



HAL
open science

Vecteurs nanométriques micellaires pour l'imagerie et la radiothérapie

Sophia Godel-Pastre

► **To cite this version:**

Sophia Godel-Pastre. Vecteurs nanométriques micellaires pour l'imagerie et la radiothérapie. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASF085 . tel-04343680

HAL Id: tel-04343680

<https://theses.hal.science/tel-04343680>

Submitted on 14 Dec 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.

Vecteurs nanométriques micellaires pour l'imagerie et la radiothérapie

*Design and synthesis of multimodal micellar nanocarriers for targeted
imaging and radiosensitization*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°571 : Sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie
Graduate School : Chimie
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'**unité Médicaments et Technologies pour la Santé**
(**Université Paris-Saclay, CEA, INRAE**) et dans le **Laboratoire d'Imagerie
Biomédicale Multimodale Paris Saclay (Université Paris-Saclay, CEA,
CNRS, Inserm)**, sous la direction de **Edmond GRAVEL**, chercheur CEA, et
le co-encadrement de **Charles TRUILLET**, chercheur CEA.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 12 décembre 2022, par

Sophia GODEL-PASTRE

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Nicolas TSAPIS

Directeur de recherche CNRS, Université Paris-Saclay

Président

Céline FROCHOT

Directrice de recherche CNRS, Université de Lorraine

Rapporteur &
Examinatrice

Cécilia MÉNARD-MOYON

Directrice de recherche CNRS, Université de Strasbourg

Rapporteur &
Examinatrice

Ling PENG

Directrice de recherche CNRS, Université d'Aix-Marseille

Examinatrice

Titre : Vecteurs nanométriques micellaires pour l'imagerie et la radiothérapie

Mots clés : micelle, composé perfluoré, radiosensibilisation, imagerie TEP, nanoparticule d'or

Résumé : Plus de la moitié des patients atteints d'un cancer auront recours, durant leur prise en charge médicale, à la radiothérapie. Elle constitue une pierre angulaire des traitements anti-cancéreux et l'amélioration de son efficacité est un défi de santé publique. En effet, la radio-résistance de certains cancers, liée entre autres à l'hypoxie tumorale, constitue un réel frein à l'efficacité de la radiothérapie. Afin de pallier cet état hypoxique, le développement d'agents capables d'augmenter la perfusion en dioxygène des cellules tumorales a été considéré. Ces dernières années, les nanoparticules (organiques et inorganiques) ont suscité un intérêt considérable dans le domaine de la radiosensibilisation. Leur taille nanométrique permet un ciblage passif du tissu tumoral en exploitant les propriétés intrinsèques de la vascularisation tumorale.

Cette capacité de ciblage peut, dès lors, permettre une potentialisation des effets de la radiothérapie au plus proche de la tumeur tout en épargnant les tissus sains environnants. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse. Dans une première partie, le développement d'un vecteur nanométrique micellaire capable d'augmenter efficacement la perfusion en dioxygène de cellules tumorales de mélanome murin pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie *in vitro* est décrit. L'étude par imagerie radioactive de la biodistribution de ce vecteur nanométrique micellaire chez un modèle murin est discutée dans une seconde partie. Enfin, la complexification de ce vecteur nanométrique par l'introduction d'une nanoparticule métallique est exposée dans une dernière partie.

Title : *Design and synthesis of multimodal micellar nanocarriers for targeted imaging and radiosensitization*

Keywords : micelle, gold nanoparticles, radiosensitization, imaging, nanomedicine, radiotherapy

Abstract : Radiation therapy is a cornerstone of cancer treatment and improving its efficiency is a public health challenge. Indeed, the radioresistance of certain cancers is a real obstacle to the effectiveness of radiotherapy. Among the tumor mechanisms involved in this radioresistance phenomenon, chronic hypoxia has been identified as playing a major role. In order to overcome this hypoxic state, the development of agents capable of increasing the oxygen perfusion of tumor cells has been explored. In recent years, nanoparticles (organic and inorganic) have attracted considerable interest in the field of radiosensitization. Their nanometric size allows passive targeting of tumor tissues. This targeting capacity can, therefore, allow the effects of radiotherapy to be potentiated as close as possible

to the tumor while sparing the surrounding healthy tissue. The work presented in this thesis manuscript has been carried out in this context. In a first part, the development of a micellar nanometric vector able to efficiently increase the oxygen perfusion of murine melanoma tumor cells, in order to improve the efficiency of *in vitro* radiotherapy, is described. The radioactive imaging study of the biodistribution of this micellar nanoscale vector in a mouse model is discussed in a second part. Finally, the complexification of this nanometric vector by the introduction of a metallic nanoparticle is presented in a last part.

Remerciements

Je remercie avant tout les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail.

Je voudrais remercier, Frédéric Taran, chef du Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, pour m'avoir permis d'effectuer ces trois années dans les meilleures conditions possibles. En ce sens, je remercie aussi Vincent Lebon, chef du Service Hospitalier Frédéric Joliot où j'ai réalisé une partie de ces travaux de thèse. Je tiens aussi à remercier Éric Doris, directeur du laboratoire Tritium, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je profite de cette occasion pour exprimer mon entière gratitude à mon directeur de thèse Edmond Gravel. Durant ces trois années à tes côtés j'ai appris le métier de chercheur et ton soutien (bien que discret) m'a permis de tenir la distance. Je te remercie pour ta patience et ta pédagogie. Nos blagues vont me manquer. Pour tout ça, et bien plus, je te serai toujours reconnaissante Edmundo.

Je remercie aussi mon co-directeur de thèse Charles Truillet pour ses conseils et sa disponibilité.

Mes remerciements s'adressent également à Erika Porcel avec qui j'ai collaboré durant mon projet de thèse. J'ai eu la chance de croiser ta route et j'en suis très heureuse. Tes conseils avisés m'ont été d'une grande aide. J'ai hâte de continuer l'aventure avec toi.

Je remercie le service analyse du SCBM pour leur contribution à mon travail de thèse. Merci à vous David, Sabrina, Amélie et Tim d'avoir répondu présents quand j'en avais besoin. De plus, je tiens à remercier Elodie Barruet qui a réalisé les dosages ICP-MS, Gabriel Ramasamy pour les séances d'irradiation à l'Institut Curie et Chantal Faux pour sa disponibilité et son aide précieuse dans mon combat contre ma phobie administrative.

Je remercie tous les collègues du SCBM qui ont partagé mon quotidien pendant ces trois années fortes en émotions. Je souhaite, cependant, exprimer ma gratitude à quelques personnes en particulier. Cristelle, tu es au top. Merci pour ton écoute et tes conseils. Nos pauses vont me manquer. Merci à Claire, ton soutien au labo et ton humour m'ont aidée à traverser des mauvais moments. Je suis très contente de t'avoir rencontrée. Tu vas me manquer. Merci aux zouz du tritium de m'avoir supportée ces dernières années (certains plus que d'autres). Votre bienveillance et votre bonne humeur ont largement contribué au bon déroulement de ma thèse. Ca va me faire vide sans vous au labo. Je remercie les anciens post-docs du tritium (Manu, Marco, Etienne, Yordenca) avec qui j'ai apprécié discuter et rigoler. De même, j'aimerais tout particulièrement remercier Lucie et Lucas, deux rencontres marquantes de ma première année de thèse. Je remercie aussi bien évidemment les thésards et post-docs du C14 (passés et présents), on a quand même bien rigolé. Merci à Marie, mon gars sûr du SHFJ. Merci pour nos discussions, nos craquages et nos délires. Je te remercie pour ton aide dans le traitement des données de biodistribution et pour ton soutien sans faille, de manière générale. Au SHFJ, je tenais aussi à remercier Caroline et Soizic pour leur aide et leur joie de vivre.

Dans ce dernier paragraphe j'aimerais remercier mes proches. Un merci tout particulier à Aurélie que j'ai rencontré en master de Chimie et sans qui je n'en serai pas là aujourd'hui. De même, je tenais à spécifiquement remercier Pauline, ma plus vieille amie. Tu as toujours été là et j'espère que tu le seras toujours. Merci à tous mes copains qui m'ont supportée durant ces trois

dernières années et qui répondent encore présents après tout ce temps. Je souhaitais aussi remercier du fond du coeur Yann, mon amoureux. Ton soutien et ta patience me font avancer au jour le jour. Je te suis tellement reconnaissante de m'aimer.

Je me dois aussi de remercier ma soeur, Selma, sans qui je n'aurai jamais pu continuer. Tu as toujours su m'écouter et me conseiller. On a poussé au coeur du magma et malgré tout ça, on ne s'est jamais quittées. Tu es mon roc, je n'aurai jamais pu tenir sans toi à mes côtés.

Enfin, je voulais remercier mon père, mes grands parents et mes tantes pour leur soutien. Un merci tout personnel à mon père qui m'a toujours encouragée à faire de grandes études. Tu vois, j'ai fait tout comme tu m'as dit. Pour une fois.

Enfin, je dédie ce manuscrit à ma mère qui, je l'espère, aurait été fière.

Table des matières

Introduction générale	1
I. Le cancer, une pathologie multifactorielle complexe	3
A. Définition du cancer	3
B. Caractéristiques communes à tous les types de cancer.....	3
C. Microenvironnement tumoral	6
D. Diagnostic du cancer	7
E. Prise en charge du cancer à l'hôpital	7
II. La radiothérapie, principes et limitations	7
A. Radiothérapie : différentes sources.....	7
B. Principes physiques et biologiques de la radiothérapie externe	10
III. De l'intérêt des composés perfluorés en tant qu'adjuvants de la radiothérapie	27
A. Présentation physico-chimique du fluor et des composés perfluorés.....	27
B. Les composés perfluorés comme moyen de transport du dioxygène <i>in vivo</i>	29
IV. Problématique de thèse.....	31
Chapitre 1	33
Micelles perfluorées comme agent de radiosensibilisation.....	33
I. Les architectures nanoparticulaires : cas particulier des micelles.....	35
A. Classification des nanoparticules.....	35
B. Interaction des nanoparticules avec le milieu biologique.....	37
C. Les nanoparticules dans le traitement du cancer	38
D. Importance de la chimie de surface des nanoparticules.....	40
E. Cas particulier des micelles	41
F. Intérêt des micelles en milieu biologique	44
II. État de l'art sur les nanoparticules perfluorées à visée anti-cancéreuse.....	45
III. Objectifs du chapitre	49
IV. Résultats et discussion.....	51
A. Synthèse des amphiphiles perfluorés et formulation sous forme de micelle.....	51
B. Estimation de la CMC des micelles PFTD-PEG 100 %	53
C. Étude du potentiel de solubilisation du dioxygène des micelles perfluorées	55
D. Étude de la cytotoxicité des micelles PFTD-PEG sur cellules B16F10	59
E. Étude du devenir intracellulaire des micelles PFTD-PEG	59
F. Étude du potentiel radiosensibilisant des micelles perfluorées sur cellules B16F10	75
V. Conclusion du chapitre.....	81
Chapitre 2	83

Étude de la cinétique de distribution des micelles perfluorées par imagerie TEP	83
I. L'imagerie TEP, un outil préclinique précieux	85
A. Principe physique de l'imagerie TEP	85
B. Caractéristiques du scanner TEP et principe de la technique	87
C. Limitations de l'imagerie TEP	88
D. Radiotraceurs couramment utilisés en imagerie TEP, cas particulier du ^{89}Zr	90
E. Chélation du radiotraceur ^{89}Zr	91
II. Objectifs du chapitre	96
III. Résultats et discussion.....	97
A. Synthèse de l'amphiphile PFTD-DFO	97
B. Formulation de micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10.....	100
C. Radiomarquage des micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO au ^{89}Zr	103
D. Évaluation de la cytotoxicité sur modèle cellulaire B16F10.....	104
E. Étude de la tolérance des micelles PFTD-PEG sur souris C57BL/6.....	104
F. Étude de la biodistribution des micelles perfluorées sur souris C57BL/6.....	105
G. Détermination des paramètres pharmacocinétiques des micelles perfluorées.....	113
IV. Conclusion de chapitre	116
Chapitre 3	119
Les nanoparticules d'or comme agent de radioamplification	119
I. Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d'or.....	121
A. Voies de synthèse des nanoparticules d'or sphériques	124
B. Fonctionnalisation des nanoparticules d'or	127
C. Biocompatibilité des nanoparticules d'or	128
D. Nanoparticules d'or et ciblage de la tumeur	129
E. Interactions entre la nanoparticule d'or et la cellule tumorale	133
II. État de l'art des nanoparticules d'or pour l'amélioration de la radiothérapie	136
III. Objectifs de chapitre.....	138
IV. Résultats et discussion.....	139
A. Synthèse des nanoparticules d'or et encapsulation au sein des micelles perfluorées	139
B. Évaluation de la cytotoxicité des NpAu@PFTD-PEG	148
C. Évaluation de l'internalisation cellulaire des NpAu@PFTD-PEG	149
D. Étude de la toxicité clonogénique des NpAu@PFTD-PEG	150
E. Évaluation du potentiel radioamplificateur des NpAu@PFTD-PEG	151
V. Conclusion du chapitre.....	152
Conclusion générale	155

Table des matières

Bibliographie	161
Liste des figures	173
Experimental section	181
General procedures	183
Chapter 1	185
Chapter 2	197
Chapter 3	227
Annexes	231

Liste des abréviations

AAS	Atomic absorption spectroscopy
ATG	Analyse thermogravimétrique
AUC	Area under curve
BGO	Germanate de bismuth
CMC	Concentration micellaire critique
CPP	Cell penetrating peptide
DCM	Dichlorométhane
DEF	Dose enhancement factor
DFO	Desferrioxamine
DFT	Density functional theory
DI	Dose injectée
DMF	Diméthylformamide
DMR	Dose modifying ratio
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOI	Depth of interaction
DPBS	Dulbeccos's phosphate buffer saline
DSPE	Diastéaroylphosphatidyléthanolamine
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EPR	Enhanced permeability and retention
ICP-AES	Inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectroscopy
IRM	Imagerie par résonance magnétique
iTLC	Instant thin layer chromatography
LC-MS	Liquid chromatography – mass spectroscopy
LOR	Line of response
LSO	Lutéium oxyorthosilicate dopé au cérium
MET	Microscopie électronique à transmission
PDI	Polydispersity index
PE	Plating efficiency
PEG	Poly(éthylène glycol)
PFH	Perfluorohexane
PFMC	Perfluorométhylcyclohexane
PFTD	1 <i>H</i> ,1 <i>H</i> -perfluorotétradécanol
RER	Radiation enhancement ratio
ROS	Reactive oxygen species
SER	Sensitization enhancement ratio
SF	Surviving fraction
SPR	Surface plasmon resonance
SSC	Side scattered channel
TA	Température ambiante
TAC	Time activity curve
TEP	Tomographie à émission de positon
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane

TIPS	Triisopropylsilane
TOAB	Bromure de tétraoctylammonium
u.a.	Unité arbitraire
UV	Ultraviolet
VOI	Volume of interest

Introduction générale

Introduction générale

I. Le cancer, une pathologie multifactorielle complexe

A. Définition du cancer

Selon la définition de l'OMS, le terme général de « cancer » s'applique à un grand groupe de maladies pouvant toucher n'importe quelle partie de l'organisme et dont la caractéristique principale est la prolifération rapide et incontrôlée de cellules anormales qui, au-delà de leur délimitation habituelle, peuvent envahir des parties adjacentes de l'organisme, puis essaimer dans d'autres organes (métastase). Cette pathologie multifactorielle constitue la deuxième cause de mortalité mondiale.

B. Caractéristiques communes à tous les types de cancer

Dans les années 2000, Hanahan *et al.* ont mis en évidence les caractéristiques communes à tous les types de cancer¹. En 2011, ces caractéristiques ont été mises à jour, mettant en avant de nouveaux mécanismes tumoraux² (fig. 1). Parmi ces caractéristiques, on retrouve :

- indépendance des cellules tumorales vis-à-vis des signaux de prolifération cellulaire : Tandis que les cellules saines nécessitent des signaux de croissance exogènes pour sortir du stade quiescent et débiter leur prolifération, les cellules tumorales se démarquent par leur indépendance aux stimuli mitogènes, induisant alors une prolifération anarchique et incontrôlée.
- échappement à l'apoptose : L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, constitue une des modalités les plus importantes de mort cellulaire. Alors que la cellule saine, une fois activée par des stimuli physiologiques pro-apoptotiques, entre en apoptose (altération de l'intégrité de la membrane cellulaire, destruction du cytosquelette, dégradation des chromosomes, fragmentation du noyau cellulaire...), il a été démontré que les cellules tumorales ont acquis une résistance au processus apoptotique par différentes stratégies telles que la mutation du gène suppresseur de tumeurs *p53*, l'hyper-expression d'oncogènes...
- insensibilité des cellules tumorales vis-à-vis des signaux anti-prolifératifs : Au sein d'un tissu cellulaire sain, nombre de signaux anti-prolifératifs permettent de maintenir une quiescence cellulaire ainsi qu'une homéostasie optimales. Ces signaux agissent au niveau de la membrane cellulaire, via fixation sur des récepteurs couplés à des effecteurs internes, induisant, *in fine*, un blocage de la prolifération cellulaire. Au sein des cellules

¹ Hanahan, D. *et al.*, *Cell*, **2000**, *100*, 57–70

² Hanahan, D. *et al.*, *Cell*, **2011**, *144*, 646–674

Introduction générale

tumorales, plusieurs mécanismes entrent en jeu afin de perturber ces voies de signalisation rendant donc la cellule tumorale insensible aux facteurs anti-prolifératifs.

- capacité proliférative illimitée : De par leur auto-suffisance en signaux de croissance, leur insensibilité aux facteurs anti-prolifératifs ainsi que leur échappement à l'apoptose, les cellules tumorales présentent une capacité de réplication sans limite, indépendamment de leur environnement et des stimuli externes.
- néoangiogénèse : Les cellules tumorales sont capables de détourner la vascularisation de l'organisme afin de se supplémenter en oxygène et nutriments nécessaires à leur survie. Ce phénomène est appelé néoangiogénèse. De nouveaux vaisseaux sont alors formés à partir de vaisseaux pré-existants afin de permettre le développement tumoral. Ces néo-vaisseaux présentent un aspect anormal, immature et fenestré.
- invasion tissulaire et métastase : Les cellules tumorales, au cours de leur développement, peuvent envahir les tissus voisins en migrant par la vascularisation sanguine ou lymphatique pour former une métastase.
- échappement au système immunitaire : Les cellules tumorales présentent des capacités d'immunoévasion, limitant ainsi la réaction immunitaire délétère au développement tumoral.
- prolifération et réplication illimitées : Il a été prouvé que les télomères, répétitions tandem de motifs hexanucléotidiques à l'extrémité des chromosomes, étaient responsables de la protection du patrimoine génétique au niveau chromosomique, en limitant les risques de soudure/fusion terminale des chromosomes (chromosomes dicentriques) qui menacent la viabilité cellulaire. Chez les cellules non immortalisées, les télomères raccourcissent d'une génération cellulaire à l'autre, induisant obligatoirement la mort cellulaire à partir d'un stade générationnel précis (disparition des télomères). Chez les cellules tumorales, les télomérases, ADN polymérases responsables de la synthèse des télomères, présentent une activité anormalement accrue. Ces enzymes compensent en permanence le raccourcissement inévitable des télomères, permettant d'éviter leur disparition et limitant, de fait, le déclenchement des phénomènes de sénescence ou d'apoptose qui en découleraient.
- phénomène inflammatoire lié au développement tumoral : Dans la littérature, le développement de tumeurs a été décrit comme étant favorisé, de manière paradoxale, par la réponse inflammatoire au niveau du microenvironnement tumoral. En effet, La progression néoplasique serait induite par certains facteurs de croissance et facteurs de

survie sécrétés par les cellules immunitaires présentes dans l'environnement tumoral (macrophages, mastocytes, lymphocytes B et T...).

- instabilité génétique et mutation : La progression tumorale a été rapidement associée à une incidence importante de mutations génétiques, induisant l'acquisition d'un phénotype résistant aux signaux anti-prolifératifs. Cette propension à développer des mutations est, entre autres, liée à une sensibilité accrue aux agents mutagènes des cellules tumorales.
- reprogrammation du métabolisme énergétique : Les cellules tumorales ont développé la faculté d'exploiter le glucose afin de générer de l'ATP, source d'énergie cellulaire, même en conditions aérobies. Il est à noter que chez les cellules saines, la glycolyse ne se réalise qu'en conditions anaérobies, la cellule saine favorisant en conditions aérobies la chaîne de respiration mitochondriale. L'exploitation accrue du glucose chez les cellules tumorales, on parle alors de glycolyse aérobie (effet Warburg), peut être rationalisée par le fait que le métabolisme du glucose génère des macromolécules impliquées dans plusieurs mécanismes biosynthétiques tels que la synthèse d'acides aminés et de nucléosides nécessaires à une prolifération cellulaire active.

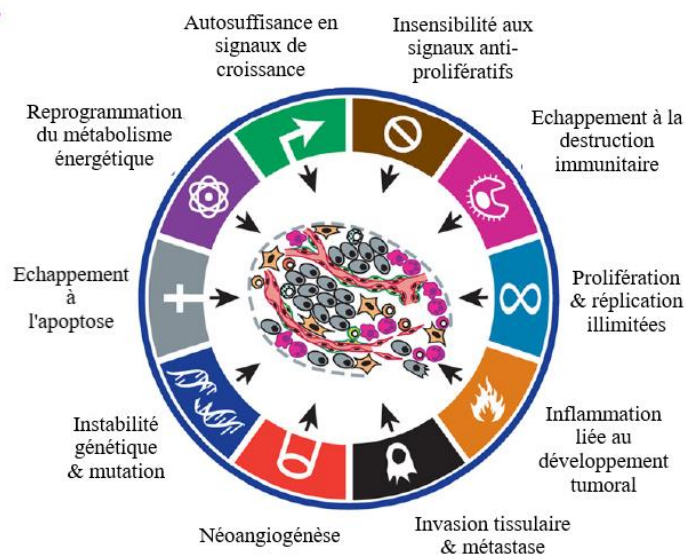


Figure 1. Caractéristiques communes à tous les types de cancer².

Introduction générale

C. Microenvironnement tumoral

Une matrice cellulaire et tissulaire complexe est nécessaire aux tumeurs pour leur développement et ses composantes influencent grandement le devenir de la tumeur³. Au sein du tissu tumoral, on retrouve les cellules tumorales et le stroma tumoral, provenant de l'hôte et dont l'existence est induite par la présence des cellules cancéreuses. Parmi les éléments que l'on retrouve au sein de ce stroma tumoral, les néovaisseaux jouent un rôle critique dans la supplémentation en dioxygène et en nutriments des cellules tumorales. Ces vaisseaux, issus du phénomène de néoangiogénèse, possèdent une architecture différente des autres vaisseaux et capillaires, présentant une bordure endothéliale incomplète, une membrane basale le plus souvent absente, des péricytes et cellules musculaires lisses raréfiés. En plus des néo-vaisseaux, le stroma tumoral, matrice nourricière de la tumeur, est majoritairement composé de structures conjonctives et de cellules immunitaires (fig. 2). L'existence au sein de ces néo-vaisseaux sanguins de jonctions lâches permet l'extravasation de macromolécules telles que les nanoparticules.

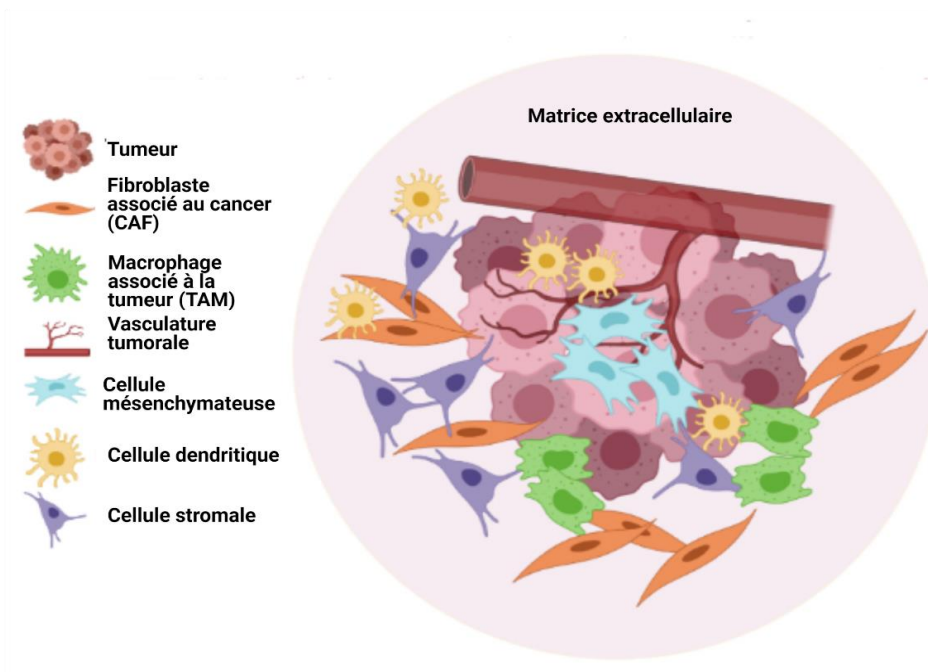


Figure 2. Le microenvironnement tumoral.

³ Whiteside, T. L. *et al.*, *Oncogene*, **2008**, 27, 5904–5912

D. Diagnostic du cancer

Les tumeurs modifient, pendant leur développement, les intégrités biologique, physiologique et tissulaire⁴. Ce comportement tumoral est exploitable en imagerie afin de diagnostiquer la présence de la-dite tumeur. Parmi les techniques d'imagerie non invasives permettant de mettre en avant la présence d'une tumeur, on retrouve le scanner à rayon X, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et la Tomographie à Emission de Positons (TEP). En dernier lieu, la biopsie permet d'obtenir une information précise quant au type de cancer et de son stade. Ces techniques permettent aux soignants d'obtenir un diagnostic précis et donc d'orienter au mieux la prise en charge du patient.

E. Prise en charge du cancer à l'hôpital

En fonction du type et de l'avancée du cancer, plusieurs schémas thérapeutiques sont envisagés : les traitements locorégionaux tels que la chirurgie et la radiothérapie et les traitements systémiques (chimiothérapie, immunothérapie ou hormonothérapie). La chirurgie reste, encore aujourd'hui, le premier traitement proposé aux patients dont la tumeur est résécable. En 2015, environ 80 % des nouveaux cas de cancer nécessitaient une opération chirurgicale⁵. Au même titre que la chirurgie, la radiothérapie a une place définie dans l'arsenal thérapeutique du soignant qui y aura recours dans la prise en charge médicale d'environ 50 % des patients atteints d'un cancer⁶. En complément des rayonnements, et si le type cancéreux ainsi que son évolution le permettent, un traitement par chimiothérapie peut être envisagé. Enfin, dans certains types de cancer, l'immunothérapie et l'hormonothérapie peuvent être envisagées. Ainsi, parmi ces différentes stratégies de prise en charge des cancers, la radiothérapie constitue un traitement pivot dans la lutte contre le cancer et l'amélioration de son efficacité représente un réel défi de santé publique.

II. La radiothérapie, principes et limitations

A. Radiothérapie : différentes sources

Le terme radiothérapie regroupe tous les rayonnements pouvant avoir une efficacité thérapeutique sur le développement du cancer. La radiothérapie repose sur l'exposition de tissus tumoraux à des rayonnements énergétiques, ces rayonnements provoquant des lésions au sein

⁴ García-Figueiras, R. *et al.*, *Insights Imaging*, **2019**, *10*, 28

⁵ Sullivan, R. *et al.*, *Lancet Oncol.*, **2015**, *16*, 1193–1224

⁶ Baskar, R. *et al.*, *Int. J. Med. Sci.*, **2012**, *9*, 193–199

Introduction générale

des cellules tumorales menant à la mort cellulaire. Les effets des rayonnements sont multiples, à des échelles différentes.

1. Source externe

La radiothérapie la plus couramment utilisée en ambulatoire est la radiothérapie externe permettant un traitement local de la tumeur. Les rayonnements les plus couramment utilisés sont les rayons X. Les rayons X sont produits après bombardement d'électrons sur une cible de tungstène. Ces électrons bombardés sont déviés et freinés par le champ électrique des noyaux de tungstène (force d'attraction de Coulomb). L'énergie de décélération observée est alors émise sous forme d'un rayonnement, le rayon X. Ce phénomène s'appelle le rayonnement de freinage ou *bremsstrahlung*⁷. Les rayonnements γ produits par une source radioactive scellée (^{137}Cs , ^{60}Co ...) sont aussi employés en radiothérapie. Enfin, d'autres modalités d'irradiation, plus récentes, ont été développées comme les faisceaux d'électrons, les faisceaux de protons ou les ions carbonés.

Plusieurs types de radiothérapie externe ont vu le jour ces dernières années, que ce soit la radiothérapie externe classique (2D), la radiothérapie conformationnelle (tridimensionnelle ou avec modulation d'intensité) ou la radiothérapie stéréotaxique. Les techniques d'irradiation ont beaucoup évolué au cours des années, toujours dans le but de limiter au maximum l'exposition des tissus sains adjacents à la tumeur.

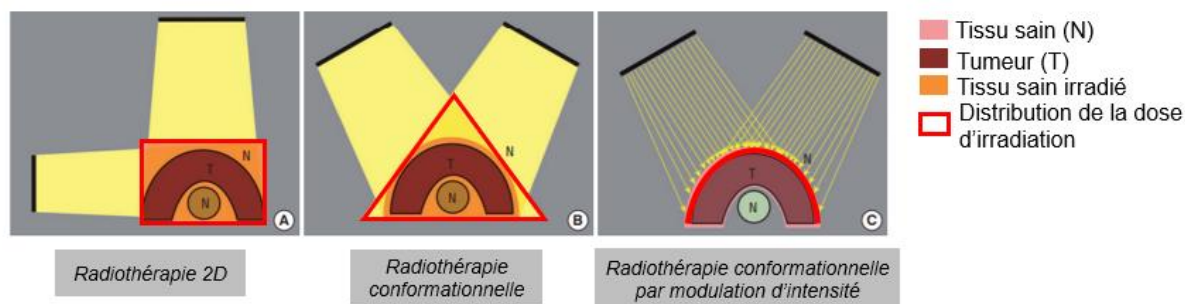


Figure 3. Différentes modalités de radiothérapie externe⁸.

Ainsi, tandis que la radiothérapie 2D induisait une exposition assez importante des tissus sains environnants, la radiothérapie conformationnelle a permis un réel progrès dans la prise en charge des cancers. En effet, en faisant correspondre le volume irradié au volume de la tumeur, l'impact sur les tissus sains environnants est limité sans totalement être supprimé. Une des

⁷ Khan, F. M. *et al.*, Khan's the physics of radiation therapy. 5th edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer; **2014**, 572 pages

dernières avancées dans le domaine est la radiothérapie conformationnelle par modulation d'intensité dans laquelle le rayon X incident est transformé en une multitude de petits faisceaux de photons X permettant, dès lors, une modulation du débit de dose délivré par chacun des faisceaux afin de protéger au mieux les tissus sains⁸ (fig. 3).

2. Source interne

Il existe un autre type de radiothérapie, la radiothérapie interne où la source d'irradiation est directement introduite dans la tumeur ou à proximité de celle-ci. La source d'irradiation correspond généralement à une entité radioactive capable d'émettre un rayonnement fortement ionisant de courte portée telle que les émetteurs β^- , α ou des entités qui en se désexcitant émettent des rayons X ou γ . Ainsi, la dose de rayonnement est forte au niveau du site tumoral et la courte portée permet de minimiser au maximum les effets indésirables sur les tissus sains environnants. Parmi les sources radioactives couramment utilisées, on recense l'iridium 192, l'iode 125, le lutetium 177 ou encore le palladium 103. Selon les recommandations, plusieurs types de cancer peuvent être traités par radiothérapie interne ou curiethérapie (cancer de la prostate, cancer du col de l'utérus, cancer de l'œsophage...). Plusieurs types de curiethérapie existent : curiethérapie interstitielle, curiethérapie endoluminale, curiethérapie endocavitaire etc. en fonction du type de cancer à traiter.

Dans la suite de ce manuscrit, nous développerons plus en détails la radiothérapie externe. Cependant, il est à noter que les mécanismes biologiques impliqués dans l'efficacité de la radiothérapie interne sont similaires à ceux de la radiothérapie externe.

⁸ Choi, W. H. *et al.*, *J. Korean Med. Sci.*, **2016**, *31*, S75–87

Introduction générale

B. Principes physiques et biologiques de la radiothérapie externe

1. Principes physiques de l'interaction rayon-matière

Les rayonnements utilisés en radiothérapie sont de natures multiples, ils peuvent être directement ionisants lorsqu'ils sont eux-mêmes chargés (ions lourds, protons, électrons) ou indirectement ionisants s'ils sont électriquement neutres (photons, neutrons) mais qu'ils vont générer des électrons secondaires à l'origine de l'effet radiothérapeutique. Par exemple, lorsqu'un photon est en interaction avec un atome du milieu, il entre en collision avec les électrons situés sur les couches de valence du noyau atomique, ce qui permet de générer un électron secondaire et un photon d'énergie moins élevée. On appelle ce phénomène l'effet Compton (fig. 4).

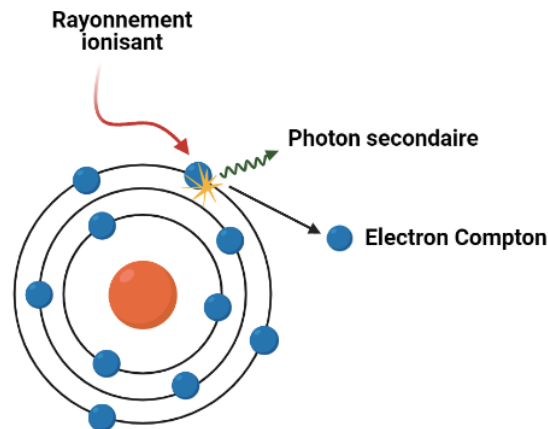


Figure 4. Effet Compton

Un phénomène compétitif peut intervenir quand un rayonnement photonique entre en interaction avec un atome du milieu : on parle d'effet photoélectrique (fig. 5). L'effet photoélectrique se déroule en deux temps, tout d'abord, le photon incident arrache un électron lié de l'atome. Il s'agit généralement d'un électron appartenant aux couches les plus internes L ou K. L'atome qui a perdu un de ses électrons internes se trouve dans un état excité. Un électron d'une couche plus externe vient occuper la lacune laissée par l'électron éjecté, ce qui libère de l'énergie. On a alors deux cas de figure : l'énergie générée peut causer l'émission d'un photon de faible énergie ou cette énergie peut être transmise à un électron de la couche de valence qui sera éjecté de l'atome, on parle alors d'électron Auger. On peut avoir un effet cascade de génération d'électrons Auger, ce qui permet d'obtenir à partir d'un même rayonnement ionisant une multitude d'électrons secondaires.

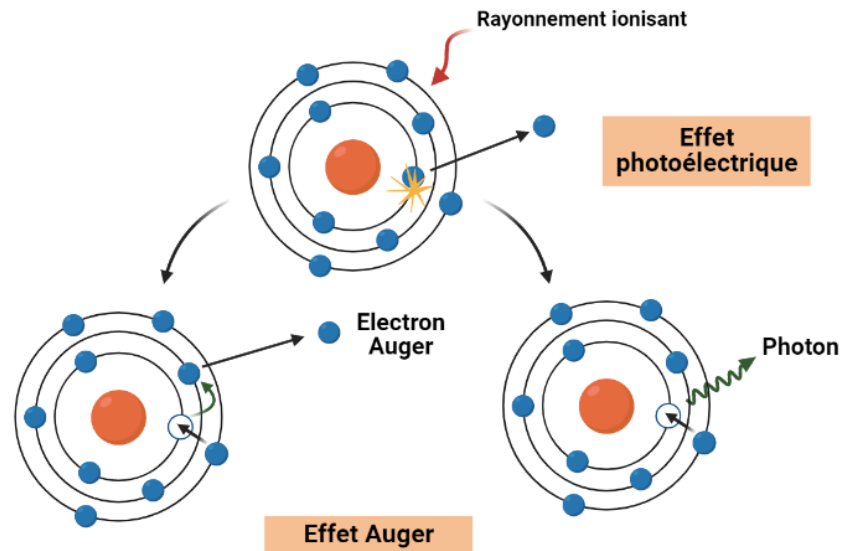


Figure 5. Effet photoélectrique et effet Auger.

Enfin, si le photon incident possède une énergie excédentaire de 1,022 MeV au voisinage d'un noyau atomique, il y a création d'une paire de particule-antiparticule (électron-positon). On a alors génération d'électrons secondaires *de novo* issus de la disparition du photon incident par conversion en électron et positon de 511 keV chacun. On parle de production de paire (fig. 6).

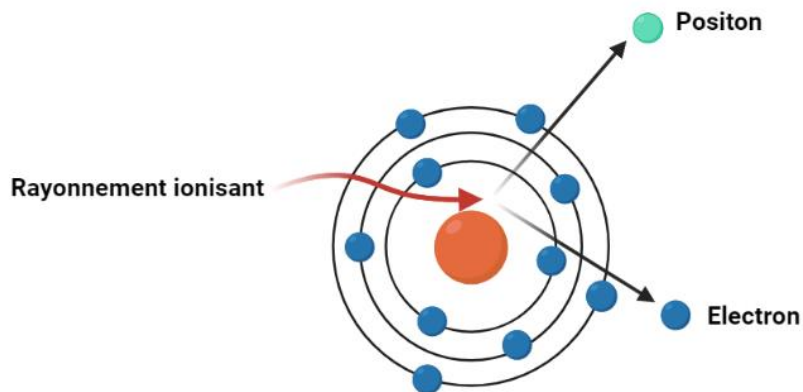


Figure 6. Phénomène de production de paire.

La probabilité d'occurrence de ces phénomènes électroniques est différente en fonction de l'atome considéré. La probabilité d'absorption photoélectrique est directement proportionnelle à Z^n/E^3 où Z est le numéro atomique de l'atome ou métal considéré, E l'énergie du photon incident et n varie entre 3 et 4 en fonction de la nature du rayon incident. Ainsi, plus l'atome sera lourd et l'énergie du rayonnement faible, plus la probabilité de génération d'électrons secondaires par effet photoélectrique sera importante. L'effet Compton est prédominant dans les tissus mous et indépendant du numéro atomique Z de l'atome. Pour ce qui est du phénomène

Introduction générale

de production de paire, sa probabilité d'occurrence est proportionnelle à l'énergie du photon incident et augmente en fonction de Z^2 (fig. 7) Enfin, dans le cas des effets photoélectrique et Compton, l'énergie du rayonnement incident doit être légèrement supérieure à l'énergie de liaison de l'électron⁹.

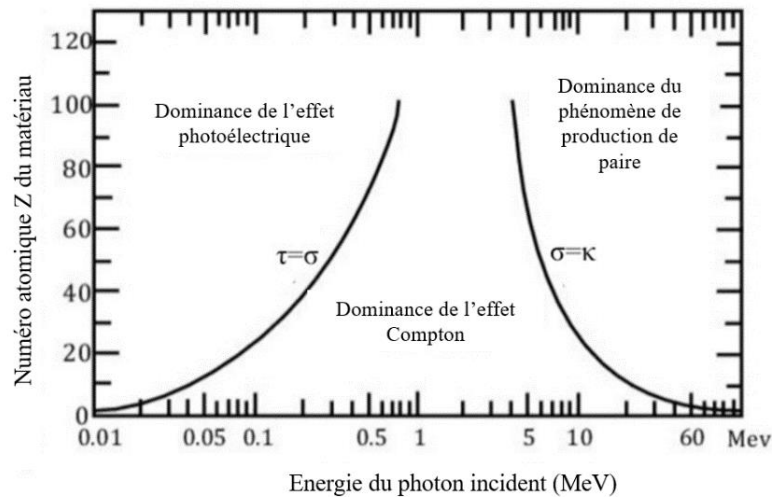


Figure 7. Diagramme d'interaction des photons avec la matière en fonction de l'énergie incidente⁹

Les rayonnements ionisants sont caractérisés par plusieurs paramètres : la dose absorbée, le débit de dose et le transfert linéique d'énergie.

La dose absorbée, ou *Radiation Absorbed Dose* (RAD), est définie comme la quantité d'énergie (en Joule, J) déposée par unité de masse par un rayonnement ionisant. Elle s'exprime en Gray (Gy) qui correspond à 1 J kg^{-1} .

Le débit de dose correspond à la dose absorbée par unité de temps. Il s'exprime en Gray/seconde (Gy s^{-1}).

Les rayonnements ionisants sont aussi caractérisés par leur Transfert Linéique d'Énergie (TLE) qui correspond à l'énergie transmise par une particule ionisante traversant la matière par unité de distance. On peut alors distinguer les rayonnements ionisants présentant un faible TLE, tels que les rayons X ou rayons γ ¹⁰, des rayonnements ionisants à TLE important tels que les rayonnements α , les ions carbonés ou les protons. Plus le TLE d'un rayonnement est faible, plus le nombre d'ionisations au sein de la cellule irradiée est faible et donc plus l'efficacité de la radiothérapie sera dépendante de facteurs exogènes (pression partielle en O_2 , position dans le cycle cellulaire...).

