3 millions de nouveaux cas et près de 10,0 millions de décès survenus en 2020, le cancer est l'une des causes majeures de mortalité dans le monde. Le nombre de nouveaux cas ne devrait pas cesser d'augmenter : 47 % de nouveaux cas (28,4 millions) attendus d'ici 2040 [1]. La recherche dans le développement de nouveaux outils de diagnostic et de nouveaux traitements est donc primordiale pour affronter cette maladie. Dans ce contexte, l'Institut Lumière Matière (ILM, Lyon, France) a développé une nanoparticule : AGuIX[®] (Activation et Guidage de l'Irradiation X). D'un diamètre hydrodynamique de 5 nm, elle est constituée d'un cœur de polysiloxane et présente à sa surface des complexes de gadolinium. Ces complexes permettent un usage d'AGuIX[®] comme agent de contraste en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et améliore l'efficacité de la radiothérapie (effet radiosensibilisant). Cette nanoparticule est aujourd'hui exploitée par la société NH Theraguix (NHT, Grenoble, France) afin de rejoindre l'arsenal de lutte contre le cancer au travers de plusieurs essais cliniques (métastases cérébrales NCT03818386/NCT02820454, glioblastome NCT04881032, cancer du col de l'utérus NCT03308604, cancer du poumon NCT04789486).

Cette thèse se focalise premièrement sur la caractérisation complète de la nanoparticule AGuIX[®]. La détermination des caractéristiques physico-chimiques est essentielle pour comprendre et évaluer le devenir d'AGuIX[®] dans l'organisme et répondre précisément aux questions du régulateur tel que l'Agence Nationale de Sureté du Médicament et des produits de santé (ANSM) en France, ou Food and Drug Administration (FDA) aux USA. Dans un second temps, la thèse traite du développement de nouvelles nanoparticules issues d'AGuIX[®] présentant de nouveaux effets thérapeutiques. Pour cela, on a cherché : 1) à générer des groupes complexant à la surface de la nanoparticule afin de diminuer l'excès de Cu²⁺ constaté dans les tissus tumoraux. Cette stratégie de déplétion du cuivre ajoute des propriétés anti-tumorales à la nanoparticule en plus de son effet radiosensibilisant ; 2) à augmenter l'effet radiosensibilisant de la nanoparticule en remplaçant une partie des complexes de gadolinium par des complexes de bismuth.

Abstract

With an estimated 19.3 million new cases and nearly 10.0 million deaths in 2020, cancer is one of the leading causes of death in the world. The number of new cases is expected to continue to rise with a 47% increase in new cases (28.4 million cases) expected by 2040 [1]. Research in the development of new diagnostic tools and new treatments is therefore essential to face this disease. In this context, the Institut Lumière Matière (ILM, Lyon, France) has developed a nanoparticle called AGuIX® (Activation et Guidage de l'Irradiation X). With a hydrodynamic diameter of less than 5 nm, it consists of a polysiloxane core with gadolinium complexes on its surface. These complexes can be used as contrast agents in Magnetic Resonance Imaging (MRI) and improve the effectiveness of radiotherapy (radiosensitizing effect). The company NH Theraguix (NHT, Grenoble, France) to lead this innovative nanoparticle now exploits this nanoparticle in the arsenal of fight against cancer through several clinical trials (brain metastasis NCT03818386/NCT02820454, glioblastoma NCT04881032, cervical cancer NCT03308604, lung cancer NCT04789486).

This thesis focuses first on the complete characterization of the AGuIX® nanoparticle. The determination of the physico-chemical characteristics is essential to understand and evaluate the fate of AGuIX® in the body and to answer precisely the questions of the regulator such as the Agence Nationale de Sureté du Médicament (ANSM) in France, or Food and Drug Administration (FDA) in the USA. In a second step, the thesis deals with the development of new nanoparticles from AGuIX® presenting new therapeutic effects. For this purpose, we have tried: 1) to generate complexing groups on the surface of the nanoparticle in order to decrease the excess of Cu²⁺ found in tumor tissues. This copper depletion strategy adds anti-tumor properties to the nanoparticle in addition to its radiosensitizing effect; 2) to increase the radiosensitizing effect of the nanoparticle by replacing part of the gadolinium complexes with bismuth complexes.

Abréviation

A

ACN : Acétonitrile

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFM : *Atomic Force Microscopy*, Microscopie à Force Atomique

AGuIX : Activation et Guidage de l'Irradiation X

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANR : Agence Nationale de la Recherche

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

APTES : 3-Aminopropyltriéthoxysilane

ARNi : Acide Ribonucléique interférent

ATG : Analyse Thermogravimétrique

Au : Or

B

Bi : Bismuth

C

C : Carbone

CE : Conformité Européenne

CSF : *Cerebro Spinal Fluid*, Fluide Cérébro Spinal Cu : Cuivre

Cy : Cyanine

D

Da : Dalton

DEG : Diéthylène Glycol

D_H : Diamètre Hydrodynamique

DLS : *Dynamic Light Scattering*, Diffusion Dynamique de la Lumière

DOTA : Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique

DOTAGA : Acide pentadioic 2-(4,7,10-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)

DRC : *Dynamic Reaction Cell*, Chambre de Réaction

DSB : *Double-Strand Breaks*, Cassures Double Brins

DTPA : Acide Diéthylènetriaminepentaacétique

E

ELS : *Electrophoretic Light Scattering*, Electroforèse Laser Doppler

EPR : *Enhanced Permeability and Retention*

ESI/MS : *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, Spectrométrie de masse par électrospray

eV : electron-Volt

F

FDA : *Food and Drug Administration*

Fe : Fer

FU : Formule Unitaire

G

GBCA : *Gadolinium Based Contrast Agent*, Agent de Contraste à Base de Gadolinium

GBM : Glioblastome

Gy : Gray (unité de dosage absorbée)

H

H : Hydrogène

Hf : Hafnium

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*, Chromatographie Liquide à Haute Performance

HSA : *Human Serum Albumine*, Albumine Humaine

I

ICP/AES : *Inductively coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*, Spectroscopie d'Émission Atomique à Plasma Induit

ICP/MS : *Inductively coupled Plasma Mass Spectrometry*, Spectrométrie de Masse à Plasma Induit

IEP : *Isoelectric Point*, Point Isoélectrique

ILM : Institut Lumière Matière

IP2I : Institut Physique des 2 Infinis

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

ISA : Institut des Sciences Analytiques

L

LOX : *Lysyl Oxidase*

M

MPS : *Mononuclear Phagocytic System*, Système Phagocytaire Mononucléé

M_w : Masse molaire moyenne en poids

N

NIR : *Near Infra-Red*, Proche Infrarouge

NSF : *Nephrogenic systemic fibrosis*, Fibroses Systémiques Néphrogéniques

O

O : Oxygène

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique

P

PDI : *Polydispersity Index*, Indice de Polydispersité

PDT : *Photodynamic Therapy*, Photothérapie dynamique

PEG : Polyéthylène Glycol

PES : Polyéthersulfone

PET : *Positron Emission Tomography*, Tomographie par émission de Positons

PLGA : Acide poly-lactique-co-glycolique

PS : Photosensibilisateur

R

r₁ : Relaxivité longitudinale

r₂ : Relaxivité transversale

R_g : Rayon de giration

R_H : Rayon Hydrodynamique

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : *Reactive Oxygen Species*, Dérivé réactifs de l'oxygène

S

SAXS : *Small Angle X-ray Scattering*, Diffusion des rayons X aux petits angles

SEC : *Size Exclusion Chromatography*

Si : Silicium

SPION : *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle*

SPR : *Surface Plasmon Resonance*, Résonance Plasmon de Surface

T

T_1 : Temps de relaxation longitudinal

T_2 : Temps de relaxation transversal

TDA : *Taylor Dispersion Analysis*, Analyse de Dispersion de Taylor

TEM : *Transmission Electron Microscopy*, Microscopie Electronique à Transmission

TEOS : Tétrahéoxysilane

TFA : Acide Trifluoroacétique

T_r : Temps de rétention

TTM : Tétrathiomolybdate

U

UV : Ultraviolet

V

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Z

Z : Numéro atomique

Table des matières

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Introduction générale..... | 12 |
| 2 | Nanoparticules et cancer :..... | 13 |
| 2.1 | Interactions des nanoparticules dans l'organisme..... | 13 |
| 2.1.1 | Corps sain et nanoparticules | 13 |
| 2.1.2 | Tumeur et nanoparticules..... | 18 |
| 2.2 | Les nanoparticules en clinique : Cas particulier des NPs inorganiques et AGuIX®..... | 21 |
| 2.2.1 | Les différents types de nanoparticules | 21 |
| 2.2.2 | Etat des lieux des nanoparticules en clinique..... | 24 |
| 2.2.3 | Cas particulier des nanoparticules inorganiques à but thérapeutique..... | 27 |
| 2.2.4 | AGuIX®: Un candidat médicament..... | 36 |
| 2.3 | Objectifs de thèse..... | 44 |
| 3 | Caractérisation de la nanoparticule AGuIX®..... | 47 |
| 3.1 | Détermination de taille | 47 |
| 3.1.1 | Dynamic Light Scattering (DLS)..... | 47 |
| 3.1.2 | Taylor Dispersion Analysis (TDA)..... | 49 |
| 3.1.3 | Diffusion des rayons X aux petits angles (Small Angle X-ray Scattering SAXS)..... | 51 |
| 3.2 | Masse, charge, géométrie et propriétés magnétiques d'AGuIX®..... | 55 |
| 3.2.1 | Détermination de la masse par SEC-MALLS..... | 55 |
| 3.2.2 | Détermination de la charge par Zétamétrie..... | 57 |
| 3.2.3 | Détermination de la géométrie par SAXS | 58 |
| 3.2.4 | Détermination des propriétés magnétiques par relaxométrie..... | 60 |
| 3.3 | AGuIX® en solution : une particule et des fragments..... | 61 |
| 3.3.1 | HPLC-UV : Pureté..... | 61 |
| 3.3.2 | HPLC-ICP/MS : Suivi de Fragmentation | 63 |
| 3.3.3 | Identification des fragments : par HPLC-ESI/MS | 69 |
| 3.4 | Composition élémentaire et moléculaire d'AGuIX®..... | 82 |
| 3.4.1 | Gadolinium libre..... | 82 |
| 3.4.2 | DOTAGA libre | 84 |
| 3.4.3 | Analyse élémentaire et formule unitaire | 85 |
| 3.4.4 | Dégradation totale et Formule unitaire | 88 |
| 3.5 | Conclusion..... | 90 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4 | CuPRiX : Des propriétés anti-angiogéniques pour un dérivé d'AGuIX® | 93 |
| 4.1 | Le cuivre et sa régulation comme paramètre important du développement du cancer | 93 |
| 4.1.1 | Le rôle du cuivre | 93 |
| 4.1.2 | Impact des stratégies de déplétion via le TTM | 96 |
| 4.2 | CuPRiX : Relargage de gadolinium pour générer des DOTAGA libres..... | 97 |
| 4.2.1 | Relargage de gadolinium : stratégie et suivi | 97 |
| 4.2.2 | Caractérisation des produits CuPRiX ₁ et CuPRiX ₂ | 101 |
| 4.3 | Résultats <i>in vitro</i> et publication | 108 |
| 4.3.1 | Résumé des résultats <i>in vitro</i> | 108 |
| 4.3.2 | Publication | 110 |
| 4.4 | Conclusion et perspectives | 128 |
| 5 | AGuIX(Gd/Bi) : Augmentation de l'effet radiosensibilisant..... | 129 |
| 5.1 | L'effet radiosensibilisant : Mécanisme et amplification..... | 129 |
| 5.1.1 | La radiothérapie : Un processus complexe | 129 |
| 5.1.2 | Effet radiosensibilisant : usage de nanoparticules à Z élevé | 134 |
| 5.2 | AGuIX(Bi) : Un procédé ajustable pour une nanoparticule spécifique | 137 |
| 5.2.1 | Relargage de gadolinium et complexation du bismuth | 138 |
| 5.2.2 | Caractérisation des produits finaux | 145 |
| 5.3 | Résultats biologiques | 152 |
| 5.3.1 | Conservation des propriétés d'imagerie IRM | 152 |
| 5.3.2 | Augmentation de l'effet radiosensibilisant | 153 |
| 5.3.3 | Biodistribution | 155 |
| 5.4 | Conclusion et perspectives | 157 |
| 6 | Conclusion Générale | 158 |
| | Références..... | 163 |

1 Introduction générale

Les nanoparticules sont de plus en plus présentes dans notre quotidien, elles jouent un rôle clé dans l'innovation et le développement de la majorité des domaines scientifiques. Il faut prendre conscience que d'origine humaine ou naturelle, la nanotechnologie est présente partout. Cependant, si elle échappe aux yeux du grand public lorsqu'elle se cache dans nos smartphones, ordinateurs, panneaux solaires et autres, c'est tout à fait différent lorsque celle-ci interagit avec notre organisme. Les nanos et micros particules peuvent être source d'inquiétude, comme on peut le voir à travers des sujets comme l'émission de « particules fines » dans l'atmosphère de nos villes, ou les études portant sur le dioxyde de titane de nos crèmes solaires ou notre alimentation ... [2,3].

C'est pendant ces années de thèse que le monde a fait le plus confiance aux nanoparticules dans le domaine médical. En effet, avec plus de 4 milliards de doses injectées, les vaccins anti-COVID de Pfizer/BioNTech (BNT162b2) et Moderna (mRNA-1273) ont joué un rôle majeur dans la stabilisation de cette crise sanitaire du XXI^e siècle. Pourtant, une grande partie du public ignore que l'ARNm injecté dans notre organisme est encapsulé dans des nanoparticules lipidiques de diamètre de 70-100 nm [4]. En médecine, les nanoparticules présentent des propriétés intéressantes permettant de pallier les limitations des médicaments classiques. Ces propriétés rendent les nanoparticules en médecine incontournables déjà aujourd'hui et encore plus demain.

La première partie de ce manuscrit est consacrée aux différentes interactions entre nanoparticules et organisme ainsi que les paramètres physicochimiques qui les influencent et finalement qui dictent la conception de nos futurs médicaments. Après avoir évoqué les différents types de nanoparticules, nous nous intéresserons à celles impliquées dans la lutte contre le cancer, actuellement sur le marché ou en phase d'essai clinique. Une attention particulière sera portée sur AGuIX[®], une nanoparticule composée d'un cœur de silice présentant des complexes de gadolinium greffés de façon covalente à la surface. La nanoparticule AGuIX[®] est au centre du travail de recherche de ce manuscrit.

La seconde partie sera dédiée à l'ensemble des techniques anciennes et nouvelles développées afin de caractériser AGuIX[®]. Ces techniques permettent ainsi de connaître les moindres spécificités de la nanoparticule, un point primordial, qui intervient dans le procédé de validation de la nanoparticule et joue un rôle important dans les négociations avec le régulateur.

Les troisièmes et quatrièmes parties seront consacrées aux développements de nouvelles nanoparticules dérivées d'AGuIX[®] permettant l'apport de nouvelles propriétés thérapeutiques, tel qu'un effet anti-angiogénique ou l'augmentation du pouvoir radiosensibilisant de celle-ci.

2 Nanoparticules et cancer :

2.1 Interactions des nanoparticules dans l'organisme

Malgré des découvertes constantes dans le domaine pharmaceutique, les formulations médicamenteuses actuelles pourraient encore être plus efficaces si elles pouvaient atteindre les zones cibles (tumeurs, sites inflammatoires, ...) de manière plus significative. La capacité des médicaments moléculaires à diffuser librement dans l'organisme peut entraîner de forts effets secondaires, qui limitent la dose injectable au patient. Dans ce contexte, les nanoparticules, de par leurs caractéristiques physiques spécifiques (taille, forme, charge, ...), présentent des biodistributions et des pharmacocinétiques très différentes de celles observées pour des médicaments moléculaires classiques [5]. Dans cette partie, nous souhaitons mettre en avant les différents mécanismes physiologiques qui interviennent dans la prise en charge des nanoparticules chez l'individu sain mais aussi dans le cas d'un individu atteint de cancer. Nous verrons ainsi comment la compréhension de ces mécanismes joue un rôle majeur dans la conception de nouveaux médicaments plus efficaces.

2.1.1 Corps sain et nanoparticules

Dans un organisme sain il existe deux principaux mécanismes d'élimination des nanoparticules du système vasculaire : l'élimination par le système phagocytaire mononucléé (MPS) et l'élimination par le système glomérulaire des reins [6].

2.1.1.1 *Le système phagocytaire mononucléé (MPS)*

Le système phagocytaire mononucléé est composé des phagocytaires du foie, de la rate ainsi que des ganglions lymphatiques. Le procédé de séquestration des nanoparticules commence par l'opsonisation, c'est-à-dire l'interaction de celles-ci avec les protéines plasmatiques directement après leur administration. Cette interaction résulte en la formation d'une couronne protéique qui favorise ensuite le processus d'endocytose tel que la phagocytose comme présenté en Figure 1. Cette couronne protéique modifie les propriétés physicochimiques de la nanoparticule lui apportant ainsi un statut biologique spécifique. Ce statut biologique est spécifique de par l'interaction unique entre les protéines de la couronne et les récepteurs des cellules du MPS. C'est donc les protéines absorbées à la surface de la nanoparticule qui vont déterminer son devenir dans l'organisme comme illustré en Figure 2.

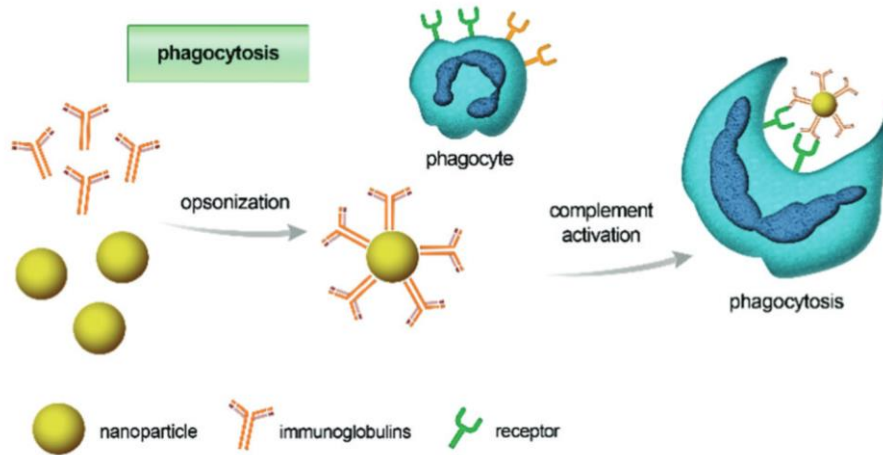


Figure 1. Représentation schématique du processus d'opsonisation initié par l'adsorption d'immunoglobulines ou d'autres protéines du complément (opsonines) à la surface de la nanoparticule. Les particules opsonisées sont ensuite identifiées par des récepteurs sur les cellules phagocytaires et internalisées. Figure issue de Behzadi et al[6]

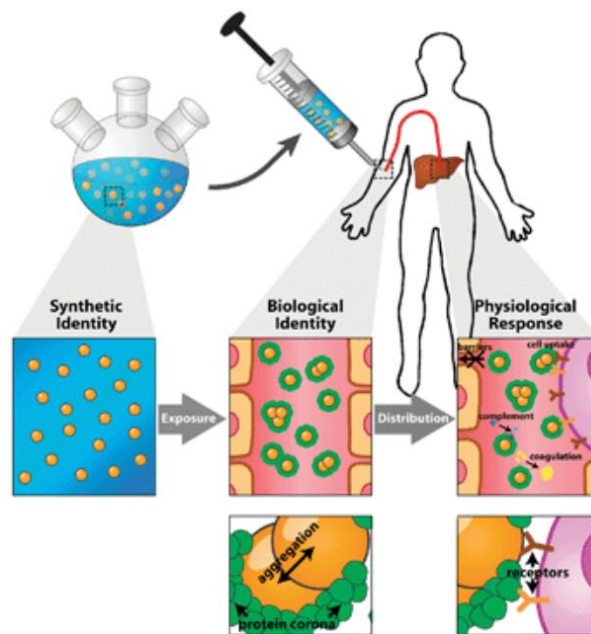


Figure 2. Devenir des nanoparticules dans l'organisme. Après injection, une couche protéique recouvre la surface de la nanoparticule lui attribuant une identité biologique, c'est l'opsonisation. Cette opsonisation va ensuite entraîner le phénomène d'endocytose par le MPS. Figure issue de Walkey et al [7]

Il existe une forte dépendance de ce mécanisme liée à la taille de la nanoparticule. Ainsi, les nanoparticules les plus larges seront principalement prises en charge par les cellules phagocytaires du MPS [8]. Dans le cadre d'interactions avec la biologie on entend par « taille » de la nanoparticule son diamètre moyen. Sur le plan physico-chimique, on peut caractériser la taille par le diamètre hydrodynamique (D_H) qui correspond au

diamètre de la sphère théorique qui aurait le même coefficient de diffusion (D) que la nanoparticule considérée. Pour une nanoparticule chargée, la sphère considérée contient la particule entourée de sa couche de solvation [9].

Si ce processus de ‘prise en charge’ physiologique met en lumière les premières inquiétudes concernant l’accumulation des nanoparticules dans l’organisme, il donne aussi la possibilité de cibler certains organes du MPS comme le foie ou la rate avec des nanoparticules de diamètre supérieur à 20 nm (voir Figure 6) [10].

De plus, la compréhension de ces mécanismes permet d’élaborer des stratégies permettant à la nanoparticule d’échapper à l’opsonisation. Ainsi, si l’on greffe à la surface de certaines nanoparticules des chaînes polymériques tel que le PEG (Polyéthylène glycol), celles-ci interagissent avec les molécules d’eau environnantes pour créer une couche d’hydratation autour de la nanoparticule. Cette couche agit comme un écran limitant la formation de la couronne protéique menant à l’élimination de la nanoparticule par le système immunitaire. Cette couche hydratée rend donc la nanoparticule « furtive » aux MPS. Grâce à ce procédé, on augmente le temps de circulation dans l’organisme après une injection intravasculaire. Un exemple significatif du succès de ce procédé d’évasion de l’opsonisation est la PEGylation de nanoparticules lysosomales contenant l’agent de chimiothérapie Doxorubicine. Le procédé a ainsi permis d’augmenter le temps de résidence plasmatique de quelques minutes, pour le composé seul, à plusieurs heures pour le composé sous forme de nanoparticule PEGylée [5]. On retrouve une représentation schématique de ce type de nanoparticule en Figure 3. De manière générale, les nanoparticules contenant uniquement les principes actifs sont dites de première génération et les nanoparticules PEGylées sont dites de deuxième génération[5-8,10-15].

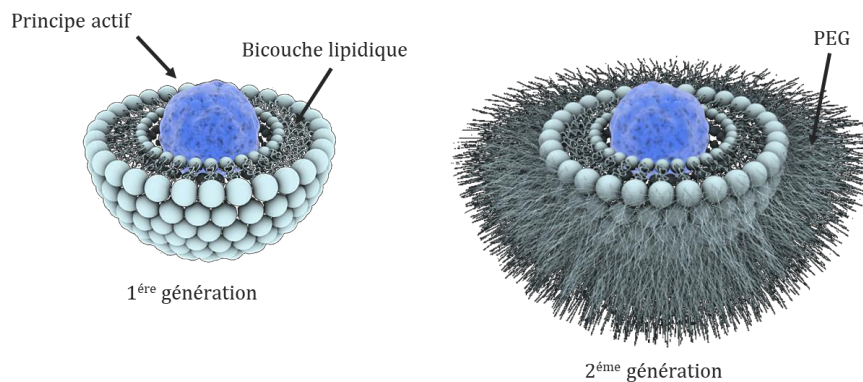


Figure 3. Représentation structurelle de nanoparticule/nanovecteur lysosomale de première et deuxième génération.

Image de F. Caillaud/Sagascience/Photothèque CNRS.

2.1.1.2 Système d’élimination rénal

Les reins sont le deuxième système majeur d’élimination des nanoparticules dans l’organisme. Cette capacité de filtration vient principalement de l’architecture de l’organe. L’unité principale de filtration est le néphron, celui-ci contient des glomérules où prend place la filtration glomérulaire permettant l’extraction de

composés de la circulation sanguine. Une fois filtrés, ces composés sont éliminés par excrétion urinaire. Le processus de filtration au niveau de la membrane glomérulaire est complexe. La taille de la nanoparticule est un paramètre majeur. Si la taille de la nanoparticule est inférieure au seuil de filtration glomérulaire (6 nm) alors la nanoparticule sera très facilement éliminée. En revanche, les nanoparticules d'un plus gros diamètre hydrodynamique seront soit retenues par la membrane glomérulaire, soit renvoyées dans la circulation sanguine où elles seront prises en charge par le MPS en vue de leur élimination. Un bilan de l'impact de la taille des particules au niveau de la membrane glomérulaire est présenté en Figure 4.

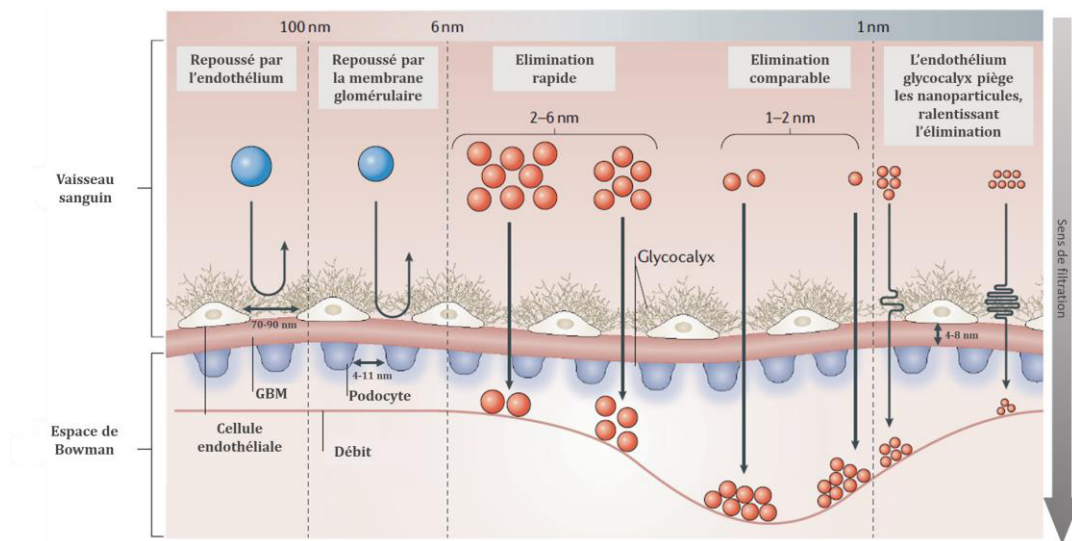


Figure 4. Influence de la taille d'une nanoparticule sur le devenir de la filtration au niveau de la membrane glomérulaire. Issue de Du et al [16]. GBM = glomerular basement membrane.

L'accumulation de nanoparticules au sein de l'organisme, est une question majeure de toxicité à long terme. La bonne compréhension des paramètres qui influencent l'élimination des nanoparticules par filtration glomérulaire est donc un point crucial dans la conception de nouveaux médicaments nanoparticulaires. Dans un souci de simplification, seulement les aspects de taille ont été évoqués. Cependant, d'autres caractéristiques physicochimiques jouent un rôle majeur dans le devenir d'une nanoparticule dans un corps sain tels que sa charge, sa géométrie, sa chimie de surface pour ne citer que les principaux [16]. Leurs impacts spécifiques sur la biodistribution sont développés dans la partie suivante.

2.1.1.3 Influence des paramètres physicochimiques et bilan

Pour le devenir des nanoparticules dans l'organisme tous les paramètres physicochimiques entrent en jeu. Ainsi, la taille, la géométrie et la charge de surface sont souvent considérées comme les paramètres principaux qui régissent la biodistribution.

Les nanoparticules de diamètres hydrodynamiques inférieurs à 6 nm seront rapidement éliminées par les reins. En revanche, les nanoparticules de taille supérieure seront prises en charge par les organes du MPS. À

mesure que la taille augmente, de plus en plus de nanoparticules sont piégées dans le foie et la rate. Les particules de diamètre supérieur à 150 nm se retrouvent aussi dans les capillaires des poumons [10].

La géométrie nanoparticulaire impactera principalement le comportement de la nanoparticule dans la circulation sanguine et donc influe sur la biodistribution. Les nanoparticules sphériques présentent un temps de circulation plus important que les particules sous forme de bâtonnets ou de disques. En effet, une fois en contact avec les cellules endothéliales, la petite taille et la petite surface des nanoparticules sphériques conventionnelles réduisent le nombre de points de liaison et de contact par rapport aux nanoparticules discoïdes (ou non-sphériques) plus grandes ce qui peut affecter la circulation dans le sang et l'accumulation dans les tissus comme schématisé en Figure 5.[10,17,18]. Au niveau de l'élimination rénale, des études ont suggéré que la géométrie en bâtonnet est filtrée plus rapidement que la géométrie sphérique, à coefficient de diffusion équivalent [19].

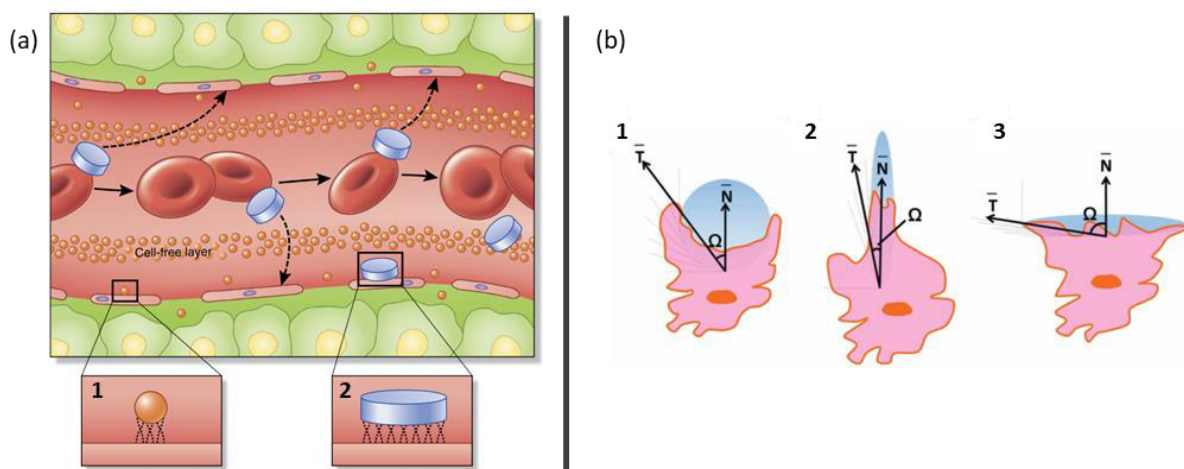


Figure 5. Illustration de l'impact de géométrie. (a) Différence du nombre de points de contact avec les cellules endothéliales entre particules sphériques (1) et discoïdes (2) qui impacte la circulation dans le sang. Issue de Blanco et al [10], (b) Interaction cellule/particule : Ω est défini comme l'angle entre la moyenne des angles tangentiels (T) de 0° à $\pi/2$ et la normale de la membrane au site de fixation (N). Lorsque $\Omega \leq 45^\circ$, les particules sont internalisées avec succès (1,2) ; lorsque $\Omega > 45^\circ$, les cellules peuvent se répandre sur la particule, mais l'internalisation est inhibée (3). Issue de Duan et al. [20]

La charge de surface des nanoparticules a largement été identifiée comme un paramètre crucial influençant la circulation et la biodistribution. Néanmoins, les résultats des recherches restent difficiles à généraliser et seules des grandes tendances ont pu être identifiées [20,21]. La charge de surface des nanoparticules est caractérisée par le potentiel zêta [21]. Le potentiel zêta correspond au potentiel électrocinétique d'une dispersion colloïdale de nanoparticules. Il peut être expérimentalement mesuré par mesure de mobilité électrophorétique ou par électrophorèse laser Doppler (ELS). Étant donné que la membrane plasmique cellulaire est généralement globalement chargée négativement les nanoparticules cationiques sont plus susceptibles d'être attirées électrostatiquement par la membrane ce qui entraîne une accumulation accrue à l'intérieur des cellules. Pour les mêmes raisons, les nanoparticules chargées négativement présentent une faible absorption, contribuant ainsi à l'allongement du temps de circulation sanguine. Dû à la charge négative de la membrane glomérulaire des

reins, les particules chargées positivement seront donc éliminées plus rapidement que les nanoparticules chargées négativement [16,22]. Enfin, les nanoparticules neutres ou faiblement chargées ont un potentiel prometteur en tant que système de délivrance à circulation intermédiaire, avec une biocompatibilité et une biofonctionnalité souhaitables [10,20,21].

Un rapide bilan de la biodistribution des nanoparticules dans l'organisme, dépendant de ces trois paramètres principaux est présenté en Figure 6 [10,16,20].

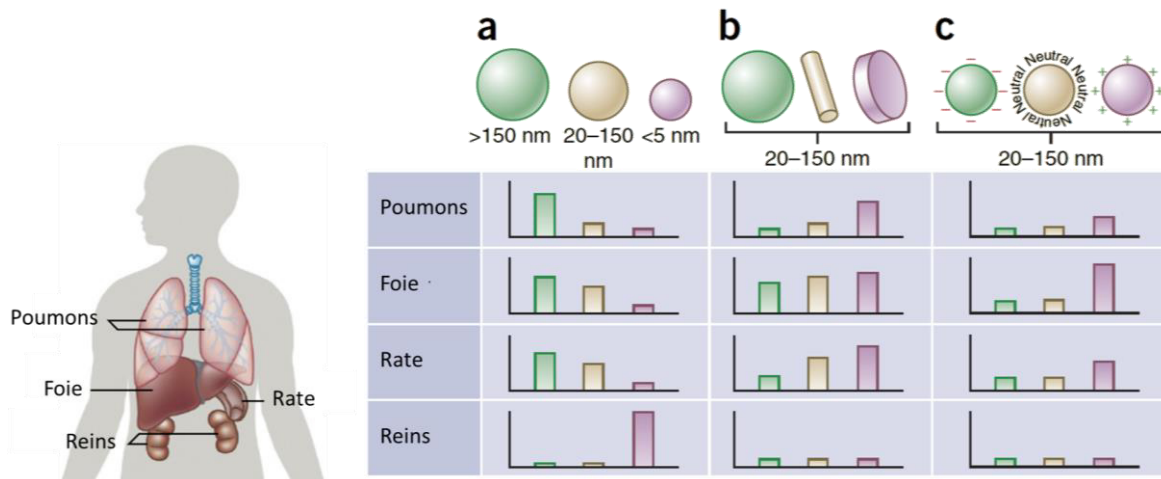


Figure 6. Influence de la taille (a), de la forme (b), et de la charge (c) des nanoparticules sur leur élimination. Figure issue de Branco et al. [10]

La biodistribution d'une nanoparticule est une question multifactorielle. Elle dépend de plusieurs paramètres physicochimiques de la nanoparticule et/mais aussi des paramètres extérieurs tels que le mode d'exposition ou l'état de santé de l'individu. Une défaillance rénale ou hépatique modifiera crucialement la prise en charge des nanoparticules. Dans la partie suivante, nous nous intéresserons à l'interaction entre tumeur et nanoparticules.

2.1.2 Tumeur et nanoparticules

Le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans les pays développés en 2022. Cette maladie se traduit par la prolifération anormale de cellules cancéreuses menant à la formation d'une masse que l'on appelle tumeur. Cette tumeur se développe localement à partir des premières cellules cancéreuses. Mais ces cellules peuvent aussi migrer vers d'autres parties du corps grâce aux vaisseaux sanguins et lymphatiques : on parle alors de métastases et de tumeurs métastatiques. C'est un processus long et complexe résultant de l'accumulation progressive de mutations génétiques dans les cellules qui va rompre l'équilibre naturel existant entre la prolifération des cellules et leur mort (apoptose). Les cellules cancéreuses se caractérisent par une insensibilité à l'apoptose, une capacité de reproduction illimitée et une invasion des tissus voisins ou plus lointains entraînant alors le dysfonctionnement de ces derniers. Elles nécessitent généralement un apport en oxygène menant à une

importante angiogénèse, c'est-à-dire la création de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux déjà existants [23]. L'architecture intrinsèque de ces tumeurs mène à des interactions particulières avec les nanoparticules. De plus, la présence de marqueurs biologiques spécifiques à la surface des cellules tumorales ouvre la voie à de nouveaux moyens d'influencer la biodistribution des nanoparticules afin de cibler activement la tumeur.

2.1.2.1 Effet EPR et ciblage passif

Dans le cas d'un tissu sain, les petites molécules se propagent par diffusion à travers les petits interstices de la paroi endothéliale. Le bon fonctionnement du drainage lymphatique dans le milieu extracellulaire évite l'accumulation de pathogènes. Dans le cas des tumeurs, la croissance rapide et anarchique mène à une angiogénèse rapide et incomplète [23,24]. Les parois endothéliales présentent alors des pores relativement larges pouvant aller de 100 nm à 3 μm de diamètre rendant le réseau vasculaire tumoral perméable, comme on peut le voir en exemple sur un tissu de foie en Figure 7 [25].

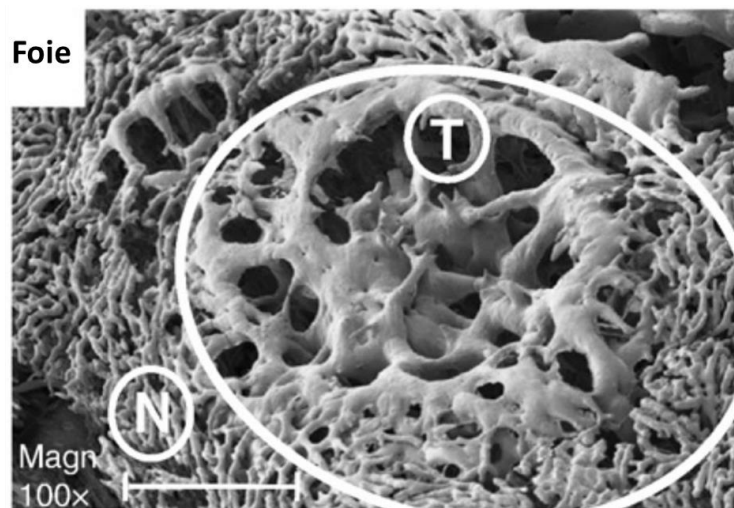


Figure 7 Image MEB d'un nodule tumoral métastatique (zone entourée identifiée par T) dans le foie, le tissu hépatique normal est indiqué par N. Figure issues de Fang et al. [25]

De plus, dans l'environnement extra-tumoral le drainage lymphatique est déficient ou inexistant limitant ainsi l'élimination des nanoparticules par cette voie [26]. Les nanoparticules peuvent donc pénétrer dans les tissus tumoraux et s'y accumuler, contrairement aux tissus sains. Cet effet connu sous le nom d'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) donne donc lieu à un ciblage dit 'passif' de la tumeur car il dépend uniquement des propriétés intrinsèques de celle-ci (voir schéma Figure 8). Il a initialement été mis en évidence dans les années 80 par Matsumura et Maeda [27]. Ce phénomène est donc extrêmement intéressant, car on peut, par l'usage de nanoparticules, cibler les tumeurs améliorant ainsi la délivrance de principes actifs tout en limitant les effets secondaires. Dans le cadre d'établissement d'un diagnostic par imagerie, l'effet EPR permet également

un meilleur contraste des tissus tumoraux par rapport aux tissus sains, en augmentant le ratio Signal/Bruit au niveau des tumeurs [22,24,25,28–30].

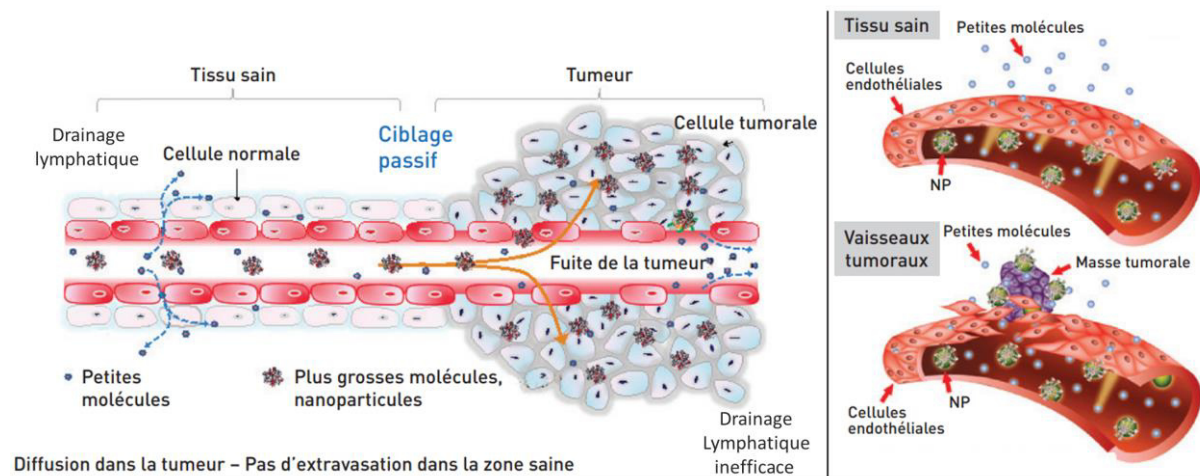


Figure 8. Schéma explicatif de l'effet EPR. Figure issue adapté de de Tillement et al. [31] (gauche) et Bozzuto et al. [32] (droite)

La modification de paramètres tels que la taille, la charge ou la géométrie permet d'optimiser l'accumulation intratumorale par effet EPR [26,28] en diminuant l'action du MPS et augmentant le temps de circulation dans l'organisme par exemple. Jouer sur l'hydrophilie de la surface peut aussi avoir un rôle important, comme évoqué dans le chapitre précédent. La réduction de l'activité du MPS par l'usage de PEG entraîne un plus long temps de circulation qui favorise donc l'effet EPR. Il existe aussi certaines stratégies d'amplification de cet effet par la modification du flux sanguin ou encore l'augmentation de la perméabilité vasculaire des tumeurs [22,24]. Cependant, les organes du MPS et les reins séquestrent et éliminent 99% de la dose de nanoparticule administrée [28]. Au-delà de la compétition avec ces 2 systèmes, l'accumulation au sein de la tumeur est limitée par une pression interstitielle élevée, causée par un drainage lymphatique faible, des vaisseaux sanguins compressés dus à la forte densité cellulaire de l'environnement tumoral. La vascularisation inhomogène des tumeurs est aussi un frein à la répartition uniforme des nanoparticules au sein de la tumeur [24].

2.1.2.2 Ciblage actif

Afin de compléter et renforcer le ciblage passif, on peut greffer à la surface des nanoparticules des ligands ciblant spécifiquement des marqueurs tumoraux [33,34]. On parle alors de nanoparticules fonctionnalisées et de ciblage actif. Ces ligands peuvent être de différentes natures : anticorps, fragments d'anticorps (nanobodies), peptides ou petites molécules organiques telles que des acides aminés [35]. Le choix du ligand utilisé doit être réalisé avec soin car celui-ci peut éventuellement être reconnu par le système immunitaire entraînant alors l'élimination de la nanoparticule avant qu'elle n'ait atteint sa cible [34].

Le ciblage actif ne semble pas augmenter l'accumulation dans les tumeurs. L'accumulation intratumorale est principalement dominée par l'effet EPR [35]. En revanche, le ciblage actif permet une meilleure internalisation des nanoparticules et une répartition plus homogène dans la tumeur [35,36]. Deux stratégies sont étudiées pour le

ciblage actif. Dans un premier cas, on cherche à cibler directement les cellules cancéreuses en visant les récepteurs surexprimés en surface. Dans le deuxième cas, on veut cibler les cellules endothéliales des néovaisseaux des tumeurs. Cela permet éventuellement, d'inhiber l'angiogénèse, donc de limiter l'apport en oxygène et nutriments détruisant les cellules cancéreuses. Dans cet esprit, beaucoup de travaux se focalisent, par exemple, sur le greffage du peptide Arg-Gly-Asp (RGD) et ses dérivés. En effet, ce peptide cible l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, un marqueur membranaire qui est surexprimé dans une large variété de cancers ainsi que chez les cellules endothéliales issues de l'angiogénèse tumorale. De plus, il est très largement absent des tissus sains [37].

2.2 Les nanoparticules en clinique : Cas particulier des NPs inorganiques et AGuIX®

La connaissance des différentes interactions nanoparticules-milieu vivant est essentielle afin de pouvoir expliquer et optimiser un effet compétitif comparé aux médicaments moléculaires aujourd'hui présents dans l'arsenal thérapeutique. Les nanoparticules peuvent être de types très divers. Dans cette partie, nous évoquerons ces différents types. Nous dresserons par ailleurs un état des lieux des nanoparticules en clinique. Une attention particulière sera apportée aux nanoparticules inorganiques impliquées dans le traitement du cancer et plus spécifiquement au candidat médicament AGuIX®, base des travaux de cette thèse.

2.2.1 Les différents types de nanoparticules

2.2.1.1 Nanoparticules organiques

La catégorie la plus représentée est celle des nanoparticules organiques qui regroupe plusieurs types de nanoparticules qui diffèrent par leur composition.

La famille la plus importante est celle des liposomes. Les nanoparticules liposomales sont fabriquées à partir de phospholipides, lipides et cholestérol. Due à leur nature amphiphile, les phospholipides s'auto-assemblent dans l'eau pour former des structures sphériques. La partie hydrophile (la « tête ») se retrouve en contact avec le milieu interne et externe et la partie hydrophobe est responsable de la formation de la double couche lipidique formant la structure sphérique du liposome (voir Figure 9). Les liposomes peuvent présenter une ou plusieurs doubles couches lipidiques. Ces nanoparticules peuvent transporter des principes actifs hydrosolubles dans leurs espaces internes ou entre deux doubles couches. Elles peuvent aussi transporter des principes actifs liposolubles au sein des couches lipidiques. Ces nanoparticules peuvent présenter à leur surface des chaînes PEG connus pour stabiliser la nanoparticule, augmenter le temps de circulation sanguin en réduisant l'action du MPS. Par exemple, on trouve sur le marché des nanomédicaments tels que DaunoXome® ($D_H = 45$ nm, Galen) [38] ou Mycet® ($D_H = 150$ nm, Teva UK) [39] qui sont des nanomédicaments liposomales non PEGylés utilisés dans le traitement du cancer. Le Doxil® est quant à lui une formulation liposomale PEGylée de doxorubicine ($D_H = 100$ nm, Janssen), c'est aussi le premier nanomédicament à avoir été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) [40].

Également composées de macromolécules amphiphiles, les micelles sont auto-assemblées de manière à présenter leur partie hydrosoluble à l'extérieur et à former un cœur de partie hydrophobe. Les différentes structures

de liposomes et micelles sont présentées en Figure 9. De par cette architecture, les micelles ne peuvent contenir que des principes actifs hydrophobes. Cette structure est moins utilisée mais fait l'objet d'études cliniques [41].

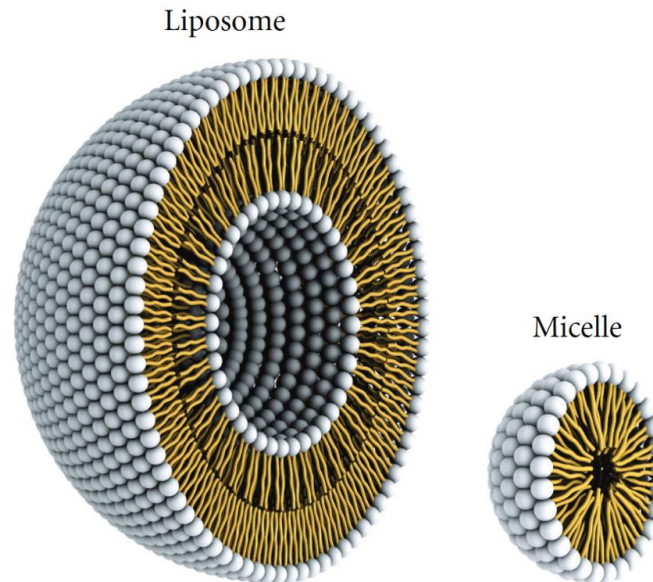


Figure 9. Une représentation de l'organisation stérique d'un liposome (à gauche) et d'une micelle (à droite). Issue de Bitounis et al. [42]

Les nanoparticules polymériques se regroupent en deux familles : les copolymères à blocs (ou polymersomes) et les polymères simples. Les nanoparticules à base de copolymères à blocs ont une morphologie très proche de celle des micelles. Ce sont des polymères amphiphiles composés au minimum de deux types de polymères reliés entre eux par des liaisons covalentes. La partie hydrophile est généralement composée de PEG et la partie hydrophobe peut être composée de polymères biocompatibles tels que de l'acide polylactique, l'acide poly-lactique-co-glycolique (PLGA), le polystyrène ou la polycaprolactone [43]. Par rapport aux liposomes, les copolymères à blocs amphiphiles présentent une plus grande stabilité, une meilleure résistance mécanique et une perméabilité réduite limitant la perte de principe actif [44]. On compte très peu de ces formulations approuvées par les autorités de santé, cependant l'Eligard® (Tolmar) est utilisé dans le traitement du cancer de la prostate contenant du PLGA [45]. Les nanoparticules polymériques simples sont des sphères solides composées d'un unique polymère biocompatible et biodégradable tel que les polymères précédemment évoqués mais aussi le chitosane, l'alginate ou encore la gélatine. Les principes actifs sont greffés à ces polymères de façon covalente ou adsorbés à la surface par interactions non-covalentes.

Les dendrimères représentent une classe de polymères caractérisés par un cœur, atome ou groupe d'atomes, et de multiples branches qui se terminent par différents groupes fonctionnels. Les branches s'étendent de façon radiale à partir du cœur formant ainsi une géométrie plus ou moins sphérique. La synthèse des dendrimères peut être contrôlée avec une grande précision et offre une très bonne monodispersité. Selon la nature

du polymère, divers principes actifs, hydrophiles ou hydrophobes, peuvent être chargés dans le dendrimère. Ce type de particule est largement développé en recherche [46,47] mais il n'existe pas de médicament approuvé utilisant les dendrimères [45,46].

La quasi-totalité des nanoparticules se présente comme des nano-vecteurs de médicaments déjà existants. C'est la formulation nanométrique qui va apporter une nouvelle biodistribution et pharmacocinétique.

2.2.1.2 *Nanoparticules Inorganiques*

Cette classe de nanoparticules regroupe les composés inorganiques ou hybrides organique-inorganique, c'est la deuxième famille la plus développée mais peu de ces nanoparticules ont reçu une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM).

L'une des catégories qui regroupe le plus de travaux concerne les **nanoparticules d'or**. En effet, les nanoparticules d'or présentent des propriétés optiques et électroniques intéressantes, ainsi qu'une faible toxicité. On les retrouve dans diverses applications thérapeutiques comme la vectorisation de principe actif [48], l'hyperthermie optique [49] ou encore comme radiosensibilisant [50]. On les retrouve aussi comme moyen de détecter certains marqueurs biologiques [51]. De plus, la chimie de l'or est très versatile, elle offre un très bon contrôle de la taille, de la monodispersité ou encore de la géométrie[52]. La très bonne interaction S-Au offre aussi des possibilités de fonctionnalisation par une partie organique comme un anticorps ou un peptide permettant leur usage dans l'immunothérapie ou le ciblage actif [52]. On retrouve certaines nanoparticules à base d'or en cours d'essai clinique tels que : Auroshell, CYT-6091 et NU-129 (voir Section 2.2.3).

On retrouve aussi dans cette catégorie les **nanoparticules à base de silice**, très étudiées dans le domaine la recherche. La chimie de la silice à travers la chimie sol-gel offre la possibilité de synthétiser des nanoparticules sphériques de porosité et de taille ajustable présentant une très bonne dispersion. Les nanoparticules poreuses peuvent être chargées avec un principe actif qui sera relargué dans le milieu cible. On peut aussi encapsuler les agents de contraste au sein de la matrice de silice pour apporter des propriétés pour l'imagerie. Les nanoparticules de silice sont aussi très facilement fonctionnalisables grâce à l'apport de fonctions chimiques de surface pouvant réagir avec des molécules d'intérêt. De plus, la silice est un matériau biocompatible facilement éliminable par l'organisme[53,54].

Malgré le grand développement de ces deux familles de nanoparticules inorganiques, aucun de leurs produits n'a actuellement reçu d'AMM. En revanche certains d'entre eux font l'objet de recherches cliniques avancées tel que le produit AGuIX[®]. Ces candidats médicaments seront plus largement développés dans la Section 2.2.2.

La dernière catégorie de nanoparticules inorganiques est celle des oxydes métalliques. Choisis pour leurs propriétés spécifiques, on trouve certaines nanoparticules dérivées d'oxydes métalliques sur le marché. Les nanoparticules d'oxydes de fer super paramagnétiques (SPION) sont utilisées comme agent de contraste IRM. On peut aussi retrouver les SPIONs recouvertes de silice comme le Gastromark[®] ($D_H = 300$ nm, AMAG Pharmaceuticals) ou fonctionnalisées avec du Dextran comme le Feridex[®] ($D_H = 150$ nm, Feridex) [55]. Les nanoparticules d'oxyde d'hafnium NBTXR3[®] (Nanobiotix) et d'oxyde de fer NanoTherm[®] (Magforce) ont reçu des autorisations (marquage CE) dans le cadre de traitement du cancer par, respectivement, radio-sensibilisation

et hyperthermie magnétique. Leurs caractéristiques seront spécifiées dans le chapitre suivant. Un point particulier est apporté sur ces nanoparticules en Section 2.2.3.2 et 2.2.3.5.

La silice et l'or sont les deux matériaux les plus utilisés pour recouvrir divers cœurs inorganiques car leur chimie offre une fonctionnalisation facile. Ils permettent, par exemple, l'ajout de PEG ou de molécules actives. On parle alors de nanoparticules cœur-coquille (*core-shell*) [56].

Un bilan des différents types de nanoparticules utilisées dans le domaine de la nanomédecine est présenté en Figure 10.

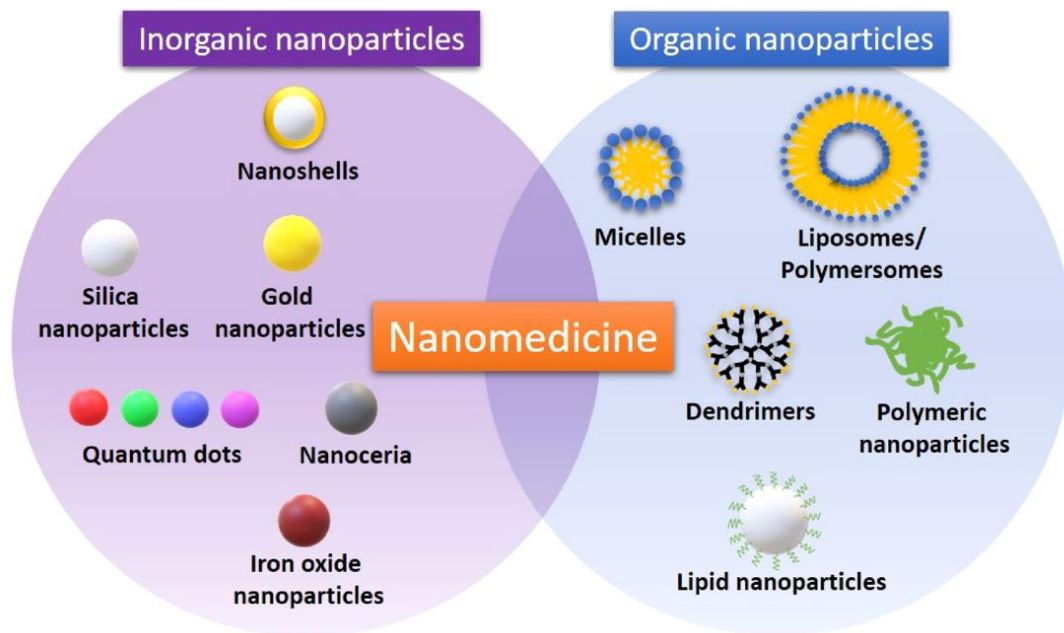


Figure 10. Principaux types de nanoparticules inorganique, organique et protéique. Issue de Martinelli et al. [57].

2.2.2 Etat des lieux des nanoparticules en clinique

La large variété de types et de propriétés qu'offrent les nanoparticules explique l'engouement de la recherche pour les appliquer au domaine médical. Cet engouement se concrétise notamment par la constante augmentation du nombre de publications liant les termes « nanoparticules » et « medical » comme l'indique la Figure 11.

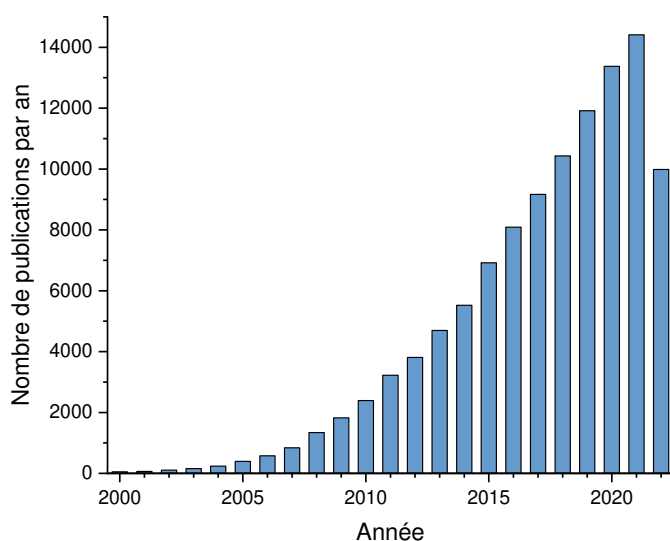


Figure 11. Nombre de publications annuel regroupant les termes « nanoparticules » et « medical ». Données élaborées à partir de l’outil de recherche de Web of Science 09/2022.

Cependant, cet intérêt croissant peine à se concrétiser en applications réelles, très peu de travaux mènent à des essais cliniques. Ainsi, en 2021, on dénombre 47 nanoparticules commercialisées (ou ayant été commercialisées par le passé) et 103 nanoparticules en cours d’essais cliniques tous domaines confondus [41]. Les domaines d’application sont divers mais le traitement du cancer regroupe à lui seul plus de 60 % de la totalité des nanoparticules (commercialisé et en cours d’évaluation clinique) (Figure 12). La surpondération des nanoparticules dans ce domaine s’explique par leurs propriétés qui en font des produits très intéressants dans le combat contre cette maladie. En effet, comme évoqué en Section 2.1.2, les nanoparticules peuvent s’accumuler dans les tumeurs par effet EPR, elles peuvent donc délivrer un principe actif directement au niveau des tissus cancéreux ou encore réagir à des stimuli externes (rayon X, champs magnétique, ...) pour détruire les cellules environnantes (sensibilisation, hyperthermie magnétique, ...).

On dénombre aujourd’hui 15 nanomédicaments approuvés dans la lutte contre le cancer. Il est intéressant de noter que même si 94% des candidats médicaments valident leur phase I seulement 14% aboutissent à une phase 3 positive. De fait, l’efficacité des nanomédicaments est souvent remise en question [36].

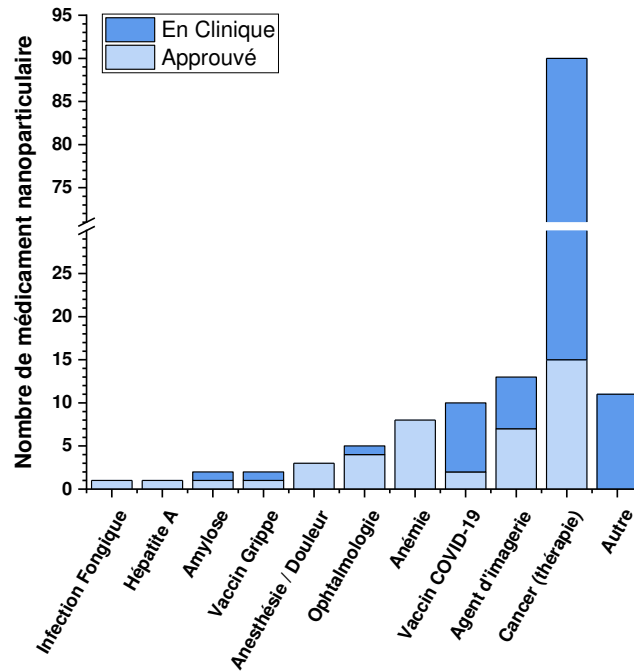


Figure 12. Répartition du nombre de nanoparticule en fonction de leur statut et de leur domaine d'application [41,45,50,57,58].

En se focalisant sur l'imagerie et le traitement du cancer, on note une très forte représentation des nanoparticules organiques regroupant principalement les liposomes (Figure 13). Cette forte présence s'explique par la bonne maîtrise des différentes méthodes d'encapsulation (nanoprécipitation, émulsification, microémulsion [59]) et la très bonne biocompatibilité des matrices utilisées qui sont facilement éliminées. La vectorisation de principe actif (ex : Doxorubicine[®]) grâce à la formulation liposomale et l'effet EPR améliore la balance bénéfice/risque d'un traitement de chimiothérapie. Cependant la plupart de ces produits utilisent l'aspect nanométrique uniquement dans un but de vectorisation de médicaments déjà utilisés depuis plusieurs décennies (Doxorubicine[®], Curcumin[®], Paclitaxel[®], ...). Ainsi, le premier nanomédicament cliniquement approuvé est le Doxil[®]. C'est une formulation liposomale PEGylée de l'agent intercalant de l'ADN utilisé en chimiothérapie, la Doxorubicine découverte en 1980. L'avantage réside donc ici plus dans la « formulation » nanométrique qui permet la libération de dose concentrée dans des zones plus ciblées améliorant ainsi le ratio bénéfice/risque du médicament. EN effet, à principe actif équivalent plutôt que dans le développement de nouveaux types de traitements.

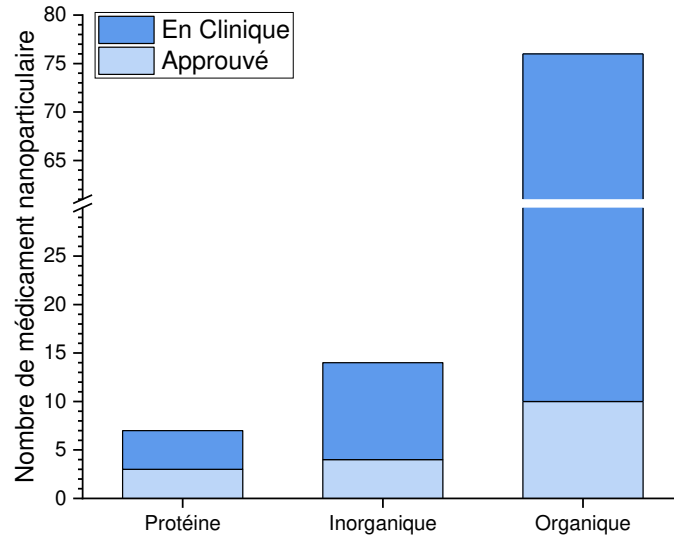


Figure 13. Répartition du nombre de nanoparticule dans le traitement et l'imagerie du cancer en fonction de leur statut et de leur type [41,45,50,57,58].

2.2.3 Cas particulier des nanoparticules inorganiques à but thérapeutique

Concernant les nanoparticules inorganiques, on retrouve un large panel de types de nanoparticules approuvées ou actuellement en phase clinique. Ces nanoparticules sont répertoriées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Présentation des différentes nanoparticules inorganiques approuvées ou en phase d'essai clinique

| Nom | Société | Type de nanoparticule | Coating | D _h | Application | Statut | Ref |
|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--|---------------------|-----------------------------------|--|---------------|
| Lumiren (USA) / GastroMARK (Eu) | AMAG pharceutical / Guerbet S.A. | SPION | Poly[N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl]siloxane | 300-400 nm (1,2,19) | Imagerie IRM | Retiré du marché en 2014 (USA) / 2010 (EU) | [55,57,60,61] |
| AuroShell / AuroLase | Nanospectra Nanoscience | Core-Shell : SiO _x -Au | PEG 5 kDa | 360 nm (4) | Thérapie (Photo-thermal ablation) | En clinique NCT00848042 / Completed / Cancer tête et cou NCT01679470 / Terminated / Cancer du poumon NCT02680535 / Completed / Cancer de la prostate NCT04240639 / Recruiting / Cancer de la prostate | [41,50,62,63] |
| Feridex (USA) / Emdorem (EU) | Berlex Laboratories / Guerbet S.A. | SPION | Dextran 10 kDa | 120-180 nm (2) | Imagerie IRM | Retiré du marché en 2012 (USA) / 2008 (EU) | [55,57,60,61] |
| NBTXR3 / Hensify | Nanobiotix | HfO ₂ cristallites | Agent biocompatible avec des groupements phosphate | 50 nm (7) | Thérapie (Radioenhancer) | Marquage CE pour le traitement des sarcomes mous localement avancés (2019) En Clinique Ph I / NCT01433068 / Completed / Sarcome des tissus mous Ph I / NCT01946867 / Recruiting / Cancer tête et cou Ph I-II / NCT02465593 / Recruiting / Cancer du rectum Ph II-III / NCT02379845 / Completed / Sarcome des tissus mous Ph I-II / NCT02721056 / Terminated / Cancer du foie Ph I-II / NCT02901483 / Recruiting / Cancer tête et cou Ph I-II / NCT02805894 / Terminated / Cancer de la prostate Ph I / NCT03589339 / Recruiting / Cancers métastatiques Ph I / NCT04484909 / Recruiting / Cancer du pancréas Ph I / NCT04615013 / Recruiting / Cancer de l'esophage Ph I / NCT04505267 / Recruiting / Cancer du poumon Ph I-II / NCT05039632 / Not yet recruiting / Cancers métastatiques Ph II / NCT04834349 / Recruiting / Cancer tête et cou Ph II / NCT04862455 / Recruiting / Cancer tête et cou Ph III / NCT04892173 / Recruiting / Cancer tête et cou | [36,41,63–66] |

| Nom | Société | Type de nanoparticule | Coating | D _h | Application | Statut | Ref |
|-------------------------------|------------------------------------|--|--|------------------|------------------------------------|--|------------------|
| Aurimune / CYT-6091 | Cytimmune sciences | GNP | PEG-SH et TNF α | 27-34 nm (10,11) | Thérapie (Immunothérapie) | Pas de nouvel essai clinique depuis 2012 Ph I / NCT00356980 / Completed / Tumeur solide avancée Early Ph I / NCT00436410 / Completed / Cancer primaire et métastatique Développement de nouveau candidat sur la base CYT-6091 | [48,50,63,67,68] |
| NU-129 | Northwestern | GNP | PEG-SH et marqueurs du gène Bcl2L12 (GBM) | 19-34 nm (13) | Thérapie (Immunothérapie) | Pas d'essai clinique en cours Early Ph I / NCT03020017 / Completed / Glioblastome | [41,50,63,69,70] |
| Combidex (USA) / Sinerem (EU) | AMAG pharmaceutical / Guerbet S.A. | SPION | Dextran 10 kDa | 30 nm (1,2) | Imagerie IRM | Jamais approuvé en EU (sauf Pays-Bas) et retiré du marché aux USA (2007) Fait l'objet de recherche clinique NCT03817307 / Recruiting / Imagerie Ph III / NCT04261777 / Recruiting / Imagerie | [55,60] |
| NanoTherm | MagForce | SPION | Aminosilane breveté | 20 nm | Thérapie (Hyperthermie magnétique) | Marquage CE pour le traitement du GBM (2010) Nouvel essai clinique pour le traitement du cancer de la prostate NCT05010759 / Recruiting / Cancer de la prostate | [36,57,61,71] |
| Cornell dott | | SiOx contenant un fluorophore (Cy 5.5) | - PEG 0,5 kDa, cRGDY, radiomarqué à l'Indium 124 - PEG 0,5 kDa, PSMA, radiomarqué au Cuivre 64 - PEG 0,5 kDa, cRGDY, radiomarqué au Zirconium 89 - PEG 0,5 kDa, cRGDY | < 10 nm (17) | Imagerie de fluorescence et PET | En clinique NCT01266096 / Active / Mélanome et cancer du cerveau Ph I / NCT04167969 / Recruiting / Cancer de la prostate Ph I / NCT03465618 / Recruiting / Cancer du cerveau Ph I-II / NCT02106598 / Recruiting / Mélanome tête et cou | [41,72] |
| AGuIX® | Nh Theraguid | SiOx présentant des chélates de gadolinium | | < 10 nm (18) | Thérapie (Radioenhancer) | En clinique Ph I / NCT02820454 / Completed / Métastases cérébrales Ph I / NCT03308604 / Recruiting / Cancer gynécologique Ph II / NCT03818386 / Recruiting / Métastases cérébrales Ph I-II / NCT04881032 / Recruiting / Glioblastome Ph I-II / NCT04789486 / Recruitin / Cancer du poumon et du pancréas Ph II / NCT04899908 / Recruiting / Cancer du cerveau Ph II / NCT04784221 / Not yet recruiting / Cancer récurrent / Radiation par protons | [41,66,73] |

| Nom | Société | Type de nanoparticule | Coating | D _h | Application | Statut | Ref |
|--|---------|--------------------------|---------|----------------|------------------------------------|--|------------|
| Magnablate | | | | n.d. (19) | Thérapie (Hyperthermie magnétique) | Pas d'essai clinique en cours Early Ph I / NCT0233447 / Completed / Cancer de la prostate | [41,61,63] |
| Carbon nanoparticles (YE Yingjiang) | | Nanoparticule de carbone | | n.d. | Imagerie Fluorescence | NCT03550001 / Not yet recruiting | [41] |
| Carbon nanoparticles (The First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University) | | Nanoparticule de carbone | | n.d. | Imagerie Fluorescence | NCT04482803 / Recruiting | [41] |
| Carbon nanoparticles (LI XIN-XIANG) | | Nanoparticule de carbone | | n.d. | Imagerie Fluorescence | Ph II-III / NCT04759820 | [41] |

Certaines nanoparticules comme les SPIONS ou les nanoparticules de carbone sont évaluées en clinique principalement dans le cadre du diagnostic.