⁹ Knoll, G, Radiation Detection and Measurement, 4th edition, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010, 816 pages

¹⁰ Hunter, N. et al., J. Radiol. Prot., 2009, 29, 5–21

De plus, durant son interaction avec la matière, le rayonnement ionisant dépose de l'énergie dans les tissus qu'il traverse. En fonction de la nature du rayonnement ionisant, l'énergie déposée durant son parcours peut être plus ou moins importante. Il a ainsi pu être démontré que tandis que les rayonnements X déposent de l'énergie en continu jusqu'à perte totale de leur énergie incidente, les protons ou les ions carbonés ne déposent la majorité de leur énergie qu'à une distance finie dans la matière. Le tracé du dépôt d'énergie en fonction de la profondeur d'interaction avec la matière forme un pic nommé pic de Bragg (fig. 8). Ce paramètre est capital, l'objectif de la radiothérapie étant toujours de limiter l'exposition des tissus sains et donc de limiter le dépôt d'énergie au sein des tissus environnant la zone tumorale. Ainsi, ces nouvelles modalités d'irradiation permettant de diminuer grandement l'impact sur les tissus sains attirent de plus en plus l'attention de la communauté scientifique^{11,12}

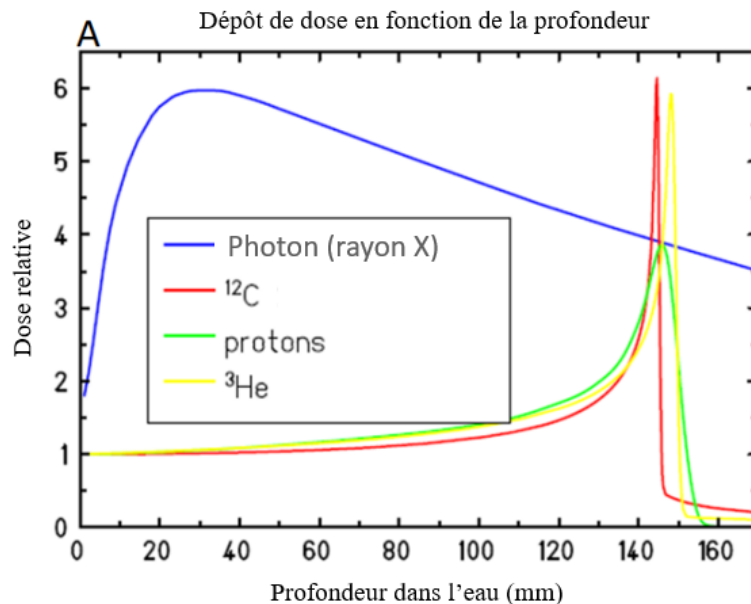


Figure 8. Dépôt de dose en fonction de la profondeur dans l'eau¹¹.

¹¹ Tinganelli, W. *et al.*, *Cancers*, **2020**, *12*, 3022

¹² Thariat, J. *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*, 133

2. Mécanismes biologiques de la radiothérapie

L'efficacité de la radiothérapie repose sur des mécanismes biologiques connus d'interaction entre les rayonnements ionisants et les molécules intracellulaires.

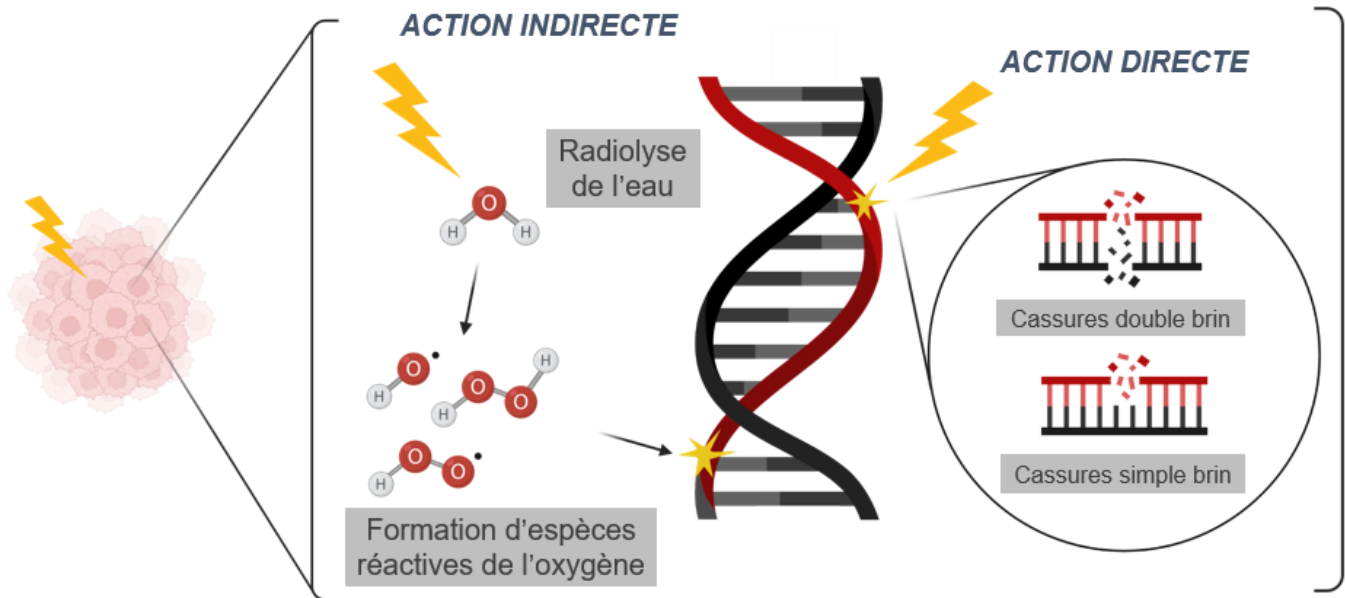


Figure 9. Actions directe et indirecte des rayonnements ionisants sur la molécule d'ADN.

En effet, quand un rayonnement traverse les cellules, il ionise les biomolécules sur son passage, induisant des modifications chimiques. Les effets biologiques de ces ionisations peuvent être regroupés en deux sous-catégories (fig. 9):

Domages directs : Le rayonnement ionisant interagit avec la matière, induisant la formation d'électrons secondaires qui vont, eux, interagir directement avec l'ADN, provoquant des lésions létales. En effet, le rayonnement ionisant incident peut provoquer des cassures simple brin, des cassures double brin, des altérations des bases nucléotidiques ou sucres *via* oxydation, des ponts intra-brin ou inter-brin ou encore des ponts entre ADN et protéines...)¹³ (fig. 10).

¹³ Lomax, M. E. *et al.*, *Clin. Oncol.*, **2013**, 25, 578–585

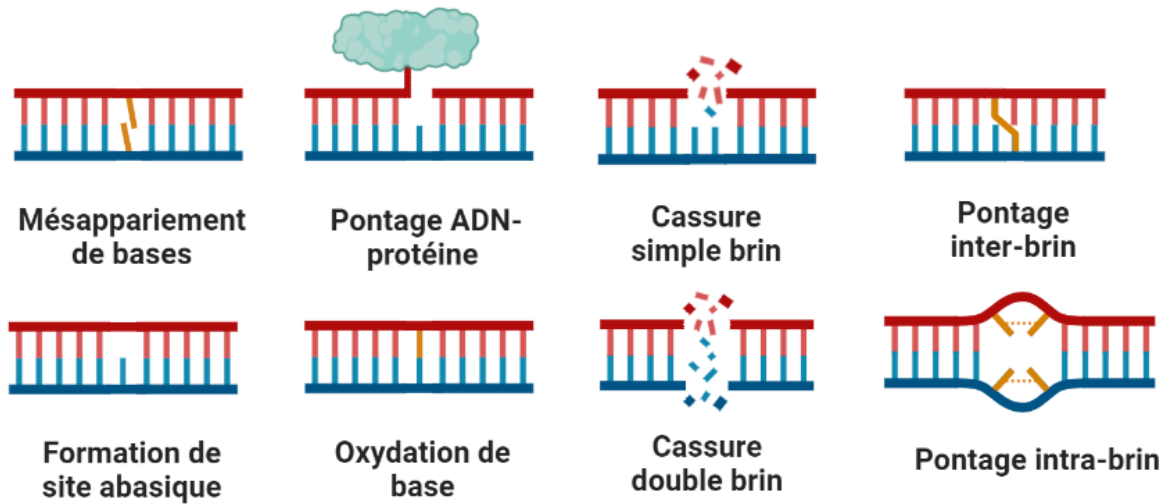
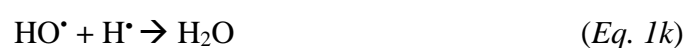
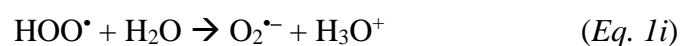


Figure 10. Lésions directes à l'ADN.

- Dommmages indirects : Le rayonnement ionisant interagit alors avec les molécules environnantes dans la cellule induisant la formation de radicaux libres. Un radical libre peut être défini comme une espèce chimique possédant un électron non apparié sur sa couche externe, lui conférant une très grande réactivité chimique. De par la teneur en eau extrêmement élevée au sein des organismes vivants, les molécules d'eau constituent la principale source de radicaux libres de la cellule tel que :



Introduction générale



Le photon incident peut induire l'ionisation des molécules d'eau (Eq. 1a) ou leur simple excitation (Eq. 1b). Tandis que les molécules d'eau excitées H_2O^* se dissocient en radicaux hydrogènes et hydroxyles (H^\bullet et HO^\bullet) (Eq. 1c), les molécules d'eau ionisées, quant à elles, forment des radicaux hydroxyles HO^\bullet ainsi que des protons H^+ (Eq. 1d). Il est à noter que la quantité d'oxygène présent dans la cellule est aussi déterminante pour la synthèse de ces espèces hautement réactives. Ainsi, en présence de dioxygène, la recombinaison du dioxygène avec les radicaux hydrogènes H^\bullet a lieu, générant des radicaux hydroperoxydes HOO^\bullet (Eq. 1g) instables car très réactifs. HOO^\bullet est rapidement déprotonné pour donner le radical superoxydes $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Eq. 1i). Le dioxygène moléculaire peut aussi réagir avec les électrons libres pour former le radical superoxyde (Eq. 1h). Dès lors, la multiplicité de possibilités de recombinaison des radicaux oxygénés induit la formation de différentes espèces chimiques durant le phénomène de radiolyse de l'eau. En effet, durant ce processus, la production d'ions réactifs (H_2O^+ , HO^- , H^+), d'espèces radicalaires (H^\bullet , HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, HOO^\bullet) et d'espèces moléculaires (H_2O_2 , H_2) est observée¹⁴.

Parmi les espèces radicalaires générées sur le trajet du rayonnement ionisant, les radicaux hydroxyles HO^\bullet ont été identifiés comme jouant un rôle prépondérant dans l'efficacité de la radiothérapie. En effet, il a été démontré que la majorité des lésions indirectes de l'ADN était imputable à la présence de radicaux HO^\bullet ¹⁵. Ces radicaux hydroxyles électrophiles altèrent donc l'intégrité structurale de l'ADN, soit par abstraction d'un hydrogène au niveau du sucre, soit par oxydation des bases *via* addition sur une double liaison. Ces phénomènes traumatiques induisent, dans un second temps, la formation d'adduits intra- et inter-brins.

D'un point de vue cinétique, on distingue 4 grandes étapes impliquées dans la production de dommages biologiques par action indirecte des rayonnements ionisants:

- *Phase physique* : L'interaction des photons incidents avec la matière produit des électrons secondaires énergétiques. Cette étape apparaît entre 10^{-18} à 10^{-12} s post-irradiation.

¹⁴ Pinel, S., Thèse de doctorat : Conséquences de l'érythropoïétine recombinante humaine sur l'hypoxie tumorale et l'efficacité de la radiothérapie sur deux gliomes malins humains xenogreffés, Université de Lorraine, Juin, **2004**

¹⁵ Breen, A. P. *et al.*, *Free Radic. Biol. Med.*, **1995**, 18, 1033–1077

- *Phase physico-chimique* : Les électrons secondaires produits se déplacent dans la cellule et interagissent avec des molécules d'eau (radiolyse de l'eau) pour générer des espèces radicalaires instables. Cette phase a lieu entre 10^{-12} s et 10^{-6} s post-irradiation.
- *Phase chimique* : Les espèces radicalaires se recombinent entre elles pour former, entre autres, du peroxyde d'hydrogène. Cette phase se produit dans l'intervalle temporel [10^{-6} s – 1 s post-irradiation].
- *Phase radiobiologique* : Les radicaux libres produits peuvent générer des dommages à l'ADN *via* rupture de liaisons chimiques et peroxydation de bases ou sucres. Des effets sur l'intégrité cellulaire peuvent être observés.

C. Interaction rayon-tissu et radiosensibilité

L'interaction rayon-tissu est différente en fonction de la nature du tissu considéré. On parle de radiosensibilité pour désigner la propension d'un organe ou d'un tissu irradié par des rayonnements ionisants à développer une réaction liée à la toxicité de la radiation qui se traduit généralement par un arrêt de la prolifération cellulaire¹⁶. Le terme de radiorésistance, désignant l'ensemble des mécanismes biologiques complexes menant à une résistance aux effets des rayonnements ionisants, a aussi vu le jour et les mécanismes d'acquisition d'un tel phénotype sont de plus en plus étudiés au sein de la communauté scientifique.

Au XX^{ème} siècle, Bergonié et Tribondeau ont démontré que la radiosensibilité d'un tissu est proportionnelle à son taux de division cellulaire et inversement proportionnelle à son degré de différenciation cellulaire. Il est alors judicieux de distinguer i) les tissus compartimentaux (moelle osseuse, peau...) présentant un compartiment de cellules souches radiosensibles capables d'autoreproduction et un compartiment de cellules différenciées matures radiorésistantes incapables de se diviser et ii) les tissus non compartimentaux qui ne présentent pas de cellules souches et au sein desquels le renouvellement cellulaire dépend du type cellulaire considéré. Tandis que les tissus compartimentaux sont capables de compenser le déficit cellulaire lié à l'irradiation, les tissus non compartimentaux qui ne présentent pas de cellules souches sont soumis à un délai d'expression du déficit fonctionnel du tissu irradié qui dépend de la durée de vie des cellules différenciées.

Il convient, de plus, d'introduire la notion d'effet différentiel, à l'origine de l'efficacité de la radiothérapie. En effet, la capacité de réparation des lésions induites par les rayonnements

¹⁶ Foray, N. *et al.*, *Radiology*, **2012**, 264, 627–631

Introduction générale

ionisants est plus importante pour les cellules saines que pour les cellules tumorales, ce qui est à l'origine d'un effet différentiel des rayonnements ionisants entre les tissus sains et les tissus tumoraux. En outre, différents facteurs influent sur la radiosensibilité des tissus et sur l'efficacité de la radiothérapie :

Position dans le cycle cellulaire : Pendant le cycle cellulaire la cellule duplique son patrimoine génétique et se divise en deux cellules filles identiques. Le cycle cellulaire est composé de 4 phases : la phase G1 qui constitue la phase de croissance cellulaire et de préparation à la réplication, la phase S au cours de laquelle la réplication d'ADN a lieu, la phase G2 qui représente la phase de croissance et de préparation à la phase de division cellulaire ou mitose, dite phase M. Il a été prouvé que la cellule présente une radiosensibilité différente en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle elle se situe¹⁷. Par ailleurs, il a été démontré que la phase S tardive constituait la phase du cycle cellulaire la plus radiorésistante tandis que les phases G2 et M seraient les plus radiosensibles¹⁸, comme mis en avant dans la figure 11. En effet, tandis que le taux de survie des cellules en phase G2 et M diminue drastiquement quand on augmente la dose d'irradiation, les cellules en phase S montrent une courbe de survie nettement moins altérée par les doses croissantes d'irradiation.

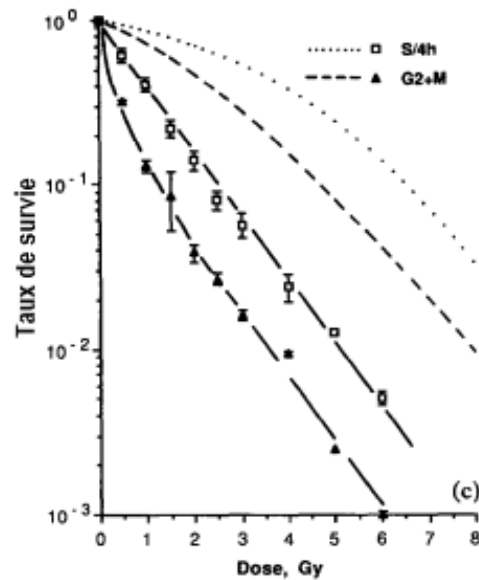


Figure 11. Courbe de survie de cellules situées en phase G2/M et en phase S tardive en fonction de la dose d'irradiation appliquée (en Gray)¹⁷.

Radiosensibilité intrinsèque du tissu : Afin de décrire ou prédire la réponse radiobiologique des tissus, les scientifiques ont adopté un modèle linéaire quadratique qui se rapproche au mieux des données cliniques et expérimentales. Ce modèle mathématique décrit l'évolution de la fraction survivante de cellules clonogéniques (SF) en fonction de la dose d'irradiation D telle que :

$$SF(D) = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (Eq. 2)$$

¹⁷ Iliakis, G. E. *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.*, **1990**, 57, 1195–1211

¹⁸ Pawlik, T. M. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol.*, **2004**, 59, 928–942

Ainsi, chaque tissu irradié par un rayonnement ionisant est caractérisé par un ratio α/β , où α (composante linéaire) correspond aux lésions induisant directement la mort cellulaire tandis que β (composante quadratique) représente l'accumulation de lésions sub-létales dans les cellules engendrant *in fine* la mort cellulaire. Ce ratio α/β correspond à la dose pour laquelle la fraction de cellules mortes par lésions létales équivaut à la fraction de cellules mortes de lésions sub-létales. Ce paramètre peut être relié à la radiosensibilité du tissu considéré. Il s'agit alors de différencier les tissus possédant un ratio α/β élevé, c'est-à-dire présentant une faible capacité de réparation, des tissus possédant un ratio α/β faible reflétant une capacité de réparation importante et une accumulation de lésions sub-létales. En effet, comme exemplifié dans la figure 12, pour les tissus présentant un faible ratio α/β (tissu sain à réponse tardive ou tissu tumoral radiorésistant), la composante quadratique (β) a une influence aux faibles doses d'irradiation. Le taux de survie chute considérablement dès que la dose par fraction d'irradiation dépasse une certaine valeur (environ 2 à 4 Gy). On observe alors un épaulement dans la courbe de survie. En ce qui concerne les tissus présentant un ratio α/β élevé (tissu sain à réponse précoce ou tissu tumoral radiosensible), la composante linéaire (α) est prédominante aux faibles doses et une évolution presque linéaire de la survie en fonction de la dose d'irradiation est observée.

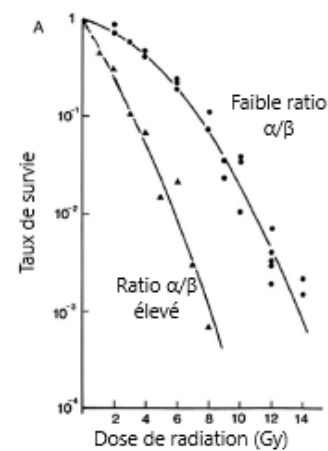


Figure 12. Courbe de survie des tissus en fonction du ratio α/β et en fonction de la dose délivrée (Gy)²⁰.

Facteur temps : L'étalement dans le temps des séances d'irradiation (ou fractionnement de dose) a démontré une efficacité à dissocier les tissus sains des tissus tumoraux, « réparés » plus lentement. Le recours au fractionnement de dose repose sur les 4 R de la radiothérapie. En effet, durant l'intervalle de temps entre deux irradiations consécutives on observe au niveau des tissus plusieurs phénomènes concomitants : la **repopulation** cellulaire, la **redistribution** au sein du cycle cellulaire, la **réoxygénation** des cellules tumorales et la **réparation** des lésions sub-létales¹⁹. Ainsi, après irradiation du tissu tumoral, une **redistribution** des cellules tumorales au sein de phases du cycle cellulaire plus radiosensibles est observée. De plus, suite au stress causé par l'irradiation, une **repopulation** cellulaire accélérée a été mise en évidence chez plusieurs types de cancer. Afin de compenser cette repopulation tumorale, une adaptation de la dose totale délivrée doit être réalisée. Une **réoxygénation** significative des cellules tumorales consécutive

¹⁹ Withers, H. R. *et al.*, *Adv. Radiat. Biol.*, **1975**, 5, 241–271

Introduction générale

à l'irradiation a aussi été démontrée, la mortalité cellulaire induite par l'exposition aux rayonnements ionisants induisant une diminution de la consommation de dioxygène au niveau tumoral, rendant dès lors le dioxygène plus disponible pour les cellules ayant survécu à l'irradiation. Enfin, l'efficacité du fractionnement est directement liée à l'effet différentiel observé lors d'un traitement par rayonnements ionisants, conséquence des différences de capacité de **réparation** des tissus tumoraux et sains. L'exposition des tissus tumoraux de manière itérée à de plus faibles doses d'irradiation sans laisser, entre chaque séance, le temps nécessaire à leur complète réparation induit une mort cellulaire tumorale plus importante que dans les tissus sains, où les cellules saines ont pu restaurer leur intégrité génomique plus rapidement. Cependant, il est à noter que l'étalement des doses peut être à double tranchant puisque pour les tissus tumoraux à fort taux de renouvellement tels que les carcinomes ou les lymphomes, l'étalement permet une repopulation cellulaire efficace. Ainsi, la repopulation et la restauration tumorale entre chaque fraction implique, en contrepartie, d'augmenter la dose totale d'irradiation pour obtenir le même effet tumoricide. Il est important de noter que les tissus à réponse précoce ne sont pas sensibles au fractionnement de dose.

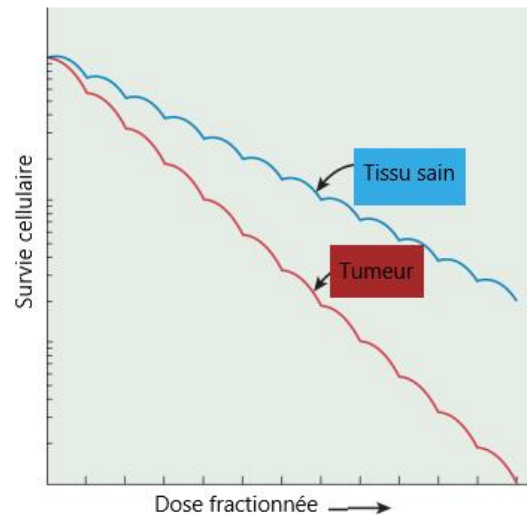


Figure 13. Courbe de survie des tissus en fonction du nombre de doses fractionnées d'irradiation.

Le fractionnement des doses (< 3 Gy) est donc apparu comme un moyen de limiter l'impact des rayons ionisants sur les tissus sains environnant la tumeur²⁰ (fig. 13).

Température : Il a été mis en avant que l'hyperthermie ($T > 42$ °C) inhibait les fonctions de réparation des lésions à l'ADN dues à une irradiation par rayonnements ionisants au sein des cellules tumorales, ce qui permettrait d'augmenter leur radiosensibilité²¹.

²⁰ Hennequin, C. *et al.*, *Cancer/Radiothérapie*, **2019**, 23, 500–502

²¹ Genet, S. C. *et al.*, *J. Cell Physiol.*, **2013**, 228, 1473–1481

Effet oxygène : En 1947, l'équipe de Thoday a mis en évidence l'effet de l'oxygène sur la fréquence d'aberrations chromosomiques générées par irradiation aux rayons X chez les cellules de racines de *Vicia faba*²². Les résultats de leurs expériences sont reportés dans la figure 14.

Il est donc à noter que la quantité d'aberrations chromosomiques au sein des cellules de racines de *Vicia faba* est sensiblement plus importante post-irradiation dans un milieu riche en oxygène que dans un milieu riche en azote, ce qui implique que la présence d'oxygène potentialise la cytotoxicité des rayons X.

En 1993, l'équipe d'Okunieff a

évalué l'influence réelle de la pression partielle en oxygène dans la prédiction du contrôle de la croissance tumorale sur une cohorte de 22 femmes atteintes d'un cancer du sein²³. Il a alors été démontré que la réoxygénation entre les doses fractionnées d'irradiation était un facteur primordial dans le contrôle de la croissance tumorale, mettant en avant le rôle crucial que joue l'oxygène dans la réponse tumorale à la radiothérapie.

Depuis, l'impact de la pression partielle en oxygène sur la sensibilité des cellules tumorales aux rayonnements ionisants a été largement étudié et apparaît comme un facteur essentiel de prédiction de la radiosensibilité des cellules tumorales²⁴. On parle alors d'« effet oxygène », la présence d'oxygène au sein de la cellule tumorale favorisant la synthèse d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (ou ROS pour *Reactive Oxygen Species*). En stimulant la synthèse de ROS, la présence d'oxygène augmente considérablement la radiosensibilité de la cellule tumorale et donc le potentiel tumoricide des rayonnements ionisants²⁵. De plus, l'irradiation des cellules tumorales provoque la formation de radicaux au niveau de l'ADN (R[•]). En conditions normoxiques, ces espèces radicalaires réagissent avec le dioxygène moléculaire pour former des radicaux peroxy ROO[•] et, *in fine*, des peroxydes ROOH, beaucoup plus

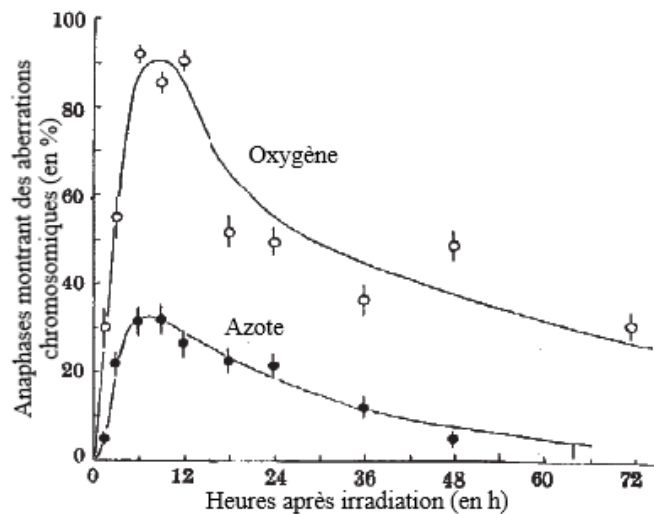


Figure 14. Pourcentage d'aberrations chromosomiques en fonction de la présence d'oxygène ou d'azote dans le milieu en fonction de la durée post-exposition (en h)²².

²² Thoday, J. M. *et al.*, *Nature*, **1947**, 160, 608

²³ Okunieff, P. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol.*, **1993**, 26, 631–636

²⁴ Liu, C. *et al.*, *Radiat. Res.*, **2015**, 183, 487–496

²⁵ Gray, L. H. *et al.*, *Br. J. Radiol.*, **1953**, 26, 638–648

Introduction générale

difficilement réparables pour la cellule tumorale. Ainsi, le dioxygène stabilise les lésions directes des rayonnements ionisants et induit au final une mort cellulaire plus importante au sein de la population tumorale, incapable de réparer les lésions « fixées » par le dioxygène²⁶. Les rayonnements ionisants à faible TLE, tels que les rayons X, sont d'autant plus sensibles à ce paramètre que leur capacité d'ionisation est limitée.

Cet effet oxygène, bien connu désormais de la communauté scientifique²⁷, peut être exprimé quantitativement par l'*Oxygen Enhancement Ratio* ou OER (Eq. 3).

$$OER = \frac{\text{Dose d'irradiation en conditions hypoxiques}}{\text{Dose d'irradiation en conditions aérobies}} \quad (\text{Eq. 3})$$

L'OER permet de mettre en avant l'intérêt d'un apport d'oxygène pendant l'irradiation de cellules tumorales en établissant le ratio entre la dose d'irradiation en conditions hypoxiques et la dose d'irradiation en conditions aérobies permettant d'obtenir le même effet biologique. Tandis que les rayonnements à faible TLE possèdent un OER important, entre 2 et 3 pour les rayons X, les rayonnements à TLE important possèdent un OER faible, de l'ordre de 1 pour les rayonnements α . En effet, il a été démontré que l'OER diminue quand le TLE du rayonnement augmente²⁸.

Volume tumoral : Le volume tumoral joue aussi un rôle conséquent dans la sensibilité de la tumeur aux rayonnements ionisants. En effet, la vascularisation anarchique et inégale au sein de la tumeur induit la formation de zones hypoxiques, pouvant atteindre jusqu'à 60 % du volume tumoral²⁹. Cette inégalité de distribution de l'oxygène au niveau du site tumoral induit inexorablement l'existence de zones peu sensibles aux rayonnements ionisants. En effet, l'oxygène ne pouvant diffuser que dans un rayon d'environ 75 μm autour d'un vaisseau sanguin³⁰, toutes les cellules au-delà de ce rayon sont exposées à un stress hypoxique. Il semblerait donc que plus le volume tumoral est faible, plus la fraction de cellules perfusées en dioxygène est importante et donc plus cette tumeur sera sensible aux rayonnements ionisants.

L'identification des différents facteurs influant sur l'efficacité radiobiologique a permis de mieux adapter les traitements en clinique sans totalement outrepasser la résistance innée de certains cancers à la radiothérapie.

²⁶ Telarovic, I. *et al.*, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **2021**, 40, 197

²⁷ Rockwell, S. *et al.*, *Curr. Mol. Med.*, **2009**, 9, 442–458

²⁸ Barendsen, G. W. *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **1966**, 10, 317–327

²⁹ Vaupel, P. *et al.*, *Cancer Metastasis Rev.*, **2007**, 26, 225–239

³⁰ Vaupel, P. *et al.*, *Appl. Magn. Reson.*, **2021**, 52, 1451–1479

D. Mécanismes biologiques de radiorésistance des cancers

Au-delà d'une radiosensibilité plus ou moins importante, on observe chez la cellule tumorale la mise en place de mécanismes de résistance à la radiothérapie. Par mutation de son génome et modification de son environnement, la cellule cancéreuse est ainsi capable de s'adapter aux stimuli exogènes létaux, tels que les rayonnements ionisants, afin de survivre. Cette radiorésistance peut ainsi être à l'origine de récurrences de cancer ou d'absence d'efficacité de la radiothérapie.

Dès lors, plusieurs altérations génétiques et phénotypiques ont pu être mises en cause dans l'acquisition d'une résistance aux rayonnements ionisants.

Parmi les altérations génétiques observées, on retrouve l'activation de la voie de signalisation cellulaire PI3K/Akt/mTOR³¹, impliquée dans la prolifération tumorale ou encore la régulation de protéines du cycle cellulaire, telles que la protéine p53. Cette dernière est un facteur de transcription essentiel au contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose, dont la surexpression a été identifiée comme induisant une radiorésistance³².

Entre autres, la transition épithélio-mésenchymateuse constitue une modification phénotypique associée au phénomène de radiorésistance³³. En effet, suite à l'activation de diverses voies de signalisation, la cellule tumorale soumise aux rayonnements ionisants acquiert un phénotype mésenchymateux présentant un potentiel invasif important, à l'origine de métastases³⁴.

De plus, l'irradiation répétée par rayonnements ionisants induit des changements conséquents de la morphologie et de l'architecture du microenvironnement tumoral³⁵. D'une part, le traitement par rayonnements ionisants engendre la destruction dose-dépendante des vaisseaux sanguins, touchant plus particulièrement la microvascularisation³⁶. Cette densité vasculaire diminuée au sein du stroma tumoral potentialise l'hypoxie des cellules cancéreuses. D'autre part, l'irradiation répétée par rayonnements ionisants induit une réaction inflammatoire exacerbée à l'origine d'une fibrose anormale du tissu tumoral. Ce tissu fibrotique est majoritairement composé de fibroblastes associés au cancer (CAF)³⁷, identifiés comme

³¹ Chang, L. *et al.*, *Cell Death Dis.*, **2014**, *5*, e1437

³² Lee, J. M. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci.*, **1993**, *90*, 5742–5746

³³ Theys, J. *et al.*, *Radiother. Oncol.*, **2011**, *99*, 392–397

³⁴ Tsukamoto, H. *et al.*, *Gynecol. Oncol.*, **2007**, *107*, 500–504

³⁵ Barker, H. E. *et al.*, *Nat. Rev. Cancer*, **2015**, *15*, 409–425

³⁶ Baker, D. G. *et al.*, *Cancer Invest.*, **1989**, *7*, 287–294

³⁷ Yamauchi, M. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **2018**, *128*, 16–25

Introduction générale

induisant une radiorésistance chez les cellules tumorales, principalement par sécrétion paracrine de facteurs de croissance³⁸.

Enfin, l'action tumoricide des rayonnements ionisants est, entre autres, liée à l'augmentation du stress oxydant dans la cellule tumorale, *via* l'accélération de la synthèse d'espèces radicalaires oxygénées. L'accumulation de ces espèces réactives oxygénées au sein de la cellule induit un dérèglement de l'homéostasie cellulaire, une altération du patrimoine génétique et protéique et, *in fine*, la mort cellulaire. De plus, les ROS en excès générés par l'irradiation ainsi que l'oxygène moléculaire présent dans la cellule se fixent aux cassures de l'ADN et pérennisent ces lésions, rendant impossible la réparation du patrimoine génétique²⁶. Cependant, pour échapper à la mort cellulaire, la cellule tumorale dispose, comme nous l'avons évoqué précédemment, de mécanismes de résistance limitant l'effet des rayonnements ionisants. Parmi eux, on peut noter le basculement de l'équilibre redox vers un milieu réducteur et le phénomène d'hypoxie chronique. On parle d'hypoxie chronique lorsque la concentration en dioxygène à laquelle sont exposées les cellules est particulièrement faible (1 % à 3 %) et ce, pendant de longues périodes. Par comparaison, au sein d'un tissu normoxique, la concentration en dioxygène est comprise entre 4 et 9 %³⁹. Cet état hypoxique est lié à la faible distance de diffusion du dioxygène à partir des vaisseaux sanguins issus de la néoangiogenèse (~ 70–100 µm) ainsi qu'à l'hétérogénéité de vascularisation au sein même de la tumeur. De plus, l'absence de dioxygène empêche la production d'ATP *via* la chaîne respiratoire et induit une suractivation de la glycolyse, ce qui engendre une surproduction de lactate (fig. 15). Cette accumulation de lactate est à l'origine d'une acidification du microenvironnement tumoral et, de par son caractère anti-oxydant, d'une radiorésistance accrue⁴⁰

Il a été démontré que l'hypoxie chronique des cellules cancéreuses était responsable de modifications majeures du phénotype cancéreux telles que la suractivation de la voie PI3K/Akt/mTOR ou la stimulation de la transition épithélio-mésenchymateuse conduisant à l'acquisition d'un potentiel métastatique.

³⁸ Wang, Z. *et al.*, *Cell Commun. Signal.*, **2019**, 17, 47

³⁹ Suwa, T. *et al.*, *Exp. & Mol. Med.*, **2021**, 53, 1029–1035

⁴⁰ Kato, *et al.* *Cancer Cell Int.*, **2013**, 13, 89

Enfin, le phénomène hypoxique induit la suractivation de certains facteurs transcriptionnels jouant un rôle essentiel dans la survie cellulaire. Parmi ces facteurs, on retrouve le facteur de transcription HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor-1*), hétérodimère composé de 2 sous-unités (α et β), qui constitue un élément central dans la réponse des cellules tumorales au stress hypoxique. En effet, HIF-1 est activé en conditions hypoxiques et contrôle la transcription de gènes impliqués dans l'angiogénèse, le métabolisme du glucose, la prolifération cellulaire et l'invasion métastatique. L'activation de HIF-1 est dépendante de la stabilisation post-traductionnelle de la sous-unité HIF-1 α via l'inhibition de la dégradation oxygène-dépendante de cette sous-unité par le système ubiquitine-protéasome impliquant l'action de prolyl hydroxylases en conditions hypoxiques⁴¹. Une suractivation de HIF-1 a été associée à une angiogénèse accrue, une radiorésistance⁴² ainsi qu'à un mauvais pronostic clinique dans différents types de cancer⁴³.

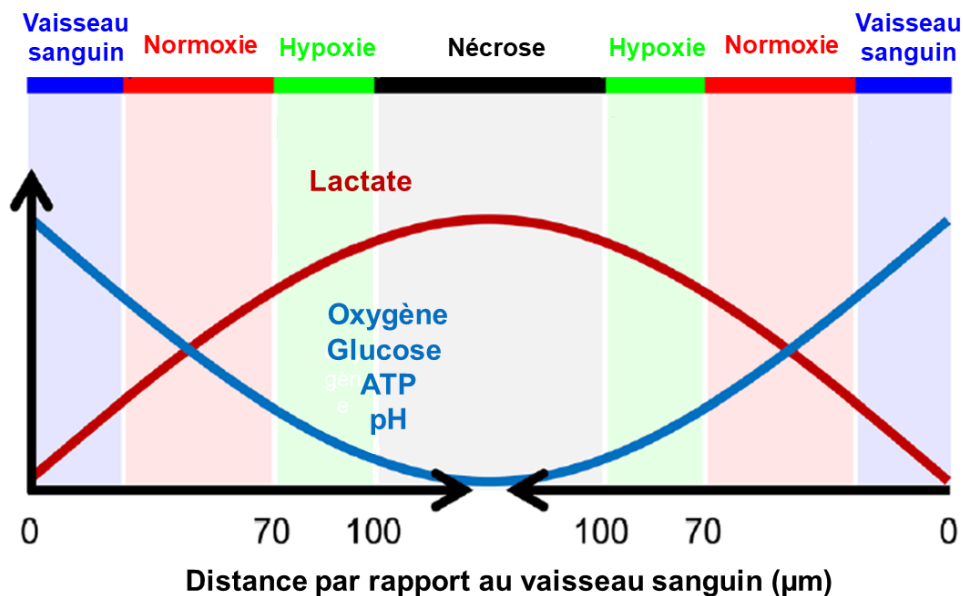


Figure 15. Diagramme schématisé du microenvironnement tumoral³⁹.

Ainsi, le phénomène d'hypoxie chronique des cellules tumorales régule un large nombre de mécanismes biologiques menant à une radiorésistance et apparaît donc comme un défi considérable pour la radiothérapie.

Dès lors, agir sur l'hypoxie en augmentant la perfusion en dioxygène des cellules tumorales est rapidement apparu comme un moyen de radiosensibilisation efficace et de nouvelles thérapies

⁴¹ Huang, L. E. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci.*, **1998**, 95, 7987–7992

⁴² Moeller, B. *et al.*, *Br. J. Cancer*, **2006**, 95, 1–5

⁴³ Birner, P. *et al.*, *Cancer Res.*, **2000**, 60, 4693–4696

Introduction générale

exploitant ce fameux « effet oxygène » ont été développées afin d'augmenter la radiosensibilité des cellules tumorales.

E. Augmenter la perfusion en dioxygène des tissus afin d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie

Plusieurs stratégies permettant d'augmenter la perfusion en dioxygène des cellules tumorales et ainsi pallier le mécanisme de radiorésistance hypoxique ont été envisagées, et parmi elles, l'administration d'oxygène hyperbare ou de carbogène (oxygène + 5 % CO₂)⁴⁴. Cependant, bien que la perfusion en dioxygène du tissu tumoral soit améliorée⁴⁵ et que le bénéfice radiosensibilisant soit prouvé, la faisabilité de tels traitements en clinique reste encore incertaine, majoritairement à cause des toxicités aiguës induites. D'autres axes stratégiques ont été considérés afin d'améliorer l'oxygénation tumorale, comme par exemple, les transfusions sanguines ou l'administration d'érythropoïétine recombinante, le but étant de moduler la quantité d'hémoglobine au niveau du compartiment sanguin et donc la quantité de dioxygène transportée par l'hémoglobine. Malheureusement, les transfusions sanguines n'ont pas démontré de réel bénéfice clinique chez les patients traités par radiothérapie et les risques associés à une telle pratique (risques infectieux, réaction allergique, allo-immunisation, immunosuppression...) ont rapidement limité l'utilisation de transfusion sanguine pour améliorer la radiosensibilité des tumeurs⁴⁶. En 1998, Thews *et al.* ont démontré que l'administration d'érythropoïétine recombinante, facteur de croissance hématopoïétique stimulant la synthèse de globules rouges, induisait une augmentation de la sensibilité de sarcomes aux rayonnements ionisants *in vivo* et permettait un meilleur contrôle locorégional de la tumeur⁴⁷. Cependant, certains résultats d'études divergeant⁴⁸, l'utilisation d'érythropoïétine recombinante humaine est encore controversée⁴⁹. Dès lors, certains chercheurs se sont intéressés à la synthèse de modulateurs allostériques de l'hémoglobine capables de modifier l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène et, par conséquent, induire une libération de l'oxygène accrue au niveau des tissus hypoxiques⁵⁰. L'efaproxiral ou RSR-13, chef de file des modulateurs allostériques de l'hémoglobine, a ainsi pu démontrer son potentiel

⁴⁴ Overgaard, J. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, **2007**, *25*, 4066–4074

⁴⁵ Lartigau, E. *et al.*, *Eur. J. Cancer*, **1998**, *34*, 856–861

⁴⁶ Levine, E. A. *et al.*, *Oncol. Res. Treat.*, **1993**, *16*, 79–87

⁴⁷ Thews, O. *et al.*, *Br. J. Cancer*, **1998**, *78*, 752–756

⁴⁸ Temkin, S. M. *et al.*, *Int. J. Gynecol. Cancer*, **2006**, *16*, 1855–1861

⁴⁹ Dicato, M. *et al.*, *Curr. Opin. Oncol.*, **2010**, *22*, 307–311

⁵⁰ Abraham, D. J. *et al.*, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 9141–9149

radiosensibilisant, *in vivo*⁵¹. L'efaproxiral a ensuite été introduit en clinique et a prouvé son efficacité radiosensibilisante dans plusieurs essais de phase II ou III^{52,53}. La FDA a donc accordé en 2004 le statut de médicament orphelin à l'efaproxiral en tant qu'agent adjuvant dans le traitement par radiothérapie du cerveau entier de métastases issues d'un cancer du sein. Cependant, les recherches sur l'efaproxiral ont été abandonnées depuis qu'un essai clinique de phase III (ENRICH) sur des patientes présentant un cancer du sein et des métastases cérébrales traitées par radiothérapie n'a pas conclu à un effet bénéfique de l'efaproxiral en tant qu'adjuvant de radiothérapie⁵⁴.

Dès lors, d'autres méthodes d'amélioration de l'état hypoxique des cellules tumorales par perfusion ont été explorées.

III. De l'intérêt des composés perfluorés en tant qu'adjuvants de la radiothérapie

A. Présentation physico-chimique du fluor et des composés perfluorés

Les composés perfluorés (ou PFC) sont des composés hydrocarbonés dont tous les atomes d'hydrogène ont été substitués par des atomes de fluor, et quelques fois, par d'autres halogènes (ex : perflubron).

1. Comparaison du fluor et de l'hydrogène

L'atome de fluor constitue l'atome le plus électronégatif du tableau périodique ($\chi = 4$ par rapport à 2,1 pour l'hydrogène). Outre son électronégativité, le fluor possède aussi des caractéristiques physicochimiques différentes de l'atome d'hydrogène. En effet, le nuage électronique du fluor (9 électrons) est plus dense que celui de l'hydrogène (1 électron) et le rayon de l'atome de fluor représente le double de celui de l'hydrogène. De plus, l'atome de fluor possède une masse environ 20 fois plus élevée que l'atome d'hydrogène. Enfin, le fluor présente une plus faible polarisabilité que celle de l'hydrogène ($\alpha = 0,56 \text{ \AA}^3$ pour le fluor contre $\alpha = 0,66 \text{ \AA}^3$ pour l'hydrogène)⁵⁵. La polarisabilité d'un atome représente l'aptitude de son nuage électronique à se déformer sous l'effet d'un champ électrique et peut être directement liée à l'induction d'un moment dipolaire.