2.2.3.1 AuroShell®

La société Nanospectra Bioscience (USA) développe la nanoparticule AuroShell® (ou thérapie AuroLase®), une particule *core-shell* présentant un cœur de silice SiO_x de 120 nm de diamètre recouvert d'une couche d'or de 15 nm d'épaisseur. Pour augmenter le temps de circulation de la particule et favoriser l'accumulation intra-tumorale, une couche de PEG 5 kDa est greffée à la surface. Le diamètre hydrodynamique du produit final est de 360 nm [62]. Grâce à la couche d'or, la nanoparticule AuroShell® présente des propriétés d'hyperthermie lorsque celle-ci est soumise à un rayonnement proche infra-rouge (NIR). Cette élévation de température est due à un effet de Résonance Plasmon de Surface (SPR) induit par l'absorption des rayons NIR issus d'une source laser placée au niveau de la tumeur (Figure 14). La preuve de concept, faite sur un modèle de cancer de la prostate, a montré une augmentation de 35°C de la zone tumorale en présence d'AuroShell® comparé à 14°C sans la nanoparticule [74]. Aujourd'hui, l'efficacité de ce traitement est évaluée dans le traitement de tumeurs de la prostate néoplasique (NCT04240639). La nanoparticule AuroShell® est injectée par voie intraveineuse, ce mode est apprécié dans le milieu hospitalier pour sa facilité de mise en place. Néanmoins, les travaux précliniques de l'équipe de S.C. Gad *et al.* ont montré la présence de particules dans le foie de chiens un an après injection. Il faut noter que cette rétention n'a pas entraîné de toxicité observée. Cette séquestration dans le foie est dû à la taille importante de ces nanoparticules qui sont largement soumises à l'action du MPS [62] comme développé en Section 2.1.1. Une étude pilote menée sur 16 patients a apporté de bons résultats préliminaires estimant que l'usage d'une telle thérapie dans le traitement du cancer de la prostate est faisable et permettra de diminuer l'usage de médicaments à forts effets secondaires [75]. Cependant, l'irradiation par NIR limite le futur usage de ces nanoparticules à des cancers proches de la peau (là où l'atténuation du rayonnement est faible) ou à des cancers où une fibre optique pourra être insérée, nécessitant une intervention.

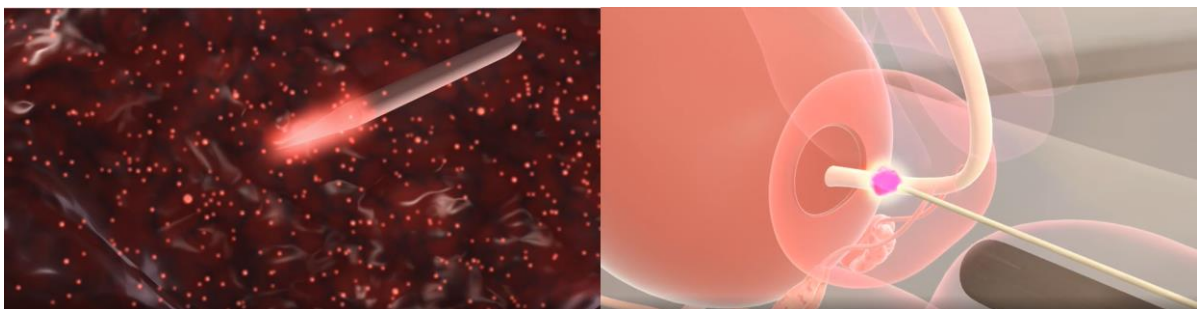


Figure 14. Figure représentant le l'ablation d'une tumeur de cancer de la prostate utilisant les nanoparticules AuroShell®. Adapté du site internet de Nanospectra Bioscience : <https://nanospectra.com/technology/>.

2.2.3.2 NBTXR3®

La société Nanobiotix (France) est l'une des entreprises les plus avancées dans la lutte contre le cancer par les nanoparticules. En effet, le candidat dispositif médicament NBTXR3® (Hensify/PEP503) a déjà obtenu le marquage CE en 2019 dans le cadre du traitement de certains sarcomes des tissus mous (STS). Le médicament NBTXR3® est une nanoparticule sphérique d'oxyde d'hafnium ($Z=72$) de 50 nm de diamètre hydrodynamique recouverte d'un agent biocompatible présentant des groupements phosphate lui assurant une charge de surface négative de l'ordre de -50 mV [65] (Figure 15). Le numéro atomique élevé de l'hafnium permet de générer plus de ROS dans l'environnement de la nanoparticule lorsque celle-ci est soumise aux rayonnements ionisants de la radiothérapie entraînant l'apoptose des cellules environnantes [76]. Il est intéressant de noter que ce produit est injecté par voie intra-tumorale nécessitant une opération et limitant ainsi son usage aux tumeurs accessibles. L'efficacité de cette nanoparticule fait actuellement l'objet de 11 essais cliniques actifs (3 portant sur l'action unique de la nanoparticule et 8 autres sur l'action de la nanoparticule couplée à une chimiothérapie ou une immunothérapie). Son efficacité est principalement évaluée dans les cancers tête et cou, du foie et du pancréas.

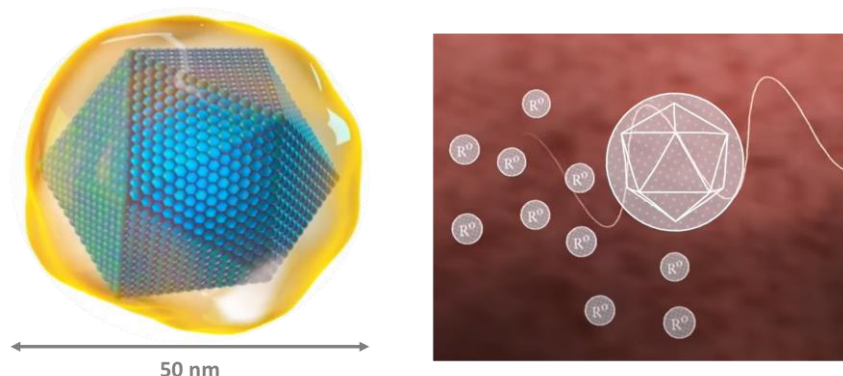


Figure 15. Représentation schématique de la nanoparticule NBTXR3® et de son mode d'action. Adapté du site internet de Nanobiotix : <https://www.nanobiotix.com/>

2.2.3.3 CYT-6091®

La société Cytimmune Sciences (USA) développe une GNP visant à devenir une plateforme inorganique pour la libération d'agents thérapeutiques. Le premier candidat médicament de cette société, le CYT-6091® (Aurimmune®), est une nanoparticule d'or présentant à sa surface des protéines TNF- α liées à la nanoparticule par la formation de liaisons S-Au [48]. Les protéines TNF- α jouent un rôle dans le mécanisme d'angiogenèse ainsi que dans l'activation de la réponse immunitaire [77]. L'ensemble nanoparticule/TNF- α présente un diamètre hydrodynamique de 34 nm et est ensuite recouvert de PEG via l'utilisation de PEG-SH pour augmenter la furtivité de l'ensemble vis-à-vis du système immunitaire. Les résultats de l'essai clinique de phase I (NCT00356980) ont démontré la capacité de CYT-6091® à cibler les différentes tumeurs. De plus, l'utilisation de CYT-6091® a permis d'augmenter la dose maximale de TNF- α injectable par voie intraveineuse d'un facteur 3 [78]. Le 15 juin 2020, Cytimmune et le NCI ont signé un accord pour le lancement d'un essai clinique de phase II qui n'a, à ce jour, pas commencé. En attendant le début de nouveaux essais cliniques, la société Cytimmune développe plusieurs

déclinaisons de sa particule CYT-6091[®]. On retrouve ainsi des produits dits de première génération où le TNF- α est remplacé par d'autres agents d'immunothérapies tel que IFN γ (CYT-IFLg) ou IL-12 (CYT-IL-12) [63]. Les produits de seconde génération offrent quant à eux la possibilité de délivrer de façon simultanée des agents de chimiothérapie et d'immunothérapie (Figure 16) La particule CYT-21625 conjugue ainsi sur la même nanoparticule des TNF- α et l'anticancéreux Paclitaxel [79]. Comme les nanoparticules organiques, les produits CYT s'inscrivent donc dans la thématique de vectorisation d'agents thérapeutiques déjà existants plus que dans le développement de nanoparticules intrinsèquement thérapeutiques.

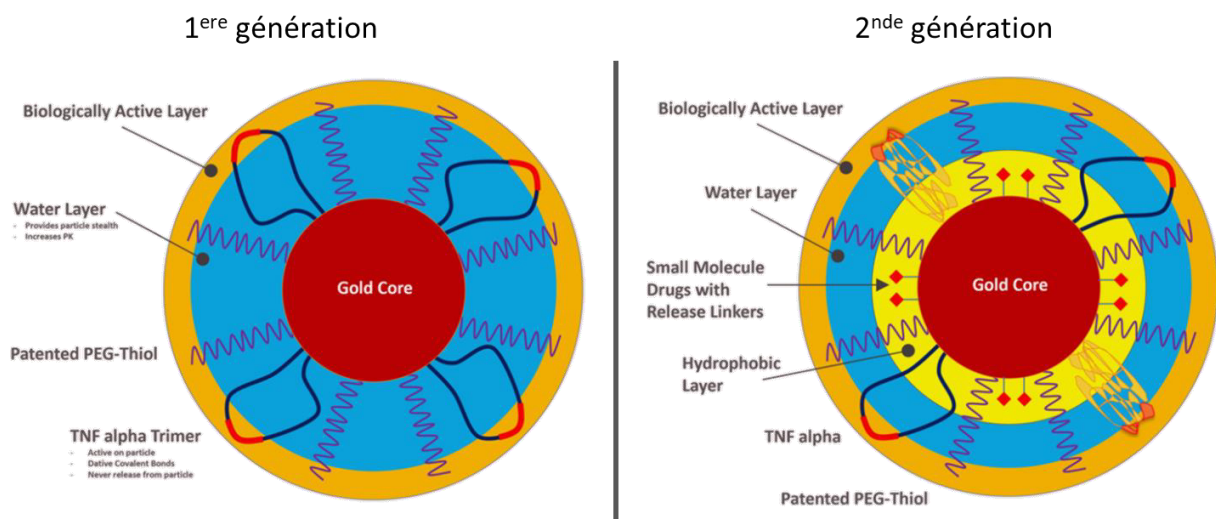


Figure 16. Illustration schématique de l'organisation des produits CYT de première et seconde génération. Adapté du site internet de Cytimmune Sciences : <https://www.cytimmune.com/tech>.

2.2.3.4 NU-0129[®]

Dans le même domaine, l'université de Northwestern (USA) a développé une nanoparticule d'or de 13 nm de diamètre recouverte d'ARN interférant (RNAi, ou *Small Nucleic Acid* = SNA) qui neutralise l'expression du gène Bcl2L12 surexprimé chez les patients atteints de glioblastome (GBM), un cancer du cerveau très agressif. En effet, ce gène Bcl2L12 inhibent l'expression de la protéine p53 impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, notamment via le mécanisme d'apoptose, rendant le développement des cellules cancéreuses incontrôlé participant ainsi à l'agressivité du GBM[80] participant ainsi à l'agressivité du GBM. L'ensemble, nanoparticule et RNAi, nommé NU-0129[®], présente un diamètre hydrodynamique de 34 nm [69] (Figure 17). Les résultats de l'essai clinique de phase 0 portant sur 8 patients ont récemment été publiés. Ces résultats ont mis en avant la capacité de NU-0129[®] à traverser la barrière hématoencéphalique. De plus, grâce à l'ARN interférant, l'activité du gène Bcl2L12 a significativement diminué dans les tumeurs ayant internalisé la nanoparticule après injection intraveineuse [70]. La diminution de l'activité de ce gène mène au rétablissement du mécanisme d'apoptose chez les cellules cancéreuses limitant le développement tumoral.

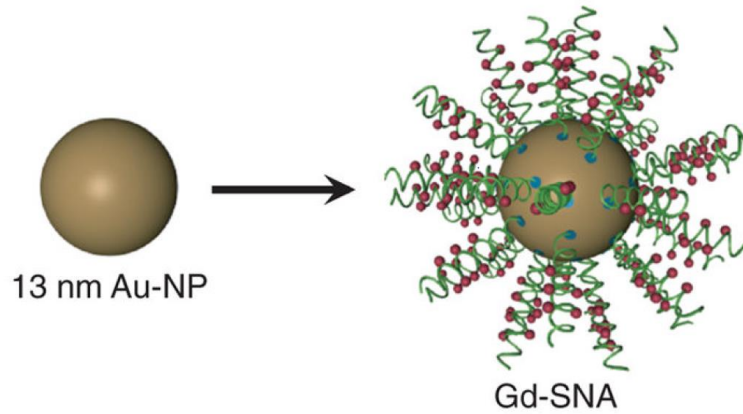


Figure 17. Représentation schématique de la nanoparticule NU-0129®. Adapté du travail de Jensen et al [69].

2.2.3.5 NanoTherm®

La société MagForce (Allemagne) est la première société à avoir obtenu le marquage CE pour une nanoparticule inorganique à but thérapeutique dans le cadre de la lutte contre le cancer. En effet, son produit NanoTherm® a été approuvé en 2010 pour le traitement du Glioblastome par hyperthermie magnétique [57]. NanoTherm® est une nanoparticule d'oxyde de fer recouverte d'une couche brevetée de dérivé d'aminosilane, l'ensemble mesurant 20 nm de diamètre (voir Figure 18) [71]. Grâce à ses propriétés magnétiques, la nanoparticule génère un échauffement local lorsqu'elle est soumise à un champ magnétique sinusoïdal intense comparable à celui que l'on retrouve dans les machines IRM. Ce phénomène est appelé hyperthermie magnétique. Les deux principaux mécanismes impliqués dans la production de chaleur sont le phénomène d'hystérésis et le phénomène de relaxation [81]. Le produit NanoTherm® est donc injecté par voie intra-tumorale et son usage thérapeutique nécessite l'usage d'un appareil spécifique : le NanoActivator®. L'intervention nécessaire à l'introduction des nanoparticules ainsi que le prix d'un tel équipement peuvent être des freins à la démocratisation de ce type de traitement innovant. Malgré ces difficultés la société a débuté en Novembre 2021 un nouvel essai clinique de phase 2B sur l'ablation par hyperthermie magnétique de tumeurs de cancers de la prostate (NCT05010759).

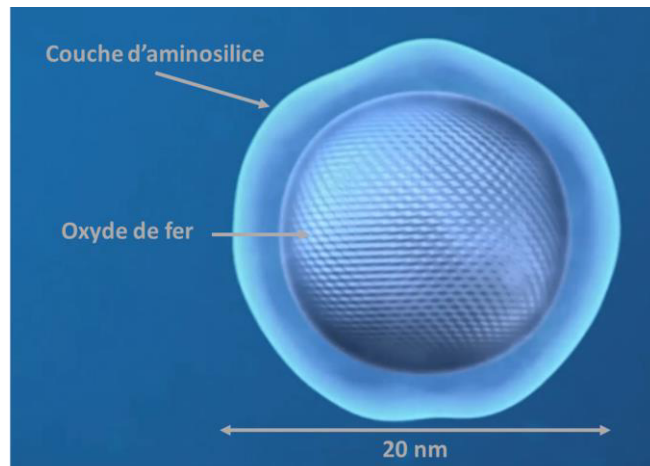


Figure 18. Illustration schématique de la nanoparticule NanoTherm®. Adapté du site : <https://www.magforce.com/home/>.

2.2.3.6 C-dot® (Cornell-dot)

La société Elucida Oncology (USA), en partenariat avec l'université de Cornell, développe la nanoparticule C'-dot. Anciennement nommée C-dot®, les deux nanoparticules sont très proches du point de vue des caractéristiques physico-chimiques. La principale différence vient du changement de la voie de synthèse opéré en 2015, milieu alcoolique pour C-dot et milieu aqueux pour C'-dot [82]. La nanoparticule C'-dot est une nanoparticule de silice encapsulant le fluorophore Cy5.5 ou Cy5. Cette nanoparticule est ensuite recouverte de PEG ainsi que de PEG fonctionnalisés avec un marqueur peptidique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (protéine transmembranaire liée à la neo-vascularisation tumorale [72]), le cRGDY. L'ensemble présente un diamètre hydrodynamique inférieur à 10 nm (Figure 19) [83]. Comme indiqué en Section 2.1., une telle taille offre de très bonnes propriétés d'élimination de l'organisme par voie rénale car la taille est inférieure au seuil de filtration des reins [16]. La société Elucida adapte ensuite la fonctionnalisation de sa plateforme C'-dot selon le cadre thérapeutique. Aujourd'hui, la nanoparticule C'-dot est principalement évaluée en clinique dans des applications d'imagerie médicale multimodale. Dans sa version initiale cRGDY-PEG-Cy5.5-C'-dot, la nanoparticule est utilisée afin d'assister la localisation des ganglions sentinelles pendant une biopsie chez des patients atteints de mélanome (NCT02106598). Ceci est rendu possible grâce au fluorophore enfermé dans le cœur de silice. Les résultats ont démontré que l'usage de ces nanoparticules, même après injection en faible quantité par voie intraveineuse, a permis d'améliorer les conditions de biopsie en facilitant l'identification des tissus cancéreux [84]. Deux autres versions de la nanoparticule sont radiomarquées respectivement à l' ^{124}I (NCT01266096) et au ^{89}Zr (NCT02106598) permettant ainsi une détection par imagerie PET, en plus de la détection par fluorescence. Les résultats de l'essai NCT01266096 ont démontré un bon ciblage des tumeurs sans effets secondaires grâce aux nanoparticules [85]. Il est intéressant de noter que l'imagerie de fluorescence est principalement utilisée dans le cadre interventionnel. C'est dans ce cadre-là, en complément de l'imagerie PET, que les nanoparticules C'-dot présentent une multi-modalité d'imagerie [86]. Dans l'essai clinique NCT04167969, on retrouve une nanoparticule C'-dot où le marqueur cRGDY est remplacé par un peptide anti-PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen). Un radiomarquage au ^{64}Cu est aussi effectué. Cette nanoparticule ^{64}Cu -NOTA-PSMAi-PEG-Cy5.5-C'-dot est évaluée dans le cadre de l'imagerie de tumeur de cancer de la prostate (imagerie PET) post-interventionnelle

(imagerie de fluorescence). Bien que les produits d'Elucida que l'on retrouve en clinique se présentent comme des outils d'imagerie, la société développe aussi des nanoparticules visant à apporter un aspect thérapeutique grâce à la délivrance de médicament dans la zone tumorale [87,88].

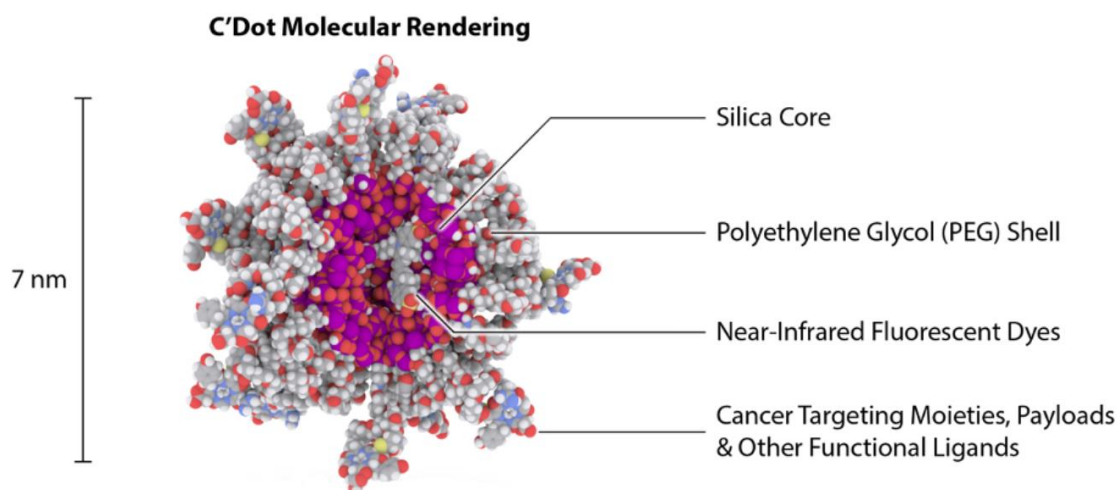


Figure 19. Représentation schématique de l'architecture des particules C'Dot. Adapté du site : <https://www.elucidaoncology.com/our-science>.

2.2.4 AGuiX[®] : Un candidat médicament

2.2.4.1 Description et mode d'action

AGuiX[®] (Activation et Guidage de l'Irradiation X) est une nanoparticule hybride ultrafine à base de polysiloxane et de gadolinium. Elle est développée depuis plus de dix ans par l'ILM à l'Université Claude Bernard Lyon 1 [89] et exploitée depuis 2015 par la société NH Theragix afin d'apporter cette nanoparticule innovante sur le marché.

2.2.4.1.1 Caractéristiques chimiques et biocompatibilités

AGuiX[®] est une nanoparticule inorganique avec un cœur de silice présentant des groupements chélateurs DOTAGA (2-(4,7,10-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododécane-1-yl) pentanedioic acid) greffés à sa surface de façon covalente par formation d'une liaison amide. Le DOTAGA est un ligand macrocyclique dérivée du DOTA (acide 1,4,7,10-tetraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique) qui offre, après greffage, huit sites coordinations libres pour la chélation d'ions Gd³⁺. Le complexe DOTAGA(Gd)⁻ présente une très grande stabilité (log K = 24,7) et une cinétique de dissociation lente [90]. Ces groupements sont chélatés à plus de 98% par des ions Gd³⁺. Le taux massique de gadolinium dans le produit AGuiX[®] est de l'ordre de 12 %. Les groupements DOTAGA restants sont libres et peuvent chélater d'autres éléments d'intérêts tels que des radio éléments [91].

De par son procédé de synthèse faisant intervenir de l'APTES (3-Aminopropyl)triéthoxysilane), AGuIX[®] possède aussi à sa surface des groupements NH₂ qui peuvent être utilisés comme point de greffage à des fins de fonctionnalisation avec des biomolécules par exemple (anticorps, peptides, ...) [92].

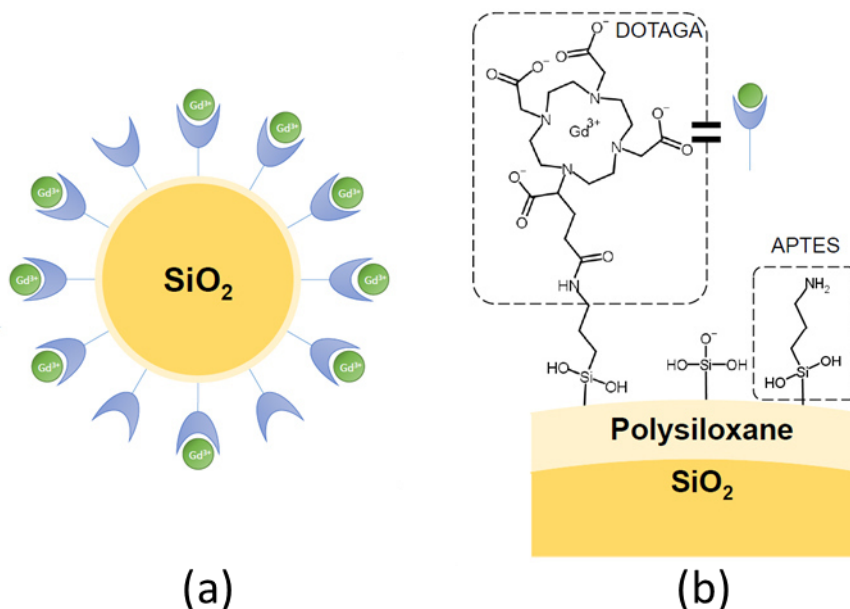


Figure 20. Représentation schématique (a) de la structure d'AGuIX[®] et (b) de sa surface.

La matrice polysiloxane du corps d'AGuIX[®] est un matériau très largement considéré comme biocompatible. De plus, cette matrice est soumise à dégradation, les sous-produits issus de cette dégradation sont de petits fragments TEOS_x-APTES_y-DOTAGA(Gd)_z venant de l'hydrolyse du cœur de la nanoparticule [93].

Du point de vue de ses caractéristique physiques, AGuIX[®] présente un diamètre hydrodynamique de 5 ± 2 nm, une charge de surface proche de la neutralité à pH physiologique [94] et un aspect sphérique. Ainsi, comme évoqué dans la Section 2.1., AGuIX[®] cible les tumeurs par effet EPR et est principalement éliminé par voie rénale comme en attestent les conclusions de l'essai clinique « NANO RAD I ». Les résultats menés sur 15 patients atteints de métastases cérébrales (354 au total) de cancers primaires divers ont démontré une demi-vie plasmatique du produit de 1,3h en moyenne, ainsi que la capacité d'AGuIX[®] à cibler les tumeurs. Il est intéressant de noter ici que cet essai démontre la capacité d'AGuIX[®] à traverser la barrière hémato-encéphalique et à être concentré dans la tumeur par effet EPR [95].

2.2.4.2 Mode d'action

2.2.4.2.1 Agent de contraste IRM

Le gadolinium est un élément de la famille des lanthanides avec un numéro atomique élevé ($Z=64$). Son nombre de coordination varie entre 8 et 10. Il est usuellement rencontré sous le degré d'oxydation +III [90]. Sous sa forme ionisée, le gadolinium présente une structure électronique avec 7 électrons non appariés, ce qui fait de lui l'ion métallique paramagnétique avec le spin le plus élevé [96]. Grâce à ses propriétés, le gadolinium est utilisé

en clinique en tant qu'agent de contraste positif pour l'imagerie à résonance magnétique (IRM). Vendu sous forme complexé par des ligands afin d'éviter la toxicité induite par l'ion libre, les agents de contraste basés sur du gadolinium (GBCA) sont les produits de contraste IRM les plus utilisés en clinique. On distingue 2 familles de GBCA dépendantes de la nature du ligand. Les ligands linéaires (Magnevist®, Omniscan®, ...) sont de moins en moins utilisés car suspectés de relarguer du gadolinium libre dans l'organisme [97]. La famille des ligands cycliques et macrocyclique (Dotarem®, Gadovist®, ...) est toujours utilisée en clinique car très stable vis-à-vis de la séquestration du Gd^{3+} . Sous forme ionique, le Gd^{3+} est considéré comme toxique car il est à l'origine de fibroses systémiques néphrogéniques (NSF) [98]. De plus, plusieurs travaux ont mis en évidence la déposition de gadolinium dans le cerveau et sa périphérie à la suite de l'injection d'agents de contraste [98–100]. Cependant, la grande stabilité du complexe DOTAGA(Gd) limite très fortement le risque de relargage de Gd^{3+} *in vivo*. Il existe déjà sur le marché des agents de contraste à base de gadolinium complexé (Dotarem®, Gadovist®, ...). Aussi, de nombreuses études réalisées sur des rats, souris et singes ont démontré la bonne tolérance d'AGuIX® même injecté jusqu'à 500 mg/kg [101–103]. Les conclusions de l'essai clinique de phase I « NANO RAD I » en escalade de dose, ont démontré la bonne tolérance d'AGuIX® pour chacun des 15 patients traités par des doses allant de 15 mg.kg⁻¹ à 100 mg.kg⁻¹ [95]. Le DOTAREM® est un des agents de contraste IRM les plus utilisés, le complexe associé à ce médicament est le DOTA(Gd) qui est très proche du DOTAGA(Gd) greffé à la surface d'AGuIX®. De la même manière que le DOTAREM® présente des propriétés magnétiques intéressantes pour l'imagerie, AGuIX® possède aussi des caractéristiques d'agent de contraste positif pour l'IRM comme indiqué en Figure 21.

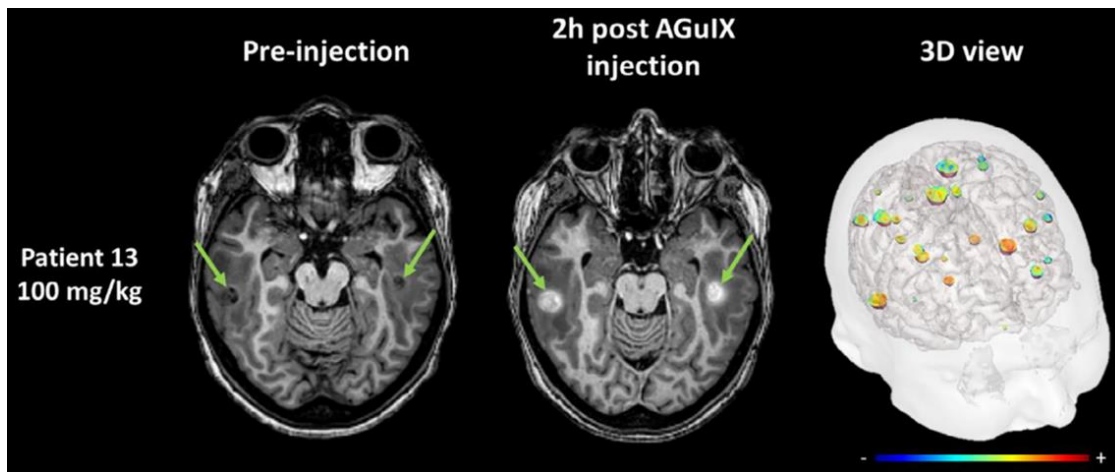


Figure 21. Mise en évidence des propriétés d'agents de contraste d'AGuIX®. Image IRM du patient 13 de l'essai « NanoRad I ». Adapté de Verry et al. [95].

AGuIX® a démontré des propriétés de persistance intratumorale permettant ainsi d'imager les tumeurs jusqu'à 8 jours après l'injection de la nanoparticule. Cette rétention permet d'imager plusieurs fois avec une seule injection. De manière intéressante, la durée du signal n'excède pas 2 heures après injection dans les zones saines du cerveau [95] mettant en évidence les caractéristiques de rétentions des nanoparticules par les tissus tumoraux (effet EPR).

2.2.4.2.2 Mode d'action : Radiosensibilisation

La radiothérapie est un traitement local des tumeurs. Elle consiste en l'irradiation ciblée des tumeurs par des rayons ionisants. Cette irradiation entraîne la mort des cellules cibles par divers mécanismes dont les 2 principaux sont :

- Action directe : cassures directes d'un seul et/ou des 2 bras de l'ADN qui entraînent l'apoptose
- Action indirecte : augmentation locale du stress oxydant par la génération de ROS interagissant avec l'ADN

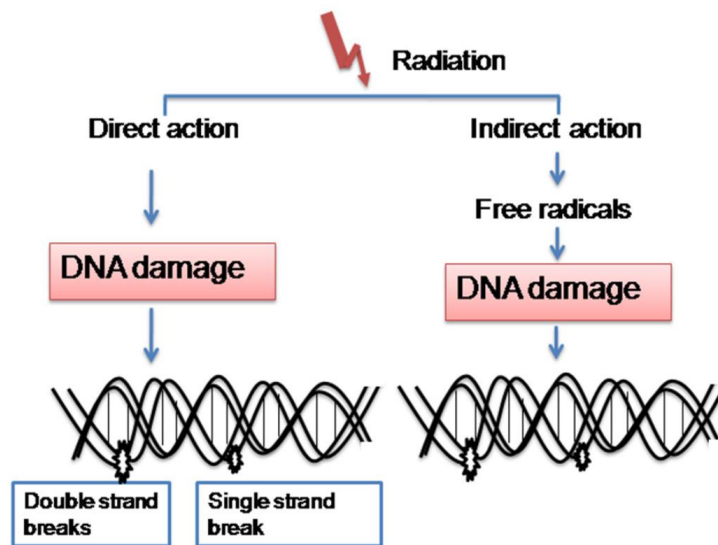


Figure 22. Mode d'action de l'irradiation par 2 mécanismes majeurs : (1) Induction d'une ionisation directement sur le bras d'ADN (2) Génération de ROS qui entraînent des dommages cellulaires.

En effet, la radiolyse de l'eau (60% du poids d'un adulte, 80% de la composition d'une cellule) produit une grande variété d'espèces, des plus oxydantes ($\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , O_2) au plus réductrices ($\cdot\text{H}$, e^-_{aq} , $\cdot\text{O}_2$). Ces espèces chimiques très réactives, communément appelées *Reactive Oxygen Species* (ROS), entraînent des dommages au niveau biologique et contribuent à hauteur de 60% des dommages dus à la radiothérapie par rayon X [104].

Il existe plusieurs types d'irradiations possédant chacune leurs spécificités (rayon X, rayon γ , électrons, neutrons particules chargées). En clinique, c'est l'irradiation par rayon X qui est la plus répandue. La dose reçue par les patients se mesure en Gray (1 Gy = 1 J/Kg) et dépend de nombreux paramètres tels que le type de cancer, la taille et emplacement de la tumeur. En moyenne, la dose reçue oscille entre 45 et 80 Gy. Cette irradiation est fractionnée au cours de plusieurs séances. La plupart des séances de radiothérapie sont réalisées avec des irradiateurs 6 MV qui permettent la production de rayons X de haute énergie pénétrant profondément sous la peau.

L'interaction des rayons X avec la matière dépend de l'énergie incidente (E) et du numéro atomique (Z) de l'élément rencontré.

Pour de faibles énergies ($E < 100\text{keV}$), l'effet photoélectrique est prépondérant. Il consiste en l'absorption d'un photon X par un atome, entraînant l'expulsion d'un électron (photoélectron) situé dans les couches électroniques internes de l'atome. La lacune de la couche électronique est ensuite comblée par un électron d'énergie plus élevée. Finalement, cette énergie est libérée sous forme de photons et/ou d'autres électrons appelés électrons Auger. Ces électrons libérés dans l'environnement de l'interaction génèrent ainsi des ROS (voir Figure X). L'effet photoélectrique dépend du matériau et varie en Z^4 ou Z^5 .

Pour des énergies moyennes (100keV à quelques MeV), l'effet Compton apparaît. Il consiste en la collision d'un photon incident avec un électron des couches externes. Seule une partie de l'énergie est transmise à l'électron, le reste est libéré par la diffusion d'un photon d'énergie inférieure (voir Figure X). Le photon diffusé va à son tour, et selon son énergie entraîner un effet photoélectrique ou Compton.

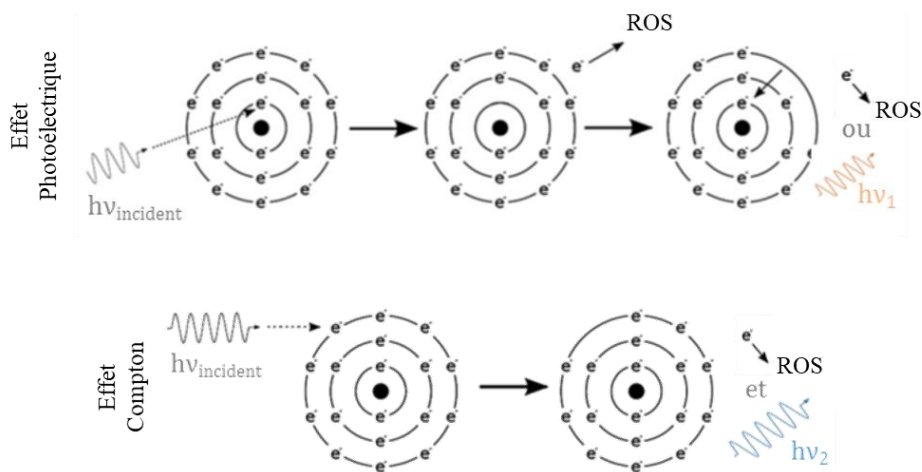


Figure 23. Schéma illustrant (haut) l'effet photoélectrique et (bas) l'effet Compton. Figure adaptée de Butterworth et al. [76].

A travers ces 2 phénomènes, on comprend ici l'intérêt d'utiliser des matériaux avec un haut numéro atomique. Des études théoriques [105–107] et expérimentales [108–110] ont démontré que la production de ROS pouvait être grandement augmentée dans l'environnement de nanoparticules composées d'éléments au numéro atomique Z élevé. L'émission d'électrons suite à l'interaction avec les nanoparticules entraîne la génération de ROS localement et conduit à la mort des cellules proches de la nanoparticule. Cet effet est connu comme effet radiosensibilisant (*radiosensitizing effect*). La quantité de ROS produite dépend principalement de l'énergie du rayonnement incident et du numéro atomique Z rencontré. Plus Z est important plus la quantité de ROS générée est élevée [108]. Ainsi, comme indiqué Figure 24.b., on remarque bien que l'augmentation locale de la dose relative délivrée est d'autant plus forte que Z est grand. Les éléments les plus étudiés pour la radiosensibilisation sont l'or ($Z=79$) [50,111], l'hafnium ($Z=72$) exploité à travers la société Nanobiotix sous forme d'oxyde (Voir Section 2.2.3.2) et le gadolinium ($Z = 64$) avec NH Theraguix et la nanoparticule AGuIX®. Le bismuth est un élément intéressant dans le processus de radiosensibilisation car il est l'élément stable le plus lourd.

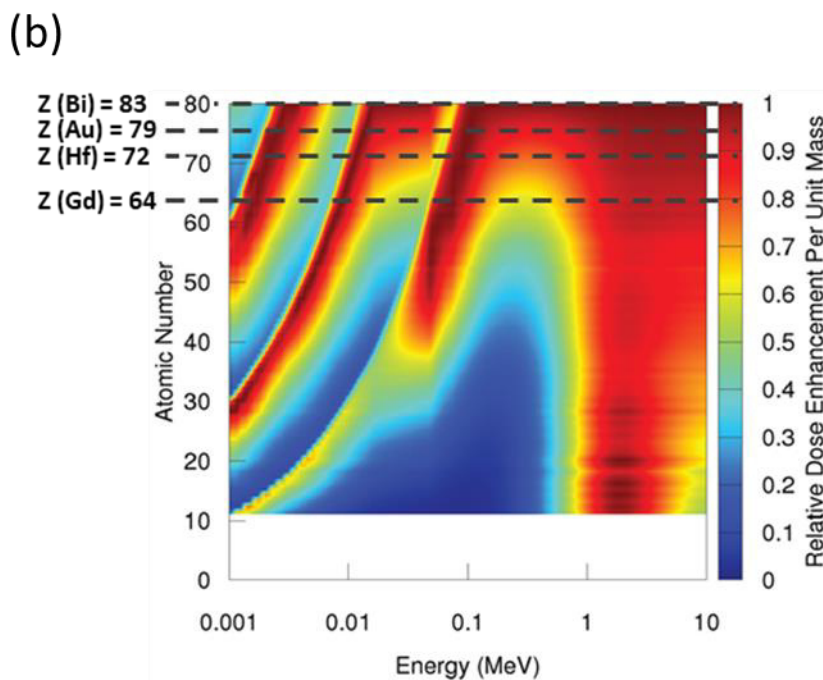
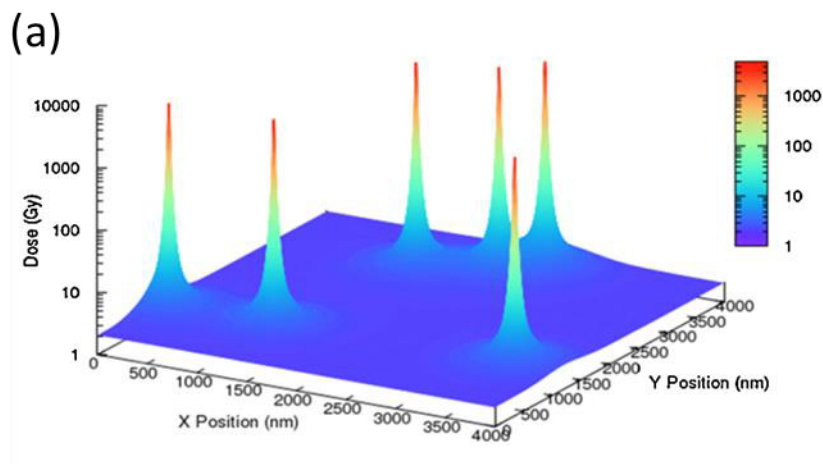


Figure 24. (a) La simulation de la dose locale déposée après l'irradiation des nanoparticules à 2 Gy fait apparaître des nano-spots de haute énergie. Figure issue de Lux et al. [103] (b) Augmentation relative de la dose d'irradiation délivré par unité de masse en fonction de l'énergie incidente et du numéro atomique Z. Les éléments lourds augmentent de façon significative la dose relative et cela même pour des faibles énergies. Figure adaptée de McMahon et al [105].

Pour résumer le principe de thérapie avec la nanoparticule AGuIX[®] est le suivant : (i) après injection intraveineuse, la nanoparticule s'accumule dans la tumeur (<1% de la dose injectée [112]) ou est filtrée par les reins, (ii) un examen IRM permet ensuite de localiser la tumeur grâce aux propriétés de contraste du gadolinium lié à la particule, (iii) cette tumeur est ensuite la cible des rayons de la radiothérapie, qui en interagissant avec AGuIX[®] génère une grande quantité de ROS qui va entraîner la mort des cellules tumorales environnantes.

2.2.4.3 Synthèse

La synthèse d'AGuIX[®] comporte des étapes de type « bottom-up » puis « top-down » et est détaillée dans la Figure 25 [113,114].

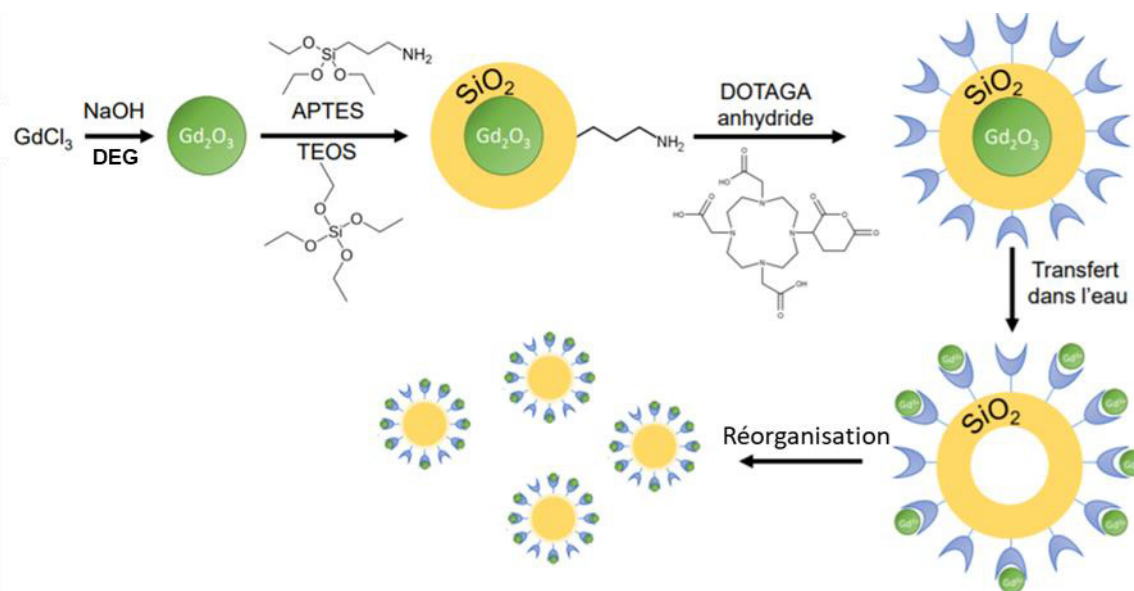


Figure 25. Schéma de la synthèse de AGuIX[®] [115], comme décrite par Mignot et al. [113].

Après l'obtention de cœurs d'oxyde de gadolinium [116], on les encapsule dans une couche de polysiloxane. Cette couche est obtenue grâce à la chimie « sol-gel » de la silice [117]. Le mélange de silanols APTES et TEOS initialement introduits va subir des étapes d'hydrolyse-condensation qui vont mener à l'obtention de la couche de polysiloxane. Le TEOS a été choisi pour réticuler et densifier le réseau de silice. L'APTES a été choisi pour ses groupements amine, il apporte ainsi à la couche de silice des groupes chimiques réactifs qui pourront être utilisés comme pour des greffages ultérieurs [92,118–121]. L'étape suivante consiste en le greffage de DOTAGA à la surface du réseau de silice. Le greffage se fait par l'ajout de DOTAGA-Anhydride. Le groupement anhydride réagit avec les amines de l'APTES pour former une liaison amide permettant de greffer de façon covalente le DOTAGA à la couche de silice. Ces groupements DOTAGA sont capables de former des complexes très stables avec les lanthanides comme le gadolinium. Finalement, les nanoparticules sont transférées dans l'eau, on observe alors la dissolution du cœur d'oxyde de gadolinium ce qui libère les ions Gd^{3+} qui sont captés par les DOTAGA en surface. La disparition de l'oxyde au cœur de la nanoparticule provoque l'effondrement de la structure de silice menant ainsi à des nanoparticules ultrafines : le produit AGuIX[®]. La solution est ensuite purifiée, filtrée à $0,2\mu m$ puis enfin lyophilisée. Le produit final se présente sous la forme d'une poudre marron comme présenté en Figure 26.



Figure 26. Présentation d'un flacon d'AGuIX®.

2.2.4.4 Perspectives et développement

AGuIX® fait l'objet de plusieurs essais cliniques détaillés dans la Figure 27. Un premier essai de phase 1 portant sur le traitement de métastases cérébrales par irradiation globale du cerveau a été conclu avec succès (NANORAD 1). Ainsi, quinze patients avec 354 métastases ont été inclus. Aucun effet toxique limitant la dose n'a été observé jusqu'à des injections de 100 mg/kg. La demi-vie d'élimination plasmatique d'AGuIX® était similaire pour tous les groupes (moyenne 1,3 h; plage de 0,8 à 3 heures). Un ciblage efficace des métastases (amélioration de l'IRM T1, sélectivité tumorale) et la persistance de l'amélioration du contraste AGuIX® ont été observés dans les métastases. La concentration d'AGuIX® dans les métastases après administration était proportionnelle à la dose injectée. Il est important de noter que treize des quatorze patients évaluable ont eu un bénéfice clinique du traitement, avec soit une stabilisation soit une réduction du volume tumoral. L'analyse IRM a montré une corrélation significative entre le contraste et la réponse tumorale, favorisant ainsi un effet radiosensibilisant [95]. AGuIX® cible donc spécifiquement les métastases cérébrales et est retenue dans les tumeurs jusqu'à 1 semaine. Ces résultats encourageant ont mené au démarrage d'une étude de phase 2 afin d'évaluer définitivement l'efficacité de la nanoparticule (NANORAD 2). La société a démarré un autre essai clinique de phase 2 aux Etats-Unis (NANOBRAIMETS). La nanoparticule AGuIX® est également utilisée pour évaluer en clinique d'autres indications comme le cancer de l'utérus (NANOCOL), du pancréas et du poumon (NANOSMART) ou encore le glioblastome (NANO-GBM).

Si l'efficacité du médicament se vérifie au travers les essais cliniques, AGuIX® présente un fort potentiel d'usage de par sa large gamme d'applications dû à son mode d'action, sa facilité d'injection par voie intraveineuse, son élimination rénale et sa très bonne tolérance. De plus, le développement de nouvelles machines médicales comme les MRI-LINAC offrant la possibilité d'imagerie IRM couplée à une source de radiothérapie rend l'usage

d'AGuIX® encore plus pertinent [122]. AGuIX® est ainsi à l'étude dans 5 essais cliniques comme indiqués en Figure 27.

| Indications | Protocol | Location | Preclinical | Clinical Stage | | |
|---|--|---|--------------------|----------------|---------|---------|
| | | | | Phase 1 | Phase 2 | Phase 3 |
|  Brain Metastases | NANORAD 2 CHU Grenoble-Alpes 100 patients randomized |  | Recruiting Phase 2 | → | | |
| | NANOBRAINMETS Dr. Aizer at Dana-Farber/Harvard Cancer Center 134 patients randomized |  | Recruiting Phase 2 | → | | |
|  Cervical Cancer | NANOCOL Institut Gustave Roussy 12 patients |  | Recruiting Phase 1 | → | | |
|  Pancreatic/ Lung Cancer | NANOSMART Dr. Leeman at Dana-Farber/Harvard Cancer Center 100 patients randomized |  | Recruiting Phase 1 | → | | |
|  Glioblastoma | NANO-GBM Centre Jean Perrin 66 patients randomized |  | Recruiting Phase 1 | → | | |

Figure 27. Pipline de développement de la société NhTheraguix pour le candidat médicament AGuIX®. Issue du site de NhTheraguix : <https://nhtheraguix.com/pipeline/>.

2.3 Objectifs de thèse

Cette thèse présente deux intérêts distincts. Premièrement, une grande partie de la thèse se focalise sur l'analyse de la nanoparticule AGuIX®. Le but étant de développer des nouvelles méthodes d'analyse et de les coupler aux caractérisations de routine d'AGuIX® afin de réaliser un bilan des caractéristiques physico-chimiques de la nanoparticule le plus complet possible. Deuxièmement, cette thèse vise le développement d'une seconde génération d'AGuIX® proposant des thérapies plus performantes en oncologie. Plusieurs projets ont été menés en parallèle au contact de différents partenaires français ou internationaux principalement impliqués dans l'évaluation des propriétés biologiques des nouvelles particules utilisées (voir Figure 28).

Ce manuscrit se compose de 3 chapitres traitant d'une majeure partie des résultats obtenus pendant la thèse. Les résultats biologiques obtenus par les partenaires sont présentés brièvement à la fin des chapitres concernés. Les publications issues de la thèse sont insérées au sein même des chapitres.

En résumé :

- Chapitre 3 : Le but est de réunir une grande variété de caractérisations d'AGuIX® pour déterminer ses propriétés physico-chimiques. La détermination de la taille, la charge, la géométrie tout comme le comportement de la nanoparticule, son processus de fragmentation et leur nature chimique, font partie de ce chapitre. L'ensemble des réponses apportées seront compilées afin de pouvoir extraire une

représentation 3D de la particule. Une partie de ce travail est réalisé avec l'aide de nos partenaires de l'Institut des Sciences Analytiques (ISA, Lyon, France) dans le cadre du projet ANALYTAGUIX.

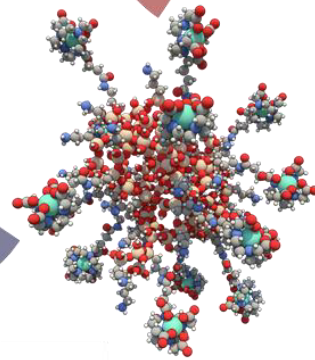
- Chapitre 4 : Le premier projet sur la seconde génération d'AGuIX® consiste en l'apport de nouvelles propriétés anti-tumorales. Après avoir mis en avant la relation entre excès de cuivre et cancer, il vient à l'idée que les groupements DOTAGA complexant initialement le Gd pourraient aussi être utilisés pour induire une déplétion du cuivre au niveau tumoral et les effets anti-tumoraux liés. Ce projet vise donc à mettre en place un procédé de relargage du gadolinium afin d'obtenir une particule AGuIX® pouvant capter le cuivre intratumoral. Après une caractérisation totale, l'activité biologique de ce nouveau produit a fait l'objet d'études *in vitro* et *in vivo* menées par nos partenaires de l'Institut Physique des 2 Infinis (IP2I, Lyon, France).
- Chapitre 5 : Le second projet sur la seconde génération d'AGuIX® consiste à améliorer l'effet radiosensibilisant des nanoparticules, c'est-à-dire leur capacité à améliorer la radiothérapie. Pour se faire, nous avons poussé l'étape de relargage du gadolinium (voir Chapitre 4) générant ainsi une forte quantité de DOTAGA libres capables de complexer du bismuth. Le bismuth est un élément à haut Z permettant d'augmenter l'effet radiosensibilisant. Après une caractérisation structurale et physico-chimique complète, l'activité biologique de ce nouveau produit a fait l'objet d'études *in vitro* et *in vivo* menées par nos partenaires de Harvard Medical School (Boston, USA).

Caractérisation d'AGuIX®

- Usage et interprétation de différentes méthodes analytiques pour la caractérisation d'AGuIX®

CuPRiX : Des propriétés anti-angiogéniques pour un dérivé d'AGuIX®

- Génération de DOTAGA libres à la surface d'AGuIX®



AGuIX(Gd/Bi) : Augmentation de l'effet radiosensibilisant

- Complexation de bismuth pour augmenter l'effet radiosensibilisant

Figure 28. Synthèse des projets de thèse

3 Caractérisation de la nanoparticule AGuIX[®]

Comme évoqué dans le chapitre 2, connaître les caractéristiques structurales et physico-chimiques d'une nanoparticule est primordial pour évaluer son devenir au sein de l'organisme. De plus, une caractérisation approfondie s'appuyant sur différentes techniques de mesure est essentielle pour convaincre les autorités sanitaires lors du complexe processus de validation du médicament. Ainsi, dans ce chapitre, nous nous efforcerons de rappeler les méthodes historiquement utilisées pour caractériser AGuIX[®] et évoquerons les résultats de nouvelles techniques apportant confirmations et/ou nouvelles informations sur les caractéristiques du produit AGuIX[®]. Pour ce faire nous avons analysé un échantillon d'AGuIX[®] par un panel de méthodes analytiques. Grâce à ces informations complémentaires, nous tenterons de fournir la structure 3D la plus représentative possible de la nanoparticule.

3.1 Détermination de taille

3.1.1 Dynamic Light Scattering (DLS)

La taille des nanoparticules peut être évaluée par diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering*), une technique très utilisée dans l'analyse de suspensions colloïdales et reconnue par l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) dans le cadre de son travail d'harmonisation des techniques de caractérisations des nanomatériaux [123]. Cette méthode d'analyse d'ensemble, indirecte et non destructive basée principalement sur le phénomène de diffusion de Rayleigh fournit le diamètre hydrodynamique des particules en présupposant que ce sont des sphères. Les particules en mouvement Brownien dans le milieu vont, en passant devant le faisceau laser, moduler dans le temps l'intensité de la lumière diffusée à un angle donné. Cette modulation dans le temps est reliée à la taille des particules par l'intermédiaire de la fonction d'autocorrélation de l'intensité temporelle. De cette fonction d'autocorrélation de l'intensité diffusée, on peut remonter au rayon hydrodynamique des nanoparticules en solution [124]. La détermination du rayon hydrodynamique d'une particule via la DLS se fait par la détermination du coefficient de diffusion D de l'échantillon. Ce coefficient D est obtenu par l'intermédiaire du temps de relaxation τ de la fonction d'autocorrélation comme exposé dans l'Equation 1.

$$\text{Équation 1 : } 1/\tau = 2Dq^2$$

- τ est le temps de relaxation
- D est le coefficient de diffusion
- q est le vecteur de diffusion ($q=4\pi \sin(\theta)/\lambda$ où 2θ est l'angle de diffusion et λ la longueur d'onde incidente)

Une fois le coefficient D déterminé le rayon hydrodynamique est obtenu via la relation de Stokes-Einstein (Equation 2).

$$\text{Équation 2 : } R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

- R_H est le rayon hydrodynamique de l'espèce analysée
- k_B est la constante de Boltzmann
- η est la viscosité du fluide

Les différentes valeurs évaluées par la DLS lors de l'analyse d'AGuIX® sont présentées dans le Tableau 2 et la répartition volumique en Figure 29.

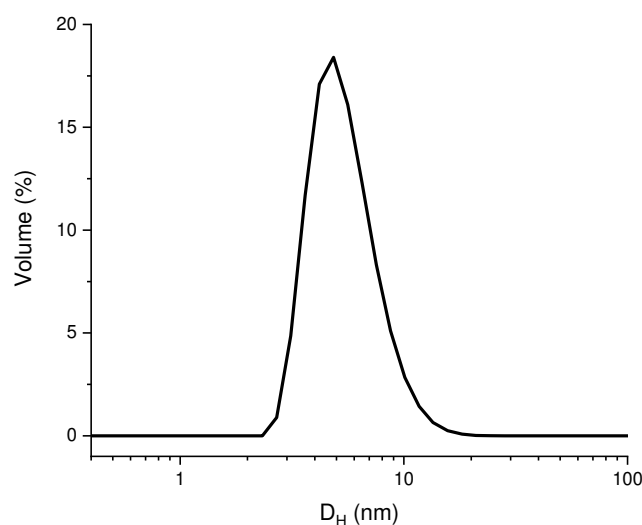


Figure 29. Répartition volumique du diamètre hydrodynamique d'AGuIX®

Tableau 2. Résultats de la mesure DLS de AGuIX®

| Produit | $2R_H = D_H$ (nm) | Z-Average (nm) | PDI |
|---------|-------------------|----------------|-------|
| AGuIX® | $5,6 \pm 2,0$ | 7,5 | 0,204 |

La DLS permet de mesurer le diamètre hydrodynamique proche de $5,6 \pm 2,0$ nm. Cette valeur est la « mode » (ou maximum) de la distribution. Le Z-Average est une mesure utilisée en DLS censée représenter le diamètre de la population gaussienne monodisperse la plus proche de l'échantillon mesuré : ici 7,5 nm. Cette valeur a tendance à être supérieure à la mesure de la nanoparticule car les plus grosses particules diffusent plus de lumière. Néanmoins on retrouve un très bon accord entre le diamètre moyen et le z-average ce qui renforce le caractère monodisperse d'AGuIX®. Le PDI (*PolyDispersity Index*), est un nombre sans dimension indiquant la

largeur de la distribution de taille de l'échantillon. Ainsi, des valeurs inférieures à 0,05 sont rarement observées ailleurs que dans des échantillons hautement monodisperses. En revanche, des valeurs supérieures à 0,7 sont caractéristiques d'échantillons avec une distribution très large et non adaptée à la technique de DLS. Les calculs de ce paramètre sont définis dans les documents standards ISO 13321 :1996 E et ISO 22412:2008.

3.1.2 Taylor Dispersion Analysis (TDA)

Lors de cette thèse, un travail en collaboration avec l'Institut des Sciences Analytiques (ISA, Agnès Hagège, Lucie Labied) a été mené pour développer une nouvelle méthode d'analyse des nanoparticules dans le cadre du projet ANR ANALYTAGUIX. Cette nouvelle méthode est basée sur le phénomène de dispersion de Taylor. Ce phénomène physique, couplé à une détection par ICP-MS permet de déterminer avec précision la taille de nanoparticules contenant des métaux.

La dispersion de Taylor est un phénomène qui a d'abord été décrit par Sir Geoffrey Taylor en 1953, sur la dispersion subie par une molécule soumise à un flux laminaire dans un tube, lorsque la diffusion le long du tube est négligeable. Son principe est schématisé en Figure 30. Un flux laminaire dans un tube de section circulaire a un profil de vitesse parabolique (représenté par les flèches bleues). La vitesse du fluide est maximale au centre du tube, et quasi-nulle aux parois. Lorsqu'un échantillon est injecté, les espèces au centre du tube sont alors plus rapides que les espèces proches des parois, et un gradient de concentration s'établit (en orange).

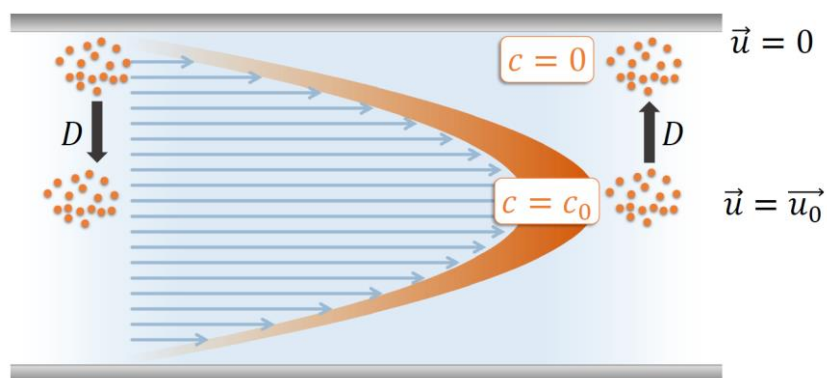


Figure 30. Principe de l'analyse par dispersion de Taylor [115].

Dans ces conditions, seule la diffusion radiale a lieu. Les espèces situées au centre du capillaire diffusent vers les parois et voient alors leur vitesse diminuer. De même, les espèces se situant aux parois diffusent vers le centre et accélèrent. Ces phénomènes de diffusion entraînent une oscillation de la vitesse des espèces en solution autour de la vitesse moyenne. Le signal détecté en sortie du capillaire peut alors être assimilé à un pic gaussien et est appelé un Taylorgramme. Une représentation schématique est donnée en Figure 31. Les petites molécules diffusent rapidement, ce qui mène à un faible écart autour de la vitesse moyenne. Le Taylorgramme déterminé est alors représenté par un pic fin. En revanche, pour un analyte plus gros, tel qu'une protéine ou une nanoparticule, la diffusion est plus lente et le pic observé sera large.

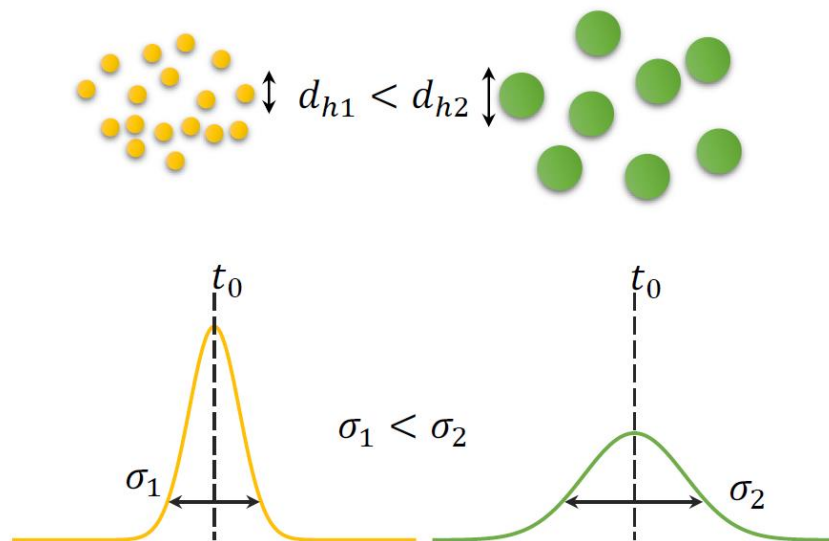


Figure 31. Forme schématique d'un Taylorgramme selon la taille de l'espèce détectée [115].

Dans des conditions optimales, cette méthode permet de remonter au coefficient de diffusion D d'une espèce spécifique par le biais de l'Equation 3.

$$\text{Equation 3 : } D = \frac{R_c^2 t_0}{24\sigma^2}$$

- R_c est le rayon du tube
- t_0 est le temps de résidence moyen du pic
- σ la variance temporelle du pic

De la même manière que lors de la mesure DLS, la détermination du coefficient de diffusion D permet l'obtention du rayon hydrodynamique R_H par l'équation de Stokes-Einstein (Equation 2). Le développement de cette méthode d'analyse est très intéressante dans l'étude de nanoparticules en milieu complexe, étude difficile à mener avec la DLS qui est limitée par sa faible résolution dû aux modalités de la mesure [124]. L'ajout du mode de détection ICP-MS lié à la dispersion de Taylor permet, grâce au suivi du gadolinium, de se focaliser sur la nanoparticule et les potentiels produits issus de son interaction avec un milieu biologique complexe.

Dans le travail de L. Labied et al : «*Taylor Dispersion Analysis Coupled to Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry for Ultrasmall Nanoparticle Size Measurement: From Drug Product to Biological Media Studies* » de 2021 [125] la méthode TDA a été appliquée à la nanoparticule AGuIX[®] afin de déterminer son R_H dans une solution de Tris NaCl à différents pH ainsi que dans des milieux plus complexes tel que : Fluide Cérébro Spinal (CSF), urine synthétique, Tris NaCl avec Albumine Humaine (HSA) ou encore dans du sérum humain. Les résultats de la mesure du R_H d'AGuIX[®] à pH 7,4 sont présentés dans le Tableau 3 ainsi que le Taylorgramme d'AGuIX[®] en Figure 32.

Tableau 3. Détermination du R_H d'AGuIX[®] par TDA-ICP/MS à pH 7,4. Issue de L. Labied et al [125]

| Produit | R_H (nm) | D_H (nm) |
|--------------------|---------------|---------------|
| AGuIX [®] | $2,3 \pm 0,2$ | $4,6 \pm 0,4$ |

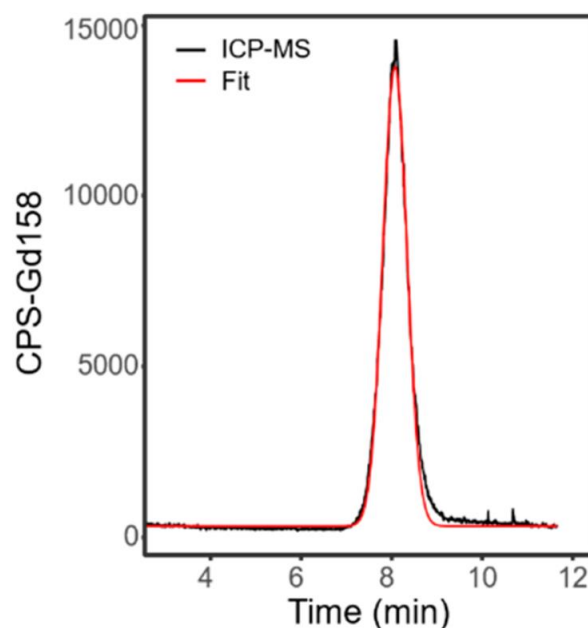


Figure 32. Taylogramme d'AGuIX[®] avec détection par ICP-MS (Gd 158, noir). Fit Gaussien monomodale (rouge) issue de la déconvolution du signal renseignant sur le rayon hydrodynamique d'AGuIX[®] à 0,5 g/L dans une solution de Tris NaCl 150 mM pH 7,4.

Les résultats de la mesure TDA indiquent un diamètre hydrodynamique d'AGuIX[®] de $4,6 \pm 0,4$ nm. Il est intéressant de noter que cette valeur est inférieure à celle obtenue par DLS qui est de $5,6 \pm 0,8$ nm. L'obtention d'une valeur plus grande en DLS peut s'expliquer par le fait que les particules plus grosses de la distribution diffusent plus la lumière, déplaçant ainsi la valeur caractéristique de la distribution vers les plus grandes tailles. Les deux valeurs restent néanmoins très proches et cohérentes entre elles.

3.1.3 Diffusion des rayons X aux petits angles (Small Angle X-ray Scattering SAXS)

La diffusion des rayons X aux petits angles ou *Small Angle X-ray Scattering* (SAXS) est une technique qui permet de mesurer le rayon de giration (R_g) des nanoparticules. Mathématiquement, R_g représente la distance quadratique moyenne de chaque élément de la structure au centre de masse (Equation 4). R_g est similaire à la taille physique mesurée par microscopie électronique, cependant la petite taille d'AGuIX[®] et la faible densité de sa

matrice de silice rendent la mesure par microscopie électronique difficile. La mesure SAXS est une bonne alternative permettant de confirmer des résultats obtenus par d'autres méthodes de mesure de la taille telle la DLS [123].

Equation 4 :
$$R_g = \sqrt{\frac{\sum m_i r_i^2}{\sum m_i}}$$

- m_i est la masse de l'élément i
- r_i est la distance de l'élément i au centre de masse

Si nous supposons que les nanoparticules sont des sphères homogènes, alors le diamètre hydrodynamique D_H peut être facilement calculé à partir de R_g (Equation 5).

Equation 5 :
$$D_H = 2 \cdot \sqrt{\frac{5}{3} \cdot R_g^2}$$

- D_H est le diamètre hydrodynamique
- R_g est le rayon de giration

La Figure 33 explicite le lien entre R_g et R_H afin de mieux comprendre le rapport entre ces 2 mesures.