⁵¹ Rockwell, S. *et al.*, *Radiat. Oncol. Investig.*, **1998**, 6, 199–208

⁵² Shaw, E. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, **2003**, 21, 2364–2371

⁵³ Suh, J. H. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, **2006**, 24, 106–114

⁵⁴ Eccles, C. L. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol.*, **2008**, 72, S50

⁵⁵ Riess, J. G., *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, **2005**, 33, 47–63

2. Les composés perfluorés

La modification du squelette carboné, suite à la substitution des atomes d'hydrogènes par des atomes de fluor, altère de manière majeure le comportement et les propriétés physicochimiques de la molécule. En effet, la forte électronégativité du fluor rend la liaison C-F très énergétique (environ 500 kJ mol^{-1}) et rigidifie la structure carbonée des composés perfluorés en augmentant l'énergie des liaisons C-C du squelette *via* rétraction des orbitales des atomes de carbone (413 kJ mol^{-1} pour $\text{CF}_3\text{-CF}_3$ contre 376 kJ mol^{-1} pour $\text{CH}_3\text{-CH}_3$). De plus, l'atome de fluor étant plus volumineux que l'atome d'hydrogène, les molécules perfluorées n'adoptent pas la même configuration zig-zag que leurs analogues hydrocarbonés et lui préfèrent une configuration hélicoïdale, plus rigide et plus encombrante⁵⁶ (fig. 16).

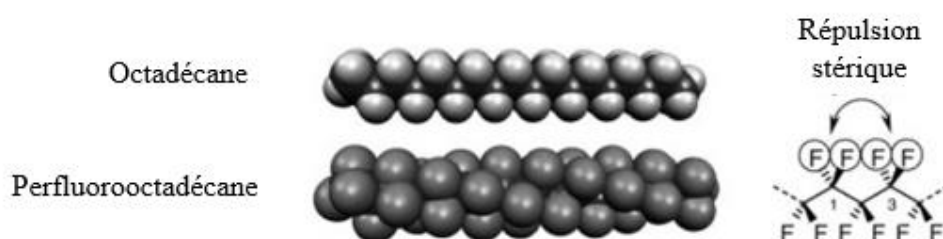


Figure 16. Configuration moléculaire des composés perfluorés⁵⁶.

Les composés perfluorés possèdent des capacités remarquables qui ont très vite intéressé la communauté scientifique pour les multiples débouchés qu'elles permettent. Parmi ces propriétés, on peut recenser une résistance thermique ainsi qu'une inertie chimique impressionnantes (exemple du polytétrafluoroéthylène ou PTFE, plus connu sous le nom commercial Teflon®). Ces deux dernières propriétés sont dues à l'extrême force de la liaison C-F. De plus, les composés perfluorés présentent de faibles températures d'ébullition, ce qui leur confère une volatilité plus élevée que leurs homologues hydrocarbonés. Cette propriété des composés perfluorés est exploitée dans la construction de microbulles utilisées en tant qu'agent de contraste en échographie^{57,58}.

D'un autre côté, la capacité de solvation des gaz des composés perfluorés a aussi suscité beaucoup d'engouement de par ses possibilités d'application. En effet, les composés perfluorés solubilisent de manière importante les gaz, quels qu'ils soient. D'un point de vue

⁵⁶ Kirsch, P., *Modern fluoroorganic chemistry: Synthesis, reactivity, applications*, Wiley-VCH, **2006**, 320 pages

⁵⁷ Lin, C. Y. *et al.*, *Biomed. Res. Int.*, **2013**, 404361

⁵⁸ Cosco, D. *et al.*, *J. Fluor. Chem.*, **2015**, 171, 18–26

physicochimique, la faible polarisabilité du fluor induit l'absence de formation de liaisons de Van der Waals et donc, *in fine*, limite fortement le nombre de liaisons intermoléculaires au sein des composés perfluorés. Ces composés peu cohésifs donnent facilement naissance à des cavités dans lesquelles peuvent être incluses des molécules de gaz, comme le dioxygène.

À titre d'illustration, la perfluorodécane et le perfluorooctylbromure peuvent dissoudre respectivement 403 et 527 mL_{O₂}/L_{PFC} tandis que l'eau ne peut charger que 10 mL_{O₂}/L_{H₂O} (et 200 mL_{O₂}/L_{sang}). Il est à noter qu'un litre d'eau contient 55 mol de molécules d'eau tandis que, pour les PFC, on a, par exemple pour la perfluorodécane 4,2 mol dans un litre. L'environnement perfluoré beaucoup moins dense induit, de fait, que les molécules de gaz possèdent beaucoup plus d'espace pour se déplacer et se loger dans les cavités créées. Les ratios moléculaires sont 1_{O₂} : 200_{H₂O} et, toujours avec l'exemple de la perfluorodécane, on obtient un ratio de 5_{O₂} : 1_{PFD}⁵⁹. Enfin, la solubilisation du dioxygène dans les composés perfluorés suit la loi de Henry, c'est-à-dire que la solubilité du gaz ne dépend que de sa pression partielle et serait donc, en théorie, infinie.

B. Les composés perfluorés comme moyen de transport du dioxygène *in vivo*

Les travaux pionniers de Clark et Gollan ont posé les bases de l'utilisation des composés perfluorés comme moyen de transport du dioxygène⁶⁰. Depuis 1966, la recherche dans le domaine s'est intensifiée et les composés perfluorés ont rapidement été reconnus pour leur propension remarquable à solubiliser le dioxygène. Ce potentiel de solubilisation du dioxygène a ouvert le champ des possibles dans bien des domaines et l'utilisation de composés perfluorés en tant que substituts sanguins a, d'abord, été envisagée.

Cependant, l'hydrophobie et la lipophobie des composés perfluorés constituent une limitation majeure à leur utilisation. En effet, en ce qui concerne l'hydrophobie, la symétrie intrinsèque de la molécule perfluorée annule la polarité de chacune des liaisons C-F, rendant la structure apolaire. De plus, la molécule perfluorée possédant une structure plus encombrante et donc un ratio aire/volume plus important que son homologue hydrocarboné, la surface de contact avec les molécules d'eau augmente et l'énergie d'hydratation nécessaire à une solubilité en milieu aqueux aussi⁶¹. Ainsi, le phénomène n'étant pas favorisé thermodynamiquement, ceci confère un caractère hydrophobe aux composés perfluorés. D'un autre côté, la faible polarisabilité des composés perfluorés inhibe la formation de dipôles qui pourrait mener à des liaisons de Van

⁵⁹ Jägers, J. *et al.*, *Pflügers Archiv – Eur. J. Physiol.*, **2021**, 473, 139–150

⁶⁰ Clark, L. C. *et al.*, *Science*, **1966**, 152, 1755–1756

⁶¹ Dalvi, V. H., *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci.*, **2010**, 107, 13603–13607

Introduction générale

der Waals qui sont nécessaires à la solubilité dans les phases lipidiques⁶². Ainsi, tandis que l'apolarité générale des composés perfluorés engendre une hydrophobie, leur faible polarisabilité est, quant à elle, à l'origine d'une nette lipophobie.

Dès lors, leur utilisation en clinique se révèle compromise. En effet, outre la perfusion en dioxygène, les composés perfluorés, en tant que substituts sanguins, doivent aussi assurer le transport des nutriments hydrosolubles nécessaires au maintien des fonctions de l'organisme. De plus, pour une application clinique, une solubilité en milieu aqueux est primordiale.

Afin de s'affranchir des propriétés de solubilité médiocres des composés perfluorés, le procédé d'émulsification est apparu comme une technique efficace. Le procédé d'émulsification permet le mélange de deux ou plusieurs liquides non miscibles. Ce procédé, coûteux énergétiquement, permet l'obtention d'une dispersion thermodynamiquement métastable de gouttelettes de PFC au sein d'un dispersant tel que l'eau. Ces gouttelettes ou microbulles, en fonction de l'état physique du composé perfluoré considéré, peuvent être à l'échelle nanométrique ou micrométrique, on parle dès lors de nano-émulsion ou de microémulsion. Ces émulsions nécessitent l'ajout de surfactants tels que des phospholipides ou des poloxamères (exemple du Pluronic-F68) afin de limiter la tension de surface à l'interface PFC/eau⁵⁹. Les émulsions perfluorées ont été testées en préclinique et en clinique et ont montré des résultats très prometteurs⁶³.

De ce fait, l'émulsification a permis de contourner les limitations intrinsèques des PFC et donc de démocratiser leur usage dans divers domaines jusqu'alors incompatibles avec leur insolubilité aqueuse. C'est le cas de la radiosensibilisation où l'incroyable capacité de solubilisation du dioxygène des PFC a suscité un grand intérêt et est apparue comme une possible solution à l'état hypoxique des tumeurs radiorésistantes. Ainsi, en 1987, Martin *et al.* ont mis en évidence le potentiel radiosensibilisant d'une émulsion perfluorée, le Fluosol DA 20 % *w/w*, en association avec le carbogène sur des rats porteurs de rhabdomyosarcomes⁶⁴. Le Fluosol-DA est une émulsion de deux composés perfluorés, la perfluorodécane (PFD) et la perfluorotripropylamine (PFTPA). Le Fluosol-DA s'est révélé un réel agent adjuvant de la radiothérapie en clinique durant des essais cliniques de phase I/II^{65,66}.

⁶² Holman, R. *et al.*, *Front. Chem.*, **2022**, 9, 810029

⁶³ Spahn, D. R. *et al.*, *Crit Care.*, **1999**, 3, R93–R97

⁶⁴ Martin, D. F. *et al.*, *Radiat. Res.*, **1987**, 112, 45

⁶⁵ Evans, R. G. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1990**, 19, 415–420

⁶⁶ Rose, C. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1986**, 12, 1325–1327

Cependant, les hautes doses de Fluosol-DA nécessaires pour atteindre une réoxygénation efficace ont conduit à l'émergence d'effets secondaires néfastes, principalement hépatiques, *via* une augmentation des transaminases persistant après le traitement, et pulmonaires⁶⁷. Dans l'idée de limiter la quantité de composé perfluoré nécessaire pour obtenir une efficacité radiosensibilisante, NVX-108, une nano-émulsion de dodécafluoropentane (PFDD), a été développée. Cette nano-émulsion a prouvé son potentiel de transport de l'oxygène chez des souris porteuses de xénogreffes de cancer pancréatique⁶⁸ et fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase Ib/II dans le traitement de glioblastome en association avec la radiothérapie (NCT02189109). Il semble que le NVX-108 possède une capacité de solubilisation du dioxygène plus importante que les émulsions de perfluorodécane ou de bromure de perfluorooctyle, permettant d'avoir recours à des doses beaucoup plus faibles pour obtenir un effet radiosensibilisant, limitant ainsi l'occurrence d'effets indésirables.

Ainsi, à la lumière des différents exemples cités ci-dessus, il apparaît évident que les composés perfluorés constituent des réservoirs à dioxygène capables d'influer grandement sur l'efficacité de la radiothérapie.

IV. Problématique de thèse

L'efficacité de la radiothérapie, pierre angulaire de la plupart des thérapies anti-cancéreuses, souffre de l'existence de mécanismes de résistance au sein des cellules tumorales. Parmi ces différents mécanismes, l'hypoxie chronique du tissu tumoral constitue un réel frein à l'efficacité radiobiologique des rayonnements ionisants. Différents axes stratégiques permettant d'agir sur ce phénomène hypoxique ont été explorés. Ainsi, l'amélioration de la perfusion en dioxygène du tissu tumoral a été considérée et plusieurs options de traitement ont vu le jour. Dès lors, le recours aux composés perfluorés, reconnus pour leurs exceptionnelles capacités de solubilisation des gaz, a été envisagé. Différents exemples de radiosensibilisation efficace ont été décrits dans la littérature *via* l'utilisation de micro et nano-émulsions perfluorées. Cependant, la formulation des composés perfluorés sous forme d'émulsion et leur stabilité peuvent présenter des limitations inhérentes aux propriétés physico-chimiques mêmes des composés perfluorés, ce qui entrave leur utilisation en clinique. Ainsi, le développement d'agents de radiosensibilisation perfluorés innovants permettant d'exploiter l'affinité de

⁶⁷ Police, A. M. *et al.*, *Crit. Care Med.*, **1985**, *13*, 96–98

⁶⁸ Johnson, J. L. H. *et al.*, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **2015**, *11*, 274–281

Introduction générale

l'oxygène des systèmes perfluorés tout en s'affranchissant de leurs limitations apparaît comme une stratégie prometteuse pour améliorer l'action tumoricide des rayonnements ionisants.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons souhaité exploiter les propriétés radiosensibilisantes établies des composés perfluorés en construisant un vecteur nanométrique micellaire perfluoré capable d'augmenter la perfusion en dioxygène des cellules tumorales. Cette réoxygénation tumorale devrait permettre d'améliorer la radiosensibilité du tissu tumoral et l'efficacité radiosensibilisante d'un tel vecteur sera étudiée *in vitro*. Sa distribution au sein de l'organisme sera aussi évaluée *in vivo*. Enfin, la complexification du vecteur nanométrique *via* l'introduction d'une composante métallique sera considérée.

Chapitre 1

Micelles perfluorées comme agent de radiosensibilisation

I. Les architectures nanoparticulaires : cas particulier des micelles

Les nanotechnologies constituent un domaine de recherche de plus en plus important, en particulier pour des applications biologiques et médicales. Depuis leur découverte, les nanoparticules ont grandement élargi le spectre des possibles dans le cadre de la prise en charge des pathologies. Les nanoparticules sont définies par la FDA (*Food and Drug Administration*) comme des particules possédant un diamètre inférieur à 100 nm qui démontrent des propriétés dépendantes de leur dimension. Leur intérêt est multiple et dépendant de leur composition, de leurs propriétés intrinsèques ainsi que de leur interaction avec les milieux biologiques.

A. Classification des nanoparticules

Il existe différents types de nanoparticules, en fonction de leur composition. Ainsi, on peut distinguer des nanoparticules composées de carbone, de métal, d'oxyde de métal (nanoparticules inorganiques) ou de matière organique⁶⁹.

- Nanoparticules composées de matière organique

Parmi ce type de nanoparticules, on recense les dendrimères, les particules polymériques, les liposomes et les micelles⁷⁰ (fig. 17). Les dendrimères sont des macromolécules quasi-sphériques constituées de motifs répétés qui se déploient depuis un cœur commun. Le liposome est défini comme une vésicule artificielle composée de bicouches lipidiques concentriques, emprisonnant un compartiment aqueux. La micelle, quant à elle, est constituée d'une monocouche de molécules amphiphiles (ou surfactants) présentant une queue hydrophobe et une tête hydrophile externe au contact de l'eau. La micelle peut aussi être constituée de plusieurs copolymères à bloc, on parle dès lors de micelle polymérique. Enfin, la vésicule polymérique ou polymersome est définie comme une vésicule artificielle résultant de l'autoassemblage en milieu aqueux de copolymères amphiphiles, ceci ménageant une cavité aqueuse au cœur du polymersome via un assemblage en bicouche des polymères. Ainsi, tandis que le liposome et le polymersome renferment un cœur hydrophile, la micelle et le dendrimère possèdent un cœur hydrophobe et la présence de cette cavité aqueuse ou hydrophobe au centre de ces nanoparticules organiques est d'un grand intérêt pour la délivrance de principes actifs pharmacologiques.

⁶⁹ Anu, M. E. S. *et al.*, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, **2017**, 263, 032019

⁷⁰ Mitragotri, S. *et al.*, *MRS Bull.*, **2014**, 39, 219–223

- Nanoparticules allotropes de carbone

Certaines nanoparticules sont entièrement composées de carbone et peuvent adopter des structures différentes en fonction de l'agencement de ces atomes de carbone. Les matériaux carbonés présentent des propriétés électroniques qui peuvent être altérées par des modifications subtiles de leur structure. Parmi ces structures, on recense notamment les fullerènes, les nanotubes de carbone, les nanodiamants, le graphène ainsi que l'oxyde de graphène⁷¹ (fig. 17). Le graphène correspond à un réseau bidimensionnel d'atomes de carbone hybridés sp^2 formant un feuillet. Les atomes de carbone au sein du graphène sont arrangés de manière hexagonale formant alors un réseau « en nid d'abeilles »⁷². Le graphène correspond au matériau de base à l'origine des fullerènes, des nanotubes ou du graphite. L'oxydation du graphène permet d'obtenir des nanostructures plus polaires et hydrophiles, solubles dans les milieux biologiques. Les nanotubes de carbone sont une forme allotropique du carbone constituée d'un ou plusieurs feuillets de graphène enroulés sur eux-mêmes formant alors un tube. Les feuillets carbonés des nanotubes se stabilisent entre eux grâce aux interactions π ⁷³ et aux forces de van der Waals⁷⁴. Les fullerènes sont des structures carbonées sp^2 sphériques, dérivées du graphène, découvertes en 1985⁷⁵ qui sont très utilisées en biomédecine pour leurs propriétés photophysiques et photochimiques. En effet, les fullerènes absorbent des photons dans le domaine du visible et de l'ultraviolet, ce qui excite la structure carbonée et induit, localement, la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène. Ainsi, les fullerènes sont majoritairement utilisés comme sensibilisants pour la photoproduction d'oxygène singulet ainsi que d'autres espèces réactives de l'oxygène. En ce qui concerne les nanodiamants, il s'agit de nanocristaux qui correspondent à des atomes de carbones sp^3 liés de manière tétraédrique dans une maille cubique. Enfin le graphite correspond à un empilement de feuillets de graphène. L'amélioration de la solubilité aqueuse permettant la compatibilité en milieu biologique de ces nanoparticules entièrement carbonées reste encore un défi majeur au sein de la communauté scientifique.

⁷¹ Patel, K. D. *et al.*, *Mater. Horiz.*, **2019**, 6, 434–469

⁷² Wang, Y. *et al.*, *Trends Biotechnol.*, **2011**, 29, 205–212

⁷³ Pérez, E. M. *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44, 6425–6433

⁷⁴ Gobre, V. V. *et al.*, *Nat. Commun.*, **2013**, 4, 2341

⁷⁵ Ghaffari, M. *et al.*, Chapter 17 - Nanotechnology for pharmaceutical In *Industrial Applications of Nanomaterials*. Elsevier, **2019**, Pages 475–502

- Nanoparticules composées de métal et oxyde de métal

La plupart des métaux peuvent être utilisés pour former des nanoparticules. Cependant, les matériaux les plus communs utilisés en recherche biomédicale sont l'or (Au), le nickel (Ni), l'argent (Ag), les oxydes de fer II et III (Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , FeO), le platine (Pt), l'oxyde de zinc (ZnO), le gadolinium (Gd), la silice (SiO_2) et le dioxyde de titane (TiO_2)⁷⁵. Ces nanoparticules diffèrent par leur composition, leur forme, leur densité et charge de surface ainsi que leur surface spécifique. Ainsi, on recense parmi les nanoparticules métalliques les nanoparticules sphériques, les nano-bâtonnets et les nano-étoiles (fig. 17). Ces nanoparticules métalliques, quelle que soit leur forme, sont généralement recouvertes d'un revêtement biocompatible ou par des ligands hydrophiles de faible poids moléculaire⁷⁶ permettant d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques et d'augmenter le temps de résidence dans les milieux biologiques. Ces nanoparticules inorganiques sont d'un grand intérêt pour l'industrie pharmaceutique de par les possibilités de fonctionnalisation qu'elles présentent.

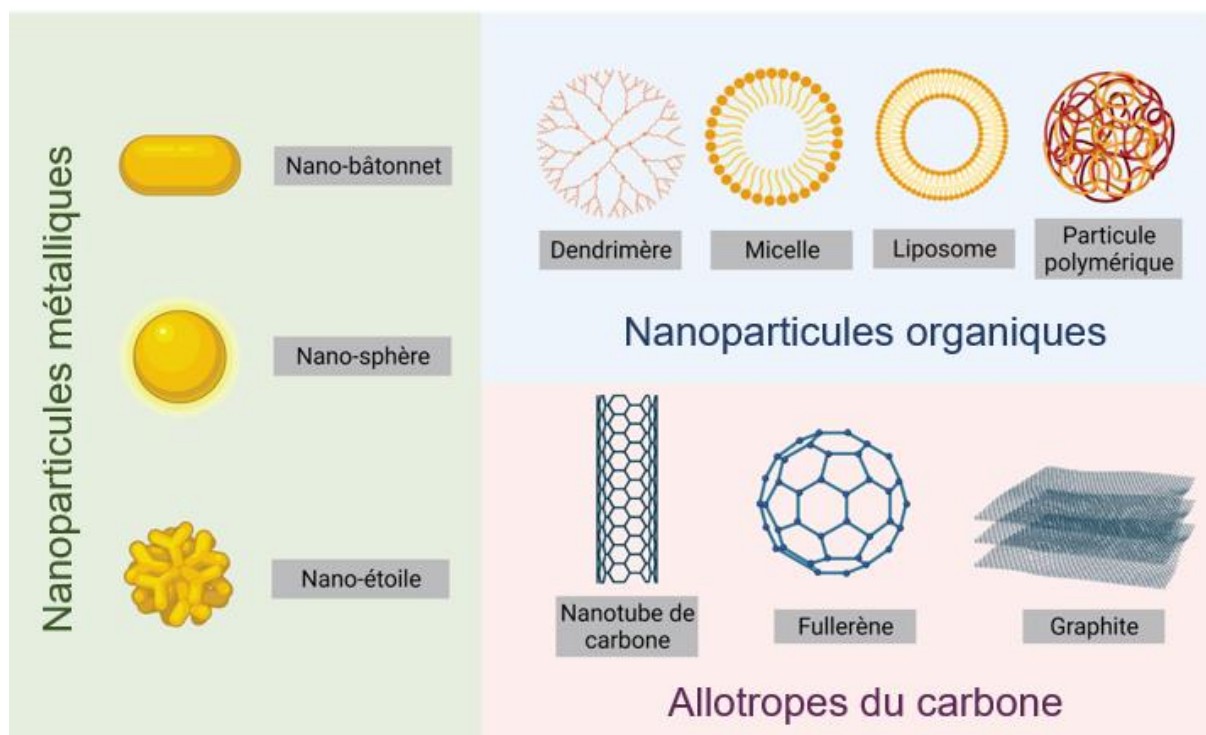


Figure 17. Schéma des différentes structures nanoparticulaires.

B. Interaction des nanoparticules avec le milieu biologique

Une fois administrés par voie intraveineuse, les systèmes nanoparticulaires circulants vont être détectés par le système phagocytaire mononucléé, première ligne de défense de l'organisme.

⁷⁶ Quarta, A. *et al.*, *Nanoscale*, **2012**, 4, 3319

Ce système phagocytaire mononucléé est constitué d'un ensemble de cellules immunitaires dont le rôle est d'éliminer les corps étrangers de l'organisme. En effet, les corps étrangers sont reconnus de manière non-spécifique par des protéines circulantes, les opsonines, capables de recruter les macrophages. Une fois fixées au corps étranger, un changement conformationnel des opsonines induit le recrutement de phagocytes. Les macrophages localisés au niveau du foie (cellules de Kupffer) et de la rate vont rapidement prendre en charge les antigènes opsonisés. La reconnaissance des systèmes nanoparticulaires par le système phagocytaire mononucléé est principalement médiée par leur charge de surface, leur hydrophobicité et leur rayon hydrodynamique. Ainsi, dans un premier temps, il a été démontré que les nanoparticules chargées ou hydrophobes étaient plus rapidement éliminées de la circulation sanguine par les macrophages⁷⁷. En ce qui concerne la taille, il a été mis en avant que plus le rayon hydrodynamique de la nanoparticule était faible, plus le phénomène d'opsonisation était limité⁷⁸. Enfin, la rigidité des nanoparticules semble influencer sur la reconnaissance de la nanoparticule par le système phagocytaire mononucléé. En effet, les nanoparticules « molles » posséderaient un temps de résidence dans la circulation sanguine plus important, ceci étant lié à une opsonisation plus marquée des nanoparticules rigides ce qui contribue à leur taux élevé de prise en charge par les macrophages⁷⁹.

C. Les nanoparticules dans le traitement du cancer

Dans le cadre de la lutte contre le cancer, les formulations nanoparticulaires ont été envisagées pour le développement de traitements innovants. Ces nanoparticules à visée anti-cancéreuse sont destinées à atteindre les zones tumorales afin d'y exercer leur action thérapeutique. Pour ce faire, elles doivent sortir du compartiment sanguin pour rejoindre le tissu tumoral, ce phénomène est appelé extravasation. Hors, le système vasculaire tumoral possède des propriétés intrinsèques différentes de celles des vaisseaux normaux. En effet, la perte d'intégrité des jonctions entre les cellules endothéliales conduit à une perméabilité accrue des vaisseaux tumoraux qui sont, de plus, dépourvus de péricytes, dilatés, irréguliers et désorganisés⁸⁰. Par ailleurs, il a été démontré que le drainage lymphatique au niveau tumoral était défaillant⁸¹. Ces particularités permettent aux nanoparticules de diffuser hors des vaisseaux sanguins et de

⁷⁷ Storm, G. *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1995**, 17, 31–48

⁷⁸ Nie, S. *et al.*, *Nanomedicine (Lond)*, **2010**, 5, 523–528

⁷⁹ Tengjisi, *et al.*, *J. Colloid. Interface Sci.*, 2022, 606, 1737–1744.

⁸⁰ Hashizume, H. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, **2000**, 156, 1363–1380

⁸¹ Greish, K. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting, *Cancer Nanotechnology*. Totowa, Humana Press; **2010**, Pages 25–37

s'accumuler spécifiquement au sein du tissu tumoral, on parle alors d'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) (fig. 18).

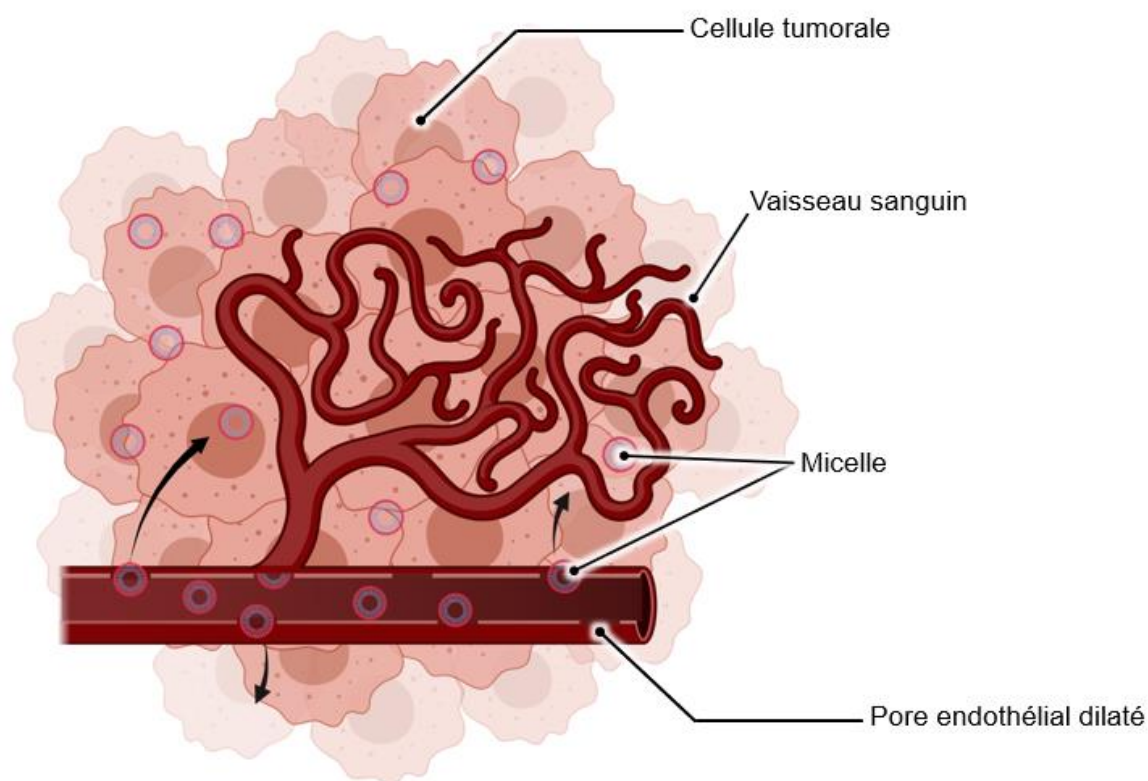


Figure 18. Schéma général illustrant l'effet EPR.

Ainsi, l'effet EPR correspond à la combinaison de la perméabilité importante des vaisseaux sanguins tumoraux et de la défaillance du drainage lymphatique au niveau tumoral. Il est admis que, pour bénéficier de l'effet EPR, les nanoparticules doivent être biocompatibles et posséder une taille supérieure à 40 kDa⁸². Les composés de poids moléculaire inférieur à 40 kDa ne s'accumulent pas au niveau de la zone tumorale car ils sont éliminés trop rapidement du compartiment sanguin. Par ailleurs, Hashizume *et al.* ont démontré que les pores trouvés sur les vaisseaux tumoraux présentaient un diamètre moyen de 1,7 μm , permettant l'extravasation des nanoparticules au niveau tumoral⁸⁰. Au niveau des vaisseaux irrigant les tissus sains, de tels pores n'existent pas. Ainsi, les micelles de taille nanométrique ne peuvent s'extravaser qu'au niveau des vaisseaux tumoraux et peuvent donc cibler passivement et de manière spécifique le tissu tumoral en exploitant les caractéristiques intrinsèques de la néo-vasculature. Les micelles

⁸² Maeda, H., *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, 2012, 88, 53–71

sont très utilisées de nos jours comme vecteurs pour la délivrance de thérapies anti-cancéreuses au niveau du site tumoral par effet EPR.

D. Importance de la chimie de surface des nanoparticules

Pour pouvoir avoir une chance de s'accumuler au niveau tumoral ou de pouvoir atteindre la zone d'intérêt à traiter, la nanoparticule doit présenter un temps de résidence dans la circulation sanguine assez long. Pour améliorer ce temps de circulation et contourner le système phagocytaire mononucléé, plusieurs techniques de modification de la chimie de surface des nanosystèmes ont été envisagées comme, par exemple, le recours à des revêtements hydrophiles (polyéthylène glycol (PEG), poloxamines, polysaccharides et poloxamères)⁸³. Cette technique consiste introduire à la surface de la nanoparticule un revêtement hydrophile qui forme ainsi un « nuage », limitant les interactions électrostatiques et hydrophobes à la surface de la micelle et empêchant, dès lors, le contact de la micelle avec les protéines d'opsonisation.

Les revêtements hydrophiles constituent une véritable révolution dans le monde des nanosciences et ont permis d'obtenir des nanoparticules biocompatibles possédant des temps de rétention dans le compartiment sanguin élevés⁸⁴. Bien que la pégylation soit l'option de choix pour améliorer le temps de demi-vie des nanoparticules, des études *in vivo* montrant les limites de ce revêtement sont apparues dans la littérature. En effet, il semblerait que, dans certains cas, la clairance par le système phagocytaire mononucléé de nanoparticules pégylées augmente au fil d'injections répétées, vraisemblablement à cause de la production d'anticorps anti-PEG⁸⁵. Afin de contourner les problèmes d'immunogénicité présumée du motif PEG, des alternatives à la pégylation ont été développées, toujours dans le but d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques des nanoparticules. Parmi ces solutions alternatives, le recours à des revêtements zwitterioniques a rapidement attiré l'attention de la communauté scientifique⁸⁶. Les revêtements zwitterioniques tels que les phosphobétaïnes, carboxybétaïnes, poly(carboxybétaïnes) et sulfobétaïnes empêchent efficacement la fixation non spécifique des protéines sanguines et l'activation des protéines du complément en formant un bouclier hydrophile autour de la nanoparticule⁸⁷. Cependant, l'étude de la stabilité et de l'immunogénicité de ces polymères hydrophiles nécessite des évaluations complémentaires⁸⁸.

⁸³ Brigger, I. *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2012**, *64*, 24–36

⁸⁴ Fam, S. Y. *et al.*, *Nanomaterials*, **2020**, *10*, 787

⁸⁵ Hoang, T. T. T. *et al.*, *Polymers*, **2020**, *12*, 298

⁸⁶ Jiang, J. *et al.*, *Polymers (Basel)*, **2019**, *11*, 1019

⁸⁷ Yang, W. *et al.*, *Nano Today*, **2014**, *9*, 10–16

⁸⁸ Knop, K. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 6288–6308

Il est à noter que l'introduction d'un pôle hydrophile PEGylé induit un temps de résidence plus long dans le compartiment sanguin mais peut aussi influencer sur le comportement des nanoparticules *in vivo*. En effet, le PEG crée une couche hydrophile dense autour de la nanoparticule pouvant limiter les interactions avec les récepteurs à la surface de la cellule induisant une diminution de son internalisation cellulaire et, *in fine*, de son efficacité. Ce phénomène appelé le « dilemme PEG » a suscité l'intérêt de la communauté scientifique qui s'est penchée sur le développement d'alternatives permettant de limiter les conséquences néfastes du PEG. Ainsi, l'introduction à la surface de la nanoparticule d'un motif PEG clivable en réponse à des stimuli extérieurs (changement de pH, état redox...) permettrait de s'affranchir du dilemme PEG. En effet, il a été démontré que le clivage du motif PEG au niveau du tissu d'adressage améliore l'internalisation cellulaire de la micelle et augmente son efficacité⁸⁹.

E. Cas particulier des micelles

Les micelles sont donc des structures nanoparticulaires de faible taille (< 50 nm) constituées de molécules amphiphiles (ou surfactants). Ces molécules amphiphiles, au-delà d'une concentration appelée CMC (*Critical Micelle Concentration*), s'auto-assemblent en milieu aqueux afin de minimiser l'énergie du système. Ainsi, les queues hydrophobes des surfactants s'orientent vers l'intérieur de la micelle, sans aucun contact avec le compartiment aqueux tandis que les têtes polaires hydrophiles sont dirigées vers l'extérieur, au contact de l'eau.

Comme expliqué précédemment, les micelles peuvent aussi être constituées de copolymères à blocs de polarité différente. Ces différents blocs sont eux-mêmes composés d'un enchaînement d'unités monomériques et possèdent des affinités différentes pour le milieu aqueux. Ainsi, les copolymères s'auto-assemblent dans l'eau spontanément en fonction de leur hydrophilie apparente et forment des micelles polymériques, le bloc de copolymère le plus hydrophile se situant en périphérie de la nanoparticule.

La formulation d'une micelle constitue généralement un procédé robuste et simple à mettre en œuvre. De plus, la formation de la micelle est un processus dynamique régi par des mécanismes physico-chimiques connus.

Il est à noter que l'intégrité micellaire dépend principalement de la concentration en amphiphiles dans le milieu. Ceci constitue d'ailleurs une des limitations majeures à l'utilisation

⁸⁹ Fang, Y. *et al.*, *Drug Deliv.*, **2017**, *24*, 22–32

de micelles en thérapeutique. En effet, une fois administrée par voie systémique, la micelle diluée dans le sang peut se dégrader et se dissocier en molécules amphiphiles libres (unimères) si la concentration micellaire sanguine passe en-deçà de la CMC, relarguant de ce fait le contenu micellaire dans la circulation avant même l'atteinte de la zone à traiter. Dès lors, il s'agit de construire des assemblages micellaires stables en milieu sanguin et présentant donc des valeurs de CMC les plus basses possibles pour limiter l'impact destructeur de la dilution sanguine. Ainsi, afin d'améliorer la cohésivité des systèmes micellaires, plusieurs stratégies ont été envisagées.

Dans un premier temps, certains paramètres inhérents aux composants mêmes de la micelle peuvent être optimisés pour augmenter la cohésion des architectures micellaires et donc diminuer leur CMC. Il a été prouvé que la taille de la partie hydrophobe des micelles, polymériques ou non, influait grandement sur la CMC. En effet, en ce qui concerne les micelles polymériques, plus la taille du bloc hydrophobe est importante, plus la CMC chute de manière exponentielle⁹⁰. En ce qui concerne les micelles composées de surfactants, plus la chaîne hydrophobe est longue, plus les interactions hydrophobes sont fortes et plus la CMC est basse⁹¹. Ainsi augmenter les **interactions hydrophobes** au sein du cœur micellaire permettrait une diminution de la CMC et une augmentation de la stabilité micellaire *in vivo*.

Parmi les stratégies envisagées, on peut d'abord noter le **recours à des micelles polymériques** possédant généralement des valeurs de CMC beaucoup plus basses que les micelles issues de l'assemblage d'amphiphiles non polymériques⁹². De plus, en augmentant le contraste de polarité entre le pôle hydrophobe et hydrophile de ces micelles, il a été prouvé qu'une diminution importante de la CMC était observée, améliorant la stabilité de la micelle *in vivo*⁹³. Dans cet exemple, le pôle hydrophile est constitué d'un polymère zwitterionique tandis que le pôle hydrophobe est formé par une longue chaîne hydrocarbonée DSPE.

L'introduction de groupements particuliers au sein de la structure de l'amphiphile peut induire une meilleure cohésion et donc conduire à une amélioration de la stabilité micellaire *in vivo*. C'est le cas, par exemple, des groupements aromatiques contenant des liaisons π . En effet, de par l'existence d'interactions attractives non-covalentes π - π entre les cycles aromatiques, on

⁹⁰ Kapse, A. *et al.*, Chapter 6 - Polymeric micelles: a ray of hope among new drug delivery systems, In *Advances in Pharmaceutical Product Development and Research, Drug Delivery Systems*, Academic Press, **2020**, Pages 235–289

⁹¹ Kopecký, F. *et al.*, *Acta Fac. Pharm. Univ. Comen.*, **2007**, *54*, 84–94

⁹² Lu, Y. *et al.*, *Nano Res.*, **2018**, *11*, 4985–4998

⁹³ Lu, Y., *et al.*, *Nat. Biomed. Eng.*, **2018**, *2*, 318–325

observe un rapprochement des entités amphiphiles. Il en résulte une meilleure cohésivité du système. Ce phénomène appelé *π -stacking* est largement utilisé dans la formulation de nanoparticules polymériques pour améliorer la stabilité des nano-systèmes *in vivo*⁹⁴ mais aussi pour faciliter le chargement au cœur des nanoparticules de molécules thérapeutiques hydrophobes présentant elles-mêmes plusieurs groupements aromatiques⁹⁵.

Toujours dans le but d'améliorer la stabilité des architectures micellaires, la **réticulation** (ou *cross-linking*) du cœur de la micelle ou de la couronne périphérique a été envisagée. Les réactions chimiques permettant une réticulation de la structure micellaire sont diverses. Parmi elles, la réticulation du cœur micellaire par **polymérisation radicalaire** stimulée par irradiation UV ou par la présence d'un initiateur de radicaux tel que K₂S₂O₈ ou AIBN a été décrite dans la littérature et cette technique de réticulation a prouvé une amélioration de la stabilité de la micelle polymérique considérée⁹⁶. Enfin, la réticulation du cœur polymérique *via* l'introduction de **ponts disulfure** permet aussi de conférer une stabilité accrue en milieu biologique⁹⁷.

Les stratégies explicitées ci-dessus ont été principalement appliquées à la formulation de micelles polymériques, sans être toutefois incompatibles avec la formulation de micelles non polymériques. Il est à noter que peu d'exemples de stabilisation physico-chimique de micelles non polymériques sont décrits dans la littérature. Cependant, au sein du laboratoire SCBM, des micelles non polymériques constituées d'amphiphile diacétylénique DA-PEG ont été développées. Ces micelles ont été réticulées par irradiation UV et ont prouvé leur stabilité *in vivo* ainsi que leur efficacité en tant que nanoparticule cargo pour plusieurs molécules cytotoxiques hydrophobes⁹⁸.

À la lumière des exemples précédents, il apparaît évident qu'une augmentation de la stabilité micellaire est obtenue lorsque les interactions entre les différents amphiphiles constituant la micelle sont fortes. Dès lors, le **recours aux amphiphiles perfluorés** peut paraître judicieux afin d'améliorer la stabilité d'un système micellaire. En effet, l'immiscibilité extrême des composés perfluorés avec l'eau conduit à une stabilité accrue des assemblages fluorés et à des valeurs de CMC plus basses que leurs homologues hydrocarbonés.

⁹⁴ Buwalda, S. *et al.*, *J. Colloid. Interf. Sci.*, **2018**, 514, 468–478

⁹⁵ Zhuang, W. R. *et al.*, *J. Control. Release*, **2019**, 294, 311–326

⁹⁶ Shuai, X. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **2004**, 15, 441–448

⁹⁷ Talelli, M. *et al.*, *Nano Today*, **2015**, 10, 93–117

⁹⁸ Ogier, J. *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 3902–3907

F. Intérêt des micelles en milieu biologique

Comme expliqué précédemment, les micelles peuvent être utilisées pour **solubiliser en leur cœur des composés hydrophobes**, normalement insolubles dans la circulation sanguine. Ainsi, le recours à l'architecture micellaire permet de s'affranchir des propriétés physicochimiques inadaptées de certains composés thérapeutiques tels que par exemple le paclitaxel, traitement référence dans divers cancers⁹⁹.

La micelle peut aussi **protéger du milieu sanguin** les composés thérapeutiques fragiles chargés en son cœur. En effet, de nombreuses estérases et enzymes circulantes peuvent altérer l'intégrité d'une molécule thérapeutique d'intérêt. L'encapsulation au sein des micelles permet une protection mécanique de ces molécules sensibles¹⁰⁰.

De plus, la formulation sous forme de micelle permet une **meilleure furtivité** des systèmes nanoparticulaires. Les micelles, du fait de leur petite taille (< 50 nm), possèdent des temps de rétention dans la circulation sanguine plus importants que les liposomes dont le rayon hydrodynamique est généralement compris entre 100 nm et 1 µm. Cette caractéristique des micelles est donc liée à une diminution de leur reconnaissance par le système phagocytaire mononucléé¹⁰¹.

Enfin, outre l'augmentation du temps de résidence dans la circulation sanguine, la petite taille des micelles permet une **meilleure pénétration tissulaire** ainsi qu'une **meilleure prise en charge cellulaire** comparativement à d'autres architectures nanoparticulaires possédant des diamètres plus importants (*e.g.* liposomes).

Ainsi, dans le cadre du développement de nouveaux anti-cancéreux, les micelles constituent un outil puissant permettant une vectorisation efficace et un ciblage passif de la tumeur par effet EPR. De plus, leur petite taille et l'optimisation de leur chimie de surface permet un échappement au système phagocytaire mononucléé et, donc, induit un temps de résidence dans la circulation sanguine prolongé. En effet, le recours aux revêtements hydrophiles tels que le PEG permet une diminution encore importante du phénomène d'opsonisation, première étape de la reconnaissance par le système phagocytaire mononucléé.

⁹⁹ He, Z. *et al.*, *Biomaterials*, **2016**, *101*, 296–309

¹⁰⁰ Simoes, S. M. N. *et al.*, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2014**, *12*, 1–22

¹⁰¹ Hoshyar, N. *et al.*, *Nanomedicine (Lond.)*, **2016**, *11*, 673–692

II. État de l'art sur les nanoparticules perfluorées à visée anti-cancéreuse

Le phénomène passif d'accumulation tumorale des nanoparticules par effet EPR peut aussi être exploité pour délivrer de manière préférentielle le dioxygène au niveau des zones hypoxiques tumorales et donc améliorer localement l'efficacité de la radiothérapie. Ceci induirait, en effet, une protection des tissus sains des effets délétères de l'hyperoxie tout en augmentant les effets néfastes des rayonnements ionisants au niveau tumoral.

En ce sens, en 2015, Lee *et al.* ont développé une microparticule creuse (diamètre d'environ 10 μm) contenant des nanogouttelettes de perfluorooctane (environ 200 nm de diamètre) (PFO-HP)¹⁰². Ils ont mis en évidence qu'en conditions hypoxiques, la présence des microparticules chargées en perfluorooctane permettait une meilleure croissance cellulaire à leur surface que le contrôle (PBS-HP). Ils ont aussi pu mettre en avant, en injectant à des souris les cellules adsorbées sur PFO-HP ou sur PBS-HP, que la présence du composé perfluoré limitait la proportion nécrotique liée à l'hypoxie de la matrice cellulaire, *in vivo*. Ils ont ainsi pu prouver que les microparticules perfluorées permettaient une oxygénation efficace des cellules murines de pré-ostéoblastes et ont donc confirmé le potentiel de stockage du dioxygène des composés perfluorés.

En 2016, Song *et al.* ont entrepris de construire une nanoparticule creuse de Bi_2Se_3 chargée en perfluorohexane (PFH). Tandis que le Bi_2Se_3 est exploité pour ces propriétés photothermiques après irradiation par un laser dans le domaine du proche infrarouge, le perfluorohexane sert de réservoir à dioxygène pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie. En effet, l'équipe a réussi à mettre en évidence qu'une irradiation de Bi_2Se_3 dans le proche infrarouge induit une élévation conséquente de la température, elle-même à l'origine d'un relargage plus important de dioxygène du composé perfluoré. Ainsi, sur plusieurs aspects, la nanoparticule ainsi pensée permettrait une amélioration de l'efficacité de la radiothérapie, *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, une amélioration de l'état d'oxygénation des cellules tumorales et une augmentation des lésions à l'ADN en complément de la radiothérapie ont été mises en avant. *In vivo*, le traitement par nanoparticules de Bi_2Se_3 chargées en PFH en complément d'une irradiation dans le proche infrarouge et de la radiothérapie a permis d'allonger significativement le délai de croissance tumorale et de contrôler plus efficacement l'évolution du volume tumoral, en comparaison avec les groupes contrôles¹⁰³. Cette même équipe, en 2017, a développé un autre nano-objet destiné,

¹⁰² Lee, H-Y. *et al.*, *Biomaterials*, **2015**, 53, 583–591

¹⁰³ Song, G. *et al.*, *Adv. Mater.*, **2016**, 28, 2716–2723

lui aussi, à tirer profit du potentiel des molécules perfluorées à solubiliser l'oxygène¹⁰⁴. Cette structure nanoparticulaire est composée d'un cœur métallique de tantale encapsulé dans une première couche hydrophobe d'octadécyltriméthoxysilane (C18-TMS) et sur laquelle des nano-gouttelettes de perfluorohexane (PFH) sont adsorbées. L'ensemble est ensuite décoré d'une molécule amphiphile présentant un motif PEG utilisée comme agent émulsifiant (fig. 19). Une nano-émulsion d'une phase hydrophobe (TaOx@C18-PFC-PMH-PEG) dispersée dans l'eau est alors obtenue. L'ensemble est enfin saturé en O₂ (TaOx@PFC-PEG@O₂). Cet objet a démontré son potentiel de réservoir à oxygène *in vitro* puis *in vivo*. Une fois injectées par voie intra-tumorale, ces nanoparticules associées aux nano-gouttelettes de PFH permettent une amélioration de l'oxygénation de la tumeur (la saturation moyenne en dioxygène de la tumeur passant de 10 à 37 % après injection). Enfin, il a été démontré qu'une injection intra-tumorale chez la souris de TaOx@PFC-PEG@O₂ en complément de la radiothérapie induit un ralentissement de la croissance tumorale et une diminution de la masse cancéreuse significativement plus importants que les groupes traités par rayonnements seuls ou seulement par TaOx@PFC-PEG@O₂.



Figure 19. Synthèse du système nanoparticulaire développé par Song *et al*¹⁰⁴.

D'autres formulations innovantes ont été développées afin de minimiser les effets indésirables systémiques des composés perfluorés *via* un ciblage passif de la tumeur par effet EPR tout en exploitant leur affinité pour l'oxygène. Parmi elles, on peut recenser la formulation sous forme de liposome, l'émulsion perfluorée se retrouvant au cœur du liposome¹⁰⁵ ou encore sous forme de vésicule associée aux liposomes. En ce sens, en 2016, Xu *et al.* ont démontré que le traitement de souris présentant des tumeurs par une vésicule lipidique nanoparticulaire contenant du perfluorohexane en complément de la radiothérapie a permis de freiner la croissance tumorale en comparaison avec le groupe contrôle radiothérapie seule¹⁰⁶.

¹⁰⁴ Song, G. *et al.*, *Biomaterials*, **2017**, *112*, 257–263

¹⁰⁵ Ninomiya, K. *et al.*, *Ultrason. Sonochem.*, **2016**, *28*, 54–61

¹⁰⁶ Xu, L. *et al.*, *J. Transl. Med.*, **2016**, *14*, 268

Le caractère radiosensibilisant des systèmes nanoparticulaires perfluorés a été confirmé en 2018 par l'équipe de Wu¹⁰⁷. Ainsi, une nanoparticule composée d'un coeur hydrophobe de perfluorotributylamine piégé au sein des régions hydrophobes de l'albumine (PFTBA@HSA) a été formulée au laboratoire (fig. 20).

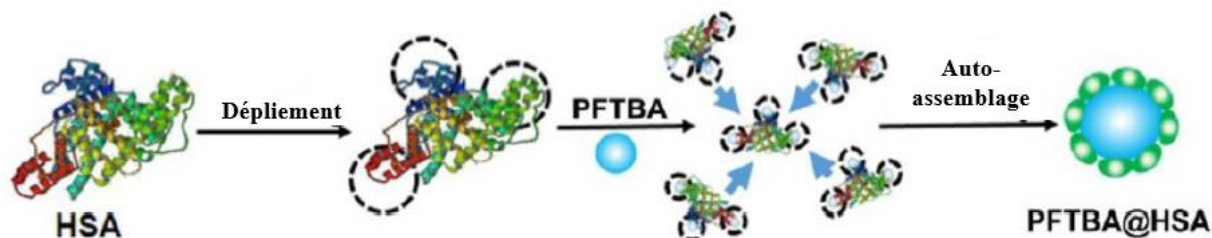


Figure 20. Nanoparticule développée par Zhou *et al*¹⁰⁷.

En théorie, ce type de nanostructure permet une délivrance de dioxygène dans la tumeur en deux temps : le premier apport en O₂ repose sur la capacité du composé fluoré à fixer et relarguer le dioxygène au niveau du site tumoral, le second, quant à lui, est lié à l'activité antiplaquettaire du composé fluoré. L'inhibition de l'activité plaquettaire médiée par les composés fluorés induit une perturbation de la paroi des microvaisseaux tumoraux ce qui facilite l'extravasation d'hématies au niveau du microenvironnement tumoral, augmentant dès lors la perfusion en dioxygène de la tumeur.

Le potentiel du système PFTBA@HSA à inhiber l'agrégation plaquettaire a été validé *in vitro*. De plus, une densité de globules rouges et une concentration en hémoglobine plus importantes ont été mises en évidence au sein des tumeurs post-injection de PFTBA@HSA chez la souris. Une administration de PFTBA@HSA par voie intraveineuse chez la souris présentant une greffe de cellules murines du carcinome du côlon entraîne une diminution du phénomène d'hypoxie tumorale, observée pendant les 24 h qui suivent l'injection. Le caractère radiosensibilisant de PFTBA@HSA a ensuite été évalué sur des modèles de souris porteuses de xénogreffes de cancer du sein radiorésistant. Il a ainsi pu être démontré qu'un traitement par PFTBA@HSA associé à une irradiation par rayonnements ionisants engendrait une inhibition de la croissance tumorale efficace et plus conséquente que chez les groupes traités par rayonnements seuls ou PFTBA@HSA seul. Les auteurs ont ainsi pu synthétiser un système radiosensibilisant efficace, stable et non toxique exploitant les nombreuses propriétés des composés perfluorés.

¹⁰⁷ Zhou, Z. *et al.*, *Theranostics*, **2018**, 8, 4898–4911

Certaines équipes de recherche ont décidé d'exploiter les propriétés de prise en charge du dioxygène des composés perfluorés en les incorporant au cœur d'érythrocytes. En effet, en faisant subir un traitement hypotonique aux érythrocytes, leur membrane peut être isolée et utilisée à des fins thérapeutiques. Par plusieurs étapes d'ultrasonication, l'encapsulation d'un assemblage PFC@PLGA, polymère biocompatible, a été réalisée au sein des membranes vides d'érythrocytes. La membrane érythrocytaire induit une furtivité du système nanoparticulaire liée à sa faible immunogénicité conférant à l'assemblage nanoparticulaire ($d = 290$ nm) un temps de résidence au sein de la circulation sanguine prolongé. Les auteurs ont donc pu prouver une augmentation de la perfusion en dioxygène des tumeurs ainsi qu'une activité radiosensibilisante médiées par leur système nanoparticulaire *in vivo*¹⁰⁸. D'autres équipes se sont intéressées à l'emploi de la membrane érythrocytaire comme véhicule pour le transport de PFC au plus proche de la tumeur pour une action radiosensibilisante et ont obtenu des résultats similaires¹⁰⁹.

Les composés perfluorés peuvent aussi être employés dans d'autres domaines que la radiosensibilisation. En effet, le domaine de la thérapie photodynamique s'intéresse aussi aux propriétés de solubilisation du dioxygène des composés perfluorés pour la construction de systèmes nanométriques. En effet, l'augmentation de la perfusion en dioxygène des tumeurs permet l'augmentation de la synthèse de l'espèce $^1\text{O}_2$ après irradiation de la molécule photosensibilisante et ainsi une potentialisation des dommages cellulaires.

Dans ce contexte, Cheng *et al.* ont construit une nanoplateforme perfluorée composée d'une nanogouttelette de perfluorohexane stabilisée par une monocouche de lipides et d'amphiphiles DSPE-PEG 2000. Au sein de cette couche périphérique, une molécule photosensibilisante, IR780, a été chargée. Ainsi, l'équipe a pu mettre en évidence chez les cellules tumorales une augmentation de la formation d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ ainsi que de ROS en présence de la nanoplateforme perfluorée, comparativement au même nanovecteur exempt de perfluorohexane. Enfin, ils ont pu prouver qu'une injection intra-tumorale de la nanoplateforme perfluorée sur des souris porteuses de xénogreffes induisait un contrôle locorégional de la tumeur plus important que chez les groupes contrôles¹¹⁰. La formulation sous forme d'assemblage micellaire polymérique a aussi été envisagée afin de construire un vecteur perfluoré photosensibilisant utilisable *in vivo*. En 2018, Wang *et al.* ont développé une micelle

¹⁰⁸ Gao, M. *et al.*, *Adv. Mater.*, **2017**, 1701429

¹⁰⁹ Yu, P. *et al.*, *Adv. Therap.*, **2019**, 1900031

¹¹⁰ Cheng, Y. *et al.*, *Nat. Commun.*, **2015**, 6, 8785

polymérique perfluorée chargée avec une espèce photosensibilisante (Ce6) afin d'améliorer l'efficacité de la thérapie photodynamique. Le polymère perfluoré a été obtenu par réaction entre l'acide perfluorooctanoïque et la polyéthylène imine (fig. 21). L'équipe a pu démontrer une amélioration de l'état d'oxygénation tumorale ainsi qu'une potentialisation des effets tumoricides de la molécule photosensibilisante, *in vitro* et *in vivo* après irradiation¹¹¹.

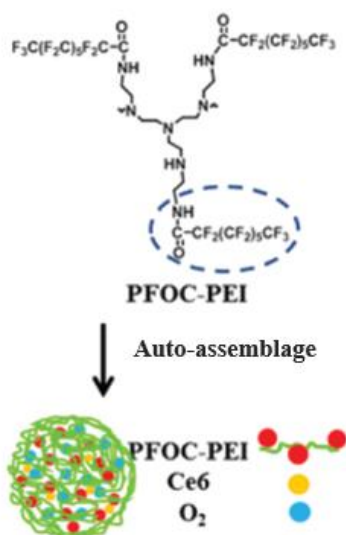


Figure 21. Structure et formulation de l'assemblage micellaire développé par Wang *et al*¹¹¹.

Il est important de souligner que peu d'exemples de formulations nanoparticulaires de composés perfluorés utilisées dans le domaine de la radiosensibilisation sont décrits dans la littérature. Dans ce contexte, la construction d'un vecteur micellaire perfluoré et l'efficacité radiosensibilisante d'un tel vecteur restent encore à investiguer.

III. Objectifs du chapitre

Dans cette partie introductive, nous avons défini les nanoparticules et mis en avant que le recours à des structures nanoparticulaires dans la thérapie anti-cancéreuse permettait une vectorisation efficace de composés d'intérêt thérapeutique *via* le phénomène de ciblage passif de la tumeur par exploitation de l'effet EPR. Cette accumulation passive au niveau tumoral nécessite un temps de résidence dans la circulation sanguine des nanoparticules suffisant. L'optimisation de la taille et de la chimie de surface des nanoparticules est souvent nécessaire

¹¹¹ Wang, Q. *et al.*, *Biomater. Sci.*, **2018**, 6, 3096

pour limiter la reconnaissance par le système phagocytaire mononucléé et diminuer le phénomène de clairance.

Dans le cadre du développement de nouveaux outils permettant d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie, les nanoparticules constituent une réelle avancée puisqu'elles permettent d'augmenter sélectivement la radiosensibilité tumorale tout en épargnant les tissus sains environnants. Ainsi, par exemple, la construction de nanoparticules perfluorées permettrait d'augmenter la perfusion en dioxygène tumorale palliant ainsi l'hypoxie chronique et la radorésistance associée à ce phénomène. Plusieurs équipes de recherche ont publié sur ce sujet et toutes ont pu prouver une efficacité radiosensibilisante des nanoparticules perfluorées. Cependant, dans la plupart de ces exemples, les composés perfluorés sont sous forme de nanogouttelettes et donc en émulsion. Ces nanogouttelettes sont adsorbées à la surface d'une nanoparticule métallique ou encapsulées à l'intérieur d'une nanoparticule creuse. L'introduction de la composante perfluorée par modification de la structure des micelles ou du revêtement des nanoparticules n'est encore que très peu considérée dans la littérature et permettrait de simplifier les nanosystèmes perfluorés.

Les micelles, de par leurs caractéristiques particulières, sont de bons candidats pour vectoriser les traitements anti-cancéreux. Leur petite taille leur permet d'échapper au système phagocytaire mononucléé et de diffuser plus loin dans les tissus que des nanoparticules plus imposantes comme les liposomes. Leur grande capacité de chargement ainsi que la diversité de fonctionnalisation de leur cœur et de leur surface rendent ce type de nanostructures très attractives pour le développement de nouveaux traitements anti-cancéreux et la formulation innovante d'agents radiosensibilisants tels que les composés perfluorés.

Au laboratoire, des micelles présentant une couronne hydrophile constituée de PEG 2000 ont déjà été utilisées comme méthode de vectorisation. Il s'agit d'un système nanoparticulaire présentant un cœur diacétylénique photopolymérisable, induisant une stabilisation de l'architecture micellaire *in vivo*. Ces micelles polydiacétyléniques ont prouvé leur efficacité d'adressage tumoral et de vectorisation de principe actif *in vivo*¹¹². Sur la base de ces résultats plus qu'encourageants, des micelles présentant un cœur perfluoré ont été développées et utilisées en tant qu'agent de contraste en IRM ¹⁹F. Ces micelles perfluorées ont démontré un tropisme tumoral, par simple exploitation de l'effet EPR ainsi que leur efficacité de contraste¹¹³.

¹¹² Mackiewicz, N. *et al.*, *Small*, **2011**, 7, 2786–2792

¹¹³ Jamgotchian, L. *et al.*, *Nanoscale*, **2021**, 13, 2373

Dans ce chapitre, nous décrivons l'utilisation du système micellaire perfluoré préalablement développé au laboratoire comme outil de radiosensibilisation. La synthèse des amphiphiles perfluorés et leur formulation sous forme de micelle ont été réalisées. La capacité de chargement en dioxygène de cet assemblage micellaire perfluoré a été évaluée.

In vitro, le profil de toxicité du vecteur perfluoré a été déterminé et son internalisation cellulaire a été investiguée. Enfin, l'efficacité radiosensibilisante de ces autoassemblages perfluorés a été étudiée sur des cellules murines de mélanome.

IV. Résultats et discussion

A. Synthèse des amphiphiles perfluorés et formulation sous forme de micelle

Afin d'obtenir des vecteurs permettant de pallier l'hypoxie des cellules tumorales, la construction d'un amphiphile perfluoré a été envisagée. Les micelles formées à partir d'un tel composé devraient permettre de solubiliser le dioxygène et de le transporter au niveau tumoral. L'amphiphile, ainsi pensé, présente une chaîne de poly(éthylène glycol) (2000 Da, monométhoxy) en guise de tête polaire et un dérivé de perfluorotétradécanol (PFTD) en guise de queue hydrophobe. Une première étape d'activation de la fonction hydroxyle terminale du méthoxy-PEG 2000 sous forme de tosylate mène à l'obtention de l'intermédiaire réactif **I.1** avec un rendement satisfaisant. Cet intermédiaire **I.1** est mis en réaction avec le 1*H*,1*H*-perfluorotétradécanol, permettant l'accès à l'amphiphile PFTD-PEG (fig. 22) par substitution nucléophile.

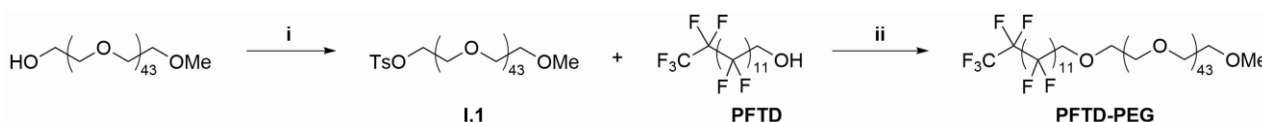


Figure 22. Voie réactionnelle pour la synthèse de l'amphiphile PFTD-PEG. i. TsCl (5 équiv.), NEt₃ (5 équiv.), DCM anh., TA, 16 h, 78 % ii. PFTD (4 équiv.), NaH 60 % (4 équiv.), 3 jours, 75 °C, 63 %

L'amphiphile PFTD-PEG a ensuite été utilisé afin de formuler des micelles à cœur perfluoré. Une étape de traitement à la sonde ultrasonore (10 min, 40 %) induit la formation de micelles et permet l'accès à une suspension colloïdale perfluorée stable. Cette dernière est filtrée sur membrane (0,22 μm) avant une caractérisation par diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*, DLS) qui confirme la structure micellaire des amphiphiles PFTD-PEG avec un diamètre moyen de 13 nm environ avec un PDI (*Polydispersity index*) de 20 % environ (fig. 23.a). Le potentiel ζ (charge de surface des particules) de la suspension de PFTD-PEG a aussi

été mesuré et s'est avéré nul (fig. 23.b), reflétant le caractère neutre (non-ionique) des chaînes PEG constituant la surface de la micelle perfluorée.

La technique d'ultrasonication pour la formation de micelles a déjà été largement décrite dans la littérature et permet l'accès à des formulations micellaires homogènes¹¹⁴. La sonication induit une dispersion des molécules du système. Ces dernières se réarrangent en forme de micelle, état le plus thermodynamiquement favorisé.

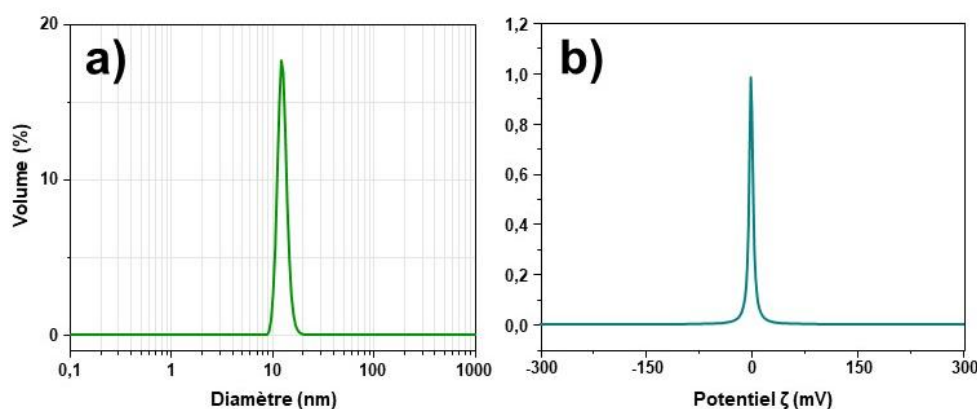


Figure 23. a) Mesure DLS d'une suspension micellaire PFTD-PEG 100 % à 10 mg mL⁻¹ (H₂O).
b) Mesure du potentiel ζ d'une suspension micellaire PFTD-PEG 100 % à 10 mg mL⁻¹ (H₂O).

A l'échelle cellulaire, les petites nanoparticules peuvent être internalisées par simple diffusion à travers la membrane ($d < 10$ nm) ou par plusieurs voies d'endocytose, dont les limites de prise en charge sont compatibles avec leur faible taille¹¹⁵. Ainsi, la faible taille des micelles perfluorées peut faciliter leur internalisation au niveau cellulaire.

De plus, les micelles perfluorées ainsi formulées présentent un diamètre moyen largement compatible avec une utilisation *in vivo*. En effet, comme expliqué précédemment (*cf* Chapitre 1. I. B.), la taille des nanoparticules influe grandement sur leur reconnaissance par le système phagocytaire mononucléé et leur prise en charge future dans le foie ou la rate, principaux acteurs de ce système. Il a été prouvé que la prise en charge des nanoparticules par le système phagocytaire mononucléé était plus importante pour des nano-objets de grande taille (> 30 nm). Ainsi, une taille de l'ordre de la dizaine de nanomètres constitue un réel atout pour une possible translation vers le *vivo* et garantit une limitation du phénomène immunitaire. De plus, une faible taille nanoparticulaire permettrait une pénétration plus élevée au sein de l'interstitium tumoral. En effet, il a été démontré que le taux de pénétration au sein de la tumeur diminuait avec

¹¹⁴ Cerqueira, P. *et al.*, *Int. J. Pharmaceutics*, **2019**, 566, 282–290

¹¹⁵ Panja, P. *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.* **2020**, 11, 2363–2368

l'augmentation du diamètre nanoparticulaire, cet effet étant plus marqué chez les tumeurs présentant des pores vasculaires plus étroits¹¹⁶.

De même, une charge surfacique neutre dans le cas d'une utilisation des nanoparticules *in vivo* représente un avantage non négligeable lorsque l'on considère le phénomène de reconnaissance par le système phagocytaire mononucléé. En effet, il a été mis en évidence que les cellules phagocytaires reconnaissent plus efficacement les nanoparticules présentant une charge surfacique élevée (positive ou négative)¹¹⁷.

Ainsi, les micelles perfluorées présentent une taille et une charge surfacique optimales pour leur utilisation future *in vitro* et *in vivo*.

La concentration micellaire critique, paramètre important pour l'emploi des micelles perfluorées *in vivo*, a ensuite été évaluée pour chacun des amphiphiles perfluorés.

B. Estimation de la CMC des micelles PFTD-PEG 100 %

Les amphiphiles perfluorés s'auto-assemblent de manière spontanée sous forme de micelle à des concentrations supérieures à leur concentration micellaire critique (CMC). Nous avons souhaité, dans un premier temps, évaluer la CMC des amphiphiles PFTD-PEG. Afin de mesurer la CMC de surfactants, plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature. Par exemple, le suivi de l'évolution de la conductivité, de la turbidité ou de la tension de surface des suspensions micellaires a été décrit pour la détermination de la CMC. D'autres stratégies de mesure de la CMC ont vu le jour comme l'utilisation de sondes fluorescentes telles que le pyrène dont les propriétés optiques s'avèrent très dépendantes de la polarité du milieu environnant¹¹⁸. Tandis que la mesure de la conductivité ne concerne que les surfactants ioniques, l'estimation de la CMC par méthodes spectroscopiques ou par suivi de l'évolution de la tension de surface sont des méthodes adaptées à tous types de surfactants (cationiques, anioniques, neutres). Pour la mesure de CMC de surfactants neutres, la mesure de l'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration de surfactants demeure la méthode la plus couramment utilisée. Cette méthode très sensible permet de travailler à de très faibles concentrations. Il existe deux grandes méthodes d'étude de la tension de surface de solutions, la méthode Wilhelmy et la méthode du Noüy. Tandis que la méthode Wilhelmy sera préférée dans le cas de solutions

¹¹⁶ Chauhan, V. P. *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, **2012**, 7, 383–388

¹¹⁷ Xiao, K. *et al.*, *Biomaterials*, **2011**, 32, 3435e3446

¹¹⁸ Perinelli, D. R. *et al.*, *Langmuir*, **2020**, 36, 5745–5753

visqueuses, la méthode du Noüy constitue la méthode de choix pour l'étude de la tension de solutions aqueuses. Une variante de la méthode du Noüy (du Noüy-Padday), plus adaptée à de faibles volumes a été utilisée pour la détermination de la CMC de l'amphiphile PFTD-PEG. L'expérience consiste à mesurer la force exercée par la solution sur une tige métallique immergée en faisant varier la concentration d'amphiphile perfluoré. Cette force étant mathématiquement reliée à la tension de surface, cette expérience permet la mesure de la tension de surface de la solution à différentes concentrations d'amphiphile. À une concentration inférieure à la CMC, les amphiphiles isolés en solution se distribuent majoritairement à

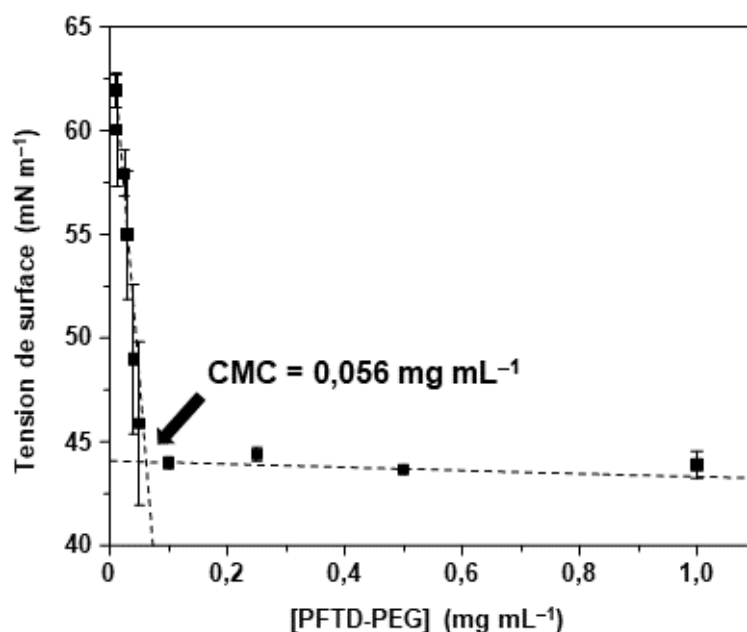


Figure 24. Mesure de l'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration d'amphiphile PFTD-PEG.

l'interface liquide/air, ce qui influence la valeur de la tension de surface. Celle-ci diminue avec l'augmentation de la concentration en amphiphiles jusqu'à la CMC. La CMC est atteinte lorsque l'interface liquide/air est saturée. Au-delà de la CMC, l'ajout d'amphiphiles dans le milieu entraîne la formation de micelles, sans impact sur la tension de surface qui reste constante. Ainsi, l'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration en amphiphiles perfluorés [PFTD-PEG] peut être tracée sur un graphe sur lequel la CMC, correspondant à l'intersection des deux droites, peut être estimée (fig. 24).

La valeur de la CMC de l'amphiphile PFTD-PEG obtenue par la méthode du Noüy-Padday est de 0,056 mg mL⁻¹ ou 21,2 μ M ($MM_{\text{PFTD-PEG}} = 2642,6 \text{ g mol}^{-1}$). Ainsi, la CMC de l'amphiphile

PFTD-PEG est plus faible que celles d'autres surfactants hydrocarbonés tels que le Triton X 100 (CMC = 0.24 mM), le SDS (CMC = 8 mM) ou le CTAB (CMC = 0.93 mM)^{119,120}.

La valeur basse de la CMC de l'amphiphile PFTD-PEG constitue un critère essentiel pour une utilisation des amphiphiles *in vivo*, permettant de limiter les conséquences de l'hémodilution une fois les micelles dans l'organisme. La combinaison d'une CMC faible, d'une petite taille et d'une charge de surface nulle permet d'envisager une stabilité des micelles perfluorées en fluide biologique, une furtivité *in vivo*, et un potentiel d'extravasation et de pénétration de l'interstitium tumoral élevé.

C. Étude du potentiel de solubilisation du dioxygène des micelles perfluorées

La capacité de solubilisation du dioxygène est une propriété fondamentale des micelles perfluorées pour leur utilisation en tant qu'agents de reperfusion, dans le cadre de la lutte contre l'hypoxie tumorale. Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature afin de mesurer le contenu en dioxygène présent dans les micelles ou dans d'autres assemblages supramoléculaires. Ces méthodes ne permettent qu'une mesure indirecte du chargement en dioxygène, reposant sur la mesure de la concentration en dioxygène dans le dispersant (eau). Ainsi, une technique largement utilisée consiste à mesurer la vitesse de décroissance de la concentration en dioxygène d'une suspension micellaire, préalablement saturée en O₂, pendant l'équilibration avec l'air (20 % O₂). Dans le cas des micelles perfluorées, toute différence de vitesse de déoxygénation observée peut être directement reliée à l'oxygène, encapsulé au sein du cœur perfluoré, qui diffuse vers le milieu aqueux lorsque l'oxygène dissous dans la solution saturée s'échappe dans l'atmosphère¹²¹. Cette méthode a souvent été utilisée dans la littérature et permet une estimation fiable du potentiel de dissolution du dioxygène que présentent les auto-assemblages perfluorés¹²². Ainsi, nous avons décidé d'appliquer cette méthode et avons suivi, à l'aide d'une sonde à dioxygène type électrode de Clark (Unisense®), l'évolution de la concentration en dioxygène au cours du temps dans différentes suspensions micellaires (V = 4 mL, Triton X 100 3,8 mM, SDS 9 mM, PFTD-PEG 3,8 mM) préalablement saturées en O₂. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 25 et ont été modélisés, en accord avec la littérature¹²¹, par une fonction exponentielle du premier ordre telle que

¹¹⁹ Fluksman, A. *et al.*, *Anal. Methods*, **2019**, *11*, 3810–3818

¹²⁰ Bhattarai, A. *et al.*, *Scientific World*, **2014**, *12*, 41-43

¹²¹ Fan, M. *et al.*, *ACS Appl. Bio Mater.*, **2018**, *1*, 708–713

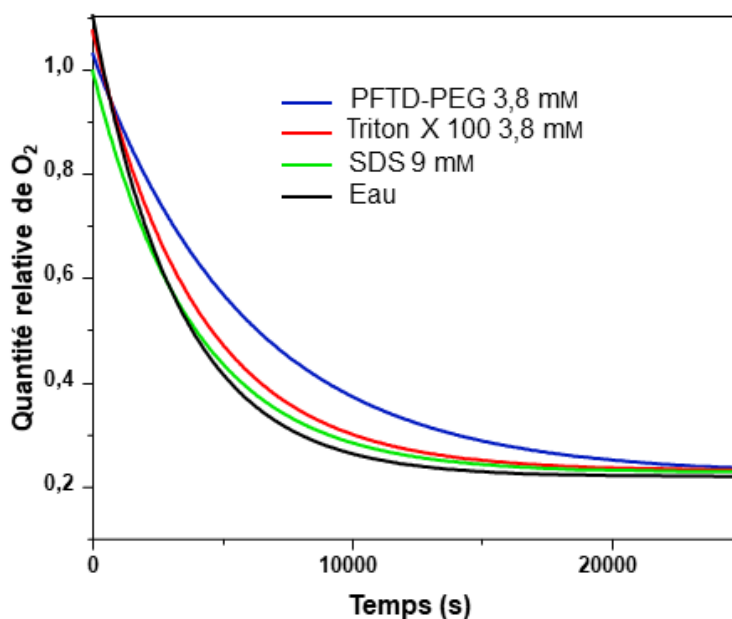
¹²² Pitarresi, G. *et al.*, *J. Fluor. Chem.*, **2008**, *129*, 1096–1103

$$y = y_0 + Ae^{-x/t} \quad (Eq. 4)$$

Dans cette équation, y_0 correspond à la valeur de y à $t = 0$ s tandis que A correspond à l'amplitude de la courbe telle que $A = \text{Plateau} - y_0$. Cette modélisation permet l'obtention de paramètres essentiels tels que le temps de demi-vie du dioxygène au sein des suspensions micellaires et le taux de libération du dioxygène des différentes suspensions micellaires testées. Ces paramètres sont recensés dans la figure 25. On peut noter un temps de demi-vie du dioxygène plus important dans la suspension micellaire PFTD-PEG à 10 mg mL^{-1} ($3,8 \text{ mM}$) comparativement aux trois autres conditions (eau, triton X 100 $3,8 \text{ mM}$, SDS 9 mM), atteignant une valeur voisine du double de celle obtenue pour l'eau ($t_{1/2} = 4106$ s pour la suspension micellaire PFTD-PEG contre 2316 s pour l'eau). En ce qui concerne le taux de libération, le dioxygène est libéré plus lentement depuis la suspension micellaire PFTD-PEG que depuis les autres formulations testées (eau, triton X 100 $3,8 \text{ mM}$, SDS 9 mM), laissant suggérer une quantité importante de dioxygène retenue au sein des micelles, ne diffusant que lorsque l'oxygène dissous en phase aqueuse est à l'équilibre avec l'oxygène de l'air. Il semblerait, dès

lors, que l'existence d'un équilibre $[O_2]_{\text{solution}} \leftrightarrow [O_2]_{\text{perfluoré}} \leftrightarrow [O_2]_{\text{atm}}$ ¹²².

Afin de confirmer cette tendance, une autre méthode de mesure du contenu en dioxygène des micelles perfluorées a été mise en pratique. En effet, l'évaluation du chargement en dioxygène des micelles perfluorées peut être réalisée *via* la mesure de l'apport en dioxygène associé à l'ajout d'un volume précis de suspension micellaire saturée en dioxygène dans un grand volume d'eau dégazée au N_2 ¹⁰⁴. Les concentrations de travail doivent se situer en dessous de la CMC



	Temps de demi-vie ($t_{1/2}$) (s)	Taux de libération ($\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)
Eau	2316,1 ± 33,7	2,99 ± 0,04
SDS 9 mM	2657,0 ± 29,9	2,61 ± 0,03
Triton X 100 3,8 mM	2785,3 ± 49,9	2,49 ± 0,04
PFTD-PEG 3,8 mM	4106,8 ± 101,2	1,69 ± 0,04

Figure 25. Évolution de la concentration en O_2 au cours du temps dans différentes suspensions micellaires préalablement saturées en O_2 et tableau recensant les différents paramètres issus de l'exploitation du modèle exponentiel (OriginPro, $R^2 > 0,9$)

afin de garantir une libération rapide du dioxygène piégé au sein du cœur perfluoré.

Ainsi, on note la même tendance qu'observée lors de l'expérience précédente avec une libération de dioxygène plus importante pour les suspensions micellaires perfluorées que pour les autres formulations micellaires hydrocarbonées (Triton X 100, SDS...), reflétant la meilleure capacité de solubilisation du dioxygène des colloïdes perfluorés, comparativement à leurs homologues hydrocarbonés. Il convient, de plus, de remarquer que la solubilisation du dioxygène semble dépendante de la concentration en fluor de la solution, étant donné qu'on observe une solubilisation plus importante pour des concentrations croissantes de PFTD-PEG (fig. 26).

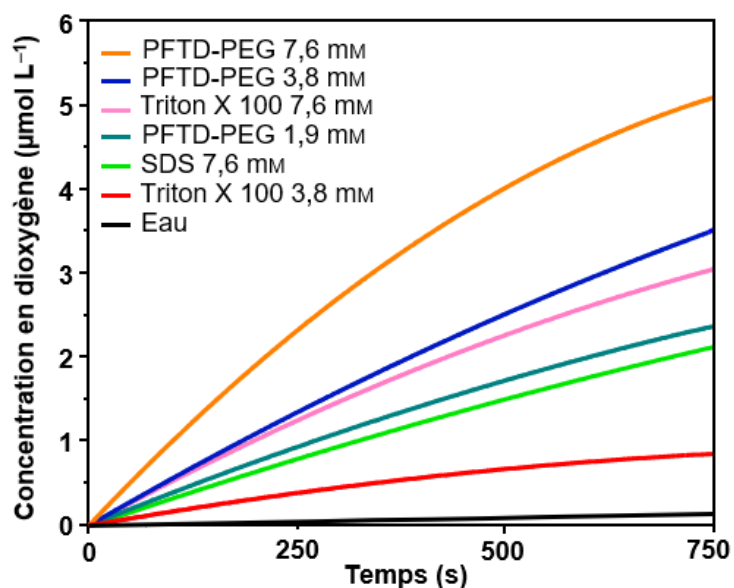


Figure 26. Suivi de l'évolution de la concentration en dioxygène au cours du temps après ajout dans un grand volume d'eau dégazée de 0,2 mL de suspension micellaire saturée en O₂. Modèle polynomial d'ordre 2 obtenu avec OriginPro (R² > 0,9).

Ces observations sont le reflet de la bonne capacité des micelles perfluorées à prendre en charge le dioxygène présent dans le milieu. Ces expériences valident l'intérêt de la structure perfluorée au cœur de la micelle pour la solubilisation du dioxygène et corroborent les impressionnantes capacités de solubilisation du dioxygène des composés perfluorés, déjà bien décrites dans la littérature. Ces résultats nous ont encouragés à tester l'emploi des micelles perfluorées en tant que navette à dioxygène permettant de pallier l'hypoxie tumorale et ainsi améliorer l'efficacité des rayonnements ionisants.

Pour envisager une utilisation de ces objets en combinaison avec la radiothérapie, il nous a tout d'abord fallu démontrer leur innocuité en absence de rayonnement ionisant.

D. Étude de la cytotoxicité des micelles PFTD-PEG sur cellules B16F10

La toxicité intrinsèque des micelles perfluorées a été testée *in vitro* sur la lignée cellulaire B16F10 (cellules de mélanome murin), choisie comme modèle. Pour ce faire, nous avons réalisé un test MTS à différentes concentrations de PFTD-PEG allant de 0,01 mg mL⁻¹, inférieure à la CMC, à 1 mg mL⁻¹ et avons obtenu les résultats résumés dans la figure 27. Aucune cytotoxicité n'a été observée aux concentrations inférieures ou égales à 0,5 mg mL⁻¹. Une toxicité significative a néanmoins été mise en évidence à 1 mg mL⁻¹ (79 % de viabilité cellulaire après 24 h d'exposition aux micelles perfluorées). Il est à noter que la concentration de 1 mg mL⁻¹ est largement supérieure à celle envisagée pour les études ultérieures et l'application visée. Cette toxicité résiduelle des micelles perfluorées à forte concentration ne constitue donc pas une limite à leur utilisation *in vitro*.

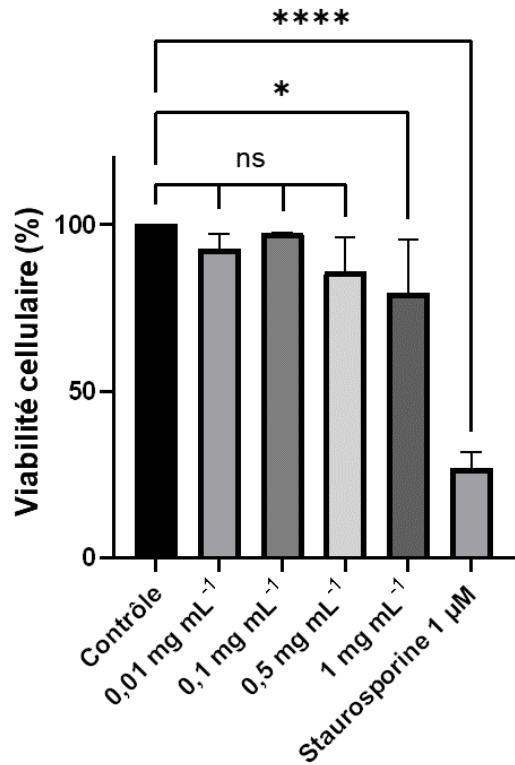


Figure 27. Étude de la cytotoxicité des micelles PFTD-PEG sur cellules B16F10 par test MTS. * p < 0,05 **** p < 0,0001 (test ANOVA). Les données sont représentées en moyenne ± écart type.

L'absence de cytotoxicité des micelles perfluorées permet d'envisager sereinement les études *in vitro*, en commençant par démontrer que les micelles ont la capacité de passer de l'espace extracellulaire vers l'intérieur des cellules, où l'oxygène transporté pourra exercer son effet radiosensibilisant.