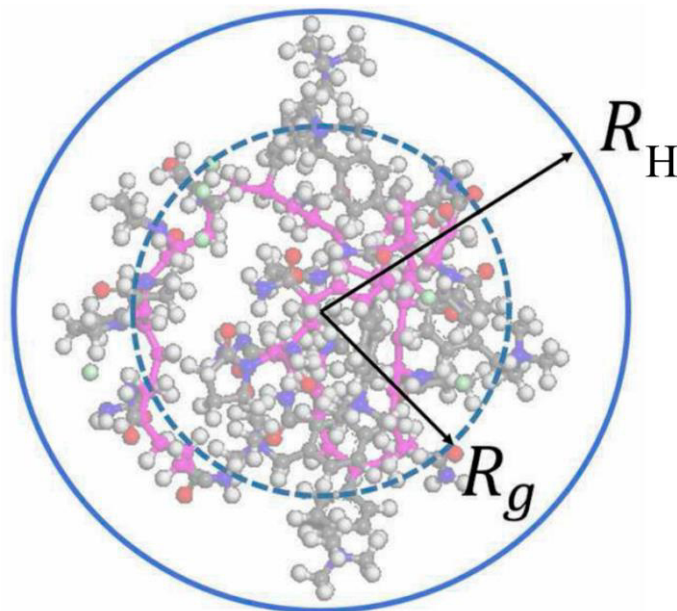


Figure 33. Schéma illustrant le lien entre R_g et R_H [126].

Cette technique de mesure peut être utilisée dans une large gamme de concentration contrairement à la DLS qui nécessite généralement des échantillons dilués afin d'éviter une trop forte absorption ou une trop forte viscosité de l'échantillon.

Le principe de la mesure par SAXS consiste en l'irradiation d'un échantillon par un faisceau de rayons X monochromatique de vecteur d'onde $k_0 = 2\pi/\lambda$ avec λ la longueur d'onde du rayonnement X. Les atomes de l'objet interagissent avec le rayonnement incident donnant lieu à un rayonnement secondaire diffusé. Les ondes lumineuses diffusées interfèrent les unes avec les autres pour créer des motifs d'interférence sur un détecteur. Chaque motif représente le vecteur d'onde de diffusion résultant k_1 . L'intensité diffusée est en général exprimée expérimentalement et théoriquement en fonction du vecteur de diffusion q avec $q = k_1 - k_0$ (voir Figure 34.a.). L'intensité de diffusion I varie (décroit) en fonction du vecteur de diffusion q comme on peut l'observer sur les résultats de la mesure SAXS d'AGuIX® en Figure 34.c.

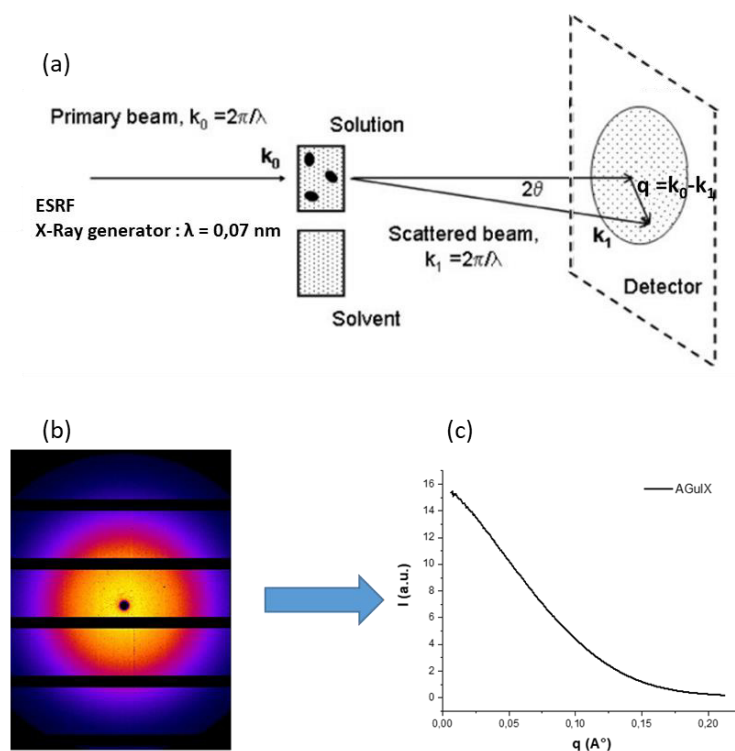


Figure 34. (a) Représentation schématique du principe de la mesure par SAXS. Issue de D. Svergun [127]. (b) Figure de diffraction obtenue lors de l'analyse d'AGuIX® (c) Intensité diffusée I d'une échantillon d'AGuIX® à 100g/L en fonction du vecteur de diffusion q .

L'intensité diffusée est dépendante de paramètres structuraux tels que la taille, la géométrie ou encore la distance entre particules. Il existe différents modèles mathématiques pour exploiter cette fonction de diffusion $I(q)$. La plus utilisée est l'approximation de Guinier. En effet, lorsque que $qR_g < 1$ alors $I(q)$ peut s'exprimer sous la forme d'une fonction exponentielle dépendante du rayon de giration R_g (Equation 7).

Equation 7 Loi de Guinier : $I(q) = I(0) \cdot \exp\left(-\frac{R_g^2 q^2}{3}\right)$

- q est la norme du vecteur de diffusion (\AA)
- R_g est le rayon de giration (\AA)

En représentant $\ln(I) = f(q^2)$ la droite obtenue a une pente directement reliée à R_g (voir Equation 8).

Equation 8 Loi de Guinier : $\ln(I(q^2)) = \ln(I(0)) - \frac{R_g^2}{3} \cdot q^2$

- q est la norme du vecteur de diffusion (\AA)
- R_g est le rayon de giration (\AA)

L'analyse de la fonction de diffusion $I(q)$ issue de AGuIX® à 100 g/L dans l'eau est présentée en Figure 35. Les résultats de R_g et D_H qui en découlent sont présentés dans le Tableau 4.

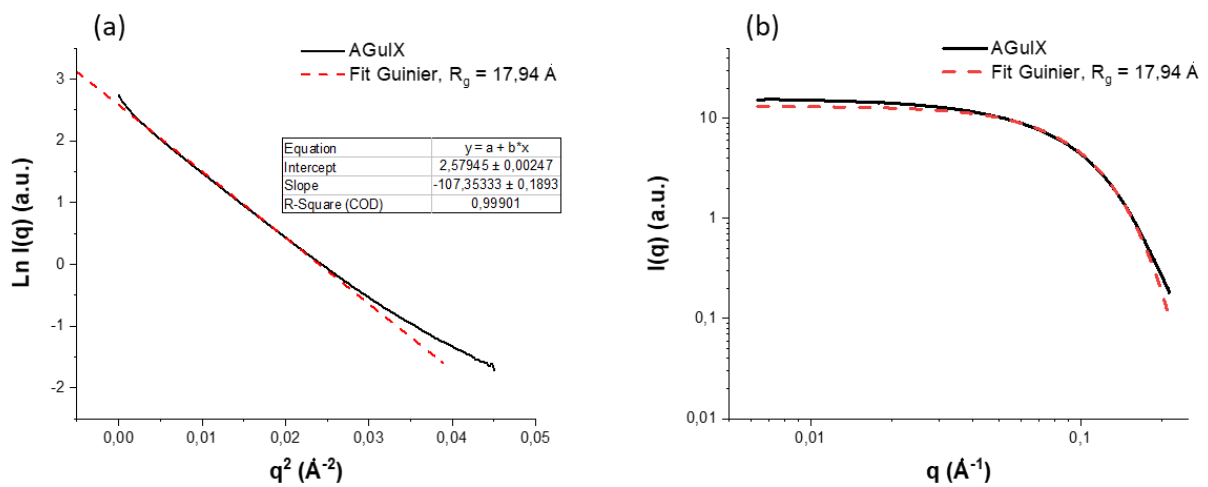


Figure 35. (a) Détermination du rayon de giration R_g de AGuIX® par application de la loi de Guinier. Le fit linéaire proposé présente un R^2 de 0,999. (b) Comparaison entre les données expérimentales et la loi de Guinier obtenue pour $R_g = 17,94 \text{ \AA}$.

Tableau 4. Résultats de l'analyse des données SAXS d'AGuIX®

| Produit | R_g (nm) | D_{H-SAXS} (nm) |
|----------------|---------------------------|--------------------------------|
| AGuIX® | 1,8 ± 0,1 | 4,6 ± 0,3 |

D'après les résultats de la SAXS, AGuIX® présente un rayon de giration R_g égal à 1,8 ± 0,1 nm et une distribution quasi monodisperse des tailles de particules. Un tel rayon de giration serait associé à un diamètre hydrodynamique D_H égal à 4,6 nm dans l'hypothèse d'une particule sphérique. Ce résultat est en accord avec les diamètres déterminés par les méthodes de DLS (Section 3.1.1.) et TDA (Section 3.1.2.) comme indiqué dans le bilan en tableau 5.

Tableau 5. Récapitulatif des différents diamètres hydrodynamique obtenus avec les méthodes DLS, TDA et SAXS

| Produit | D_{H-DLS} (nm) | D_{H-TDA} (nm) | D_{H-SAXS} (nm) |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| AGuIX® | 5,6 ± 2,0 | 4,6 ± 0,4 | 4,6 ± 0,3 |

3.2 Masse, charge, géométrie et propriétés magnétiques d'AGuIX®

3.2.1 Détermination de la masse par SEC-MALLS

Pour étudier la masse molaire d'une nanoparticule, l'une des techniques les plus utilisées est la chromatographie liquide haute performance utilisant une colonne SEC couplée à un détecteur de diffusion de lumière laser multi-angle (MALLS). En effet, il existe de nombreuses nanoparticules polymériques (voir Section 2.2.1) dont la détermination de leur masse molaire est un paramètre majeur. Le système MALLS mesure la lumière diffusée par l'échantillon à une gamme d'angles (dans ce cas, 18 angles différents), il en extrapole le poids moléculaire à partir de la théorie de la diffusion de la lumière de Rayleigh-Debye-Gans [128]:

$$\text{Equation 9} \quad \frac{K^* \cdot c}{R(\theta, c)} = \frac{1}{M_w \cdot P(\theta)} + 2 \cdot A_2 \cdot c$$

- R est le rapport de Rayleigh, un coefficient expérimental dépendant de l'intensité de la lumière diffusée à angle θ et la concentration du soluté c
- M_w est la masse molaire moyenne en poids du soluté
- A_2 est le second coefficient de Viriel
- K^* est une constante $K^* = \frac{4 \cdot \pi^2 \cdot \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2 \cdot n_0^2}{N_A \cdot \lambda^4}$
- N_A est le nombre d'Avogadro
- n_0 est l'indice de réfraction du solvant, λ est la longueur d'onde du laser
- $\frac{\partial c}{\partial n}$ est l'incrément d'indice de réfraction, calculé grâce à une diffractomètre différentiel (DRI)
- $P(\theta)$ est une fonction qui décrit la dépendance angulaire de la lumière diffusée et elle est liée au rayon de giration R_g

Le développement de $P(\theta)$ à l'ordre 1 nous donne :

$$\text{Equation 10} \quad P(\theta) \approx 1 - \frac{16 \cdot \pi^2 \cdot n_0^2 \cdot R_g^2}{3 \cdot \lambda^2} \cdot \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

En déterminant $R(\theta)$ par extrapolation grâce à la mesure de l'intensité diffusée à 18 angles différents on est alors capable de déterminer la masse molaire pondérée M_w du soluté injecté et le rayon de giration. Les résultats de la mesure effectuée à l'Institut d'Ingénierie des Matériaux Polymères (IMP, Lyon, France) sont respectivement présentés le Tableau 6.

Tableau 6. Résultats des masses d'AGuIX[®] obtenues par mesure SEC-MALLS

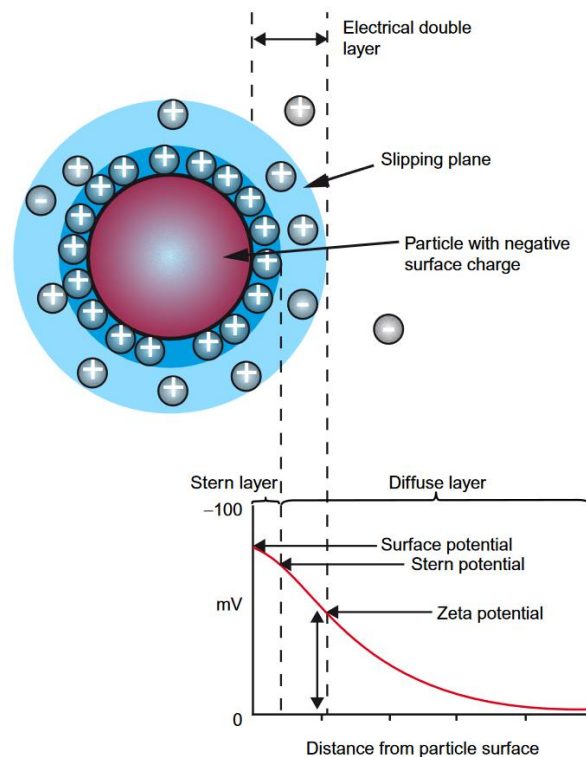
| Produit | M_w (g/mol) | M_n (g/mol) | M_w/M_n |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|
| AGuIX [®] | 20270 ± 152 | 15600 ± 201 | 1,299 ± 0,019 |

La masse moléculaire moyenne en nombre M_n est la masse moléculaire moyenne statistique de toutes les particules de l'échantillon, pondérée par leur nombre. La masse moléculaire moyenne en poids M_w prend en compte le poids moléculaire d'une particule pour déterminer les contributions à la moyenne. Les particules AGuIX[®] présentent donc une masse moléculaire moyenne en nombre $M_n = 15\,600 \pm 201$ g/mol et une masse moléculaire moyenne en poids $M_w = 20\,270 \pm 152$ g/mol d'après la mesure par SEC-MALLS. Le ratio M_w/M_n est appelé indice de polydispersité, Plus l'indice de polydispersité est élevé, plus la distribution du poids moléculaire est large. Une suspension monodisperse où toutes les particules sont de masse égale (comme une protéine) a un $M_w/M_n = 1$. Les polymères synthétiques les mieux contrôlés (utilisés pour les calibrations) ont un M_w/M_n de 1,02 à 1,10. De plus,

les polymères issus de réactions en chaîne donnent des valeurs Mw/Mn comprises entre 1,5 et 20 [129]. Avec une valeur d'indice de polydispersité de $1,299 \pm 0,019$, AGuIX® est une suspension avec une très faible dispersité.

3.2.2 Détermination de la charge par Zétamétrie

Le potentiel zêta est une propriété physique qui est présentée par toute particule en suspension. Les particules dispersées dans un milieu aqueux acquièrent une charge de surface, principalement par ionisation des groupes de surface ou par adsorption d'espèces chargées. Ces charges de surface modifient la distribution des ions environnants. Cette distribution donne lieu à deux régions, une région intérieure (couche de Stern) où les ions sont fortement liés à la particule et une région extérieure (diffuse) où ils sont moins associés. Dans la couche diffuse, il existe une limite théorique à l'intérieur de laquelle les ions et les particules forment un ensemble stable. Ainsi, lorsqu'une particule se déplace (par exemple, en raison du mouvement Brownien), les ions situés à l'intérieur de la limite se déplacent comme faisant partie de la particule. Le potentiel zêta est le potentiel de la frontière au-delà de laquelle les ions ne sont pas affectés par le mouvement de la particule comme indiqué en Figure 36.



Le potentiel zêta est donc lié à la charge des nanoparticules. Il permet d'évaluer leurs interactions, la stabilité des suspensions ou de vérifier le bon déroulement d'une fonctionnalisation de surface. En effet, lors d'une fonctionnalisation de surface, le changement de groupes chimiques peut se traduire par un changement d'ionisation. Le principe de la mesure repose sur l'application d'un champ électrique à des particules en solution.

Sous l'effet du champ électrique, les particules vont se mettre en mouvement. Celui-ci est étudié grâce à la diffusion de la lumière. En effet, la fréquence de la lumière diffusée dépend de la vitesse des particules (effet Doppler). La détermination de la vitesse (mobilité électrophorétique) permet ensuite de calculer le potentiel zêta des particules [130]. La mesure peut être effectuée à différents pH car l'acidité du milieu influe directement sur l'état de charge des espèces en surface et donc sur la charge globale de l'objet. Le pH au point iso-électrique est le pH pour lequel la particule possède une charge globale de surface nulle. Les résultats obtenus à partir d'un échantillon d'AGuIX® sont présentés en Figure 37.

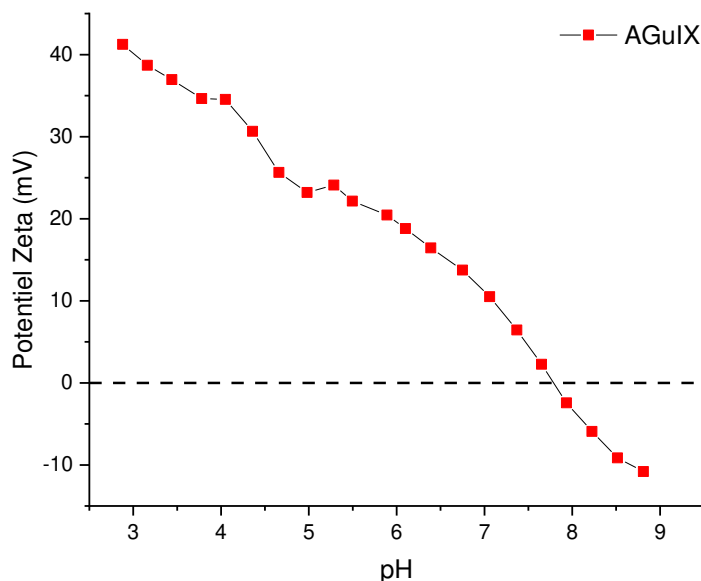


Figure 37. Valeur du potentiel zêta d'AGuIX® (10 g/L) à différents pH dans une solution de NaCl à 5mM. Le point iso-électrique est atteint à pH = 7,8

AGuIX® est donc chargée positivement à pH acide et négativement à pH basique >8. Cette évolution est cohérente avec la composition d'AGuIX®. Ainsi, à pH acide, les groupements amine résiduels (n'ayant pas réagi avec le DOTAGA anhydride) et les groupements silanols sont protonés, ce qui confère une charge globale positive. Ils semblent en effet être largement majoritaires par rapport aux complexes DOTAGA(Gd) qui ont une charge permanente négative (-1). En augmentant le pH, les groupes amine deviennent neutres faisant ainsi diminuer la charge globale jusqu'à devenir neutre puis négative dû à la présence de complexes de gadolinium. Le point iso-électrique d'AGuIX® est mesurée à pH = 7,8. Au pH physiologique de 7,4 AGuIX® présente une charge légèrement positive.

3.2.3 Détermination de la géométrie pas SAXS

L'analyse des données de mesure par SAXS nous renseigne également sur la géométrie de la particule analysée. Premièrement, l'intensité diffusée est isotrope. Comme attendu, l'échantillon ne présente pas de direction

privilegiée. Cette symétrie autour de l'axe central permet le calcul d'une intensité moyenne azimuthale, comme on l'observe en Figure 38.

L'intensité à petites valeurs de q peut être analysée par la loi de Guinier. De plus, dans le cas où le vecteur de diffusion q est suffisamment grand devant la plus grande dimension structurale caractéristique de l'objet on se trouve alors dans le régime dit de Porod, qui dépend des caractéristiques de surface de la particule. Dans ce régime, $I(q)$ peut s'exprimer sous la forme suivante :

Equation 10 Loi de Porod : $I(q) = \frac{2\pi}{q^{-4}} \cdot C^2 \cdot S$

- q est la norme du vecteur de diffusion (Å)
- C la constante de Porod, intégrant le facteur de contraste, c'est à dire la différence de densité électronique entre la particule et le milieu
- S est l'aire totale des interfaces particule/milieu dans le volume irradié

Dans le cas d'une suspension colloïdale d'objets sphériques, le terme $C^2 \cdot S$ est indépendant de q , il apparait alors que dans le domaine de Porod la valeur de $\text{Ln}(I(q))$ décroît linéairement en fonction de $\text{Ln}(q)$ avec une pente de valeur -4. L'analyse de l'intensité diffusée par AGuIX® est présentée en Figure 38.

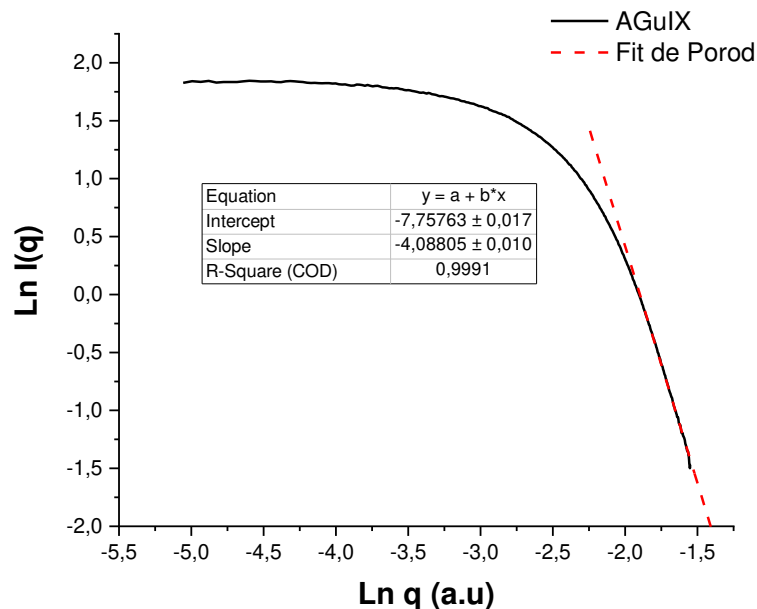


Figure 38. Analyse du comportement de l'intensité $I(q)$ diffusée par AGuIX® dans le domaine de Porod.

L'analyse de l'échantillon d'AGuIX® indique que dans le domaine de Porod l'intensité de $\text{Ln}(I(q))$ décroît de façon linéaire ($R^2 = 0,9991$) avec une pente de -4,09. Comme indiqué précédemment, cette valeur est

caractéristique d'une suspension colloïdale d'objets sphériques avec une interface 'nette' entre l'intérieur et l'extérieur de la particule.

De plus, le ratio R_g/R_H entre le rayon hydrodynamique R_H par DLS (ou TDA) et du rayon de giration R_g par mesure SAXS permet de déterminer la structure d'un objet (Figure 33). Ainsi, un ratio de 0,775 est la signature d'une sphère homogène. Dans le cas d'AGuIX[®], $R_g = 1,8$ nm et $R_{H-TDA} = 2,3$ nm ($R_{H-DLS} = 2.8$ nm), soit un ratio $R_g/R_{H-TDA} = 0,778$ ($R_g/R_{H-DLS} = 0,639$). AGuIX[®] semble donc présenter une structure sphérique 'pleine' avec une densité électronique constante en première approximation. A titre d'indication, un ratio de 1 est synonyme d'une structure de coquille sphérique et un ration supérieur à 1 est la signature s'une structure cylindrique, étendue [131].

3.2.4 Détermination des propriétés magnétiques par relaxométrie

Les IRM cliniques mesurent la relaxation des protons de l'eau. Plus précisément, au cours d'un examen IRM, un champ magnétique statique est appliqué pour aligner les spins des noyaux de protons de l'eau dans la direction du champ appliqué. Ensuite, une impulsion de radiofréquence (RF) est introduite pour exciter les spins perpendiculairement à la direction du champ appliqué. Lorsque l'impulsion RF est terminée, les spins excités des protons de l'eau retournent à l'état d'équilibre dans la direction du champ. Au cours de ce processus, deux processus indépendants mais simultanés ont lieu : la relaxation longitudinale T_1 (spin-lattice) et la relaxation transversale T_2 (spin-spin). La relaxation T_1 mesure le temps nécessaire pour que les spins reviennent dans la direction du champ statique, tandis que la relaxation T_2 indique le temps nécessaire pour que les moments de spin dans la direction perpendiculaire se déphasent jusqu'à zéro. Un agent de contraste IRM raccourcit normalement à la fois les processus T_1 et T_2 , mais l'un des processus est plus affecté que l'autre. Si un agent de contraste affecte principalement le processus T_1 , il est appelé agent de contraste T_1 . En revanche, si l'agent de contraste influence plus significativement le processus T_2 , il est appelé agent de contraste T_2 . Les valeurs T_1 dépendent de la vitesse à laquelle l'énergie du spin est dissipée dans l'environnement. L'eau directement liée à l'agent de contraste et le taux d'échange d'eau avec l'environnement sont donc essentiels. En revanche, les valeurs T_2 mesurent la vitesse à laquelle les moments de spin se déphasent, ce qui est fortement influencé par les propriétés magnétiques des agents de contraste. En général, deux paramètres sont principalement utilisés pour évaluer les comportements d'un agent de contraste : la relaxivité longitudinale (r_1) et la relaxivité transversale (r_2). Il est possible de déterminer les relaxativités à partir de la formule suivante :

$$\text{Equation 8} \quad : \quad \frac{1}{T_{i,solution}} = \frac{1}{T_{i,0}} + r_i \cdot [Gd^{3+}]$$

- r_i est la relaxivité exprimée en $s^{-1}.mM^{-1}$
- $[Gd^{3+}]$ est la concentration en gadolinium exprimé en mM
- $T_{i,solution}$ est le temps de relaxation mesuré avec particules et exprimé en s
- $T_{i,0}$ est le temps de relaxation mesuré sans particules et exprimé en s

Les résultats de la mesure des temps de relaxation d'une solution d'AGuIX[®] à 100 g/L sont présentés en Figure 39 et Tableau 7.

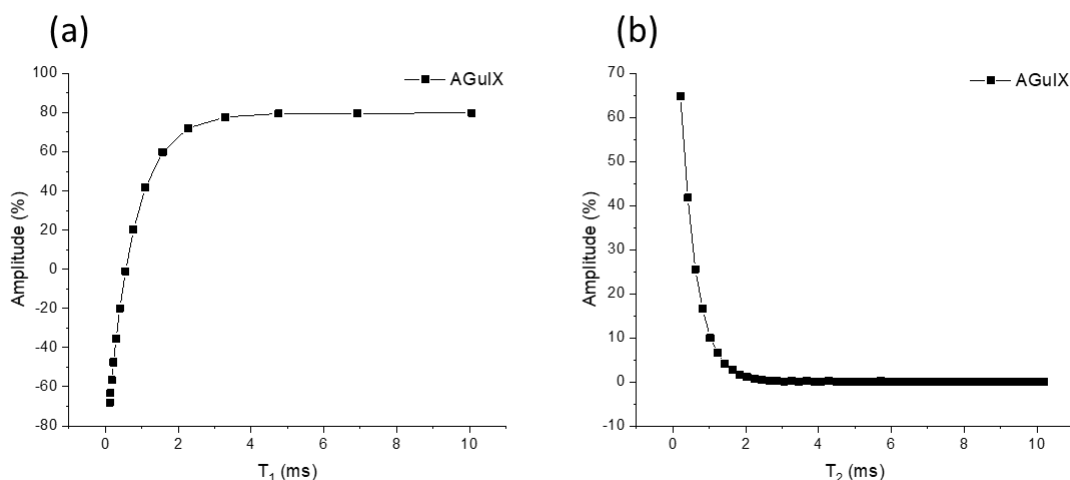


Figure 39. (a) Détermination du temps de relaxation T_1 d'une solution d'AGuIX® à 100 g/L (b) Détermination du temps de relaxation T_2 d'une solution d'AGuIX® à 100 g/L. Les mesures sont réalisées sur un Brüker Minispec MQ60 de 60 MHz, 1,4 T à 37°C.

Tableau 7. Résultats des mesures de relaxométrie d'une solution d'AGuIX® à 100 g/L (mesures effectuées à 37°C, 1,4T à 60 MHz).

| Produit | T_1 (ms) | r_1 (s ⁻¹ .mM ⁻¹) | T_2 (ms) | r_2 (s ⁻¹ .mM ⁻¹) | r_2/r_1 |
|---------|------------|--|------------|--|-----------|
| AGuIX® | 0,72 | 19,7 | 0,44 | 32,0 | 1,63 |

Le rapport de relaxivité (r_2/r_1) est principalement utilisé pour évaluer les comportements d'un agent de contraste positif (T_1) ou négatif (T_2). En général, les agents de contraste T_1 ont un rapport r_2/r_1 plus faible (compris entre 1-2) tandis que les agents de contraste T_2 ont un rapport r_2/r_1 plus important (supérieur à 10) [132]. AGuIX® présentant un ratio r_2/r_1 de 1,63 est donc considéré comme un agent de contraste positif comme on le voit en Section 2.2.4.2.

3.3 AGuIX® en solution : Une particule et des fragments

3.3.1 HPLC-UV : Pureté

La chromatographie en phase liquide ou *High Performance Liquide Chromatography* (HPLC) est une technique de séparation des composés d'un mélange. Elle est très largement répandue dans le domaine de l'analyse chimique. Cette technique est basée sur la différence d'interactions des composants d'un mélange avec une phase mobile et une phase stationnaire. Ainsi, le temps de migration diffère selon les composants présentant donc un temps d'éluion spécifique. La mise en place d'une méthode dépend de divers paramètres dont les principaux sont : le choix de la colonne chromatographique contenant la phase stationnaire adéquate, le choix de la phase mobile et le détecteur utilisé en sortie de colonne.

La technique HPLC mise en place pour l'analyse d'AGuIX[®] est une technique de séparation dite « phase inverse » qui repose sur l'utilisation d'une colonne C4, c'est-à-dire contenant une phase stationnaire de silice greffée avec de chaînes linéaires de 4 carbones (-C₄H₉). Cette phase stationnaire est initialement conçue pour analyser et purifier des protéines intactes (M > 10 kDa) mais elle est aussi très adaptée pour l'analyse des nanoparticules de petite taille [93]. Cette phase stationnaire apolaire nécessite donc une phase mobile polaire. Dans le cas de l'analyse d'AGuIX[®], cette phase mobile est composée d'acétonitrile (ACN), d'eau et d'acide trifluoro acétique (TFA). Les composés polaires sont élués en premier puis les composés apolaires sont ensuite élués à l'aide d'un gradient d'ACN. Grâce à un détecteur UV il est alors possible de mesurer les variations d'absorbance à 295 nm des différents constituants d'un échantillon AGuIX[®]. Le chromatogramme issu de l'analyse d'AGuIX[®] est présenté Figure 40.

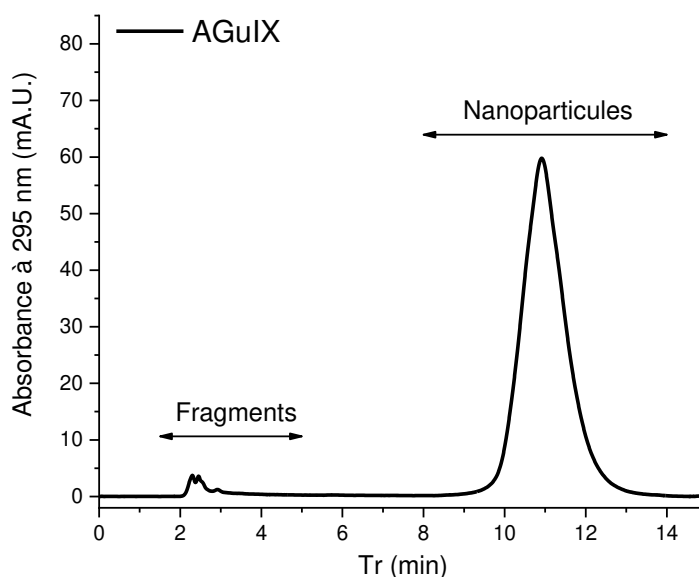


Figure 40. Chromatogramme HPLC-C4-UV ($\lambda_{\text{abs}} = 295 \text{ nm}$) obtenu à la suite d'une injection de 10 μL d'une solution d'AGuIX[®] à 100 g/L.

Grâce à cette analyse, on remarque qu'une solution d'AGuIX[®] n'est pas uniquement composée de nanoparticules. En effet, on identifie clairement deux parties distinctes du chromatogramme. Une première partie minoritaire allant de 2 à 5 minutes et une seconde majoritaire de 8 à 14 min. Cette première partie concerne les « fragments » d'AGuIX[®] c'est-à-dire des petites espèces issues de l'hydrolyse des liaisons Si-O-Si de la matrice de silice de la nanoparticule. Ces fragments sont des espèces moléculaires polaires (voir Section 3.3.2) qui interagissent très faiblement avec la phase C4. La seconde concerne la nanoparticule en elle-même AGuIX[®] de par sa nature globalement apolaire. La surface de la nanoparticule présente des polarités locales mais l'ensemble

est globalement apolaire. La nanoparticule nécessite donc un gradient de phase mobile (ACN) pour se défaire de l'interaction avec la phase stationnaire.

Le rapport de l'aire des particules ($Aire_{Particules}$) sur l'aire totale ($Aire_{Totale}$) nous renseigne sur la « pureté » de l'échantillon soit la proportion de particules dans l'échantillon. Les résultats issus de l'injection d'AGuIX® sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8. Résultats de la mesure des aires et du calcul de la pureté d'AGuIX® à 100g/L

| Produit | Aire _{Particules} (a.u.) | Aire _{Totale} (a.u.) | Pureté (%) |
|---------|--------------------------------------|----------------------------------|---------------|
| AGuIX® | 77,2 | 79,8 | 96,7 |

À 100g/L, la pureté déterminée par HPLC-UV d'AGuIX® excède 95%. Il est important de noter que l'apparition de « fragments » dépend d'un équilibre $Fragments \rightleftharpoons Particules$ qui est principalement impacté par la concentration d'AGuIX® en solution. En effet, à concentration élevée, l'équilibre se retrouve en faveur des particules. Ce comportement est typique des nanoparticules de silice en milieu aqueux [133]. En milieu dilué on favorise ainsi la rupture des ponts Si-O-Si par hydrolyse. Les particules en milieu dilué seront donc sujettes à une dégradation par hydrolyse jusqu'à atteindre la concentration d'équilibre en $Si(OH)_4$ [134]. On peut ainsi conserver des solutions d'AGuIX® concentrées pendant plusieurs mois. En revanche à faible concentration, l'équilibre est déplacé en faveur des fragments. Dans son travail de fonctionnalisation d'AGuIX®, V-L. Tran a ainsi exploité cet équilibre pour ajouter/substituer de nouveaux chélateurs à la surface de la particule. En effet, les dérivés APTES-DOTAGA et APTES-NODAGA peuvent former des liaisons siloxanes covalentes avec les groupes silanol libres à la surface d'AGuIX® ou échanger avec les chélateurs silanisés déjà existants à la surface des particules grâce à l'équilibre $Fragments \rightleftharpoons Particules$ [135]. La dégradation de la nanoparticule en espèces plus petites en milieu dilué a été mise en évidence par C. Truillet et al. [93] grâce à l'usage d'un détecteur ESI-MS (*ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometry*).

3.3.2 HPLC-ICP/MS : Suivi de Fragmentation

De la même façon que la dégradation d'AGuIX® a pu être suivi par ESI-MS [93], nous avons mis en place une méthode afin de suivre la dégradation par ICP-MS (*Inductive Coupled Plasmas-Mass Spectrometry*). L'ESI-MS permet de mesurer la masse des composés en solution. L'ICP-MS permet quant à lui de suivre des éléments d'intérêts. Ce type de détecteur ICP-MS couplé à une séparation HPLC permet de remonter à la nature élémentaire des différents composants d'une solution d'AGuIX®. Les deux éléments caractéristiques d'AGuIX® choisis pour l'analyse sont respectivement Gd et Si.

L'utilisation d'un détecteur ICP-MS a entraîné un changement dans la méthode de séparation utilisée pour cette analyse. En effet, afin d'obtenir une meilleure sensibilité en signal Si, il a été décidé de remplacer les colonnes C4 classiquement utilisées par des colonnes polymères car les colonnes C4 sont elles-mêmes composées de silice,

leur usage aurait donc entraîné un fort signal parasite non dû à la silice d'AGuIX®. Nous avons donc travaillé sur une méthode de séparation SEC (*Size Exclusion Chromatography*). Contrairement à la méthode phase inverse utilisée en HPLC-UV, la méthode SEC sépare selon la taille des composés grâce à une architecture spécifique de la phase stationnaire polymérique. Les colonnes SEC imposent un temps de parcours plus faible pour les gros composés plutôt que pour les petits. De plus, la séparation SEC se fait de façon isocratique, point intéressant qui permet d'éviter les effets de matrice pouvant intervenir dans la source plasma de l'ICP-MS lors du gradient de phase utilisée en phase inverse [136]. Il est important de noter que la difficulté de la mise en place de cette méthode réside surtout dans la mesure du signal de Si. En effet l'isotope le plus abondant de la silice est l'isotope 28 (abondance 92%) qui présente 2 interférents majeurs : CO^+ et N_2^+ . De plus la silice est abondamment présente dans l'environnement du laboratoire, il est difficile d'éviter les contaminations. Afin de résoudre les problèmes d'interférence massique, la mesure du Si est effectuée avec ajout d'un gaz de réaction (*Dynamic Reaction Cell*, DRC), le dihydrogène H_2 . En effet, le H_2 introduit dans la chambre de réaction réagira avec CO^+ et le N_2^+ pour former respectivement les espèces COH^+ et N_2H^+ de masse respective 29 évitant ainsi les interférences possibles Si^+ . Le chromatogramme issu de l'injection d'AGuIX® est présenté Figure 41.

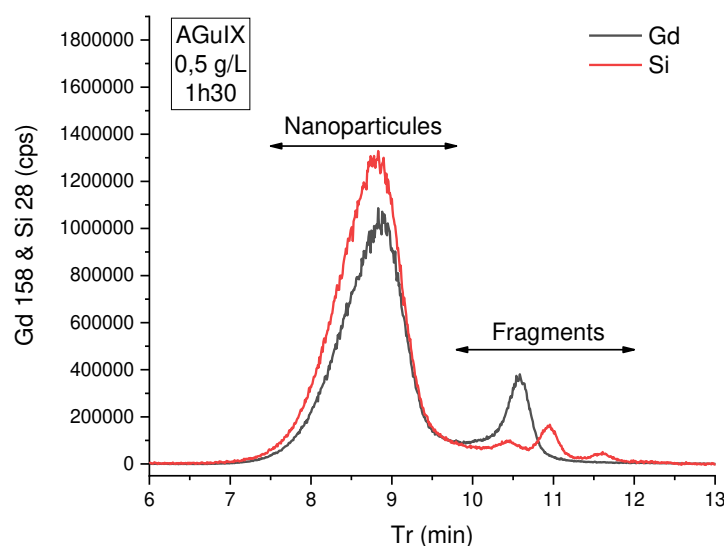


Figure 41. Chromatogramme HPLC-SEC-ICP/MS obtenu à la suite d'une injection de 3 μL d'AGuIX® dilué à 0,5 g/L depuis 1 h 30. Détection ICP/MS : Gd 158 (noir) Si 28 (rouge)

De ce premier chromatogramme obtenu 1 h 30 après dilution de 100 g/L à 0,5 g/L, on peut identifier les particules dans le premier pic ($\text{Tr} = 8,85$ min). En effet, en SEC le produit élué le plus tôt correspond au composé de plus grande taille. De plus, on retrouve la signature élémentaire de la nanoparticule composée de silicium et de gadolinium. Pour observer la fragmentation d'AGuIX®, l'injection a été répétée à différents temps : 2 h 30, 3 h et 4 h après dilution. Les chromatogrammes correspondants sont compilés en Figure 42.

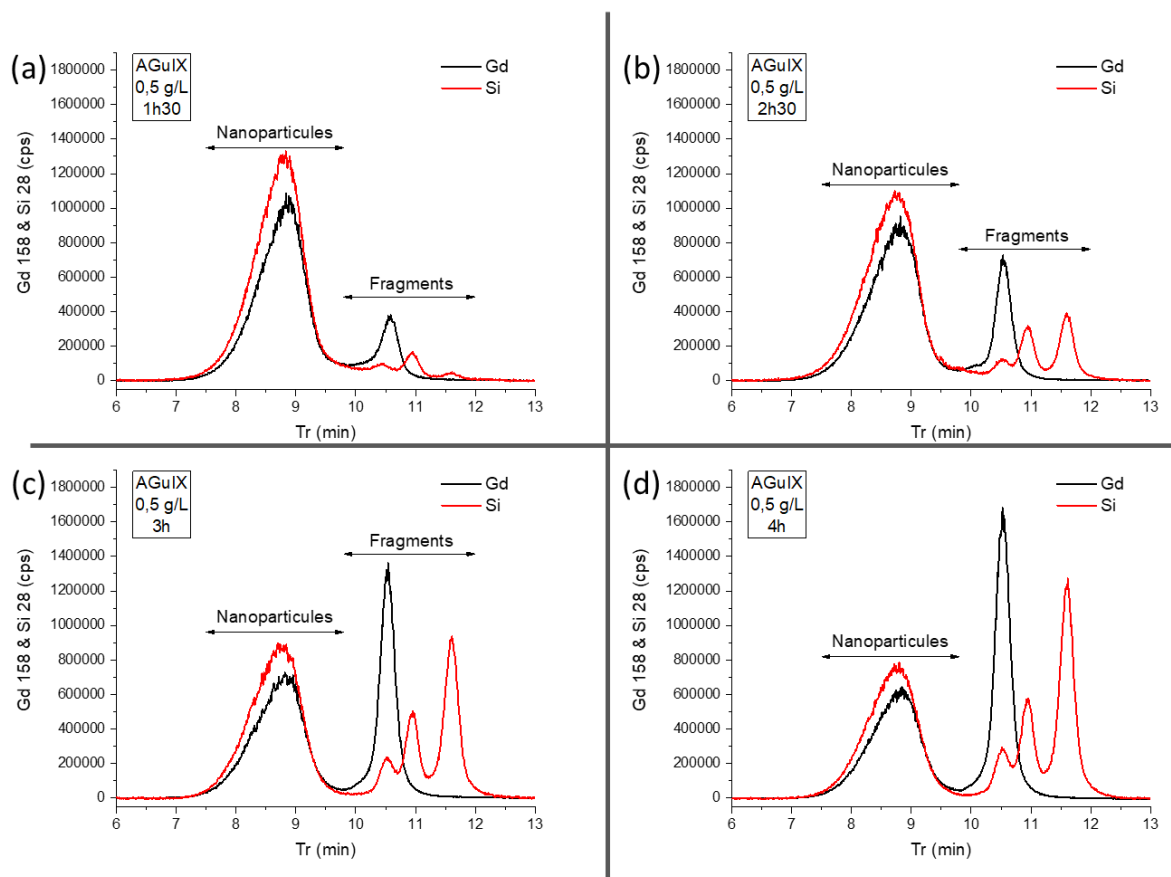


Figure 42. Evolution des chromatogrammes d'AGuIX® à 0,5 g/L à (a) 1 h 30, (b) 2 h 30, (c) 3 h et (d) 4 h. Transfert de signal des nanoparticules vers les fragments indiquant une fragmentation du produit AGuIX® à 0,5 g/L. Détection ICP-MS : Gd 158 (noir) et Si 28 (rouge).

Il est intéressant de noter que la fragmentation d'AGuIX® semble mener à l'apparition de trois produits distincts notés F1 (Tr = 10,53 min), F2 (Tr = 10,95 min) et F3 (Tr = 11,60 min) comme présenté en Figure 43.

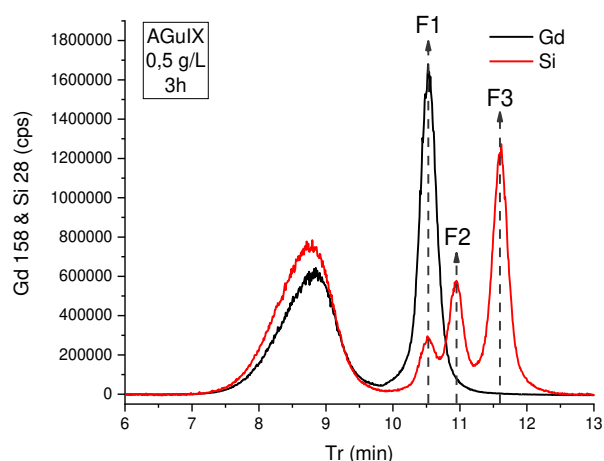
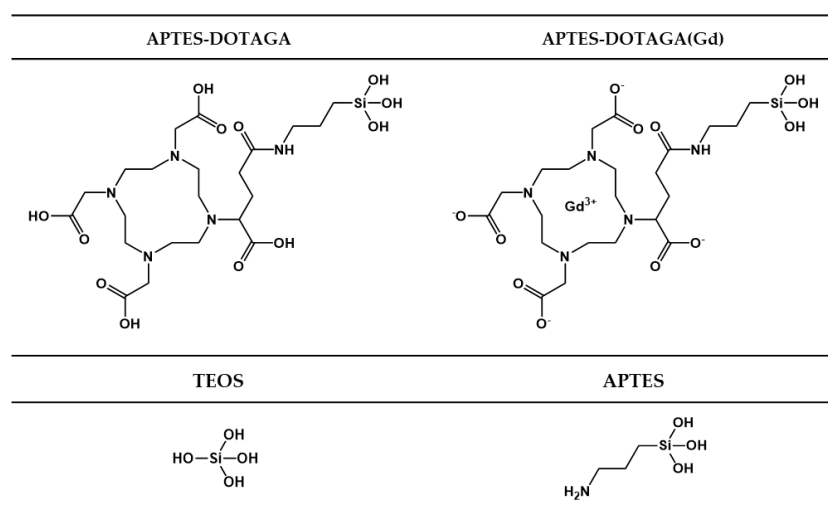


Figure 43. Chromatogramme AGuIX® à 0,5 g/L après 4h de dilution. Identification des pics de fragments F1, F2 et F3. Détection ICP/MS : Gd 158 (noir) et Si 28 (rouge).

Ces trois produits contiennent tous du silicium. En revanche, seul le fragment F1 possède une signature en gadolinium. Le produit F1 est donc un produit contenant du gadolinium complexé par du DOTAGA, lui-même attaché à un résidu contenant du silicium. Cette description correspond parfaitement à l'espèce APTES-DOTAGA(Gd) représentée dans le Tableau 9. F2 et F3 pourraient correspondre à APTES et TEOS. Pour répondre à cette question il a été préparé les standards des espèces suivante : APTES, TEOS, APTES-DOTAGA(Gd), APTES-DOTAGA. Chaque standard est préparé dans l'eau afin de s'assurer que les espèces APTES et TEOS soient sous forme hydrolysée [137]. Les représentations des standards synthétisés sont présentées dans le Tableau 9, il est important de noter que les termes TEOS et APTES font référence aux dérivés hydrolysés de ces alkoxydes de silicium.

Tableau 9. Représentation des standards synthétisés pour l'analyse HPLC-SEC-ICP/MS



Les résultats des diverses identifications en silicium et en gadolinium sont respectivement présentées en Figure 44 et 45.

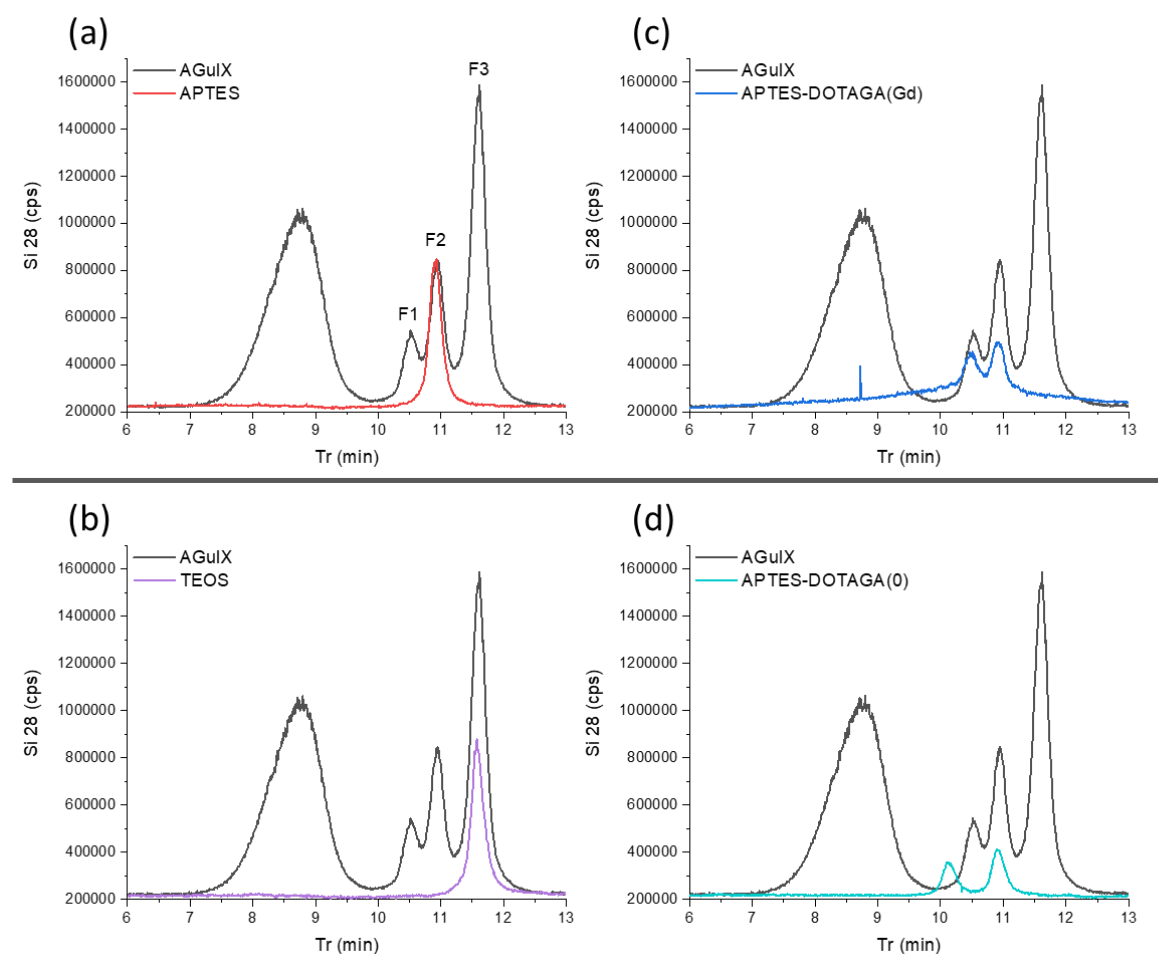


Figure 44. Comparaison entre le chromatogramme en de AGuIX® à 0,5 g/L après 4 h de dilution et (a) une référence APTES (b) une référence TEOS (c) une référence APTES-DOTAGA(Gd) (d) une référence APTES-DOTAGA. Détection ICP/MS : Si 28

Le suivi de l'identification en silicium nous renseigne sur la nature des fragments. Ainsi, la correspondance entre les temps de rétention du produit F2 et de la référence APTES permet d'identifier F2 comme correspondant au signal de l'APTES (rouge). De même, F3 et TEOS (violet) présente le même temps de rétention. Le standard APTES-DOTAGA(Gd) (bleu), présente deux pics : le premier possédant le même temps de rétention que F1 et le second ayant un temps de rétention identique à F2. Ce résultat n'est pas surprenant car pour favoriser la réaction entre APTES et DOTAGA-Anhydride, la référence APTES-DOTAGA(Gd) a été préparée avec un excès d'APTES. On retrouve donc bien de l'APTES au niveau du pic F2 à Tr =10,95 min. Le nouveau pic qui apparait dans cette référence est le produit APTES-DOTAGA(Gd) attendu. La correspondance entre ce pic et le pic F1 nous permet d'identifier F1 comme étant le produit APTES-DOTAGA(Gd). Il est intéressant de noter que la référence APTES-DOTAGA (cyan) préparée sans gadolinium présente bien le pic correspondant à APTES,

néanmoins on remarque un décalage du premier pic. L'espèce APTES-DOTAGA non complexée présente un temps de rétention $T_r = 10,12$ min alors que la même espèce APTES-DOTAGA(Gd) complexée présente un temps de rétention $T_r = 10,53$ min. Ce résultat est assez inattendu lors d'une séparation par taille et est un signe d'une interaction particulière entre la phase stationnaire et le DOTAGA. De manière intéressante, cette différence de temps de rétention entre espèce complexée ou non renseigne sur l'absence de DOTAGA libre dans le produit AGuIX®.

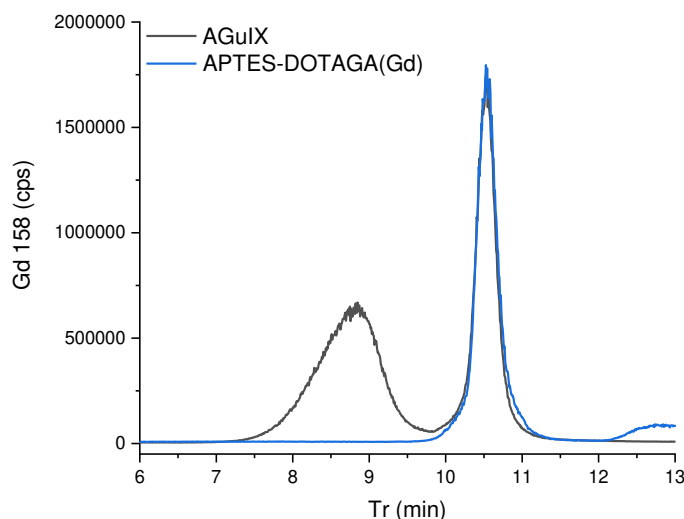


Figure 45. Comparaison entre le chromatogramme de AGuIX® à 0,5 g/L après 4 h de dilution et une référence APTES-DOTAGA(Gd). Détection ICP/MS : Gd 158.

Le suivi de l'identification en gadolinium nous renseigne aussi sur la nature des fragments. On remarque en Figure 45 une correspondance entre le pic de F1 et le pic de la référence APTES-DOTAGA(Gd) (bleu). Ceci est une preuve supplémentaire de la nature de ce fragment comme étant l'espèce APTES-DOTAGA(Gd). Le signal Gd présent en fin du chromatogramme du standard APTES-DOTAGA(Gd) est dû au gadolinium libre introduit en excès lors de la préparation d'échantillons.

Cette étude nous permet de conclure sur la nature des fragments issus de la dégradation d'AGuIX®. Ainsi, il semblerait que AGuIX® tende à se dégrader en ses molécules constitutives par dissolution de sa matrice polysiloxane en milieu dilué : TEOS, APTES et APTES-DOTAGA(Gd). La nature de ses fragments a aussi fait l'objet d'analyses par électrophorèse capillaire couplé à un ICP-MS qui ont confirmé les résultats de l'analyse HPLC-ICP/MS [138].

L'utilisation de cette méthode HPLC-ICP/MS pourrait nous renseigner sur la composition d'AGuIX® en ses molécules constitutives après dégradation totale. Cette expérience nous permettra donc de remonter à la composition d'AGuIX® et les ratios moléculaires au sein de la nanoparticule (voire Section 3.5.4).

Si cette expérience nous renseigne sur le déroulement de la dégradation et son équilibre final, elle apporte peu de réponses sur la nature réelle des fragments à l'équilibre et les états intermédiaires. Ainsi, il est important


de noter que la dégradation d'AGuIX[®] passe par des états intermédiaires que l'on peut identifier grâce à d'autres techniques d'analyses comme l'ESI-MS.

3.3.3 Identification des fragments par HPLC-ESI/MS

Dans le but de comprendre la nature des fragments qui composent le début du chromatogramme HPLC-UV d'AGuIX[®] (voir Figure 40) nous avons travaillé avec Lucie Labied sur la séparation et l'identification de ces espèces par l'utilisation d'un HPLC-ESI-MS. Ce travail a donné lieu à une publication dans le journal *Nanomaterials*.

Article

Identification of Molecular Fragments in Equilibrium with Polysiloxane Ultrasmall Nanoparticles

Paul Rocchi ^{1,2}, Lucie Labied ^{1,3}, Tristan Doussineau ², Michel Julien ², Barbara Giroud ³, Emmanuelle Vulliet ³, Jérôme Randon ³, Olivier Tillement ¹, Agnès Hagege ³  and François Lux ^{1,4,*}

¹ Institut Lumière Matière, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5306, 69622 Villeurbanne, France; rocchi@nhtheraguix.com (P.R.); lucie.labied@isa-lyon.fr (L.L.); olivier.tillement@univ-lyon1.fr (O.T.)

² NH TherAguix S.A, 29 Chemin du Vieux Chêne, 38240 Meylan, France; doussineau@nhtheraguix.com (T.D.); julien@nhtheraguix.com (M.J.)

³ Institut des Sciences Analytiques, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, UMR 5280, 69100 Villeurbanne, France; barbara.giroud@isa-lyon.fr (B.G.); emmanuelle.vulliet@isa-lyon.fr (E.V.); jerome.randon@univ-lyon1.fr (J.R.); agnes.hagege@univ-lyon1.fr (A.H.)

⁴ Institut Universitaire de France (IUF), 75000 Paris, France

* Correspondence: francois.lux@univ-lyon1.fr; Tel.: +33-(0)4-7243-1200

Abstract: During recent decades, ultrasmall inorganic nanoparticles have attracted considerable interest due to their favorable biodistribution, pharmacokinetics and theranostic properties. In particular, AGuIX nanoparticles made of polysiloxane and gadolinium chelates were successfully translated to the clinics. In an aqueous medium, these nanoparticles are in dynamic equilibrium with polysiloxane fragments due to the hydrolysis of Si–O–Si bonds. Thanks to high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry, all these fragments were separated and identified.

Keywords: ultrasmall nanoparticles; theranostic; polysiloxane; hyphenated high-performance liquid chromatography; inductively coupled plasma mass spectrometry



Citation: Rocchi, P.; Labied, L.; Doussineau, T.; Julien, M.; Giroud, B.; Vulliet, E.; Randon, J.; Tillement, O.; Hagege, A.; Lux, F. Identification of Molecular Fragments in Equilibrium with Polysiloxane Ultrasmall Nanoparticles. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 738. <https://doi.org/10.3390/nano12050738>

Academic Editor: Jose L. Arias

Received: 2 February 2022

Accepted: 18 February 2022

Published: 22 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Due to their capacity to integrate different functionalities, nanoparticles have attracted considerable interest for biomedical applications, in particular for theranostic ones (a combination of diagnostic and therapeutic), a concept introduced by Funkhouser in 1998 [1,2]. In oncology, nanoparticles are of particular interest since they can be passively accumulated in tumors after intravenous administration through the enhanced permeability and retention (EPR) effect [3]. However, despite intense preclinical research [4,5] and important funding during the last few decades, only a limited number of nanoparticles have reached clinical trials and even less to the market [6,7]. Several explanations can be given to explain this gap: (i) difficulty to scale-up the production and lack of process robustness; (ii) lack of detailed product physicochemical characterization to convince regulatory offices on these new types of pharmaceutical products; (iii) unexpected toxicity; (iv) detrimental discrepancies between promising preclinical results and clinical ones; or (v) long, uncertain, and expensive clinical development leading to a high risk of failure before commercialization [8–10]. Nanoparticle-based pharmaceuticals are complex products for which regulatory guidelines are still not properly defined. Nanomedicines require the implementation and the development of new and specific analytical techniques and methods that have many hurdles in the regulatory pathway up to their approval.

Among nanoparticles, ultrasmall inorganic nanoparticles (with a hydrodynamic diameter of <10 nm) were specifically developed thanks to their unique advantages [11,12]. Indeed, they can combine the benefits of including metals displaying interesting properties (such as magnetic properties for magnetic resonance imaging or high Z for radiosensitization) and fast renal elimination avoiding long-term retention of metals in the body, often

associated with toxicity. In addition, even if their resident time in the blood circulation is lesser than for larger nanoparticles, better tumoral penetration can be achieved [3]. Due to these interesting features, two ultrasmall nanoparticles were accepted in clinical trials during the last decade: (i) Cornell dots made of silica core embedding an optical imaging agent and displaying PEG functions, ^{124}I agent and cRGD [13], and (ii) AGuIX made of a polysiloxane (silica derivative) matrix onto which macrocyclic gadolinium chelates (DOTAGA(Gd)) are covalently grafted (See Figure 1A,B) [14]. A phase 1b clinical trial on the treatment of brain metastases by whole-brain radiation therapy using AGuIX as a radiosensitizer (NanoRad) was recently completed demonstrating the very good safety profile of the product, as well as first hints at efficacy [15,16]. Based on these encouraging results, AGuIX is now in phase 2 clinical trials for this indication and for others, such as lung and pancreatic cancers.

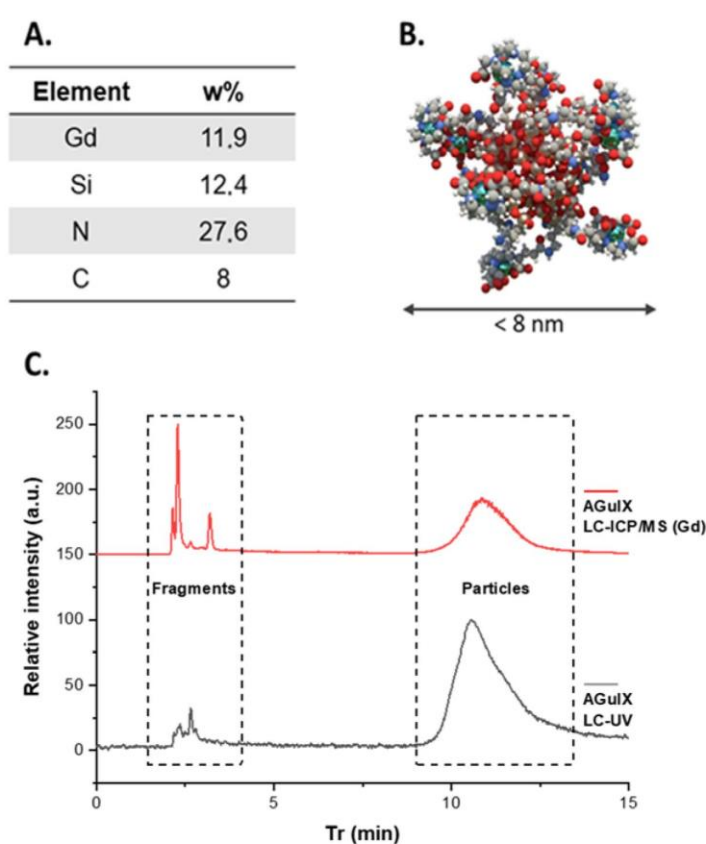


Figure 1. (A) Elemental analysis of AGuIX (B) Schematic representation of AGuIX NPs (gadolinium atoms in green are chelated in DOTAGA ligands grafted to polysiloxane matrix). (C) LC-ICP/MS chromatogram of AGuIX (5 μL , 10 g/L) recorded at Gd 152 channel (red). LC-UV chromatogram of AGuIX (5 μL , 10 g/L) recorded at $\lambda = 295 \text{ nm}$ (black).

Due to their high surface-to-volume ratio, ultrasmall silica-based nanoparticles are more susceptible to be biodegraded [17]. The degradation mechanism can be described by a dissolution of the silica-based matrix through the hydrolysis of Si–O–Si bonds over time and yielding (poly)silicic acid and silanols molecules that are finally fragments of the product. This kind of biodegradation has already been shown on AGuIX nanoparticles using high liquid performance chromatography (HPLC) coupled to electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) [18] or Taylor dispersion analysis (TDA) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) but these methods were not capable of providing clear identification for all molecular fragments in equilibrium [19].

In these studies, assessment of biodegradability was mainly performed by monitoring the size of the nanoparticle over time and molecular fragments were proposed after almost complete hydrolysis of the polysiloxane matrix. Due to hydrolysis reactions, polysiloxane nanoparticles are always in equilibrium with molecular fragments in an aqueous medium. The aim of this paper is to clearly identify the exact nature of these fragments for the AGuIX nanoparticles at a relevant concentration for *in vivo* applications.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Acetonitrile (CH₃CN, ACN, >99.9%) was purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Trifluoroacetic acid (TFA) and Formic acid (AF) at LC/MS grade purity were purchased from Fischer Scientific (Waltham, MA, USA). The starting USNPs AGuIX (gadolinium-chelated polysiloxane nanoparticles) were provided by NH TherAguix (Meylan, France) as lyophilized powder and reconstituted in ultrapure water. Only Milli-Q water ($\rho > 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) was used for the aqueous solution preparation.

2.2. Instrumentation

HPLC-UV/Vis system: A Shimadzu Prominence series UFLC system with a CBM-20A controller bus module, an LC-20 AD liquid chromatograph, a CTO-20A column oven and an SPD-20A UV-visible detector. UV-visible absorption was measured at 295 nm.

HPLC-ICP/MS system: A Nexion 2000B (Perkin-Elmer, Villebon Sur Yvette, France), coupled with a Flexar LC system (Perkin-Elmer). Gd signal was monitored at m/z 152. Syngistix software version 2.3 was used to control the ICP-MS. The Gd signal was acquired through Empower software version 7.3.

HPLC-ESI/MS system: The ESI/MS measurements were carried out on a triple quadrupole spectrometer Xevo TQ-S (Waters, Milford, MA, USA), coupled with UHPLC chain Acquity H-Class (Waters). The analyses were performed on positive mode (ESI+) and detection SCAN mode set on 300–1500 $u\text{m}$ range.

2.3. Elemental Analysis

The measure of gadolinium and silicon content in the AGuIX product was conducted by the company Quality Assistance (Thuin, Belgium). The measurements were performed through ICP-MS Agilent 7900 equipped with Masshunter software. The measure of carbon and nitrogen content was conducted by the Isotope and Organic Laboratory of Institut des Sciences Analytiques (ISA, Lyon, France) through device designed by the laboratory. For the carbon analysis, total combustion of the AGuIX at 1050 °C under a stream of oxygen is performed. The carbon in the sample is transformed into carbon dioxide then quantified by specific infrared CO₂ detectors. For the nitrogen, total combustion of AGuIX sample at 1050 °C is performed under a stream of helium and oxygen. The nitrogen in AGuIX is transformed into various nitrogen oxides reduced to molecular nitrogen. Carbon dioxide and water from combustion are trapped on ascarite and magnesium perchlorate. Nitrogen is quantified by a thermal conductivity detector.

2.4. Separation of Both Nanoparticles and Fragments in a Single Run

The AGuIX sample composition was studied through HPLC using conditions described in C. Truillet et al. [16] The separation was performed using C4 reverse phase column (Jupiter[®], 5 μm , 300 Å, 150 × 4.6 mm) at constant flow rate of 1 mL·min⁻¹. The gradient initial mobile phase was 95% solvent A—5% solvent B (A = H₂O/ACN/TFA: 98.9/1/0.1 $v/v/v$, B = ACN/H₂O/TFA: 89.9/10/0.1 $v/v/v$) and was held for 5 min. After this isocratic step, nanoparticles were eluted by a gradient developed from 5% to 90% of solvent B in solvent A over 15 min. The concentration of solvent B was maintained over 5 min.

The sample was analyzed using both UV-Vis detection and ICP-MS detection. For the ICP-MS analysis, O₂ was added to the gas injection mixture in order to facilitate complete combustion of the increasing amount of ACN in the plasma source. Moreover, after the elution of the nanoparticle peak, the LC route was switched to the waste to avoid excess ACN entering the ICP. Operating conditions used for this analysis by ICP-MS were: nebulizer gas flow rate, 0.77 L/min; O₂ AMS Gas flow, 0.07 L·min⁻¹; plasma gas flow rate, 15 L·min⁻¹; auxiliary gas flow rate, 1.2 L·min⁻¹; radiofrequency power, 1600 W for the plasma. All other parameters were tuned to maximize the Gd signal at $m/z = 152$.

2.5. Fragment Separations and Identification by HPLC Coupled to Different Detectors

The fragment separation was achieved by HPLC using C4 reverse phase column (Jupiter[®], 5 μm, 300 Å, 150 × 2 mm). The measurements were performed on isocratic mode using the following phase composition H₂O/ACN/AF (98.9%/1%/0.1%) at 0.2 mL·min⁻¹ flow rate. After each nanoparticle injection, the column was flushed with H₂O/ACN/AF (19.9/80/0.1 v/v/v) solution for 10 min, to elute the nanoparticles. The fragments were analyzed using the three different detectors. The operating condition used for the ICP-MS system were: nebulizer gas flow rate, 0.84 L·min⁻¹; plasma gas flow rate, 15 L·min⁻¹; auxiliary gas flow rate, 1.2 L·min⁻¹; radiofrequency power, 1600 W for the plasma. The operating conditions used for the ESI/MS system were: capillary tension, 3.2 kV; source temperature, 150 °C; desolvation temperature, 550 °C; N₂ desolvation gas flow, 900 L·h⁻¹; N₂ nebulizing gas flow, 150 L·h⁻¹.

The identification and the drawing of each fragment were assisted by the use of the MarvinSketch software (ChemAxon, <https://www.chemaxon.com>, accessed on 16 February 2022).

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis and Purification of AGuIX Nanoparticles

The representative AGuIX[®] batch studied in this article was prepared through a five-step process consisting of three chemical transformation steps, a purification step and a lyophilization step: (i) formation of a gadolinium oxide core by addition of sodium hydroxide on gadolinium chloride in diethylene glycol (DEG); (ii) growth of a polysiloxane shell by addition of a mixture of TEOS (tetraethoxysilane) and APTES (aminopropyltriethoxysilane); (iii) functionalization of the amino functions issued from APTES by DOTAGA anhydride (2,2',2''-(10-(2,6-dioxotetrahydro-2H-pyran-3-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid); (iv) after precipitation in acetone and transfer to water, the nanoparticles are purified through tangential flow filtration during which a top-down process occurs consisting of dissolution of the gadolinium oxide cores due to chelation of gadolinium by DOTAGA followed by fragmentation of polysiloxane shells, rearrangement of these fragments and chelation of released gadolinium by DOTAGA (see Supporting Information Figure S1) [20,21]. Tangential flow filtration using membranes of NMWCO of 5kDa aims at removing small molecules comprising salts, residual solvents, any residual molecular species and the smallest polysiloxane species. They are finally freeze-dried for easy handling. After dispersion in water, the nanoparticles display a hydrodynamic diameter of 2.7 nm (see Supporting Information Figure S2), and almost all of the DOTAGA chelate a gadolinium ion (~1–2% of free chelates) (see Supporting Information Figure S3).

3.2. Separating Nanoparticles from Fragments by HPLC Coupled to Different Detection Methods

Despite a high purification factor applied by tangential flow filtration, fragments issued from the polysiloxane matrix are always detected by HPLC due to the equilibrium between them and the nanoparticles after hydrolysis of the Si–O–Si bonds (see Figure 1C.). Fragments are detected between 2 and 4 min and nanoparticles between 9 and 14 min on a C4 reverse-phase column using both UV/VIS and ICP-MS detectors.

The HPLC conditions have further been modified to match with the ESI-MS detector requirements. Consequently, the flow rate was lowered by reducing the reverse phase column diameter from 4.6 mm to 2 mm, and TFA was replaced by AF in the HPLC phases

to enhance the ESI-MS signal of the fragments. Those conditions were applied to study the separation of the different fragments using three different types of detection (i.e., ICP/MS, ESI/MS and UV). ESI/MS detection permits us to distinguish seven peaks while ICP/MS and UV detection at 295 nm are limited to four or five peaks. This discrepancy led us to consider that the two first peaks are associated with polysiloxane fragments that do not contain either gadolinium (detected by ICP/MS) or DOTAGA (detected by UV detection at 295 nm) (Figure 2).

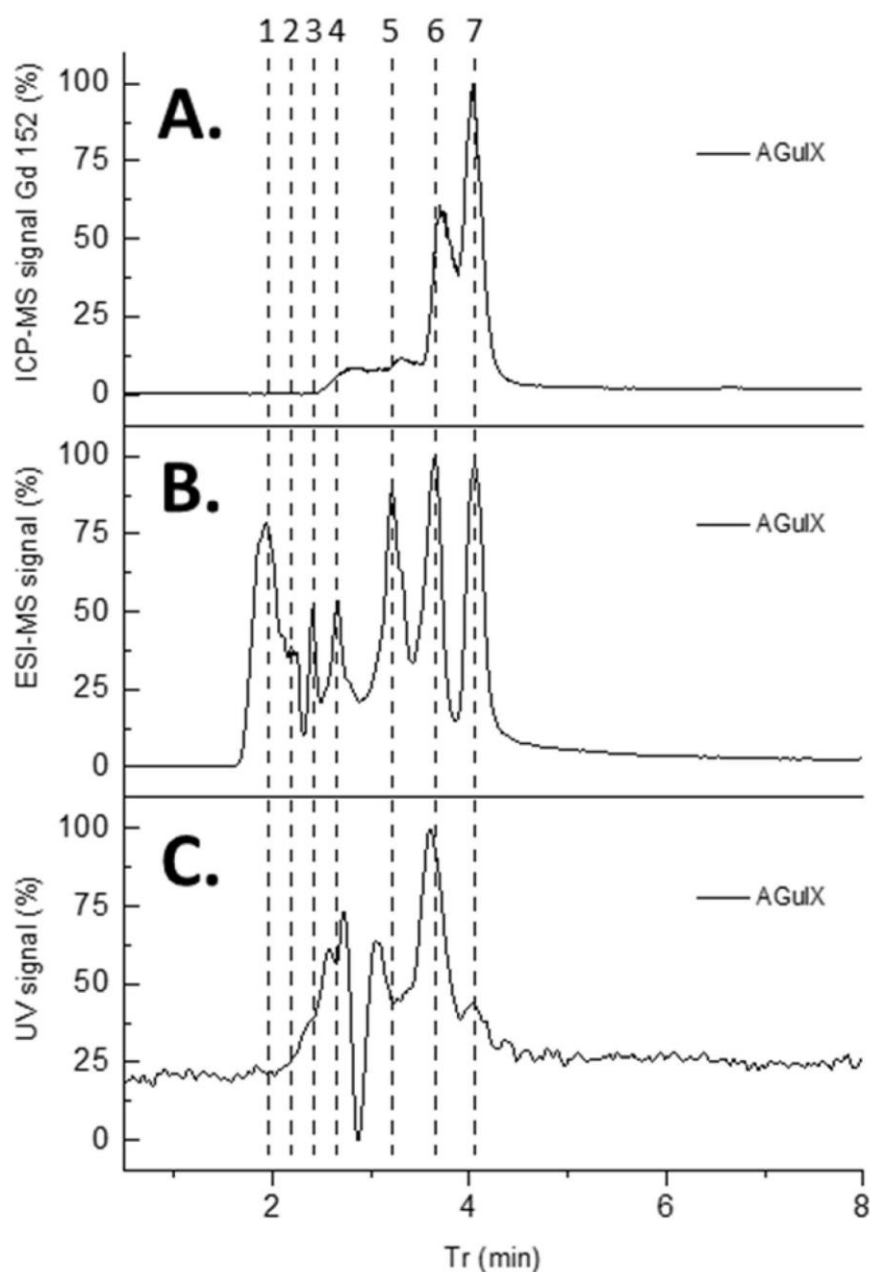


Figure 2. (A) LC-ICP/MS chromatogram of AGuIX's fragments (3 μ L, 1 g/L) recorded at Gd 152 channel (B) LC-ESI/MS chromatogram of AGuIX's fragments (3 μ L, 1 g/L) set on mass range 300–1500 uma. (C) LC-UV chromatogram of AGuIX's fragments (10 μ L, 1 g/L) recorded at $\lambda = 295$ nm.

3.3. Identification of the Different Species by ESI/MS

As previously performed by Hu et al. for carbon nanoparticles [22], the different peaks separated by HPLC were fully studied by ESI/MS (see Figure 3) and the identification of the fragments was proposed in Table 1 using notable gadolinium isotopic patterns and water hydration to determine the charge states of the compounds. As stated previously, thanks to ICP-MS and UV detections, the two first peaks are fragments issued from polysiloxane without DOTAGA(Gd) sub-structures. For the first HPLC peak, three co-eluted components were identified (see Supporting Information Figure S4). For each, the mass is obtained involving a methanoate anion present in the eluent. The m/z signal at 303.0 ($z = 1$) is related to a fragment corresponding to two silicon atoms issued from APTES. A signal corresponding to an m/z of 423.0 is associated with four silicon atoms coming from APTES for two of them and TEOS for the two others. Interestingly, the signal at an m/z of 441.1 corresponds to the same species with the hydrolysis of one Si–O–Si bond. For the less defined HPLC peak 2 (see Supporting Information Figure S5) at a time of 2.19 min, larger polysiloxane fragments are observed. The intense signal at an m/z of 301.52 corresponds to a fragment with six silicon atoms including three issued from APTES and three issued from TEOS. The signal at an m/z of 394.5 corresponds to the same entity with the addition of one $\text{Si}(\text{OH})_3$ issued from TEOS. The signal at an m/z of 397.5 is obtained by the addition of another $\text{Si}(\text{OH})_3$ and the hydrolysis of two Si–O–Si bonds. Higher retention is observed for compounds containing DOTAGA(Gd) entities that are present in HPLC peaks 3 to 7. For HPLC peak 3, only one main entity (see Supporting Information Figure S6) is observed with different charge and hydrolysis states. The m/z signal of 391.4 ($z = 3$) corresponds to a DOTAGA(Gd) coupled to an aminopropyl with six silicon atoms issued from two APTES and four TEOS. Signals at an m/z of 397.4 and 403.6 are the products resulting from one and two hydrolysis of the Si–O–Si bonds. The m/z of 586.5 and m/z of 595.5 are associated with an m/z of 391.4 and 397.4, respectively, but for $z = 2$. The mass spectrum of HPLC peak 4 is relatively similar to that of HPLC peak 3. It corresponds also to one main species with different charge and hydrolysis states (see Supporting Information Figure S7). The signal at an m/z of 358.0 ($z = 3$) corresponds to DOTAGA(Gd) coupled to an aminopropyl with five silicon atoms issued from two APTES and three TEOS. Hydrolysis of one or two Si–O–Si bonds leads to the species at an m/z of 364.0 and 370.0, respectively. For the three species, another charge state is also detected ($z = 2$) at an m/z of 536.5, 545.6 and 554.6 corresponding to the precedent species either not hydrolyzed or with the hydrolysis of one or two Si–O–Si bonds, respectively. For HPLC peak 5, a compound containing two DOTAGA(Gd) species is observed at an m/z of 506.8 (see Figure 4). It contains also nine silicon atoms issued from three APTES and six TEOS. The species at an m/z of 515.54 are related to the precedent ones with the hydrolysis of two Si–O–Si bonds. Interestingly other detected species contain only one DOTAGA(Gd) molecule. This can be explained by the cleaving hydrolysis of the Si–O–Si in the ESI-MS source leading to two species detected at an m/z of 486.0 and 536.5. The first one is composed of one DOTAGA(Gd) and four silicon atoms issued from three TEOS and one APTES. The hydrolysis of one Si–O–Si bond leads to a species detected at an m/z = 495.0 for $z = 2$ and 330.4 for $z = 3$. For the second one, a composition of one DOTAGA(Gd) and five silicon atoms issued from three TEOS and two APTES is obtained. Hydrolysis of one Si–O–Si bond leads to m/z of 545.6 for $z = 2$ and 364.0 for $z = 3$. For HPLC peak 6 also, the main species corresponds to two DOTAGA(Gd) and twenty silicon atoms issued from nine APTES and eleven TEOS (see Supporting Information Figure S8). As for HPLC peak 5, cleaving hydrolysis of a Si–O–Si bond occurs in the ESI-MS source and leads to two different species with different charge states. The first one corresponds to one DOTAGA(Gd) associated with nine silicon atoms issued from four APTES and five TEOS and is observed at an m/z of 367.3 for $z = 4$ and of 733.6 for $z = 2$. By hydrolysis or condensation, the species at an m/z of 724.6, 742.6, 751.6 or 760.6 can be obtained (see Figure 5). The

second one corresponds to one DOTAGA(Gd) associated with eleven silicon atoms issued from five APTES and six TEOS and corresponds to masses of 425.5 ($z = 4$) and 850.1 ($z = 2$). Finally, HPLC peak 7 is attributed to DOTAGA(Gd) without polysiloxane fragments (see Supporting Information Figure S9). This was verified by an LC-ESI-MS analysis of a control sample of DOTAGA(Gd) (see Supporting Information Figure S10).

Altogether, these results show the biodegradability of the nanoparticle and its equilibrium with smaller fragments issued from the cleaving hydrolysis of Si–O–Si functions. It has already been shown that a large part of these fragments is eliminated very rapidly, as fragments under 8 kDa are mainly observed five minutes after intravenous administration in rats, and their concentration decreases a lot after this timepoint [23]. One of the limitations of the study is the use of an aqueous medium that cannot completely mimic the more complex interactions that may arrive in a biological medium but a precedent biodegradation study performed in phosphate buffer and serum has shown a very similar electrophoretic profile for the molecular fragments in both media [19]. Moreover, AGuIX presents very limited interactions with proteins, such as human serum albumin [24], confirmed by their very fast renal elimination [15,16]. Altogether, these results indicate that the fragments identified in this study will certainly also be representative of the biological medium.

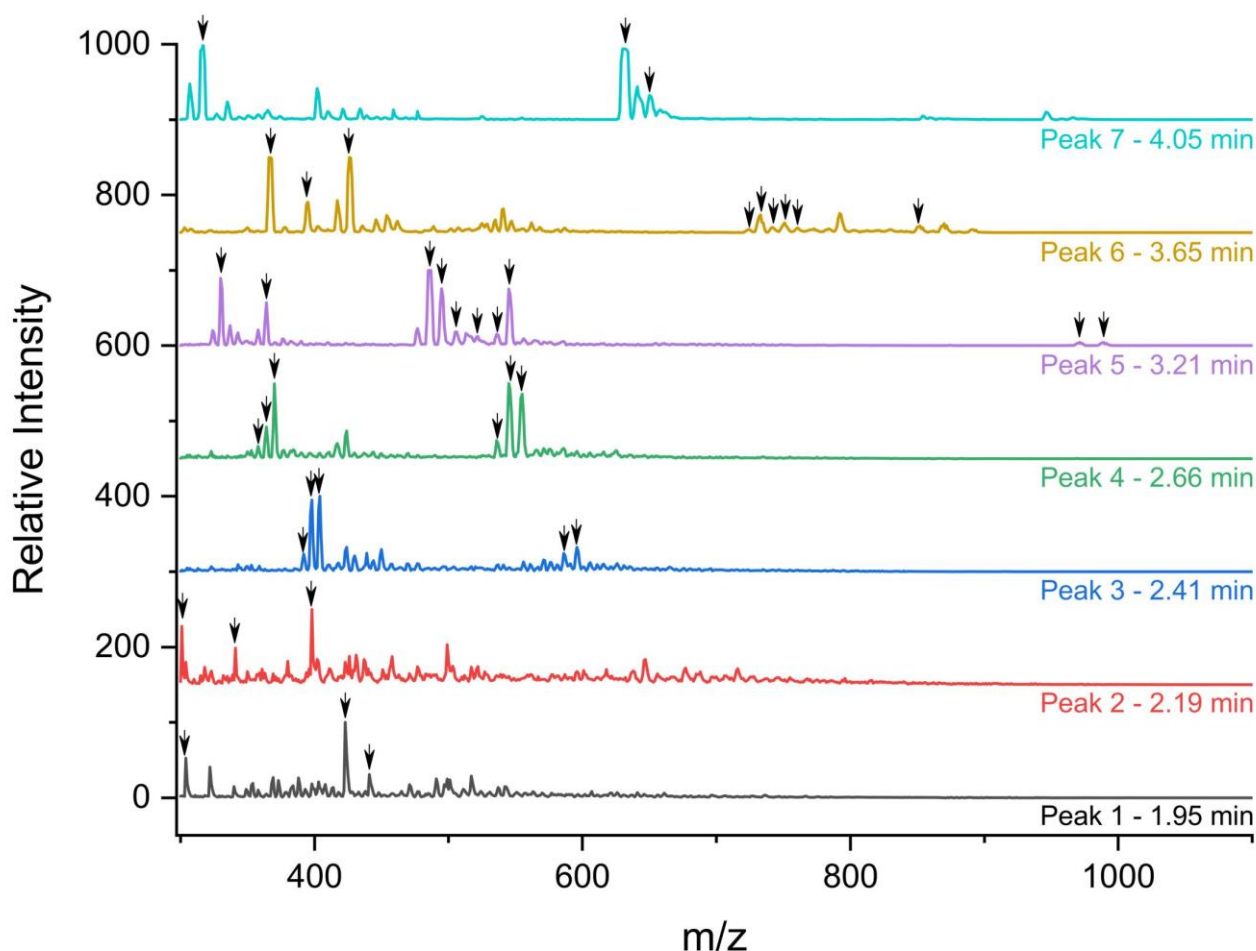


Figure 3. MS spectra of each peak identified (1–7) in the LC-ESI/MS AGuIX's fragments chromatogram. All identified m/z are pointed with a black arrow.

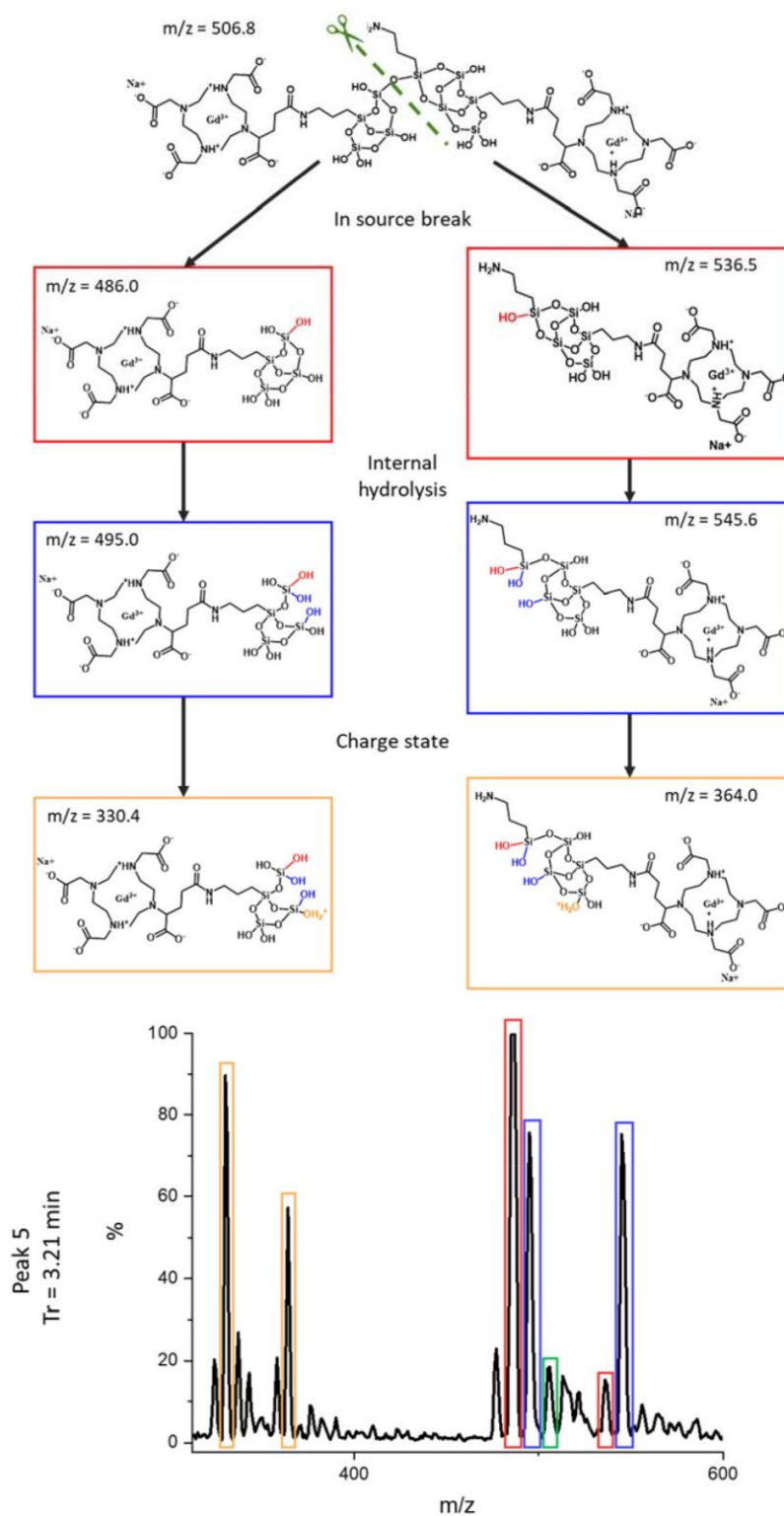


Figure 4. Structure of the main chemical compound detected on peak 5 (Tr = 3.21 min) and of the related species issued from the hydrolysis of the Si–O–Si bond.

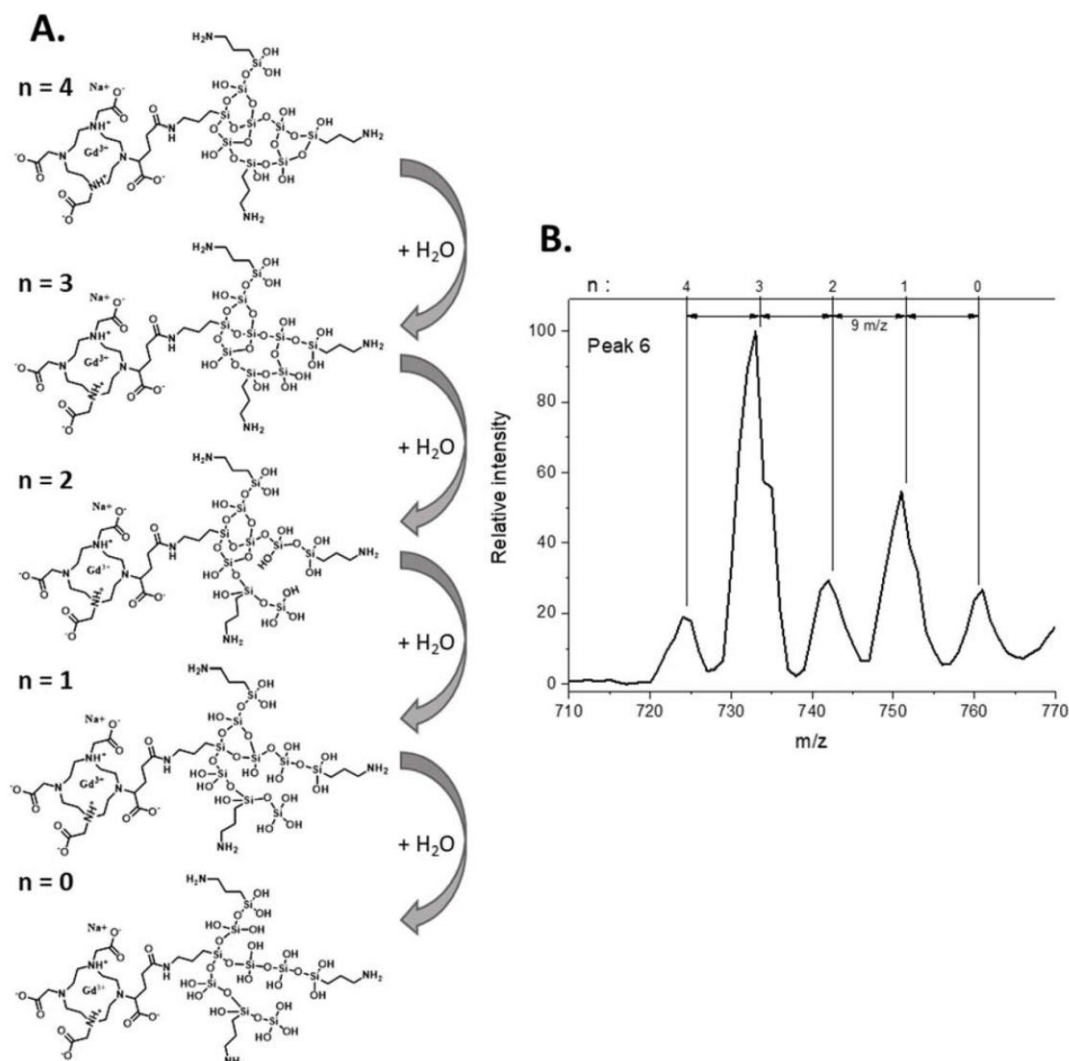


Figure 5. As illustrated by study of peak 6 fragment, different hydrolysis and condensation reaction can occur leading to addition or removal of H_2O to the structure. **(A)** Scheme of successive siloxane bridge hydrolysis going from $n = 4$ to $n = 0$ on fragment detected at $m/z = 724.6$. **(B)** Zoom on the related peak 6 MS spectra area (710–770 m/z) where the successive m/z of hydrolyzed fragment can be found.

Table 1. Proposed fragments formula for m/z observed in MS spectra of peak 1 to 7, with associated retention time from 1.95 to 4.05 min.

| Time (min) | m/z | Species | Peak |
|------------|-------|---|------|
| 1.95 | 303.0 | $\text{C}_6\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}_2^{2+} + \text{CHO}_2^-$ | 1 |
| | 423.0 | $\text{C}_6\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_9\text{Si}_4^{2+} + \text{CHO}_2^-$ | |
| | 441.1 | $\text{C}_6\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Si}_4^{2+} + \text{CHO}_2^-$ | |
| 2.19 | 301.5 | $\text{C}_9\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{Si}_6^{3+} + \text{CHO}_2^-$ | 2 |
| | 340.5 | $\text{C}_9\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_{16}\text{Si}_7^{3+} + \text{CHO}_2^-$ | |
| | 397.5 | $\text{C}_9\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_{21}\text{Si}_8^{3+} + \text{CHO}_2^-$ | |

Table 1. Cont.

| Time (min) | <i>m/z</i> | Species | Peak |
|------------|------------|---|------|
| 2.41 | 391.7 | C ₂₈ H ₅₆ GdN ₇ O ₂₁ Si ₆ ²⁺ + Na ⁺ | 3 |
| | 397.7 | C ₂₈ H ₅₈ GdN ₇ O ₂₂ Si ₆ ²⁺ + Na ⁺ | |
| | 403.7 | C ₂₈ H ₆₀ GdN ₇ O ₂₃ Si ₆ ²⁺ + Na ⁺ | |
| | 587.1 | C ₂₈ H ₅₅ GdN ₇ O ₂₁ Si ₆ ⁺ + Na ⁺ | |
| | 596.1 | C ₂₈ H ₅₇ GdN ₇ O ₂₂ Si ₆ ⁺ + Na ⁺ | |
| 2.66 | 358.0 | C ₂₅ H ₄₉ GdN ₆ O ₂₀ Si ₅ ²⁺ + Na ⁺ | 4 |
| | 364.0 | C ₂₅ H ₅₁ GdN ₆ O ₂₁ Si ₅ ²⁺ + Na ⁺ | |
| | 370.0 | C ₂₅ H ₅₃ GdN ₆ O ₂₂ Si ₅ ²⁺ + Na ⁺ | |
| | 536.5 | C ₂₅ H ₄₈ GdN ₆ O ₂₀ Si ₅ ⁺ + Na ⁺ | |
| | 545.6 | C ₂₅ H ₅₀ GdN ₆ O ₂₁ Si ₅ ⁺ + Na ⁺ | |
| 3.21 | 554.6 | C ₂₅ H ₅₂ GdN ₆ O ₂₂ Si ₅ ⁺ + Na ⁺ | 5 |
| | 330.4 | C ₂₂ H ₄₄ GdN ₅ O ₂₀ Si ₄ ²⁺ + Na ⁺ | |
| | 364.0 | C ₂₅ H ₅₁ GdN ₆ O ₂₁ Si ₅ ²⁺ + Na ⁺ | |
| | 486.0 | C ₂₂ H ₄₁ GdN ₅ O ₁₉ Si ₄ ⁺ + Na ⁺ | |
| | 495.0 | C ₂₂ H ₄₃ GdN ₅ O ₂₀ Si ₄ ⁺ + Na ⁺ | |
| | 506.8 | C ₄₇ H ₈₇ Gd ₂ N ₁₁ O ₃₈ Si ₉ ²⁺ + 2 Na ⁺ | |
| | 515.5 | C ₄₇ H ₉₁ Gd ₂ N ₁₁ O ₄₀ Si ₉ ²⁺ + 2 Na ⁺ | |
| | 536.5 | C ₂₅ H ₄₈ GdN ₆ O ₂₀ Si ₅ ⁺ + Na ⁺ | |
| | 545.6 | C ₂₅ H ₅₀ GdN ₆ O ₂₁ Si ₅ ⁺ + Na ⁺ | |
| | 971.1 | C ₂₂ H ₄₀ GdN ₅ O ₁₉ Si ₄ ⁺ + Na ⁺ | |
| 3.65 | 989.1 | C ₂₂ H ₄₂ GdN ₅ O ₂₀ Si ₄ ⁺ + Na ⁺ | 6 |
| | 367.3 | C ₃₁ H ₇₂ GdN ₈ O ₃₀ Si ₉ ³⁺ + Na ⁺ | |
| | 394.2 | C ₆₅ H ₁₅₇ Gd ₂ N ₁₇ O ₆₆ Si ₂₀ ⁶⁺ + 2 Na ⁺ | |
| | 425.5 | C ₃₄ H ₈₇ GdN ₉ O ₃₇ Si ₁₁ ³⁺ + Na ⁺ | |
| | 724.6 | C ₃₁ H ₆₈ GdN ₈ O ₂₉ Si ₉ ⁺ + Na ⁺ | |
| | 733.6 | C ₃₁ H ₇₀ GdN ₈ O ₃₀ Si ₉ ⁺ + Na ⁺ | |
| | 742.6 | C ₃₁ H ₇₂ GdN ₈ O ₃₁ Si ₉ ⁺ + Na ⁺ | |
| | 751.6 | C ₃₁ H ₇₄ GdN ₈ O ₃₂ Si ₉ ⁺ + Na ⁺ | |
| 4.05 | 760.6 | C ₃₁ H ₇₆ GdN ₈ O ₃₃ Si ₉ ⁺ + Na ⁺ | 7 |
| | 850.1 | C ₃₄ H ₈₅ GdN ₉ O ₃₇ Si ₁₁ ⁺ + Na ⁺ | |
| | 316.6 | C ₁₉ H ₃₁ GdN ₄ O ₁₀ ²⁺ | |
| | 632.1 | C ₁₉ H ₃₀ GdN ₄ O ₁₀ ⁺ | |
| | 650.1 | C ₁₉ H ₃₀ GdN ₄ O ₁₀ ⁺ + H ₂ O | |

4. Conclusions

Full identification of silanol molecular species issued from AGuIX partial dissolution in an aqueous medium was performed. These molecular species are fragments of the ultrasmall AGuIX nanoparticle that are in dynamic equilibrium with the nanoparticles at a given concentration. They display from one to two DOTAGA (Gd) entities. These fragments are of no safety concern due to their silane composition and also their rapid elimination through the kidneys [23]. The approach developed in this study can be applied

to different ultrasmall nanoparticles that will certainly be mainly developed in the future due to their interesting pharmacokinetic features.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nano12050738/s1>, Figure S1: Synthesis route of AGuIX; Figure S2: AGuIX main characterizations; Figure S3: Quantification of uncomplexed DOTAGA; Figure S4: Chemical structures of the fragments identified at HPLC peak 1; Figure S5: Chemical structures of the fragments identified at HPLC peak 2; Figure S6: Chemical structures of the fragments identified at HPLC peak 3; Figure S7: Chemical structures of the fragments identified at HPLC peak 4; Figure S8: Chemical structures of the fragments identified at HPLC peak 6; Figure S9: Chemical structures of the fragments identified at HPLC peak 7; Figure S10: MS spectra comparison of HPLC peak 7 (Tr = 4.05 min) and DOTAGA(Gd) control sample

Author Contributions: P.R. was involved in all the experiments and has participated in the writing of the paper. L.L. has participated in experiments involving ICP/MS and mass spectrometry. T.D. and M.J. have participated in the fine characterization of the NPs. B.G. and E.V. were involved in the mass spectrometry experiments. J.R., O.T., A.H. and F.L. have designed the study and were involved in all the characterization processes. A.H. and F.L. coordinated all the studies and have obtained the funding. F.L. has written the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work is part of the Analytaguix project and was supported by a French Government Grant managed by the French National Research Agency (ANR-18-CE17-0025-02). The authors want to also thank the Région Auvergne Rhône-Alpes for its support in project MEDFORCE (project number 19 01791501-40890).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: P.R., T.D. and M.J. are employees of NH TherAguix. F.L. and O.T. possess shares of NH TherAguix. F.L. and O.T. have filed patents on the synthesis of AGuIX nanoparticles.

References

1. Lim, E.K.; Kim, T.; Paik, S.; Haam, S.; Huh, Y.M.; Lee, K. Nanomaterials for theranostics: Recent advances and future challenges. *Chem. Rev.* **2014**, *115*, 327.
2. Johnson, K.K.; Koshy, P.; Yang, J.-L.; Sorrell, C. Preclinical Cancer Theranostics—From Nanomaterials to Clinic: The Missing Link. *Adv. Func. Mat.* **2021**, *31*, 2104199. [[CrossRef](#)]
3. Bort, G.; Lux, F.; Dufort, S.; Crémillieux, Y.; Verry, C.; Tillement, O. EPR-mediated tumor targeting using ultrasmall-hybrid nanoparticles: From animal to human with theranostic AGuIX nanoparticles. *Theranostics* **2020**, *10*, 1319–1331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Zhao, L.; Xing, Y.; Wang, R.; Yu, F.; Yu, F. Self-Assembled Nanomaterials for Enhanced Phototherapy of Cancer. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3*, 86–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Zhao, L.; Liu, H.; Xing, Y.; Wang, R.; Cheng, Z.; Lv, C.; Lv, Z.; Yu, F. Tumor microenvironment-specific functional nanomaterials for biomedical applications. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2020**, *16*, 1325–1358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Huang, H.; Feng, W.; Chen, Y.; Shi, J. Inorganic nanoparticles in clinical trials and translations. *Nano Today* **2020**, *35*, 100972. [[CrossRef](#)]
7. Anselmo, A.C.; Mitragotri, S. Nanoparticles in the clinic: An update post COVID-19 vaccines. *Bioeng. Transl. Med.* **2021**, *13*, e10246. [[CrossRef](#)]
8. Farjadian, F.; Ghasemi, A.; Gohari, O.; Roointan, A.; Karimi, M.; Hamblin, M.R. Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: Challenges and opportunities. *Nanomedicine* **2019**, *14*, 93–126. [[CrossRef](#)]
9. Agrahari, V.; Hiremath, P. Challenges associated and approaches for successful translation of nanomedicines into commercial products. *Nanomedicine* **2017**, *12*, 819–823. [[CrossRef](#)]
10. Sayes, C.M.; Aquino, G.V.; Hickey, A.J. Nanomaterial drug products: Manufacturing and analytical perspectives. *AAPS J.* **2017**, *19*, 18–25. [[CrossRef](#)]
11. Cassano, D.; Pocovi-Martinez, S.; Voliani, V. Ultrasmall-in-nano approach: Enabling the translation of metal nanomaterials to clinics. *Bioconj. Chem.* **2018**, *29*, 4–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zarschler, K.; Rocks, L.; Licciardello, N.; Boselli, L.; Polo, E.; Garcia, K.P.; de Cola, L.; Stephan, H.; Dawson, K.A. Ultrasmall inorganic nanoparticles: State-of-the-art and perspectives for biomedical applications. *Nanomedicine* **2016**, *12*, 1663–1701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Chen, F.; Ma, K.; Benezra, M.; Zhang, L.; Cheal, S.M.; Phillips, E.; Yoo, B.; Pauliah, M.; Overholtzer, M.; Zanzonico, P.; et al. Cancer-targeting ultrasmall silica nanoparticles for clinical translation: Physicochemical structure and biological property correlations. *Chem. Mater.* **2017**, *29*, 8766–8779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lux, F.; Tran, V.-L.; Thomas, E.; Dufort, S.; Rossetti, F.; Martini, M.; Truillet, C.; Doussineau, T.; Bort, G.; Denat, F.; et al. AGuIX[®] from bench to bedside—Transfer of an ultrasmall theranostic gadolinium-based nanoparticle to clinical medicine. *Br. J. Radiol.* **2018**, *91*, 20180365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Verry, C.; Dufort, S.; Lemasson, B.; Grand, S.; Pietras, J.; Troprès, I.; Crémillieux, Y.; Lux, F.; Mériaux, S.; Larrat, B.; et al. Targeting brain metastases with ultrasmall theranostic nanoparticles, a first-in-human trial from an MRI perspective. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaay5279. [[CrossRef](#)]
16. Verry, C.; Dufort, S.; Villa, J.; Gavard, M.; Iriart, C.; Grand, S.; Charles, J.; Chovelon, B.; Cracowski, J.L.; Quesada, J.L.; et al. Theranostic AGuIX nanoparticles as radiosensitizer: A phase I, dose-escalation study in patients with multiple brain metastases (NANO-RAD trial). *J. Balosso Radiother. Oncol.* **2021**, *160*, 159–165. [[CrossRef](#)]
17. Croissant, J.G.; Fatieiev, Y.; Kashab, N.M. Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1604634. [[CrossRef](#)]
18. Truillet, C.; Lux, F.; Tillement, O.; Dugourd, P.; Antoine, R. Coupling of HPLC with electrospray ionization mass spectrometry for studying the aging of ultrasmall multifunctional gadolinium-based silica nanoparticles. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10440–10447. [[CrossRef](#)]
19. Labied, L.; Rocchi, P.; Doussineau, T.; Randon, J.; Tillement, O.; Cottet, H.; Lux, F.; Hagège, A. Biodegradation of metal-based ultra-small nanoparticles: A combined approach using TDA-ICP-MS and CE-ICP-MS. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1185*, 339081. [[CrossRef](#)]
20. Le Duc, G.; Roux, S.; Paruta-Tuarez, A.; Dufort, S.; Brauer, E.; Marais, A.; Truillet, C.; Sancey, L.; Perriat, P.; Lux, F.; et al. Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. *Cancer Nanotechnol.* **2014**, *5*, 4. [[CrossRef](#)]
21. Mignot, A.; Truillet, C.; Lux, F.; Sancey, L.; Louis, C.; Denat, F.; Boschetti, F.; Bocher, L.; Gloter, A.; Stephan, O.; et al. A Top-Down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-Based silica nanoparticles for theranostic applications. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 6122–6136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Hu, Q.; Meng, X.; Choi, M.M.F.; Gong, X.; Chan, W. Elucidating the structure of carbon nanoparticles by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionisation quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *911*, 100–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Sancey, L.; Kotb, S.; Truillet, C.; Appaix, F.; Marais, A.; Thomas, E.; van der Sanden, B.; Klein, J.-P.; Laurent, B.; Cottier, M.; et al. Long-Term in Vivo Clearance of Gadolinium-Based AGuIX Nanoparticles and Their Biocompatibility after Systemic Injection. *ACS Nano* **2015**, *9*, 2477–2488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Yang, X.; Bolsa-Ferruz, M.; Marichal, L.; Porcel, E.; Salado-Leza, D.; Lux, F.; Tillement, O.; Renault, J.P.; Pin, S.; Wien, F.; et al. Human serum albumin in the presence of AGuIX nanoagents: Structure stabilisation without direct interaction. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4673. [[CrossRef](#)]

Ce travail a mis évidence la présence de diverses sous-espèces siliciées provenant toutes de la nanoparticule. De plus, on a pu observer grâce à cette méthode la présence du phénomène d'hydrolyse qui entraîne la dégradation des ponts Si-O-Si et l'apparition dans la solution des espèces moléculaires APTES, TEOS et APTE-DOTAGA(Gd) comme évoqué dans la section précédente.

3.4 Composition élémentaire et moléculaire d'AGuIX®

Dans le cadre d'une caractérisation la plus exhaustive possible d'AGuIX® il est important de connaître la composition élémentaire d'AGuIX® en ses éléments caractéristiques tel que Si/Gd/N/C. L'analyse des teneurs et des rapports élémentaires peut mener à une meilleure compréhension de la structure d'AGuIX®. L'état ou la forme de chaque élément et/ou molécules est tout aussi important. Ainsi la mesure de gadolinium libre dans l'échantillon permet de s'assurer de la sécurité du médicament car celui-ci est considéré comme potentiellement toxique lorsqu'il est libre dans le milieu. De même, l'état complexé ou libre des DOTAGA de surface est aussi un paramètre important. Dans cette partie nous nous intéresserons à l'analyse de tous ces paramètres pour en déduire la composition unitaire moléculaire et élémentaire d'AGuIX®.

3.4.1 Gadolinium libre

Comme indiqué en introduction, la détermination de la quantité de gadolinium libre dans le produit AGuIX® est une donnée critique qu'il est nécessaire d'évaluer précisément compte-tenu de son caractère potentiellement toxique (voir Section 2.2.4.2.1). Pour ce faire, une séparation phase inverse via colonne C4 a été développée afin de séparer le gadolinium libre du reste des composants du mélange. En sortie de l'HPLC un détecteur ICP-MS est utilisé afin de mesurer le gadolinium. L'injection de standards de gadolinium à différentes concentrations permet premièrement de s'assurer que le gadolinium libre est bien élué au début du chromatogramme et deuxièmement permet l'obtention d'une courbe de calibration qui permettra la quantification du gadolinium libre résiduel d'AGuIX®. Les différents chromatogrammes et la courbe de calibration qui résultent de cette expérience sont présentés Figure 46.

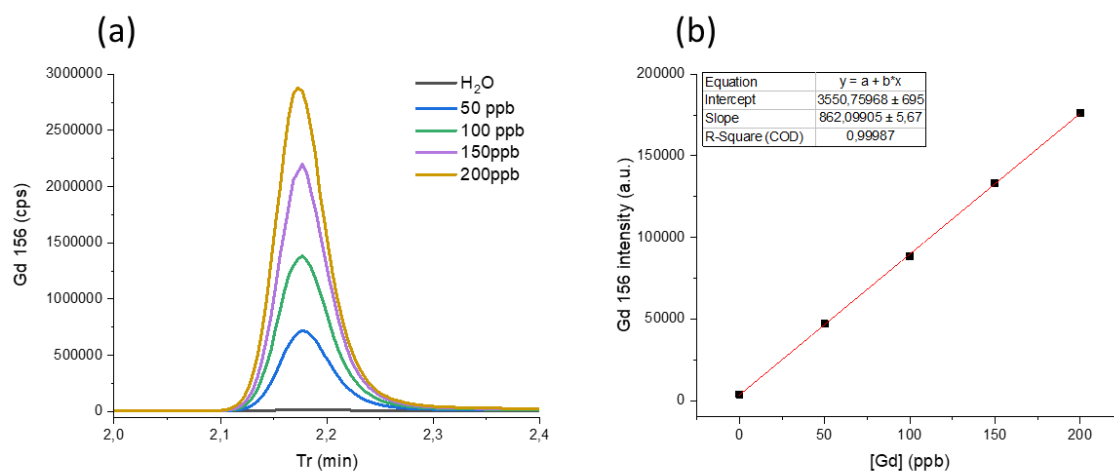


Figure 46. (a) Augmentation du signal Gd 156 en HPLC-ICP/MS après injection des standards composant la courbe de calibration du gadolinium libre (b) Courbe de calibration du gadolinium libre avec un $R^2 = 0,999$.

Le gadolinium libre a donc un temps de rétention $Tr = 2,18$ min dans les conditions expérimentales. De plus, la courbe de calibration obtenue présente un coefficient de corrélation $R^2 = 0,999$. On peut donc évaluer la quantité de gadolinium libre résiduel dans AGuIX[®] grâce à cette méthode. Le résultat de l'injection d'AGuIX[®] est présenté Figure 47.

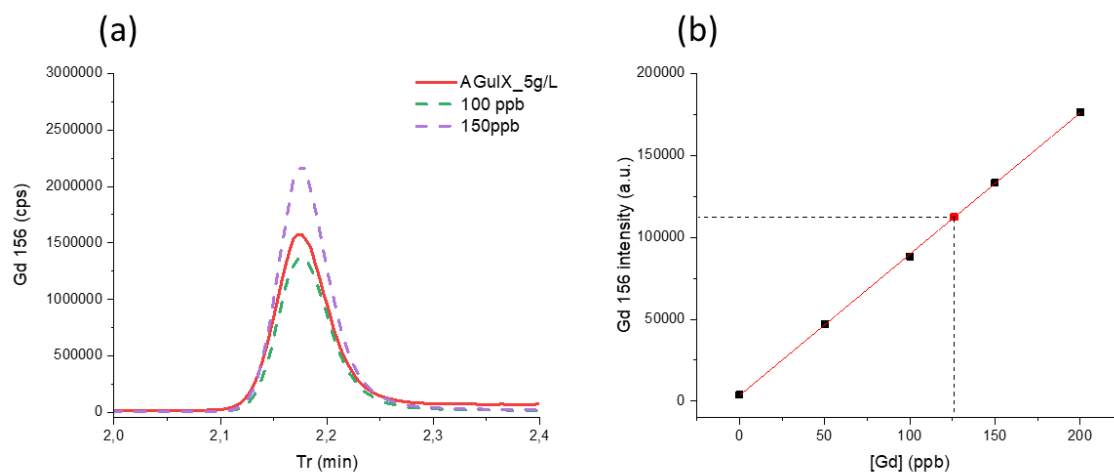


Figure 47. Signal Gd 156 du gadolinium libre contenu dans AGuIX[®] à 5 g/L (rouge) encadré par les standards les plus proches (vert et violet) (b) détermination de la quantité de gadolinium libre par usage de la courbe de calibration.

L'injection d'un échantillon d'AGuIX[®] à 5 g/L indique une concentration en gadolinium libre de 126 ppb ($= \mu\text{g}/\text{Kg} \approx \mu\text{g}/\text{L}$). La concentration de gadolinium libre dans le produit AGuIX[®] est donc de 25 ppm c'est à dire 25 mg de gadolinium libre par kilogramme de produit AGuIX[®]. D'après les résultats de l'analyse élémentaire présentés en Section 3.4.3, la concentration massique de gadolinium dans AGuIX[®] est de 11,1 %, cela signifie que

plus de 99,9% du gadolinium contenu dans AGuIX[®] est complexé. A ce jour, les lignes directrices harmonisées de la pharmacie (ICH Q3D) ne mentionnent pas textuellement de limite injectable pour cet élément [139]. Toutefois depuis les incidents issus de la pharmacovigilance sur les injections répétées de GBCAs, il est important de montrer que cette teneur peut être 1) précisément quantifiée et 2) contrôlée à un niveau relativement faible. Une teneur de 25 ppm est considérée comme suffisamment faible dans le cadre d'un traitement d'un cancer avancé par AGuIX[®].

3.4.2 DOTAGA libre

La présence de DOTAGA libre dans le produit final est un paramètre important dans le cadre de la caractérisation d'AGuIX[®]. La présence de DOTAGA libre peut impacter certaines propriétés physico-chimiques telles que la charge de surface. Pour répondre à cette question, nous avons développé une technique de titration basée sur la complexation de ions Cu²⁺. En effet, le DOTAGA forme un complexe stable avec les ions Cu²⁺ ($\log \beta = 22,44$) [140,141], ce complexe DOTAGA(Cu) absorbe de façon intense à 295 nm comparé au DOTAGA non complexé. En jouant sur cette forte différence d'absorbance il est donc possible de déterminer le point d'équilibre de la titration. Ce point correspond au moment où le cuivre devient l'espèce en excès. L'ajout de cuivre supplémentaire n'entraînant plus la formation de DOTAGA(Cu) une différence dans l'évolution de l'absorbance pourra être constatée. Les résultats du test de titration des DOTAGA présents dans le produit AGuIX[®] sont visibles en Figure 48.

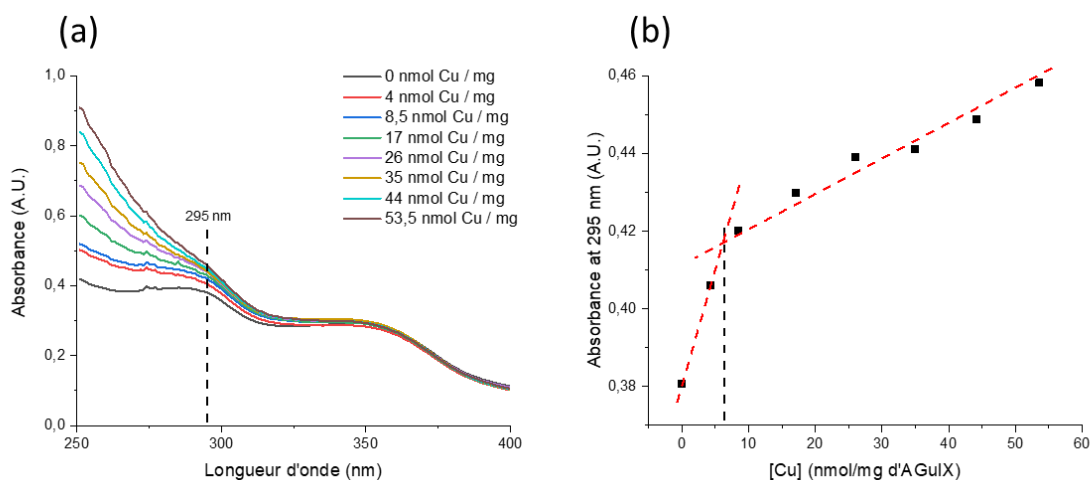


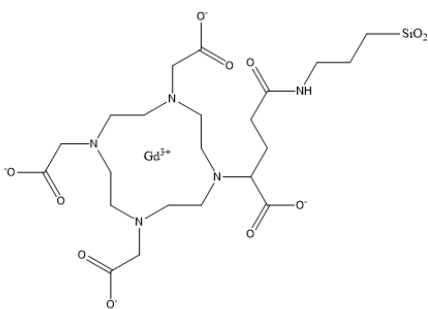
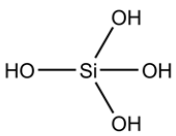
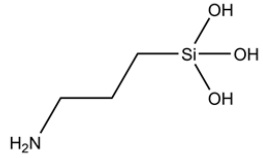
Figure 48. (a) Augmentation de l'absorbance dû à l'ajout de cuivre dans un échantillon d'AGuIX[®] (b) détermination du point d'équilibre indiquant la quantité de DOTAGA libre dans AGuIX[®]

AGuIX[®] présente une quantité de DOTAGA libre de 6 nanomoles de DOTAGA libre par mg. Cette quantité est très faible comparée aux 706 nanomoles de DOTAGA(Gd) par mg d'AGuIX[®] ([Gd] = 11,1 w%). Les DOTAGA libres représentent donc autour de 1 % de la quantité de DOTAGA totale. Cette quantité est exploitable pour complexer certains éléments d'intérêts comme des radioéléments pour l'imagerie [142].

3.4.3 Analyse élémentaire et formule unitaire

L'analyse élémentaire d'AGuIX[®] permet la détermination des rapports entre éléments au sein de la nanoparticule. La connaissance de ces rapports ainsi que des espèces constitutives d'AGuIX[®] peut nous renseigner de manière précise sur sa structure. En effet, il est possible de déterminer à partir d'un système d'équations une formule unitaire moléculaire (FU) d'AGuIX[®] de type $FU = \text{DOTAGA}(\text{Gd})_x\text{APTES}_y\text{TEOS}_z$. La « Formule Unitaire » représente ici l'unité moléculaire qui se répète n-fois au sein de la nanoparticule. En plus des connaissances sur la composition élémentaire d'AGuIX[®] nous avons montré en Section 3.3.2. que la nanoparticule est composée des molécules TEOS, APTES et APTES-DOTAGA(Gd). Un bilan de la structure et composition atomique en Gd, N, Si et C est présenté dans le Tableau 10.

Tableau 10. Bilan des molécules constitutives d'AGuIX[®], de leur masse respectives ainsi que de leurs compositions en Gd, C, N, Si

| Product | M (g/mol) | Nombre de Gd | Nombre de C | Nombre de N | Nombre de Si |
|---|-----------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| APTES-DOTAGA(Gd)  | 748,9 | 1 | 22 | 5 | 1 |
| TEOS  | 96,11 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| APTES  | 137,21 | 0 | 3 | 1 | 1 |

Pour déterminer la formule élémentaire, nous posons les hypothèses suivantes :

- Tous les éléments quantifiés entrent dans la composition d'AGuIX® (pureté 100%).

- La quantité de APTES-DOTAGA libre est négligeable devant la quantité de APTES-DOTAGA(Gd)
(Section 3.4.2.)

$$n \text{ APTES DOTAGA}_{Total} = n \text{ APTES DOTAGA} + n \text{ APTES DOTAGA(Gd)} = n \text{ APTES DOTAGA(Gd)}$$

- La quantité de gadolinium libre est négligeable devant la quantité totale de gadolinium
(Section 3.4.1.)

$$n \text{ Gd} = n \text{ APTES DOTAGA(Gd)} = x$$

$$\text{Equation x : } x = n \text{ Gd}$$

- Les azotes sont uniquement issus des APTES et APTES-DOTAGA(Gd)

$$n \text{ N} = 5. n \text{ APTES DOTAGA(Gd)} + n \text{ APTES}$$

$$y = n \text{ APTES} + n \text{ APTES DOTAGA(Gd)}$$

$$y = n \text{ N} - 4. n \text{ APTES DOTAGA(Gd)}$$

$$y = n \text{ N} - 4. n \text{ Gd}$$

$$y = 7,1. n \text{ Gd} - 4. n \text{ Gd} = 3,1. n \text{ Gd} = 3,1. x$$

$$\text{Equation y : } y = 3,1. x$$

- Les siliciums sont uniquement issus des TEOS, APTES et APTES-DOTAGA(Gd)

$$n \text{ Si} = n \text{ TEOS} + n \text{ APTES} + n \text{ APTES DOTAGA(Gd)}$$

$$z = n \text{ TEOS}$$

$$z = n \text{ Si} - n \text{ APTES} - n \text{ APTES DOTAGA(Gd)}$$

$$z = n \text{ Si} - n \text{ N} + 4. n \text{ Gd}$$

$$z = 7,6. n \text{ Gd} - 7,1. n \text{ Gd} + 4. n \text{ Gd} = 4,5. n \text{ Gd} = 4,5. x$$

$$\text{Equation z : } z = 4,5. x$$

- Les carbones sont uniquement issus des APTES et APTES-DOTAGA(Gd)

$$n \text{ C} = 3. n \text{ APTES} + 22. n \text{ APTES DOTAGA(Gd)}$$

$$n \text{ C} = 3. n \text{ N} - 15. n \text{ Gd} + 22. n \text{ Gd} = 21,3. n \text{ Gd} + 7. n \text{ Gd} = 28,3. n \text{ Gd} = 28,3. x$$

$$\text{Equation C : } n \text{ C} = 28,3. x$$

Grâce à ce jeu d'équations, il est donc facile d'obtenir la formule unitaire d'AGuIX[®], FU = DOTAGA(Gd)_xAPTES_yTEOS_z, à partir des résultats de l'analyse élémentaire en Gd, N et Si. Les résultats des analyses élémentaires menées par les laboratoires d'analyses de l'Institut des Sciences Analytiques sont présentées dans le Tableau 11.

Tableau 11. Résultats de l'analyse élémentaire d'AGuIX[®] en Gd, C, N et Si

| | Gd (w%) | C (w%) | N (w%) | Si (w%) |
|--------------------------------|------------|-----------|-----------|------------|
| AGuIX [®] | 11,1 | 22,0 | 7,02 | 15,08 |
| Ratio molaire par rapport à Gd | 1 | 25,9 | 7,1 | 7,6 |

Ainsi, d'après cette analyse la formule unitaire d'AGuIX[®] est du type FU = DOTAGA(Gd)₁APTES_{3,1}TEOS_{4,5}. Une formule unitaire de ce type possède une masse molaire maximale de 1487,88 g/mol dans son état de condensation minimum (minimum de pont Si-O-Si). Une représentation schématique de ce type de formule unitaire est présentée en Figure 49. L'équation sur les carbones permet d'évaluer la crédibilité de cette formule unitaire. On observe ainsi un ratio molaire C/Gd expérimental de 25,9 (Tableau 11) et théorique de 28,3 (Equation C). Cet écart de 9,3 % entre les valeurs théoriques et expérimentales peut s'expliquer par les différentes hypothèses faites lors de cette analyse. On peut aussi supposer la présence de quelques impuretés résiduelles (DEG par exemple). Néanmoins ces 2 valeurs restent proches et tendent à confirmer la FU déterminé précédemment.

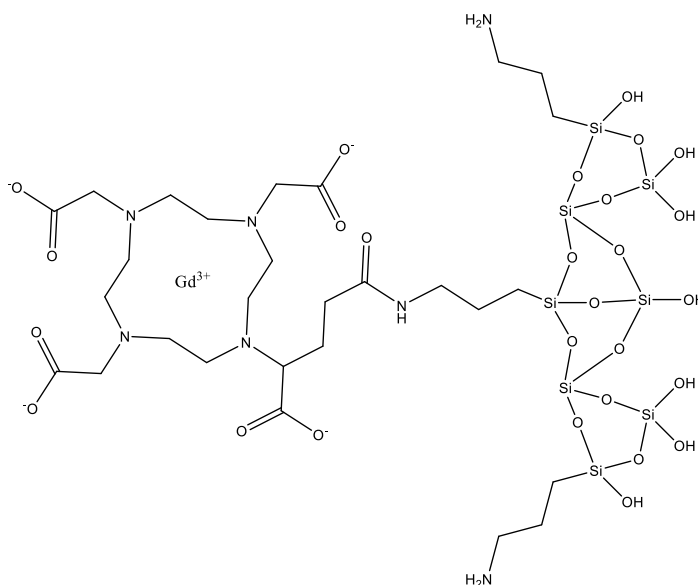
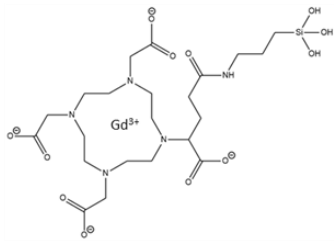
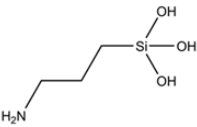
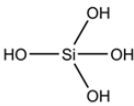


Figure 49. Schéma d'une formule unitaire d'AGuIX[®] DOTAGA(Gd)₁APTES₃TEOS₅, condensée avec 4 ponts Si-O-Si, M = 1305,72 g/mol.

3.4.4 Dégradation totale et Formule unitaire

Comme indiqué précédemment en Section 3.3.2., la dégradation totale de AGuIX® en ses molécules constitutives APTES-DOTAGA(Gd), APTES et TEOS, tous respectivement hydrolysés (voir Tableau 12), pourrait nous renseigner directement sur les rapports moléculaires impliqués au sein de la nanoparticule.

Tableau 12. Bilan des molécules constitutives d'AGuIX® (voir Section 3.3.2)

| APTES-DOTAGA(Gd) F1 | APTES F2 | TEOS F3 |
|---|---|---|
|  |  |  |

Une formule unitaire de type $FU = \text{DOTAGA}(\text{Gd})_x\text{APTES}_y\text{TEOS}_z$ pourrait donc être obtenue par une simple quantification de ces molécules après dégradation totale. Cette dégradation par dissolution de la matrice polysiloxane peut être suivie grâce à la méthode HPLC-SEC-ICP-MS développée pour le suivi de la dégradation d'AGuIX®. Ainsi, on observe une dégradation totale après une dilution à 0,5 g/L dans l'eau pendant 72 h comme présenté en Figure 50.

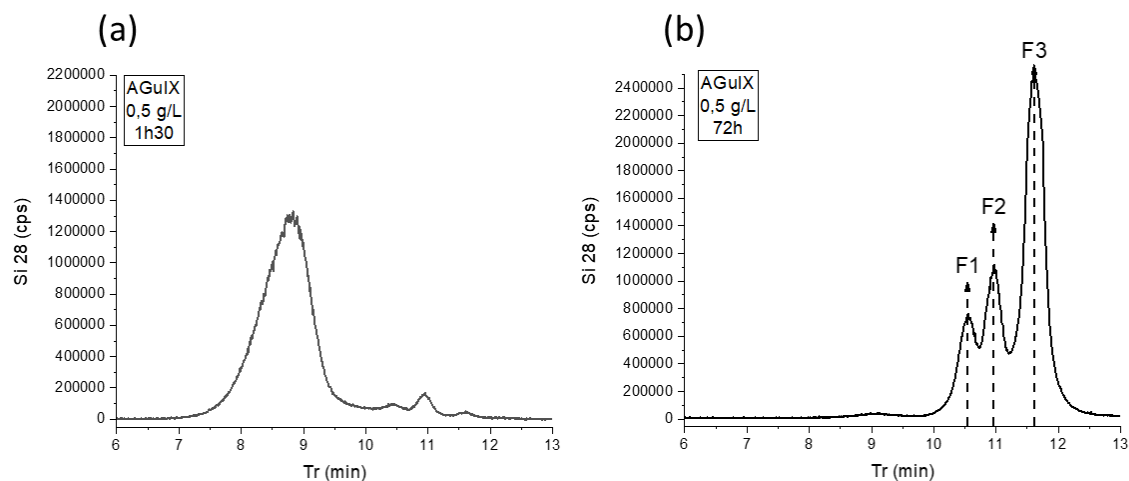


Figure 50. (a) Chromatogramme d'AGuIX® à 0,5 g/L après 1 h 30 de dilution (b) Chromatogramme d'AGuIX® à 0,5 g/L après 72h de dilution. Les F1, F2 et F3 correspondent respectivement à APTES-DOTAGA(Gd), APTES et TEOS.

Détection ICP/MS : Si 28

Le signal obtenu après dégradation totale peut être décomposé en une somme de trois fonctions gaussiennes dont chacune des aires est proportionnellement liée à la quantité de chaque espèce dans l'échantillon. Les résultats de la déconvolution sont présentés en Figure 51 et dans le Tableau 13.

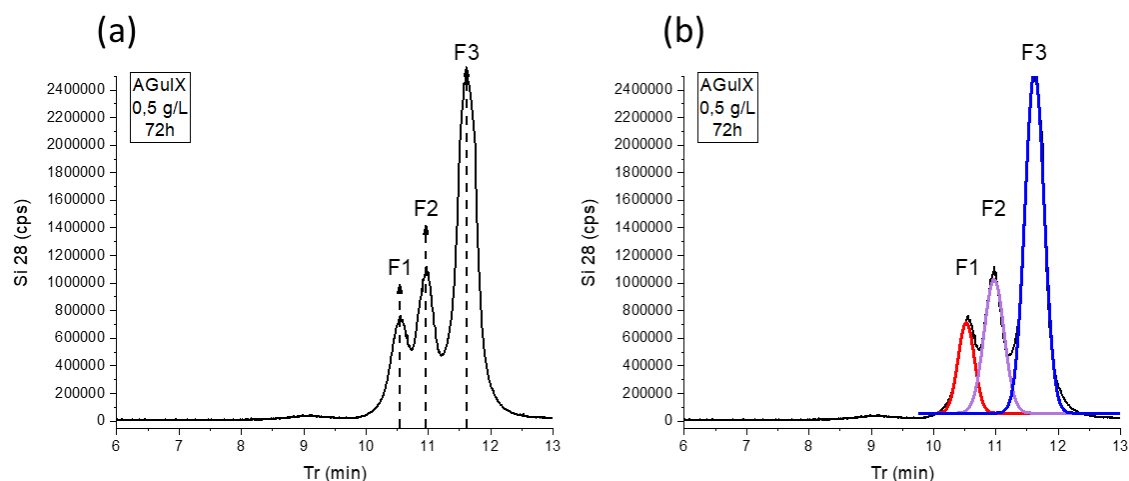


Figure 51. (a) Chromatogramme d'AGuIX® à 0,5 g/L après 72h de dilution. Les F1, F2 et F3 correspondent respectivement à APTES-DOTAGA(Gd), APTES et TEOS (b) résultats de la déconvolution en 3 pics gaussien de la zone des fragments F1 (noir), F2 (violet) et F3 (bleu).

Ainsi, la déconvolution en trois fonctions gaussiennes converge vers une solution très proche du signal obtenu expérimentalement. Les aires respectives de ces gaussiennes sont présentées dans le Tableau 6. Il est important de souligner que l'APTES est aussi présent dans le pic du produit APTES-DOTAGA(Gd).

Tableau 13. Mesure des aires issues de la déconvolution des pics de fragments et des ratios moléculaires associés

| FU = DOTAGA(Gd) ^x APTES ^y TEOS ^z | | |
|---|--------|-----------|
| Pic | Aire | Ratio |
| F1 APTES-DOTAGA(Gd) | 213023 | x = 1 |
| F2 APTES | 388485 | y-x = 1,8 |
| F3 TEOS | 956263 | z = 4,5 |

Ainsi, d'après l'analyse des aires, on obtient les ratios en espèces moléculaires qui donnent directement accès à la formule unitaire suivante : $FU_{HPLC} = DOTAGA(Gd)_1APTES_{2,8}TEOS_{4,5}$. Cette formule unitaire est très proche de celle obtenue dans la Section précédente grâce à l'analyse élémentaire $FU_{Elementaire} = DOTAGA(Gd)_1APTES_{3,1}TEOS_{4,5}$.

3.5 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons montré le développement de plusieurs méthodes et approches analytiques pour caractériser plus finement la composition et la structure d'AGuIX[®]. Cette caractérisation approfondie est essentielle pour définir les attributs qualité critiques du produit maximisant son efficacité et sa sûreté. C'est également un prérequis dans l'optique de l'enregistrement du produit auprès des agences sanitaires en vue de sa commercialisation. Ces méthodes et approches analytiques ont été appliquées sur un échantillon représentatif du produit dont les résultats sont compilés dans le Tableau 14.

Tableau 14. Bilan récapitulatif des caractéristiques physico-chimique d'AGuIX[®]

| Produit | AGuIX[®] |
|--|--|
| D_H (nm) | DLS : 5,6 ± 2 TDA : 4,6 ± 0,4 SAXS : 4,6 ± 0,3 |
| M_w (g/mol) | SEC-MALLS : 20 270 |
| IEP (pH) | Zêta : 7,8 |
| Géométrie | SAXS : Sphérique |
| Relaxométrie (s⁻¹.mM⁻¹) | r ₁ = 19,7 r ₂ = 32,0 |
| Pureté à 295 nm (%) | HPLC-UV : > 95 % |
| Gd (w%) | ICP-AES : 11,1 |
| Gd libre (ppm) | HPLC-ICP/MS : 25 |
| DOTAGA libre (% DOTAGA totale) | Titration Cu : < 1 % |
| FU | ICP-AES : DOTAGA(Gd) ₁ APTES _{3,1} TEOS _{4,5} HPLC-ICP/MS : DOTAGA(Gd) ₁ APTES _{2,8} TEOS _{4,5} |
| Nombre de FU par particule (Nombre de Gd par particule) | ≈ 15 |

La détermination du poids de la nanoparticule ainsi que de sa formule unitaire nous permettent de déterminer le nombre de répétition de FU qui constitue la nanoparticule. Ainsi, pour une masse de nanoparticule $M = 20\,270$ g/mol et une masse de FU de l'ordre de $1\,400$ g/mol (FU condensé) on obtient une répétition de l'ordre de 15 FU. AGuIX[®] est donc une nanoparticule sphérique composée de 15 FU de type : DOTAGA(Gd)₁APTES_{3,1}TEOS_{4,5}. A partir de ces informations, une représentation 3D d'AGuIX[®] a été générée à l'aide du logiciel *open-source* AVOGADRO. Cette représentation est issue de l'ajout successif de FU. Le résultat est présenté en Figure 52. La matrice du cœur est composée majoritairement de Si (Si : atomes orange). On retrouve à la surface de la nanoparticule les groupements les groupement NH₂ des APTES (N : atomes bleu, H : atomes blanc) et aussi les complexes DOTAGA(Gd) (Gd : atomes cyan).

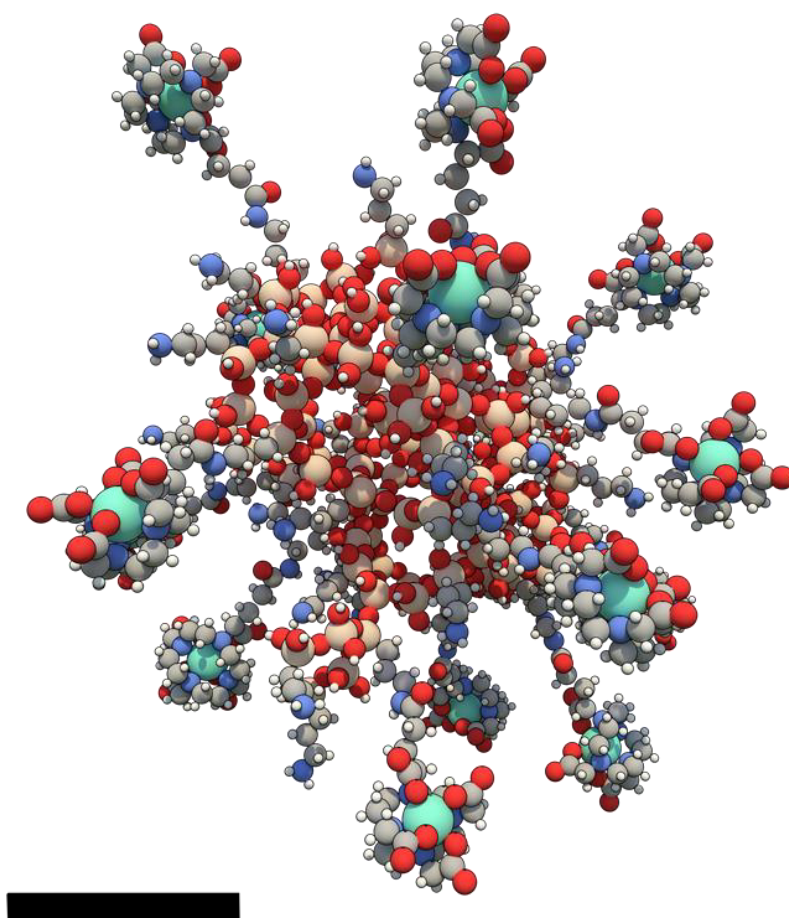


Figure 52. Modélisation de la particule AGuIX[®] à partir des informations issues du chapitre 3. La nanoparticule est donc constituée de 15 FU. La modélisation à été réalisée à l'aide du logiciel AVOGADRO. Le témoin noir mesure 1 nm de longueur.