E. Étude du devenir intracellulaire des micelles PFTD-PEG

1. Etude de la localisation intracellulaire des micelles PFTD-PEG

Afin d'étudier plus en détails l'interaction des micelles perfluorées avec les cellules tumorales, l'encapsulation d'un fluorophore hydrophobe au sein du cœur perfluoré de la micelle a été réalisée. L'encapsulation du DiD (fluorophore organique hydrophobe, $\lambda_{ex} = 644 \text{ nm} / \lambda_{em} = 665 \text{ nm}$) au cœur de la micelle PFTD-PEG, à un taux massique de 1 %, a permis la visualisation des micelles au sein de cultures cellulaires. Pour ce faire, les cellules B16F10 ont été incubées pendant 24 h avec les micelles PFTD-PEG ($c = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$), puis elles ont été observées par microscopie confocale. Un marquage des noyaux au colorant Hoechst 33342 a permis une

visualisation plus précise de la morphologie cellulaire (fig. 28). Les images de microscopie confocale obtenues nous ont permis de confirmer l'internalisation des micelles perfluorées au sein des cellules tumorales. Aucune colocalisation des micelles et des noyaux cellulaires n'a été observée et les micelles semblent réparties de manière homogène dans la cellule (noyau exclu).

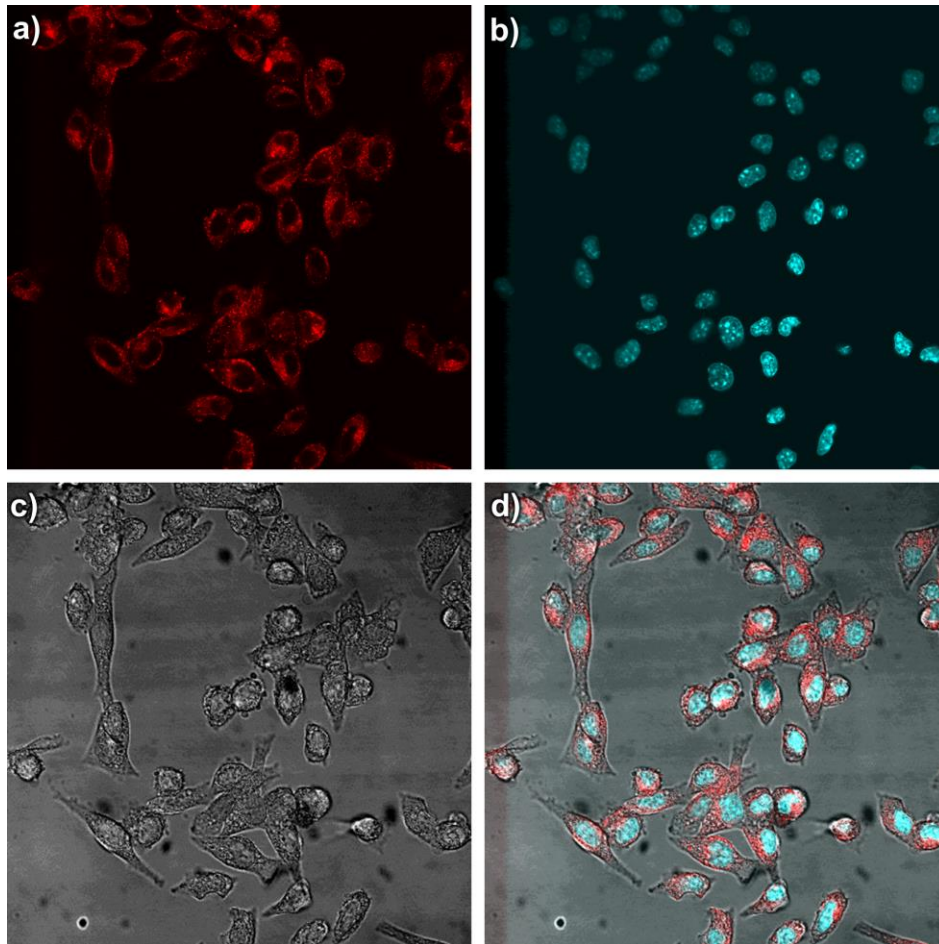


Figure 28. Images en microscopie confocale de cellules B16F10 incubées pendant 24 h en présence des micelles perfluorées chargées en fluorophore. a) DiD (micelles) ; b) Hoechst 33342 (noyaux) ; c) optique ; d) composite.

2. Étude de la cinétique d'internalisation des micelles PFTD-PEG

Nous nous sommes alors intéressés à la cinétique d'internalisation des micelles PFTD-PEG au sein des cellules tumorales B16F10. Le suivi de l'internalisation des micelles perfluorées chargées en DiD a été réalisé par cytométrie en flux. La fluorescence du DiD au sein des cellules a été mesurée à différents temps d'incubation et une courbe de cinétique d'internalisation a ainsi pu être établie (fig. 29). L'intensité de fluorescence du DiD encapsulé dans les micelles perfluorées peut être directement reliée à la proportion de micelles internalisées.

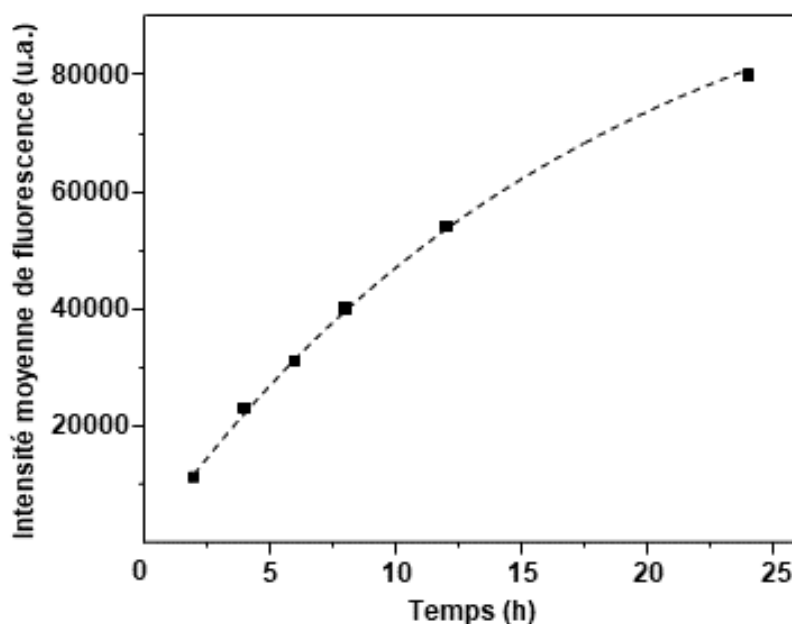


Figure 29. Évolution de l'internalisation cellulaire de micelles PFTD-PEG en fonction du temps (lignée cellulaire B16F10). La courbe en pointillés représente le modèle exponentiel obtenu à l'aide d'OriginPro t.q. $y = a(1 - e^{-kt})$ ($R^2 = 0.9981$). Les données sont représentées en moyenne \pm SEM.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence une internalisation continue des micelles perfluorées sur 24 h. L'apparition d'une légère inflexion de la courbe suggère cependant une stabilisation du taux d'internalisation des micelles perfluorées à 24 h. Une modélisation exponentielle des données obtenues (Eq. 5) a permis l'obtention des paramètres cinétiques tels que le taux d'internalisation des micelles perfluorées au sein des cellules.

$$y = y_{eq}(1 - e^{-kt}) \quad (Eq. 5)$$

Dans ce modèle permettant de décrire la cinétique d'internalisation selon une exponentielle de pseudo premier ordre ($R^2 = 0.9981$), y_{eq} correspond au plateau d'internalisation maximale et k correspond au taux d'internalisation (en min^{-1}) et t est le temps d'incubation des micelles perfluorées en min. Ce type de modèle exponentiel de pseudo premier ordre a déjà été utilisé dans la littérature pour décrire l'internalisation au sein de cellules tumorales de CPP (*Cell Penetrating Peptide*)¹²³, de molécules stéroïdes simples¹²⁴ ou encore de nanoparticules d'or pégyliées¹²⁵ ou quantum dots fonctionnalisés¹²⁶. Le taux d'internalisation des micelles

¹²³ Mäger, I. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, 1798, 338–343

¹²⁴ McManus, J. M. *et al.*, *PLoS One*, **2019**, 14, e0224081

¹²⁵ Penninckx, S. *et al.*, *Nanomedicine (Lond.)*, **2018**, 13, 2917–2937

¹²⁶ Carvalho, I. C. *et al.*, *Nanotheranostics*, **2021**, 5, 213–239

perfluorées au sein des cellules tumorales B16F10 (k) ainsi que le temps nécessaire pour que la moitié des micelles soit internalisée ($t_{1/2}$) ont pu être extrapolés à partir du modèle exponentiel et une valeur de $k = 9,5 \cdot 10^{-4} \pm 7,3 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ (ou $0,057 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$) et $t_{1/2} = 732,0 \text{ min}$ (ou $12,2 \text{ h}$) ont été obtenues. Ces résultats sont à mettre en perspective avec les données de la littérature. Penninckx *et al.* ont décrit la cinétique d'internalisation de nanoparticules d'or pégylées sphériques de 10 nm environ via le suivi par cytométrie en flux de l'évolution de l'intensité du rayon diffusé latéral (SSC pour *Side Scattered Channel*) des cellules. En effet, il a été mis en évidence que l'intensité du signal SSC pouvait être reliée à la quantité de nanoparticules d'or internalisées, la présence de nanoparticules d'or au sein de la cellule complexifiant sa structure et sa granularité et augmentant dès lors le signal SSC¹²⁷. Les auteurs ont mis en évidence un taux d'internalisation de $0,52 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$. Une autre étude de l'internalisation de nanoparticules d'or sphériques n'exploitant aucune modalité de ciblage actif a été publiée en 2011 par Trono *et al.*. Durant cette étude, des nanoparticules de 20 nm de diamètre présentant un revêtement citrate ont été utilisées afin d'évaluer l'impact du temps d'incubation et de la concentration sur l'internalisation des nanoparticules au sein de plusieurs lignées cellulaires du cancer du pancréas. Une accumulation constante des nanoparticules d'or au sein des cellules tumorales sur 48 h sans atteinte de plateau a ainsi pu être démontrée¹²⁸. La quantification de l'internalisation des nanoparticules d'or au sein des cellules tumorales a été réalisée par spectrométrie d'absorption atomique (AAS pour *Atomic Absorption Spectroscopy*), technique courante en chimie analytique pour déterminer la concentration d'éléments métalliques au sein d'un échantillon.

Il est à noter que des exemples de nanoparticules exploitant des méthodes de ciblage actif pour conditionner leur internalisation cellulaire ont aussi été décrits dans la littérature. Par exemple, des nanoparticules possédant à leur surface des ligands folate dont le récepteur est souvent surexprimé à la membrane des cellules tumorales présentent une internalisation rapide^{129,130}. Il a d'ailleurs été démontré que le ciblage actif *via* la conjugaison de folate, par exemple, améliorerait considérablement le taux d'internalisation cellulaire des nanoparticules¹³¹. Ainsi, les micelles perfluorées simplement pégylées présentent logiquement une cinétique

¹²⁷ Wu, Y. *et al.*, *Anal. Chem.*, **2019**, *91*, 14261–14267

¹²⁸ Trono, J. D. *et al.*, *J. Radiat. Res.*, **2011**, *52*, 103–109

¹²⁹ Zhang, B. *et al.*, *Small*, **2009**, *5*, 2716–2721

¹³⁰ Tsolou, A. *et al.*, *Int. J. Nanomedicine*, **2020**, *15*, 4899–4918

¹³¹ Chen, J. *et al.*, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2011**, *37*, 1339–1346

d'internalisation plus lente que des nanoparticules exploitant des mécanismes de ciblage actif des cellules tumorales.

Influence de la taille des particules sur leur internalisation cellulaire

Il convient de rappeler que le taux d'internalisation diffère en fonction du revêtement de la nanoparticule, de sa taille et de sa forme. Ainsi, il a été démontré que la taille nanoparticulaire permettant une internalisation cellulaire optimale était $d_{opt} = 50 \text{ nm}$ ¹³². Gao *et al.* ont déterminé que la cinétique d'internalisation des nanoparticules *via* un mécanisme d'endocytose médié par la fixation de la nanoparticule aux récepteurs surfaciques cellulaires par interaction spécifique ligand-récepteur (sans intervention de la clathrine) était particulièrement déterminée par le « *wrapping time* » ou temps d'enveloppement de la nanoparticule par la membrane plasmique avant son internalisation. Le modèle

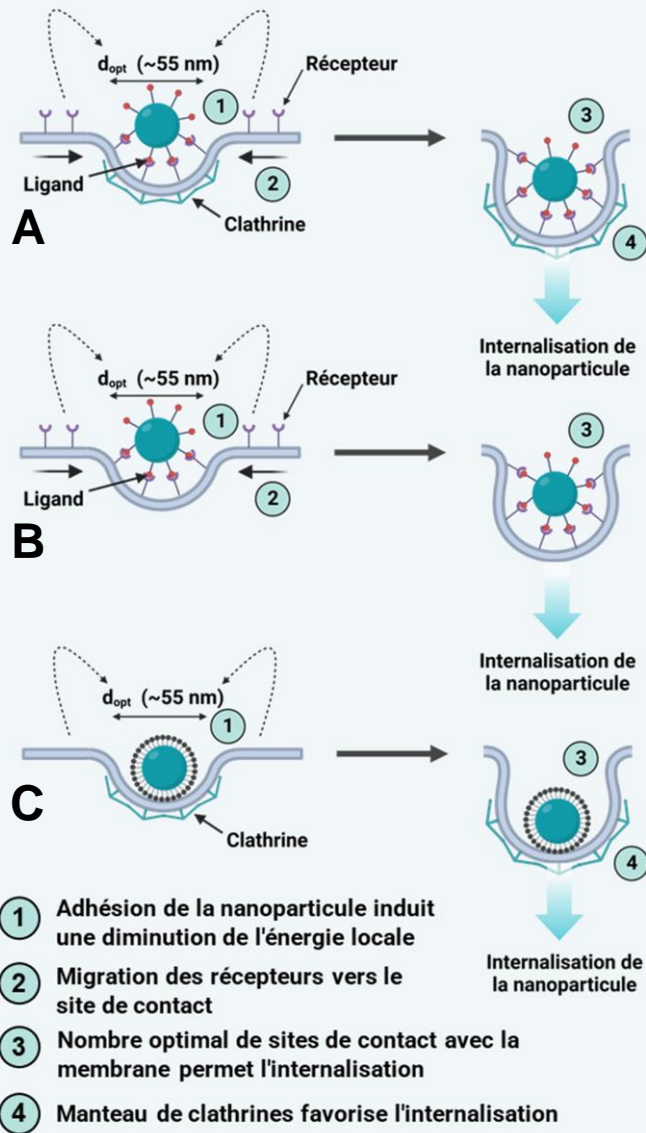


Figure 30. Schématisation de l'enveloppement des nanoparticules par endocytose médiée par la clathrine (A), par endocytose médiée par les récepteurs indépendamment de la clathrine (B) et par simple adsorption de la nanoparticule (ciblage passif) (C)¹³³.

développé peut être transposé au phénomène d'endocytose médiée par la clathrine ainsi qu'à l'internalisation non spécifique de nanoparticules (sans intervention du couple ligand-récepteur). Dans le cas des nanoparticules exploitant le ciblage actif des cellules tumorales, le phénomène d'enveloppement met en jeu la liaison de la particule aux récepteurs,

¹³² Lu, F. *et al.*, *Small*, **2009**, 12, 1408–1413

considérés comme répartis de manière uniforme à la surface de la cellule. La fixation de la nanoparticule à un récepteur induit une diminution de l'énergie libre localement et engendre, dans un second temps, la migration des récepteurs libres dans le voisinage immédiat vers le lieu de prise en charge de la nanoparticule, par simple diffusion *via* la création d'un gradient de densité des récepteurs libres surfaciques. L'aire de contact entre la membrane et la nanoparticule augmente jusqu'à ce que toute la nanoparticule soit enveloppée (fig. 30.A et 30.B). Les phénomènes d'adhérence et d'enveloppement de la nanoparticule dans la zone d'adhésion nécessitent des interactions spécifiques et non spécifiques capables de passer outre les forces résistives et limitantes qui entravent l'internalisation telles que la rigidité membranaire ou la cinétique de diffusion des récepteurs au point d'adhésion particulaire. Le rayon optimal des nanoparticules, permettant le plus faible temps d'enveloppement, est le résultat de la concurrence entre les forces thermodynamiques régissant l'avancement du processus d'enveloppement de la nanoparticule et la cinétique de diffusion des récepteurs membranaires, entre autres. Dans le cas de l'adsorption non spécifique des nanoparticules à la surface membranaire (sans intervention du couple ligand-récepteur), il n'y a pas de phénomène de recrutement des récepteurs au niveau du point d'adhésion. L'internalisation de la nanoparticule dépend uniquement de la diminution d'énergie libre au niveau du point d'adhésion *via* des interactions stabilisantes (interactions électrostatiques, forces de van der Waals, effet hydrophobe, liaisons hydrogènes...) entre la nanoparticule et la membrane. Le phénomène d'enveloppement de la nanoparticule est alors principalement régi par la force d'adhésion du système, la taille de la nanoparticule et la force de flexion nécessaire pour courber la membrane. L'intervention d'un manteau de clathrines peut favoriser ce phénomène d'internalisation (fig. 30C).

La taille des nanoparticules influe grandement sur le temps d'enveloppement. En effet, pour toute nanoparticule capable d'être internalisée par la cellule, il existe un diamètre optimal pour lequel le temps d'enveloppement est minimal. À des tailles inférieures au diamètre optimal ($d_{opt} \sim 50-60$ nm), le processus n'est pas favorisé thermodynamiquement et la cinétique d'internalisation en est très affectée¹³³. L'intervention de manteaux de clathrines ou de cavéoles peuvent favoriser l'enveloppement des petites nanoparticules, sans modifier la tendance générale¹³⁴. Dans le cas d'une absence de ligand à la surface de la nanoparticule l'existence

¹³³ Nel, A. E. *et al.*, *Nat. Mater.*, **2009**, 8, 543–557

¹³⁴ Bao, G. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, 9997–9998

d'un rayon minimum d'environ 5 nm (donc $d < 10$ nm) à partir duquel les nanoparticules ne peuvent plus entrer une par une dans la cellule a été mis en évidence¹³⁵. L'internalisation des petites nanoparticules ($d < 10$ nm) est donc conditionnée par leur accumulation au niveau membranaire, ce qui induit une surface de contact avec la membrane suffisante pour déclencher leur prise en charge par la cellule. Une modélisation physique de ce phénomène d'enveloppement a permis de conclure à une meilleure efficacité d'enveloppement pour les larges sphères colloïdales que pour les plus petites¹³⁶. Ainsi, ce modèle mathématique permet une simulation fidèle des cinétiques d'internalisation cellulaire d'une grande variété de nanoparticules et fournit un rationnel pour l'élaboration future de vecteurs nanométriques afin d'améliorer leurs paramètres d'endocytose.

L'impact de la taille des nanoparticules sur leur cinétique d'internalisation cellulaire a été étudié expérimentalement plus en profondeur. Par exemple, une étude de la cinétique d'internalisation de nanoparticules d'or présentant un revêtement citrate a été réalisée et les auteurs ont conclu à une supériorité d'efficacité d'internalisation des nanoparticules d'or de 50 nm comparativement aux nanoparticules de 14 ou 74 nm. Ils ont ainsi pu mettre en évidence que les nanoparticules d'or sphériques de 50 nm possédaient un temps de demi vie d'internalisation plus court ($t_{1/2} = 1,9$ h) que les nanoparticules de 14 nm ($t_{1/2} = 2,1$ h) et les nanoparticules de 74 nm ($t_{1/2} = 2,24$ h)¹³⁷. Dans une autre étude, Chrithrani *et al.* ont synthétisé des nanoparticules d'or de différentes tailles (14 nm, 50 nm, 20×30 nm, 14×50 nm, 7×42 nm) présentant des motifs transferrine à leur surface afin d'étudier l'impact de la taille et de la forme des nanoparticules sur leur cinétique d'endocytose au sein de deux lignées cellulaires tumorales. Ils ont ainsi pu confirmer la supériorité d'efficacité d'endocytose des nanoparticules de 50 nm comparativement aux autres dimensions testées et ont mis en évidence que les nanoparticules de petite taille (14 nm) étaient nécessairement internalisées en groupe (au minimum 6 nanoparticules/vésicule), limitant ainsi leur cinétique d'internalisation (la fixation de six nanoparticules minimum est nécessaire à leur enveloppement par la membrane plasmique et leur internalisation), tandis que les nanoparticules de 50 nm pouvaient être internalisées une par une, accélérant dès lors le processus¹³⁸. Ceci met en évidence l'influence du nombre de sites de contact entre la surface membranaire et la nanoparticule sur l'énergie nécessaire à l'enveloppement de la nanoparticule. La quantification des nanoparticules d'or internalisées au

¹³⁵ Zhang, S. *et al.*, *ACS Nano*, **2015**, 8, 8655–8671

¹³⁶ Deserno, M. *et al.*, *EPL*, **2003**, 62, 767

¹³⁷ Chrithrani, B. D. *et al.*, *Nano Lett.*, **2006**, 6, 662–668

¹³⁸ Chrithrani, B. D. *et al.*, *Nano Lett.*, **2007**, 7, 1542–1550

sein des cellules tumorales a été conduite par ICP-AES (*Induced Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry*). Il s'agit d'une technique au cours de laquelle un plasma à couplage inductif excite les atomes et ions d'un échantillon. En revenant à leur état fondamental, les électrons des atomes ionisés émettent un photon dont la longueur d'onde est caractéristique pour chaque élément chimique. La lumière émise est alors analysée par des monochromateurs et son intensité est comparée à celle émise par le même élément contenu dans un échantillon étalon.

Ainsi, les micelles perfluorées qui présentent un diamètre moyen de 13 nm sont internalisées lentement, ce qui est cohérent avec ce qui a été décrit dans la littérature. De plus, la présence du PEG à la surface de la micelle peut induire une gêne stérique, limitant l'adhésion des micelles à la surface membranaire, diminuant dès lors le taux d'internalisation des micelles perfluorées¹³⁹.

La couronne protéique peut aussi avoir une influence sur l'internalisation des nanoparticules dans les expériences *in vitro*. En effet, la composition du sérum présent dans le milieu (à hauteur de 10 % en conditions normales de culture cellulaire) conditionne la nature des protéines adsorbées à la surface des nanoparticules et influe grandement sur leur internalisation. Par exemple, il a été prouvé que la composition de la couronne protéique pouvait modifier les mécanismes d'endocytose des nanoparticules de silice de 50 nm¹⁴⁰. Dans le cas de nanoparticules présentant à leur surface des ligands spécifiques de récepteurs membranaires (tels que la transferrine par exemple), l'adsorption de protéines non spécifiques sur les nanoparticules peut altérer leur internalisation cellulaire en créant un bouclier stérique limitant l'interaction spécifique du ligand surfacique nanoparticulaire avec son récepteur membranaire¹⁴¹. Dans le cas de nanoparticules n'exploitant pas le ciblage actif des cellules, la même tendance inhibitrice de la couronne protéique a été mise en évidence sur l'internalisation de nanoparticules de silice de 50 nm¹⁴².

De plus, il convient de souligner que le processus d'endocytose est compétitif du phénomène d'exocytose concomitant. Le processus d'exocytose a été décrit comme plus rapide dans le cas des petites nanoparticules ($d = 14$ nm), en comparaison avec des nanoparticules de 50 et 74 nm,

¹³⁹ Li, Y. *et al.*, *Biomaterials*, **2014**, *35*, 8467–8478

¹⁴⁰ Francia, V. *et al.*, *ACS Nano*, **2019**, *13*, 11107–11121

¹⁴¹ De Almeida, M. S. *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, *50*, 5397

¹⁴² Lesniak, A. *et al.*, *ACS Nano*, **2012**, *6*, 5845–5857

avec une fraction plus importante de nanoparticules évacuées par exocytose pour des diamètres nanoparticulaires faibles¹³⁸.

Pour conclure, avec un taux d'internalisation de $0,057 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$, les micelles perfluorées sont internalisées plus lentement que la plupart des nanoparticules décrites dans la littérature. Il apparaît important, cependant, de rappeler que ce profil de cinétique d'internalisation de nanoparticules a déjà été observé¹²⁸. De plus, il semble pertinent de souligner le faible nombre de publications sur l'étude cinétique de l'internalisation de nanoparticules. Par ailleurs, les techniques d'analyse de la quantité de nanoparticules internalisées diffèrent selon les publications (AAS, ICP-AES, cytométrie en flux...) ce qui peut limiter la comparabilité des résultats obtenus.

Les micelles perfluorées montrent une accumulation constante au sein des cellules B16F10 sur une durée de 24 h. Ce phénomène cumulatif d'internalisation pourrait permettre une perfusion en dioxygène progressive des cellules tumorales.

3. Étude de l'influence de la concentration en micelles perfluorées sur l'internalisation cellulaire

Pour poursuivre l'étude, nous avons étudié l'impact de la concentration en micelles perfluorées dans le milieu sur leur internalisation cellulaire. Pour ce faire, les cellules tumorales B16F10 ont été incubées en présence de concentrations croissantes de micelles perfluorées encapsulant du DiD (1 % massique) pendant 4 h.

La quantification de l'internalisation a été réalisée par cytométrie en flux et les résultats sont reportés sur la figure 31.

Les résultats expérimentaux sont en excellente corrélation avec un modèle de régression linéaire ($R^2 = 0,995$) représenté en pointillés sur le graphe. Cette corrélation démontre que l'internalisation des micelles dans la cellule est directement proportionnelle à leur concentration dans le milieu. Des résultats

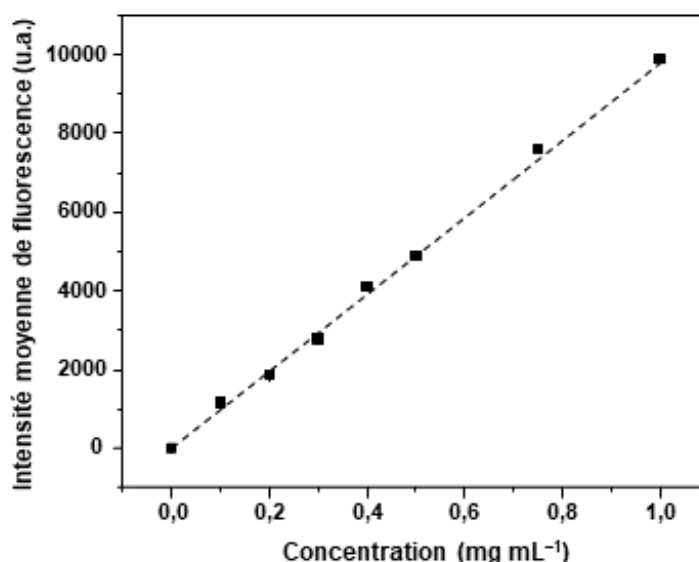


Figure 31. Évolution de l'internalisation cellulaire de micelles perfluorées en fonction de la concentration [PFTD-PEG] (ligneé cellulaire B16F10). La droite en pointillés représente le modèle de régression linéaire obtenu à l'aide d'OriginPro t.q. $y = ax + b$ ($R^2 = 0,995$). Les données sont représentées en moyenne \pm SEM.

similaires ont été mis en avant par Trono *et al.* durant l'étude de l'internalisation cellulaire de nanoparticules d'or de 20 nm de diamètre¹²⁸. Ce phénomène a été largement décrit dans la littérature. Par exemple, Jiang *et al.* ont prouvé l'internalisation concentration-dépendante de quantum dots de 8 nm de diamètre fonctionnalisés par un ligand zwitterionique par microscopie confocale et ont ainsi pu étudier l'impact de la concentration en quantum dots sur la proportion de nanoparticules au niveau membranaire et intracellulaire. Ils ont mis en évidence qu'à plus faible concentration, un nombre plus faible de nanoparticules sont présentes au niveau membranaire. De plus, une différence significative entre la fraction de nanoparticules à la membrane et la fraction de nanoparticules internalisées a pu être observée à de faibles concentrations nanoparticulaires. Au contraire, à des concentrations en quantum dots plus élevées, la fraction de nanoparticules au niveau membranaire est équivalente à la fraction nanoparticulaire internalisée. Plus la concentration en nanoparticules est faible, plus la probabilité d'interaction entre une nanoparticule et la membrane plasmique est faible, ce qui engendre un temps d'enveloppement plus long et donc une diminution de la quantité de nanoparticules internalisées. En effet, l'internalisation cellulaire s'opère seulement quand une densité nanoparticulaire critique est atteinte au niveau membranaire. Ceci explique la différence observée entre la proportion de nanoparticules au niveau membranaire et intracellulaire, le temps d'accumulation membranaire du nombre suffisant de nanoparticules pour déclencher l'internalisation cellulaire étant plus important à de faibles concentrations¹⁴³.

Ces études de l'internalisation des micelles perfluorées au sein des cellules tumorales B16F10 ont donc permis de démontrer une internalisation dépendante du temps d'exposition des cellules tumorales et de la concentration en micelles perfluorées dans le milieu.

4. Étude du mécanisme d'endocytose des micelles PFTD-PEG

Pour compléter ce volet de l'évaluation des objets, nous nous sommes attelés à l'élucidation du mécanisme d'internalisation des micelles perfluorées au sein des cellules tumorales B16F10. Il est admis que la plupart des nanoparticules organiques et inorganiques entrent dans la cellule par endocytose. L'endocytose des nanoparticules peut être médiée par différents mécanismes et l'identification de ces mécanismes permet une meilleure compréhension du comportement de la nanoparticule *in vitro* et *in vivo*. Parmi les mécanismes connus d'endocytose, on recense, entre autres, la voie des clathrines, la voie des cavéoles et la macropinocytose. Tandis que les voies des clathrines et des cavéoles présentent des vésicules de faible diamètre (< 100 nm), la

¹⁴³ Jiang, X. *et al.*, *ACS Nano*, **2010**, *4*, 6787–6797

macropinocytose met en jeu la formation de vésicules hétérogènes de grande taille (> 200 nm). Enfin, d'autres voies d'internalisation indépendantes des clathrines et des cavéoles ont été caractérisées ces dernières années. Ces-dernières peuvent être dépendantes ou non de la dynamine et peuvent prendre en charge des particules d'une centaine de nanomètres¹⁴⁴.

Différentes voies d'internalisation

① La macropinocytose représente la voie d'internalisation de choix pour les particules présentant des diamètres importants (>200 nm). L'internalisation des particules est médiée par la formation de macropinosomes, évaginations de la membrane plasmique de taille irrégulière générées par la mobilisation des filaments d'actine.

② Les voies d'endocytose indépendantes des clathrines et des cavéoles telles que la CLIC/GEEC (*Clathrin Independent Carrier/GPI-AP Enriched Early Endosomal Compartment*) ou l'endocytose médiée par RhoA (GTPase) ont été récemment identifiées et constituent une voie d'internalisation alternative pour plusieurs particules, protéines et toxines. Tandis que certaines présentent une activité dynamine-dépendante (l'endocytose médiée par RhoA par exemple), d'autres font intervenir d'autres protéines GTPases¹⁴⁵. Dans un souci de simplicité de schéma, seule la voie d'endocytose médiée par RhoA a été représentée.

③ La voie des clathrines constitue la voie majoritaire d'internalisation cellulaire et implique une machinerie protéique importante. Elle met en jeu la clathrine, protéine cytosolique en triskèle qui s'agence à la surface de la vésicule sous forme d'octogone et interagit avec la vésicule *via* la protéine adaptatrice AP2. La polymérisation de la clathrine induit une déformation de la membrane plasmique et crée un puits recouvert de clathrine. Finalement, la mécano-enzyme dynamine se polymérise autour du cou de l'invagination et induit la scission de la vésicule (~ 100 nm de diamètre en moyenne) par hydrolyse du GTP puis on a une dépolymérisation du manteau de clathrine et une fusion de la vésicule avec l'endosome précoce.

④ La voie des cavéoles, quant à elle, implique la formation de vésicules d'environ 60 nm de diamètre à la surface de la membrane plasmique. Ces invaginations de la membrane plasmique d'environ 50–80 nm de diamètre sont recouvertes d'un manteau protéique composé majoritairement de cavéolines, essentielles à la stabilité et à la formation des cavéoles. Les cavéoles se forment au niveau de zones riches en glycosphingolipides et cholestérol (radeaux

¹⁴⁴ Rennick, J. J. *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, **2021**, *16*, 266–276

¹⁴⁵ Mayor, S. *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2007**, *8*, 603–612

lipidiques) et l'activation de la GTPase dynamine permet la scission des vésicules de la membrane plasmique et une internalisation des nanoparticules prises en charge¹⁴⁶. Une partie des cavéoles fusionnent avec l'endosome précoce tandis que la fusion d'une autre partie des cavéoles en cavéosome semblerait médier le transport de certaines particules internalisées vers le réticulum endoplasmique^{147,148}.

Les vésicules de ces différentes voies d'internalisation possèdent le même devenir intracellulaire. Toutes fusionnent avec l'endosome précoce qui, après maturation (vésiculation et acidification), devient l'endosome tardif. La fusion de l'endosome tardif avec le lysosome forme l'endolysosome et induit la dégradation des nanoparticules en environnement acide.

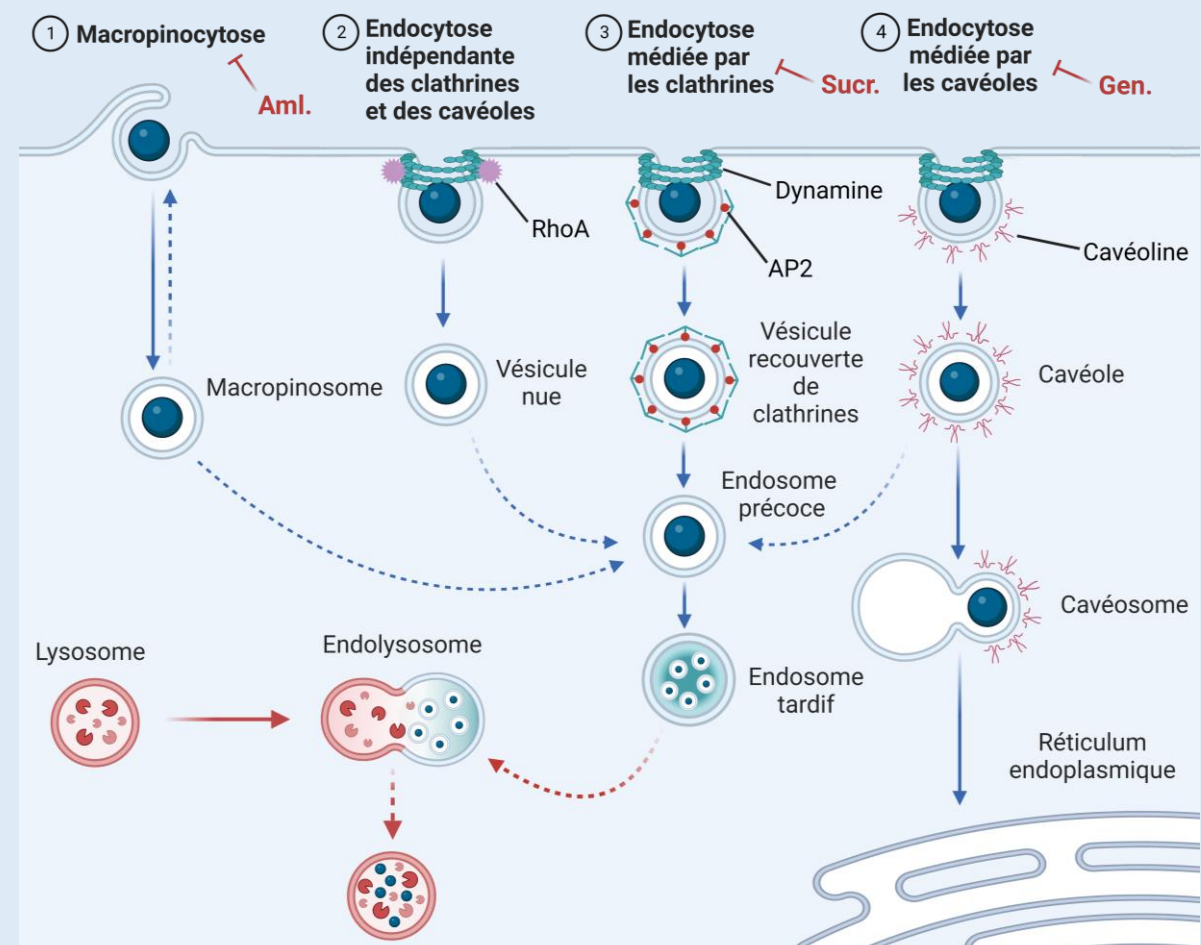


Figure 32. Principales voies d'endocytose des nanoparticules. Aml : Amiloride ; Gen. : Genistéine ; Sucr. : Sucrose.

Afin d'étudier les mécanismes d'internalisation des nanoparticules, plusieurs techniques ont vu le jour. Parmi elles, la plus courante est l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs d'une voie

¹⁴⁶ Deirdre, P. O. *et al.*, *J. Cell Biol.*, **1998**, *141*, 101–114

¹⁴⁷ Le, P. U. *et al.*, *J. Cell Sci.*, **2003**, *116*, 1059–1071

¹⁴⁸ Parton, R. G. *et al.*, *Dev. Cell.*, **2004**, *7*, 458–460

d'internalisation. Si l'endocytose de la nanoparticule est médiée majoritairement par une voie précise, après incubation avec un inhibiteur sélectif de cette voie, l'internalisation sera diminuée.

Ainsi, plusieurs inhibiteurs ont été utilisés dans la littérature pour inhiber les trois voies d'endocytose principales (voie des clathrines, voie des cavéoles et macropinocytose). Pour inhiber la voie des clathrines, par exemple, le recours à des solutions de sucrose hypertoniques (0,4–0,5 M) permettant un piégeage des triskèles de clathrine sous forme de microcages dépourvus de membrane¹⁴⁹, constitue un mode d'inhibition couramment utilisé. D'autres méthodes d'inhibition de la voie des clathrines ont été mises en évidence, telles que l'utilisation de chlorpromazine, inhibant AP2¹⁵⁰ ou la déplétion en potassium des cellules, provoquant les mêmes effets qu'un traitement hypertonique (sucrose 0,4–0,5 M)¹⁴⁹.

En ce qui concerne la macropinocytose, la cytochalasine D a été identifiée comme capable de l'inhiber de manière efficace en bloquant la polymérisation des filaments d'actine ou en les dépolymérisant¹⁵¹. L'amiloride a aussi été rapidement utilisé en tant qu'agent inhibiteur de la macropinocytose. Initialement utilisé en tant que diurétique *via* le blocage de la réabsorption de sodium au niveau du tubule distal rénal, sa capacité à inhiber le fonctionnement de transporteurs échangeurs d'ions Na^+/H^+ a démocratisé son utilisation en tant qu'inhibiteur de la macropinocytose. En effet, il a été prouvé que la macropinocytose mettait en jeu les antiports Na^+/H^+ afin de contrôler le pH sub-membranaire, crucial pour la formation du macropinosome¹⁵².

Enfin, l'internalisation par la voie des cavéoles met en jeu la dépolymérisation du cytosquelette d'actine cortical *via* la phosphorylation de résidus tyrosine et la migration des monomères d'actine autour de la cavéole¹⁵³. Cette étape peut être inhibée par certains inhibiteurs de tyrosine kinase tels que la genistéine¹⁵⁴. D'autres inhibiteurs de la voie des cavéoles ont été développés tels que la méthyl- β -cyclodextrine qui provoque une déplétion membranaire en cholestérol, composant essentiel des cavéoles¹⁵⁵. Afin de confirmer ou infirmer l'internalisation des nanoparticules *via* un mécanisme actif, plusieurs conditions ont été mises en évidence. Par exemple, il est connu que le maintien d'une température basse (4 °C) induit une inhibition de

¹⁴⁹ Heuser, J. E. *et al.*, *J. Cell Biol.*, **1989**, *108*, 389–400

¹⁵⁰ Wang, L. H. *et al.*, *J. Cell Biol.*, **1993**, *123*, 1107–1117

¹⁵¹ Casella, J. *et al.*, *Nature*, **1981**, *293*, 302–305

¹⁵² Koivisalo, M. *et al.*, *J. Cell Biol.*, **2010**, *188*, 547–563

¹⁵³ Pelkmans, L. *et al.*, *Traffic*, **2002**, *3*, 311–320

¹⁵⁴ Nabi, I. R. *et al.*, *J. Cell Biol.*, **2003**, *161*, 673–677

¹⁵⁵ Kozera, L. *et al.*, *PLOS One*, **2009**, *4*, e8312

la plupart des mécanismes de transport actif, ceci ayant déjà été décrit dans la littérature sur la lignée cellulaire B16F10^{156,157}. Ainsi, le recours à ces différents inhibiteurs a permis l'élucidation des mécanismes d'endocytose d'une grande quantité de composés et nanoparticules ces dernières années¹⁵⁸.

Dans un premier temps, l'absence de cytotoxicité des inhibiteurs utilisés a été prouvée *in vitro* via la réalisation d'un test MTS (fig. 33). On ne note aucune cytotoxicité significative en présence des différents inhibiteurs aux concentrations testées, après un temps d'exposition de 2 h30. La toxicité des inhibiteurs d'endocytose a été évaluée à des concentrations décrites dans la littérature comme induisant une inhibition efficace des mécanismes d'endocytose¹⁵⁹.

Dans un second temps, les cellules B16F10 ont été incubées en présence ou non d'inhibiteurs et de micelles perfluorées à une concentration de 0,25 mg mL⁻¹. Pour ces expériences, comme pour les précédentes, le DiD a été encapsulé à hauteur de 1 % massique au cœur des micelles perfluorées, permettant la quantification de l'internalisation cellulaire par cytométrie en flux. Ainsi, les cellules ont été pré-incubées avec différents inhibiteurs (amiloride 0,8 mM, sucrose 0,45 M, genistéine 0,4 mM) ou maintenues à 4 °C ou 37 °C pendant 30 min avant l'ajout des micelles perfluorées au milieu de culture ($c = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$). Après une incubation de 2 h, les cellules ont été passées au cytomètre en

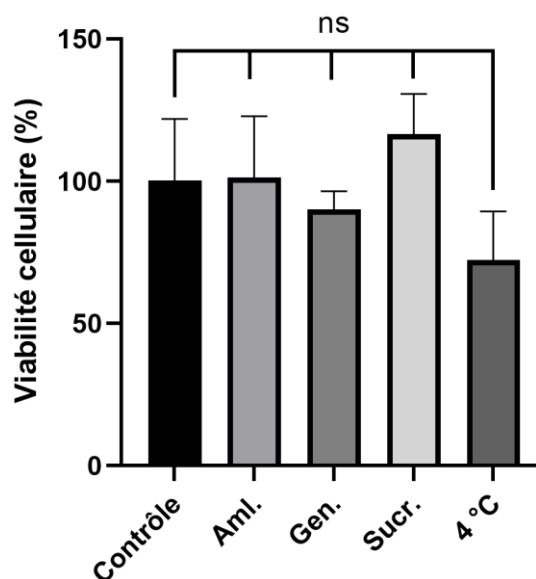


Figure 33. Etude de la cytotoxicité des différents inhibiteurs d'endocytose par test MTS sur cellules B16F10. ns: non significatif ($p > 0,05$) (test ANOVA). Les données sont représentées en moyenne \pm écart type.

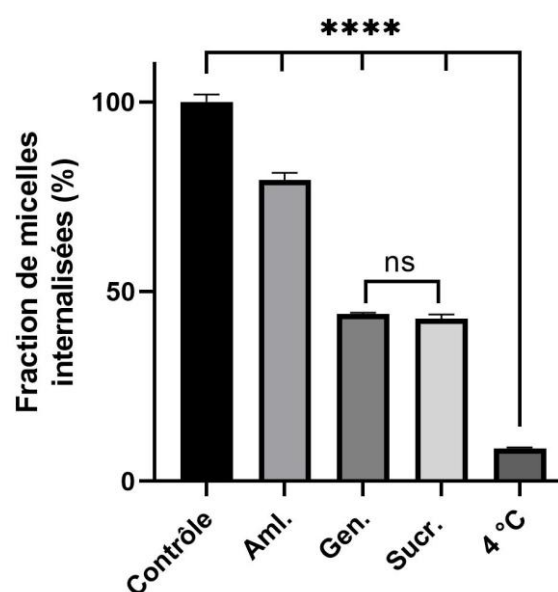


Figure 34. Évaluation du mécanisme d'endocytose des micelles perfluorées sur cellules tumorales B16F10. ns : non significatif, **** $p < 0,0001$ (test ANOVA). Les données sont représentées en moyenne \pm écart-type.

¹⁵⁶ Pautu, V. *et al.*, *Cancers*, **2021**, *13*, 2028

¹⁵⁷ Du, R. *et al.*, *Int. J. Nanomedicine*, **2014**, *9*, 3091–3105

¹⁵⁸ Dutta, D. *et al.*, *Cell Logist.*, **2012**, *2*, 203–208

¹⁵⁹ Gravel, E. *et al.*, *Nanoscale*, **2013**, *5*, 1955

flux. Le cytomètre en flux détecte la fluorescence émise par le DiD encapsulé à l'intérieur des micelles perfluorées et permet une quantification fiable de l'internalisation cellulaire des micelles perfluorées. Les résultats sont regroupés dans la figure 34 et ont été exprimés en pourcentage de micelles internalisées comparativement à la condition contrôle (37 °C, sans inhibiteur) et corrigés par l'autofluorescence des cellules.

Ainsi, une chute drastique de la quantité de micelles perfluorées internalisées est constatée lorsque les cellules sont maintenues à 4 °C, mettant en évidence la nécessité d'un transport actif pour l'internalisation des micelles perfluorées. De plus, on observe une diminution significative de l'internalisation des micelles perfluorées en présence de sucrose ($c = 0,45 \text{ M}$) (~ 43 % des micelles internalisées) ou de genistéine ($c = 0,4 \text{ mM}$) (~ 44 % des micelles internalisées), inhibiteurs de la voie des clathrines et de la voie des cavéoles, respectivement. Enfin, une légère contribution de la macropinocytose dans le processus d'endocytose des micelles perfluorées est mise en évidence par la diminution statistiquement significative ($p\text{-value} < 0,0001$) de l'internalisation des micelles perfluorées en présence d'amiloride ($c = 0,8 \text{ mM}$) (~ 80 % de micelles internalisées). Les petites nanoparticules ($d < 100 \text{ nm}$) peuvent être internalisées par plusieurs voies différentes, leur taille ne constituant pas une limitation pour la formation de la vésicule d'endocytose (cavéole, vésicule recouverte de clathrine, macropinosome)¹⁶⁰. Le faible diamètre des micelles perfluorées est cohérent avec les résultats observés expérimentalement.

Ces résultats semblent en cohérence avec la littérature, le recours à plusieurs voies d'endocytose pour l'internalisation d'une même nanoparticule ayant déjà été décrit. En effet, Wu *et al.* ont comparé l'internalisation cellulaire de nanoparticules d'argent de différentes tailles (5 nm, 20 nm, 50 nm et 100 nm) et ont étudié leur mécanisme d'endocytose sur cellules de mélanome murin. Ils ont mis en évidence que tandis que les nanoparticules de petite taille (5 et 20 nm) étaient majoritairement internalisées par la voie des clathrines et des cavéoles, l'internalisation des nanoparticules de 50 nm et 100 nm impliquait de manière non négligeable la voie de la macropinocytose, en plus des autres voies citées. Ainsi, ils ont pu conclure qu'à des diamètres inférieurs à 50 nm, les nanoparticules d'argent étaient principalement internalisées par les voies des clathrines et des cavéoles¹⁶¹. En ce qui concerne les micelles polymériques, des études ont été menées afin d'élucider leur mécanisme d'endocytose sur des cellules tumorales humaines¹⁶². Les auteurs ont étudié le mécanisme d'internalisation de nanoparticules

¹⁶⁰ Akinc, A. *et al.*, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2013**, a016980

¹⁶¹ Wu, M. *et al.*, *Int. J. Nanomedicine*, **2019**, *14*, 4247–4259

¹⁶² Sulheim, E. *et al.*, *J. Nanobiotechnol.*, **2016**, *14*, 1

polymériques de poly(octyl cyanoacrylate) d'environ 150 nm de diamètre sur des cellules du cancer de la prostate. L'analyse des résultats obtenus a démontré une inhibition significative de l'internalisation cellulaire en présence de genistéine et chlorpromazine, reflet d'une endocytose principalement médiée par la voie des clathrines et des cavéoles. D'autres exemples de nanoparticules empruntant ces deux voies d'internalisation ont été décrits dans la littérature¹⁶³.

Enfin, il convient de noter tout de même que certains des inhibiteurs couramment utilisés dans l'étude des voies d'internalisation cellulaire possèdent une sélectivité relative et peuvent interférer avec d'autres voies d'endocytose¹⁴⁴. De plus, les capacités d'internalisation et les voies principales d'endocytose peuvent différer en fonction de la lignée cellulaire considérée, ceci étant la résultante d'une expression de récepteurs membranaires différente ou d'une absence de certaines protéines impliquées dans la cascade de signalisation suivant l'internalisation cellulaire¹⁶⁴.

Ainsi, le mécanisme d'internalisation des micelles perfluorées a été identifié et les voies des clathrines et des cavéoles semblent majoritairement impliquées. Il est important de noter que l'internalisation des micelles perfluorées par endocytose induit la conservation de l'intégrité micellaire durant l'internalisation, contrairement à certaines nanoparticules dont l'internalisation du chargement est initiée par la fusion de l'enveloppe particulaire avec la membrane plasmique (liposome par exemple)¹⁶⁵. Le transport actif des micelles perfluorées permet donc de protéger le cargo micellaire (ici O₂) et la micelle chargée en dioxygène peut ainsi entrer dans la cellule intacte et la supplémenter efficacement en dioxygène.

À ce stade de l'étude, les micelles ont montré qu'elles réunissaient toutes les caractéristiques nécessaires à leur application en tant qu'agent radiosensibilisant : i) une taille appropriée à l'accumulation passive par effet EPR et permettant une diffusion dans la matrice extracellulaire, ii) une excellente capacité de transport de l'oxygène, iii) une toxicité négligeable en l'absence de rayonnement ionisant, iv) une faculté à entrer dans les cellules cancéreuses par un mécanisme qui a été identifié. L'évaluation des objets a donc été poursuivie en s'intéressant à leur comportement au contact des cellules cancéreuses sous irradiation γ .

¹⁶³ Manzanares, D. *et al.*, *Pharmaceutics*, **2020**, *12*, 371

¹⁶⁴ Mazumdar, S. *et al.*, *Acta Pharm. Sin. B.*, **2021**, *11*, 903–924

¹⁶⁵ Yang, J. *et al.*, *ACS Cent. Sci.*, **2016**, *2*, 621–630

F. Étude du potentiel radiosensibilisant des micelles perfluorées sur cellules B16F10

Dans le but d'étudier le potentiel radiosensibilisant des micelles perfluorées sur la lignée cellulaire B16F10, il a fallu dans un premier temps confirmer l'absence d'effet des micelles perfluorées sur la capacité de prolifération des cellules tumorales sans irradiation. Cet effet toxique potentiel, différent de celui mesuré par le test MTS, a été étudié en réalisant un test clonogénique, permettant de mesurer la capacité de chaque cellule à établir un nouveau clone de cellules après une exposition à un agent nanoparticulaire. Le test clonogénique a été réalisé après 24 h d'incubation des cellules en présence des micelles perfluorées et les résultats sont représentés dans la figure 35.

Il semblerait que les micelles perfluorées ne provoquent pas de toxicité significative aux concentrations testées et n'influencent donc pas la capacité des cellules tumorales B16F10 à former un clone cellulaire (ou colonie). Dans cette expérience, n'ont été comptabilisés que les clones de cellules (ou colonies) constitués de plus de 64 cellules (correspondant à 8 mitoses). Une toxicité à la concentration maximale de 1 mg mL^{-1} (64 % de fraction survivante) a cependant été observée.

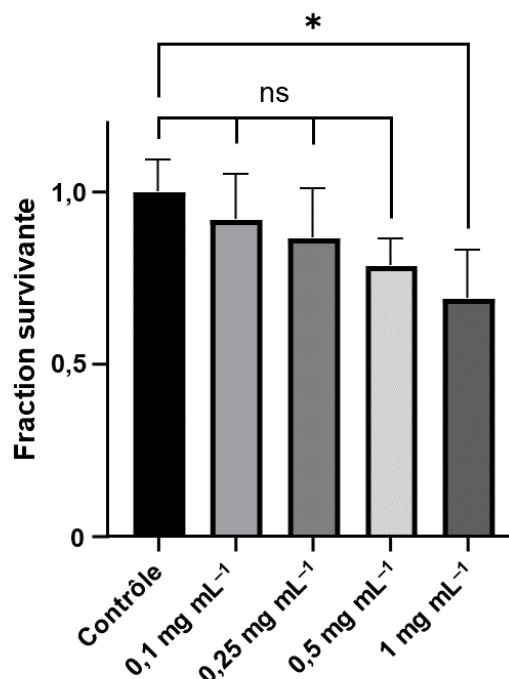


Figure 35. Test de toxicité clonogénique sur cellules B16F10 en présence de concentrations croissantes de micelles PFTD-PEG. * $p < 0,05$ (test ANOVA). Les données sont représentées en moyenne \pm écart-type.

Les résultats du test de toxicité clonogénique nous ont permis de déterminer la concentration de travail pour l'évaluation de l'efficacité de radiosensibilisation des micelles perfluorées. En effet, sans irradiation, les micelles perfluorées ne doivent pas être toxiques pour la cellule. Ainsi, nous avons choisi la concentration de travail $c = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ pour les expériences suivantes, cette concentration ne démontrant aucune cytotoxicité apparente.

Une fois la concentration de travail choisie, nous avons évalué le potentiel radiosensibilisant des micelles perfluorées sur cellules B16F10. Pour ce faire, nous avons irradié les cellules B16F10 à l'aide d'une source scellée de ^{137}Cs . Le rayonnement γ , produit par ce type de source, constitue un rayonnement de référence en préclinique. Il s'agit, en effet, d'un rayonnement

photonique de faible énergie qui apparaît comme un modèle adéquat pour l'évaluation du potentiel radiosensibilisant des micelles perfluorées *in vitro*. Ainsi, les cellules B16F10 ont été préalablement incubées pendant 24 h en présence ou non des micelles perfluorées ($c = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) avant d'être irradiées à des doses croissantes (0 Gy, 1,5 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 4 Gy, 5 Gy, 6 Gy). Par la suite, les cellules ont été incubées à 37 °C dans un environnement humide pendant 7 jours puis colorées afin de révéler les colonies formées. Le comptage de ces colonies a permis l'établissement de la courbe de survie des cellules B16F10 en présence ou non des micelles perfluorées (fig. 36). Comme pour le test précédent, seuls les clones cellulaires de plus de 64 cellules (8 mitoses) ont été comptabilisés. Il est à noter que plus les doses d'irradiation sont importantes, plus la fraction survivante est faible, même dans les conditions contrôle.

L'utilisation d'un modèle polynomial du second ordre pour représenter la tendance issue des données expérimentales a permis l'obtention des courbes de la figure 36. Le modèle polynomial a depuis longtemps été utilisé afin de mettre en évidence une efficacité radiosensibilisante de nanoparticules^{166,167}. On peut ainsi accéder à des paramètres importants tels que le *SER* (*Sensitization Enhancement Ratio*) qui correspond au rapport de l'aire sous la courbe contrôle sur l'aire sous la courbe en présence de micelles. Plusieurs manières de calculer le *SER* ont été décrites dans la littérature mais l'utilisation du rapport des aires sous la courbe constitue la mesure la plus fiable, permettant de prendre en compte l'entièreté de la courbe de survie et donc la totalité de la population cellulaire. La fraction survivante $SF(D)$ est alors considérée comme une variable aléatoire à densité et l'aire sous la courbe est exprimée en *MID* pour *Mean Inactivation Dose* (Eq. 6).

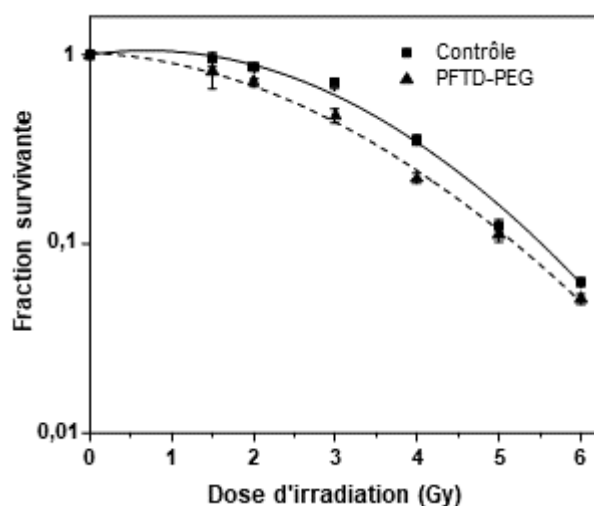


Figure 36. Évolution de la survie des cellules B16F10 en fonction de la dose d'irradiation (Gy) avec ou sans exposition préalable aux micelles perfluorées ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$). Les données sont représentées en moyenne \pm écart-type et ont été modélisées à l'aide d'OriginPro par un modèle polynomial du 2nd ordre tel que $y = \text{Intersection} + ax + bx^2$. L'intersection dans les 2 conditions peut être approximée à 0 ($-9,31 \cdot 10^{-4} \pm 0,0164$ pour la condition contrôle et $0,058 \pm 0,021$ pour la condition PFTD-PEG). La courbe pleine correspond au modèle polynomial de la condition contrôle ($R^2 = 0,996$) et la courbe en pointillés correspond au modèle polynomial de la condition PFTD-PEG $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ($R^2 = 0,997$).

¹⁶⁶ Minafra, L. *et al.*, *Sci. Rep.*, **2019**, 9, 1134

¹⁶⁷ Swanner, J. *et al.*, *Int. J. Nanomedicine*, **2015**, 10, 3937–3953

$$MID = \int_0^{\infty} SF(D)dD \quad (Eq. 6)$$

D'autres paramètres pour décrire l'efficacité d'un traitement radiosensibilisant ont été utilisés dans la littérature tels que la fraction survivante (SF) à une dose précise (2 Gy le plus souvent). Il est important de notifier que la dose de 2 Gy (par séance d'irradiation) constitue la dose de traitement la plus couramment utilisée en radiothérapie clinique fractionnée¹⁶⁸. Si la fraction survivante SF_{2Gy} des cellules exposées aux nanoparticules est plus faible que la fraction survivante dans les conditions contrôle à la même dose, ceci permet de rendre compte d'un effet radiosensibilisant de la nanoparticule. Toujours pour décrire l'influence d'un traitement nanoparticulaire sur l'évolution de la radiosensibilité cellulaire, le $DMR_x\%$ (*Dose Modifying Ratio*) a été démocratisé. Le $DMR_x\%$ correspond au rapport de la dose dans la condition contrôle permettant d'obtenir x % de survie cellulaire sur la dose dans la condition test (avec nanoparticule) conduisant à la même valeur de SF . Il est souvent calculé pour des valeurs de survie entre 10 % et 90 %. Un paramètre dérivant du $DMR_x\%$, le DEF_{xGy} (*Dose Enhancement Factor*) a, quant à lui, été employé pour étudier l'efficacité radiosensibilisante des nanoparticules métalliques. Le DEF_{xGy} correspond au rapport de la dose à x Gy dans la condition contrôle sur la dose dans la condition test (nanoparticule métallique) nécessaire pour obtenir la même fraction survivante que dans la condition contrôle à x Gy. Afin de visualiser rapidement l'efficacité de radiosensibilisation de nanoparticules, le RER_{xGy} (*Radiation Enhancement Ratio*) a été aussi exploité. Le RER_{xGy} correspond au rapport de la fraction survivante dans la condition contrôle à une dose x Gy sur la fraction survivante dans la condition test (nanoparticules) à la même dose x Gy¹⁶⁹. Ainsi, tous ces différents paramètres permettent de mettre en évidence l'impact d'une exposition à un agent nanoparticulaire sur la sensibilité des cellules tumorales aux rayonnements ionisants. Cependant, le SER constitue, tout de même, le paramètre de référence afin d'évaluer le potentiel radiosensibilisant d'agents nanoparticulaires ou moléculaires.

À l'aide de la modélisation polynomiale, la plupart de ces paramètres ont pu être obtenus pour les micelles perfluorées et sont reportés dans le tableau 1.

¹⁶⁸ Roach, M. C. et al., *J. Thorac. Dis.*, **2018**, 10, S2465–S2473

¹⁶⁹ Subiel, A. et al., *Theranostics*, **2016**, 6, 1651–1671

Tableau 1. Paramètres de radiosensibilisation dérivés du modèle polynomial d'ordre 2 obtenu à l'aide d'OriginPro.

Paramètre	SER	$SF_{2 Gy}$	$DMR_{20\%}$	$DMR_{50\%}$	$RER_{2 Gy}$	$RER_{4 Gy}$
Formule de calcul	$MID_{contrôle}$	SF à 2 Gy	$D_{contrôle 20\%}$	$D_{contrôle 50\%}$	$SF_{2 Gy contrôle}$	$SF_{4 Gy contrôle}$
	$MID_{PFTD-PEG}$		$D_{PFTD-PEG 20\%}$	$D_{PFTD-PEG 50\%}$	$SF_{2 Gy PFTD-PEG}$	$SF_{4 Gy PFTD-PEG}$
PFTD-PEG	1,23	0,6774	1,1	1,24	1,3	1,4
Contrôle		0,8813				

Il est intéressant de comparer les valeurs obtenues pour nos micelles perfluorées avec les données décrites pour d'autres systèmes dans la littérature. Par exemple, le potentiel radiosensibilisant des nanoparticules AGuIX, nanoparticules théranostiques de gadolinium désormais en étude clinique de phase II pour l'amélioration de l'efficacité de la radiothérapie sur les métastases cérébrales (NCT03818386), a été testé sur plusieurs lignées cellulaires tumorales. Ces nanoparticules métalliques permettent une augmentation de l'efficacité de la radiothérapie sur les cellules tumorales *via* un phénomène de radioamplification résultant de l'interaction du métal et du rayonnement ionisant et à l'origine d'une libération importante d'électrons secondaires capables de générer des espèces réactives de l'oxygène dans le milieu intracellulaire. L'étude de l'efficacité des nanoparticules AGuIX sur des cellules humaines du cancer du pancréas en complément d'une irradiation par rayons X à 6 MV a mis en évidence un $RER_{4 Gy} = 1,12$ ainsi qu'un $DMR_{20\%} = 1,23$ ¹⁷⁰. Toujours à la même énergie d'irradiation de 6 MV, les nanoparticules AGuIX ont aussi été testées sur une lignée cellulaire humaine de gliome avec un $RER_{2 Gy}$ de 1,1–1,5¹⁷¹. L'efficacité des nanoparticules AGuIX a, de plus, été évaluée sur la lignée cellulaire B16F10 en complément d'une irradiation par rayons X (220 kV) et des paramètres de radiosensibilisation ont pu être calculés. Ainsi, un $RER_{2 Gy}$ de 2,08 ainsi qu'une $SF_{2 Gy}$ de 0,46 pour la condition test (AGuIX) contre une $SF_{2 Gy}$ de 0,96 pour la condition contrôle ont pu être estimés¹⁷². Enfin, l'efficacité radioamplificatrice de ces mêmes nanoparticules a été évaluée sur cellules humaines de glioblastome en combinaison avec une irradiation à l'aide d'une source γ (⁶⁰Co, $E\gamma = 1,25$ MeV) et un facteur d'amélioration de l'efficacité de la radiothérapie en présence des nanoparticules AGuIX correspondant à

¹⁷⁰ Detappe, A. *et al.*, *Cancer Nanotechnol.*, **2015**, 6, 1–9

¹⁷¹ Lux F, *et al.*, *J. Soc. Fr. Radiother. Oncol.*, **2015**, 19, 508–514

¹⁷² Kotb, S. *et al.*, *Theranostics*, **2016**, 6, 418–427

$[(SF_{2 Gy \text{ contrôle}} - SF_{2 Gy NP})/SF_{2 Gy NP}]$ de 22,6 % a pu être mis en avant¹⁷³. De la même manière, un facteur d'amélioration de l'efficacité de la radiothérapie sur cellules B16F10 en présence des micelles perfluorées a pu être calculé à partir des fractions survivantes à 2 Gy observées et une valeur de 30 % a été obtenue.

Il est à noter la disparité des résultats obtenus avec un même système nanoparticulaire, les sources d'irradiation et les énergies d'irradiation utilisées étant très variables. De plus, un parallèle entre ces différents résultats et ceux obtenus avec les micelles perfluorées s'avère compliqué pour les mêmes raisons. En effet, l'étude de l'efficacité des nanoparticules AGuIX a été réalisée en irradiant à l'aide de rayons X de faible (220 kV) et forte (6 MV) énergie ou avec des rayonnements γ ($E_\gamma = 1,25$ MeV) tandis que des rayonnements γ de ^{137}Cs ($E_\gamma = 0,661$ MeV) ont été utilisés pour les micelles perfluorées. Comme avancé précédemment, cette différence de source et d'énergie d'irradiation peut complexifier la comparaison des résultats. En effet, l'efficacité biologique de la radiothérapie en présence de nanoparticules radiosensibilisantes/radioamplificatrices peut être différente en fonction de la nature de la source d'irradiation et de l'énergie du faisceau incident. Par exemple, dans le cas des rayons X, il a été mis en évidence que l'efficacité radioamplificatrice des nanoparticules à haut numéro atomique pouvait être grandement impactée par l'énergie du faisceau incident. Ce phénomène rend difficile la comparaison des résultats d'études *in vitro* employant différentes énergies d'irradiation. D'autres paramètres tels que la position des cellules par rapport au faisceau incident durant l'irradiation ou le volume de milieu de culture au contact des cellules influent aussi sur l'efficacité de radiosensibilisation *in vitro*. Ainsi, une standardisation des protocoles d'irradiation (sources d'irradiation, énergies d'irradiation, montage et méthodologie d'expérience) est nécessaire afin de permettre une véritable comparaison des études de la radiosensibilisation médiée par les nanoparticules *in vitro*¹⁷⁴. Enfin, l'efficacité de radiosensibilisation des nanoparticules est dépendante du type cellulaire considéré¹⁷⁵.

Toute comparaison mise à part, les paramètres de radiosensibilisation calculés pour les micelles perfluorées sont cohérents avec la plupart des nanoparticules à visée radiosensibilisante développées dans la littérature (dont les AGuIX).

La plupart des études de nanoparticules perfluorées utilisées à des fins radiosensibilisantes qui sont reportées dans la littérature ne présentent pas de données sur leur efficacité *in vitro*. En

¹⁷³ Štefančíková, L. *et al.*, *Cancer Nanotechnol.*, **2014**, 5, 6

¹⁷⁴ Retif, P. *et al.*, *Theranostics*, **2015**, 5, 1030–1044

¹⁷⁵ Jain, S. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **2011**, 79, 531–539

effet, dans ces études, l'amélioration de la sensibilité tumorale aux rayonnements ionisants est le plus souvent mise en évidence *in vivo* sur modèle rongeur. Dès lors, une comparaison directe entre l'efficacité de nos micelles perfluorées et les systèmes perfluorés déjà décrits ne peut pas être établie. Cependant, certaines différences peuvent, tout de même, être mises en évidence. A *contrario* de certains systèmes^{103,104}, la saturation en dioxygène de la suspension micellaire n'est pas requise pour observer un effet radiosensibilisant. Cette caractéristique des micelles perfluorées représente un réel avantage d'un point de vue logistique (transport, stockage, accès à une chambre hyperbare). De plus, la synthèse et formulation de certains systèmes perfluorés décrits dans la littérature peuvent s'avérer fastidieuses^{103,108}, ce qui peut constituer une limitation à leur utilisation. Par rapport à ces systèmes perfluorés complexes, la simplicité de synthèse et formulation de nos micelles perfluorées peut être ainsi considérée comme un atout certain.

Enfin, l'efficacité radiosensibilisante significative des micelles perfluorées sans pré-saturation en dioxygène à faible dose (~ 40 % de cellules tumorales mortes à 2 Gy) représente un bénéfice considérable. La radiosensibilisation observée ici est due à l'augmentation de la perfusion en dioxygène des cellules tumorales. Ce transport de dioxygène médié par les micelles perfluorées, depuis le milieu vers l'espace intracellulaire, facilite la production de ROS et potentialise l'effet du rayonnement. Outre la production de ROS accrue, la présence de dioxygène moléculaire permet la fixation des dommages à l'ADN via la formation de lésions peroxydes stables au niveau des brins d'ADN, plus difficilement réparables par la cellule. L'accumulation de ces lésions conduit à une mort cellulaire plus importante en présence de dioxygène²⁶.

D'autres nanoparticules métalliques ont été étudiées afin d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie sur les cellules tumorales, toujours en exploitant le phénomène de radioamplification brièvement décrit précédemment. Ainsi, les nanoparticules d'or ont rapidement été identifiées comme de potentiels adjuvants pour la radiothérapie. Par exemple, Chen *et al.* ont construit une nanoparticule d'or sphérique de 18 nm de diamètre présentant un revêtement composé d'albumine sérique et l'ont testée sur une lignée cellulaire humaine de glioblastome. Ils ont ainsi pu conclure à un effet radioamplificateur des nanoparticules d'or AuNp-BSA avec un $DEF_2 Gy$ de 1,37¹⁷⁶. Des résultats similaires ont été obtenus par Jain *et al.* en étudiant l'impact d'une exposition à des nanoparticules d'or sphériques de 1,9 nm de diamètre sur la radiosensibilité de plusieurs lignées cellulaires tumorales humaines. Sur cellules

¹⁷⁶ Chen, N. *et al.*, *RSC Adv.*, **2015**, 5, 40514

du cancer du sein, une exposition préalable aux nanoparticules d'or a permis une augmentation de l'efficacité de la radiothérapie, et ce, à plusieurs énergies d'irradiation de rayons X (*SER* compris entre 1,16 et 1,41 en fonction des conditions d'irradiation)¹⁷⁵. Ainsi, beaucoup d'exemples d'agents radiamplificateurs mettant en jeu des nanoparticules métalliques ont été décrits dans la littérature¹⁷⁷.

Les résultats obtenus avec les micelles perfluorées sont prometteurs et permettent de conclure à leur efficacité radiosensibilisante sur la lignée cellulaire B16F10 (valeurs de ratio *SER* supérieures à 1).

Il convient de remarquer que, malgré sa structure organique et l'absence d'élément à haut numéro atomique, le système micellaire perfluoré développé permet une radiosensibilisation significative des cellules tumorales exposées (*SER* = 1,23) équivalente, voire supérieure, à celle générée par des nanoparticules métalliques.

V. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre nous avons décrit le développement d'un outil micellaire perfluoré afin d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie sur les cellules tumorales. Dans un premier temps, l'amphiphile perfluoré a été obtenu en deux étapes de synthèse avec un rendement satisfaisant. La formulation sous forme de micelle stable présentant une couche biocompatible externe a ensuite été réalisée et des nano-vecteurs d'une dizaine de nanomètres ont été obtenus. La faible taille des micelles perfluorées est compatible avec une extravasation au niveau tumoral ainsi qu'une pénétration de la matrice extra-cellulaire de la tumeur¹⁷⁸. L'intérêt principal des micelles perfluorées est leur aptitude à solubiliser le dioxygène afin d'améliorer l'oxygénation des cellules tumorales et donc d'augmenter leur radiosensibilité. Le transport du dioxygène par les micelles perfluorées a donc ensuite été évalué. Nous avons montré que les micelles perfluorées possèdent une capacité de prise en charge du dioxygène plus importante que l'eau ou certaines suspensions micellaires de surfactants hydrocarbonés courants (Triton X 100, SDS). De plus, les micelles perfluorées ont montré un temps de séquestration du dioxygène plus important que des micelles composées de surfactants hydrocarbonés usuels (Triton X 100, SDS). Ce phénomène de rétention du dioxygène peut s'avérer d'un grand intérêt dans le cas d'une utilisation *in vivo* où la diffusion du dioxygène en dehors de la micelle devrait être observée

¹⁷⁷ Wang, C. *et al.*, *J. Nanopart. Res.*, **2013**, *15*, 1642

¹⁷⁸ Tchoryk, A. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **2019**, *30*, 1371–1384

dans les fluides biologiques (sang). De plus, une libération progressive du dioxygène au niveau tumoral pourrait induire une réoxygénation efficace dans le temps.

Par la suite, les études *in vitro* ont été réalisées sur cellules tumorales B16F10. Tout d'abord, l'absence de cytotoxicité sur les cellules tumorales B16F10 après 24 h d'incubation avec les micelles perfluorées a été confirmée. Par la suite, l'internalisation des micelles perfluorées a été investiguée et une accumulation intracellulaire dépendante du temps et de la concentration a pu être mise en évidence. L'étude du mécanisme d'endocytose des micelles perfluorées dans les cellules B16F10 a été effectuée et a permis de conclure à une internalisation des micelles perfluorées principalement par les voies des clathrines et des cavéoles. Enfin, le potentiel radiosensibilisant des micelles perfluorées a été démontré sur le modèle cellulaire B16F10 avec un *SER* significatif de 1,23.

Nous avons donc réussi à établir une preuve de concept de l'utilisation de micelles perfluorées en tant qu'adjuvant de la radiothérapie *in vitro*. L'évaluation de l'accumulation tumorale *in vivo* ainsi que l'étude de la cinétique de distribution des micelles dans l'organisme restent encore à accomplir afin de confirmer l'intérêt des micelles perfluorées en tant qu'agent de radiosensibilisation permettant l'acheminement de dioxygène vers le tissu cible. Enfin, si le profil de biodistribution des micelles perfluorées le permet, l'évaluation de l'efficacité radiosensibilisante des micelles perfluorées *in vivo* pourra être considérée. Cette ultime étape permettra la validation finale du potentiel radiosensibilisant des micelles perfluorées.

Chapitre 2

Étude de la cinétique de distribution des micelles perfluorées
par imagerie TEP

I. L'imagerie TEP, un outil préclinique précieux

Dans le domaine de l'imagerie moléculaire, la tomographie à émission de positon (TEP) est une technique développée depuis les années 70¹⁷⁹ qui connaît actuellement un essor considérable en oncologie. Le recours à l'imagerie TEP peut avoir lieu à différentes étapes de la prise en charge du patient, précocement au niveau du diagnostic, lors de la mise en place du traitement pour sélectionner en amont le traitement le plus efficace et pendant le traitement du patient pour évaluer la réponse tumorale aux traitements tels que la chimiothérapie, et pour la radiothérapie, particulièrement pour l'aide à la planification. En effet, en radiothérapie, la connaissance précise du volume tumoral à irradier est essentielle pour localiser et moduler la dose en fonction des tissus afin de limiter au maximum les effets néfastes sur les cellules saines environnantes. La technique TEP permet aux cliniciens d'obtenir des informations fonctionnelles qui seront nécessaires à l'établissement d'un diagnostic différentiel précoce afin de déterminer le caractère malin ou bénin d'une tumeur et d'identifier le stade du cancer.

Outre son utilisation pour le diagnostic, la planification et le suivi thérapeutique, l'imagerie TEP est rapidement apparue comme une technique essentielle dans le domaine de la recherche en oncologie. En effet, cette modalité d'imagerie permet l'étude du devenir dans l'organisme des petites molécules jusqu'aux macromolécules telles que les anticorps ou les nanoparticules et permet ainsi d'accéder aux propriétés pharmacocinétiques de ces macromolécules. Des informations quant à leur distribution spatiale et temporelle peuvent aussi être obtenues, permettant d'établir leur profil de biodistribution au cours du temps.

A. Principe physique de l'imagerie TEP

La technique de l'imagerie TEP repose sur l'utilisation de radioisotopes particuliers qui en se désexcitant émettent un positon β^+ (particule chargée positivement). Ce positon éjecté du noyau atomique entre en collision avec un électron β^- , on a alors ce qu'on appelle une réaction d'annihilation avec génération de 2 photons γ colinéaires de 511 keV émis à 180 ° l'un de l'autre. Ces-derniers sont détectés par un détecteur γ (fig. 37) composé de cristaux scintillateurs qui les convertit en une multitude de photons UV et visibles qui sont eux détectés par un photodétecteur. Ces radioisotopes sont produits dans un cyclotron lors du bombardement par un faisceau de protons de haute énergie d'un matériau cible contenant le précurseur.

¹⁷⁹ Ter-Pogossian, M. *et al.*, *Radiology*, **1975**, 114, 89–98

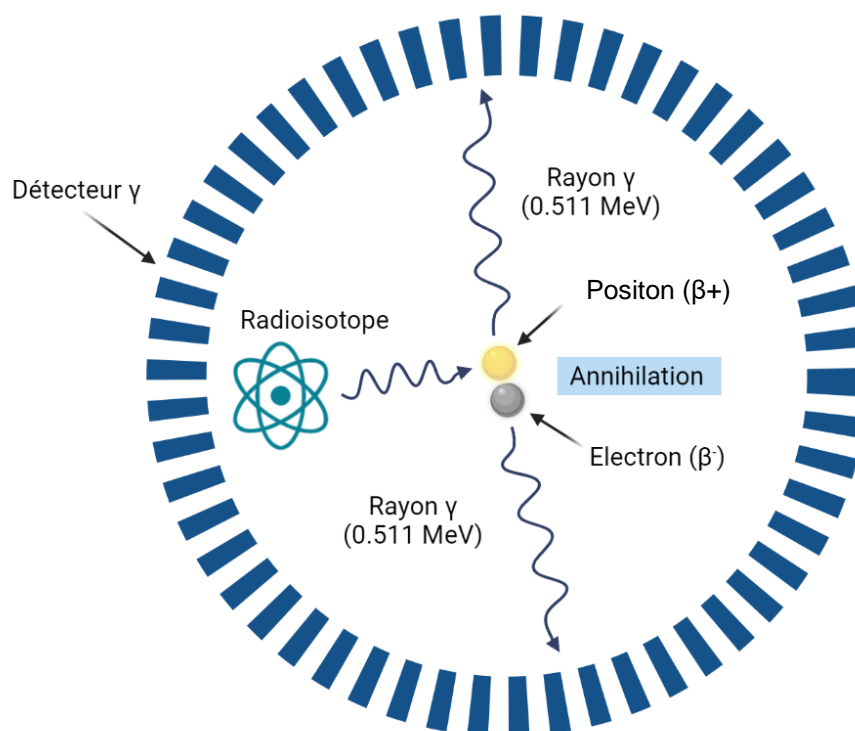


Figure 37. Principe physique du TEP.

Les radioisotopes pour l'imagerie TEP sont nombreux mais les plus couramment employés dans la prise en charge des patients sont le fluor 18 (^{18}F) et le carbone 11 (^{11}C) avec le cuivre 64 (^{64}Cu) et le zirconium 89 (^{89}Zr) pour la recherche clinique. Il est à noter que tandis que le fluor 18 et le carbone 11 possèdent des temps de demi-vie courts (respectivement 109,7 min et 20 min) limitant leur utilisation aux molécules à pharmacocinétique rapide pour l'imagerie de tumeurs, le zirconium 89, avec sa demi-vie de 3,3 jours, représente une alternative viable. En effet, afin d'obtenir une image tumorale, le radioisotope doit s'accumuler au niveau du site sans se désintégrer avant d'avoir atteint la zone d'intérêt, ce qui peut s'avérer plus ou moins long en fonction du type de composé radiomarqué considéré.

La molécule référence dans le domaine de l'imagerie TEP est le fluorodéoxyglucose (^{18}F FDG), analogue fluoré du glucose qui exploite le métabolisme accru au niveau tumoral afin de s'y accumuler et ainsi fournir des informations morphologiques et fonctionnelles sur la tumeur.

La technique d'imagerie TEP permet donc d'imager la distribution spatiale et temporelle des molécules radiomarquées. En effet, en plus des informations morphologiques classiques obtenues par imagerie, la TEP permet la visualisation et la quantification des caractéristiques tumorales à l'échelle moléculaire (évaluation du métabolisme ou de la surexpression de récepteurs à la surface tumorale par exemple).

B. Caractéristiques du scanner TEP et principe de la technique

Un scanner TEP est constitué d'un détecteur cylindrique composé de 15 000 à 30 000 cristaux scintillateurs type germanate de bismuth (BGO) ou lutétium oxyorthosilicate dopé au cérium ($\text{Lu}_2\text{SiO}_5[\text{Ce}]$ ou LSO)¹⁸⁰. Suite à l'interaction des photons γ incidents avec les cristaux, il y a génération d'électrons secondaires par effet Compton et photoélectrique. Ces électrons en se désexcitant au sein des cristaux émettent des photons dans le visible ou l'UV qui seront détectés par un tube photomultiplicateur, qui convertit la lumière incidente en signal électronique. Le nombre de photons de scintillation de faible énergie (environ 1 eV) est proportionnel à l'énergie déposée par le photon d'annihilation initial au sein des cristaux. Chaque type de cristal est défini par une constante de décroissance temporelle correspondant à la mesure de la vitesse d'émission de photons visibles après absorption du photon γ incident. La quantité instantanée de lumière générée suit une fonction exponentielle décroissante, dépendante de la constante de décroissance du cristal. Une constante de décroissance du cristal faible augmente le taux de comptage du détecteur et donc, *in fine*, réduit le temps mort entre chaque mesure et ainsi améliore la résolution temporelle du système.

Après réaction d'annihilation, deux photons γ coïncidents sont donc détectés permettant de définir dans l'espace une direction bien précise (LOR ou *line of response*) correspondant à la position supposée de la réaction d'annihilation. Pendant l'acquisition on a alors une accumulation de LORs qui, après traitement informatique, permettent d'obtenir une image reconstruite.

La technique TEP peut être définie par différents paramètres que sont la sensibilité, la résolution temporelle et la résolution spatiale. En ce qui concerne la sensibilité, elle peut être définie comme l'efficacité de collecte des photons émis par le radiotraceur et peut être ainsi considérée comme le taux de coups par unité de radioactivité dans le champ de vue (cps Bq^{-1}). Ainsi, une haute sensibilité mène à un nombre d'évènements détectés plus important et donc à un temps d'acquisition plus court. La résolution temporelle découle majoritairement de la sensibilité de l'appareil et des paramètres de reconstruction d'image considérés. En effet, les images tridimensionnelles obtenues sont issues de la sommation de données acquises pendant un

¹⁸⁰ Sæterstøl, J., Thèse de doctorat : Characterization of Scintillation Crystals for Positron Emission Tomography, Bergen University, Juin, 2010

intervalle de temps dont la durée dépend du radiotracteur considéré (quelques secondes à minutes).

C. Limitations de l'imagerie TEP

Cependant, il est à noter que l'imagerie TEP possède quelques limitations inhérentes au processus nucléaire exploité lui-même. En effet, la technique TEP repose sur la coïncidence de détection de 2 photons γ colinéaires résultant de l'annihilation du positon émis par le radiotracteur. D'un point de vue physique, le positon possède une énergie initiale de l'ordre du MeV (au maximum, 0,63 MeV pour ^{18}F , 0,90 MeV pour ^{89}Zr , 0,96 MeV pour ^{11}C) et doit préalablement se désexciter pour atteindre son énergie de repos de 511 keV afin de pouvoir s'annihiler avec un électron. Ainsi, le positon perd une partie de son énergie initiale en parcourant une distance finie, dépendante du type de radiotracteur considéré (1,67 mm pour ^{18}F , 1,88 mm pour ^{11}C , 1,91 mm pour ^{89}Zr ¹⁸¹) avant de pouvoir générer les photons γ nécessaires à la détection du signal par le scintillateur¹⁸². Dès lors, il existe une « zone floue » et une différence spatiale dépendante de la densité du tissu pénétré et du radiotracteur utilisé car le scintillateur ne peut détecter que la zone d'occurrence de l'annihilation qui ne correspond donc pas à la position précise du radionucléide. Cette limitation est connue au sein de la communauté et des tentatives d'amélioration de ce phénomène sont en développement, notamment le couplage TEP/IRM qui permettrait l'induction d'un champ magnétique de forte intensité durant l'examen. Ainsi, de par l'influence du champ magnétique, le positon émis adopterait un trajet hélicoïdal, ce qui réduirait la distance parcourue et donc améliorerait la résolution spatiale transaxiale de la technique¹⁸³. De plus, la colinéarité des photons γ est nécessaire à leur détection par le scintillateur et donc à la construction d'une image TEP. Dans le contexte idéal, durant le processus d'annihilation l'émission de 2 photons γ à 180° exactement l'un de l'autre est observée. Cependant, dans certains cas les particules (positon et électron) possèdent un *momentum* non nul au moment du phénomène d'annihilation, cela résulte en une déviation minimale de la trajectoire de 180° des photons émis. Ce phénomène de non colinéarité introduit donc un degré d'erreur dans la localisation précise du radiotracteur et est directement proportionnel au diamètre du détecteur PET. Toujours en considérant le phénomène physique mis en jeu, les photons γ émis interagissent avec la matière qu'ils traversent par effet Compton ou effet photoélectrique. Ces phénomènes indésirables induisent une perte d'énergie ainsi

¹⁸¹ Palmer, M. R. *et al.*, *IEEE Trans Nucl Sci.*, **2005**, 52, 1391–1395

¹⁸² Moses, W. W., *Nucl Instrum Methods Phys Res A.*, **2011**, 648, s236–240

¹⁸³ Raylman, R. R. *et al.*, *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, **1996**, 43, 2460–2412

qu'une déviation du photon γ initial résultant en une erreur de positionnement du signal et un bruit de fond conséquent. En filtrant ces photons de faible énergie issus de ces phénomènes électroniques au niveau du détecteur, ce bruit de fond peut être diminué en minimisant la fenêtre temporelle d'acquisition. Cette adaptation induit nécessairement le recours à des cristaux à scintillation rapides type LSO. Ainsi, la résolution spatiale de l'imagerie TEP repose en grande partie sur les propriétés physiques du phénomène d'annihilation de paires, mais pas exclusivement. D'autres caractéristiques intrinsèques au détecteur à scintillations peuvent altérer la résolution spatiale de la technique. Les cristaux doivent être d'une épaisseur suffisante pour obtenir une résolution spatiale satisfaisante tout en permettant une détection efficace. Il a été prouvé que la résolution spatiale diminuait au fur et à mesure qu'on s'éloigne du centre du champ de vue, induisant un biais potentiel important. En effet, au sein des détecteurs TEP circulaires, quand on s'éloigne du centre du champ de vue, les photons γ émis peuvent pénétrer un premier détecteur avant d'être réellement détectés par un détecteur adjacent, ce phénomène est appelé l'erreur parallaxe¹⁸⁴. De plus, lorsqu'un photon arrive au niveau du détecteur à scintillations, il peut pénétrer plus ou moins profondément le cristal avant de générer des électrons secondaires. Cependant, les algorithmes de reconstruction ne prenant pas en compte la profondeur d'interaction (DOI pour *Depth of Interaction*), un biais spatial est obligatoirement introduit, ce qui diminue la résolution spatiale (fig. 38). Les caméras TEP modernes possèdent une résolution spatiale de quelques millimètres (entre 4 et 7 mm en clinique et environ 1,5 mm en préclinique)¹⁸⁵. Enfin, l'accès à une infrastructure possédant un cyclotron, indispensable pour la synthèse des radioisotopes, peut ainsi constituer une limitation de l'imagerie TEP.