Il est cependant évident que cette liste de caractérisations n'est pas exhaustive. Beaucoup d'autres expériences peuvent être réalisées ou ont été réalisées par le passé afin d'apporter des nouvelles données ou d'en conforter certaines au sujet d'AGuIX[®]. On peut citer ici la FTIR qui fait partie des analyses de routine dans la

caractérisation d'AGuIX[®]. La Microscopie à Transmission Electronique (TEM) est une mesure compliquée de par la faible densité de la nanoparticule mais pourrait être envisagée afin d'apporter de nouvelles informations sur la taille et la géométrie [113]. Dans le même domaine, la Microscopie à Force Atomique (AFM) pourrait être envisagée [143]. L'analyse thermogravimétrique (ATG) pourrait être utilisée pour confirmer les teneurs en composé organique et inorganique.

Les techniques développées dans ce chapitre ont été mises en avant aussi car elles ont été appliquées à la caractérisation des particules dérivées d'AGuIX[®] synthétisées dans les chapitres suivants.

4 CuPRiX : Des propriétés anti-angiogéniques pour un dérivé d'AGuIX®

Le cuivre est un élément important présent dans une large variété de procédés métaboliques. Il est nécessaire au bon déroulement du fonctionnement de l'organisme en intervenant dans des mécanismes tels que : la respiration mitochondriale, les mécanismes de défense anti-oxydants ou encore la bonne cohésion des matrices extracellulaires [144]. De plus, il a été démontré que la dérégulation de l'homéostasie du cuivre est souvent liée à l'apparition et au développement de certains cancers. Dans cette partie nous expliciterons, dans un premier temps, les liens mis en évidence entre cuivre et cancer ainsi que les moyens d'action qu'offrent ce lien. Dans un deuxième temps, nous montrerons comment modifier le produit AGuIX® pour permettre à la nanoparticule d'agir sur le cuivre afin de lutter contre le cancer. Ces propriétés seront enfin évaluées au travers de test *in vitro* sur cellules cancéreuses démontrant la capacité de cette nouvelle nanoparticule à limiter le développement de ces cellules. Ces résultats seront présentés dans un article publié.

4.1 Le cuivre et sa régulation comme paramètre important du développement du cancer

4.1.1 Le rôle du cuivre

Le cuivre est connu pour jouer un rôle essentiel dans la cascade métastatique au sein des cellules tumorales et du microenvironnement tumoral. En effet, il intervient et régule aussi les phénomènes de migration et d'invasion au sein de la tumeur [145]. Il est aussi un composant essentiel de diverses métalloenzymes, notamment la SOD1, la protéine d'adhésion vasculaire1, la métalloprotéinase matricielle (MMP-9) et la LOX, dont il a été démontré qu'elles font partie intégrante du processus métastatique [146]. Le cuivre joue également un rôle important dans l'angiogenèse dans l'expression de facteurs pro-angiogéniques comme les facteurs de croissance endothélial vasculaire (VEGF) ou l'angiogénine [147]. L'omniprésence du cuivre dans ces mécanismes liés au développement des tumeurs fait des cellules tumorales d'importantes consommatrices de cet élément. Différents essais cliniques ont ainsi démontré une augmentation significative du taux de cuivre dans le sérum de patients atteints de cancer comparé à des patients sains comme on peut le voir en Figure 53. De même, le taux de cuivre dans les tissus tumoraux comparé au taux dans les tissus sains est plus élevé (Figure 54).

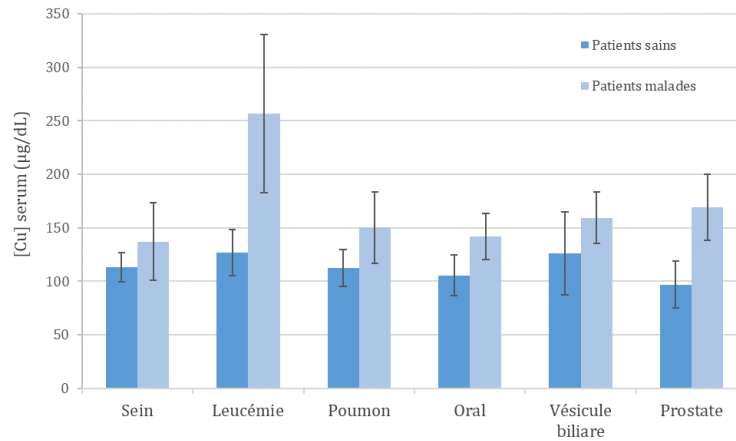


Figure 53. Comparaison des taux de cuivre sérique chez les patients sains et les patients atteints de cancer spécifiques ($p < 0,001$). Résultats issus de Shanbhag et al. [148].

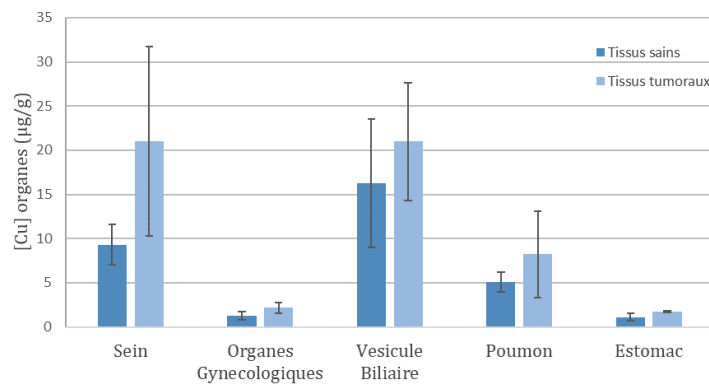


Figure 54. Comparaison des taux de cuivre dans des tissus sains et des tissus tumoraux ($p < 0,001$). Les mesures ont été effectuées sur des tissus sains et tumoraux issus du même patient. Résultats issus de Shanbhag et al. [148].

Certaines études ont mis en évidence l'impact du cuivre sur le développement de tissus tumoraux. Ainsi, en comparant deux populations de souris RIP1–Tag2 transgéniques, l'une recevant de l'eau traditionnelle et l'autre une eau contenant 20 µM de cuivre, l'équipe de S. Ishida a montré que la population recevant du cuivre développait des tumeurs plus importantes en volumes comme on peut le voir dans la Figure 55 [149].

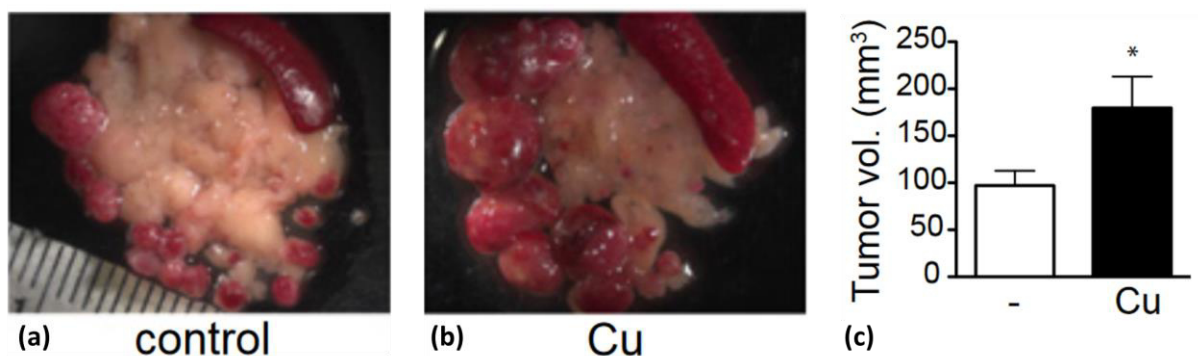


Figure 55. Illustration de la croissance tumorale sous supplémentation de cuivre. Des souris RIP1 – Tag2 ont été soumises à (a) l'eau ordinaire, ou (b) 20 μM de cuivre dans de l'eau potable, à partir du moment du sevrage (quatre semaines d'âge). Les tumeurs disséquées de souris âgées de 15 semaines sont dissociées et affichées à côté du pancréas (tissu blanchâtre), où la rate (tissu oblong rouge foncé) est affichée dans le coin supérieur droit. (c) Quantification du volume tumorale dans ces deux populations. Résultats moyennés et SEM $p < 0.05$ ($n = 15$) [150].

Agir sur des mécanismes aussi importants que l'angiogenèse tumorale ou le processus métastatique pourrait ralentir le développement d'un cancer. La détermination du rôle central du cuivre dans ces mécanismes a poussé les chercheurs à évaluer l'impact de stratégies dites de « déplétion du cuivre » chez les patients atteints de cancer. Ces stratégies visent à diminuer la quantité de cuivre présente dans l'organisme afin de priver les cellules tumorales de l'apport nécessaire à leur développement. Cette diminution peut être atteinte par une alimentation spécifique couplée à l'administration de chélateurs de cuivre tels que la D-penicilamine (DPA, Cuprimine[®], (S)-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid, $\log K = 1,9$ [151]), la trientine (TETA, Syprine[®], triethylenetetramine dihydrochloride, $\log K = 2,3$ [152]) ou encore le tetrathiomolybdate (TTM) [153] (voir Figure 56). Ces molécules font historiquement partie de l'arsenal thérapeutique pour soigner la maladie de Wilson. Cette maladie génétique provoque une modification de la protéine ATP7B intervenant dans le transport du cuivre intra et extra cellulaire [154]. Cette modification de la proréine entraîne une accumulation de cuivre dans l'organisme. L'administration de chélateurs permet la régulation du niveau de cuivre dans l'organisme. Il est intéressant de noter qu'historiquement, dans le cadre de cancers hépatobiliaires, l'apparition de métastases chez les patients atteints de la maladie de Wilson est faible, même chez les patients cirrhotiques. Le traitement par chélateur de cuivre semble jouer un rôle dans ce mécanisme bien que le lien ne soit pas clairement établi [155].

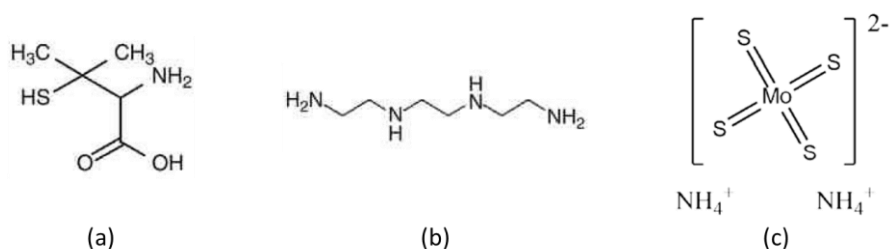


Figure 56 Formule moléculaire des chélateurs de cuivre sur le marché (a) DPA, (b) TETA et (c) du chélateur de cuivre évalué en clinique TTM.

4.1.2 Impact des stratégies de déplétion via le TTM

Bien que non utilisé en clinique, le TTM est un des médicaments les plus étudiés concernant le traitement de l'accumulation de cuivre. L'une des démonstrations les plus frappantes du potentiel thérapeutique à long terme du TTM, donc de la stratégie de déplétion de cuivre, est visible dans une étude portant sur la formation spontanée de tumeurs mammaires dans le modèle murin MMTV-neu menée par l'équipe de Pan et al [146]. Dans cette étude, le temps médian de développement de tumeurs chez les souris non traitées était de 218 jours. A cette même durée aucune souris traitée au TTM n'a présenté de tumeur. Cette absence s'est prolongée jusqu'à l'arrêt du traitement soit 150 jours après l'apparition des premières tumeurs du groupe contrôle comme on peut l'observer en Figure 57. Cependant, la découverte la plus intrigante de cette étude était que les tumeurs étaient apparues dans les semaines suivant l'arrêt du traitement par TTM. Cela suggère qu'une déplétion en cuivre à long terme ne supprime pas l'apparition de tumeurs, mais maintient plutôt les cellules dans un état de dormance continue. Ces résultats ont fourni des indices importants montrant que la déplétion du cuivre pourrait fonctionner dans la prévention de la malignité du cancer [146].

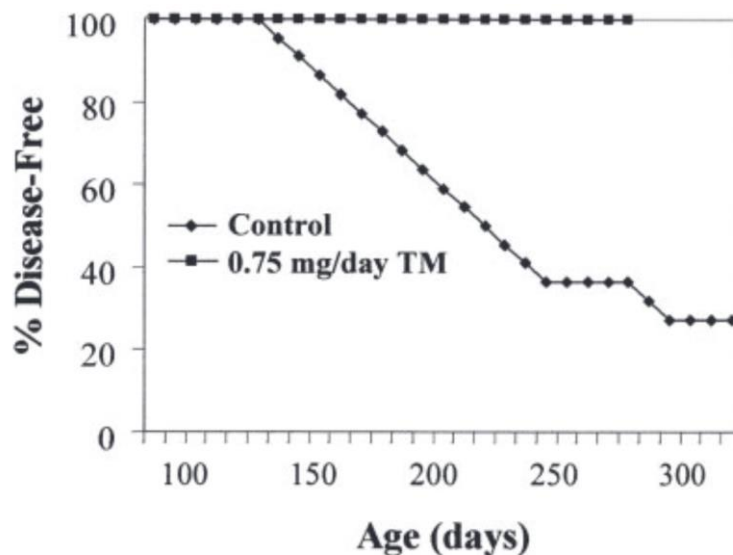


Figure 57. Diagramme de Kaplan-Meier d'apparition de la première tumeur chez les souris transgéniques *Her2/neu*. Des souris femelles transgéniques *Her2/neu* (âgées de 100 jours) ont été gavées avec de l'eau (témoin) ou 0,75 mg/jour de TTM ($n = 22$ pour le groupe control et $n = 15$ pour le groupe de traitement TTM).

Plus d'une vingtaine d'études ont démontré l'effet anticancéreux du TTM dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* portant sur une large variété de cancers [156]. Ces résultats précliniques encourageants ont poussé à la mise en place de divers essais cliniques.

Plusieurs essais ont tenté de montrer l'efficacité du TTM en tant qu'agent anticancéreux. Tous ces essais suivent un protocole très similaire consistant en un régime alimentaire spécifique allié à une prise orale de TTM 4 fois par jour. Ce protocole vise à diminuer le taux initial de céruloplasmine sérique jusqu'à 20 % du taux initial (5-15 mg/dL). Le taux de céruloplasmine sérique est un marqueur précis de la quantité générale de cuivre dans

l'organisme. Le taux de 20 % de la concentration initiale correspond à un état de défiance générale en cuivre qui entraîne peu d'effets secondaires sévères. Malheureusement, les premiers essais cliniques sur le TTM n'ont révélé aucun avantage chez les patients atteints d'un cancer métastatique de la prostate et du rein [157–159],

Aujourd'hui, l'action des chélateurs de cuivre est souvent évaluée en combinaison avec d'autres thérapies afin de montrer non pas son habilité à éliminer le cancer mais à l'affaiblir afin de le rendre plus sensible aux autres thérapies. On le retrouve ainsi couplé à la chimiothérapie [160–162], la radiothérapie [163,164] ou encore à l'immunothérapie [165]. Il est aussi testé en complément après chirurgie afin de prévenir l'apparition de nouvelles tumeurs [166].

C'est dans ce cadre de multimodalité d'action qu'AGuIX[®] pourrait jouer un rôle. En effet, les groupements DOTAGA présents à la surface d'AGuIX[®] pourraient être utilisés pour complexer le cuivre et priver les cellules tumorales de cet apport crucial. Grâce à sa biodistribution spécifique au sein des tumeurs, ainsi qu'à son effet radiosensibilisant, AGuIX[®] pourrait chélater le cuivre directement au niveau de la zone tumorale tout en augmentant l'efficacité de la radiothérapie. En effet, le DOTAGA présente une très haute constante de stabilité de complexation vis-à-vis de Cu²⁺ avec $\log \beta = 22,44$ [141]. Néanmoins, la quantité de DOTAGA libre à la surface d'AGuIX[®] est trop faible pour espérer une chélation du cuivre suffisante au sein de l'environnement tumoral. Nous avons donc tenté d'augmenter la quantité de DOTAGA disponible en modifiant le moins possible la nanoparticule originelle afin de conserver les caractéristiques originelles d'AGuIX[®].

4.2 CuPRiX : Relargage de gadolinium pour générer des DOTAGA libres

4.2.1 Relargage de gadolinium : Stratégie et suivi

4.2.1.1 Stratégie

Afin d'obtenir le produit désiré, nous avons décidé de soumettre la nanoparticule AGuIX[®] à des conditions acides fortes afin de forcer la protonation des groupements DOTAGA à la surface. Sous la forme protonée, le groupement DOTAGA ne forme plus de complexe avec le gadolinium initialement chélaté. L'espèce non complexante de DOTA est majoritaire pour un pH inférieur à 3 comme indiqué dans le diagramme de spéciation en Figure 58.

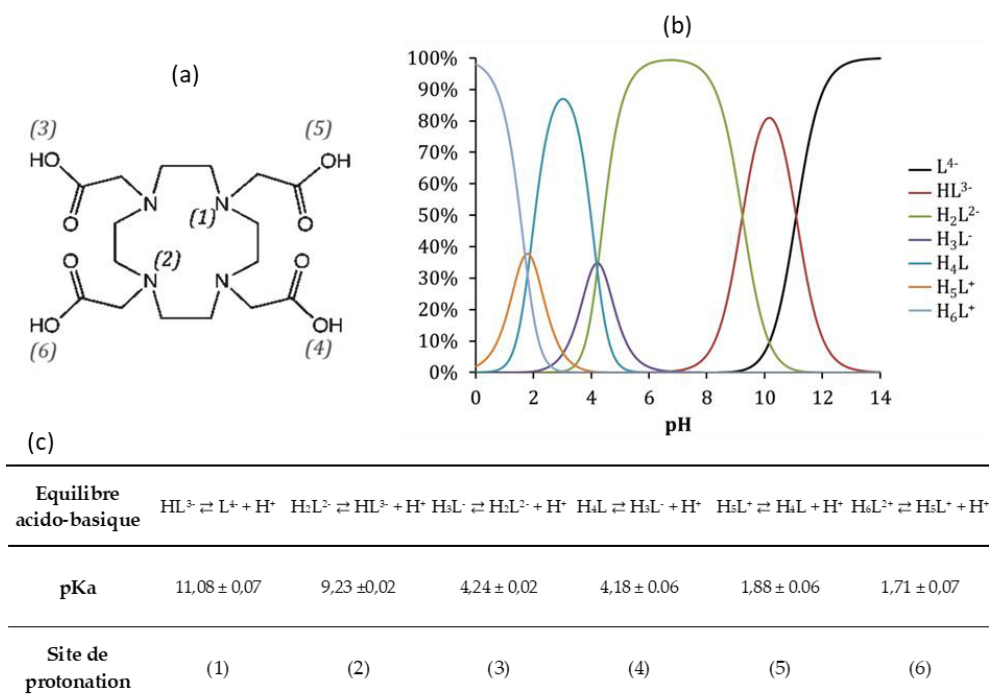


Figure 58. (a) Formule moléculaire du ligand DOTA (b) Diagramme de spéciation des différentes formes acido-basiques du ligand DOTA dans l'eau. Calculé avec Hyss2006(C) d'après (c) les constantes d'acidité du ligand DOTA à 1M NaCl, 25°C issues de Desreux et al. [167]

On procède donc ici à une dissociation du complexe assistée par protonation. En forçant la protonation du DOTAGA, le Gd^{3+} initialement complexé est alors relargué dans le milieu. Cependant, il est important de noter que le complexe DOTAGA(Gd) très proche du DOTA(Gd), est extrêmement stable, et des conditions acides, bien que favorables, ne sont pas suffisantes pour un relargage rapide du gadolinium complexé comme le montre le Tableau 15. En effet, malgré des conditions d'acidité et de température favorables (pH = 1 et T = 37°C) il faut plus de 26 heures pour relarguer la moitié du gadolinium complexé [168]. On note aussi dans ce tableau que malgré la haute stabilité thermodynamique des chélates linéaires (DTPA(Gd), $\log \beta = 22,1$), leur stabilité cinétique est très faible avec un $t_{1/2}$ inférieur à 5 secondes à pH = 1,2 et T = 20°C. C'est cette instabilité cinétique qui mène au dépôt de gadolinium dans l'organisme après injection de GBCA linéaire comme évoqué en Section 2.2.4.2.1.

Tableau 15. $t_{1/2}$ de la décomplexation de chélates de gadolinium DOTA(Gd) Vs chélate linéaire [168]

| Produit | $t_{1/2}$ (h) | $t_{1/2}$ (h) | $t_{1/2}$ (h) |
|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | pH = 1,2 T = 37°C | pH = 1,0 T = 37°C | pH = 1,2 T = 20°C |
| DOTA(Gd) | 85 | 26,4 | 338 |
| Chélate linéaire | ND | ND | < 5 s |

La température est un facteur cinétique important qui permet de raccourcir de façon significative le temps de relargage [168]. Ainsi, afin de pouvoir relarguer une quantité significative de gadolinium en un temps raisonnable, l'étape de complexation est réalisée dans les conditions suivantes : $[HCl]_{initial} = 1 \text{ M}$ ($pH = 0$) / $T = 50^\circ\text{C}$. Une illustration de la réaction appliquée à AGuIX® est présente Figure 59.

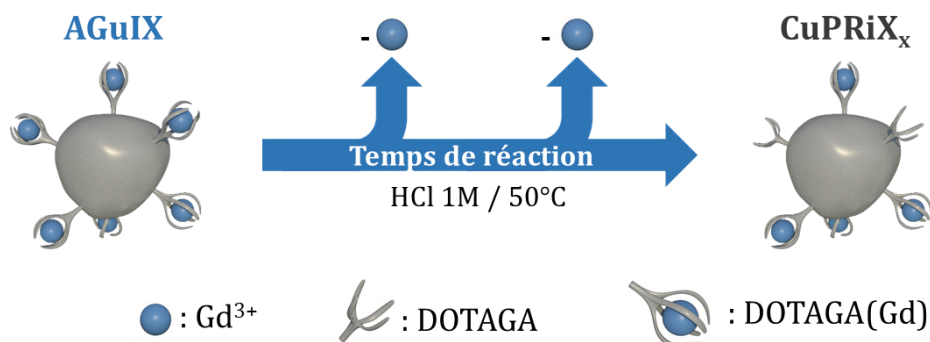


Figure 59. Illustration du procédé de dissociation du complexe DOTAGA(Gd) appliqué à AGuIX®. La nanoparticule obtenue, nommée CuPRiX, présentera donc un mélange de DOTAGA(Gd) et de DOTAGA libres. Ces DOTAGA libres lui permettront de complexer le cuivre et d'induire une déplétion locale du cuivre.

4.2.1.2 Suivi du relargage de gadolinium

Préalablement au relargage, une étude sur l'intégrité des particules AGuIX® dans les conditions d'acidité et température de la dissociation ($[HCl] = 1\text{M}$, $T = 50^\circ\text{C}$) a été menée. L'intégrité des particules au-delà de 24h a pu être confirmée par HPLC-UV et DLS.

Les nanoparticules AGuIX® donc ont été dispersées à 200 g L^{-1} dans de l'eau Milli-Q (conductivité $\rho > 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$). Après 30 minutes de dispersion, la solution d'AGuIX® est versée dans une solution HCl 2M. Ainsi, la composition finale du mélange est de 1 M HCl et $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'AGuIX®. Le mélange a été laissé à 50°C sous agitation.

Un échantillon du mélange a été extrait toutes les heures afin de suivre la libération de gadolinium par HPLC-IC/MS. Après trois heures, une partie du mélange a été isolée afin d'obtenir un premier produit avec un certain taux de DOTAGA libres. Ce produit est noté CuPRiX₁. Le reste du mélange a été laissé à 50°C et sous agitation pendant une heure supplémentaire pour obtenir un second produit avec un taux de DOTAGA libres plus important. Ce second produit est noté CuPRiX₂. Les résultats du suivi de relargage du gadolinium par HPLC-ICP/MS sont présentés en Figure 60.

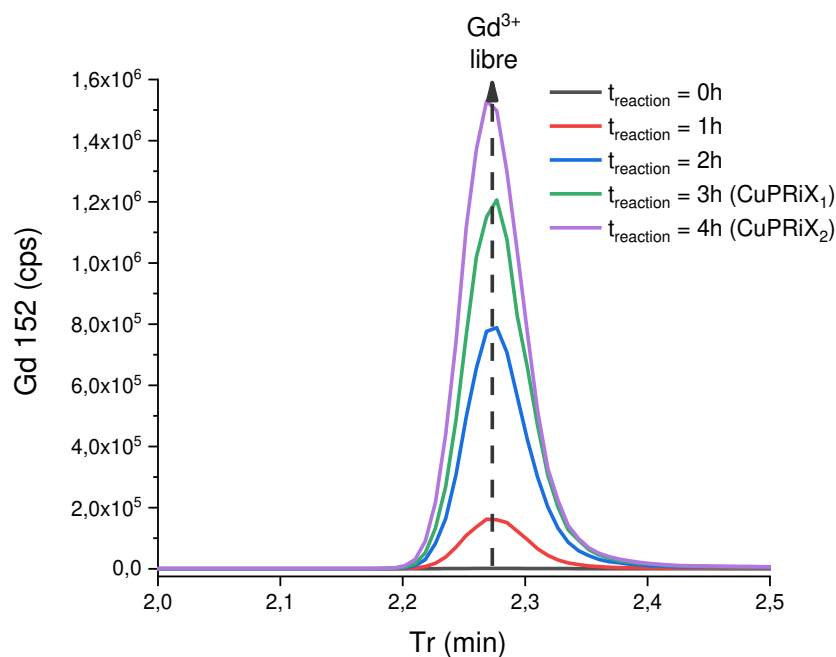


Figure 60. Résultats HPLC-ICP/MS du suivi du relargage du gadolinium lors de la réaction de dissociation ($[HCl] = 1M$, $T = 50^{\circ}C$). Le Gd^{3+} libre présente un temps de rétention $Tr = 2,27$ min. Le gadolinium est libéré au fur à mesure de la réaction. Les Temps de réaction $t_{reaction} = 3$ h (vert) et $t_{reaction} = 4$ h (violet) sont les temps où la réaction a été arrêtée afin d'obtenir deux produits notés respectivement $CuPRiX_1$ et $CuPRiX_2$.

Grâce au suivi ICP/MS à différents temps, on observe l'augmentation du gadolinium libre dans le milieu ($Tr = 2,27$ min). Ce gadolinium libre est issu de la réaction de dissociation des DOTAGA(Gd) présents à la surface de la particule. Il est donc un marqueur direct de la génération de DOTAGA libres en surface.

Au bout de quatre heures, la réaction est arrêtée. Le pH des produits $CuPRiX_1$ et $CuPRiX_2$ est ajusté à 1 avant de suivre une étape de purification pour éliminer le gadolinium libre libéré pendant la dissociation car toxique pour l'organisme [97]. Cette étape de purification est effectuée à l'aide du système d'ultrafiltration Vivaflow 200 (membrane PES, seuil de poids moléculaire = 5 kDa, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Allemagne). L'absence de Gd^{3+} libre est finalement vérifiée par la même méthode HPLC-ICP/MS et visible en Figure 61.

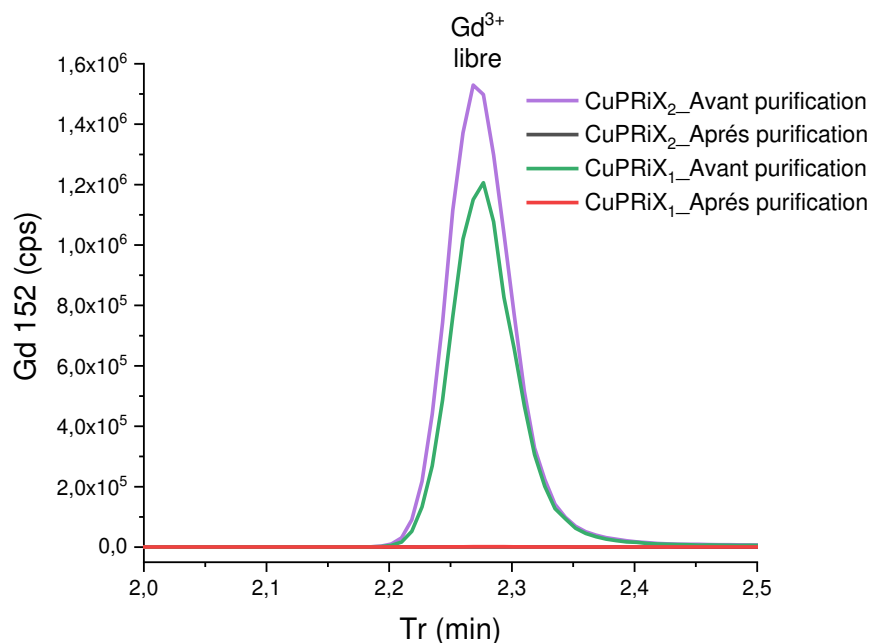


Figure 61. Résultats HPLC-ICP/MS présentant l'absence de gadolinium libre après purification des produits.

Le pH final des solutions purifiées est ajusté à 7,4 en utilisant du NaOH 1 M. Les solutions sont filtrées de manière stérile à travers un filtre de 0,2 μm pour éliminer les plus grosses impuretés. Elles sont ensuite lyophilisées pour le stockage, à l'aide d'un lyophilisateur Christ-Alpha 1–2 (Coueron, France). On obtient donc deux produits finaux CuPRiX₁ et CuPRiX₂ issues respectivement de 3 heures et 4 heures de réaction.

4.2.2 Caractérisation des produits CuPRiX₁ et CuPRiX₂

Les particules ont été caractérisées en s'appuyant sur les méthodes traditionnellement utilisées dans la caractérisation d'AGuIX[®]. Dans cette partie, nous détaillerons les résultats obtenus par les différentes techniques en les comparant à la particule AGuIX[®] initialement utilisée pour synthétiser les particules CuPRiX₁ et CuPRiX₂.

4.2.2.1 Pureté HPLC-UV

La pureté des échantillons a été évalué par HPLC-UV. Les résultats obtenus après injections sont présentés dans la Figure 62.

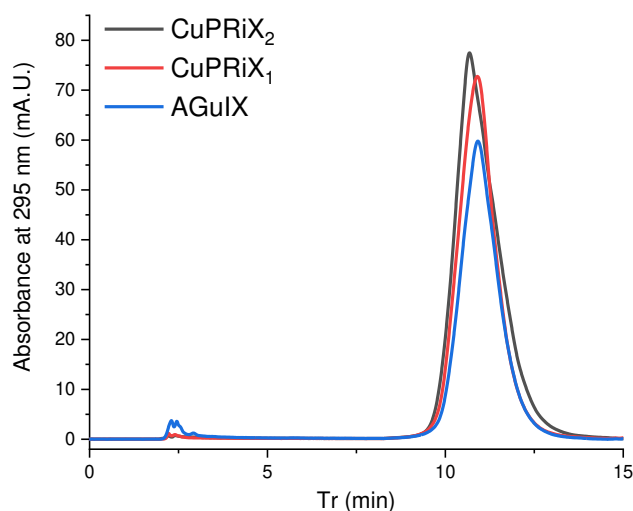


Figure 62. Chromatogramme HPLC-UV des produits AGuIX[®], CuPRiX₁ et CuPRiX₂ ($\lambda_{abs} = 295 \text{ nm}$, $10 \mu\text{l}$, 100 g/L).

Comme attendu d'après le test de stabilité initial, on retrouve ici le pic des nanoparticules CuPRiX₁ et CuPRiX₂ avec des temps de retentions respectifs de 10,9 et 10,7 min. Ces temps de rétention sont cohérents avec le temps de rétention de la nanoparticule AGuIX[®]. De plus, les deux produits présentent une pureté supérieure à 99%. Cette plus grande pureté indique que l'étape de purification a bien été effectuée et que les fragments initiaux ont bien été filtrés en même temps que le gadolinium libre (Voir Section 1.2.1.2). Il est intéressant de noter que l'absorbance globale des produits CuPRiX₁ et CuPRiX₂ est supérieure à celle du produit initial. La libération du gadolinium diminue la masse molaire de la particule, les injections HPLC étant faites à masse de produit constant ($10 \mu\text{L}$ à 100 g/L) il y a plus de particules dans les injections des deux nouveaux produits contribuant à une absorbance globale plus intense.

4.2.2.2 Taille : DLS

Les distributions volumiques renvoyées par la mesure de DLS pour les différents produits sont présentées en Figure 63. Les diamètres hydrodynamiques issus des distributions d'AGuIX[®], CuPRiX₁ et CuPRiX₂ sont respectivement de $3,6 \pm 1,34 \text{ nm}$, $4,6 \pm 1,56 \text{ nm}$ et $5,0 \pm 2,1 \text{ nm}$. Les particules CuPRiX présentent donc un diamètre hydrodynamique plus important qu'AGuIX[®]. Cette différence pourrait s'expliquer par une sélection des particules plus grosses lors de l'étape de purification. Néanmoins, il est important de noter que, malgré cette augmentation, les nanoparticules CuPRiX₁ et CuPRiX₂ présentent un diamètre hydrodynamique inférieur au seuil de filtration glomérulaire ($\approx 6 \text{ nm}$) [16].

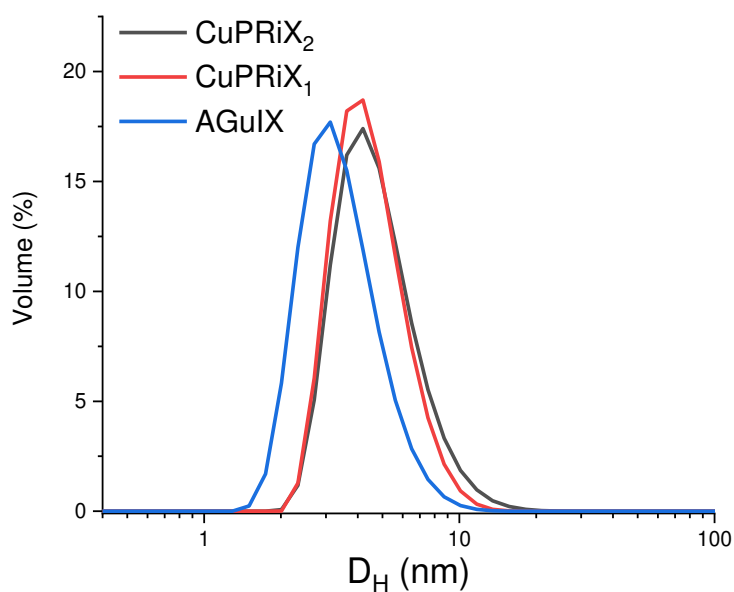


Figure 63. Distribution volumique du diamètre hydrodynamique (D_H) de AGuIX[®] (bleu), CuPRiX₁ (rouge) et CuPRiX₂ (noir).

4.2.2.3 Mesure DOTAGA libre

Une mesure cruciale pour évaluer la validité du protocole est la détermination de la quantité de DOTAGA libre générée à la surface des deux nouveaux produits. Cette mesure a été effectuée par titration par ajout de Cu^{2+} . Les détails de la titration sont explicités en Section 3.4.2. L'expérience repose sur la forte augmentation d'absorbance due à la formation du complexe DOTAGA(Cu) à 295 nm. Les résultats des mesures pour CuPRiX₁ et CuPRiX₂ sont respectivement présentés en Figure 64 et Figure 65.

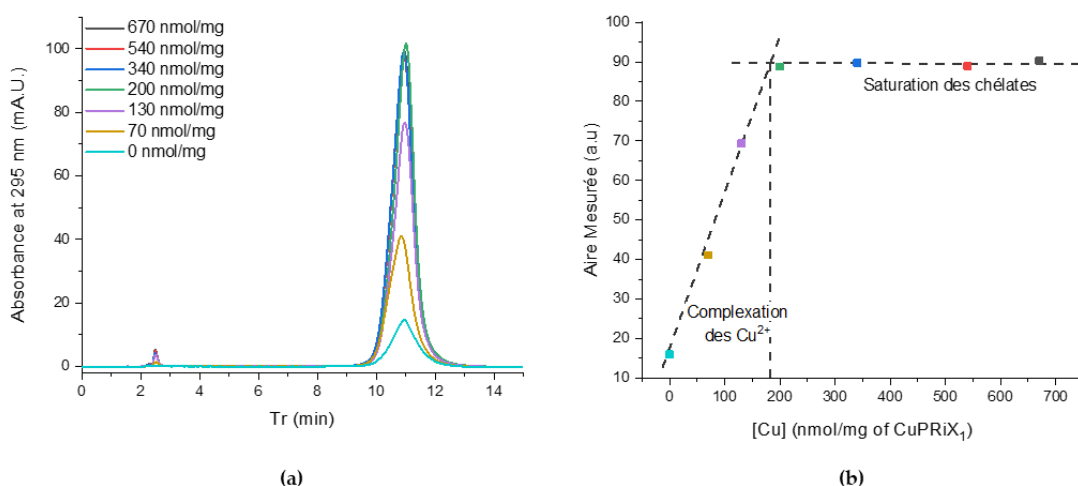


Figure 64. Titration des DOTAGA libres du produit CuPRiX_1 . (a) HPLC-UV de différents ratios de Cu^{2+} par masse de CuPRiX_1 . (b) Mesure de l'aire sous la courbe entre 0 et 15 min. Augmentation de l'absorbance jusqu'à atteindre le plateau de saturation où tous les DOTAGA libres ont été complexés par les Cu^{2+} ajoutés. La quantité de DOTAGA libres sur l'échantillon est de 182 ± 14 nmol de DOTAGA libres par mg de CuPRiX_1 .

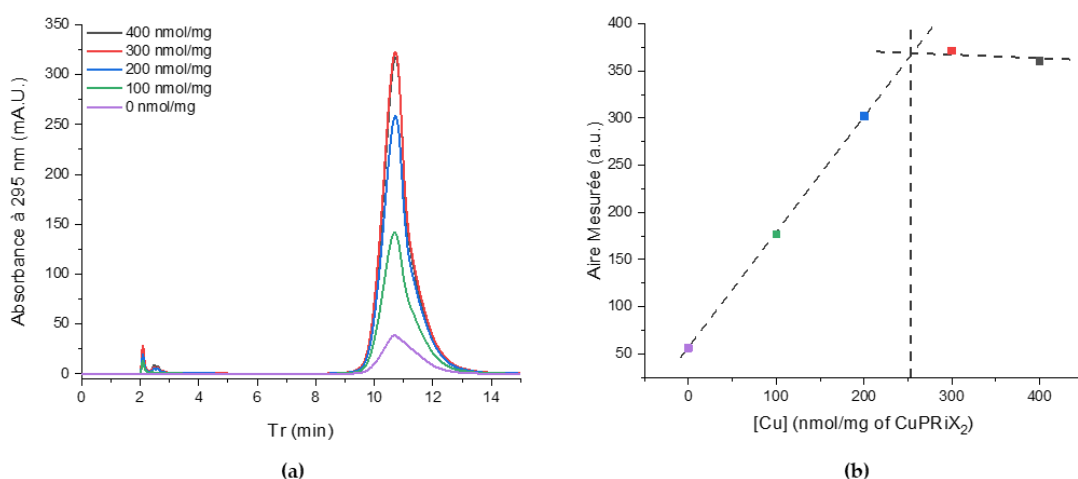


Figure 65. Titration des DOTAGA libres du produit CuPRiX_2 . (a) HPLC-UV de différents ratios de Cu^{2+} par masse de CuPRiX_2 . (b) Mesure de l'aire sous la courbe entre 0 et 15 min. Augmentation de l'absorbance jusqu'à atteindre le plateau de saturation où tous les DOTAGA libres ont été complexés par les Cu^{2+} ajoutés. La quantité de DOTAGA libres sur l'échantillon est de 252 ± 8 nmol de DOTAGA libres par mg de CuPRiX_2 .

Les résultats de la titration des DOTAGA libres montrent une forte augmentation du nombre de chélates libres dans les deux produits issus de la réaction de dissociation. Ainsi CuPRiX_1 présente un taux de DOTAGA libre de 182 ± 14 nmol de DOTAGA libres par mg de produit. CuPRiX_2 présente, quant à lui, un taux de 258 ± 8 nmol de DOTAGA libres par mg de produit. Ce taux supérieur est bien en accord avec un temps de réaction plus long pour CuPRiX_2 et donc une quantité de gadolinium libérée plus importante comme indiqué par le chromatogramme HPLC-ICP/MS de la Figure 60. Il faut rappeler que comme souligné en Section 3.4.2, le taux

de DOTAGA libre dans le produit AGuIX[®] initial est de l'ordre de 8 nmol par mg de produit. Les chromatogrammes HPLC-UV des Figure 64.a. et Figure 65.a montrent une augmentation significative de l'absorbance au niveau des particules indiquant ainsi que les chélates générés sont présents sur la nanoparticule. Ces produits seront donc plus à même d'avoir un impact sur la complexation du cuivre intratumoral.

4.2.2.4 Analyse élémentaire

La teneur massique en Gd du produit initial et des produits de synthèse a été déterminée au laboratoire par ICP/MS en injection directe. Les mesures ont été faites sur Nexion 2000B (Perkin-Elmer, Villebon Sur Yvette, France). Les résultats pour AGuIX[®], CuPRiX₁ et CuPRiX₂ sont indiqués ci-dessous dans le Tableau 16.

Tableau 16. Teneur massique en gadolinium des produits AGuIX[®], CuPRiX₁ et CuPRiX₂ déterminée par ICP/MS.

| Product | AGuIX [®] | CuPRiX ₁ | CuPRiX ₂ |
|---------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Gd (m%) | 10,5 | 8,2 | 6,2 |

CuPRiX₁ et CuPRiX₂ présentent tous deux des teneurs massiques en gadolinium inférieures à la quantité initiale contenue dans AGuIX[®] respectivement 8,2, 6,2 et 10,5 m%. L'association de la quantité de Gd et de la quantité de DOTAGA libres dans chaque produit nous permet de remonter à la quantité de DOTAGA totale présente dans les différents lots ainsi qu'au taux de DOTAGA libre au sein de chaque produit. En effet :

$$[DOTAGA]_{Totale} = [DOTAGA]_{Libre} + [Gd]$$

$$DOTAGA_{libre}(\%) = \frac{[DOTAGA]_{Libre}}{[DOTAGA]_{Totale}}$$

- $[DOTAGA]_{Totale}$ la concentration massique en DOTAGA totale en nmol/mg
- $[DOTAGA]_{Libre}$ la concentration massique en DOTAGA libre en nmol/mg
- $[Gd]$ la concentration massique en Gd en nmol/mg

Les concentrations en DOTAGA totale de chaque produit ainsi que leurs taux respectifs en DOTAGA libre sont présentés dans le Tableau 17.

Tableau 17. Quantité totale de DOTAGA et taux de DOTAGA libre dans les produits AGuIX®, CuPRiX₁ et CuPRiX₂.

| Produit | AGuIX® | CuPRiX ₁ | CuPRiX ₂ |
|--------------------------------------|--------|---------------------|---------------------|
| [DOTAGA] _{Totale} (nmol/mg) | 676 | 703 | 647 |
| DOTAGA _{libre} (%) | 1,2 | 25,9 | 39,1 |

Comme attendu, les produits CuPRiX₁ et CuPRiX₂ présentent tous deux des taux de DOTAGA libre bien supérieurs au produit AGuIX® initial avec plus du quart de leurs groupements DOTAGA disponibles pour la complexation. On remarque aussi que les concentrations massiques en DOTAGA totale de CuPRiX₁ et CuPRiX₂ sont très proches de la concentration massique en DOTAGA totale d'AGuIX® avec une variation de seulement $\pm 4\%$. Cette faible variation semble indiquer que les particules ont été très peu affectées par le processus de dissociation.

4.2.2.5 Potentiel Zéta

L'évolution du potentiel zéta des particules en fonction du pH a été mesurée. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 66.

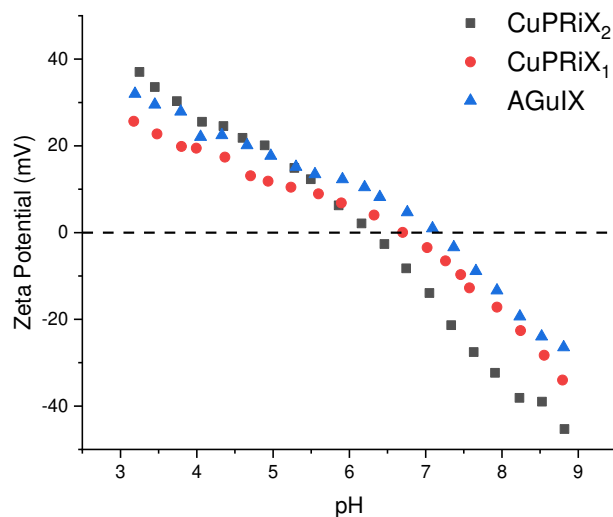


Figure 66. Évolution du potentiel zéta de AGuIX®, CuPRiX₁ et CuPRiX₂ en fonction du pH.

Une tendance similaire est observée pour tous les produits. Cette tendance est bien caractéristique de nanoparticules du même type qu'AGuIX® c'est-à-dire présentant en surface des groupements amines (via l'APTES), des DOTAGA(Gd) et des DOTAGA libres. L'évolution du pH au point isoélectrique (IEP) diminue en fonction du temps de réaction. Ainsi, AGuIX®, CuPRiX₁ et CuPRiX₂ présentent des pH à IEP respectifs de 7,15,

6,71 et 6,29. Cette diminution est en accord avec le remplacement des groupements DOTAGA(Gd) par des groupements DOTAGA libres. En effet, le groupement DOTAGA(Gd) conserve sa charge -1 car cinétiquement stable [168], en revanche pour être chargé -1 le groupement DOTAGA libre aura besoin d'être protoné trois fois (voir Figure 53) nécessitant donc un pH plus acide. Plus il y a de DOTAGA libres plus le pH de l'IEP est acide. L'évolution des pH à IEP pour CuPRiX₁ (6,71) et CuPRiX₂ (6,29) est donc en accord avec l'augmentation du taux de DOTAGA libre mis en évidence par la titration (Section 1.2.2.3) et l'analyse élémentaire (Section 1.2.2.4).

De la même manière, on pourrait s'attendre à un potentiel zêta plus négatif à pH basique car les DOTAGA libres peuvent générer jusqu'à trois charges négatives supplémentaires par rapport au DOTAGA(Gd). Pour des pH acides, le DOTAGA libre peut-être jusqu'à deux fois chargé positivement. En conclusion, la génération de DOTAGA libres en place des DOTAGA(Gd) devrait augmenter l'écart entre le potentiel zêta à pH acide et le potentiel zêta à pH basique tout en diminuant le pH d'obtention de l'IEP. Cette analyse se vérifie pour CuPRiX₂ mais pas pour CuPRiX₁. Ce raisonnement est cependant nuancé par l'impact des silanols en surface de la particule qui interviendront dans la charge globale de la particule [169]

4.2.2.6 Relaxométrie

Les résultats de la mesure des temps de relaxation des solutions d'AGuIX[®], CuPRiX₁ et CuPRiX₂ sont présentés dans le Tableau 18.

Tableau 18. Mesures des relaxivités longitudinales et transversales des produits AGuIX[®], CuPRiX₁ et CuPRiX₂. (Mesures effectuées à 37°C, 1,4T à 60 MHz)

| Produit | r ₁ (s ⁻¹ .mM ⁻¹) | r ₂ (s ⁻¹ .mM ⁻¹) | r ₂ /r ₁ |
|---------------------|---|---|--------------------------------|
| AGuIX [®] | 18,9 | 30,4 | 1,61 |
| CuPRiX ₁ | 20,2 | 33,5 | 1,66 |
| CuPRiX ₂ | 30,7 | 51,2 | 1,67 |

D'après les résultats précédents, nous savons que les trois produits AGuIX[®], CuPRiX₁ et CuPRiX₂ présentent tous du gadolinium sous la même forme, c'est-à-dire, complexé par le DOTAGA. Ainsi, on pourrait supposer que les valeurs de r₁ et r₂ soient proches entre chaque produit. Cependant, on remarque une augmentation du r₁ pour CuPRiX₁ (20,2) et CuPRiX₂ (30,7). Cette augmentation peut s'expliquer par une augmentation du temps de corrélation due à l'augmentation de la taille (comme indiqué par la DLS en Section 1.2.2.2) ou de la rigidité des particules [170] même si ce raisonnement est nuancé par les résultats de la mesure SAXS. Ce constat est identique pour r₂. Néanmoins, le ratio r₂/r₁ est proche du ratio de AGuIX[®] et reste inférieur à 2 ce qui indique un comportement d'agent de contraste IRM positif [132].

4.2.2.7 Bilan

Tableau 19. Bilan des caractéristiques d'AGuIX[®], CuPRiX₁ et CuPRiX₂

| Produit | Gd (w%) | Free | Tr (min) | D _H (nm) | pH IEP | r ₂ /r ₁ (s ⁻¹ .mM ⁻¹) |
|---------------------|---------|---------------------|----------|---------------------|--------|--|
| | | DOTAGA (nmol/mg) | | | | |
| AGuIX [®] | 10,5 | 8 ± 2 | 10,9 | 3,6 ± 1,34 | 7,15 | 30,4/18,9 |
| CuPRiX ₁ | 8,2 | 182 ± 14 | 10,9 | 4,6 ± 1,56 | 6,71 | 33,5/20,2 |
| CuPRiX ₂ | 6,2 | 253 ± 8 | 10,7 | 5 ± 2,1 | 6,29 | 51,2/30,7 |

L'ensemble des caractérisations effectuées jusqu'ici semble indiquer que les particules CuPRiX₁ et CuPRiX₂ ne présentent pas de grandes différences structurelles par rapport à AGuIX[®]. Ceci supposerait un comportement identique au niveau de la biodistribution. De plus, le gadolinium restant et le bon ratio r₂/r₁ indiquent que les produits CuPRiX peuvent présenter les mêmes propriétés qu'AGuIX[®] en terme de radiosensibilisation et d'imagerie IRM. En plus de ces propriétés, la présence des DOTAGA libres offre la possibilité d'agir sur le développement des tumeurs en complexant le cuivre intratumoral. Le potentiel effet thérapeutique lié à la déplétion du cuivre peut être évaluée par diverses expériences biologiques in-vitro dont les résultats sont présentés dans le chapitre suivant.

4.3 Résultats *in vitro* et publication

Afin de valider l'intérêt des particules CuPRiX pour agir sur la croissance tumorale, nous avons travaillé en collaboration avec la faculté de médecine de Lyon Sud en France. Des expériences sur cellules cancéreuses et sur animaux porteurs de tumeurs ont été réalisées par Delphine Brichart sous la supervision de Claire Rodriguez-Lafrasse. Nous avons travaillé sur deux modèles de cancer :

- A549, lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire humain.
- SQ20B, lignée cellulaire de carcinome épidermoïde de la tête et du cou.

Le but était de montrer que les particules CuPRiX agissaient sur la migration et l'invasion des différentes lignées cellulaires par la captation du cuivre dans le milieu tout en présentant des propriétés de radio sensibilisation comme le produit AGuIX[®]. Les résultats ont fait l'objet d'une publication dans *Pharmaceutics* en 2022.

4.3.1 Résumé des résultats *in vitro*

Afin d'évaluer l'influence de CuPRiX sur la migration cellulaire, un test d'égratignure (Scratch wound assay, [171]) a été effectué. Ce test consiste à évaluer l'impact d'un composé sur le temps de recouvrement d'une

égratignure faite au niveau de la culture cellulaire. Le résultat de ce test pour la lignée cellulaire A549 sont présentés en Figure 67.a. Dans le milieu de culture contenant CuPRiX₂ (800 μM de DOTAGA libre/500 μM DOTAGA(Gd)), on remarque que les cellules (en jaune) mettent plus de temps pour recouvrir l'espace de l'égratignure que dans le cas contrôle ou le cas où AGuIX® est introduit dans le milieu (500 μM DOTAGA(Gd)). Il semble donc que CuPRiX diminue la migration cellulaire. De plus, un test en chambre de Boyden a été effectué [172] afin d'étudier l'impact de CuPRiX sur l'invasion cellulaire. CuPRiX semble de la même manière diminuer l'invasion cellulaire chez A549 et SQ20B.

L'activité de la métaloenzyme LOX a été évaluée. Comme évoqué en introduction, LOX est une enzyme dépendante du cuivre qui a été identifiée comme jouant un rôle crucial dans le processus métastatique [146]. L'impact de CuPRiX sur l'activité de LOX au sein des cellules A549 est présenté en Figure 67.b. L'ajout de CuPRiX dans le milieu diminue significativement l'activité de cette enzyme. S'il n'est pas formellement prouvé que l'impact de CuPRiX sur A549 est dû à la chélation du cuivre dans le milieu, la diminution de l'activité de cette enzyme cuivre dépendante de cet élément montre bien que CuPRiX joue un rôle dans la disponibilité du cuivre dans le milieu.

L'aspect radiosensibilisant de CuPRiX a pu être mesuré et comparé à AGuIX® (Figure 67.c). Malgré une faible mise en évidence de cet effet sur A549, les particules CuPRiX présentent un impact comparable à AGuIX® à Gd équivalent supposant que l'effet radiosensibilisant est bien toujours présent à travers le gadolinium de la particule.

Ces tests préliminaires ont démontré le potentiel de CuPRiX en tant que dérivé d'AGuIX® présentant de nouvelles propriétés anti-angiogéniques. Cette nouvelle propriété, couplée à l'effet radiosensibilisant initial, pourrait entraîner des effets synergiques sous irradiation.

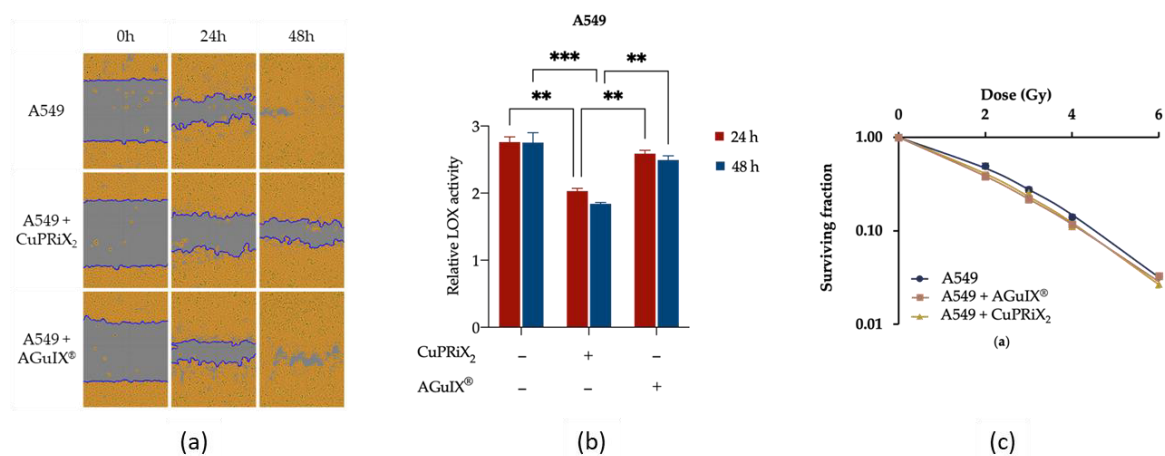


Figure 67. (a) Effet d'AGuIX® et de CuPRiX₂ sur la migration et l'invasion des A549 et SQ20B-CSC avec le test de d'égratignure. Images représentatives de la migration des cellules A549 après traitement avec CuPRiX₂ (800 μM de DOTAGA(Gd) et 500 μM de DOTAGA libre) ou AGuIX® (800 μM de DOTAGA(Gd)). (b) Effet d'AGuIX® (800 μM de DOTAGA(Gd)) et de CuPRiX₂ (800 μM de DOTAGA(Gd) et 500 μM de DOTAGA libre) sur l'activité LOX dans les cellules A549. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SD (n = 2) avec deux répétitions techniques pour chaque expérience. ** p < 0,01, *** p < 0,001, ANOVA à deux facteurs. (c) Effet radiosensibilisant d'AGuIX® (800 μM de

DOTAGA(Gd) et CuPRiX₂ (800 μ M de DOT-AGA(Gd) et 500 μ M de DOTAGA non complexé) sur A549. Chaque courbe est la moyenne de trois expériences indépendantes.

4.3.2 Publication

Article

A New Generation of Ultrasmall Nanoparticles Inducing Sensitization to Irradiation and Copper Depletion to Overcome Radioresistant and Invasive Cancers

Paul Rocchi ^{1,2,†}, Delphine Brichart-Vernos ^{1,3,†} , François Lux ^{1,4,*}, Isabelle Morfin ⁵, Laurent David ⁶ , Claire Rodriguez-Lafrasse ^{3,7,†} and Olivier Tillement ^{1,†}

¹ Institut Lumière Matière, Université Claude Bernard Lyon 1 CNRS UMR 5306, 69622 Villeurbanne, France; rocchi@nhtheraguix.com (P.R.); delphine.brichart@univ-lyon1.fr (D.B.-V.); olivier.tillement@univ-lyon1.fr (O.T.)

² NH TherAguix SA, 38240 Meylan, France

³ Cellular and Molecular Radiobiology Laboratory, Lyon-Sud Medical School, UMR CNRS 5822/IP2I, Univ. Lyon, Lyon 1 University, 69921 Oullins, France; claire.lafrasse-rodriquez@univ-lyon1.fr

⁴ Institut Universitaire de France (IUF), 75000 Paris, France

⁵ LiPhy, Université Grenoble Alpes, CNRS, UMR UMR5588, 38401 Grenoble, France; isabelle.morfin@univ-grenoble-alpes.fr

⁶ Ingénierie des Matériaux Polymères, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université Jean Monet, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, CNRS, UMR 5223, 15, bd A. Latarjet, 69622 Villeurbanne, France; laurent.david@univ-lyon1.fr

⁷ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Lyon-Sud Hospital, Hospices Civils de Lyon, 69310 Pierre-Bénite, France

* Correspondence: francois.lux@univ-lyon1.fr; Tel.: +33-4-72-43-12-00

† These authors contribute equally to the work.



Citation: Rocchi, P.; Brichart-Vernos, D.; Lux, F.; Morfin, I.; David, L.; Rodriguez-Lafrasse, C.; Tillement, O. A New Generation of Ultrasmall Nanoparticles Inducing Sensitization to Irradiation and Copper Depletion to Overcome Radioresistant and Invasive Cancers. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 814. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040814>

Academic Editor: Leonard I. Wiebe

Received: 24 February 2022

Accepted: 29 March 2022

Published: 7 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: An emerging target to overcome cancer resistance to treatments is copper, which is upregulated in a wide variety of tumors and may be associated with cancer progression and metastases. The aim of this study was to develop a multimodal ultrasmall nanoparticle, CuPRiX, based on the clinical AGuIX nanoparticle made of the polysiloxane matrix on which gadolinium chelates are grafted. Such hybrid nanoparticles allow: (i) a localized depletion of copper in tumors to prevent tumor cell dissemination and metastasis formation and (ii) an increased sensitivity of the tumor to radiotherapy (RT) due to the presence of high Z gadolinium (Gd) atoms. CuPRiX nanoparticles are obtained by controlled acidification of AGuIX nanoparticles. They were evaluated in vitro on two cancer cell lines (lung and head and neck) using the scratch-wound assay and clonogenic cell survival assay. They were able to reduce cell migration and invasion and displayed radiosensitizing properties.

Keywords: copper depletion; ultrasmall nanoparticle; radiosensitization

1. Introduction

Copper is a trace metal playing a key role in a wide variety of metabolic processes. An analysis of the human proteome allowed the identification of 54 copper-binding proteins involved in endogenous processes such as mitochondrial respiration, antioxidant defense and extracellular matrix cross-linking [1]. Copper levels must be finely regulated to maintain homeostasis for proper cell function. Any disruption of this balance can lead to sicknesses such as Wilson's disease (copper overload) and Menkes disease (copper deficiency) or, as described in different preclinical and clinical works, to cancer progression [2–4].

Copper may play a role in tumor growth, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), stabilization of the tumor microenvironment [5] and pre-metastasis niche formation [6]. It can also induce a pro-angiogenic response, which is of great importance since tumor size is limited to 1–2 mm in the absence of new blood vessel formation. Copper is also an essential cofactor of various metalloproteins known to be closely correlated with tumor

growth and metastatic invasion (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1 (MAP2K1), lysyl oxidase (LOX) and lysyl oxidase-like, (LOXL), Secreted Protein Acidic and Cysteine Rich (SPARC), ...). Interestingly, higher copper levels were detected in the tumors or serum of patients and animals in many different types of cancers, including oral, breast, prostate, and lung cancers [7]. It is also important to note that circulating copper levels tend to be higher in patients with metastases than in those with localized tumors [8]. This suggests that a disruption of Cu homeostasis may contribute to carcinogenesis as well as to the development of metastases, which thus makes it a prime target for more effective cancer treatment [9].

It is from its involvement in such crucial mechanisms that the idea of removing copper using copper chelators emerged a few decades ago in order to fight cancer. The first major preclinical study was published in 1990 [10], followed by others revealing that a copper depletion strategy could hinder cancer progression. These findings led to clinical trials using chelating agents such as trientine (TETA), tetrathiomolybdate (TM) and D-penicillamine (D-Pen), typically used for the treatment of Wilson's disease. In all cases, serum copper levels decreased and a phase 2 study on triple negative breast cancer patients at high risk of recurrence (TNBC) treated with TM showed very promising results [11,12]. In addition to successfully depleting copper, they correlated lower levels of copper with reduced levels of endothelial progenitor cells and LOXL-2, both of which are key elements of tumor progression. However, in some trials, using trientine, side effects ranging from anemia to neurological disorders have been observed [13]. These disturbances could be related to a non-localized copper depletion.

The use of a copper chelator is now being investigated as part of a multimodal approach, as it might slow cancer progression and enhance tumor cell sensitivity to other treatments [11,14]. Copper chelators, such as TM, are now being combined with chemotherapeutic agents [14,15], immunotherapy treatments [16,17] or radiotherapy [18].

In this approach, the use of nanoparticles could bring many advantages. First, nanoparticles may have a specific biodistribution driven by their physicochemical characteristics [19], which allows copper chelation to be brought closer to the tumor area, where the copper concentration is higher. This approach has been explored by R. Tremmel et al., encapsulating the copper chelator TETA in surface-modified liposome used as nanocarrier [20]. Other teams have developed synthetic nanoparticles enabling copper depletion by themselves through different mechanisms, such as polymer chelation [21,22] and copper-sulfur interaction [23]. Only a few teams took advantage of this specific nanoparticle biodistribution to combine copper depletion and delivery of therapeutic agents at the same time. In this view, P. Zhou et al. developed a pH-sensitive biodegradable polymeric nanoparticle capable of delivering both a copper chelator and the immunotherapeutic agent R848 [24]. In vitro, this nanoparticle showed greater efficiency against metastatic breast cancer than either the copper chelator or R848 alone.

To our knowledge, there is currently no work on nanoparticles combining copper chelation and radiosensitization. In this work, we present a new generation of radio-enhancing drug candidates based on a derivative of AGuIX[®] nanoparticles currently in phase 2 clinical trials [25,26]. This optimized nanoparticle, named CuPRiX, is expected to have the same initial properties as AGuIX[®], namely (i) specific accumulation in tumors via the Enhanced Permeability Effect (EPR), (ii) biodegradability and renal excretion, due to its small size, (iii) its characteristics as an MRI contrast agent and (iv) its ability to increase the efficacy of radiation therapy, thanks to the presence of gadolinium [27,28]. To those properties, we aim to add the benefits of copper chelation by generating free chelators (DOTAGA) on the surface of the nanoparticle through the neutralization of their carboxylic moieties and the partial release of gadolinium at a low pH and a relatively high temperature. The efficacy of this newly formed product, called CuPRiX, on cell migration, invasion and radiosensitization has been evaluated in vitro on two cancer cell lines (oral and lung) as a first proof of concept.

2. Materials and Methods

2.1. Chemical Materials

The starting AGuIX[®] nanoparticles (gadolinium-chelated polysiloxane nanoparticles) were provided by NH TherAguix (Grenoble, France) as lyophilized powder. These nanoparticles are composed of a polysiloxane matrix on which DOTAGA(Gd) chelates are covalently grafted. Their synthesis has been already described in Le Duc et al. [29]. The 2 M HCl solution was prepared by diluting concentrated HCl (extra pure, 37%) purchased from CarlRoth. The NaOH 1 M solution was prepared using NaOH pellets from Fisher Chemical (Waltham, MA, USA). The Cu²⁺ titration solution was prepared by dissolving CuCl₂ (powder, 99%) from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) in pH 2 aqueous solution. For the HPLC-UV phase preparation, acetonitrile (CH₃CN, ACN, >99.9%) was purchased from Sigma-Aldrich (France) and trifluoroacetic acid (TFA) from Fischer Chemical (Waltham, MA, USA).

2.2. CuPRiX_(x) Synthesis

AGuIX[®] nanoparticles were dispersed at 200 g L⁻¹ in Milli-Q water (conductivity $\rho > 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$). After 30 min of dispersion, the AGuIX[®] solution was poured in an HCl 2 M solution. Thus, the final mix composition is 1 M HCl and 100 g L⁻¹ in AGuIX[®]. The mixture was left at 50 °C under stirring. A sample of the mixture was extracted every hour in order to follow the gadolinium release by HPLC-IC/MS. After 3 h of reaction, a part of the mix was isolated and the free gadolinium was removed during a purification step performed with the Vivaflow 200 ultrafiltration system (PES membrane, molecular weight threshold = 5 kDa, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany). The final pH was adjusted to 7.4 using 1 M NaOH. The solution was sterile filtered through a 0.2 μm filter to remove the largest impurities. It was then freeze-dried for storage, using Christ-Alpha 1–2 lyophilizer (Coueron, France). This first product will be called CuPRiX₁. In order to release more gadolinium, the rest of the initial mix was left at 50 °C and under stirring for an additional hour. The same process was followed, which led to a second product called CuPRiX₂. To summarize the procedure, CuPRiX₁ and CuPRiX₂ are obtained by reaction at 100 g L⁻¹ in HCl (1 M) during 3 h and 4 h, respectively, before purification by tangential filtration.

2.3. Gadolinium Release Followed by HPLC-ICP/MS

In-process extracts were analyzed to follow the gadolinium release in the reaction mixture. The analysis was performed with a Nexion 2000B (Perkin-Elmer, Villebon Sur Yvette, France), coupled with a Flexar LC system (Perkin-Elmer). The separation was performed using a C4 reverse phase column (Jupiter[®], 5 μm , 300 A, 150 \times 4.6 mm, Phenomenex, Le Pecq, France). The measurements were performed on isocratic mode using the following phase composition: H₂O/ACN/TFA (98.9%/1%/0.1%) at 1 mL/min speed flow. Gd signal was monitored using the isotope 152. The operating conditions used for the ICP-MS were: nebulizer gas flow rate, 0.84 L/min; plasma gas flow rate, 15 L/min; auxiliary gas flow rate, 1.2 L/min; radiofrequency power, 1600 W for the plasma. All other parameters were tuned to maximize the Gd signal. Syngistix software version 2.3 (Perkin Elmer, Villebon Sur Yvette, France) was used to control the ICP-MS. The Gd signal was acquired through the Empower software version 7.3 (Waters, Milford, MA, USA).

2.4. Final Measurement of Gadolinium Amount by ICP-MS

The amount of gadolinium in AGuIX[®], CuPRiX₁ and CuPRiX₂ was measured by ICP/MS (Nexion 2000B, Perkin-Elmer, Villebon Sur Yvette, France) with a direct injection mode. The calibration points and the samples were prepared in 1% HNO₃ solution. Gd signal was monitored following isotopes 158 and 160. The operating conditions used for the ICP-MS were: nebulizer gas flow rate, 0.84 L/min; plasma gas flow rate, 15 L/min; auxiliary gas flow rate, 1.2 L/min; radiofrequency power, 1600 W for the plasma. All other

parameters were tuned to maximize the Gd signal. Syngistix software version 2.3 was used to control the ICP-MS. The Gd signal was acquired through Empower software version 7.3.

2.5. HPLC-UV

Shimadzu Prominence series UFLC system (Lyon, France), equipped with a CBM-20A controller bus module, a LC-20 AD liquid chromatograph, a CTO-20A column oven and an SPD-20A UV-visible detector was used for Gradient HPLC analysis. Wavelength was fixed at 295 nm for UV-VIS detection. The separation was performed using a C4 reverse-phase column (Jupiter[®], 5 μm , 300 A, 150 \times 4.6 mm) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The gradient initial solution is 95% solvent A – 5% solvent B (A = H₂O/ACN/TFA: 98.9 v%/1 v%/0.1 v%, B = ACN/H₂O/TFA: 89.9 v%/10 v%/0.1 v%) over 5 min. In a second step, the samples were eluted by a gradient developed from 5 to 90% of solvent B in solvent A over 15 min. The concentration of solvent B was maintained over 5 min. Then, the concentration of solvent B was decreased to 5% over a period of 5 min to re-equilibrate the system, followed by an additional 5 min at this final concentration.

2.6. Measurements of Uncomplexed DOTAGA Groups Based on the Formation of DOTAGA@Cu²⁺

The amount of uncomplexed DOTAGA groups in CuPRiX₁ and CuPRiX₂ was determined by titration by recording the increase in absorbance at 295 nm due to the formation of DOTAGA@Cu²⁺ complex. A series of samples with a fixed amount of CuPRiX product and an increasing amount of Cu²⁺ was prepared. All the samples were prepared in a pH 4.5 acetate buffer and allowed to react for 30 min to ensure a good complexation. Finally, the samples were injected following the HPLC-UV method previously described. The breaks in slope in the absorbance increase were directly related to the amount of uncomplexed DOTAGA in the product.

2.7. Dynamic Light Scattering (DLS) and ζ -Potential Measurements

Direct measurements of the size distribution of the nanoparticles were performed at 10 g/L via Zetasizer NanoS DLS (Dynamic Light Scattering, laser He-Ne 633 nm, Malvern, Palaiseau, France) from Malvern Instrument. The ζ -potential of the nanoparticles was also determined via Zetasizer NanoS. Before the measurement, the nanoparticles were diluted to 10 g/L in an aqueous solution containing 0.01 M NaCl.

2.8. Small-Angle X-ray Scattering Measurements

Small-angle synchrotron X-ray scattering (SAXS) was performed at ESRF (Grenoble, France) on a D2AM beamline. The incident photon energy was set to 15.7 keV (i.e., $\lambda = 0.789681 \text{ \AA}^{-1}$), with a beam size of about 45 $\mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$. CuPRiX₂ and AGuIX[®] suspensions were prepared at 100 g/L and transferred in glass tubes (Deutero GmbH, Kastellaun, Germany, ref. 600020-200, external diameter: 3 mm, length: 60 mm, width: 0.2 mm). The sample-to-detector distance was set close to 1.84 m. The D5 solid-state detector (IMXPAD) was used for the 2D image collection. All scattered images were normalized by the transmitted intensity, and radial averages were calculated around the image center (mean center of incident beam). The 1D radially averaged pattern of the empty cell (solvent + tube) was subtracted to the 1D scattered patterns of the samples in order to deduce the net intensity scattered by nanoparticles, i.e., I vs. $q = 4\pi \cdot \sin(\theta)/\lambda$ where 2θ is the scattering angle and q is the scattering vector.

2.9. Relaxivity Measurements

Relaxivity measurements were performed at 100 g/L on a Bruker Minispec mq60 NMR analyzer (Bruker, Billerica, MA, USA) at 37 °C at 1.4 T (60 MHz).

2.10. Cell Lines and Cell Culture

The human lung adenocarcinoma cell line, A549, was purchased from the European Collection of Authenticated Cell Culture (ECACC 86012804). A549 cells were cultured in F12K medium (Gibco™) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Dominique Dutscher SAS, Bernolsheim, France) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco™). The Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC), SQ20B was established from HNSCC (larynx) tumors and provided by J.B. Little (Department of Cancer Biology, Harvard School of Public Health, Boston, MA, USA). Its sub-population of cancer stem-cells-like (SQ20B-CSCs) was obtained by flow-cytometry cell sorting and cultured as described in [30,31]. Briefly, cells were first sorted by the Hoechst Dye Efflux Assay, which led to the generation of a Side Population (SP). Then, from this SP, SQ20B-CSCs were isolated based on their CD44 expression. SQ20B-CSCs were cultured in a mixture of DMEM, Ham's F12 (3:1, Gibco™) supplemented with 0.4 µg/mL hydrocortisone (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 1% penicillin-streptomycin, 5% FBS and 20 ng/mL Epithelium Growth Factor (EGF, Sigma-Aldrich). Due to their cancer stem-cell-like characteristics, only the SQ20B-CSC subpopulation was used. Both cell lines were cultured in humidified atmosphere with 5% CO₂, at 37 °C.

2.11. Scratch-Wound Assay

Cells (4×10^4 /well) were seeded in IncuCyte® ImageLock 96-well plates (Essen BioScience, Ltd., Royston, UK) and incubated for 16 h at 37 °C to reach 90–100% confluency. The cell layer was then scratched with the 96-well Wound-Maker™ (Essen BioScience) and washed 2 times with PBS 1X (Gibco). For invasion assays, 50 µL of reduced Matrigel (Corning) diluted at 1 mg/mL in medium was added to each well and the plate was incubated 30 min at 37 °C to allow the gelation of the matrix. Afterwards, 100 µL of medium alone or containing CuPRiX₂ (800 µM of DOTAGA(Gd) and 500 µM of uncomplexed DOTAGA) or AGuIX® (800 µM of DOTAGA(Gd)) was added to the appropriate wells. Finally, the plate was placed in the IncuCyte (objective 10X), and images of each well were taken automatically every 2 h in the CO₂ incubator. Data were analyzed using IncuCyte ZOOM software (v. 2018A, Essen BioScience, Ltd., Royston, UK) and expressed as a percentage of wound confluency (relative wound density).

2.12. LOX Activity Assay

A549 and SQ20B-CSC cells were seeded in 25 cm² flasks in appropriate medium and allowed to adhere. The medium was then replaced with medium containing CuPRiX₂ (800 µM of DOTAGA(Gd) and 500 µM of uncomplexed DOTAGA) or AGuIX® (800 µM of DOTAGA(Gd)) and incubated for 24 h or 48 h. At both time points, the medium from each condition was collected and LOX activity was determined using LOX Activity Fluorometric Assay Kit (ab112139, Abcam, Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cell culture medium was collected and centrifuged at $13,000 \times g$ for 5 min at 4 °C. Then, 50 µL of supernatant were distributed in duplicate into a clear-bottom 96-well plate (50 µL of assay buffer was used as a blank) and 50 µL of LOX reaction mix was added to each well. The plate was incubated for 40 min at 37 °C in the dark. Fluorescence was then monitored on a microplate reader at Ex/Em = 560/590 nm. LOX activity levels are expressed as relative to background noise (blank control).

2.13. Clonogenic Survival Assay

Cells were seeded at a density of 4×10^4 cells/cm² and allowed to grow overnight. The cells were then incubated for 24 h in serum-free media alone or supplemented with AGuIX® (800 µM of DOTAGA(Gd)) or CuPRiX₂ (800 µM of DOTAGA(Gd) and 500 µM of uncomplexed DOTAGA). Cells were irradiated with single dose of 2, 3, 4 or 6 Gy with 220 kV X-ray at a dose rate of 2 Gy.min⁻¹ and then incubated for 4 h. Afterwards, they were washed with PBS, trypsinized, counted, replated in 25 cm² flasks, and incubated for 10 days. Cells were then fixed with ethanol 96% (VWR) and stained with Giemsa (Sigma-Aldrich)

diluted at 1/20 in distilled water. The flasks were rinsed with distilled water and allowed to dry overnight. Colonies with 64 cells or more were counted using the Colcount™ system (Oxford Optronix Ltd., Abingdon, United Kingdom). Clonogenic survival curves were fitted according to the linear quadratic equation $SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$ where SF is the surviving fraction; α represents the probability of lethal event, β the sublethal events and D the irradiation dose.

3. Results and Discussion

3.1. From AGuIX® to CuPRiX: Chemically Designed to Increase the Amount of Uncomplexed DOTAGA

3.1.1. Controlled Release of Gadolinium

AGuIX® nanoparticles are ultrasmall nanoparticles made of polysiloxane core and covalently grafted gadolinium chelates. The chelate is DOTAGA (2-(4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)pentanedioic acid), a derivative from DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid). DOTA is a macrocyclic molecule well known for the high stability constants of its complexes formed with trivalent lanthanides cations such as Gd^{3+} with $\log_{10}(K) = 25.6$ [32]. DOTAGA has been chosen due to its additional carboxylic function that ensure strong gadolinium chelation after functionalization on the polysiloxane inorganic matrix ($\log K = 24.78$) [33]. This high stability is mainly due to the carboxylic acid groups capable of chelating in the deprotonated state [34]. Here, the dissociation of gadolinium from the DOTAGA@(Gd^{3+}) groups covalently grafted on AGuIX® has been performed through protonation of the chelate in strong acidic conditions. Indeed, AGuIX® nanoparticles were placed in a 1 M HCl acidic medium in order to force the competitive protonation of the chelate, leading to the release of some of the Gd^{3+} cations [35,36]. The dissociation kinetics was favored by heating the solution at 50 °C during the release step. The free Gd^{3+} ions can be easily separated from the rest of the mixture components by HPLC using a reverse phase C4 column. Thanks to the quantification by ICP-MS, the released gadolinium could be monitored all along the process, as illustrated in Figure 1. In the end, the amount of uncomplexed DOTAGA in the final product should be directly related to the amount of gadolinium initially released at the time we decide to stop the reaction. Two different nanoparticles, CuPRiX₁ and CuPRiX₂, with an increased ratio of uncomplexed DOTAGA have been prepared by ending the reaction after 3 and 4 h, respectively. To prevent the released Gd^{3+} from being chelated again and to ensure a good safety of the product regarding the toxicity of free Gd^{3+} [37], a purification step has been performed using Vivaflow 200 ultrafiltration system with a cutoff of 5 kDa. The absence of free Gd^{3+} in the mixture after purification and before freeze-drying has been confirmed by HPLC-ICP/MS, as shown on Figure S1.

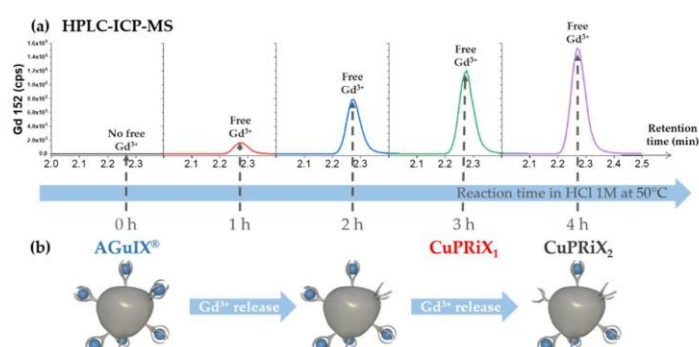


Figure 1. (a) Increase in free gadolinium (retention time close to 2.3 min) at different time points of the reaction followed by HPLC—ICP/MS. (b) Schematic view of the impact of the process on the nanoparticle starting from AGuIX® to obtain CuPRiX₁ (3 h of reaction) and CuPRiX₂ (4 h of reaction).

3.1.2. Characterization of CuPRiX₁ and CuPRiX₂ Size

The size of the nanoparticles will impact their pharmacokinetics [19] as well as its elimination pathway [38]. The hydrodynamic diameter (D_H) of the particles has been measured through dynamic light scattering (DLS). The volume distributions of the hydrodynamic diameter for CuPRiX₁ and CuPRiX₂ are displayed in Figure 2c. As expected, the measured D_H are close, equal to 4.6 ± 1.6 nm for CuPRiX₁ and 5 ± 2.1 nm for CuPRiX₂, respectively. These diameters are below the glomerular cutoff (<8 nm) [38] and thus good renal clearance from the body can be expected, as previously observed for AGuIX[®] nanoparticles [39]. Moreover, they are also close to the diameter of AGuIX[®] nanoparticles ($D_H = 3.6 \pm 1.3$ nm, displayed on Figure S2c). The gyration radii of CuPRiX₂ and AGuIX[®] nanoparticles was also evaluated by SAXS. The Guinier plots are shown in supplementary materials (Figure S3a) and yield gyration radii of 17.9 and 19.0 Å for CuPRiX₂ and AGuIX[®], respectively. In log–log representation (see Figure S3b), the theoretical Guinier law (i.e., $I(q) = I_0 \cdot \exp(-q^2 \cdot R_g^2/3)$) deviates from the experimental results at high q values, as expected from the transition to surface scattering with a modified Porod's law [40] ($I(q) = C/q^4 - B/q^2$), accounting for diffuse boundary. Indeed, the slope of the scattering diagrams in the log–log scale is slightly higher than 4. In the low- q range, scattering by AGuIX[®] displays a scattering excess compared to the theoretical Guinier law, showing the presence of small aggregates of particles. An opposite trend is observed for CuPRiX₂. This may originate from interparticle repulsive interactions associated with a negative charge surface, resulting from the partial dissociation of DOTAGA-Gd³⁺ complexes and thus the regeneration of the negatively charged uncomplexed DOTAGA.

HPLC-UV

The HPLC-UV chromatograms recorded at 295 nm, which correspond to the maximum absorption of the initial nanoparticle AGuIX[®] [41], can be found in Figure 2b. High purity close to 99% is obtained for CuPRiX₁ and CuPRiX₂ products measured directly from the absorbance ratio (purity% = Abs[10–15 min]/Abs[0–15 min]) of the HPLC-UV chromatograms. In addition, both modified products exhibit an elution peak located at a similar retention time (Tr) of 10.9 min, which is also close to that of AGuIX[®] equal to 10.7 min (Figure S2b).

ζ-Potential Measurement

The recorded ζ-potential of CuPRiX₁ and CuPRiX₂ depending on the pH is presented in Figure 2d. The nanoparticles share the same general behavior towards pH. The particles are positively charged at low pH due the protonated amine groups on the surface coming from the initial APTES used in the synthesis of AGuIX[®] [33]. At pH 3, the predominant form of the uncomplexed DOTAGA groups is the neutral one, H₄DOTA [42]. With increasing pH, the amount of the NH₃⁺ decreases and the DOTAGA groups increasingly switch to the negative charged form, leading to a decrease in ζ-potential. The pH at the Iso-Electric Point (IEP) decreases from 7.2 for AGuIX[®] (Figure S2d) to 6.7 for CuPRiX₁ and 6.3 for CuPRiX₂. This decrease in IEP is in agreement with the increase in the amount of uncomplexed DOTAGA groups. Indeed, complexed DOTAGA@(Gd³⁺) is more stable and has a fixed negative charge of −1 compared to uncomplexed DOTAGA which tends to −4 at high pH. For an equivalent amount of amine groups, the IEP will therefore be obtained at a lower pH.

Uncomplexed DOTAGA Measurement

The amount of uncomplexed DOTAGA groups in CuPRiX₁ and CuPRiX₂ was measured by HPLC-UV. Different samples have been prepared with a fixed number of particles and an increasing amount of Cu²⁺ at fixed pH to ensure increasing complexation. Due to the high absorbance of the DOTAGA@(Cu²⁺) complex at 295 nm [36], a significant increase in the overall absorbance can be observed at this wavelength (CuPRiX₁ measurement is

shown in Figure S3, CuPRiX₂ measurement is shown in Figure S4) until there was no free uncomplexed DOTAGA group ready to chelate. The amounts of uncomplexed DOTAGA groups in CuPRiX₁ and CuPRiX₂ are approximately 182 nmol and 253 nmol per mg of product, respectively. In comparison, AGuIX[®] displays only 8 nmol of uncomplexed DOTAGA per mg of product (Figure S5).

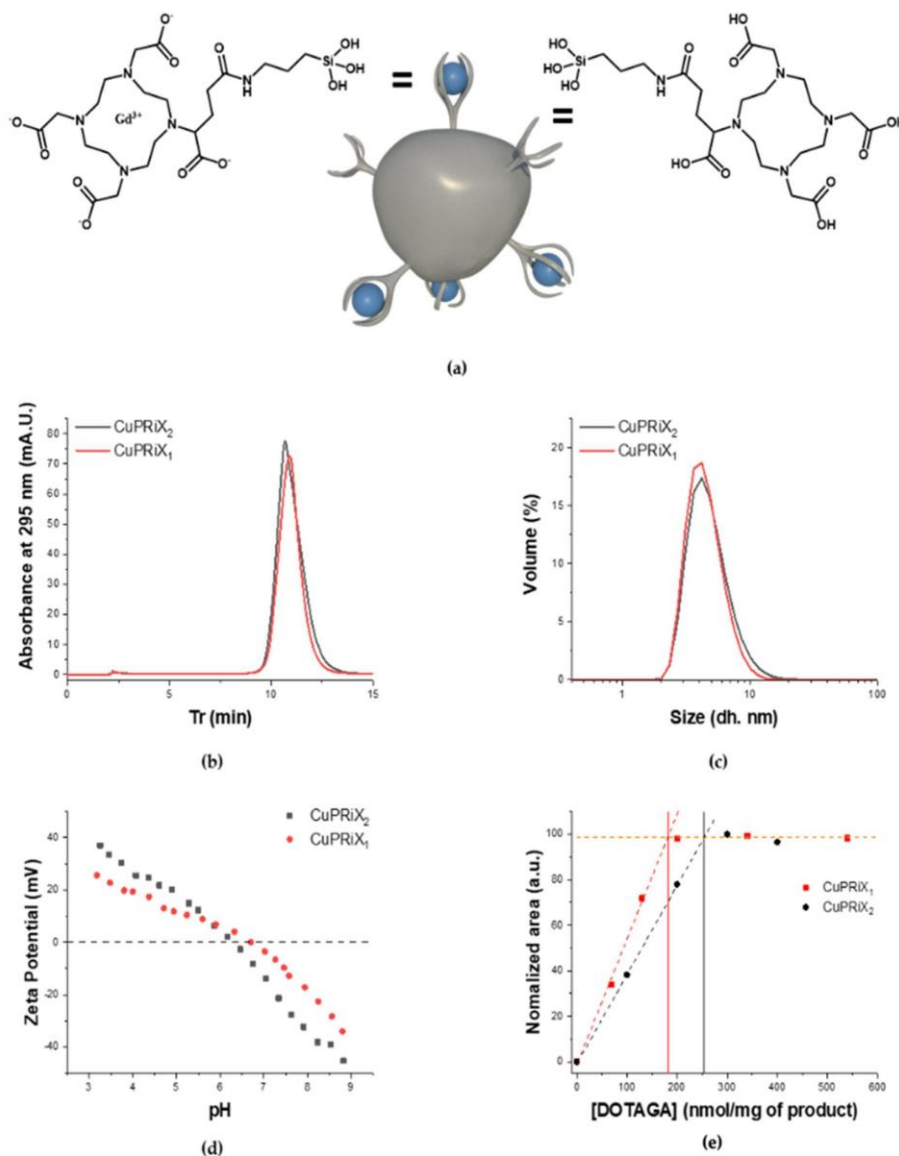


Figure 2. (a) Schematic representation of CuPRiX_x with a detailed structure of DOTAGA(Gd) and uncomplexed DOTAGA groups; (b) HPLC-UV chromatograms of CuPRiX₁ and CuPRiX₂ (10 µL, 100 g/L) recorded at 295 nm; (c) Hydrodynamic diameter distribution in volume obtained by dynamic light scattering; (d) Zeta potential vs. pH for CuPRiX₁ and CuPRiX₂; (e) Comparison of the amount of DOTA groups between CuPRiX₁ and CuPRiX₂ based on their unchelated DOTAGA measurements.

Relation between Gadolinium Content and Relaxivity Measurements

Finally, the amount of remaining gadolinium was measured by ICP/MS. The results can be found in Table 1 and show a decrease in gadolinium content with time spent in the acidic medium (10.5%, 8.2% and 6.2% for AGuIX[®], CuPRiX₁ and CuPRiX₂, respectively).

The total amount of DOTAGA in each product (DOTAGA(Gd) + Uncomplexed DOTAGA) can be then calculated.

$$[\text{total DOTAGA}] = [\text{Uncomplexed DOTAGA}] + [\text{Gd}]$$

$$\text{Uncomplexed DOTAGA content (\%)} = [\text{Uncomplexed DOTAGA}] / [\text{total DOTAGA}]$$

Table 1. Comparison of the chemical and physical characteristics of AGuIX[®], CuPRiX₁ and CuPRiX₂.

| Product | Gd (w%) | Free DOTAGA (nmol/mg) | Tr (min) | D _H (nm) | pH IEP | r ₁ (s ⁻¹ ·mM ⁻¹) | r ₂ (s ⁻¹ ·mM ⁻¹) |
|---------------------|---------|-----------------------|----------|---------------------|--------|---|---|
| AGuIX [®] | 10.5 | 8 ± 2 | 10.9 | 3.6 ± 1.34 | 7.15 | 18.9 | 30.4 |
| CuPRiX ₁ | 8.2 | 182 ± 14 | 10.9 | 4.6 ± 1.56 | 6.71 | 20.2 | 33.5 |
| CuPRiX ₂ | 6.2 | 253 ± 8 | 10.7 | 5 ± 2.1 | 6.29 | 30.7 | 51.2 |

AGuIX[®] has a total DOTAGA content of 676 nmol per mg (1.2% of Uncomplexed DOTAGA), CuPRiX₁ has a total DOTAGA content of 703 nmol per mg (25.9% of Uncomplexed DOTAGA) and CuPRiX₂ has a total DOTAGA content of 647 nmol per mg of product (39.1% of uncomplexed DOTAGA). As a conclusion, with a variation of about ±4% from the initial total DOTAGA content of AGuIX[®], CuPRiX₁ and CuPRiX₂ show a similar total DOTAGA content to that of the starting nanoparticle (See Table 1) and the acidic treatment does not induce strong hydrolysis of the inorganic matrix. CuPRiX₁ and CuPRiX₂ show higher r₁ and r₂ than AGuIX[®], which may be explained by higher hydrodynamic diameter correlated to higher correlation rotation time [27], even if this hypothesis is mitigated by a comparable radius of gyration determined by SAXS for AGuIX[®] and CuPRiX₂ (See Figure S3b).

3.2. CuPRiX Impacts Migration Processes

With copper being a key element in metastasis formation, the effects of its chelation on cell migration were evaluated using a wound-healing assay.

3.2.1. Determination of the Optimal Dose for the Use of CuPRiX

In order to determine the optimal dose of both CuPRiX₁ and CuPRiX₂ to be used in the following assays, a first evaluation of cell migration was performed with concentrations ranging from 100 to 500 µM of non-chelated DOTAGA. Maximum efficacy was observed for a concentration of 500 µM (See Figures S7–S9). It can also be noted that for an equal concentration of uncomplexed DOTAGA, CuPRiX₁ and CuPRiX₂ produce the same effect on cell migration (See Figure S10). This indicates that both types of CuPRiX can be used indiscriminately. A concentration of 500 µM of CuPRiX₂ was selected for all further assays in order to (i) maximize efficiency and (ii) limit the concentration of nanoparticles as much as possible to avoid possible side effects linked to the concentration of nanoparticles.

3.2.2. CuPRiX Decreases Migration and Invasion of A549 and SQ20B-CSCs Cells

Figure 3 shows representative images of A549 (See Figure 3a) and SQ20B-CSC (see Figure 3b) cell migration in the absence or in presence of CuPRiX₂ as well as the relative wound density calculated after 12, 24, 36 and 48 h of treatment, with (see Figure 3e,f) or without Matrigel (See Figure 3c,d). CuPRiX₂ was able to significantly decrease the motility of A549 and SQ20B-CSCs cells. At 48 h after wounding without Matrigel, the wound was closed at 80.6 ± 8.6% and 96.7 ± 3.4% for A549 and SQ20B-CSCs cells, respectively, whereas only 68.7 ± 6.6% and 85.8 ± 8.4% of the wound was closed for treated cells (***) *p* < 0.001, see Figure 3c). When A549 and SQ20B-CSCs cells were treated with CuPRiX₂, in the presence of Matrigel, the invasion process was decreased, as 56.8 ± 5.8% and 72.2 ± 7.4% of the wound was closed, respectively. These values are lower than for untreated cells where 76.4 ± 8%

and $86.1 \pm 7.9\%$ of the wound was closed after 48 h (** $p < 0.01$ for A549, *** $p < 0.001$ for SQ20B-CSC, See Figure 3e,f). For both cell lines, AGuIX[®], at the same concentration of gadolinium, did not interfere with migration or invasion, demonstrating the distinctive efficacy of CuPriX and uncomplexed DOTAGA.

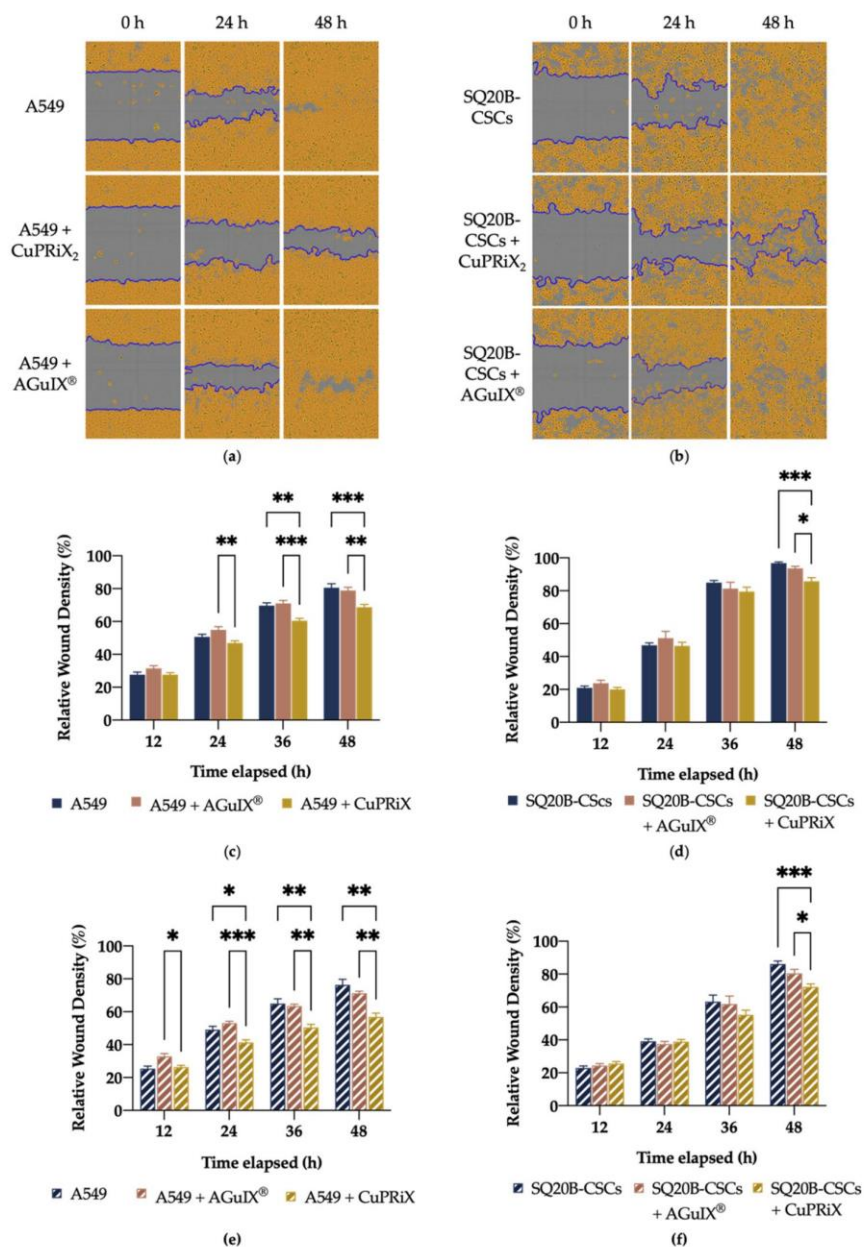


Figure 3. Effect of AGuIX[®] and CuPriX₂ on migration and invasion of A549 and SQ20B-CSCs with the scratch wound assay. Representatives images and quantitative analysis of migration of A549 (a), (c) and SQ20B-CSCs (b,d) cells after treatment with CuPriX₂ (800 μ M of DOTAGA(Gd) and 500 μ M of uncomplexed DOTAGA) or AGuIX[®] (800 μ M of DOTAGA(Gd)). (e,f) Quantitative analysis of invasion (1 mg/mL of Matrigel) of A549 and SQ20B-CSCs cells, respectively, after treatment with CuPriX₂ or AGuIX[®]. Relative wound density is a measure of the density of the cell region (%). Data are presented as mean \pm SEM ($n = 3$) with 6 technical replicates for each experiment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-way ANOVA.

The difference in wound closure cannot be explained by cell growth arrest because CuPRiX did not affect the proliferation of A549 and SQ20B-CSCs cells (see Figure S6), and this shows that CuPRiX₂ can decrease the migration and invasion of A549 and SQ20B-CSC cells.

3.2.3. CuPRiX Decreases LOX Activity

After showing the ability of CuPRiX to decrease cell migration and invasion with a functional assay, the objective of this experiment was to ensure that this effect could be attributed to copper chelation. To this end, the activity of lysyl oxidase (LOX), a copper-dependent enzyme involved in migration pathways, was evaluated after the addition of CuPRiX₂ or AGuIX[®]. Treatment for 24 h and 48 h with CuPRiX₂ resulted in a 26.4% (** $p < 0.01$) and 33.2% (***) $p < 0.001$) decrease in LOX activity for A549 cells (Figure 4a) and 21.7% (***) $p < 0.001$) and 23.4% (***) $p < 0.001$) for SQ20B-CSC (Figure 4b) cells, respectively. AGuIX[®] did not alter LOX activity in either cell line.

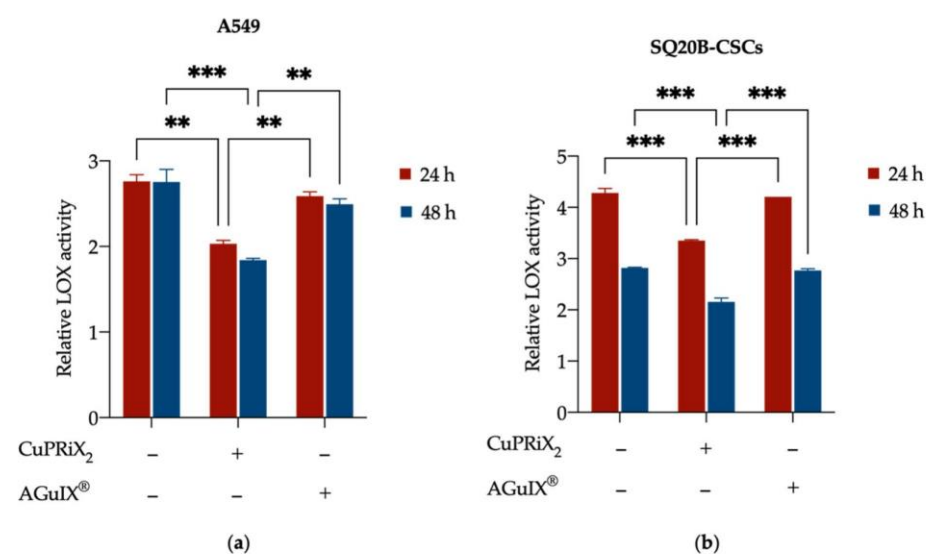


Figure 4. Effect of AGuIX[®] (800 μ M of DOTAGA(Gd)) and CuPRiX₂ (800 μ M of DOTAGA(Gd) and 500 μ M of uncomplexed DOTAGA) on LOX activity in (a) A549 and (b) SQ20B-CSCs cells. Cells were treated for 24 h and 48 h and the activity of LOX (an extracellular copper-dependent enzyme) in the culture medium was assessed. LOX activity levels are relative to background noise (blank control). Data are presented as mean \pm SD ($n = 2$) with 2 technical replicates for each experiment. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, two-way ANOVA.

The decrease in LOX activity could be the consequence of reduced copper availability, showing that CuPRiX₂ was able to chelate copper and make it unavailable to LOX. In addition, the ability of CuPRiX₂ to chelate copper in Cu-laden water has already been proven (see Figures S4–S6), but this assay demonstrates this feature in a biological medium.

3.3. CuPRiX Radiosensitizes A549 and SQ20B-CSC

Clonogenic assays were performed to compare the radiosensitizing efficacy of AGuIX[®] and CuPRiX₂, both presenting DOTAGA(Gd) on their surface (Figure 5). Radiobiological parameters were determined from these data (Table 2). For both cell lines, cell survival fractions (SF) decreased with CuPRiX₂ and AGuIX[®]. At 4 Gy, the SF of SQ20B-CSC and A549 alone was 0.33 and 0.15, respectively. When treated with AGuIX[®] and CuPRiX₂, the SF of SQ20B-CSC at 4 Gy decreases to 0.26 and 0.24, respectively, and the SF of A549 decreases to 0.12 in both cases. Additionally, the probability of having a direct lethal effect, represented with the α coefficient, increased with both CuPRiX and AGuIX[®]. In addition,

treatment with CuPRiX₂ and AGuIX[®] resulted in a 13% and 18% increase in A549 cell death and an 11% and 9% increase in SQ20B-CSC cell death at 2 Gy, respectively (Table 2). With an equivalent amount of Gd (800 μM), CuPRiX₂ induces about the same radiosensitizing effect as AGuIX[®] on both cell lines.

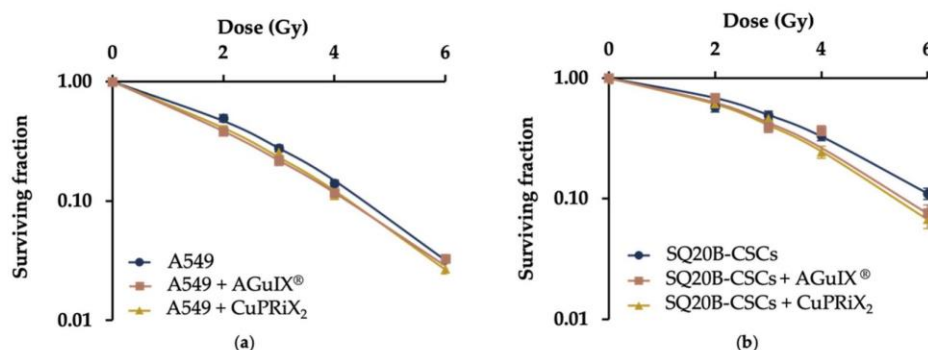


Figure 5. Radiosensitizing effect of AGuIX[®] (800 μM of DOTAGA(Gd)) and CuPRiX₂ (800 μM of DOTAGA(Gd) and 500 μM of uncomplexed DOTAGA) on (a) A549 and (b) SQ20B-CSCs cell lines. Both cell lines were treated with 800 μM of Gd. Each curve is the mean of 3 independent experiments.

Table 2. Summary of radiosensitizing parameters, D₁₀ and SER_{2Gy}.

| Parameters | A549 | A549 + CuPRiX ₂ | A549 + AGuIX [®] | SQ20B-CSCs | SQ20B-CSCs + CuPRiX ₂ | SQ20B-CSCs + AGuIX [®] |
|--------------------|--------|----------------------------|---------------------------|------------|----------------------------------|---------------------------------|
| α | 0.2825 | 0.3691 | 0.422 | 0.1005 | 0.1477 | 0.1136 |
| β | 0.0485 | 0.0393 | 0.0282 | 0.0444 | 0.0504 | 0.0492 |
| D ₁₀ | 4.57 | 4.28 | 4.25 | 6.16 | 5.45 | 5.6 |
| SER _{2Gy} | - | 13% | 18% | - | 11% | 9% |

Coefficients α and β are determined using the linear-quadratic model, with α being the probability of a lethal event occurring and β being the probability of a sublethal event occurring; D₁₀ is the calculated dose leading to 10% cell survival fraction; and SER_{2Gy} is the Sensitizing Enhancement Ratio calculated as follow:

$$SER_{2Gy}(\%) = \frac{SF_{2Gy}(\text{control}) - SF_{2Gy}(AGuIX^{(r)})}{SF_{2Gy}(\text{control})},$$

with SF_{2Gy} being the survival fraction at 2 Gy.

3.4. Discussion

Because elevated levels of copper have been observed in multiple cancer types and are associated with mechanisms such as cancer migration and the development of metastases, there is increasing interest in copper chelation as a cancer therapy [9,11]. In this view, many of the copper chelators tested are oral drugs used for disease such as Wilson’s disease that have been repurposed for cancer treatment. Although they all have their own ability to chelate copper, some copper chelators may have important side effects [9]. An advantage of using nanoparticles as multifunctional macro-chelators is their ability to target tumors via the EPR effect [43] and potentially induce a blockage of migration mechanisms within the tumor. In this study, the efficacy of CuPRiX nanoparticles to chelate copper was evaluated and was shown to decrease migration on one hand, and to enhance radiation therapy efficacy on the other hand. As increased copper levels have been measured in oral [44] and lung [45,46] cancers and they are both prone to metastasis, we tested one cell line on each

cancer: A549 (lung) and SQ20B (oral). We chose to test our drug on a subpopulation of the SQ20B cell line that exhibits stem-cell characteristics such as high radioresistance [47] and migratory and invasive capabilities [48].

CuPRiX, unlike AGuIX[®], was able to decrease cell migration and invasion in our two models, indicating that the presence of free chelate at its surface triggers an effect. In the literature, few articles demonstrate effective copper chelation *in vitro*, as their ability to chelate copper has been widely tested and validated. As this work is a first proof-of-concept study, and despite the known ability of DOTAGA to chelate copper, it was important to correlate the observed migration inhibition with copper chelation. LOX activity, a copper-dependent enzyme, was significantly decreased in both cell lines when treated with CuPRiX. This confirms the effectiveness of CuPRiX in chelating copper and supports the hypothesis that the effect on migration is indeed due to a lack of copper availability even if the chelation of other metals may also play a role. Additionally, LOX is known to be involved in metastasis formation [49], and it has been shown that catalytically active LOX regulates *in vitro* motility and cell–matrix adhesion formation [50] and is able to promote tumorigenesis and metastasis [51]. Therefore, CuPRiX, by copper chelation, has shown its potential to inhibit this key enzyme for metastasis and might be able to have a significant impact on cancer progression. To our knowledge, only one nanoparticle was shown to induce a decrease in cell migration by copper chelation, in a human umbilical vein endothelial cell line (HUVEC) [24].

The complexity of cancer mechanisms and the heterogeneity of response to treatments make combination therapies a necessary tool to overcome resistance. Few studies have evaluated the effect of copper chelation associated with radiation therapy. In 2006, Khan et al. showed that the combination of TM and radiotherapy improved local control of HNSCC in an isogenic mouse model [18]. Despite these promising results, there are currently no nanoparticles combining copper chelation and radiosensitization in their effect.

CuPRiX is a nanoparticle derived from AGuIX[®], a radiosensitizing agent currently undergoing evaluation in multiple phase II clinical trials in different types of cancer. The efficacy of AGuIX[®] as a radiosensitizing agent has been well documented [27,52], and our results showed that CuPRiX₂ is also able to induce radiosensitization due to the presence of gadolinium. Since the observed sensitizing efficacy is equivalent whether using AGuIX[®] or CuPRiX with an equivalent amount of gadolinium, this suggests that it is solely due to the presence of gadolinium. Nevertheless, CuPRiX appears to be a strong candidate as an anti-migratory agent. Recently, Yan, We, Hu et al. identified a novel role of copper in promoting the radioresistance of hepatocellular carcinoma cells [53]. We can hypothesize that a synergistic effect of metallic nanoparticles and copper chelation could be obtained in cell lines or tumors with a significantly elevated copper amount. Since CuPRiX is derived from AGuIX[®] and that display very close physico-chemical features, we can expect similar behaviors in terms of biodistribution, degradability and contrast agent properties [54] in future preclinical and clinical studies.

4. Conclusions

In this manuscript, we present a new generation of hybrid nanoparticles, derived from AGuIX[®], capable of overcoming the radioresistance of tumors, with the presence of DOTAGA(Gd), and potentially limiting metastases with the chelation of copper by uncomplexed DOTAGA that decreases cell migration and invasion in two different cell lines. The chemical synthesis offered the possibility to finely design the amount of non-chelated DOTAGA on the final nanoparticle by controlling reaction time. These nanoparticles display ultrasmall sizes and zeta potentials close to those of AGuIX[®] nanoparticles.

As a first proof of concept, we showed that, thanks to the presence of free DOTAGA on its surface, CuPRiX₂ can successfully chelate copper in a complex medium and decrease the migration and invasion of two lung and oral cancer cell lines. This observation could be partly explained by the inhibition of a copper-dependent enzyme, LOX, involved in

metastasis formation. In addition, we confirmed the radiosensitizing efficacy of CuPRiX, in the same way as AGuIX[®] nanoparticles.

Further experiments are now needed to better understand the underlying mechanisms as well as the efficacy of CuPRiX₂ on other cancer models in vitro and in vivo.

5. Patents

Two patents have been filed on the results described in this publication by PR, FL and OT for the chemical process (FR2011904) and by PR, FL, OT, DBV and CRL for copper chelation in oncology (FR2011903).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics14040814/s1>. Figure S1: Comparison of free Gd³⁺ ions level before and after purification followed by HPLC-ICP/MS. Figure S2: (a) Schematic representation of AGuIX[®] with the detailed structure of chelated DOTAGA groups; (b) HPLC-UV chromatograms of AGuIX[®] (10 µL, 100 g/L) recorded at 295 nm; (c) Hydrodynamic diameters distribution in volume as obtained by dynamic light scattering; (d) Zeta potential vs. pH for AGuIX[®]. Figure S3: Calculation of radius of gyration by SAXS (a) Guinier plots for CuPRiX₂ and AGuIX hybrid nanoparticles (b) Log-Log representation using the same Guinier modelling. Figure S4: Measurement of unchelated DOTAGA on AGuIX[®]. Figure S5: Measurement of unchelated DOTAGA on CuPRiX₁. Figure S6: Measurement of unchelated DOTAGA on CuPRiX₂. Figure S7: Effect of increasing concentrations of CuPRiX₁ (0, 50, 100, 500, 1000 µM free chelate) on cell motility of A549 cells. Figure S8: Effect of increasing concentrations of CuPRiX₁ (0, 50, 100, 500, 1000 µM of uncomplexed chelate) on cell motility of A549 cells. Figure S9: Effect of CuPRiX₁ and CuPRiX₂ on cell motility of A549 cells. Figure S10: Proliferation of A549 (a) and SQ20B-CSCs (b) cells after treatment with CuPRiX₁ (500 µM of free DOTAGA).

Author Contributions: Conceptualization, F.L., C.R.-L. and O.T.; methodology, P.R., D.B.-V., F.L., C.R.-L. and O.T.; validation, P.R., D.B.-V., F.L., L.D., C.R.-L. and O.T.; formal analysis, P.R., D.B.-V., I.M. and L.D.; investigation, P.R., L.D. and D.B.-V.; writing—original draft preparation, P.R., D.B.-V. and F.L.; writing—review and editing, P.R., D.B.-V., F.L., I.M., L.D., C.R.-L. and O.T.; supervision, F.L., C.R.-L. and O.T.; project administration, F.L., C.R.-L. and O.T.; funding acquisition, F.L., C.R.-L. and O.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the LABEX PRIMES (ANR-11-LABX-0063) of Université de Lyon, within the program “Investissements d’Avenir” operated by the French National Research Agency (ANR). This project was also supported by the departmental committee of Auvergne-Rhône-Alpes and Saône-et-Loire of the French League against cancer.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank the CRG group at D2AM beamline for their involvement and expertise in the ESRF experiments. The beamline detector development was funded by the French National Research Agency (ANR) under the “Investissement d’Avenir” program (Grant no. ANR-11-EQPX-0010).

Conflicts of Interest: PR is an employee of NH TherAguix. F.L. and O.T. possess shares of NH. TherAguix. F.L., O.T., P.R., D.B., and C.R.-L. have filed patents in relation with the results described in this paper. The company had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

- Blockhuys, S.; Celauro, E.; Hildesjö, C.; Feizi, A.; Stål, O.; Fierro-González, J.C.; Wittung-Stafshede, P. Defining the human copper proteome and analysis of its expression variation in cancers. *Metallomics* **2017**, *9*, 112–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Grubman, A.; White, A.R. Copper as a key regulator of cell signalling pathways. *Expert Rev. Mol. Med.* **2014**, *16*, e11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lelièvre, P.; Sancey, L.; Coll, J.L.; Deniaud, A.; Busser, B. The multifaceted roles of copper in cancer: A trace metal element with dysregulated metabolism, but also a target or a bullet for therapy. *Cancers* **2020**, *12*, 3594. [[CrossRef](#)]
- Tsang, T.; Posimo, J.M.; Gudiel, A.A.; Cicchini, M.; Feldser, D.M.; Brady, D.C. Copper is an essential regulator of the autophagic kinases ULK1/2 to drive lung adenocarcinoma. *Nat. Cell Biol.* **2020**, *22*, 412–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Voli, F.; Valli, E.; Lerra, L.; Kimpton, K.; Saletta, F.; Giorgi, F.M.; Mercatelli, D.; Rouaen, J.R.C.; Shen, S.; Murray, J.E.; et al. Intratumoral copper modulates PD-L1 expression and influences tumor immune evasion. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 4129–4144. [[CrossRef](#)]
6. Erler, J.T.; Bennewith, K.L.; Cox, T.R.; Lang, G.; Bird, D.; Koong, A.; Le, Q.T.; Giaccia, A.J. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 35–44. [[CrossRef](#)]
7. Ge, E.J.; Bush, A.I.; Casini, A.; Cobine, P.A.; Cross, J.R.; DeNicola, G.M.; Dou, Q.P.; Franz, K.J.; Gohil, V.M.; Gupta, S.; et al. Connecting copper and cancer: From transition metal signalling to metalloplasia. *Nat. Rev. Cancer* **2021**, *22*, 102–113. [[CrossRef](#)]
8. Lopez, J.; Ramchandani, D.; Vahdat, L. Copper depletion as a therapeutic strategy in cancer. *Met. Ions Life Sci.* **2019**, *19*, 303–330. [[CrossRef](#)]
9. Michniewicz, F.; Saletta, F.; Rouaen, J.R.C.; Hewavisenti, R.V.; Mercatelli, D.; Cirillo, G.; Giorgi, F.M.; Trahair, T.; Ziegler, D.; Vittorio, O. Copper: An intracellular achilles' heel allowing the targeting of epigenetics, kinase pathways, and cell metabolism in cancer therapeutics. *ChemMedChem* **2021**, *16*, 2315–2329. [[CrossRef](#)]
10. Brem, S.S.; Zagzag, D.; Tsanacelis, A.M.C.; Gately, S.; Elkouby, M.P.; Brien, S.E. Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper an angiogenic cofactor. *Am. J. Pathol.* **1990**, *137*, 1121–1142.
11. Baldari, S.; Di Rocco, G.; Toietta, G. Current biomedical use of copper chelation therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Chan, N.; Willis, A.; Kornhauser, N.; Mward, M.; Lee, S.B.; Nackos, E.; Seo, B.R.; Chuang, E.; Cigler, T.; Moore, A.; et al. Influencing the tumor microenvironment: A Phase II study of copper depletion using tetrathiomolybdate in patients with breast cancer at high risk for recurrence and in preclinical models of lung metastases. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 666–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Fu, S.; Hou, M.M.; Wheler, J.; Hong, D.; Naing, A.; Tsimberidou, A.; Janku, F.; Zinner, R.; Piha-Paul, S.; Falchook, G.; et al. Exploratory study of carboplatin plus the copper-lowering agent trientine in patients with advanced malignancies. *Investig. New Drugs* **2014**, *32*, 465–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Majumder, S.; Chatterjee, S.; Pal, S.; Biswas, J.; Efferth, T.; Choudhuri, S.K. The role of copper in drug-resistant murine and human tumors. *BioMetals* **2009**, *22*, 377–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kilari, D.; Guancial, E.; Kim, E.S. Role of copper transporters in platinum resistance. *World J. Clin. Oncol.* **2016**, *7*, 106–113. [[CrossRef](#)]
16. Voli, F.; Lerra, L.; Kimpton, K.; Saletta, F.; Shen, S.; Cirillo, G.; Kavallaris, M.; Vittorio, O. Abstract 3224: Copper homeostasis: A new player in anti-tumor immune response. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 3224. [[CrossRef](#)]
17. Morisawa, A.; Okui, T.; Shimo, T.; Ibaragi, S.; Okusha, Y.; Ono, M.; Nguyen, T.T.H.; Hassan, N.M.M.; Sasaki, A. Ammonium tetrathiomolybdate enhances the antitumor effects of cetuximab via the suppression of osteoclastogenesis in head and neck squamous carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2018**, *52*, 989–999. [[CrossRef](#)]
18. Khan, M.K.; Mamou, F.; Schipper, M.J.; May, K.S.; Kwitny, A.; Warnat, A.; Bolton, B.; Nair, B.M.; Kariapper, M.S.T.; Miller, M.; et al. Combination tetrathiomolybdate and radiation therapy in a mouse model of head and neck squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol.-Head Neck Surg.* **2006**, *132*, 333–338. [[CrossRef](#)]
19. Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 941–951. [[CrossRef](#)]
20. Tremmel, R.; Uhl, P.; Helm, F.; Wupperfeld, D.; Sauter, M.; Mier, W.; Stremmel, W.; Hofhaus, G.; Fricker, G. Delivery of Copper-chelating Trientine (TETA) to the central nervous system by surface modified liposomes. *Int. J. Pharm.* **2016**, *512*, 87–95. [[CrossRef](#)]
21. Cui, L.; Gouw, A.M.; LaGory, E.L.; Guo, S.; Attarwala, N.; Tang, Y.; Qi, J.; Chen, Y.S.; Gao, Z.; Casey, K.M.; et al. Mitochondrial copper depletion suppresses triple-negative breast cancer in mice. *Nat. Biotechnol.* **2020**, *39*, 357–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Shao, S.; Zhou, Q.; Si, J.; Tang, J.; Liu, X.; Wang, M.; Gao, J.; Wang, K.; Xu, R.; Shen, Y. A non-cytotoxic dendrimer with innate and potent anticancer and anti-metastatic activities. *Nat. Biomed. Eng.* **2017**, *1*, 745–757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Liu, H.; Zhang, Y.; Zheng, S.; Weng, Z.; Ma, J.; Li, Y.; Xie, X.; Zheng, W. Detention of copper by sulfur nanoparticles inhibits the proliferation of A375 malignant melanoma and MCF-7 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *477*, 1031–1037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zhou, P.; Qin, J.; Zhou, C.; Wan, G.; Liu, Y.; Zhang, M.; Yang, X.; Zhang, N.; Wang, Y. Multifunctional nanoparticles based on a polymeric copper chelator for combination treatment of metastatic breast cancer. *Biomaterials* **2019**, *195*, 86–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Verry, C.; Dufort, S.; Lemasson, B.; Grand, S.; Pietras, J.; Tropès, I.; Crémillieux, Y.; Lux, F.; Mériaux, S.; Larrat, B.; et al. Targeting brain metastases with ultrasmall theranostic nanoparticles, a first-in-human trial from an MRI perspective. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaay5279. [[CrossRef](#)]
26. Verry, C.; Dufort, S.; Villa, J.; Gavard, M.; Iriart, C.; Grand, S.; Charles, J.; Chovelon, B.; Cracowski, J.L.; Quesada, J.L.; et al. Theranostic AGuIX nanoparticles as radiosensitizer: A phase I, dose-escalation study in patients with multiple brain metastases (NANO-RAD trial). *Radiother. Oncol.* **2021**, *160*, 159–165. [[CrossRef](#)]
27. Lux, F.; Tran, V.L.; Thomas, E.; Dufort, S.; Rossetti, F.; Martini, M.; Truillet, C.; Doussineau, T.; Bort, G.; Denat, F.; et al. AGuIX[®] from bench to bedside—Transfer of an ultrasmall theranostic gadolinium-based nanoparticle to clinical medicine. *Br. J. Radiol.* **2018**, *92*, 20180365. [[CrossRef](#)]

28. Verry, C.; Sancey, L.; Dufort, S.; Le Duc, G.; Mendoza, C.; Lux, F.; Grand, S.; Arnaud, J.; Quesada, J.L.; Villa, J.; et al. Treatment of multiple brain metastases using gadolinium nanoparticles and radiotherapy: NANO-RAD, a phase I study protocol. *BMJ Open* **2019**, *9*, e023591. [[CrossRef](#)]
29. Le Duc, G.; Roux, S.; Paruta-Tuarez, A.; Dufort, S.; Brauer, E.; Marais, A.; Truillet, C.; Sancey, L.; Perriat, P.; Lux, F.; et al. Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. *Cancer Nanotechnol.* **2014**, *5*, 4. [[CrossRef](#)]
30. Wozny, A.S.; Vares, G.; Alphonse, G.; Lauret, A.; Monini, C.; Magné, N.; Cuerq, C.; Fujimori, A.; Monboisse, J.C.; Beuve, M.; et al. Ros production and distribution: A new paradigm to explain the differential effects of X-ray and carbon ion irradiation on cancer stem cell migration and invasion. *Cancers* **2019**, *11*, 468. [[CrossRef](#)]
31. Gilormini, M.; Wozny, A.S.; Battiston-Montagne, P.; Ardail, D.; Alphonse, G.; Rodriguez-Lafrasse, C. Isolation and characterization of a head and neck squamous cell carcinoma subpopulation having stem cell characteristics. *J. Vis. Exp.* **2016**, *2016*, 53958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Port, M.; Idée, J.-M.; Medina, C.; Robic, C.; Sabatou, M.; Corot, C. Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: A critical review. *BioMetals* **2008**, *21*, 469–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Mignot, A.; Truillet, C.; Lux, F.; Sancey, L.; Louis, C.; Denat, F.; Boschetti, F.; Bocher, L.; Gloter, A.; Stéphan, O.; et al. A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional gd-based silica nanoparticles for theranostic applications. *Chem.-A Eur. J.* **2013**, *19*, 6122–6136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sherry, A.D.; Caravan, P.; Lenkinski, R.E. Primer on gadolinium chemistry. *J. Magn. Reson. Imaging* **2009**, *30*, 1240–1248. [[CrossRef](#)]
35. Pniok, M.; Kubiček, V.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Sabatie-Gogová, A.; Plutnar, J.; Huclier-Markai, S.; Hermann, P. Thermodynamic and kinetic study of scandium(III) complexes of DTPA and DOTA: A step toward scandium radiopharmaceuticals. *Chem.-Eur. J.* **2014**, *20*, 7944–7955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Dai, L.; Jones, C.M.; Chan, W.T.K.; Pham, T.A.; Ling, X.; Gale, E.M.; Rotile, N.J.; Tai, W.C.-S.; Anderson, C.J.; Caravan, P.; et al. Chiral DOTA chelators as an improved platform for biomedical imaging and therapy applications. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 857. [[CrossRef](#)]
37. Mathur, M.; Jones, J.R.; Weinreb, J.C. Gadolinium deposition and nephrogenic systemic fibrosis: A radiologist's primer. *Radiographics* **2020**, *40*, 153–162. [[CrossRef](#)]
38. Du, B.; Yu, M.; Zheng, J. Transport and interactions of nanoparticles in the kidneys. *Nat. Rev. Mater.* **2018**, *3*, 358–374. [[CrossRef](#)]
39. Sancey, L.; Kotb, S.; Truillet, C.; Appaix, F.; Marais, A.; Thomas, E.; Van Der Sanden, B.; Klein, J.P.; Laurent, B.; Cottier, M.; et al. Long-term in Vivo clearance of gadolinium-based AGuIX nanoparticles and their biocompatibility after systemic injection. *ACS Nano* **2015**, *9*, 2477–2488. [[CrossRef](#)]
40. Koberstein, J.T.; Morra, B.; Stein, R.S.J. The determination of diffuse-boundary thicknesses of polymers by small-angle X-ray scattering. *Appl. Cryst.* **1980**, *13*, 34–45. [[CrossRef](#)]
41. Truillet, C.; Lux, F.; Tillement, O.; Dugourd, P.; Antoine, R. Coupling of HPLC with electrospray ionization mass spectrometry for studying the aging of ultrasmall multifunctional gadolinium-based silica nanoparticles. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10440–10447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Desreux, J.F.; Merciny, E.; Loncin, M.F. Nuclear magnetic resonance and potentiometric studies of the protonation scheme of two tetraaza tetraacetic macrocycles. *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 987–991. [[CrossRef](#)]
43. Bort, G.; Lux, F.; Dufort, S.; Crémillieux, Y.; Verry, C.; Tillement, O. EPR-mediated tumor targeting using ultrasmall-hybrid nanoparticles: From animal to human with theranostic AGuIX nanoparticles. *Theranostics* **2020**, *10*, 1319–1331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. De Jorge, F.B.; Paiva, L.; Mion, D.; da Nova, R. Biochemical studies on copper, copper oxidase, magnesium, sulfur, calcium and phosphorus in cancer of the larynx. *Acta Otolaryngol.* **1966**, *61*, 454–458. [[CrossRef](#)]
45. Zhang, X.; Yang, Q. Association between serum copper levels and lung cancer risk: A meta-analysis. *J. Int. Med. Res.* **2018**, *46*, 4863–4873. [[CrossRef](#)]
46. Díez, M.; Arroyo, M.; Cerdà, F.J.; Muñoz, M.; Martín, M.A.; Balibrea, J.L. Serum and tissue trace metal levels in lung cancer. *Oncology* **1989**, *46*, 230–234. [[CrossRef](#)]
47. Bertrand, G.; Maalouf, M.; Boivin, A.; Battiston-Montagne, P.; Beuve, M.; Levy, A.; Jalade, P.; Fournier, C.; Ardail, D.; Magné, N.; et al. Targeting head and neck cancer stem cells to overcome resistance to photon and carbon ion radiation. *Stem Cell Rev. Reports* **2014**, *10*, 114–126. [[CrossRef](#)]
48. Guy, J.B.; Espenel, S.; Vallard, A.; Battiston-Montagne, P.; Wozny, A.S.; Ardail, D.; Alphonse, G.; Rancoule, C.; Rodriguez-Lafrasse, C.; Magne, N. Evaluation of the cell invasion and migration process: A comparison of the video microscope-based scratch wound assay and the boyden chamber assay. *J. Vis. Exp.* **2017**, *2017*, 56337. [[CrossRef](#)]
49. Peng, D.H.; Ungewiss, C.; Tong, P.; Byers, L.A.; Wang, J.; Canales, J.R.; Villalobos, P.A.; Uraoka, N.; Mino, B.; Behrens, C.; et al. ZEB1 induces LOXL2-mediated collagen stabilization and deposition in the extracellular matrix to drive lung cancer invasion and metastasis. *Oncogene* **2017**, *36*, 1925–1938. [[CrossRef](#)]
50. Payne, S.L.; Fogelgren, B.; Hess, A.R.; Seftor, E.A.; Wiley, E.L.; Fong, S.F.T.; Csiszar, K.; Hendrix, M.J.C.; Kirschmann, D.A. Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 11429–11436. [[CrossRef](#)]

51. Shanbhag, V.; Jasmer-McDonald, K.; Zhu, S.; Martin, A.L.; Gudekar, N.; Khan, A.; Ladomersky, E.; Singh, K.; Weisman, G.A.; Petris, M.J. ATP7A delivers copper to the lysyl oxidase family of enzymes and promotes tumorigenesis and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 6836–6841. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Verry, C.; Porcel, E.; Chargari, C.; Rodriguez-Lafrasse, C.; Balosso, J. Use of nanoparticles as radiosensitizing agents in radiotherapy: State of play. *Cancer/Radiother.* **2019**, *23*, 917–921. [[CrossRef](#)]
53. Yang, M.; Wu, X.; Hu, J.; Wang, Y.; Wang, Y.; Zhang, L.; Huang, W.; Wang, X.; Li, N.; Liao, L.; et al. COMMD10 inhibits HIF1 α /CP loop to enhance ferroptosis and radiosensitivity by disrupting Cu-Fe balance in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **2022**, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sancey, L.; Lux, F.; Kotb, S.; Roux, S.; Dufort, S.; Bianchi, A.; Crémillieux, Y.; Fries, P.; Coll, J.L.; Rodriguez-Lafrasse, C.; et al. The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy. *Br. J. Radiol.* **2014**, *87*, 20140134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4.4 Conclusion et perspectives

Ce projet a permis de mettre en évidence la faisabilité de la voie de relargage du gadolinium par protonation assistée. Ainsi, en une étape simple de traitement acide, il est possible de modifier le contenu complexé à la surface d'AGuIX[®], tout en conservant la grande majorité de ses caractéristiques. Le projet CuPRiX met en avant la versatilité d'AGuIX[®] qui doit être vu comme une nanoparticule plateforme ajustable au cadre d'utilisations visées. Ici, on souhaite apporter à AGuIX[®] la capacité de complexer l'excès de cuivre au sein des tumeurs via la présence de groupements DOTAGA libre à la surface de la nanoparticule. Ces groupements sont issus du relargage du gadolinium initialement complexé. Les analyses chimiques effectuées ont validé l'obtention du produit désiré et les premiers résultats *in vitro* réalisés par nos partenaires ont démontré l'intérêt de l'utilisation de CuPRiX. Ces résultats encourageant doivent prochainement faire l'objet de test *in vivo* afin de confirmer l'effet de la thérapie de chélation via CuPRiX. De plus, grâce à la présence de gadolinium il est raisonnable d'espérer observer une synergie entre les effets anti-tumoraux de la chélation de cuivre et l'effet radiosensibilisant apporté par le reste du gadolinium encore en surface. Ce travail a donné lieu au dépôt de deux brevets. Le premier portant sur l'usage des nanoparticules présentant des DOTAGA libres pour la chélation de métaux dans l'organisme. Le second est focalisé sur le procédé de relargage de gadolinium ouvrant de nombreuses possibilités pour obtenir de nouveaux produits issus d'AGuIX[®].

Le relargage du gadolinium ouvre une voie vers la formation de nanoparticules de types AGuIX[®] dont le contenu complexé en surface peut être ajusté à façon. C'est dans cette optique que le procédé de relargage sera utilisé dans le chapitre suivant pour remplacer le gadolinium originel par du bismuth afin d'augmenter l'effet radiosensibilisant de la nanoparticule.

5 AGuIX(Gd/Bi) : Augmentation de l'effet radiosensibilisant

5.1 L'effet radiosensibilisant : Mécanisme et amplification

5.1.1 La radiothérapie : Un processus complexe

La radiothérapie renvoie au traitement des tumeurs par l'usage de rayonnements ionisants. Ce traitement voit le jour pour la première fois à la fin du 19^{ème} siècle, suite à la découverte par Wilhelm Conrad Röntgen des rayons X en décembre 1895. L'objectif de cette partie est de présenter les grands principes de ce processus. L'interaction d'un rayonnement ionisant avec un organisme vivant se décompose en 3 phases : 1) une phase physique, 2) une phase chimique et 3) une phase biologique (Figure 73).

5.1.1.1 Phase physique

L'interaction d'un rayonnement énergétique avec la matière résulte en un dépôt d'énergie au sein de la matière traversée. Ce dépôt d'énergie peut mener à une excitation électronique (passage d'un électron d'un atome vers un niveau plus énergétique sans être expulsé), voir à une ionisation (éjection d'un ou plusieurs électrons de l'atome) on parle alors de rayonnement « ionisant ». Cette ionisation se caractérise donc par un dépôt très localisé d'une quantité d'énergie suffisante pour induire des dégâts périphériques tels que des ruptures de liaisons chimiques.

Il existe 2 grandes familles de rayonnements ionisants : les rayonnements électromagnétiques et les rayonnements particuliers. Les rayonnements électromagnétiques comme les rayons X ou γ sont des ondes. Ils se caractérisent par leur longueur d'onde λ , leur fréquence ν et leur vitesse c (vitesse de la lumière). Ils se caractérisent aussi par leurs énergies E avec $E = h\nu$ où h est la constante de Planck. Cette énergie est généralement exprimée en électron Volt ($1 \text{ eV} = 1,602\ 176\ 634 \times 10^{-19} \text{ J}$). Si ces rayonnements présentent une énergie suffisante ils peuvent produire une ionisation dans la matière traversée. Les rayonnements particuliers se définissent par une masse, une vitesse et souvent une charge (protons, neutrons, électrons, ions carbone, ...), leurs énergies sont suffisantes pour entraîner une ionisation directe de la matière traversée.

La dose absorbée est une mesure de la « quantité » de rayonnement ionisant reçue par un tissu : elle se définit par l'énergie absorbée par masse de tissu traversée, elle est donc exprimée en Joules par kilogramme (J.Kg^{-1}). Cette unité est appelée le Gray ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J.Kg}^{-1}$). Le principe même de la radiothérapie est donc de déposer une dose suffisante d'énergie au sein de la tumeur, via les rayonnements ionisants, pour induire des dommages au niveau local. Les rayonnements ionisants les plus utilisés en clinique sont les rayons X.

Les mécanismes d'interactions entre rayons X et matière dépendent de deux paramètres principaux : l'énergie E du rayon X et le numéro atomique Z de l'atome rencontré. En radiothérapie, les principaux mécanismes impliqués dans le dépôt de dose sont l'effet photo-électrique, l'interaction Compton et la production de « paires ». La probabilité qu'un type de mécanisme se réalise est appelée section efficace d'interaction ou « cross-section ».

5.1.1.1.1 Effet photo-électrique

L'effet photo-électrique consiste en l'absorption d'un photon X par un atome, entraînant l'expulsion d'un électron situé dans les couches électroniques internes de l'atome. L'énergie du photon incident est presque entièrement transmise à l'électron expulsé, celui-ci peut se déplacer sur quelques microns causant des dommages aux molécules environnantes par ionisation. La lacune électronique ainsi créée est comblée par un électron d'une couche plus externe de l'atome. Ce changement d'orbital atomique entraîne une libération d'énergie lors d'un processus de désexcitation atomique qui peut se faire de deux façons : soit sous la forme de l'émission d'un photon X de fluorescence, soit sous la forme de l'éjection d'un électron d'une orbitale plus externe appelé alors électron Auger qui peuvent se déplacer sur une dizaine de nanomètre.

La résultante de l'effet photo-électrique est donc (Figure 68) :

- Un photon incident complètement absorbé
- Un photoélectron éjecté de son orbite
- Un photon de fluorescence X ou un électron Auger. La probabilité d'émission d'un photon ou d'éjections un électron dépend principalement de la nature de l'élément rencontré.

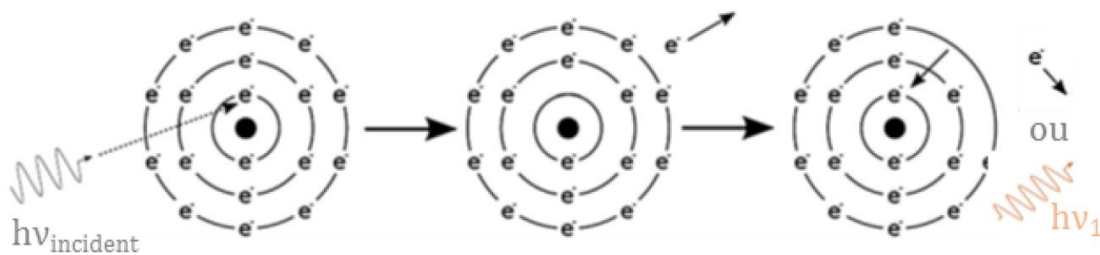


Figure 68. Schéma illustrant l'effet photoélectrique. Figure adaptée de Butterworth et al. [76].

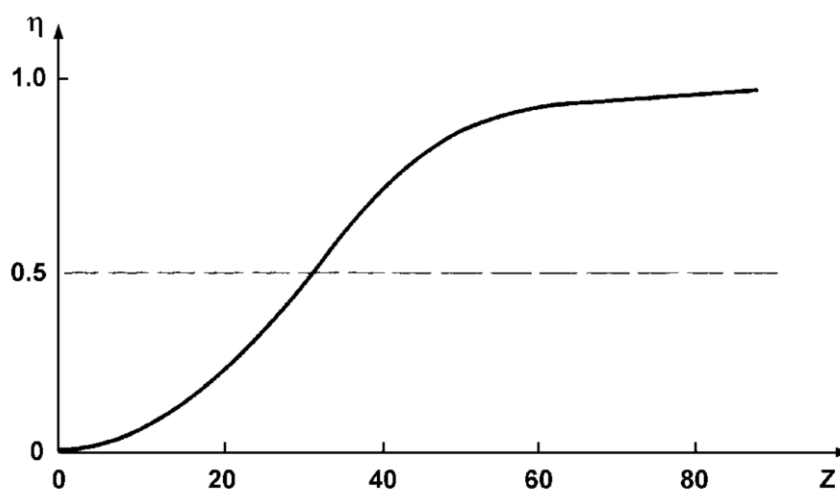


Figure 69. Ratio η d'émission d'un photon X de fluorescence sur l'émission d'un électron Auger par effet photoélectrique selon le numéro atomique Z de l'atome rencontré. Figure issue de Rosa S. et al [173].

La section efficace de l'effet photo-électrique est directement proportionnel à Z^3 et inversement proportionnel à E^3 [174]. Cet effet prédomine en utilisation clinique pour des énergies de 10-500 keV [175].

5.1.1.1.2 Effet Compton

L'effet Compton consiste en la collision d'un photon incident avec un électron des couches externes. Seule une partie de l'énergie incidente est transmise à l'électron, le reste est libéré par la diffusion d'un photon d'énergie plus faible. Le photon diffusé peut à son tour interagir avec l'environnement pour entraîner un effet photo-électrique ou un effet Compton.