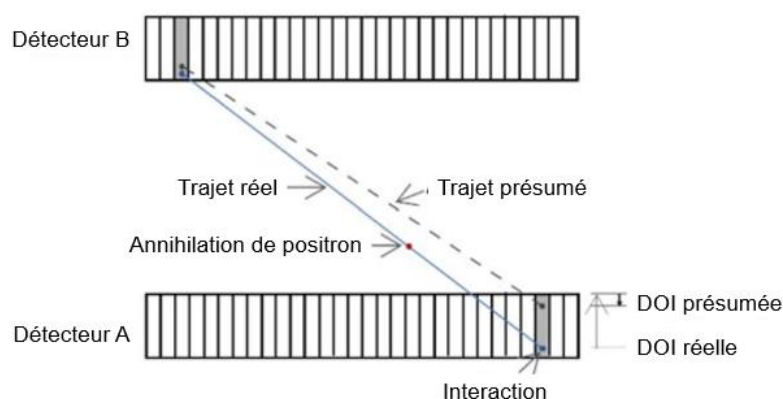


Figure 38. Erreur parallaxe¹⁸⁴.

¹⁸⁴ Mohammadi, I. *et al*, *Biomed. Phys. Eng. Express*, **2019**, 5, 062001

¹⁸⁵ Vodovar, D. *et al.*, *Méd. Intensive Réa.*, **2019**, 347–352

D. Radiotraceurs couramment utilisés en imagerie TEP, cas particulier du ^{89}Zr

L'imagerie TEP est conditionnée par l'utilisation de radiotraceurs permettant une visualisation dans l'organisme de l'objet marqué après reconstruction de l'image. Ces traceurs sont des isotopes radioactifs β^+ et possèdent des caractéristiques intrinsèques qui déterminent leur utilisation en clinique. Ces radioisotopes sont le plus souvent produits dans un cyclotron où des particules chargées (protons) sont accélérées par un champ magnétique et électrique puis, une fois l'énergie désirée atteinte, sont focalisées sur la cible d'intérêt. Cette réaction nucléaire permet l'obtention du radioisotope voulu accompagné de produits secondaires radioactifs. Suite à la production du radioélément, une étape de purification est nécessaire afin de s'affranchir des radioisotopes parasites.

Il existe plus d'une centaine de radioisotopes pour l'imagerie TEP. Cependant, ils ne sont, pour la plupart, pas adaptés au suivi du devenir de molécules et macromolécules dans l'organisme et ce, à cause de leur trop courte ou trop longue demi-vie. Or, pour le choix du radioisotope, la demi-vie radioactive doit être cohérente avec la demi-vie biologique du traceur. En effet, dès lors qu'il s'agit de marquer un anticorps ou une nanoparticule, la demi-vie du radioélément doit correspondre à la durée d'élimination du composé d'intérêt. Enfin, d'autres paramètres entrent en jeu quand il s'agit de choisir le radioisotope idéal, comme le coût total de production ou la disponibilité des précurseurs.

Parmi les radiotraceurs utilisables pour des études pharmacocinétiques, le zirconium 89, radiométal du bloc *d* d'état d'oxydation maximal (IV), suscite de plus en plus d'intérêt au sein de la communauté scientifique.

En effet, son temps de demi-vie élevé ($t_{1/2} = 78,41$ h) en fait un excellent candidat pour les études de biodistribution et de pharmacocinétique. De plus, la faible énergie du positon émis par le zirconium 89 ($E_{\beta^+ \text{ moyen}} = 396,9$ keV) induit une résolution spatiale satisfaisante des images TEP obtenues, similaire à celle du fluor 18 et du cuivre 64. Le zirconium 89 est produit par bombardement d'une cible d'yttrium (solide ou liquide) par un faisceau de protons d'environ 13 MeV¹⁸⁶. Il est à noter qu'au-delà d'une certaine énergie du faisceau incident ($E > 14$ MeV), cette synthèse $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ induit la production de déchets radioactifs tels que ^{88}Y ($t_{1/2} = 106,6$ jours) ou ^{88}Zr ($t_{1/2} = 83,4$ jours)¹⁸⁷ qu'il faudra, dès lors, séparer du

¹⁸⁶ Moulin, F., Thèse de doctorat : Développement du Zirconium-89 pour le radiomarquage d'anticorps monoclonaux pour la tomographie par émission de positons, Université de Strasbourg, Avril, 2021

¹⁸⁷ O'Hara, M. J. *et al.*, *J. Chromatogr. A.*, 2018, 1545, 48–58

radionucléide d'intérêt par des étapes de purification sur colonnes échangeuses d'anion ou cation ou encore sur résines présentant des résidus hydroxamates¹⁸⁸. Les caractéristiques du zirconium 89 ainsi que son processus de désexcitation sont décrits ci-dessous (fig. 39). Comme schématisé ci-dessous, le zirconium 89 se désintègre principalement (76,6 %) par capture électronique, phénomène durant lequel le noyau père capture un des électrons de la couche K et émet un neutrino. Cependant, c'est le phénomène compétitif de désintégration β^+ (22,3 %) qui est exploité par l'imagerie TEP.

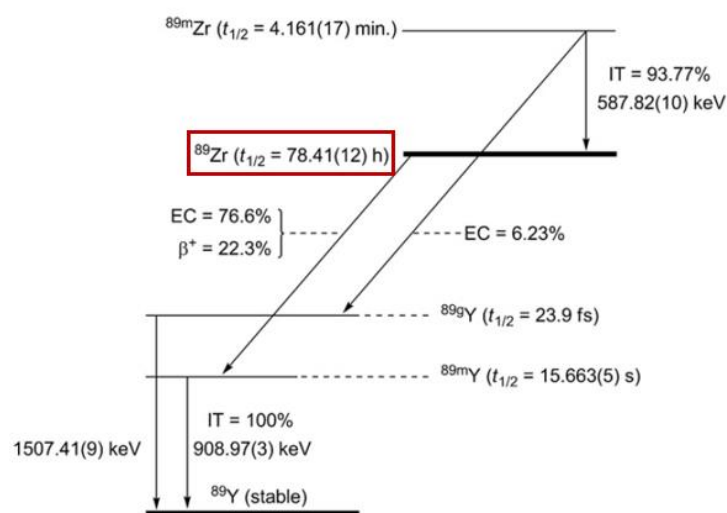


Figure 39. Schéma de désexcitation du $^{89}\text{Zr}^{188}$
EC: Capture électronique. IT: Transition isomérique.

Ce sont ces caractéristiques particulières du zirconium 89 qui en font un radioisotope de choix pour le marquage d'anticorps monoclonaux (immunoTEP) ou de nanoparticules¹⁸⁹.

E. Chélation du radiotracer ^{89}Zr

Afin de radiomarquer une macromolécule d'intérêt au zirconium 89, le recours à des agents chélatants est indispensable. En effet, contrairement au fluor 18 et carbone 11 qui peuvent être introduits au sein même de la molécule d'intérêt *via* des réactions chimiques avec un précurseur radiomarqué (réactions de méthylation par exemple pour le carbone 11¹⁹⁰ et réactions de fluoration pour le fluor 18¹⁹¹, le zirconium doit être complexé à la surface du nanovecteur pour permettre un radiomarquage efficace.

¹⁸⁸ Holland, J. P. *et al.*, *J. Med. Biol.*, **2009**, 36, 729–739

¹⁸⁹ Yoon, J. K. *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21, 4309

¹⁹⁰ Dahl, K. *et al.*, *Clin. Transl. Imaging*, **2017**, 5, 275–289

¹⁹¹ Jacobson, O. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **2015**, 26, 1–18

L'agent chélatant doit répondre à des critères essentiels. En effet, son radiomarquage doit être quantitatif à 37°C et à pH = 7,4 pour respecter les conditions de stabilité des anticorps et protéines. De plus, il doit former avec l'ion zirconium un complexe stable afin de limiter les phénomènes d'hydrolyse et de transmétallation lors de son passage dans la circulation sanguine. Enfin, l'agent chélatant doit être fonctionnalisable afin de permettre son couplage sur des macromolécules d'intérêt comme les anticorps, protéines ou nanoparticules, sans modifier leurs propriétés pharmacocinétiques.

Le zirconium 89 existe majoritairement en solution aqueuse sous sa forme la plus oxydée, Zr^{4+} , acide de Lewis « dur » au caractère fortement oxophile¹⁹². Ce cation Zr^{4+} a tendance à former des complexes de coordination à 6 ou 8 centres, adoptant une géométrie dodécahédrale ou carrée antiprismatique. Depuis longtemps, il est connu que le zirconium possède une forte affinité pour les groupements donneurs anioniques « durs » et est capable de former des complexes stables avec des ligands mono-hydroxamate¹⁹³.

Il est à noter qu'en solution aqueuse, la forte densité de charge du cation tétravalent Zr^{4+} est hautement polarisable et induit une augmentation de l'acidité des molécules d'eau liées au zirconium, induisant la formation d'oxyde et hydroxyde. Ces oxydes peuvent subir une étape de polymérisation hydrolytique conduisant à la formation de polyoxométallates où les groupements oxydes ou hydroxydes servent de pont entre deux entités métalliques¹⁹⁴.

Après avoir identifié l'espèce dominante du zirconium en solution aqueuse, la communauté scientifique s'est intéressée au développement d'agents de chélation exploitant l'affinité du zirconium pour le motif hydroxamate. Pour ce faire, les scientifiques se sont alors inspirés de la nature et plus particulièrement des sidérophores naturels, molécules de bas poids moléculaire présentant des groupements hydroxamates et produites par les micro-organismes (bactéries, champignons...) afin de séquestrer le fer (sous forme d'ions Fe^{3+}) présent dans leur environnement et de l'internaliser pour leur survie¹⁹⁵. Parmi ces sidérophores, la desferrioxamine B (DFO B), sidérophore linéaire trihydroxamique découvert dans les années 1950 chez *Streptomyces pilosus* (fig. 40), a rapidement suscité l'intérêt de la communauté scientifique. Initialement utilisée comme agent chélatant du fer pour prendre en charge les

¹⁹² McInnes, L. E. *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, **2017**, 352, 499-516

¹⁹³ Feiner, I.V.J. *et al.*, *Cancers*, **2021**, 13, 4466

¹⁹⁴ Hummel, W. *et al.*, *Chemical thermodynamics of compounds and complexes of U, Np, Pu, Am, Tc, Se, Ni and Zr with selected organic ligands*, Volume 9, 1st edition, Elsevier, Amsterdam; Boston, **2005**, 1030 pages

¹⁹⁵ Saha, R. *et al.*, *J. Basic Microbiol.*, **2012**, 52, 1–15

intoxications au fer, la desferrioxamine B a ensuite été identifiée comme capable de prendre en charge d'autres cations multivalents, parmi eux le zirconium(IV). Ainsi, en 1992, Meijs *et al.* ont décrit le radiomarquage efficace de la desferrioxamine avec le zirconium ainsi que la stabilité du complexe formé dans le plasma¹⁹⁶. Depuis, il a été prouvé par des calculs de DFT (*Density Functional Theory*) que la desferrioxamine forme un complexe hexadenté avec le cation Zr^{4+} tandis que deux molécules d'eau viennent compléter sa sphère de coordination (fig. 40)¹⁹⁷.

La présence des résidus hydroxamates permet une interaction forte avec l'ion tétravalent zirconium et conduit à un complexe stable, dont la constante de complexation $\log\beta$ est de l'ordre

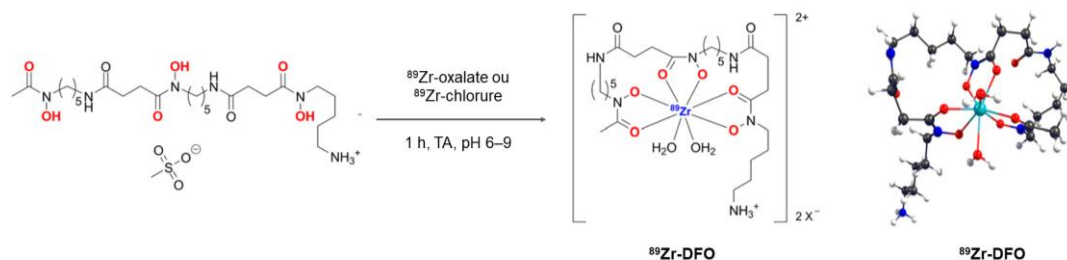


Figure 40. Structure de la desferrioxamine B et structure DFT du complexe [⁸⁹Zr]-DFO¹⁹⁷

de 40¹⁹⁸. En comparaison, la constante de complexation de la desferrioxamine avec le fer est d'environ 30. Cette stabilité thermodynamique a fait de la desferrioxamine l'agent chélatant de choix pour le radiomarquage au zirconium 89 et son utilisation dans le domaine de l'imagerie TEP s'est largement répandue.

Ainsi, en 2006, les premiers anticorps radiomarqués au zirconium 89 *via* chélation à la desferrioxamine ont été utilisés en clinique pour la détection de métastases au niveau des ganglions lymphatiques chez des patients souffrant de cancer de la tête et du cou¹⁹⁹. Depuis cette preuve de concept clinique, le complexe [⁸⁹Zr]-DFO est largement exploité en recherche préclinique et clinique pour le développement de nouveaux traceurs tumoraux^{200,201}.

Cependant, la plupart des études précliniques utilisant la desferrioxamine comme agent chélateur du zirconium ont mis en évidence la présence non négligeable (environ 5 à 10 % de

¹⁹⁶ Meijs, W. E. *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.*, **1992**, 3, 1443–1447

¹⁹⁷ Holland, J. P. *et al.*, *J. Nucl. Med.*, **2010**, 51, 1293–1300

¹⁹⁸ Holland, J. P. *et al.*, *Inorg. Chem.*, **2020**, 59, 2070–2082

¹⁹⁹ Börjesson, P. K. E. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **2006**, 12, 2133–2140

²⁰⁰ Jauw, Y. W. S. *et al.*, *Front. Pharmacol.*, **2016**, 7, 131

²⁰¹ Pandit-Taskar, N. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **2015**, 21, 5277–5285

la dose injectée 7 jours post-injection) de zirconium au niveau des os chez le modèle rongeur, cette tendance n'ayant pas été observée en clinique²⁰². En effet, le cation Zr^{4+} , une fois libre, s'accumule au niveau des os où il est chélaté par l'hydroxyapatite²⁰³. D'autres théories telles que la transchélation du zirconium avec la transferrine ont été avancées pour expliquer cette accumulation préférentielle. Les efforts se sont alors concentrés sur le développement de nouveaux agents chélatants dérivés de la desferrioxamine mais possédant au minimum 4 motifs hydroxamates permettant une saturation de la sphère de coordination du zirconium. Il a d'ailleurs été prouvé que plus la denticité du complexe est importante, plus le complexe formé est stable *in vivo*.

Ainsi, en 2014, le groupe de Gasser et Mindt publie la synthèse de la DFO* (fig. 41), obtenue à partir de la desferrioxamine commerciale et présentant 4 groupements hydroxamates. La structure de ce dérivé octadenté de la DFO a été optimisée par des études de DFT et des analyses chromatographiques ont permis de mettre en évidence un ratio métal-ligand de 1:1²⁰⁴. La DFO* a ensuite été soumise à divers tests de compétition et la stabilité du complexe formé avec le ^{89}Zr a été prouvée face à un large excès de divers autres agents chélateurs connus tels que le DTPA ou la DFO elle-même²⁰⁵. En 2017, Vugts *et al.* publient les premiers résultats *in vivo* permettant la comparaison de la stabilité des complexes formés par la DFO* et la DFO avec le ^{89}Zr chez la souris *via* leur greffage à un anticorps monoclonal (trastuzumab)²⁰⁶. La DFO et la DFO* ont été greffées à l'anticorps monoclonal *via* un lien thiourée (DFO-p-Bz-NCS et DFO*-p-Bz-NCS, respectivement) et la distribution de l'anticorps au sein de l'organisme a pu être étudiée par imagerie TEP. Une accumulation du zirconium au niveau osseux plus faible a pu être observée chez le groupe rongeur traité par [^{89}Zr]-trastuzumab-DFO* en comparaison avec le groupe rongeur traité par [^{89}Zr]-trastuzumab-DFO. Depuis l'apparition de la DFO*, d'autres dérivés octadentés de la desferrioxamine ont été développés pour la chélation du zirconium 89, exploitant toujours l'introduction d'un quatrième résidu hydroxamate afin d'améliorer la stabilité du complexe. Par exemple, la DFO-HOPO (fig. 41), d'abord utilisée pour la séquestration du Pu(IV)²⁰⁷ a été identifiée comme une alternative plus stable que la desferrioxamine pour la chélation du ^{89}Zr *in vitro* et *in vivo*²⁰⁸. D'autres agents dérivés de la

²⁰² Wuensche, T. E. *et al.*, *Theranostics*, **2022**, *12*, 7067–7079

²⁰³ Abou, D. S. *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, **2011**, *38*, 675–681

²⁰⁴ Patra, M. *et al.*, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 11523–11525

²⁰⁵ Brandt, M. *et al.*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2020**, *25*, 789–796

²⁰⁶ Vugts, D. J. *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2017**, *44*, 286–295

²⁰⁷ White, L. D. *et al.*, *J. Med. Chem.*, **1988**, *31*, 11–18

²⁰⁸ Allott, L. *et al.*, *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 8529–8532

desferrioxamine ont aussi démontré une complexation plus stable avec le zirconium 89 *in vitro* comme la DFO₂ (fig. 41), résultant de la liaison de deux molécules de desferrioxamine et présentant 6 sites hydroxamates. Cette stabilité de complexation a été évaluée *in vitro* via des études de transchélation et de compétition avec de larges excès d'EDTA. Il semblerait qu'à l'instar de la DFO* et la DFO-HOPO, la DFO₂ (fig. 41) forme un complexe avec le zirconium 89 plus stable que la DFO, limitant le phénomène d'accumulation du zirconium libre au niveau des os²⁰⁹. Cependant, la faible solubilité en milieu aqueux de la DFO* et de la DFO₂ a limité leur utilisation. Enfin, la DFO-cyclo* ou l'oxo-DFO* (fig. 41), dérivé plus soluble en milieu aqueux(fig.), entre autres, sont aussi en cours d'étude et montrent des résultats prometteurs^{210,211}.

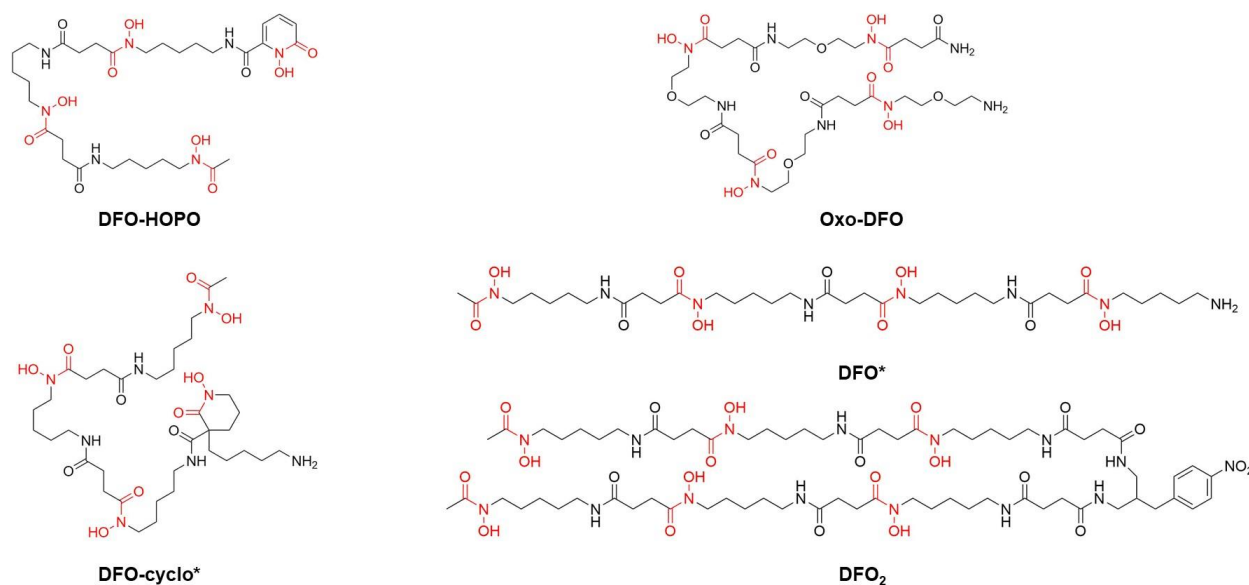


Figure 41. Structures des différents dérivés de la desferrioxamine¹⁹³

Il est à noter que d'autres ligands ne présentant pas de sites hydroxamates ont été identifiés comme capables de complexer de manière efficace le zirconium 89. C'est le cas du DOTA et de ses dérivés (DOTAM et DOTP) qui ont été décrits comme possédant une affinité de chélation avec le zirconium 89 supérieure à celle de la DFO²¹². Ces agents tétraazamacrocycliques, malgré une affinité importante pour le zirconium 89, ont peu à peu été abandonnés. En effet,

²⁰⁹ Sarbisheh, E. K. *et al.*, *Inorg Chem.*, **2020**, 59, 11715–11727

²¹⁰ Alnahwi, A. H. *et al.*, *ACS Omega*, **2020**, 5, 10731–10739

²¹¹ Raavé, R. *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.*, **2019**, 46, 1966–1977

²¹² Pandya, D. M. *et al.*, *Chem. Sci.*, **2017**, 8, 2309–2314

leur procédé de radiomarquage contraignant nécessite une température importante (90 °C) en solution aqueuse ce qui est incompatible avec la plupart des protéines et anticorps.

Ainsi, comme exemplifié précédemment, de nombreux efforts sont réalisés pour améliorer la stabilité du complexe [⁸⁹Zr]-DFO *in vivo*. Cependant, l'accumulation significative du zirconium libre au niveau des os, détectée avec la DFO durant les études précliniques, n'a pas été observée en clinique²¹³. De plus, la desferrioxamine, utilisée depuis de nombreuses années en clinique, a prouvé son innocuité et son efficacité de chélation du zirconium 89 chez l'homme. En ce sens, les nouveaux chélates développés n'ont, à ce jour, pas démontré leur supériorité par rapport à la desferrioxamine à l'échelle clinique. De plus, il s'agit de prendre en compte le coût et le travail nécessaires à la synthèse de ces nouveaux dérivés de la DFO dans la synthèse du radioimmunoconjugué, ce qui est susceptible de limiter grandement leur utilisation en routine.

En conclusion, la desferrioxamine représente encore le standard pour la chélation du zirconium 89 en préclinique et en clinique afin d'assurer le suivi par imagerie TEP d'anticorps monoclonaux ou de nanoparticules, et ce, malgré les limitations évoquées ci-dessus.

II. Objectifs du chapitre

L'imagerie TEP repose sur l'émission concomitante de 2 photons γ suite à la réaction d'annihilation entre un positon et un électron de l'environnement. Ces 2 photons sont détectés par des cristaux scintillateurs qui permettent la transformation de ce signal lumineux en signal électrique. Une reconstruction de l'image permet d'obtenir la position du radiotracer et donc de la nanoparticule ou anticorps lui étant conjugué. Cette technique présente des avantages certains mais aussi quelques limitations, inhérentes au mécanisme physique impliqué, telles qu'une résolution spatiale suboptimale.

Cette technique d'imagerie implique l'utilisation de radionucléides émetteurs β^+ tels que le fluor 18 ou le zirconium 89. Dans le cadre d'une étude de la distribution d'une macromolécule telle qu'un anticorps ou une nanoparticule, le zirconium 89 est préféré car il possède un temps de demi-vie plus important, mieux adapté aux cinétiques de distribution tissulaire des anticorps et nanoparticules. Afin de complexer le zirconium 89 à la surface de l'anticorps ou de la nanoparticule, l'emploi d'agents de chélation est nécessaire. Beaucoup d'avancées ont été réalisées dans ce domaine et la desferrioxamine constitue le chélateur de référence en ce qui concerne la complexation du zirconium 89. Le couple desferrioxamine-zirconium 89 a prouvé

²¹³ Deri, M. A. *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, **2013**, *40*, 3–14

d'un résidu isothiocyanate *via* réaction avec le *para*-phényldiisothiocyanate permet le couplage avec des entités aminées telles que les lysines. D'un autre côté, l'introduction d'un groupement maléimide, d'un iode ou brome permet la conjugaison avec des résidus présentant un thiol libre terminal tels que les cystéines. Il a été cependant prouvé que le lien maléimide pouvait subir une réaction de rétro-Michael *in vivo*, provoquant le relargage de la molécule cargo dans le sang, où elle pourra être prise en charge par d'autres protéines présentant des thiols libres dans la circulation sanguine²¹⁵. Outre le lien maléimide, toutes les fonctionnalisations de la desferrioxamine développées précédemment ont prouvé leur efficacité de conjugaison ainsi que leur stabilité *in vivo*²¹⁶.

Pendant ces étapes de fonctionnalisation, les différentes possibilités de réactivité de la desferrioxamine, due à la présence de fonctions acides hydroxamiques, induisent, *de facto*, l'apparition de réactions de couplage non désirées. Dès lors, certaines stratégies ont été élaborées afin de contourner cette limitation *via* le masquage des motifs hydroxamates. Pour ce faire, la chélation du fer a été envisagée, les résidus hydroxamates normalement libres se retrouvant engagés dans la prise en charge du Fe³⁺, limitant drastiquement la compétition lors d'étapes de conjugaison futures²¹⁷. Bien qu'efficace, le recours à une telle stratégie impose une étape de transchélation du Fe³⁺ avec un excès molaire d'EDTA ainsi qu'une étape de purification supplémentaire *via* l'utilisation d'une colonne d'exclusion ou par ultrafiltration^{218,219}. Cette approche multi-étapes, bien qu'encore très utilisée dans le domaine, se révèle néanmoins chronophage et peu pratique. Ainsi, d'autres stratégies de fonctionnalisation n'impliquant pas la protection des résidus hydroxamates ont été développées.

Des considérations pratiques nous ont conduits à choisir l'introduction d'une fonction thiol à l'extrémité de la partie PFTD associée à la fonctionnalisation de la desferrioxamine par un atome d'iode terminal pour la construction de l'amphiphile PFTD-DFO. De plus, nous avons envisagé l'utilisation de trityl mercaptan comme précurseur du résidu thiol pour faciliter le suivi LC-MS et les étapes de purification lors de la synthèse.

²¹⁵ Szijj, P. A. *et al.*, *Drug Discov. Today : Technol.*, **2018**, *30*, 27–34

²¹⁶ Heskamp, S. *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, **2017**, *28*, 2211–2223

²¹⁷ Verel, I. *et al.*, *J. Nucl. Med.*, **2003**, *44*, 1271–1281

²¹⁸ Cohen, R. *et al.*, *Nat. Protoc.*, **2013**, *8*, 1010–1018

²¹⁹ Giesen, D. *et al.*, *Sci. Rep.*, **2022**, *12*, 6286

Dans un premier temps, nos efforts se sont concentrés sur la synthèse de la partie PFTD présentant un thiol libre en position terminale. Pour ce faire, le tétraéthylène glycol a, dans un premier temps, été mono-activé sous forme de tosylate (**II.1**) puis engagé dans une réaction de substitution avec le trityl mercaptan. Le composé obtenu **II.2** a, à son tour, été activé sous forme de tosylate (**II.3**) avant de subir l'attaque nucléophile du 1*H*,1*H*-perfluorotétradécanol (fig. 43). Une ultime étape de déprotection du résidu trityl du composé **II.4** nous a ensuite permis d'accéder au composé thiol perfluoré (**II.5**).

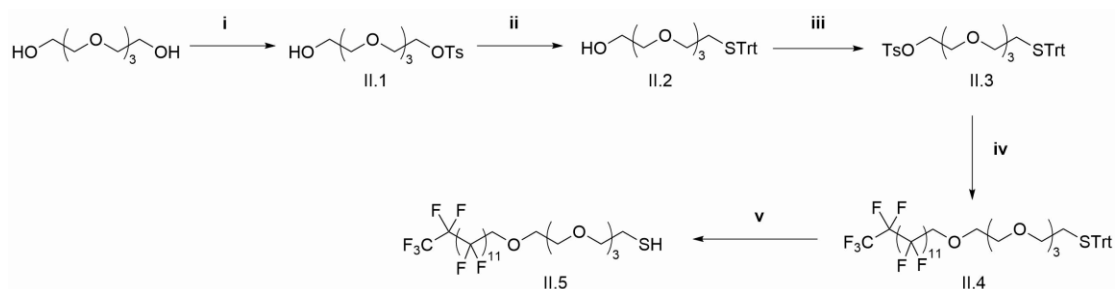


Figure 43. Voie de synthèse du thiol perfluoré (**II.5**) i. TsCl (0,1 équiv.), NaOH (1,6 équiv.), THF, 5 h, 0 °C à TA, 94 % ii. HSTrt (1,25 équiv.), NaOH (1,25 équiv.), toluène/éthanol/eau 1:1:0,4, 16 h, TA, 56 % iii. TsCl (2 équiv.), NEt₃ (5 équiv.), DCM anh., 16 h, 0 °C à TA, 79 % iv. PFTD (4 équiv.), NaH 60 % (4 équiv.), THF anh., 3 jours, 75 °C, 61 % v. TFA (5 équiv.), TIPS (5 équiv.), DCM anh., 16 h, TA, 72 %.

Le partenaire iodé a été obtenu par simple activation de l'acide iodoacétique sous forme d'ester NHS (**II.6**) qui a été ensuite mis en présence de la desferrioxamine commerciale. Cette réaction en conditions douces nous a permis d'obtenir la DFO iodée (**II.7**) avec un rendement modéré. Cette dernière a finalement été mise en présence du thiol perfluoré **II.5** en milieu alcalin doux, permettant l'obtention du composé PFTD-DFO souhaité avec un rendement de 34 % (fig. 44)

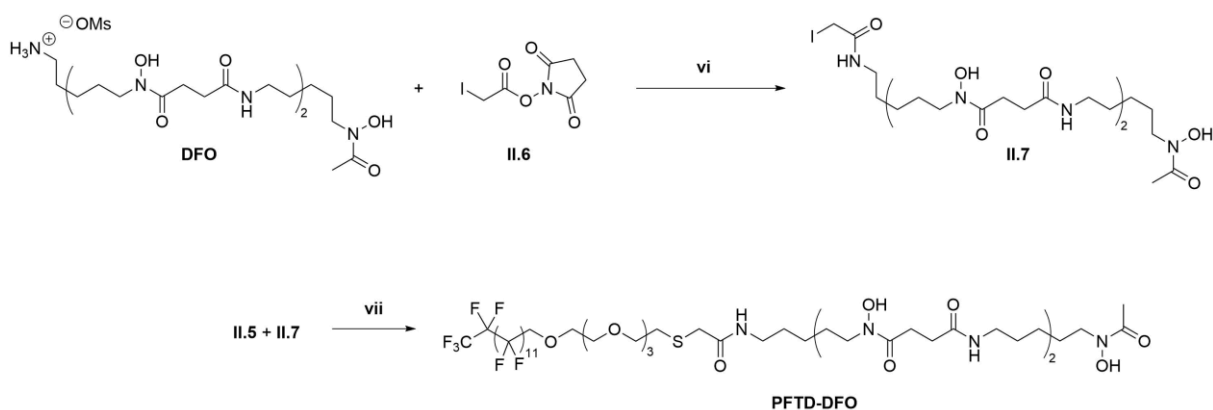


Figure 44. Synthèse du PFTD-DFO vi. **II.6** (1,1 équiv.), DIPEA (1 équiv.), DMF/H₂O 10:1, 2 h, TA, 59 % vii. **II.5** (1 équiv.), **II.7** (1 équiv.), K₂CO₃ (1 équiv.), DMSO anh., 24 h, TA, 34 %

La nature très différente des entités PFTD et DFO composant l'amphiphile et la faible solubilité qui en découle ont rendu les analyses RMN ¹H particulièrement difficiles. L'élévation de la

température (343 K) durant l'analyse RMN a été nécessaire pour permettre une caractérisation précise de la structure de l'amphiphile PFTD-DFO.

Ainsi, l'amphiphile PFTD-DFO a été obtenu *via* une synthèse multi-étape avec un rendement global satisfaisant. Ayant l'amphiphile à disposition, nous avons souhaité nous concentrer sur son introduction à hauteur de 10 % massiques au sein des micelles perfluorées déjà développées dans le Chapitre 1.

B. Formulation de micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10

L'amphiphile PFTD-DFO en main, nos efforts se sont concentrés sur la formulation de micelles mixtes constituées d'un mélange des amphiphiles PFTD-PEG et PFTD-DFO dans un rapport massique de 90:10. La faible solubilité apparente en milieu aqueux du composé PFTD-DFO a, dans un premier temps, posé problème pour l'obtention d'une suspension colloïdale de micelles mixtes. Ce constat est en adéquation avec les travaux de Ihnat *et al.*²²⁰. De

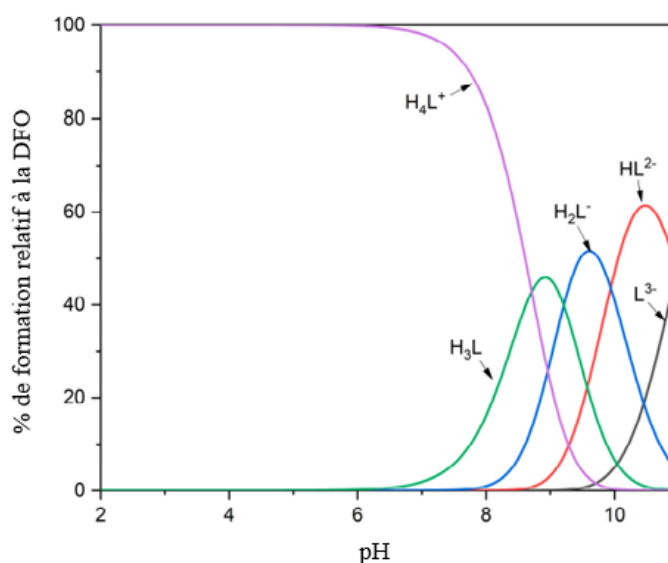


Figure 45. Diagramme de distribution des espèces ioniques de la desferrioxamine en fonction du pH²²¹.

plus, il est à noter que la solubilité des composés dérivés de la desferrioxamine est dépendante du pH et des espèces ioniques de la desferrioxamine en solution. Le profil de distribution des espèces ioniques de la DFO présentes en solution en fonction du pH du milieu a été décrit dans la littérature. À pH basique (pH > 8,5–9), la coexistence de plusieurs espèces ioniques de la desferrioxamine a été observée et semble liée à la déprotonation d'un ou plusieurs motifs hydroxamates présents sur la molécule²²¹ (fig. 45). À pH 7, l'espèce majoritaire de la desferrioxamine est la forme totalement protonée H₄L (présentant un groupement ammonium terminal). Aux alentours de pH 8,5, on assiste à la déprotonation d'un premier résidu hydroxamate, menant à une forme zwitterionique de la desferrioxamine (H₃L). Au-delà de pH 9, la fonction amine terminale puis les deux résidus hydroxamates restants sont déprotonés

²²⁰ Ihnat, P. M. *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **2000**, 89, 1525–1536

²²¹ Bellotti, D. *et al.*, *Molecules*, **2021**, 26, 3255

(H_2L^- , HL_2^- et L_3^- , respectivement). Ainsi, l'augmentation du pH favorise l'apparition de charges formelles au sein de la structure desferrioxamine, améliorant donc la solubilité apparente de ses dérivés en milieu aqueux, *via* la formation de liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau environnantes.

En effet, en milieu aqueux, à pH 7, l'amphiphile PFTD-DFO n'est que très peu soluble ce qui entraîne une turbidité de la suspension de micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10, même après 10 min de sonication à la sonde à ultrasons. Nous avons dès lors tenté d'améliorer la solubilité aqueuse du composé PFTD-DFO en modifiant le pH du milieu. À $pH > 10$, en se plaçant dans une solution aqueuse de NaOH à 0,1 M, on observe une légère turbidité qui disparaît après 10 min de sonication. Une suspension colloïdale basique est ainsi obtenue après filtration comme le prouve l'analyse DLS (fig. 46.b). Une ultime étape d'échange de tampon par élution sur colonne SephadexTM (NAP25), nous a permis d'obtenir un colloïde aqueux neutre de micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO avec un ratio massique 90:10. Les formulations de micelles mixtes ont ainsi été réalisées dans l'eau. Les analyses DLS de ces colloïdes ont mis en avant une distribution homogène des micelles mixtes formulées, avec un rayon hydrodynamique d'une dizaine de nanomètres (environ 12 nm) (fig. 46.d). Pour chaque formulation nous avons pu mesurer le potentiel zêta associé (fig. 46.a et 46.c). Tandis que pour la suspension micellaire PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 formulée dans le NaOH le potentiel zêta est légèrement négatif (-16.4 mV), de par la déprotonation en milieu basique des résidus hydroxamates, le potentiel zêta des formulations dans l'eau est nul, indiquant une absence de charge à la surface micellaire.

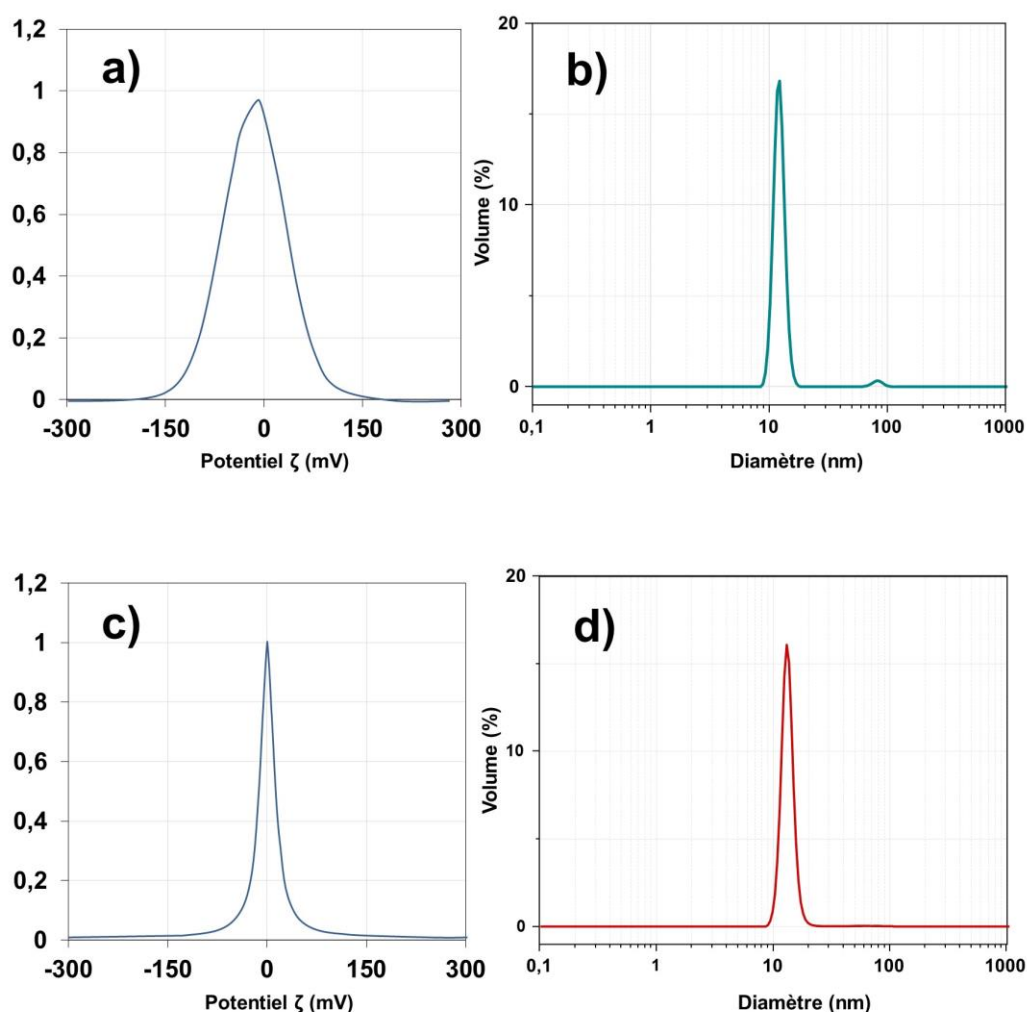


Figure 46. PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 a) Mesure du potentiel ζ d'une suspension micellaire PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 dans une solution aqueuse de NaOH 0,1 M ($c = 15 \text{ mg mL}^{-1}$) b) Mesure DLS d'une suspension micellaire PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 dans NaOH 0,1 M ($c = 15 \text{ mg mL}^{-1}$) c) Mesure du potentiel ζ d'une suspension micellaire PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 dans H_2O ($c = 10 \text{ mg mL}^{-1}$) d) Mesure DLS d'une suspension micellaire PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 dans H_2O ($c = 10 \text{ mg mL}^{-1}$)

Ainsi, les amphiphiles perfluorés PFTD-DFO ont été introduits efficacement au sein des micelles PFTD-PEG. Les micelles perfluorées mixtes ainsi formulées ont été caractérisées et ont montré un diamètre moyen similaire à celui des micelles PFTD-PEG (*ca.* 10 nm) et un potentiel ζ neutre. Une fois les différentes caractérisations réalisées et la méthode de formulation micellaire validée, nos efforts se sont concentrés sur l'évaluation du potentiel de chélation du zirconium 89 des micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO. En effet, ce paramètre est essentiel afin d'envisager l'étude de la biodistribution des micelles perfluorées *in vivo*.