La résultante de l'effet Compton est donc (Figure 70) :

- Un photon diffusé, dont l'énergie est celle du photon incident réduite de l'énergie transmise à l'électron
- Un photoélectron arraché à son orbitale atomique dont l'énergie varie selon l'énergie transmise par le photon incident

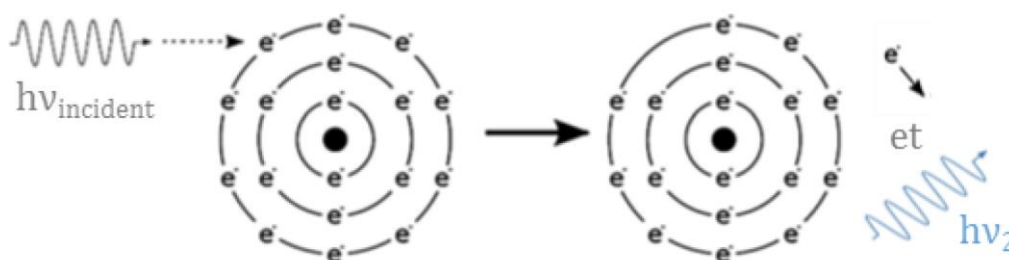


Figure 70. Schéma illustrant l'effet Compton. Figure adaptée de Butterworth et al. [76].

La section efficace de l'effet Compton est largement indépendante de Z et évolue inversement à E [174]. En clinique, il domine pour les énergies de 0,5 – 1 MeV.

L'effet photoélectrique et l'effet Compton sont les deux mécanismes principaux intervenant dans les processus de radiothérapie.

5.1.1.1.3 Production de paire électron-positon

Si le photon incident possède une énergie supérieure à 1,022 MeV alors son interaction avec le noyau de l'atome peut mener à la formation d'une paire électron-positon. Après avoir parcouru une courte distance, le positon rencontre un électron provoquant leur annihilation et l'émission de 2 photons γ d'énergie 511 keV. La section efficace de la production de paires évolue proportionnellement à Z/E [174]. Le bilan de la production de paires est présenté en Figure 71.

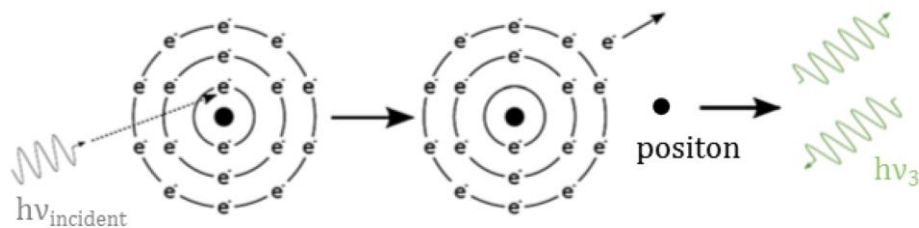


Figure 71. Schéma illustrant l'effet de production de pair électron –positon. Figure adaptée de Butterworth et al. [76].

5.1.1.1.4 Résumé des interactions physiques

Il est important de noter que le dépôt de dose des rayons X n'est pas lié aux photons eux-mêmes mais aux électrons secondaires (photoélectrons et électrons Auger) produits par l'interaction de ces rayons avec la matière. Ces électrons sont principalement produits par effet photo-électrique et effet Compton dans le cadre de la radiothérapie. La Figure 72 illustre la dominance des différents effets en fonction de l'énergie du photon incident et du numéro atomique Z des atomes rencontrés.

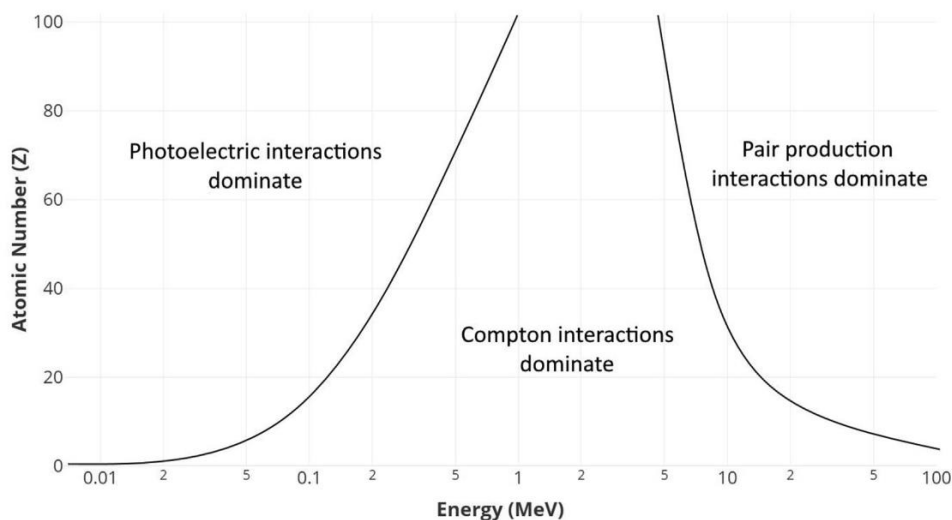


Figure 72. Influence de numéro atomique Z et de l'énergie du photon incident sur le type d'interaction [174].

5.1.1.2 Phase chimique

Au cours de son parcours dans la matière, le rayonnement incident peut interagir avec différentes espèces moléculaires. La principale est l'eau, qui constitue la majeure partie de la cellule. L'ionisation d'une molécule d'eau entraîne la formation d'espèces radicalaires, hautement réactives. La réaction de ces espèces radicalaires avec des molécules d'intérêt, comme l'ADN, conduit à des dommages moléculaires (notamment des ruptures de

liaisons chimiques) : on appelle ce type d'interactions des dégâts indirects. Au contraire, si le rayonnement incident réagit directement avec une molécule d'intérêt comme l'ADN, l'ionisation induite et les ruptures de liaison chimiques consécutives sont appelés dégâts directs. Il est estimé pour un faisceau de rayons X d'énergie thérapeutique que les dommages indirects comptent pour près de 60% [104]. Après réaction du rayonnement ionisant avec le milieu, l'ionisation des molécules d'eau (appelée radiolyse de l'eau) produit des radicaux libres. Les radicaux libres initiaux sont $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{H}$ et e^-_{aq} . Ces radicaux peuvent réagir entre eux par réactions d'oxydo-réduction pour créer des espèces moléculaires plus stables comme H_2O_2 et H_2 , ou bien réagir dans le milieu avec d'autres molécules. En présence de O_2 , la réaction de ces radicaux libres mène à la création du radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ et du radical superoxyde protoné HO_2^{\cdot} . On obtient donc au final la création des principales espèces réactives de l'oxygène (« reactive oxygen species » ou ROS) : $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 . C'est l'action de ces espèces réactives qui entraîne des dommages aux niveaux de l'ADN menant à la mort de la cellule cible.

5.1.1.3 Phase biologique

La phase biologique prend place dans les suites de la phase chimique. Les dommages ADN produits par les réactions précédentes sont de diverses natures. On estime que pour 1 Gy d'énergie absorbé, plus de 1000 lésions simples brins sont produites ainsi que 40 lésions doubles brins [176]. La machinerie de réparation de l'ADN tente alors de détecter, reconnaître et de prendre en charge ces lésions jusqu'à leur réparation. De la qualité de cette réparation dépendra la survie cellulaire. Les cassures doubles brins sont considérées comme étant les plus létales. Les effets cellulaires et tissulaires survenant dans les suites dépendront de la survie ou non des cellules, du type de dommages et du type de tissus. Une mortalité importante et rapide entraînera des effets tissulaires précoces : c'est notamment l'objectif pour le traitement d'une tumeur, mais également le cas pour les effets secondaires aigus. Une mortalité cellulaire retardée peut être à l'origine d'effets secondaires tardifs et chroniques. Une accumulation de lésions peut entraîner l'apparition de cancers radio-induits des années après le traitement, et la transmission de ces lésions en cas d'irradiation gonadique peut avoir des conséquences sur les générations futures. Ainsi, dans l'objectif d'obtenir une mortalité tumorale plus importante que la mortalité cellulaire des tissus sains adjacents, la radiothérapie se base sur le postulat de systèmes de réparation de l'ADN moins performants dans les tissus tumoraux [176].

La radiothérapie est donc un traitement complexe faisant intervenir de multiples domaines scientifiques. Le bilan du procédé est présenté en Figure 73.

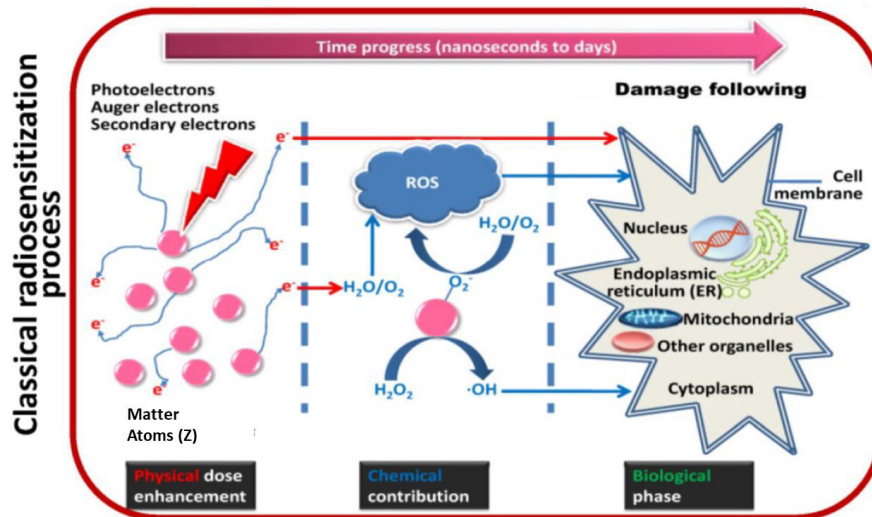


Figure 73. Bilan des différentes phases : Physique/Chimique/Biologique qui interviennent lors de la radiothérapie. Figure adaptée de Liu et al. [109].

Il faut aussi noter que depuis plusieurs années, la recherche se penche sur l'impact de la radiothérapie sur la réponse immunitaire contre le cancer. Ainsi, plusieurs études semblent indiquer que sous certaines conditions la radiothérapie peut générer une réponse immunitaire anti-tumorale ouvrant la voie à une possible « vaccination » contre le cancer [177].

5.1.2 Effet radiosensibilisant : Usage de nanoparticules à Z élevé

Dans cette partie, nous allons évoquer le principe de l'utilisation des nanoparticules à numéro atomique (Z) élevé afin d'augmenter le dépôt de dose dans les tissus tumoraux. Il est important de noter que le mode d'action est complexe car dépendant d'un très grand nombre de facteurs, et est toujours sujet à débat [76]. L'objectif de l'utilisation de nanoparticules à Z élevé en radiothérapie est de permettre une amélioration du ratio thérapeutique, à savoir dans ce cas une augmentation de la dose délivrée à la tumeur suite à une irradiation sans induire de toxicité supplémentaire sur les tissus sains adjacents. Les nanoparticules de Z élevés proposent d'agir au niveau de la phase physique de l'interaction rayonnement – matière. Leur haute densité électronique permet une augmentation de la probabilité d'interaction avec le rayonnement incident par rapport aux tissus normaux adjacents. La dose délivrée dans l'environnement direct de la nanoparticule est donc largement augmentée comme l'illustre la simulation présentée en Figure 74.

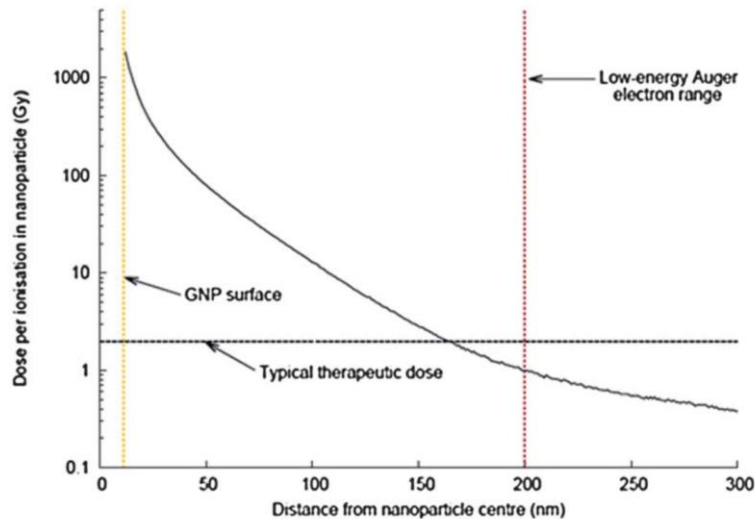


Figure 74. Simulation de la dose déposée autour d'une nanoparticule après un événement ionisant. Figure issue de Butterworth et al. [76].

En utilisant les propriétés de biodistribution des nanoparticules, une accumulation tumorale préférentielle est espérée grâce à l'effet EPR permettant donc une interaction entre nanoparticules et rayonnement au sein de la tumeur et donc une augmentation de dose localement.

Le postulat physique sous-jacent stipule que l'introduction d'un matériau de haut numéro atomique dans un tissu augmente le dépôt de dose local d'un rayonnement ionisant. La probabilité d'interaction d'un photon avec le milieu dépend en effet de deux facteurs principaux : l'énergie du photon incident et le numéro atomique des atomes rencontrés. L'introduction de nanoparticules de Z élevé induit donc théoriquement une augmentation de la probabilité d'interaction des photons incidents dans le milieu via les mécanismes photoélectrique et effet Compton. Il en résulte alors une production d'électrons secondaires (photo-électrons, électrons Auger), de radicaux libres, d'espèces réactives de l'oxygène et de dégâts biologiques responsables d'effets cytotoxiques au niveau local. Pour exemple, le numéro atomique moyen des tissus humains étant de 7.4, le rapport des probabilités d'interaction d'un photon incident via l'effet photoélectrique entre un atome d'or ($Z=79$) et cet hypothétique « atome moyen humain » est de 1217, donc largement en faveur de l'atome d'or [178]. Il est ainsi estimé qu'un ratio d'absorption de l'énergie de près de 160 peut être obtenu pour une énergie proche de 0.1 MeV entre deux tissus théoriques, l'un composé d'atomes d'or, l'autre d'atomes de Z moyen 7.4 (Figure 75). La zone d'énergie la plus favorable est par ailleurs celle à laquelle se produit préférentiellement l'effet photoélectrique. Cette observation est à la base de la recherche actuelle sur le potentiel radiosensibilisant des nanoparticules [179].

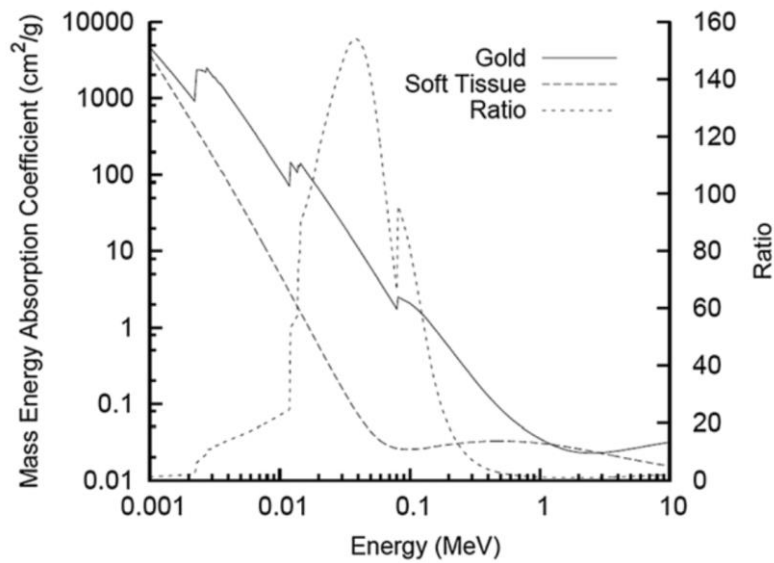


Figure 75. Coefficient d'absorption massique entre les tissus mous et l'or selon l'énergie d'un faisceau de photon X incident. Figure issue de Hubbell et al. [178].

Il est important de noter que l'effet thérapeutique d'AGuIX[®] est directement relié à l'augmentation de dose grâce à l'interaction des rayons X avec le gadolinium qui est un élément avec un numéro atomique élevé ($Z = 64$) comme détaillé dans cette partie.

De plus, la nature de l'élément interagissant avec le rayonnement ionisant est un paramètre majeur dans l'augmentation de la dose locale. Si l'or est l'élément le plus étudié dans la littérature, il existe d'autres éléments avec un numéro atomique élevé. La Figure 76 présente ainsi l'évolution de l'augmentation relative de la dose libéré dépendant de l'énergie incidente et du numéro atomique rencontré.

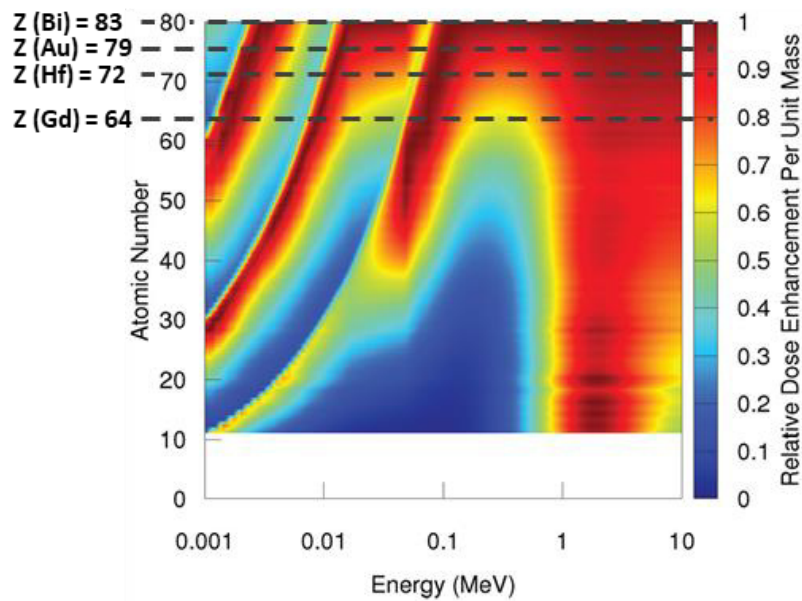


Figure 76. Augmentation relative de la dose d'irradiation délivrée par unité de masse en fonction de l'énergie incidente et du numéro atomique Z . Les éléments lourds augmentent de façon significative la dose relative et cela même pour des faibles énergies. Figure adaptée de McMahon et al [105].

Il ressort ainsi, que de manière générale plus Z est grand plus l'augmentation relative de la dose est importante. Le bismuth ($Z = 83$) semble donc être un élément particulièrement intéressant dans le cadre de la radiosensibilisation. En effet, il est l'élément le plus lourd du tableau périodique avant de rencontrer des problèmes d'instabilité nucléaire.

Ce constat est à la base du projet mené en collaboration avec Harvard Medical School visant à améliorer les propriétés radiosensibilisantes de la nanoparticule AGuIX[®] en remplaçant le gadolinium chélaté à la surface de la nanoparticule par du bismuth qui présente les meilleures caractéristiques d'amplification de dose de la radiothérapie.

5.2 AGuIX(Bi) : Un procédé ajustable pour une nanoparticule spécifique

Lors de ce projet, l'augmentation de l'effet radiosensibilisant d'AGuIX[®] est le principal point d'intérêt. Cependant, la propriété d'agent de contraste IRM doit être préservée impliquant la présence de gadolinium complexé. Il a été décidé de synthétiser des particules AGuIX[®] présentant différents ratio Gd/Bi afin d'évaluer quel ratio serait le plus à même de fournir un fort effet radiosensibilisant via l'ajout de bismuth tout en gardant les propriétés d'imagerie via la conservation d'une quantité suffisante de gadolinium. Trois différents ratio Gd/Bi ont donc été testés : 70/30, 50/50, 30/70.

5.2.1 Relargage de gadolinium et complexation du bismuth

5.2.1.1 Étape 1 : Relargage du gadolinium et suivi du relargage

Afin d'obtenir les 3 produits désirés, nous avons décidé de pousser le processus de décomplexation du gadolinium assisté par protonation (Section 4.2.1.2) au-delà de 70% de libération de gadolinium (soit 70% de DOTAGA libres). Un tel taux de libération offre alors la possibilité de complexer à façon le bismuth et le gadolinium nécessaire à l'obtention des 3 ratios Gd/Bi : 70/30, 50/50, 30/70. AGuIX[®] est donc laissé dans des conditions de décomplexation ($[HCl]_{initial} = 1 \text{ M}$ (pH = 0) / $T = 50^\circ\text{C}$) le temps suffisant pour atteindre plus de 70% de gadolinium libéré. De la même façon que lors de l'obtention du produit CuPRiX, le processus est suivi par HPLC-ICP/MS. Un échantillon du mélange a été extrait toutes les heures afin de suivre la libération de gadolinium. De plus, ces échantillons sont comparés à une référence de gadolinium libre censée représenter un relargage total du gadolinium complexé. Les chromatogrammes issus du suivi de relargage du gadolinium par HPLC-ICP/MS sont présentés en Figure 77 et leurs intégrations respectives en Tableau 20.

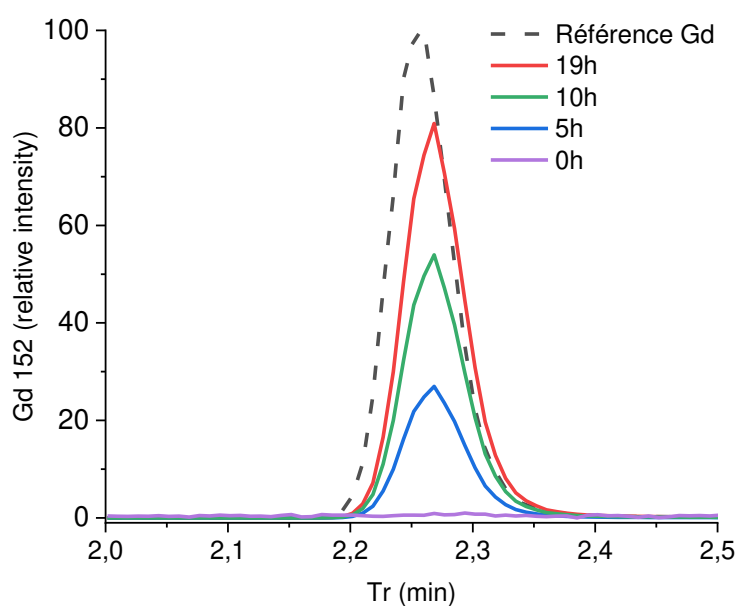


Figure 77. Résultats HPLC-ICP/MS du suivi du relargage du gadolinium lors de la réaction de dissociation ($[HCl] = 1M$, $T = 50^\circ\text{C}$). Le Gd^{3+} libre présente un temps de rétention $Tr = 2,27 \text{ min}$. Le gadolinium est libéré au fur à mesure de la réaction. Le signal de référence (pointillés) représente le cas idéal d'une libération totale du gadolinium contenu dans l'échantillon d'AGuIX[®]. Pour un temps de réaction = 19h (rouge) plus de 70% du gadolinium total a été relargué dans le milieu.

Tableau 20. Mesure de l'aire du pic de Gd libre ($A_{\text{mesurée}}$) durant l'étape 1 de relargage du Gd. Mesure du ratio par rapport à l'aire du pic de référence (A_{ref}) indiquant un relargage de la totalité du Gd complexé par AGuIX® afin d'évaluer le taux de relargage de Gd au cours de la réaction.

| Intégration | 0h | 5h | 10h | 19h | Ref |
|---------------------------------------|-------|--------|--------|--------|------|
| $A_{\text{mesurée}}$ | 0,19 | 1,65 | 3,30 | 4,95 | 6,31 |
| $A_{\text{mesurée}} / A_{\text{ref}}$ | 2.9 % | 26,1 % | 52,3 % | 78,4 % | 100% |

Ainsi, après 19 h de réaction 78,4% de gadolinium ont été libérés (Tableau 20). Afin d'éviter la recomplexation du gadolinium relargué, nous procédons à une purification à l'aide du système d'ultrafiltration Vivaflow 200 (membrane PES, seuil de poids moléculaire = 5 kDa, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Allemagne). Après purification, la quantité de DOTAGA libres à la surface des particules a été mesurée par titration au cuivre comme mis en place précédemment pour la caractérisation des produits CuPRiX (voir Section 4.2.2.3). Les résultats de cette titration sont présentés en Figure 78.

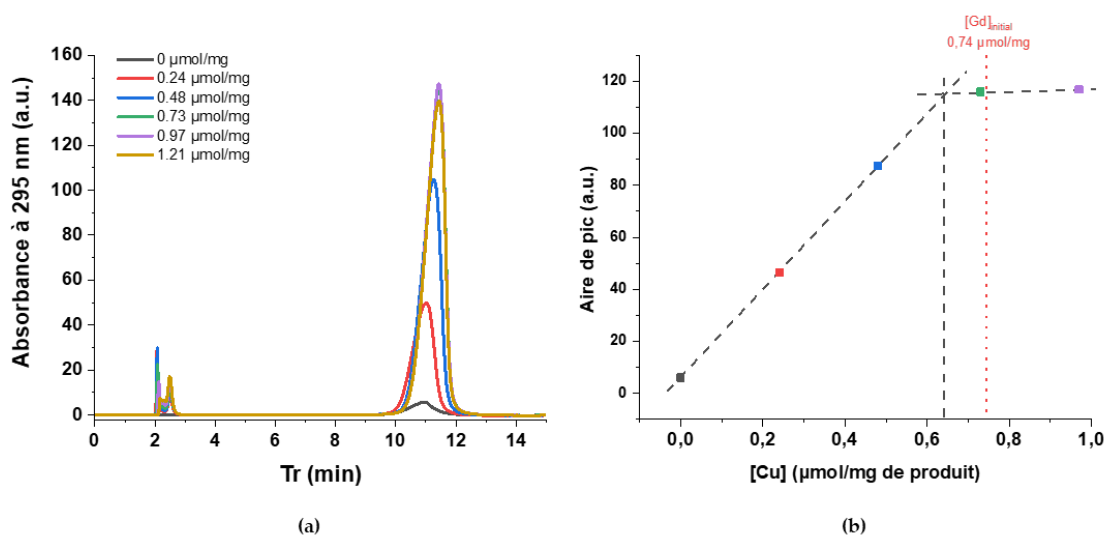


Figure 78. Titration des DOTAGA libres du produit après relargage du gadolinium et purification. (a) HPLC-UV de différents ratios de Cu^{2+} par masse de produit. (b) Mesure de l'aire sous la courbe entre 0 et 15 min. Augmentation de l'absorbance jusqu'à atteindre le plateau de saturation où tous les DOTAGA libres ont été complexés par les Cu^{2+} ajoutés. La quantité de DOTAGA libres sur l'échantillon est de 0,64 μmol de DOTAGA libres par mg de produit. En rouge est indiquée la quantité initiale de gadolinium contenue dans AGuIX® soit la valeur attendue dans le cas d'un relargage total.

La quantité de DOTAGA libres après purification est de $0,64 \mu\text{mol}$ de DOTAGA par mg de produit. Or, la concentration initiale en gadolinium dans l'AGuIX[®] de départ est de $0,74 \mu\text{mol}$ par mg de produit. Le rapport $0,64/0,74$ indique donc un taux de DOTAGA libre de 86%. Cette valeur de DOTAGA libre supérieure à la valeur de 78,4% initialement déterminée par HPLC-ICP/MS peut s'expliquer par le fait que la réaction a pu continuer lors de l'étape de purification. En effet, il est difficile de stopper à un niveau précis de relargage et de le conserver tout au long de la purification, les risques soit de recomplexation soit de relargage sont présents. C'est pour cette raison que l'on s'assure du taux de DOTAGA en fin de réaction avant le démarrage de l'étape de complexation. Le taux de relargage est toujours suffisant pour obtenir les 3 ratio Gd/Bi désirés. Un bilan schématique de cette première étape est visible en Figure 79.

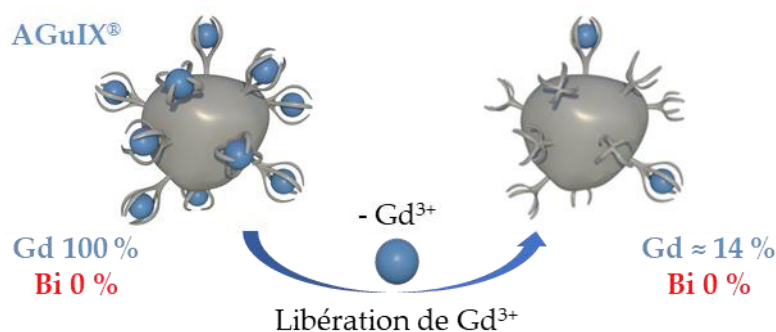


Figure 79. Schéma bilan de l'étape 1 de relargage du gadolinium. On obtient en fin d'étape un produit ne contenant plus que 14% de sa quantité initiale de gadolinium.

5.2.1.2 Etape 2 : Complexation de bismuth par étape et suivi

Grâce aux DOTAGA générés lors de la première étape, nous sommes maintenant capables de complexer à façon les particules obtenues. De plus, Le DOTAGA(Bi) présente une forte constante de stabilité avec $\log \beta = 30,3$ [180]. La difficulté de cette étape réside dans la formation d'hydroxyde de bismuth et ce même pour des valeurs faibles de pH ou de faible concentration ($pK_s \sim 30$ pour $\text{Bi}(\text{OH})_3$) [181,182]. Afin de répondre à cette problématique et pour obtenir les produits désirés, l'étape de complexation du bismuth se déroulera en 3 étapes successives. Dans un premier temps 30% de la quantité totale de DOTAGA seront ajoutés pour atteindre le seuil du premier produit ($n\text{Gd}\%/n\text{Bi}\% : 70\%/30$). Puis l'équivalent de 20% de la quantité totale de DOTAGA seront ajoutés pour atteindre 50% de DOTAGA complexé par du bismuth. Finalement, 20% seront une fois de plus ajoutés pour obtenir 70% de DOTAGA complexés par du bismuth. Un schéma récapitulatif de cette étape de complexation est présenté en Figure 80.

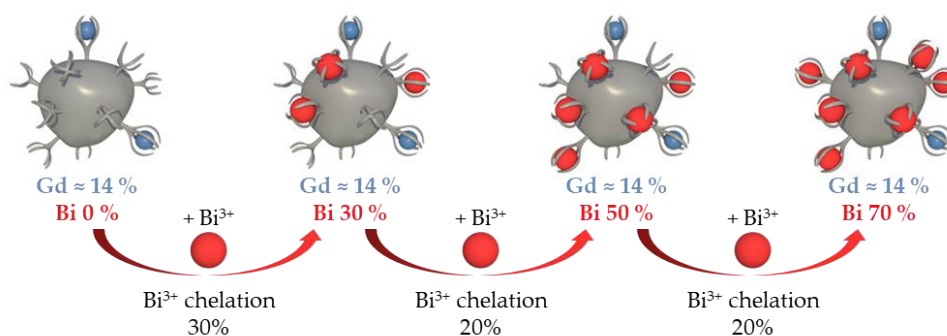


Figure 80. Schéma bilan de l'étape 2 de complexation du bismuth. Celle-ci est divisée en trois étapes permettant l'obtention successive des niveaux de bismuth désirés.

Lors des différentes étapes de complexation du bismuth, la quantité nécessaire de BiCl_3 solide est ajoutée au mélange. Après ajout du chlorure, la solution se trouble en raison de la formation de $\text{Bi}(\text{OH})_3$. Le pH est alors mesuré et ajusté autour de 6-7 avec une solution de NaOH 1M. Dans cette zone de pH on s'assure la présence d'une majorité de DOTAGA déprotonés capables de complexer [90] la faible quantité de bismuth en solution en équilibre avec le $\text{Bi}(\text{OH})_3$ précipité. La complexation du bismuth en solution tirera l'équilibre des hydroxydes vers leurs dissolutions rendant la solution de plus en plus transparente. De plus, à chaque étape de la complexation, le DOTAGA libre est en excès par rapport à la quantité de bismuth ajoutée limitant la possibilité d'accumulation d'hydroxyde de bismuth. Pour accélérer le processus, le mélange est placé à 80°C sous agitation pendant 48 h. Le pH est ajusté toutes les 12 h. Les photos de la première étape de complexation sont visibles en Figure 81.

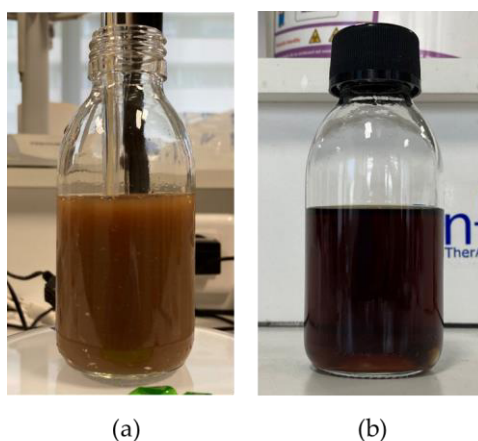


Figure 81. (a) Photo de mélange après ajout de BiCl_3 , le mélange est trouble dû à la formation de précipités $\text{Bi}(\text{OH})_3$. (b) Photo du même mélange après étape de complexation à pH 7 et $T=80^\circ\text{C}$ pendant 48h.

L'obtention d'une solution limpide ainsi que la stabilisation du pH entre deux réajustements sont les signes d'une complexation totale. Après, chaque complexation on prélève un échantillon du mélange et une

quantification du nombre de DOTAGA restant est effectuée. Les résultats des titrations sont présentés en Figure 82 et les bilans de chaque étape sont reportés dans un Tableau 21.

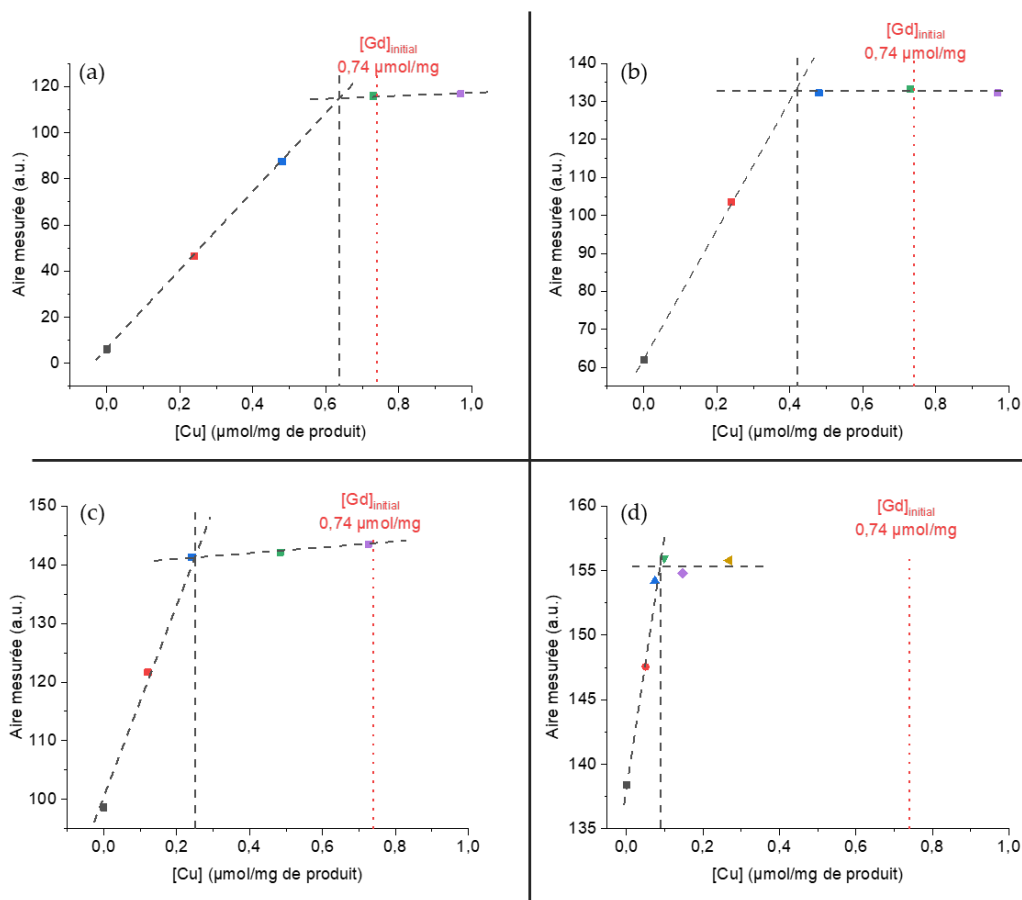


Figure 82. Résultats des titrations de DOTAGA libres effectuées après chaque complexation. (a) Avant de commencer la complexation. (b) Après ajout de 30% de BiCl₃ (Etape 1). (c) Après ajout le premier ajout 20% de BiCl₃ (Etape 2). (d) Après le second ajout de 20% de BiCl₃ (Etape 3). Le taux initial de gadolinium du produit AGuIX® est indiqué en rouge.

Tableau 21. Résultat des titrations de DOTAGA libres après chaque de complexation du bismuth lors de l'étape 2

| Etape de Complexation | 0 | 1 | 2 | 3 |
|--|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| | 14% Gd 0% Bi | 14% Gd 30% Bi | 14% Gd 50% Bi | 14% Gd 70% Bi |
| $[\text{DOTAGA}]_{\text{libre}}$ mesuré ($\mu\text{mol/mg}$) | 0,64 | 0,42 | 0,25 | 0,09 |
| $\text{DOTAGA}_{\text{libre}}$ théorique (%) | 86% | 56% | 36% | 16% |
| $\text{DOTAGA}_{\text{libre}}$ mesuré (%) | 86% | 57% | 34% | 12% |

La mesure de la quantité de DOTAGA libre après chaque étape de complexation permet de confirmer le bon déroulement de celle-ci. Pour toutes les étapes de complexation, le taux de DOTAGA libre mesuré est très proche du taux de DOTAGA libre théorique attendu (Tableau 21). Il est intéressant de noter que la formation du complexe DOTAGA(Bi) entraîne une forte augmentation de l'absorbance à 295 nm [183]. Cette augmentation d'absorbance à travers la formation de DOTAGA(Bi) est notamment visible sur les chromatogrammes HPLC-UV effectués entre chaque étape de complexation du bismuth comme on peut l'observer en Figure 83.

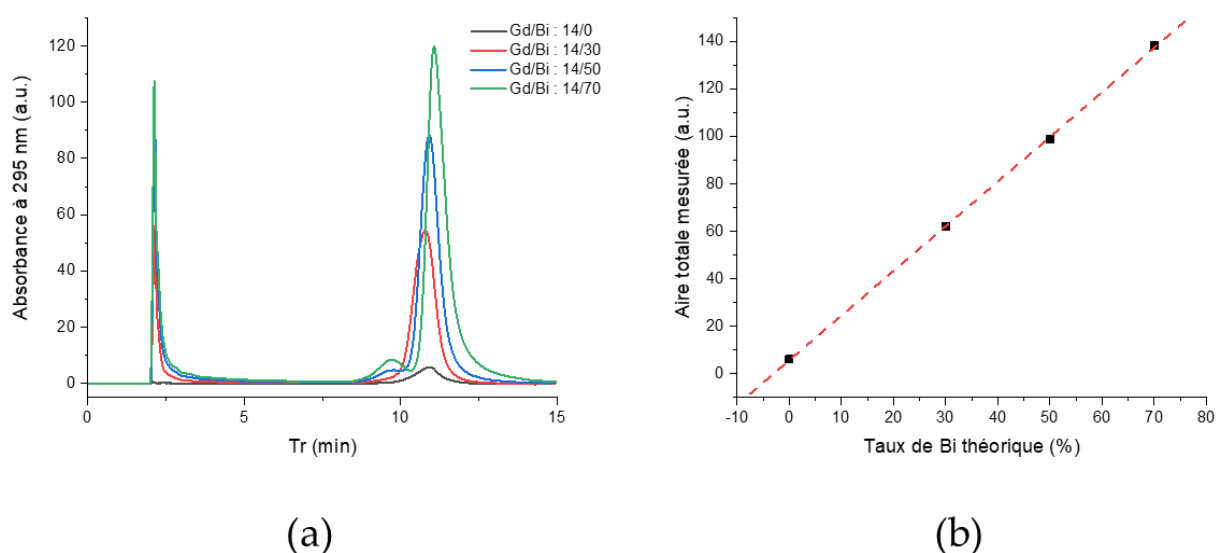


Figure 83. (a) Chromatogrammes HPLC-UV à 295 nm des différents produits après chaque étape de complexation par le bismuth (10 g/L, 10 μl). (b) Aire sous la courbe mesurée en fonction du taux de bismuth théorique.

L'augmentation linéaire de l'absorbance après chaque étape de complexation (Figure 83.b) est aussi un marqueur du bon déroulement de cette étape. Une complexation incomplète aurait entraîné une absorbance (ou aire totale mesurée) inférieure.

En plus de la modification de l'absorbance, l'obtention de DOTAGA(Bi) modifie aussi la charge de surface de la particule. C'est pour cela que le potentiel zêta de chaque produit intermédiaire a été mesuré. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 22.

Tableau 22. Evolution du pH à l'IEP après chaque étape de complexation du bismuth lors de l'étape 2

| Étape de Complexation | AGuIX® | 0 | 1 | 2 | 3 |
|-----------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| | 100% Gd 0% Bi | 14% Gd 0% Bi | 14% Gd 30% Bi | 14% Gd 50% Bi | 14% Gd 70% Bi |
| pH IEP | 7,15 | 5,58 | 6,63 | - | 6,95 |

A travers l'évolution de l'IEP, on remarque tout d'abord, comme observé lors de la synthèse de CuPRiX (Section 4.2.2.5), que la décomplexation du gadolinium est liée à une diminution de l'IEP. Le DOTAGA(Gd) conserve sa charge -1 car il est cinétiquement stable, en revanche pour être chargé -1 le groupement DOTAGA libre aura besoin d'être protoné 3 fois (voir Figure 58) nécessitant donc un pH plus acide. Plus il y a de DOTAGA libres plus le pH de l'IEP est acide. De la même manière la formation de DOTAGA(Bi) après chaque étape fait augmenter le pH de l'IEP.

5.2.1.3 Etape 3 : Complexation des DOTAGA libres restant par le gadolinium

Finalement, les DOTAGA libres restant sont complexés avec du gadolinium pour obtenir les 3 produits contenant les ratios molaires Gd/Bi voulus : 30/70, 50/50, 30/70. La complexation du gadolinium est effectuée dans les mêmes conditions que la complexation du bismuth. Un schéma récapitulatif de cette étape est présenté en Figure 84.

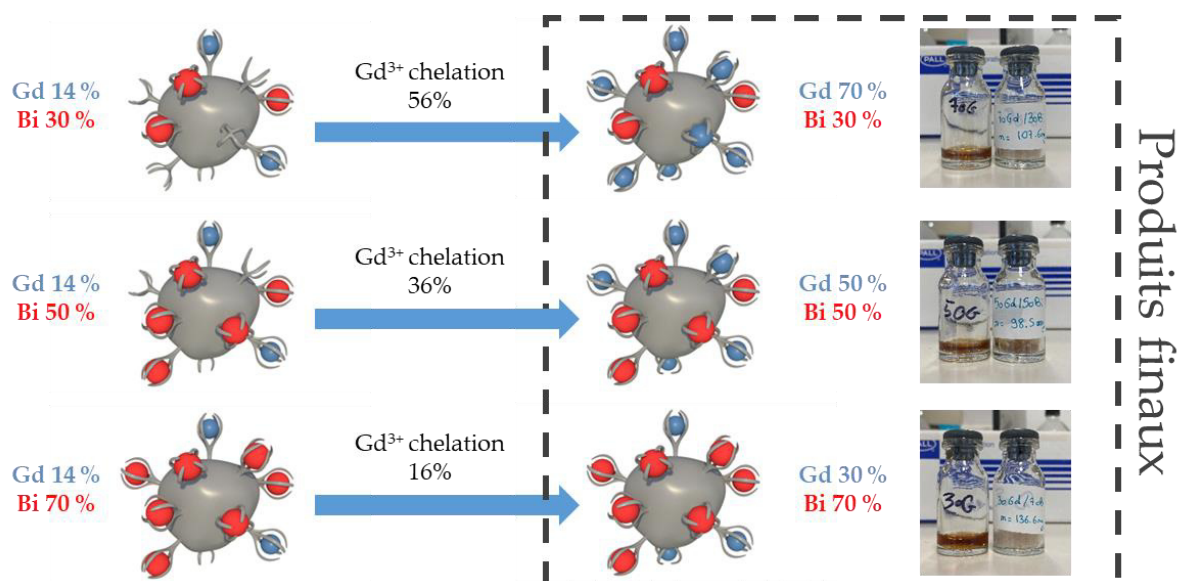


Figure 84. . Schéma bilan de l'étape 3 de complexation du gadolinium. Celle-ci est divisé en trois étapes permettant l'obtention successive des niveaux de bismuth désirés.

Une fois la complexation du gadolinium effectuée, les différentes solutions sont filtrées à l'aide du système d'ultrafiltration Vivaflow 200 (membrane PES, seuil de poids moléculaire = 5 kDa, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Allemagne) afin d'éliminer les possibles ions Gd^{3+} , Bi^{3+} encore en solution. Les solutions sont stérilisées par filtration à $0.2 \mu m$ et le pH est ensuite ajusté à 7,4. Les particules sont ensuite lyophilisées pour une meilleure conservation.

5.2.2 Caractérisation des produits finaux

5.2.2.1 Pureté HPLC-UV

De la même manière que pour AGuIX[®] et CuPRiX, la pureté de chaque produit est mesurée par HPLC. Les résultats des injections de produit AGuIX[®] et des trois produits 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi, 30Gd/70Bi sont présentés en Figure 85.

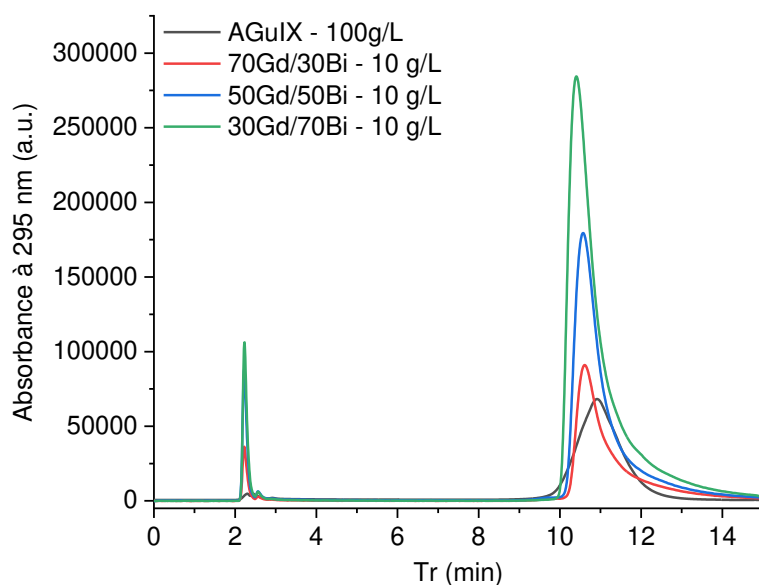


Figure 85. Chromatogrammes HPLC-UV à 295 nm des différents produits finaux 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi (10 μ l, 10 g/L) et d'AGuIX® (10 μ L, 100 g/L).

La pureté mesurée pour chaque produit est supérieure à 91%. On remarque ici encore la différence d'absorbance à 295 nm des produits finaux comparés à l'absorbance d'AGuIX®. Les trois produits Gd/Bi sont injectés à 10 g/L dans l'HPLC alors que l'échantillon d'AGuIX® est injecté à 100 g/L. Malgré un facteur de dilution de 10, l'absorbance totale mesurée est supérieure pour les particules Gd/Bi.

5.2.2.2 Taille : DLS

Les distributions volumiques renvoyées par la mesure de DLS pour les différents produits Gd/Bi sont présentées en Figure 86. Les diamètres hydrodynamiques issus des distributions d'AGuIX®, de 70Gd/30Bi, de 50Gd/50Bi et de 30Gd/70Bi sont respectivement de $4,6 \pm 1,6$ nm, $4,5 \pm 1,6$ nm, $5,1 \pm 1,9$ nm et $4,8 \pm 2,0$ nm. Les produits Gd/Bi présentent un diamètre hydrodynamique du même ordre qu'AGuIX®. Il est important de noter que les nanoparticules Gd/Bi présentent un diamètre hydrodynamique inférieur au seuil de filtration glomérulaire (≈ 6 nm) [16].

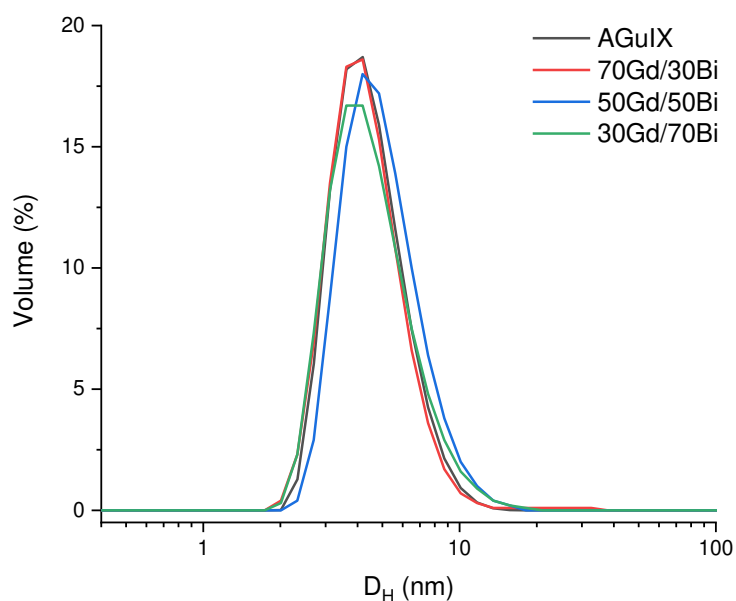


Figure 86. Distribution volumique du diamètre hydrodynamique (D_H) des produits : AGuIX[®] (noir), 70Gd/30Bi (rouge), 50Gd/50Bi (bleu) et 30Gd/70Bi (vert).

5.2.2.3 HPLC-SEC-ICP/MS

Afin d'obtenir une première approximation du ratio interne Gd/Bi au sein des 3 produits synthétisés nous avons adapté la méthode HPLC-SEC-ICP/MS initialement développée pour l'analyse de la dégradation d'AGuIX[®] (voir Section 3.3.2). Ainsi, en plus de suivre le signal Gd et Si des particules, nous avons ajouté le signal Bi à l'analyse. Les chromatogrammes obtenus après injection des produits 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi sont présentés en Figure 87.a. De plus, l'analyse des ratios élémentaire (Gd, Bi) entre chaque produit, présenté en Figure 87.b. et en Tableau 23, nous permet d'estimer les ratios Gd/Bi au sein de chaque produit.

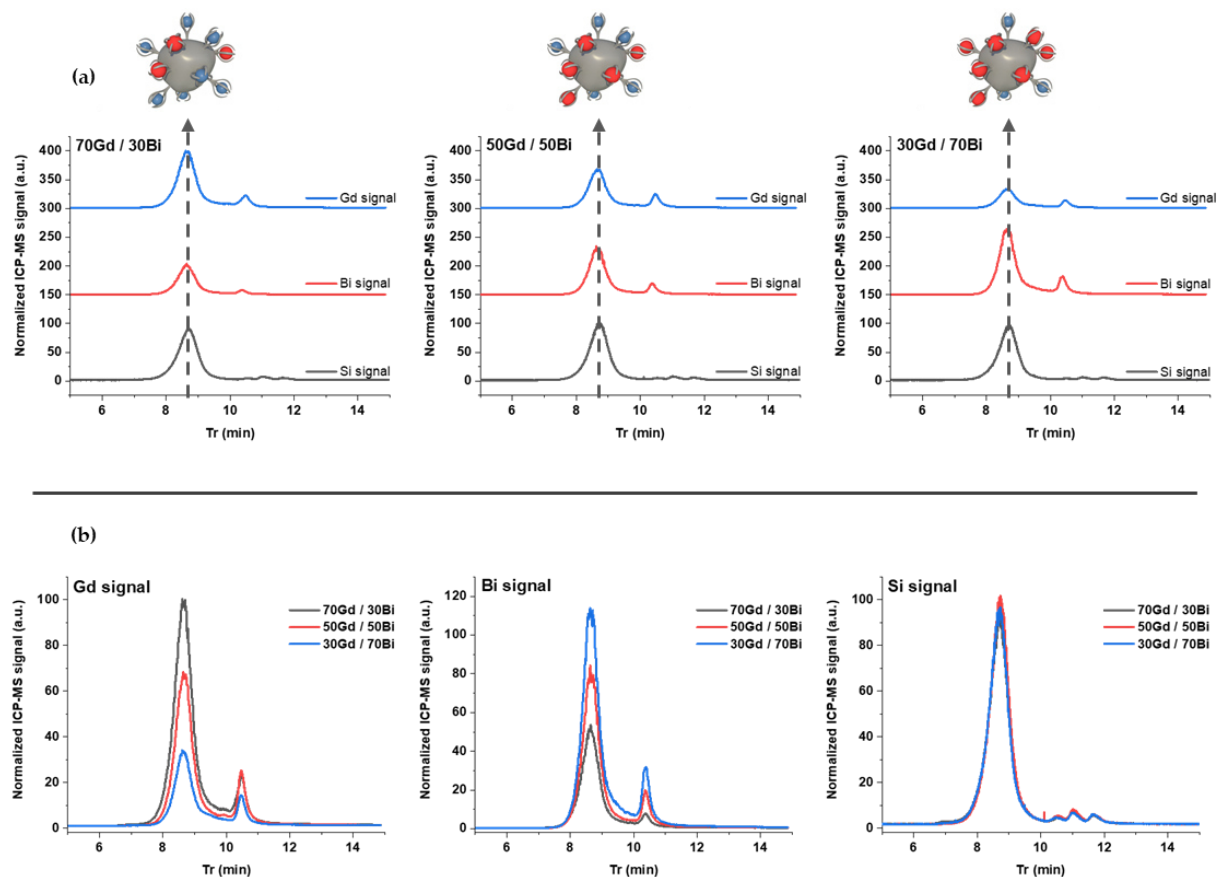


Figure 87. (a) Chromatogrammes HPLC-SEC-ICP/MS des 3 différents produits finaux : 30Gd/70Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi. Acquisition des signaux en Gd (bleu), Bi (rouge) et Si (noir). (b) Superposition des signaux normalisés Gd (gauche), Bi (milieu) et Si (droite) des 3 produits.

Les chromatogrammes HPLC-SEC-ICP/MS mettent en évidence la co-localisation des éléments Gd, Bi et Si à un temps de rétention $Tr = 8,8$ min. Ce temps de rétention est très proche du temps de rétention observé pour AGuIX[®] dans la Section 3.3.2 avec un temps de rétention de 8,85 min. De plus, on observe bien les tendances attendues au niveau de l'intensité des signaux Gd et Bi pour les différents produits. Ceci est en accord avec les attentes et avec les conclusions apportées par l'analyse de l'absorbance à 295 nm. Comme attendu, l'intensité du signal de Si est identique pour les 3 produits marquant une forte ressemblance au niveau du cœur des particules.

Il est intéressant de noter que, comme lors de l'analyse de la fragmentation d'AGuIX[®], on retrouve un seul fragment pour les éléments Gd et Bi. Ces fragments sont superposés avec le premier pic de fragment visible en Si avec un temps de rétention de 10,3 min. On retrouve donc ici la signature des produits APTES-DOTAGA(Gd) et APTES-DOTAGA(Bi). De plus, comme lors de l'analyse d'AGuIX[®], le signal en Si renvoie 3 pics de fragments respectivement APTES-DOTAGA(Gd/Bi), APTES et TEOS (voir Section 3.3.2).

Tableau 23. Mesures des aires Gd, Bi et Si des différents produits 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi et évaluation de ratio Gd / Bi.

| Produit | Aire Gd | Aire Bi | Aire Si | Gd % / Bi % mesuré |
|------------------|----------------|----------------|----------------|-------------------------------|
| 70% Gd 30% Bi | 100 | 46,5 | 95,4 | 68,3 / 31,7 |
| 50% Gd 50% Bi | 71,6 | 69,9 | 100 | 50,7 / 49,3 |
| 30% Gd 70% Bi | 42,0 | 100 | 96,4 | 29,6 / 70,4 |

D'après l'analyse des aires présentées dans le Tableau 23 on retrouve un ratio Gd/Bi extrêmement proche du ratio théorique souhaité pour les 3 différents produits. Ces résultats sont confirmés par l'analyse élémentaire indépendante dont les résultats sont évoqués dans la partie suivante.

5.2.2.4 Analyse élémentaire

La teneur massique en Gd et Bi du produit initial AGuIX[®] et des produits de synthèse 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi a été déterminée par ICP/AES. Les mesures ont été effectuées par le laboratoire CREALINS de l'Institut des Sciences Analytiques (ISA, Lyon, France). Les résultats sont indiqués ci-dessous dans le Tableau 24.

Tableau 24. Résultats des analyses élémentaires ICP/AES, calcul des ratios Gd % / Bi % associés et évaluation de la quantité de totale de [Gd] + [Bi] par mg de produit

| Produit | Gd (w%) | Bi (w%) | Gd % / Bi % | [Gd] + [Bi] (μmol/mg) |
|--------------------|----------------|----------------|--------------------|---|
| AGuIX [®] | 11,7 | - | 100 % / 0 % | 744 |
| 70% Gd 30% Bi | 7,54 | 4,24 | 70,3 % / 29,7 % | 682 |
| 50% Gd 50% Bi | 5,38 | 6,84 | 48,8 % / 51,2 % | 669 |
| 30% Gd 70% Bi | 3,16 | 9,97 | 29,6 % / 70,4 % | 678 |

La mesure de la teneur massique en Gd et Bi permet de remonter au ratio molaire exact de ces 2 éléments pour chaque produit. Ainsi, le produit 70Gd/30Bi présente un ratio réel mesuré de 70,3% Gd et 29,7% Bi, le produit 50Gd/50Bi présente un ratio réel mesuré de 48,8% Gd et 51,2% Bi et le produit 30Gd/70Bi présente un

ratio réel mesuré de 29,6% Gd et 70,4% Bi. Ces ratios correspondent précisément aux ratios attendus. De plus, il est intéressant de mesurer la quantité molaire totale en Gd et Bi (colonne [Gd] + [Bi] du Tableau 24). En effet, cette quantité est directement équivalente au nombre de DOTAGA contenus dans chaque produit. Elle est donc un indicateur important de l'impact de la synthèse sur les particules. Dans un cas idéal, la quantité totale de DOTAGA dans les produits finaux est égale à la quantité totale de DOTAGA dans le produit initial AGuIX®. Plus précisément, la quantité de DOTAGA par masse de produit « brut » c'est-à-dire en retirant la masse des ions complexés doit rester constante. Cette valeur est ici définie comme $[DOTAGA]_{brut}$ et est calculée de la façon suivante :

$$[DOTAGA]_{brut} = \frac{Gd\%/M(Gd) + Bi\%/M(Bi)}{100 - Gd\% - Bi\%}$$

- $Gd/Bi\%$ le pourcentage massique en Gd ou Bi déterminé par ICP-AES
- $M(Gd/Bi)$ la masse molaire de Gd et Bi

Les quantités de DOTAGA brute des produits AGuIX®, 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi, 30Gd/70Bi sont respectivement égales à 843 $\mu\text{mol/mg}$, 773 $\mu\text{mol/mg}$, 763 $\mu\text{mol/mg}$ et 781 $\mu\text{mol/mg}$. On remarque ainsi que la quantité de DOTAGA brute dans les produits synthétisés est très proche de celle d'AGuIX® avec une diminution maximale de 9,5% pour le produit 50Gd/50Bi. Cela indique une bonne résistance des particules au procédé de synthèse.

5.2.2.5 Potentiel Zêta

L'évolution du potentiel zêta des particules en fonction du pH a été mesurée. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 88.

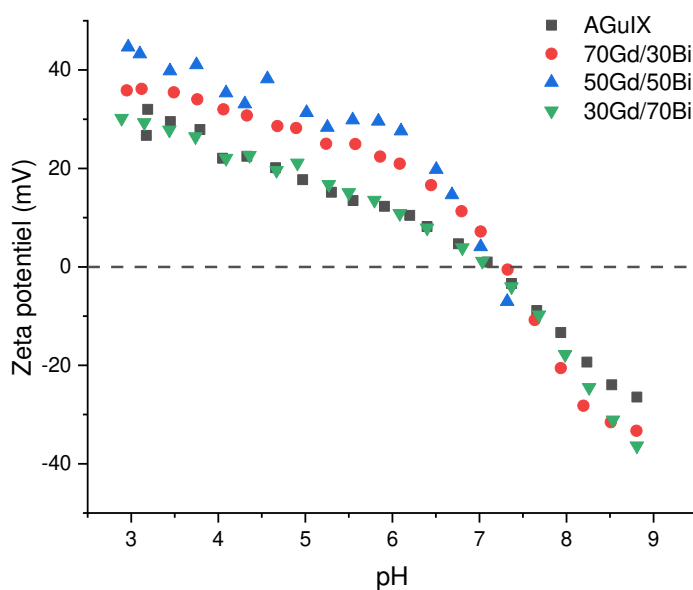


Figure 88. Évolution du potentiel zêta des produits AGuIX®, 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi en fonction du pH

Une tendance similaire est observée pour tous les produits. Cette tendance est bien caractéristique de nanoparticules du même type qu'AGuIX[®] c'est-à-dire présentant en surface des groupements amines (via l'APTES), des DOTAGA(Gd) et des DOTAGA(Bi). Les ions Gd³⁺ et Bi³⁺ présentent tous les deux la même charge. Les complexes DOTAGA(Gd) et DOTAGA(Bi) qui résultent de la complexation respective de Gd³⁺ et de Bi³⁺ sont donc de même charge -1. Si aucun des produits synthétisés ne présentent de DOTAGA libre et une quantité de DOTAGA totale équivalente au produit AGuIX[®] initial, alors on devrait s'attendre à un pH à IEP identique pour tous les produits. Ainsi, AGuIX[®], 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi présentent des pH à IEP respectifs de 7,15, 7,11, 7,11 et 7,11. Il semblerait donc que les produits synthétisés présentent une surface très similaire à AGuIX[®].

5.2.2.6 Relaxométrie

Les résultats de la mesure des temps de relaxation des solutions d'AGuIX[®], 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi sont présentés dans le Tableau 25.

Tableau 25. Mesures des relaxivités longitudinales et transversales des produits AGuIX[®], 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi. (Mesures effectuées à 100 g/L, 37°C, 1,4T à 60 MHz)

| Produit | r_1 (s ⁻¹ .mM ⁻¹) | r_2 (s ⁻¹ .mM ⁻¹) | r_2/r_1 |
|--------------------|--|--|-----------|
| AGuIX [®] | 17 | 27,3 | 1,61 |
| 70% Gd 30% Bi | 23,7 | 41,5 | 1,75 |
| 50% Gd 50% Bi | 20,1 | 35,2 | 1,75 |
| 30% Gd 70% Bi | 30,2 | 56,7 | 1,88 |

La mesure des temps de relaxation indique une augmentation du r_1 pour les produits 70Gd/30Bi 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi. Cette augmentation peut s'expliquer par une augmentation du temps de corrélation due à l'augmentation de la taille (comme indiqué par la DLS en Section 5.2.2.2) ou de la rigidité des particules [170] dû au différentes étapes de la synthèse. Ce constat est identique pour r_2 . Néanmoins, le ratio r_2/r_1 est proche du ratio de AGuIX[®] et reste inférieur à 2 ce qui indique un comportement d'agent de contraste IRM positif [132].

5.2.2.7 Bilan

Les caractérisations effectuées tout au long de ce projet sont regroupées dans le Tableau 26 ci-dessous.

Tableau 26. Bilan des caractéristiques d'AGuIX®, 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi

| Produit | *Gd (w%) | *Bi (w%) | Gd % Bi % | [Gd] + [Bi] ($\mu\text{mol/mg}$) | Pureté | D_H (nm) | pH IEP | r_1 ($\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) | r_2/r_1 |
|--------------------|----------|----------|------------------|---------------------------------------|--------|---------------|--------|--|-----------|
| AGuIX® | 11.7 | - | 100 % 0 % | 744 | > 91 % | $4,6 \pm 1,6$ | 7,15 | 17 | 1,61 |
| 70 % Gd 30 % Bi | 7.54 | 4,24 | 70,3 % 29,7 % | 682 | > 93 % | $4,5 \pm 1,6$ | 7,11 | 23,7 | 1,75 |
| 50 % Gd 50 % Bi | 5.38 | 6,84 | 48,8 % 51,2 % | 669 | > 91 % | $5,1 \pm 1,9$ | 7,11 | 20,1 | 1,75 |
| 30 % Gd 70 % Bi | 3.16 | 9,97 | 29,6 % 70,4 % | 678 | > 94 % | $4,8 \pm 2,0$ | 7,11 | 30,2 | 1,88 |

Les résultats obtenus lors de ce projet semblent converger vers l'obtention des produits attendus. En effet, pour rappel, le projet consiste en la synthèse de particules structurellement proche d'AGuIX® complexant 3 différents ratios de gadolinium et bismuth : 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi. Le mix Gd/Bi permettant à la fois une détection par IRM et un meilleur effet radiosensibilisant. Du point de vue structurel, le diamètre, l'IEP et la quantité totale de DOTAGA (au travers la valeur [Gd] + [Bi]) proche d'AGuIX® laissent supposer une structure très proche, et on peut attendre de ces nouveaux produits une biodistribution proche de celle d'AGuIX®. Cette structure similaire est aussi appuyée par un temps de rétention identique en HPLC SEC à AGuIX® comme évoqué en Section 5.2.2.3. La relaxométrie, au travers du ratio r_2/r_1 inférieur à 2, laisse supposer que les nouveaux produits synthétisés pourront être utilisés comme agents de contraste positifs pour l'IRM. Enfin, les ratios molaires Gd/Bi obtenus correspondent parfaitement aux attentes fixées au début du projet. Suite à la synthèse de ces trois produits, les nanoparticules ont été envoyées à nos partenaires de Harvard Medical School (Boston, USA) afin d'évaluer les propriétés d'imagerie et de radiosensibilisation.

5.3 Résultats biologiques

5.3.1 Conservation des propriétés d'imagerie IRM

Afin de s'assurer que les produits 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi soient toujours visibles en IRM, l'équipe d'Harvard a étudié la réponse en termes de contraste obtenu par les différentes nanoparticules. L'expérience est menée à différentes concentrations avec un MRI-LINAC, un appareil de clinique regroupant imagerie IRM et irradiateur 6 MV. L'expérience est menée sous un champ magnétique de 0.35 T suivant la séquence trueFISP. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 89.

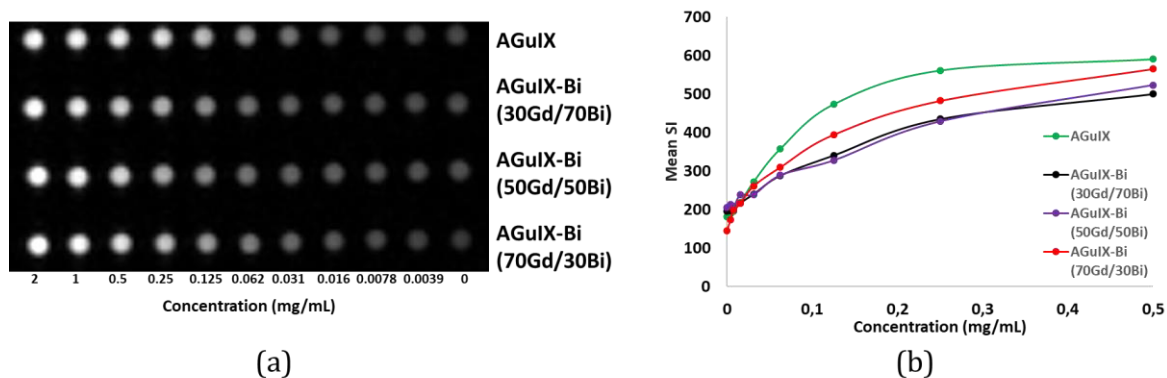


Figure 89. (a) Signal IRM obtenu pour des concentrations croissantes de nanoparticules (AGuIX®, 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi) (b) Evolution de l'augmentation de contraste dépendante des différentes nanoparticules (AGuIX®, 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi) et leurs concentrations.

Les résultats IRM indiquent que toutes les particules testées sont à l'origine d'une augmentation du contraste. Comme attendu, la réponse est directement liée à la concentration en gadolinium dans les particules. Ainsi, AGuIX® est associé à la meilleure augmentation de contraste et le produit 30Gd/70Bi à la moins bonne. On remarque donc ici que 30% de gadolinium est une quantité suffisante pour générer un contraste. Le ratio 30Gd/70Bi semble donc être idéal pour la suite du projet avec une quantité minimum de gadolinium pour obtenir un contraste IRM et une quantité de bismuth maximale pour améliorer la réponse radiosensibilisante.

5.3.2 Augmentation de l'effet radiosensibilisant

L'effet radiosensibilisant des nanoparticules Gd/Bi a été évalué par expérience γ -H2AX. Lors de cette expérience, on se focalise sur la famille protéique des Histones. En effet, à la suite de dommages à l'ADN, notamment des dommages double brins (*DNA Double-Strand Breaks*, DSB), les histones s'accumulent au niveau de ces ruptures. La quantification des histones au sein d'une cellule soumise à un rayonnement ionisant permet donc de quantifier le nombre de dommages à l'ADN engendrés par l'irradiation [184]. Ainsi, en introduisant des nanoparticules dans le milieu de culture des cellules on peut évaluer l'impact de la présence de celles-ci sur le nombre de DSB après irradiation. Nos partenaires de Harvard Medical School ont ainsi évalué la quantité de dommages engendrée à différents niveaux d'irradiation (0Gy, 2Gy, 4Gy et 6Gy) en présence de nos trois différents produits : 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi. Les résultats issus de cette expérience sont présentés en Figure 90.

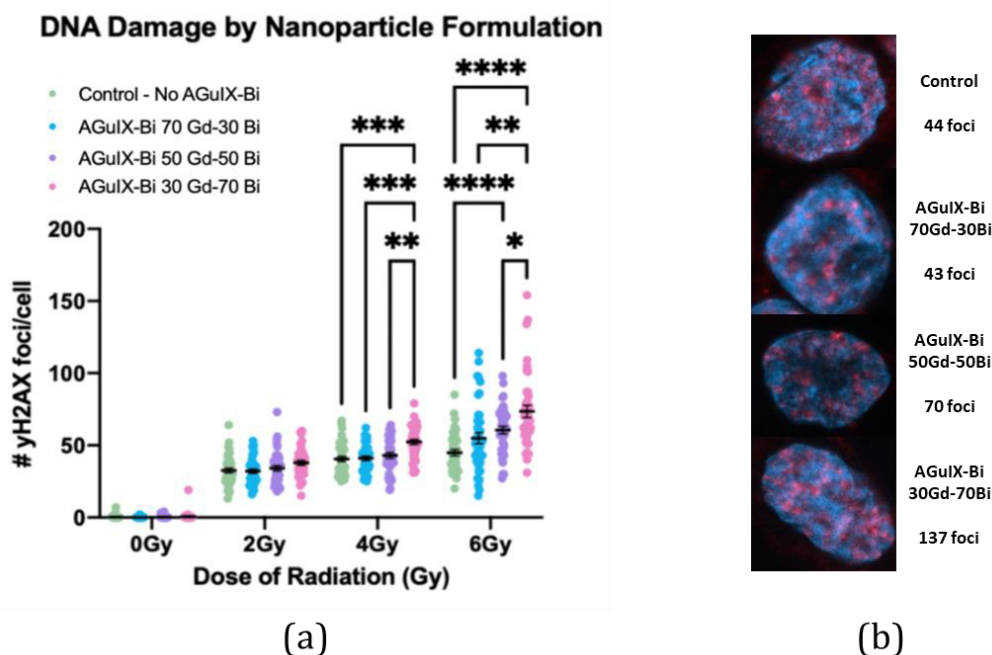


Figure 90. (a) Nombre de signaux γ -H2AX (γ H2AX foci) par cellule à différents niveaux d'irradiations et pour chaque type de nanoparticules : Pas de nanoparticules (vert), 70Gd/30Bi (bleu), 50Gd/50Bi (violet) et 30Gd/70Bi. Lignée cellulaire : A549 (cancer de poumon humain). * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (b) Exemples d'images des cellules lors de la quantification des γ -H2AX.

Les résultats de l'expérience γ -H2AX mettent en avant une relation claire entre augmentation de la quantité de bismuth et augmentation du nombre de dommages à l'ADN. Le bismuth, en accord avec les attentes, semble donc bien augmenter la quantité de dommages double brins après irradiation à différentes doses. Les résultats obtenus pour une irradiation de 6 Gy montrent une réelle augmentation de l'effet radiosensibilisant apporté par le lot 30Gd/70Bi.

Ainsi, le produit 30Gd/70Bi présente à la fois des propriétés de contraste intéressantes (Figure 89) et un meilleur effet radiosensibilisant. Le ratio 30Gd/70Bi a donc été sélectionné comme ratio d'étude pour le reste du projet. Il sera utilisé pour les futures expériences telles que : biodistribution, test *in vivo*, étude CyToF, couplage avec un peptide cRGD, ...

L'effet radiosensibilisant du lot de référence 30Gd/70Bi a été comparé à l'effet radiosensibilisant d'AGuIX® lors d'un test clonogénique. En effet, l'évaluation de l'effet radiosensibilisant des nanoparticules sur la survie cellulaire s'effectue usuellement grâce aux tests de survie clonogénique (*clonogenic assay*) [185]. La « mortalité » cellulaire est ici considérée comme le reflet de la perte de la capacité répliquative. Les cellules irradiées sont cultivées dans des milieux de culture adaptés, exposées ou non aux NPs. Le compte du nombre de colonies formées au bout d'un temps de culture déterminé définit le nombre de cellules viables après le traitement. En multipliant les conditions d'irradiation avec différentes doses testées, des courbes de survie cellulaires en fonction de la dose peuvent alors être obtenues. La comparaison des courbes de survie obtenues entre les cellules exposées aux nanoparticules et les cellules contrôles permet alors de déterminer l'efficacité de l'effet radiosensibilisant. Les résultats du test clonogénique sont présentés ci-dessous en Figure 91.

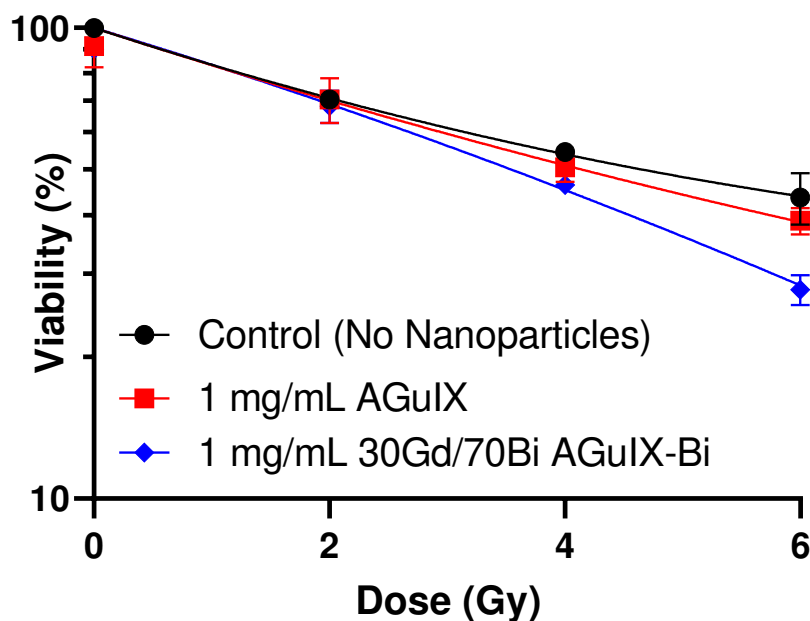


Figure 91. Test clonogénique mené sur une population tumorale A549 non exposé aux nanoparticules (control, noir), exposé à AGuIX® (rouge) et exposé au produit 30Gd/70Bi (bleu). Les différents niveaux d'irradiations sont 0, 2, 4 et 6 Gy.

Les résultats du test clonogénique montrent que la présence d'AGuIX® dans le milieu de culture introduit bien un effet radiosensibilisant entraînant une diminution de la viabilité des cellules (*viability*, nombre de cellules saines) après irradiation par rapport aux populations cellulaires n'ayant pas été exposées aux nanoparticules. On remarque aussi que l'ajout du produit 30Gd/70Bi dans le milieu de culture mène à un effet radiosensibilisant plus important comparé à AGuIX® avec une diminution significative de la viabilité cellulaire après une irradiation à 6 Gy. Ces résultats encourageants pour la suite du projet semblent indiquer que le bismuth a effectivement une place intéressante parmi les éléments capables d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie.

5.3.3 Biodistribution

Pour préparer la mise en place des test *in vivo* une étude de biodistribution et pharmacocinétique a été menée sur une semaine afin de déterminer le devenir des nanoparticules dans l'organisme et déterminer la meilleure fenêtre d'irradiation. Les souris reçoivent une injection de cellules tumorales A549 en sous-cutané en amont de l'expérience. Une fois que la tumeur est significativement grosse, les souris reçoivent une injection rétro-orbitale de 300 mg kg⁻¹ (~6 mg/animal) de AGuIX® ou de 30Gd/70Bi. Elles ont été sacrifiées à 1 h, 4 h, 24 h, 168 h et 30 jours. Les principaux organes, y compris les reins, le foie, la rate, les poumons et le cœur, ont été disséqués à Harvard Medical School puis pesés et digérés dans du HNO₃ à 69 % à l'aide du micro-ondes Multiwave 5000 (Anton Paar, Autriche) et analysés par ICP-MS Nexion 2000 B (Perkin-Elmer) à l'ILM. Les mesures ICP-MS ont

été effectuées pour confirmer la présence et quantifier le contenu en Gd et Bi de chaque organe à différents moments après l'administration.

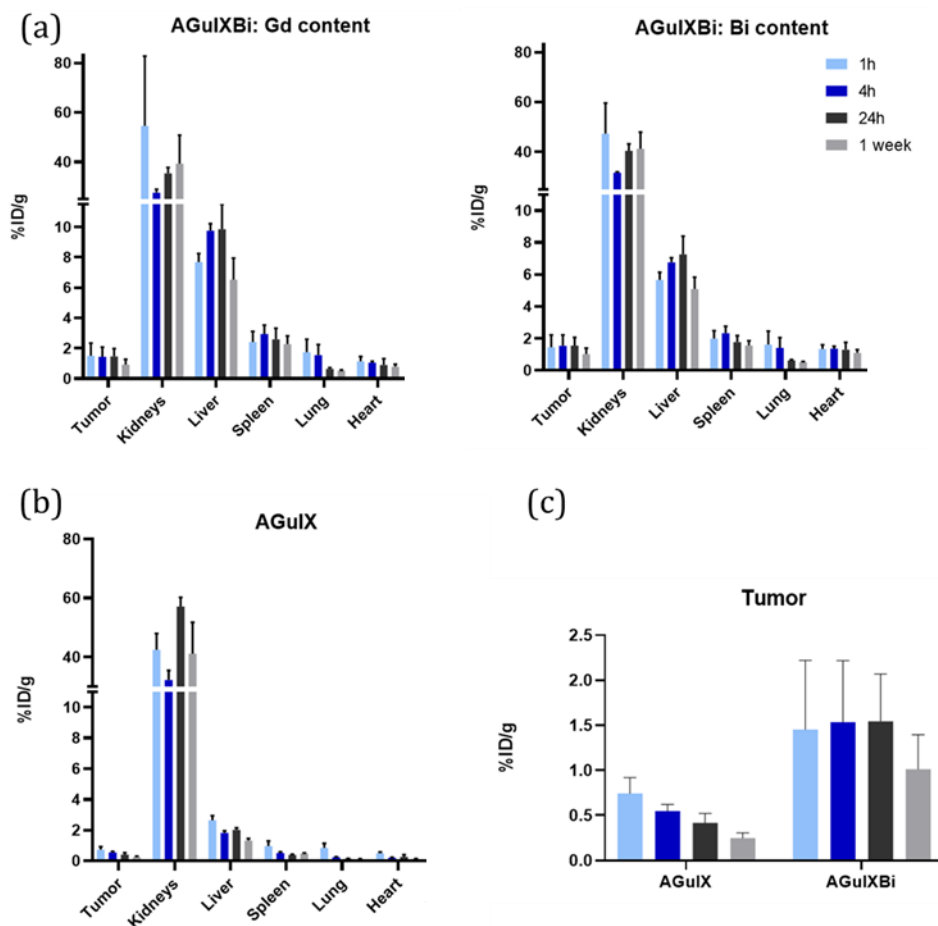


Figure 92. Étude de la biodistribution des nanoparticules 30Gd/70Bi après injection rétro-orbitale sur des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées A549. (a) Résultats ICP-MS de la quantité de Gd (partie gauche) et Bi (partie droite), exprimée en pourcentage de la dose de 30Gd/70Bi (AGuIXBi) injectée par masse d'organe (%ID/g), retrouvée dans chaque organe (respectivement tumeur, reins, foie, rate, cœur et sang) à différents temps : 1h (cyan), 4h (bleu), 24h (noir) et 1 semaine (gris). (b) Résultats ICP-MS de la quantité de Gd, exprimée en pourcentage de la dose d'AGuIX® injectée par masse d'organe (%ID/g), retrouvée dans chaque organe (respectivement tumeur, reins, foie, rate, cœur et sang) à différents temps : 1h (cyan), 4h (bleu), 24h (noir) et 1 semaine (gris). (c) Comparaison des résultats ICP-MS de la quantité de Gd dans les tumeurs entre injection d'AGuIX® et injection 30Gd/70Bi (AGuIXBi)

Les résultats de l'expérience de biodistribution montrent que le produit 30Gd/70Bi circule dans l'organisme de façon comparable à AGuIX®. On remarque une accumulation plus importante dans le foie pour les nanoparticules avec du bismuth. Cette plus grande accumulation est aussi visible au niveau de la tumeur (Figure 92.c). Il est intéressant de noter que les %ID/g sont très proches pour les résultats en Gd et Bi (Figure 92.a) cela indique qu'on retrouve donc un ratio constant entre Gd et Bi au sein des organes. Ce ratio constant est celui initialement contenu dans le produit 30Gd/70Bi.

5.4 Conclusion et perspectives

L'objectif de ce projet était de remplacer une partie du gadolinium initialement complexés à la surface de la nanoparticule AGuIX[®] par du bismuth. Le numéro atomique Z plus élevé du bismuth augmente la probabilité d'interaction avec les rayons ionisants de la radiothérapie et donc les dommages à l'ADN, c'est l'effet radiosensibilisant. Afin de conserver les propriétés de contraste IRM et maximiser l'effet radiosensibilisant, plusieurs ratios (molaires) de complexation Gd/Bi ont été étudiés : 70Gd/30Bi, 50Gd/50Bi et 30Gd/70Bi. Grâce au contrôle offert par la méthode de relargage du gadolinium, il a été possible d'obtenir les trois produits. Ce projet montre la grande versatilité qu'offre la nanoparticule AGuIX[®] en tant que nanoplateforme. Les résultats *in vitro* obtenues par nos partenaires de Harvard Medical School mettent en avant l'augmentation de l'effet radiosensibilisant. Une étude *in vivo* est en cours de réalisation afin de confirmer le bénéfice de l'ajout de bismuth. Les résultats feront l'objet d'une publication en cours de rédaction. D'autres projets sont en cours avec notre partenaire de Harvard Medical School, notamment un projet visant à évaluer l'effet du greffage du peptide cRGD, ciblant l'intégrine $\alpha V\beta 3$, sur le produit 30Gd/70Bi.

6 Conclusion Générale

Le cancer demeure l'une des premières causes de mortalité dans le monde et le nombre de cas ne cesse d'augmenter. Il existe un fort intérêt pour le développement de nouveaux outils permettant à la fois le diagnostic et le traitement de cette maladie. De plus, il existe de plus en plus de moyens de lutter contre le cancer : radiothérapie, chimiothérapie, immunothérapie, chirurgie. Dans ce contexte, la nanoparticule AGuIX[®] se place comme un produit extrêmement intéressant. Grâce à ses propriétés lui permettant 1) de s'accumuler dans les tumeurs, 2) d'agir comme agent de contraste IRM, 3) d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie et 4) d'être éliminée par voie rénale ; la nanoparticule AGuIX[®] se présente comme un sérieux candidat dans le secteur des nanoparticules inorganiques à haut Z améliorant la radiothérapie. L'efficacité de la nanoparticule est aujourd'hui évaluée au travers de différents essais cliniques (métastases cérébrales NCT03818386, glioblastome NCT04881032, cancer du col de l'utérus NCT03308604, cancer du poumon NCT04789486). En plus de ses propriétés initiales, AGuIX[®] peut facilement être modifiée pour donner lieu à une seconde génération de nanoparticules dont les propriétés peuvent être adaptées afin de répondre à un objectif voulu.

Lors de la première partie de cette thèse nous nous sommes focalisés sur la nanoparticule AGuIX[®]. Les méthodes d'analyses développées offrent la possibilité d'étudier les nanoparticules de façon extrêmement précise. Ainsi, grâce à divers méthodes (DLS, TDA, HPLC, ICP/MS, ...) nous avons pu caractériser le candidat médicament AGuIX[®]. Cette connaissance du produit est une étape essentielle dans son développement. Premièrement, l'identification des paramètres physico-chimiques est essentiel pour évaluer le comportement de la nanoparticule une fois injectée chez le patient atteint de cancer. Deuxièmement, une bonne connaissance du produit est nécessaire afin de répondre aux interrogations du régulateur et obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en cas de succès lors des phases d'essais cliniques.

La bonne connaissance d'AGuIX[®] est aussi essentielle afin de l'utiliser comme produit de base pour synthétiser des nouvelles nanoparticules. Ainsi les 2 autres parties de cette thèse s'appuient sur la connaissance d'AGuIX[®] et le développement de techniques d'analyses de cette nanoparticule pour synthétiser et caractériser des nouveaux produits issus de celle-ci.

La deuxième partie de cette thèse s'oriente donc sur le développement d'une nouvelle nanoparticule CuPRiX capable de complexer le cuivre intratumoral au sein des tumeurs. En effet, le lien entre excès de cuivre et cancer est de plus en plus étudié et des stratégies de lutte contre le cancer basé sur la déplétion du cuivre font toujours l'objet de recherches cliniques. Ainsi, il est facile de modifier AGuIX[®] afin de libérer le gadolinium initialement complexé à sa surface par les groupements DOTAGA. En libérant, ces ions gadolinium on obtient une nanoparticule similaire à AGuIX[®] présentant des DOTAGA libres capables d'aller complexer le cuivre en excès au sein des tumeurs. Le potentiel effet thérapeutique de ce produit a pu être mis en évidence grâce à des expériences *in vitro* menées par nos collaborateurs de l'IP2I. Le développement de cette nanoparticule et l'étude du procédé de relargage du gadolinium assisté par protonation ont fait l'objet de 2 dépôts de brevets distincts, un concernant la méthode de relargage du gadolinium et un autre concernant la complexation du cuivre intratumoral. Deplus, les travaux menés ont donné lieu à une publication.

Le succès de la méthode de relargage du gadolinium ouvre la voie à une synthèse facile de nanoparticules présentant un contenu métallique complexé ajustable. Il est donc possible d'obtenir directement à partir de la nanoparticule AGuIX® une nanoparticule aux propriétés similaires mais présentant en surface d'autres ions complexés par les DOTAGA différents du gadolinium initial. Ainsi, le bismuth présente des propriétés de radiosensibilisation intéressantes qui permettraient de développer une nanoparticule potentiellement encore plus efficace une fois soumise aux rayons X de la radiothérapie.

La troisième partie de cette thèse est donc exclusivement consacrée à la synthèse d'une nanoparticule complexant un ratio spécifique de gadolinium et de bismuth afin de présenter à la fois : 1) des propriétés d'imagerie IRM via la présence du gadolinium et 2) un effet radiosensibilisant optimal via la présence de bismuth. L'obtention de cette nanoparticule a donné lieu à une investigation complète de son comportement en milieu biologique. L'usage comme agent de contraste IRM ainsi que l'augmentation de l'effet radiosensibilisant ont été confirmés par nos partenaires d'Harvard Medical School lors d'expériences *in vitro* et ouvre la voie vers des études *in vivo*. Une publication en cours de rédaction devrait prochainement concrétiser ses résultats.

En parallèle de ces différents projets, j'ai aussi mené des recherches sur d'autres sujets en lien avec AGuIX® notamment sur la fonctionnalisation de sa surface avec des molécules d'intérêts :

- Dans le cadre d'un projet avec Harvard Medical School visant à greffer un nanobody (partie active d'un anticorps [186]) j'ai tout d'abord travaillé sur la synthèse de nanoparticule AGuIX® présentant des groupes maléimides de surfaces. Ces groupes sont capables de réagir avec des thiols -SH afin de former des liaisons C-S stables. L'obtention de cette nanoparticule était très intéressante dans le cadre de greffages de divers peptides car les groupements thiols sont largement répandus en biologie. A la fin de cette première étape, nous disposons d'un produit lyophilisé, stable et capable de réagir facilement avec des petits composés peptidiques. La deuxième étape, visait à coupler à notre nouvelle nanoparticule une séquence peptidique GGG. Cette séquence est ensuite reconnue par une enzyme, la sortase [187], afin de réaliser un couplage enzymatique spécifique avec un nanobody présentant la séquence terminal LPTEGG. J'ai ainsi pu montrer la faisabilité de ce projet en réalisant ce couplage enzymatique au laboratoire. Ce projet a ensuite été poursuivi et est toujours en développement. Différents bioconjugués ont été couplés à AGuIX® par cette méthode et d'autres méthodes de couplage (click chemistry [188]) mettant en avant la large gamme d'applications de cette nanoparticule.
- Dans le cadre d'un projet avec l'Université de Nancy, j'ai travaillé sur la synthèse de nanoparticules de type AGuIX® complexant uniquement du terbium. Le but de ce projet étant d'utiliser la fluorescence du terbium sous irradiation X comme activateur de molécules photosensibilisantes (PS) utilisées lors de la thérapie photo-dynamique (*Photo-Dynamic Therapy*, PDT). En effet, le principe de la PDT est de générer des ROS grâce à l'utilisation de molécules photosensibilisantes qui produisent des radicaux libres lorsqu'elles sont soumises à un rayonnement, généralement infra-rouge. La nature de ce type de rayonnement limite l'action de ce genre de thérapie à des traitements locaux peu profonds. L'activation de PS par fluorescence du terbium

sous irradiation X permettrait donc d'utiliser la PDT n'importe où à l'intérieur de l'organisme. La preuve de concept de ce projet a fait l'objet d'une publication [189].

Ma thèse a été l'occasion de découvrir une grande partie des multiples modes d'actions potentiels qu'offre AGuIX[®]. Dans le passé beaucoup de travaux se sont focalisés sur la modification de la surface de la nanoparticule via la conjugaison avec des biomolécules (peptides, anticorps, etc). Mon travail, dans cette thèse, a aussi démontré que la composition de la nanoparticule joue un rôle crucial permettant d'augmenter son efficacité (AGuIX (Gd/Bi) en Section 5) voir d'apporter de toutes nouvelles propriétés de traitement (CuPRiX en Section 4). L'étude du procédé de relargage du gadolinium offre une grande liberté dans les potentielles applications de futurs produits de seconde génération dérivés d'AGuIX[®]. La multimodalité de la nanoparticule AGuIX[®] est un point important qui lui permettra de trouver sa place dans le futur arsenal thérapeutique contre le cancer.

Publications principales :

Identification of Molecular Fragments in Equilibrium with Polysiloxane Ultrasmall Nanoparticles

Paul Rocchi, Lucie Labied, Tristan Doussineau, Michel, Julien, Barbara Giroud, Emmanuelle Vuillet, Jérôme Randon, Agnès Hagège, François Lux

Nanomaterials 2022, 12, 738.

doi : 10.3390/nano12050738

A New Generation of Ultrasmall Nanoparticles Inducing Sensitization to Irradiation and Copper Depletion to Overcome Radioresistant and Invasive Cancers

Paul Rocchi, Delphine Brichart-Vernos, François Lux, Isabelle Morfin, Laurent David, Claire Rodriguez-Lafrasse, Olivier Tillement

Pharmaceutics 2022, 14, 814

doi : 0.3390/pharmaceutics14040814

Publications associées :

Taylor Dispersion Analysis Coupled to Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry for Ultrasmall Nanoparticle Size Measurement : From Drug Product to Biological Media Studies

Lucie Labied, Paul Rocchi, Tristan Doussineau, Jerome Randon, Olivier Tillement, Francois Lux, and Agnes Hagege

Analytical Chemistry, 2021, 93, 3, 1254–1259

doi :10.1021/acs.analchem.0c03988

Biodegradation of metal-based ultra-small nanoparticles : A combined approach using TDA-ICP-MS and CE-ICP-MS

Lucie Labied, Paul Rocchi, Tristan Doussineau, Jerome Randon, Olivier Tillement, Herve Cottet, Francois Lux, Agnes Hagege

Analytica Chimica Acta, 1185 (2021), 339081

doi :10.1016/j.aca.2021.339081

Multiscale Selectivity and in vivo Biodistribution of NRP-1-Targeted Theranostic AGuIX Nanoparticles for PDT of Glioblastoma

Mickaël Gries, Noémie Thomas, Joël Daouk, Paul Rocchi, Laurence Choulier, Justine Jubréaux, Julien Pierson, Aurélie Reinhard, Valérie Jouan-Hureauux, Alicia Chateau, Samir Acherar, Céline Frochot, François Lux, Olivier Tillement, Muriel Barberi-Heyob

Int J Nanomedicine. 2020; 15: 8739–8758.

doi: 10.2147/IJN.S261352

Terbium-Based AGuIX-Design Nanoparticle to Mediate X-ray-Induced Photodynamic Therapy

Joël Daouk, Mathilde Iltis, Batoul Dhaini, Denise Béchet, Philippe Arnoux, Paul Rocchi, Alain Delconte, Benoît Habermeyer, François Lux, Céline Frochot, Olivier Tillement, Muriel Barberi-Heyob, Hervé Schohn

Pharmaceutics 2021. 14, 5: 396

doi : 10.3390/ph14050396

Unique features of brain metastases-targeted AGuIX nanoparticles vs their constituents: A focus on glutamate-/GABA-ergic neurotransmission in cortex nerve terminals

Tatiana Borisova, Natalia Pozdnyakova, Natalia Krisanova, Artem Pastukhov, Marina Dudarenko, Konstantin Paliienko, Valeria Grytsaenko, Francois Lux, Vladimir Lysenko, Paul Rocchi, Serhiy Komisarenko, Olivier Tillement.

Food and Chemical Toxicology, 2021, Volume 149, 112004,

doi : 10.1016/j.fct.2021.112004.

Brevets :

Method for treating tumours by capturing copper and/or iron

Inventeur : Olivier Tillement, François Lux, Delphine Vernos, Simon Champagne, Claire Rodriguez-Lafrasse, Thomas Brichart, Marco Natuzzi, Alain Geloën, Paul Rocchi, Matteo Martini

WIPO : WO2022106787A1

Procédé de préparation de nanoparticules

Inventeur : Olivier Tillement, François Lux, Fabien Rossetti, Paul Rocchi, Tristan Doussineau

WIPO : WO2022106788A1

Nanoparticles for the treatment of cancer by radiofrequency radiation

Inventeur : Victor Timoshenko, Alexander KHARIN, Volodymyn LYSENKO, Simon CHAMPAGNE, François LUX, Paul ROCCHI, Olivier Tillement.

WIPO : WO2021028642A1

Communications

Nanohybrides 17, Porquerolles, 06/06/2021

CuPRiX : A simple step to bring anti-angiogenic features to AGuIX®

Nanohybrides 18, Bastia, 23/06/2021

From AGuIX® to a tunable radiosensitizing nanoparticle

Références

[Cette liste se met à jour automatiquement. Elle utilise le style Bibliographie. Supprimez ce message.]

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [2] Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environ Sci Technol* 2012;46:2242–50. <https://doi.org/10.1021/es204168d>.
- [3] Sharma S, Sharma RK, Gaur K, Catala Torres JF, Loza-Rosas SA, Torres A, et al. Fueling a Hot Debate on the Application of TiO₂ Nanoparticles in Sunscreen. *Materials* 2019;12:2317. <https://doi.org/10.3390/ma12142317>.
- [4] Kisby T, Yilmazer A, Kostarelos K. Reasons for success and lessons learnt from nanoscale vaccines against COVID-19. *Nat Nanotechnol* 2021;16:843–50. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00946-9>.
- [5] Hamilton A, Biganzoli L, Coleman R, Mauriac L, Hennebert P, Awada A, et al. EORTC 10968: a phase I clinical and pharmacokinetic study of polyethylene glycol liposomal doxorubicin (Caelyx®, Doxil®) at a 6-week interval in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2002;13:910–8. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf157>.
- [6] Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, A. Hamaly M, Y. Alkawareek M, C. Dreaden E, et al. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem Soc Rev* 2017;46:4218–44. <https://doi.org/10.1039/C6CS00636A>.
- [7] D. Walkey C, W. Chan WC. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem Soc Rev* 2012;41:2780–99. <https://doi.org/10.1039/C1CS15233E>.
- [8] Song G, Petschauer J, Madden A, Zamboni W. Nanoparticles and the Mononuclear Phagocyte System: Pharmacokinetics and Applications for Inflammatory Diseases. *Curr Rheumatol Rev* 2014;10:22–34. <https://doi.org/10.2174/1573403X10666140914160554>.
- [9] Mainard M, Jacob D. Comprendre. La mesure de taille de nanoparticules par diffusion dynamique de la lumiere. *Photoniques* 2016;40–4. <https://doi.org/10.1051/photon/20168340>.
- [10] Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol* 2015;33:941–51. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>.
- [11] Tsoi KM, MacParland SA, Ma X-Z, Spetzler VN, Echeverri J, Ouyang B, et al. Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver. *Nat Mater* 2016;15:1212–21. <https://doi.org/10.1038/nmat4718>.
- [12] Moghimi SM, Patel HM. Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system – The concept of tissue specificity. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;32:45–60. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00131-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00131-2).

- [13] Pelaz B, del Pino P, Maffre P, Hartmann R, Gallego M, Rivera-Fernández S, et al. Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano* 2015;9:6996–7008. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01326>.
- [14] Albanese A, Tang PS, Chan WCW. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu Rev Biomed Eng* 2012;14:1–16. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124>.
- [15] Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat Mater* 2009;8:543–57. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>.
- [16] Du B, Yu M, Zheng J. Transport and interactions of nanoparticles in the kidneys. *Nat Rev Mater* 2018;3:358–74. <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0038-3>.
- [17] Black KCL, Wang Y, Luehmann HP, Cai X, Xing W, Pang B, et al. Radioactive ¹⁹⁸Au-Doped Nanostructures with Different Shapes for In Vivo Analyses of Their Biodistribution, Tumor Uptake, and Intratumoral Distribution. *ACS Nano* 2014;8:4385–94. <https://doi.org/10.1021/nn406258m>.
- [18] Decuzzi P, Ferrari M. The adhesive strength of non-spherical particles mediated by specific interactions. *Biomaterials* 2006;27:5307–14. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.05.024>.
- [19] Effects of filtration rate on the glomerular barrier and clearance of four differently shaped molecules n.d. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.281.1.F103>.
- [20] Duan X, Li Y. Physicochemical Characteristics of Nanoparticles Affect Circulation, Biodistribution, Cellular Internalization, and Trafficking. *Small* 2013;9:1521–32. <https://doi.org/10.1002/sml.201201390>.
- [21] Donahue ND, Acar H, Wilhelm S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2019;143:68–96. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.008>.
- [22] Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:71–9. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.002>.
- [23] Aly HAA. Cancer therapy and vaccination. *J Immunol Methods* 2012;382:1–23. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.05.014>.
- [24] Nakamura Y, Mochida A, Choyke PL, Kobayashi H. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? *Bioconjug Chem* 2016;27:2225–38. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00437>.
- [25] Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63:136–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.009>.

- [26] Fox ME, Szoka FC, Fréchet MJ. Soluble Polymer Carriers for the Treatment of Cancer: The Importance of Molecular Architecture. *Acc Chem Res* 2009;42:1141–51. <https://doi.org/10.1021/ar900035f>.
- [27] Matsumura Y, Oda T, Maeda H. General mechanism of intratumor accumulation of macromolecules: advantage of macromolecular therapeutics. *Gan To Kagaku Ryoho* 1987;14:821–9.
- [28] Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat Rev Mater* 2016;1:16014. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>.
- [29] Muzykantov V, Torchilin V, editors. *Biomedical Aspects of Drug Targeting*. Boston, MA: Springer US; 2002. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4627-3>.
- [30] Maeda H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond. *J Controlled Release* 2012;164:138–44. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.038>.
- [31] Tillement O. *Particules hybrides théranostiques pour une nano-médecine de rupture n.d.*:15.
- [32] Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine* 2015;10:975–99. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>.
- [33] Rosenblum D, Joshi N, Tao W, Karp JM, Peer D. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nat Commun* 2018;9:1410. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03705-y>.
- [34] Cheng Z, Al Zaki A, Hui JZ, Muzykantov VR, Tsourkas A. Multifunctional Nanoparticles: Cost Versus Benefit of Adding Targeting and Imaging Capabilities. *Science* 2012;338:903–10. <https://doi.org/10.1126/science.1226338>.
- [35] Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev* 2012;41:2971. <https://doi.org/10.1039/c2cs15344k>.
- [36] Salvioni L, Rizzuto MA, Bertolini JA, Pandolfi L, Colombo M, Prosperi D. Thirty Years of Cancer Nanomedicine: Success, Frustration, and Hope. *Cancers* 2019;11:1855. <https://doi.org/10.3390/cancers11121855>.
- [37] Aslan B, Ozpolat B, Sood AK, Lopez-Berestein G. Nanotechnology in cancer therapy. *J Drug Target* 2013;21:904–13. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2013.837469>.
- [38] Vibhavari RJA, Kumar G, Rao V, Cheruku SP, Kumar N. Chapter 7 - Nano-pharmacokinetics: biodistribution and toxicology. In: Thorat ND, Kumar N, editors. *Nano-Pharmacokinetics. Theranostics*, Academic Press; 2021, p. 117–52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85050-6.00013-X>.
- [39] Swenson CE, Perkins WR, Roberts P, Janoff AS. Liposome technology and the development of Myocet™ (liposomal doxorubicin citrate) n.d.:7.
- [40] Barenholz Y (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J Controlled Release* 2012;160:117–34. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.

- [41] Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update post COVID-19 vaccines. *Bioeng Transl Med* 2021;6:e10246. <https://doi.org/10.1002/btm2.10246>.
- [42] Bitounis D, Fanciullino R, Iliadis A, Ciccolini J. Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept. *ISRN Pharm* 2012;2012:738432. <https://doi.org/10.5402/2012/738432>.
- [43] Zhang X, Zhang P. Polymersomes in Nanomedicine - A Review. *Curr Nanosci* 2017;13:124–9. <https://doi.org/10.2174/1573413712666161018144519>.
- [44] Le Meins J-F, Sandre O, Lecommandoux S. Recent trends in the tuning of polymersomes' membrane properties. *Eur Phys J E* 2011;34:14. <https://doi.org/10.1140/epje/i2011-11014-y>.
- [45] Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm Res* 2016;33:2373–87. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>.
- [46] Gillies E, Frechet J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov Today* 2005;10:35–43. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03276-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03276-3).
- [47] Kesharwani P, Jain K, Jain NK. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog Polym Sci* 2014;39:268–307. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.07.005>.
- [48] Paciotti GF, Myer L, Weinreich D, Goia D, Pavel N, McLaughlin RE, et al. Colloidal Gold: A Novel Nanoparticle Vector for Tumor Directed Drug Delivery. *Drug Deliv* 2004;11:169–83. <https://doi.org/10.1080/10717540490433895>.
- [49] Kang JK, Kim JC, Shin Y, Han SM, Won WR, Her J, et al. Principles and applications of nanomaterial-based hyperthermia in cancer therapy. *Arch Pharm Res* 2020;43:46–57. <https://doi.org/10.1007/s12272-020-01206-5>.
- [50] Penninckx S, Heuskin A-C, Michiels C, Lucas S. Gold Nanoparticles as a Potent Radiosensitizer: A Transdisciplinary Approach from Physics to Patient. *Cancers* 2020;12:2021. <https://doi.org/10.3390/cancers12082021>.
- [51] Cordeiro M, Ferreira Carlos F, Pedrosa P, Lopez A, Baptista PV. Gold Nanoparticles for Diagnostics: Advances towards Points of Care. *Diagnostics* 2016;6:43. <https://doi.org/10.3390/diagnostics6040043>.
- [52] Riley RS, Day ES. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology* 2017;9:e1449. <https://doi.org/10.1002/wnan.1449>.
- [53] Manzano M, Vallet-Regí M. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery. *Adv Funct Mater* 2020;30:1902634. <https://doi.org/10.1002/adfm.201902634>.
- [54] Jeelani PG, Mulay P, Venkat R, Ramalingam C. Multifaceted Application of Silica Nanoparticles. A Review. *Silicon* 2020;12:1337–54. <https://doi.org/10.1007/s12633-019-00229-y>.

- [55] Dadfar SM, Roemhild K, Drude NI, von Stillfried S, Knüchel R, Kiessling F, et al. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2019;138:302–25. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.005>.
- [56] Chatterjee K, Sarkar S, Jagajjanani Rao K, Paria S. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci* 2014;209:8–39. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.008>.
- [57] Martinelli C, Pucci C, Ciofani G. Nanostructured carriers as innovative tools for cancer diagnosis and therapy. *APL Bioeng* 2019;3:011502. <https://doi.org/10.1063/1.5079943>.
- [58] Klein E, Betbeder D, Fattal E. *Chimie, nanomatériaux, nanotechnologies*. EDP Sciences; 2020. <https://doi.org/10.1051/978-2-7598-2399-4>.
- [59] Pal SL, Jana U, Manna PK, Mohanta GP, Manavalan R. Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *J Appl Pharm Sci* n.d.:7.
- [60] Lartigue L, Coupeau M, Lesault M. Luminophore and Magnetic Multicore Nanoassemblies for Dual-Mode MRI and Fluorescence Imaging. *Nanomaterials* 2019;10:28. <https://doi.org/10.3390/nano10010028>.
- [61] Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: clinical relevance n.d. <https://doi.org/10.2217/nmm-2017-0336>.
- [62] Gad SC, Sharp KL, Montgomery C, Payne JD, Goodrich GP. Evaluation of the Toxicity of Intravenous Delivery of Auroshell Particles (Gold–Silica Nanoshells). *Int J Toxicol* 2012;31:584–94. <https://doi.org/10.1177/1091581812465969>.
- [63] Evans ER, Bugga P, Asthana V, Drezek R. Metallic nanoparticles for cancer immunotherapy. *Mater Today* 2018;21:673–85. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.11.022>.
- [64] Maggiorella L, Barouch G, Devaux C, Pottier A, Deutsch E, Bourhis J, et al. Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. *Future Oncol* 2012;8:1167–81. <https://doi.org/10.2217/fon.12.96>.
- [65] Bonvalot S, Le Pechoux C, De Baere T, Kantor G, Buy X, Stoeckle E, et al. First-in-Human Study Testing a New Radioenhancer Using Nanoparticles (NBTXR3) Activated by Radiation Therapy in Patients with Locally Advanced Soft Tissue Sarcomas. *Clin Cancer Res* 2017;23:908–17. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1297>.
- [66] Bilynsky C, Millot N, Papa A. Radiation nanosensitizers in cancer therapy—From preclinical discoveries to the outcomes of early clinical trials. *Bioeng Transl Med* 2021. <https://doi.org/10.1002/btm2.10256>.
- [67] Goel R, Shah N, Visaria R, Paciotti GF, Bischof JC. Biodistribution of TNF- α -coated gold nanoparticles in an *in vivo* model system. *Nanomed* 2009;4:401–10. <https://doi.org/10.2217/nmm.09.21>.
- [68] Pipeline. *CYTIMMUNE Sci* n.d. <https://www.cytimmune.com/pipeline> (accessed January 31, 2022).
- [69] Jensen SA, Day ES, Ko CH, Hurley LA, Luciano JP, Kouri FM, et al. Spherical Nucleic Acid Nanoparticle Conjugates as an RNAi-Based Therapy for Glioblastoma. *Sci Transl Med* 2013;5. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006839>.

- [70] Kumthekar P, Ko CH, Paunesku T, Dixit K, Sonabend AM, Bloch O, et al. A first-in-human phase 0 clinical study of RNA interference–based spherical nucleic acids in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med* 2021;13:eabb3945. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb3945>.
- [71] Magforce - The Nanomedicine Company n.d. <https://magforce.com> (accessed January 10, 2022).
- [72] Benezra M, Penate-Medina O, Zanzonico PB, Schaer D, Ow H, Burns A, et al. Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. *J Clin Invest* 2011;121:2768–80. <https://doi.org/10.1172/JCI45600>.
- [73] Detappe A, Kunjachan S, Rottmann J, Robar J, Tsiamas P, Korideck H, et al. AGuIX nanoparticles as a promising platform for image-guided radiation therapy. *Cancer Nanotechnol* 2015;6:4. <https://doi.org/10.1186/s12645-015-0012-3>.
- [74] Stern JM, Stanfield J, Kabbani W, Hsieh J-T, Cadeddu JA. Selective Prostate Cancer Thermal Ablation With Laser Activated Gold Nanoshells. *J Urol* 2008;179:748–53. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2007.09.018>.
- [75] Rastinehad AR, Anastos H, Wajswol E, Winoker JS, Sfakianos JP, Doppalapudi SK, et al. Gold nanoshell-localized photothermal ablation of prostate tumors in a clinical pilot device study. *Proc Natl Acad Sci* 2019;116:18590–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906929116>.
- [76] Butterworth KT, McMahan SJ, Currell FJ, Prise KM. Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Nanoscale* 2012;4:4830. <https://doi.org/10.1039/c2nr31227a>.
- [77] Shen J, Xiao Z, Zhao Q, Li M, Wu X, Zhang L, et al. Anti-cancer therapy with TNF α and IFN γ : A comprehensive review. *Cell Prolif* 2018;51:e12441. <https://doi.org/10.1111/cpr.12441>.
- [78] Libutti SK, Paciotti GF, Byrnes AA, Alexander HR, Gannon WE, Walker M, et al. Phase I and Pharmacokinetic Studies of CYT-6091, a Novel PEGylated Colloidal Gold-rhTNF Nanomedicine. *Clin Cancer Res* 2010;16:6139–49. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0978>.
- [79] Nilubol N, Yuan Z, Paciotti GF, Tamarkin L, Sanchez C, Gaskins K, et al. Novel Dual-Action Targeted Nanomedicine in Mice With Metastatic Thyroid Cancer and Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2018;110:1019–29. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy003>.
- [80] The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches n.d. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014710>.
- [81] Beik J, Abed Z, Ghoreishi FS, Hosseini-Nami S, Mehrzadi S, Shakeri-Zadeh A, et al. Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *J Controlled Release* 2016;235:205–21. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.062>.
- [82] Ma K, Mendoza C, Hanson M, Werner-Zwanziger U, Zwanziger J, Wiesner U. Control of Ultrasmall Sub-10 nm Ligand-Functionalized Fluorescent Core–Shell Silica Nanoparticle Growth in Water. *Chem Mater* 2015;27:4119–33. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b01222>.

- [83] Ma K, Mendoza C, Hanson M, Werner-Zwanziger U, Zwanziger J, Wiesner U. Control of Ultrasmall Sub-10 nm Ligand-Functionalized Fluorescent Core–Shell Silica Nanoparticle Growth in Water. *Chem Mater* 2015;27:4119–33. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b01222>.
- [84] Zaroni DK, Stambuk HE, Madajewski B, Montero PH, Matsuura D, Busam KJ, et al. Use of Ultrasmall Core-Shell Fluorescent Silica Nanoparticles for Image-Guided Sentinel Lymph Node Biopsy in Head and Neck Melanoma: A Nonrandomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open* 2021;4:e211936. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.1936>.
- [85] Phillips E, Penate-Medina O, Zanzonico PB, Carvajal RD, Mohan P, Ye Y, et al. Clinical translation of an ultrasmall inorganic optical-PET imaging nanoparticle probe. *Sci Transl Med* 2014;6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009524>.
- [86] Bradbury MS, Phillips E, Montero PH, Cheal SM, Stambuk H, Durack JC, et al. Clinically-translated silica nanoparticles as dual-modality cancer-targeted probes for image-guided surgery and interventions. *Integr Biol Quant Biosci Nano Macro* 2013;5:74–86. <https://doi.org/10.1039/c2ib20174g>.
- [87] Madajewski B, Chen F, Yoo B, Turker MZ, Ma K, Zhang L, et al. Molecular Engineering of Ultrasmall Silica Nanoparticle–Drug Conjugates as Lung Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res* 2020;26:5424–37. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0851>.
- [88] Adams GP, Ma K, Venkatesan A, Chen F, Wu F, Turker M, et al. ELU001, a targeted C’Dot drug conjugate (CDC) for the treatment of folate receptor alpha (FR α) overexpressing cancers n.d.:1.
- [89] Lux F, Mignot A, Mowat P, Louis C, Dufort S, Bernhard C, et al. Ultrasmall Rigid Particles as Multimodal Probes for Medical Applications. *Angew Chem Int Ed* 2011;50:12299–303. <https://doi.org/10.1002/anie.201104104>.
- [90] Sherry AD, Caravan P, Lenkinski RE. Primer on gadolinium chemistry. *J Magn Reson Imaging* 2009;30:1240–8. <https://doi.org/10.1002/jmri.21966>.
- [91] Huclier-Markai S, Ntsiba E, Thomas E, Alliot C, Cutler C, Lux F, et al. Multimodal AGuIX® Nanoparticles: Size Characterization by HF5 and Optimization of the Radiolabeling with Various SPECT/PET/Theranostic Tracers. *IntJMedNano Res* 2019;6. <https://doi.org/10.23937/2378-3664.1410027>.
- [92] Thomas E, Colombeau L, Gries M, Peterlini T, Mathieu C, Thomas N, et al. Ultrasmall AGuIX theranostic nanoparticles for vascular-targeted interstitial photodynamic therapy of glioblastoma. *Int J Nanomedicine* 2017;12:7075–88. <https://doi.org/10.2147/IJN.S141559>.
- [93] Truillet C, Lux F, Tillement O, Dugourd P, Antoine R. Coupling of HPLC with Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Studying the Aging of Ultrasmall Multifunctional Gadolinium-Based Silica Nanoparticles. *Anal Chem* 2013;85:10440–7. <https://doi.org/10.1021/ac402429p>.
- [94] Bort G, Lux F, Dufort S, Crémillieux Y, Verry C, Tillement O. EPR-mediated tumor targeting using ultrasmall-hybrid nanoparticles: From animal to human with theranostic AGuIX nanoparticles. *Theranostics* 2020;10:1319–31. <https://doi.org/10.7150/thno.37543>.

- [95] Verry C, Dufort S, Villa J, Gavard M, Iriart C, Grand S, et al. Theranostic AGuIX nanoparticles as radiosensitizer: A phase I, dose-escalation study in patients with multiple brain metastases (NANO-RAD trial). *Radiother Oncol* 2021;160:159–65. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2021.04.021>.
- [96] Tóth éva, Helm L, Merbach A. Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes: Theory and Mechanism. In: Merbach A, Helm L, Tóth É, editors. *Chem. Contrast Agents Med. Magn. Reson. Imaging*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013, p. 25–81. <https://doi.org/10.1002/9781118503652.ch2>.
- [97] EMA’s final opinion confirms restrictions on use of linear gadolinium agents in body scans n.d.:4.
- [98] Mathur M, Jones JR, Weinreb JC. Gadolinium Deposition and Nephrogenic Systemic Fibrosis: A Radiologist’s Primer. *RadioGraphics* 2020;40:153–62. <https://doi.org/10.1148/rg.2020190110>.
- [99] Kanda T, Oba H, Toyoda K, Kitajima K, Furui S. Brain gadolinium deposition after administration of gadolinium-based contrast agents. *Jpn J Radiol* 2016;34:3–9. <https://doi.org/10.1007/s11604-015-0503-5>.
- [100] Gulani V, Calamante F, Shellock FG, Kanal E, Reeder SB. Gadolinium deposition in the brain: summary of evidence and recommendations. *Lancet Neurol* 2017;16:564–70. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30158-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30158-8).
- [101] Lux F, Sancey L, Bianchi A, Crémillieux Y, Roux S, Tillement O. Gadolinium-based nanoparticles for theranostic MRI-radiosensitization. *Nanomed* 2015;10:1801–15. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.30>.
- [102] Sancey L, Lux F, Kotb S, Roux S, Dufort S, Bianchi A, et al. The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy. *Br J Radiol* 2014;87:20140134. <https://doi.org/10.1259/bjr.20140134>.
- [103] Lux F, Detappe A, Dufort S, Sancey L, Louis C, Carme S, et al. [Ultrasmall nanoparticles for radiotherapy: AGuIX]. *Cancer Radiother J Soc Francaise Radiother Oncol* 2015;19:508–14. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2015.05.019>.
- [104] Baskar R, Dai J, Wenlong N, Yeo R, Yeoh K-W. Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front Mol Biosci* 2014;1.
- [105] McMahon SJ, Paganetti H, Prise KM. Optimising element choice for nanoparticle radiosensitisers. *Nanoscale* 2016;8:581–9. <https://doi.org/10.1039/C5NR07089A>.
- [106] Hwang C, Kim JM, Kim J. Influence of concentration, nanoparticle size, beam energy, and material on dose enhancement in radiation therapy. *J Radiat Res (Tokyo)* 2017;58:405–11. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrx009>.
- [107] Roeske JC, Nuñez L, Hoggarth M, Labay E, Weichselbaum RR. Characterization of the Theoretical Radiation Dose Enhancement from Nanoparticles. *Technol Cancer Res Treat* 2007;6:395–401. <https://doi.org/10.1177/153303460700600504>.

- [108] Retif P, Pinel S, Toussaint M, Frochot C, Chouikrat R, Bastogne T, et al. Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: the Key Parameters. *Theranostics* 2015;5:1030–44. <https://doi.org/10.7150/thno.11642>.
- [109] Liu Y, Zhang P, Li F, Jin X, Li J, Chen W, et al. Metal-based NanoEnhancers for Future Radiotherapy: Radiosensitizing and Synergistic Effects on Tumor Cells. *Theranostics* 2018;8:1824–49. <https://doi.org/10.7150/thno.22172>.
- [110] Guerreiro A, Chatterton N, Crabb EM, Golding JP. A comparison of the radiosensitisation ability of 22 different element metal oxide nanoparticles using clinical megavoltage X-rays. *Cancer Nanotechnol* 2019;10:10. <https://doi.org/10.1186/s12645-019-0057-9>.
- [111] Haume K, Rosa S, Grellet S, Śmiałek MA, Butterworth KT, Solov'yov AV, et al. Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review. *Cancer Nanotechnol* 2016;7:8. <https://doi.org/10.1186/s12645-016-0021-x>.
- [112] Verry C, Dufort S, Lemasson B, Grand S, Pietras J, Troprès I, et al. Targeting brain metastases with ultrasmall theranostic nanoparticles, a first-in-human trial from an MRI perspective. *Sci Adv* 2020;6:eaay5279. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay5279>.
- [113] Mignot A, Truillet C, Lux F, Sancey L, Louis C, Denat F, et al. A Top-Down Synthesis Route to Ultrasmall Multifunctional Gd-Based Silica Nanoparticles for Theranostic Applications. *Chem - Eur J* 2013;19:6122–36. <https://doi.org/10.1002/chem.201203003>.
- [114] Le Duc G, Roux S, Paruta-Tuarez A, Dufort S, Brauer E, Marais A, et al. Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. *Cancer Nanotechnol* 2014;5:4. <https://doi.org/10.1186/s12645-014-0004-8>.
- [115] Labied L. Développement de méthodes analytiques pour la caractérisation d'une nanoparticule ultrafine à usage clinique n.d.
- [116] Roux S, Faure A-C, Mandon C, Dufort S, Rivière C, Bridot J-L, et al. Multifunctional gadolinium oxide nanoparticles: Towards image-guided therapy. *Imaging Med* 2010;2:211–23. <https://doi.org/10.2217/iim.10.5>.
- [117] Singh LP, Bhattacharyya SK, Kumar R, Mishra G, Sharma U, Singh G, et al. Sol-Gel processing of silica nanoparticles and their applications. *Adv Colloid Interface Sci* 2014;214:17–37. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.10.007>.
- [118] Thakare V, Tran V-L, Natuzzi M, Thomas E, Moreau M, Romieu A, et al. Functionalization of theranostic AGuIX® nanoparticles for PET/MRI/optical imaging. *RSC Adv* 2019;9:24811–5. <https://doi.org/10.1039/C9RA00365G>.
- [119] Plissonneau M, Pansieri J, Heinrich-Balard L, Morfin J-F, Stransky-Heilkron N, Rivory P, et al. Gd-nanoparticles functionalization with specific peptides for β -amyloid plaques targeting. *J Nanobiotechnology* 2016;14:60. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0212-y>.

- [120] Pansieri J, Plissonneau M, Stransky-Heilkron N, Dumoulin M, Heinrich-Balard L, Rivory P, et al. Multimodal imaging Gd-nanoparticles functionalized with Pittsburgh compound B or a nanobody for amyloid plaques targeting. *Nanomed* 2017;12:1675–87. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0079>.
- [121] Detappe A, Thomas E, Tibbitt MW, Kunjachan S, Zavidij O, Parnandi N, et al. Ultrasmall Silica-Based Bismuth Gadolinium Nanoparticles for Dual Magnetic Resonance–Computed Tomography Image Guided Radiation Therapy. *Nano Lett* 2017;17:1733–40. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b05055>.
- [122] Lagendijk JJW, Raaymakers BW, Raaijmakers AJE, Overweg J, Brown KJ, Kerkhof EM, et al. MRI/linac integration. *Radiother Oncol* 2008;86:25–9. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2007.10.034>.
- [123] Rasmussen K, Rauscher H, Mech A, Riego Sintes J, Gilliland D, González M, et al. Physico-chemical properties of manufactured nanomaterials - Characterisation and relevant methods. An outlook based on the OECD Testing Programme. *Regul Toxicol Pharmacol* 2018;92:8–28. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.10.019>.
- [124] Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Controlled Release* 2016;235:337–51. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- [125] Labied L, Rocchi P, Doussineau T, Randon J, Tillement O, Lux F, et al. Taylor Dispersion Analysis Coupled to Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry for Ultrasmall Nanoparticle Size Measurement: From Drug Product to Biological Media Studies. *Anal Chem* 2021;93:1254–9. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03988>.
- [126] Paz A, Guevara-Rodríguez F, Santiago J, Likhanova A. Polymer weight determination from numerical and experimental data of the reduced viscosity of polymer in brine. *Rev Mex Física* 2019;65:321. <https://doi.org/10.31349/RevMexFis.65.321>.
- [127] Svergun DI, Koch MHJ. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Rep Prog Phys* 2003;66:1735–82. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/66/10/R05>.
- [128] Warrack BM, Redding BP, Chen G, Bolgar MS. Determination of the molecular weight of poly(ethylene glycol) in biological samples by reversed-phase LC–MS with in-source fragmentation. *Anal Bioanal Chem* 2013;405:4283–7. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6795-3>.
- [129] Polymer Molecular weight distribution n.d.
- [130] Elizondo E, Moreno E, Cabrera I, Córdoba A, Sala S, Veciana J, et al. Liposomes and Other Vesicular Systems: Structural Characteristics, Methods of Preparation, and Use in Nanomedicine. In: Villaverde A, editor. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 104, Academic Press; 2011, p. 1–52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416020-0.00001-2>.
- [131] Patterson JP, Robin MP, Chassenieux C, Colombani O, O'Reilly RK. The analysis of solution self-assembled polymeric nanomaterials. *Chem Soc Rev* 2014;43:2412–25. <https://doi.org/10.1039/C3CS60454C>.

- [132] Bao Y, Sherwood JA, Sun Z. Magnetic iron oxide nanoparticles as T1 contrast agents for magnetic resonance imaging. *J Mater Chem C* 2018;6:1280–90. <https://doi.org/10.1039/C7TC05854C>.
- [133] Yamada H, Urata C, Aoyama Y, Osada S, Yamauchi Y, Kuroda K. Preparation of Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles with Different Diameters and Their Unique Degradation Behavior in Static Aqueous Systems. *Chem Mater* 2012;24:1462–71. <https://doi.org/10.1021/cm3001688>.
- [134] Belton DJ, Deschaume O, Perry CC. An overview of the fundamentals of the chemistry of silica with relevance to biosilicification and technological advances. *FEBS J* 2012;279:1710–20. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08531.x>.
- [135] Tran V-L, Thakare V, Natuzzi M, Moreau M, Oudot A, Vrigneaud J-M, et al. Functionalization of Gadolinium Chelates Silica Nanoparticle through Silane Chemistry for Simultaneous MRI/ ⁶⁴ Cu PET Imaging. *Contrast Media Mol Imaging* 2018;2018:1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/7938267>.
- [136] Inductively coupled plasma spectrometry for precipitation analysis_Impact of ACN.pdf n.d.
- [137] Danks AE, Hall SR, Schnepf Z. The evolution of ‘sol–gel’ chemistry as a technique for materials synthesis. *Mater Horiz* 2016;3:91–112. <https://doi.org/10.1039/C5MH00260E>.
- [138] Labied L, Rocchi P, Doussineau T, Randon J, Tillement O, Cottet H, et al. Biodegradation of metal-based ultra-small nanoparticles: A combined approach using TDA-ICP-MS and CE-ICP-MS. *Anal Chim Acta* 2021;1185:339081. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339081>.
- [139] international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-32.pdf n.d.
- [140] Voráčková I, Vaněk J, Pasulka J, Štřelcová Z, Lubal P, Hermann P. Dissociation kinetics study of copper(II) complexes of DO3A, DOTA and its monosubstituted derivatives. *Polyhedron* 2013;61:99–104. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2013.05.042>.
- [141] Asti M, Tegoni M, Farioli D, Iori M, Guidotti C, Cutler CS, et al. Influence of cations on the complexation yield of DOTATATE with yttrium and lutetium: a perspective study for enhancing the ⁹⁰Y and ¹⁷⁷Lu labeling conditions. *Nucl Med Biol* 2012;39:509–17. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2011.10.015>.
- [142] Debatisse J, Eker OF, Wateau O, Cho T-H, Wiart M, Ramonet D, et al. PET-MRI nanoparticles imaging of blood–brain barrier damage and modulation after stroke reperfusion. *Brain Commun* 2020;2:fcaa193. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa193>.
- [143] Hoo CM, Starostin N, West P, Mecartney ML. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *J Nanoparticle Res* 2008;10:89–96. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9435-7>.
- [144] Blockhuys S, Celauro E, Hildesjö C, Feizi A, Stål O, Fierro-González JC, et al. Defining the human copper proteome and analysis of its expression variation in cancers. *Met Integr Biometal Sci* 2017;9:112–23. <https://doi.org/10.1039/c6mt00202a>.

- [145] Gupte A, Mumper RJ. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 2009;35:32–46. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.07.004>.
- [146] Pan Q, Kleer CG, van Golen KL, Irani J, Bottema KM, Bias C, et al. Copper Deficiency Induced by Tetrathiomolybdate Suppresses Tumor Growth and Angiogenesis n.d.:6.
- [147] Hassouneh B, Islam M, Nagel T, Pan Q, Merajver SD, Teknos TN. Tetrathiomolybdate promotes tumor necrosis and prevents distant metastases by suppressing angiogenesis in head and neck cancer. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1039–45. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0524>.
- [148] Shanbhag VC, Gudekar N, Jasmer K, Papageorgiou C, Singh K, Petris MJ. Copper metabolism as a unique vulnerability in cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 2021;1868:118893. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118893>.
- [149] Ishida S, Andreux P, Poitry-Yamate C, Auwerx J, Hanahan D. Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110:19507–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318431110>.
- [150] Shao S, Si J, Shen Y. Copper as the Target for Anticancer Nanomedicine. *Adv Ther* 2019;2:1800147. <https://doi.org/10.1002/adtp.201800147>.
- [151] Gupta VK, Ali I. Determination of stability constants of Fe(II), Co(II) and Cu(II) – nitrilotriacetate–penicillamine mixed complexes by electrophoresis 1998:5.
- [152] Nurchi VM, Crisponi G, Crespo-Alonso M, Lachowicz JI, Szewczuk Z, Cooper GJS. Complex formation equilibria of Cu^{II} and Zn^{II} with triethylenetetramine and its mono- and di-acetyl metabolites. *Dalton Trans* 2013;42:6161–70. <https://doi.org/10.1039/C2DT32252H>.
- [153] Baldari S, Di Rocco G, Toietta G. Current Biomedical Use of Copper Chelation Therapy. *Int J Mol Sci* 2020;21:1069. <https://doi.org/10.3390/ijms21031069>.
- [154] Wilson's disease n.d.
- [155] Pfeiffenberger J, Mogler C, Gotthardt DN, Schulze-Bergkamen H, Litwin T, Reuner U, et al. Hepatobiliary malignancies in Wilson disease. *Liver Int* 2015;35:1615–22. <https://doi.org/10.1111/liv.12727>.
- [156] Lopez J, Ramchandani D, Vahdat L. 12. COPPER DEPLETION AS A THERAPEUTIC STRATEGY IN CANCER. In: Carver PL, editor. *Essent. Met. Med. Ther. Use Toxic. Met. Ions Clin.*, De Gruyter; 2019, p. 303–30. <https://doi.org/10.1515/9783110527872-012>.
- [157] Henry NL, Dunn R, Merjaver S, Pan Q, Pienta KJ, Brewer G, et al. Phase II Trial of Copper Depletion with Tetrathiomolybdate as an Antiangiogenesis Strategy in Patients with Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Oncology* 2006;71:168–75. <https://doi.org/10.1159/000106066>.
- [158] Lin J, Zahurak M, Beer TM, Ryan CJ, Wilding G, Mathew P, et al. A non-comparative randomized phase II study of 2 doses of ATN-224, a copper/zinc superoxide dismutase inhibitor, in patients with

- biochemically recurrent hormone-naïve prostate cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 2013;31:581–8. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2011.04.009>.
- [159] Redman BG, Esper P, Pan Q, Dunn RL, Hussain HK, Chenevert T, et al. Phase II Trial of Tetrathiomolybdate in Patients with Advanced Kidney Cancer n.d.:8.
- [160] Fu S, Naing A, Fu C, Kuo MT, Kurzrock R. Overcoming Platinum Resistance through the Use of a Copper-Lowering Agent. *Mol Cancer Ther* 2012;11:1221–5. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0864>.
- [161] Huang Y-F, Kuo MT, Liu Y-S, Cheng Y-M, Wu P-Y, Chou C-Y. A Dose Escalation Study of Trientine Plus Carboplatin and Pegylated Liposomal Doxorubicin in Women With a First Relapse of Epithelial Ovarian, Tubal, and Peritoneal Cancer Within 12 Months After Platinum-Based Chemotherapy. *Front Oncol* 2019;9:437. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00437>.
- [162] Fu S, Hou M-M, Wheler J, Hong D, Naing A, Tsimberidou A, et al. Exploratory study of carboplatin plus the copper-lowering agent trientine in patients with advanced malignancies. *Invest New Drugs* 2014;32:465–72. <https://doi.org/10.1007/s10637-013-0051-8>.
- [163] Khan MK, Mamou F, Schipper MJ, May KS, Kwitny A, Warnat A, et al. Combination Tetrathiomolybdate and Radiation Therapy in a Mouse Model of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Arch Otolaryngol Neck Surg* 2006;132:333. <https://doi.org/10.1001/archotol.132.3.333>.
- [164] Wachsberger P, Burd R, Dicker AP. Tumor Response to Ionizing Radiation Combined with Antiangiogenesis or Vascular Targeting Agents: Exploring Mechanisms of Interaction1. *Clin Cancer Res* 2003;9:1957–71.
- [165] Morisawa A, Okui T, Shimo T, Ibaragi S, Okusha Y, Ono M, et al. Ammonium tetrathiomolybdate enhances the antitumor effects of cetuximab via the suppression of osteoclastogenesis in head and neck squamous carcinoma. *Int J Oncol* 2018. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4242>.
- [166] Chan N, Willis A, Kornhauser N, Ward MM, Lee SB, Nackos E, et al. Influencing the Tumor Microenvironment: A Phase II Study of Copper Depletion Using Tetrathiomolybdate in Patients with Breast Cancer at High Risk for Recurrence and in Preclinical Models of Lung Metastases. *Clin Cancer Res* 2017;23:666–76. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1326>.
- [167] Desreux JF, Merciny E, Loncin MF. Nuclear magnetic resonance and potentiometric studies of the protonation scheme of two tetraaza tetraacetic macrocycles. *Inorg Chem* 1981;20:987–91. <https://doi.org/10.1021/ic50218a008>.
- [168] Port M, Idée J-M, Medina C, Robic C, Sabatou M, Corot C. Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review. *BioMetals* 2008;21:469–90. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9135-x>.
- [169] Singappuli Arachchige D, Slowing I. Control of interfacial pH in mesoporous silica nanoparticles via surface functionalization. *J Chem Phys* 2020;152:034703. <https://doi.org/10.1063/1.5138912>.

- [170] Yang C-T, Padmanabhan P, Z. Gulyás B. Gadolinium(iii) based nanoparticles for T 1 -weighted magnetic resonance imaging probes. *RSC Adv* 2016;6:60945–66. <https://doi.org/10.1039/C6RA07782J>.
- [171] Cory G. Scratch-Wound Assay. In: Wells CM, Parsons M, editors. *Cell Migr. Dev. Methods Protoc.*, Totowa, NJ: Humana Press; 2011, p. 25–30. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-207-6_2.
- [172] Brown NS, Bicknell R. Cell Migration and the Boyden Chamber. In: Brooks SA, Schumacher U, editors. *Metastasis Res. Protoc. Vol. II Anal. Cell Behav. Vitro Vivo*, Totowa, NJ: Humana Press; 2001, p. 47–54. <https://doi.org/10.1385/1-59259-137-X:047>.
- [173] Martin JE. *Physics for Radiation Protection* n.d.:666.
- [174] Mott JHL, Daniel JM. Interactions of Electromagnetic Radiation and Subatomic Particles with Matter – Part 1. *Clin Oncol* 2021;33:451–4. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2021.02.004>.
- [175] Retif P, Pinel S, Toussaint M, Frochot C, Chouikrat R, Bastogne T, et al. Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: the Key Parameters. *Theranostics* 2015;5:1030–44. <https://doi.org/10.7150/thno.11642>.
- [176] Radiobiology for the Radiologist | Eric J. Hall, Amato J. Giaccia | download n.d. <https://fr.1lib.fr/book/2740382/e3a21e> (accessed June 9, 2022).
- [177] Lhuillier C, Rudqvist N-P, Elemento O, Formenti SC, Demaria S. Radiation therapy and anti-tumor immunity: exposing immunogenic mutations to the immune system. *Genome Med* 2019;11:40. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0653-7>.
- [178] Hubbell JH, Seltzer SM. Tables of x-ray mass attenuation coefficients and mass energy-absorption coefficients 1 keV to 20 meV for elements $z = 1$ to 92 and 48 additional substances of dosimetric interest. National Inst. of Standards and Technology - PL, Gaithersburg, MD (United States). Ionizing Radiation Div.; 1995.
- [179] Rosa S, Connolly C, Schettino G, Butterworth KT, Prise KM. Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Cancer Nanotechnol* 2017;8:1–25. <https://doi.org/10.1186/s12645-017-0026-0>.
- [180] The Use of the Macrocyclic Chelator DOTA in Radiochemical Separations n.d. <https://doi.org/10.1002/ejic.201900706>.
- [181] Martell AE, Smith RM. *Critical Stability Constants: First Supplement*. Boston, MA: Springer US; 1982. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6761-5>.
- [182] Csajbók É, Baranyai Z, Bányai I, Brücher E, Király R, Müller-Fahrnow A, et al. Equilibrium, ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopy, and X-ray Diffraction Studies on the Complexes $\text{Bi}(\text{DOTA})^-$ and $\text{Bi}(\text{DO3A-Bu})$. *Inorg Chem* 2003;42:2342–9. <https://doi.org/10.1021/ic0261272>.
- [183] Lima LMP, Beyler M, Oukhatar F, Le Saec P, Faivre-Chauvet A, Platas-Iglesias C, et al. H2Me-do2pa: an attractive chelator with fast, stable and inert $^{\text{nat}}\text{Bi}^{3+}$ and $^{213}\text{Bi}^{3+}$ complexation for potential α -radioimmunotherapy applications. *Chem Commun* 2014;50:12371–4. <https://doi.org/10.1039/C4CC05529B>.

- [184] Rothkamm K, Barnard S, Moquet J, Ellender M, Rana Z, Burdak-Rothkamm S. DNA damage foci: Meaning and significance. *Environ Mol Mutagen* 2015;56:491–504. <https://doi.org/10.1002/em.21944>.
- [185] Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 2006;1:2315–9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- [186] Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol* 2009;128:178–83. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.299>.
- [187] Sortase-Mediated Protein Ligation: A New Method for Protein Engineering | *Journal of the American Chemical Society* n.d. <https://pubs-acsc-org.docelec.univ-lyon1.fr/doi/full/10.1021/ja039915e> (accessed July 4, 2022).
- [188] Introduction: Click Chemistry | *Chemical Reviews* n.d. <https://pubs-acsc-org.docelec.univ-lyon1.fr/doi/full/10.1021/acs.chemrev.1c00469> (accessed July 4, 2022).
- [189] Daouk J, Iltis M, Dhaini B, B chet D, Arnoux P, Rocchi P, et al. Terbium-Based AGuIX-Design Nanoparticle to Mediate X-ray-Induced Photodynamic Therapy. *Pharmaceuticals* 2021;14:396. <https://doi.org/10.3390/ph14050396>.