C. Radiomarquage des micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO au ^{89}Zr

Afin de suivre dans l'organisme notre micelle PFTD-PEG/PFTD-DFO, il est nécessaire de procéder à une étape de radiomarquage, permettant la chélation du ^{89}Zr par l'amphiphile PFTD-DFO. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur le protocole de Vosjan et adapté ce dernier au radiomarquage de nanoparticule²²². L'efficacité de radiomarquage a été évaluée par iTLC (*Instant Thin Layer Chromatography*). Nous avons obtenu de très bons résultats de chélation du ^{89}Zr avec les micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 en atteignant une efficacité de radiomarquage de l'ordre de 92 % (fig. 47.a). Le zirconium libre a ensuite été éliminé sur colonne d'exclusion SephadexTM PD10 à l'aide d'un tampon DPBS et cette ultime étape de purification a conduit à l'obtention de micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 radiomarquées pures (fig. 47.b).

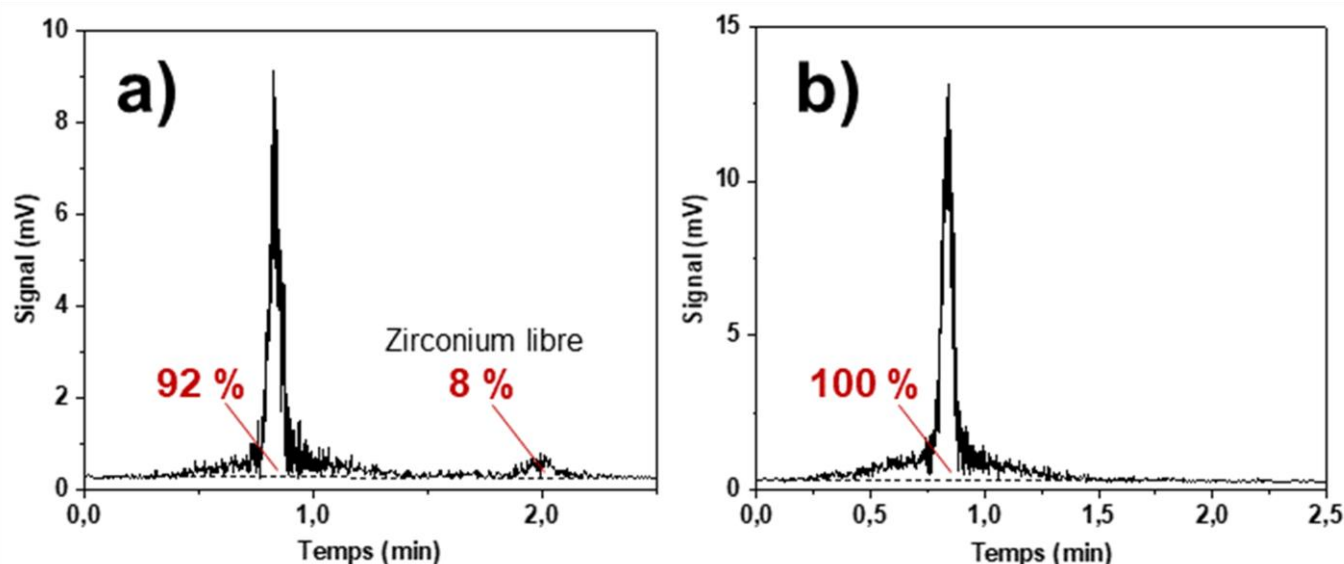


Figure 47. iTLC des micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 après radiomarquage (A) et après purification sur PD10 (B).

Ces rendements de radiomarquage sont en adéquation avec ceux décrits dans la littérature, la plupart des exemples utilisant la DFO pour le radiomarquage d'anticorps.

Ainsi, nous avons réussi à radiomarquer au zirconium 89 les micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 avec un rendement supérieur à 90 %, traduisant l'affinité du ^{89}Zr pour la tête polaire DFO de l'amphiphile PFTD-DFO. Cette étape a permis de valider le potentiel chélatant de l'amphiphile PFTD-DFO et donc de valider l'utilisation des micelles mixtes pour les études de biodistribution par imagerie TEP.

²²² Vosjan, M. W. D. *et al.*, *Nat. Protoc.*, **2010**, 5, 739–743

D. Évaluation de la cytotoxicité sur modèle cellulaire B16F10

Toujours dans l'objectif d'administrer les micelles mixtes *in vivo* afin d'obtenir des informations quant à leur distribution dans l'organisme, nous avons voulu valider l'innocuité des micelles mixtes *in vitro*. Ainsi, la cytotoxicité des micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 a été évaluée par test MTS sur cellules murines de mélanome B16F10 (fig. 48). Aucune cytotoxicité n'a été observée aux concentrations inférieures à 1 mg mL^{-1} . Il est à noter qu'à l'instar des micelles perfluorées PFTD-PEG 100 %, les micelles mixtes présentent aussi une toxicité significative à concentration élevée ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$). Dès lors, les micelles perfluorées mixtes présentent un profil de toxicité semblable à celui des micelles perfluorées PFTD-PEG 100 %.

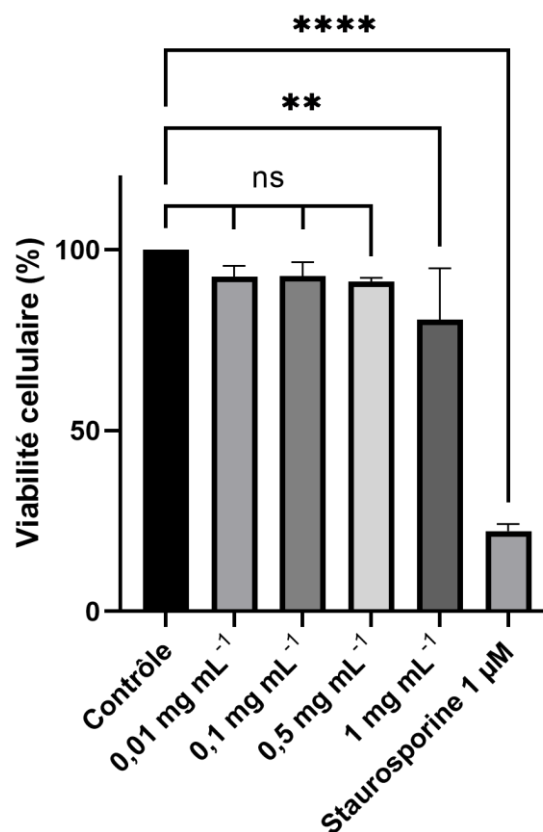


Figure 48. Test MTS des micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 sur la lignée cellulaire B16F10. ns : non significatif, ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$ (test ANOVA). Les données sont représentées en moyenne \pm écart-type.

La présence de l'amphiphile PFTD-DFO (à hauteur de 10 % en masse) n'a pas d'influence manifeste sur la cytotoxicité de l'objet nanoparticulaire. L'innocuité des micelles mixtes a donc permis de valider la transition vers le modèle murin.

E. Étude de la tolérance des micelles PFTD-PEG sur souris C57BL/6

Les études de tolérance constituent la première étape de validation de l'utilisation des micelles perfluorées *in vivo*. Pour cette étude, les micelles PFTD-PEG ont été utilisées comme modèle, la présence de 10 % d'amphiphiles PFTD-DFO au sein de la formulation micellaire n'impactant que de manière négligeable les caractéristiques physicochimiques de la micelle. Cette étude se réalise sur modèles animaux sains et permet de surveiller l'apparition de signes cliniques associés à une mauvaise tolérance, tels qu'une perte de poids excessive ou une altération du comportement de l'animal. Une injection unique de 100 μL de suspension micellaire PFTD-PEG à 10 mg mL^{-1} par la veine caudale a été réalisée sur 3 souris C57BL/6 et différents signes

cliniques ont été surveillés sur 5 jours tels que l'apparition d'un pli cutané synonyme de déshydratation ou encore une diminution de l'activité des souris. Le tableau récapitulatif des différents signes cliniques surveillés durant les études de tolérance est consultable en annexe (cf. Annexe 1). Parmi les paramètres contrôlés, la perte de poids constitue un reflet fidèle de la tolérance de la souris vis-à-vis de l'administration intraveineuse de micelles PFTD-PEG, une perte de poids supérieure à 5 % constituant un premier signal d'alerte. L'évolution du poids des 3 souris injectées est reportée figure 49 et aucune variation significative du poids n'a été observée chez les 3 souris injectées.

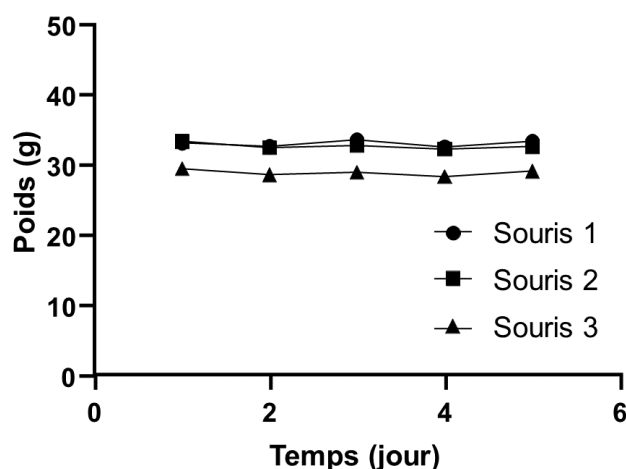


Figure 49. Évaluation de la tolérance de souris C57BL/6 vis-à-vis d'une injection intraveineuse de suspension micellaire PFTD-PEG 100 %. $n = 3$, $V = 100 \mu\text{L}$.

Les micelles perfluorées semblent donc bien tolérées chez les souris C57BL/6 avec une absence de signe clinique reflétant une souffrance de l'animal suite à leur injection en intraveineuse.

F. Étude de la biodistribution des micelles perfluorées sur souris C57BL/6

Une fois la tolérance des souris vis-à-vis des micelles PFTD-PEG avérée, les études de biodistribution sur souris C57BL/6 ont pu être réellement envisagées. Ainsi, les micelles mixtes radiomarquées ont été injectées ($4,8 \pm 0,2 \text{ MBq}$) par voie intraveineuse, *via* la veine caudale, dans des souris femelles C57BL/6 (6 semaines, $17,5 \pm 1,4 \text{ g}$) porteuses d'allogreffes orthotopiques (sous-cutanées car cancer du mélanome) de B16F10. Des examens TEP/CT-scan des souris injectées ont ensuite été réalisés à différents temps post-injection : 1 h, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 7 jours.

Après reconstruction informatique, les images TEP obtenues ont été analysées avec le logiciel PMOD. Afin de quantifier l'accumulation des micelles perfluorées radiomarquées dans les différents organes d'intérêt, des volumes d'intérêt (ou VOI pour *Volume Of Interest*) ont permis de délimiter plusieurs zones représentatives de ces organes. Les concentrations moyennes en radioactivité (kBq cm^{-3}) dans les organes sains (cœur, rein, foie, rate, os, muscle, poumon, cerveau) et la tumeur ont pu être ainsi extraites de ces VOI. Ces données brutes ont ensuite été

corrigées par rapport au temps d'injection afin de prendre en compte le phénomène de décroissance radioactive et divisées par l'activité totale administrée à la souris (kBq) afin d'obtenir le pourcentage de dose injectée par unité de volume du tissu considéré ($\% \text{DI cm}^{-3}$) (fig. 50.a) aux différents temps d'imagerie. Après la dernière acquisition d'image à 7 jours, les animaux ont été sacrifiés et le sang ainsi que les principaux organes ont été prélevés. Une mesure de la radioactivité résiduelle dans chacun des organes a été réalisée au compteur gamma et a permis d'établir la biodistribution à 7 jours *ex vivo* des micelles perfluorées (fig. 50.b). Ces données ont, elles aussi, été corrigées par la loi de décroissance radioactive et rapportées à l'activité totale injectée par souris afin d'obtenir le pourcentage de dose injectée par unité de masse de tissu ($\% \text{DI g}^{-1}$). Une analyse statistique *via* un test de corrélation de Pearson a permis de mettre en évidence une corrélation élevée entre les données d'accumulation extraites des images TEP (kBq cm^{-3}) et les données d'accumulation obtenues *ex vivo* (kBq g^{-1}) (fig. 50.c) permettant, dès lors, de valider la quantification de l'accumulation de micelles radiomarquées par analyse d'image TEP *via* le logiciel PMOD.

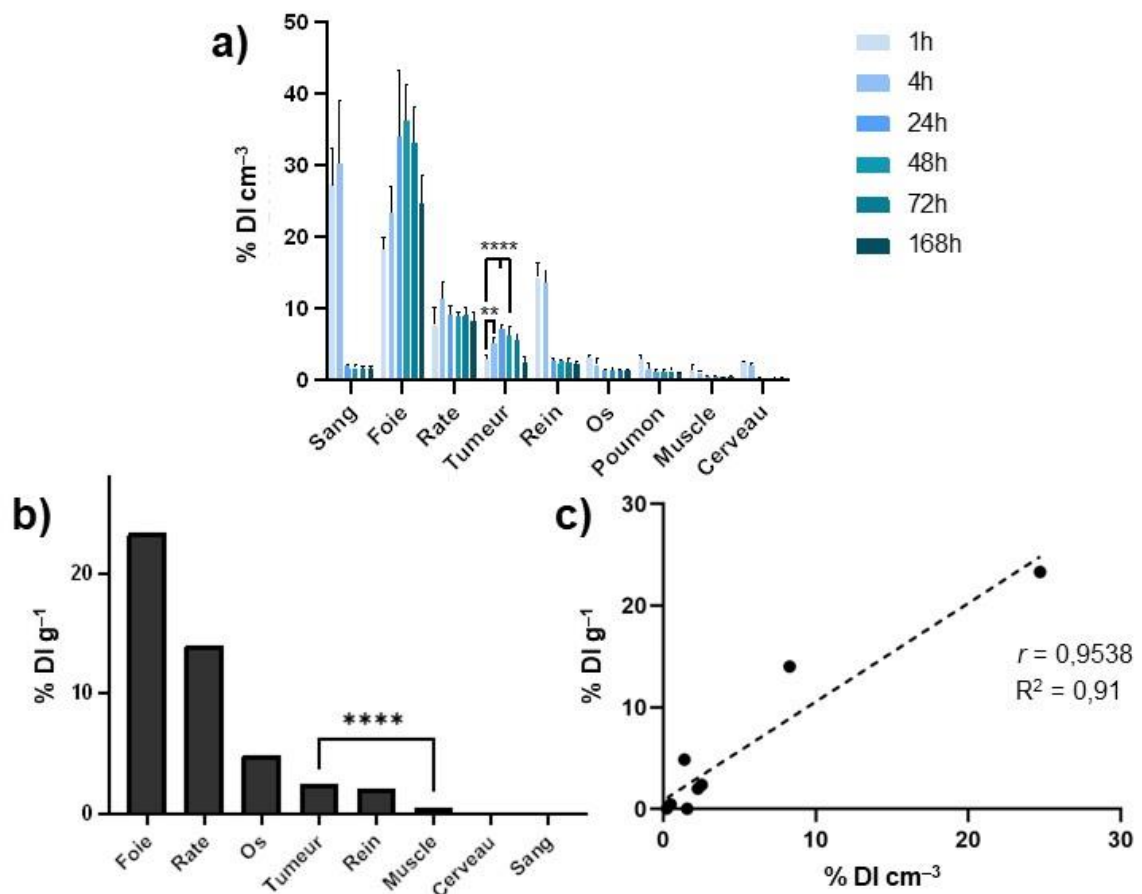


Figure 50. a) Biodistribution des micelles mixtes perfluorées radiomarquées dérivée de l'analyse des images TEP via le logiciel PMOD (n = 5 souris) ** p < 0,01 et **** p < 0,0001 (test ANOVA) b) Biodistribution *ex vivo* des micelles mixtes perfluorées radiomarquées (n = 5 souris) **** p < 0,0001 (test de Student) c) Corrélation entre la quantification de l'accumulation des micelles mixtes perfluorées radiomarquées dans les tissus par biodistribution *ex vivo* et par analyse des images TEP (test de Pearson) $R^2 = 0,91$ $r = 0,95$. Les données sont représentées en moyenne \pm écart-type.

Plusieurs informations importantes quant à la biodistribution des micelles perfluorées ont pu être obtenues à partir du traitement des images TEP avec le logiciel PMOD. Dans un premier temps, une accumulation conséquente des micelles mixtes radiomarquées dans le foie et la rate a été mise en évidence et confirmée *ex vivo*. Ces résultats sont le reflet d'une prise en charge des micelles perfluorées par le système phagocytaire mononucléé. En effet, il a été décrit que les nanoparticules organiques telles que les micelles sont reconnues et prises en charge dans la circulation sanguine par le système phagocytaire mononucléé (anciennement appelé système réticulo-endothélial). Parmi les cellules impliquées dans ce phénomène, les cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie, ainsi que les macrophages résidents de la rate jouent un rôle prépondérant. Ainsi, durant leur passage au niveau hépatique, *via* la veine porte, les nanoparticules organiques sont généralement internalisées et séquestrées par les cellules de Kupffer. Les macrophages de la rate prennent aussi en charge les nanoparticules circulantes considérées comme des corps étrangers. Il a été prouvé que la taille des nanoparticules influait grandement sur leur reconnaissance par le système phagocytaire mononucléé. La plupart des travaux étudiant l'influence de la taille des nanoparticules sur la reconnaissance par le système phagocytaire mononucléé ont été menés sur des nanoparticules d'or pegylées, celles-ci représentant un modèle idéal car elles sont non toxiques et leur taille peut être facilement contrôlée par une modification des paramètres expérimentaux. Ainsi, Perrault *et al.* ont mis en évidence que l'accumulation au niveau du foie et de la rate était différente en fonction de la taille des nanoparticules. Les nanoparticules présentant des diamètres de 80 à 100 nm s'accumulent de manière plus importante au niveau du foie et de la rate que les plus petites nanoparticules (20 nm de diamètre)²²³. Plus récemment, les travaux de Poon *et al.* ont conclu à la même relation existant entre la prise en charge des nanoparticules par les cellules de Kupffer et leur taille²²⁴. Il est à noter que bien que la proportion de nanoparticules de petite taille prises en charge par le système phagocytaire mononucléé soit plus faible, elle n'en reste pas moins importante²²⁵. Ainsi, bien que les micelles perfluorées présentent une faible taille (~10 nm), une part non négligeable est tout de même prise en charge par les macrophages de la rate et du foie, permettant d'expliquer l'accumulation au niveau hépatique et splénique. La modification de la surface des micelles perfluorées *via* l'introduction du PEG et leur petite taille permettent une limitation de ce phénomène sans tout autant le supprimer totalement.

²²³ Perrault, S. D. *et al.*, *Nano Lett.*, **2009**, 9, 1909–1915

²²⁴ Poon, W. *et al.*, *ACS Nano*, **2019**, 13, 5785–5798

²²⁵ Zhang, G. *et al.*, *Biomaterials*, **2009**, 30, 1928–1936

Notons par ailleurs la présence au niveau hépatique d'un endothélium fenestré présentant des pores d'une centaine de nanomètres permettant le passage des petites nanoparticules vers l'espace de Disse. Une fois dans l'espace de Disse, les nanoparticules peuvent être prises en charge par les hépatocytes avant d'être évacuées *via* le canalicule biliaire dans les intestins et les fèces (fig. 51).

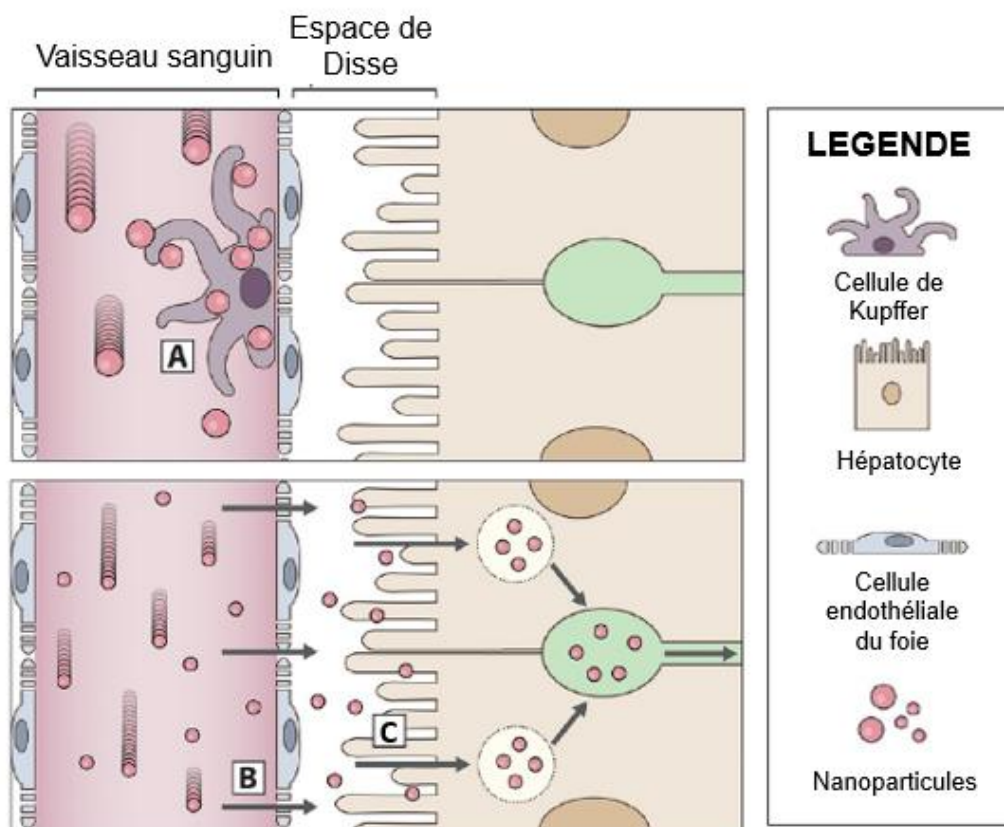


Figure 51. Prise en charge des nanoparticules par le foie. Figure adaptée de Poon *et al.*²²⁴ A: Prise en charge des grosses nanoparticules par les cellules de Kupffer B: Extravasation des petites nanoparticules à travers les pores de l'endothélium hépatique vers l'espace de Disse C: Internalisation des petites nanoparticules par les hépatocytes et évacuation dans le canalicule biliaire.

L'excrétion hépatobiliaire des nanoparticules organiques ou métalliques a déjà été décrite dans la littérature et une très grande disparité de temps d'élimination a été mise en évidence en fonction du matériau de la nanoparticule (organique, métallique...) et de sa taille, allant de quelques heures à plusieurs semaines²²⁶. Il a aussi été mis en évidence que la plupart des nanoparticules possédant des diamètres supérieurs à 6 nm, correspondant au seuil de filtration des pores présents dans les glomérules rénaux, subissent une prise en charge majoritairement hépatique et une excrétion hépatobiliaire²²⁷. Ainsi, l'accumulation hépatique observée par

²²⁶ Zhang, Y. N. *et al.*, *J. Control. Rel.*, **2016**, *240*, 332–348

²²⁷ Yu, M. *et al.*, *ACS Nano*, **2015**, *9*, 6655–6674

analyse des images TEP peut aussi laisser supposer une excrétion hépatobiliaire des micelles perfluorées. Afin de confirmer l'hypothèse d'une excrétion hépatobiliaire des micelles perfluorées, des VOI ont été réalisés au niveau des intestins chez trois souris et l'évolution du pourcentage de dose injectée présent au niveau des intestins en fonction du temps a été étudié (fig. 52). On note une accumulation maximale à 24 h des micelles perfluorées au niveau intestinal puis une élimination graduelle sur 7 jours avec encore $1,9 \pm 0,5$ % DI cm^{-3} dans les

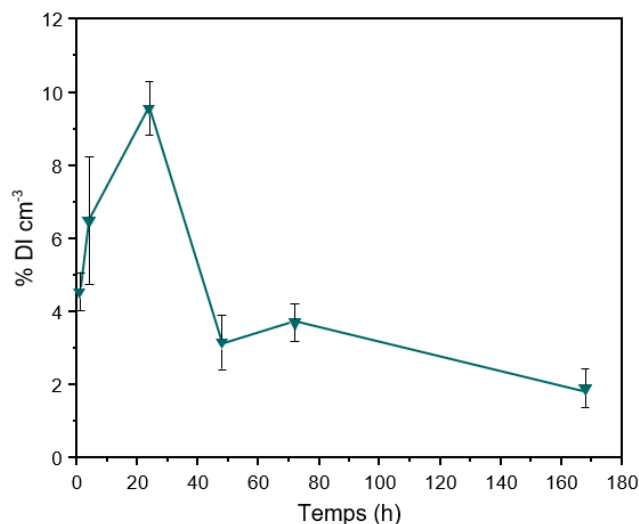


Figure 52. Évolution du pourcentage de dose injectée par unité de volume dans les intestins dérivée de l'analyse des images TEP à l'aide du logiciel PMOD. $n=3$ souris. Les données sont représentées en moyenne \pm écart-type.

intestins une semaine post-injection. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une excrétion hépatobiliaire des micelles perfluorées. Cependant, d'autres paramètres doivent être pris en compte avant de conclure de manière affirmée sur le mode d'excrétion des micelles perfluorées, comme la présence de radioactivité résiduelle dans les fèces ou encore une étude de la localisation intra-hépatique des micelles perfluorées.

Durant les premières heures d'étude (1 et 4 h post injection), on note une dose importante de micelles perfluorées radiomarquées présente dans le sang qui se reflète au sein des organes fortement irrigués tels que les reins, le cerveau ou encore les poumons tandis qu'à 24 h post injection, la majorité des micelles perfluorées a été éliminée de la circulation sanguine. La surveillance d'organes sains tels que le cœur ou les poumons permet, de plus, de quantifier l'accumulation non spécifique des micelles perfluorées radiomarquées au sein de tissus irrigués présentant une densité macrophagique importante.

La faible accumulation du signal au niveau des os ($1,4 \pm 0,07$ % DI cm^{-3} à 7 jours post-injection) traduit une stabilité de l'assemblage micellaire radiomarqué et, plus précisément, de l'association du zirconium 89 avec la desferrioxamine. En effet, comme expliqué précédemment, l'affinité du zirconium pour les cristaux d'hydroxyapatite induit une rétention du zirconium libre au niveau osseux. Une accumulation conséquente du signal radioactif dans les os est donc synonyme d'une instabilité du complexe ligand-radionucléide *in vivo*.

Au niveau tumoral, une accumulation des micelles perfluorées radiomarquées est observée avec un maximum à 24 h post injection ($7,1 \pm 0,7$ % DI cm^{-3}) (fig. 50.a). Cette accumulation est

strictement due à l'effet EPR, les micelles perfluorées ne présentant aucun autre système d'adressage à la tumeur. Cette proportion de nanoparticules au niveau tumoral est à mettre en perspective avec les exemples décrits dans la littérature pour les nanoparticules présentant des diamètres inférieurs à 100 nm. Par exemple, la biodistribution des nanoparticules AGuIX, nanoparticules à base de gadolinium de 5 nm de diamètre environ, utilisées en tant qu'agents radioamplificateurs et agents de contraste en IRM, a été évaluée par imagerie TEP *via* leur conjugaison à la desferrioxamine et chélation du zirconium 89. Une accumulation tumorale maximale 24 h post injection de l'ordre de 2 % DI g⁻¹ dans la tumeur a été mise en évidence chez des souris porteuses de xénogreffes de glioblastome humain *via* une étude de biodistribution *ex vivo*²²⁸. D'autres modalités de contrôle de l'accumulation des nanoparticules AGuIX comme l'IRM ont été utilisées sur divers modèles tumoraux et ont confirmé l'accumulation maximale des nanoparticules AGuIX 15 min post injection avec 2,3 ± 0,4 % DI *via* l'exploitation de l'effet EPR²²⁹. D'un autre côté, Cabral *et al.* en 2011 ont étudié le devenir et le potentiel anti-cancéreux de micelles polymériques de 30, 50, 70 et 100 nm de diamètre renfermant en leur cœur un cytotoxique à base de platine chez des souris porteuses de xénogreffes tumorales présentant des caractéristiques de vascularisation différentes influant sur l'effet EPR. Chez les souris porteuses de xénogreffes tumorales hyperperméables, une accumulation tumorale de l'ordre de 10 % DI g⁻¹ à 24 h post injection, indépendante de la taille des micelles, a été mesurée par analyse ICP-MS des tissus extraits. Chez les souris porteuses de xénogreffes hypoperméables, en revanche, la taille des nanoparticules s'est révélée avoir une influence importante, les micelles de 30 nm s'accumulant de manière quatre fois plus importante que les micelles de 70 et 100 nm²³⁰. Dans une autre étude, des chercheurs ont évalué la biodistribution de copolymères de 31 et 65 kDa *via* un radiomarquage à l'iode 131 et quantification *ex vivo* chez des souris porteuses d'adénocarcinome murin. Ils ont pu mettre en avant une accumulation tumorale passive plus importante pour le copolymère de 65 kDa que pour celui de 31 kDa, avec 0,9 ± 0,2 % DI g⁻¹ au niveau tumoral à 24 h, atteignant 1,4 ± 0,3 % DI g⁻¹ à 168 h²³¹. À la lumière des exemples précédents, il apparaît évident qu'il existe des variations considérables de l'effet EPR en fonction de la lignée tumorale considérée, du type de particules, mais également en fonction de la technique de quantification de l'accumulation nanoparticulaire utilisée (TEP, scintigraphie,

²²⁸ Truillet, C. *et al.*, *Mol. Pharm.*, **2016**, *13*, 2596–2601

²²⁹ Bort, G. *et al.*, *Theranostics*, **2020**, *10*, 1319–1331

²³⁰ Cabral, H. *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, **2011**, *6*, 815–823

²³¹ Lammers, T. *et al.*, *J. Control. Release*, **2005**, *110*, 103–118

IRM, ICP-MS)²³². Enfin, une méta-analyse des données de biodistribution de nanoparticules décrites dans la littérature entre 2005 et 2015 a pu mettre en avant une accumulation tumorale passive médiane de 0,6 % de la dose injectée sur un panel de 175 études²³³. Il apparaît donc que l'accumulation tumorale élevée à 24 h des micelles perfluorées par exploitation de l'effet EPR (~ 7 % DI cm⁻³) constitue un résultat très encourageant, permettant d'espérer une oxygénation suffisante/significative des cellules tumorales et d'envisager de manière raisonnable un traitement *in vivo* complémentaire de la radiothérapie.

À partir de ces données, les ratios tumeur/sang et tumeur/muscle (rapport entre la fraction de

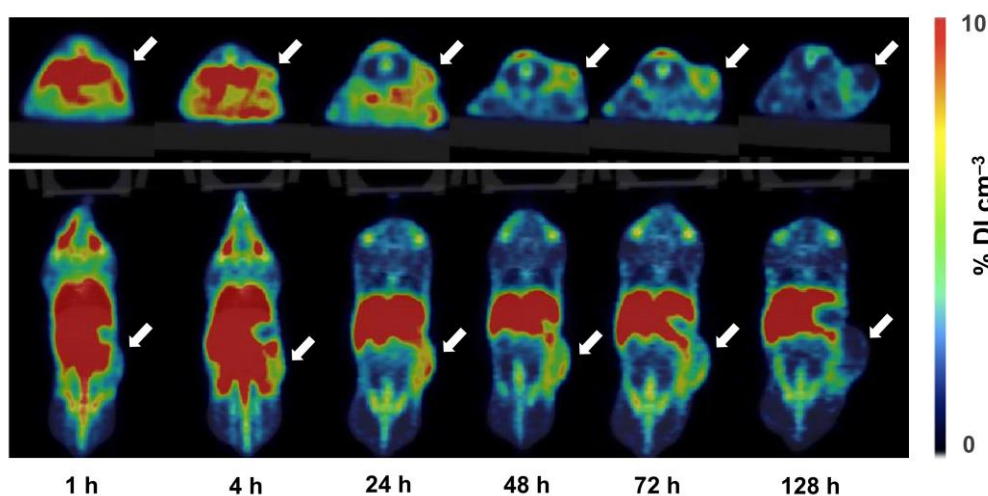


Figure 53. Images TEP d'une souris injectée radiomarquée au ⁸⁹Zr. La flèche blanche indique l

dose injectée retrouvée par unité de volume de tissu tumoral et la fraction de dose injectée retrouvée par unité de volume sanguin ou de tissu musculaire) ont pu être établis et sont reportés sur la figure 54. En ce qui concerne le ratio tumeur/muscle, permettant de mettre en évidence l'accumulation préférentielle des micelles perfluorées au niveau tumoral par rapport aux tissus sains (muscle), on note l'atteinte d'un plateau à partir de 24 h post injection qui persiste jusqu'à 72 h

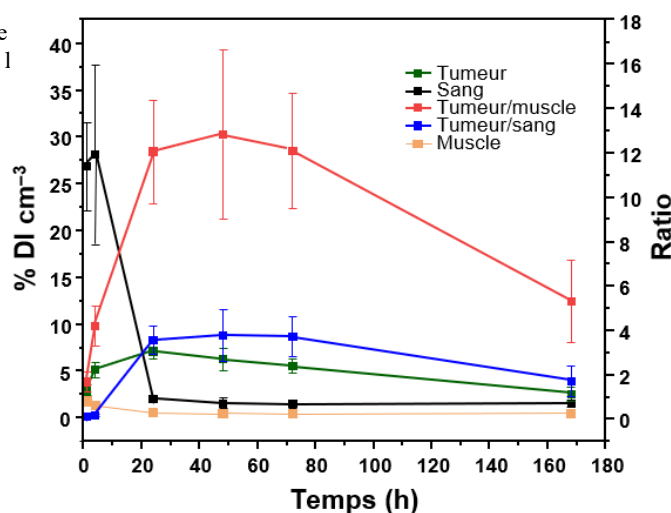


Figure 54. Évolution des ratios tumeur/muscle et tumeur/sang au cours du temps. Évolution du pourcentage de dose injectée par unité de volume dans la tumeur et dans le sang au cours du temps. Les données sont représentées en moyenne ± écart-type.

²³² Dasgupta, A. *et al.*, *Theranostics*, **2020**, *10*, 956–967

²³³ Wihelm, S. *et al.*, *Nat. Rev. Mater.*, **2016**, *1*, 16014

post injection. Le ratio tumeur/sang, quant à lui, augmente drastiquement de 4 à 24 h post injection puis atteint un plateau de 24 à 72 h post injection et diminue ensuite doucement, reflétant une élimination progressive des objets depuis la tumeur. Ces informations sont importantes afin d'établir un protocole de traitement dans le cadre d'une administration des micelles perfluorées avant une exposition aux rayonnements ionisants. Au vu des résultats, une administration de micelles perfluorées par voie intraveineuse 24 h avant traitement par rayonnements ionisants permettrait une accumulation maximale au niveau tumoral tout en limitant l'accumulation au niveau des tissus sains (ratio tumeur/muscle : $12,1 \pm 2,3$).

Afin de confirmer la présence de radioactivité au niveau tumoral et d'évaluer la distribution dans le tissu des micelles perfluorées radiomarquées, une autoradiographie de tumeurs reséquées à 24 et 48 h post injection a été réalisée (fig. 55.a et 55.c, respectivement). Une coloration à l'hématoxyline éosine a été réalisée sur les lames autoradiographiées afin de mettre en évidence le

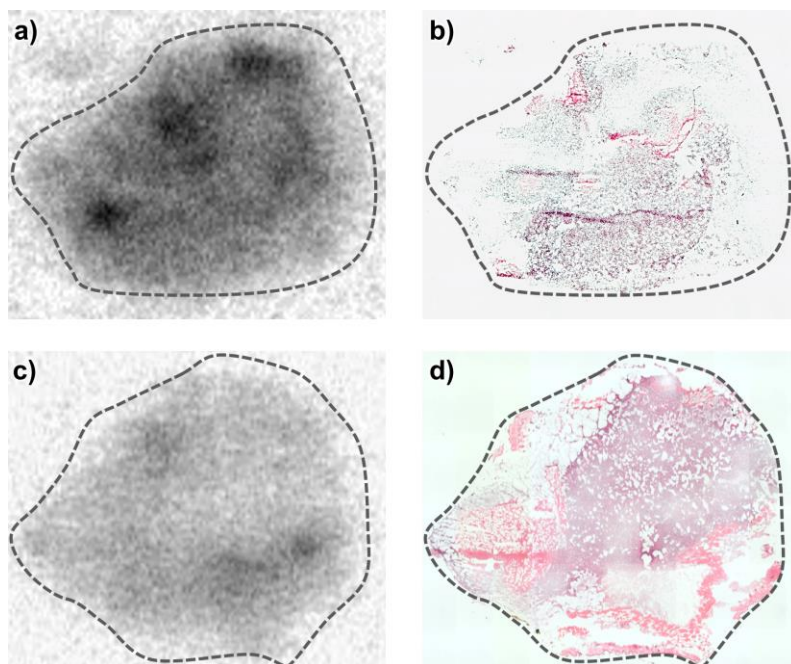


Figure 55. Autoradiographie (a, c) et coupes H&E (b, d) de sections tumorales de 5 μm à 24 (a, b) et 48 h (c, d) post-injection.

stroma tumoral (fig. 55.b et fig. 55.d). On note, 24 h post injection, une présence importante de radioactivité au niveau tumoral avec une distribution homogène au sein du stroma tumoral. Ce signal radioactif persiste à 48 h, quoique plus faible, permettant de confirmer l'accumulation tumorale initialement observée par imagerie TEP.

Durant cette étude de biodistribution, une accumulation tumorale des micelles perfluorées par simple exploitation de l'effet EPR a été mise en évidence avec un maximum à 24 h ($7,1 \pm 0,7 \% \text{ DI cm}^{-3}$). De plus, le profil de distribution des micelles perfluorées au sein de l'organisme de la souris a aussi pu être obtenu par analyse des images dérivées du TEP. Outre l'accumulation au niveau tumoral, une rétention des micelles perfluorées au niveau du foie et de la rate a été mise en évidence, jusqu'à 7 jours post-injection. La connaissance du profil de

distribution des micelles perfluorées est essentielle pour considérer l'évaluation de l'efficacité thérapeutique *in vivo*.

G. Détermination des paramètres pharmacocinétiques des micelles perfluorées

Comme énoncé précédemment, l'exploitation de l'imagerie TEP peut permettre d'accéder aux données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des objets radiomarqués²³⁴. Cette technique d'imagerie hautement quantitative apporte des informations précieuses quant au profil pharmacocinétique de l'objet radiomarqué (*e.g.* anticorps, nanoparticule, peptide, petite molécule). La TAC (pour *Time Activity Curve*) du radionanligand dans le plasma, extraite par imagerie TEP, démontre l'existence de deux tendances, l'une sur les temps courts et l'autre sur les temps longs (fig. 56). Le signal détecté sur les temps longs, très faible, laisse suggérer une contribution du zirconium libre ou zirconium complexé à la DFO circulant dans le sang et non une contribution du signal lié aux micelles. Sur les temps courts (< 24 h), l'activité plasmatique liée au ⁸⁹Zr pris en charge par les micelles perfluorées peut être extraite et extrapolée afin d'obtenir les paramètres pharmacocinétiques propres aux vecteurs.

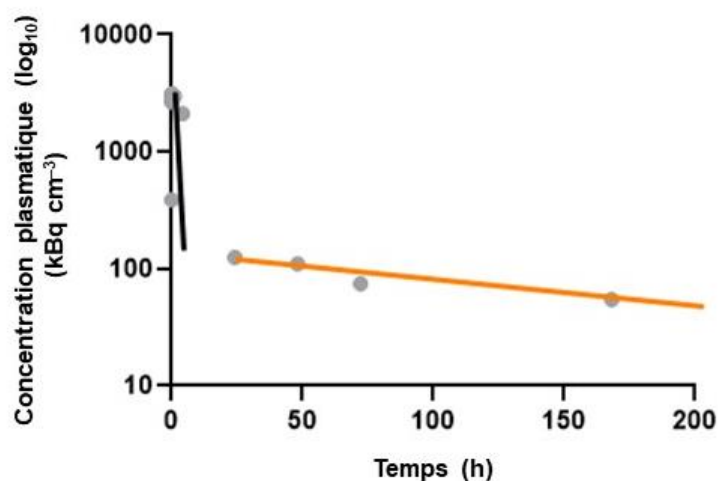


Figure 56. TAC plasmatique des micelles perfluorées radiomarquées extraite par imagerie TEP en Log10.

Plusieurs modèles pharmacocinétiques ont été développés afin de décrire le devenir de molécules ou de particules dans l'organisme tels que le modèle mono-compartmental, le modèle bi-compartmental ou le modèle non compartmental²³⁵. Tandis que les deux premiers modèles sont basés sur des hypothèses compartimentales, considérant donc l'organisme comme une suite de compartiments (compartiment central plasmatique et compartiments

²³⁴ Gupta, N. *et al.*, *Eur. J. Cancer*, **2002**, *38*, 2094–2107

²³⁵ Dhillon, S. *et al.*, *Basic Pharmacokinetics in Clinical pharmacokinetics*, Edition Pharmaceutical Press, London, **2006**, 44 pages

périphériques), le modèle non compartimental permet de s'affranchir des hypothèses initiales et d'accéder rapidement au degré d'exposition de l'organisme à l'objet étudié suite à son administration par voie intraveineuse. En effet, le modèle non compartimental considère la courbe de la concentration plasmatique en fonction du temps comme une distribution statistique et utilise donc seulement l'aire sous la courbe pour estimer les différents paramètres pharmacocinétiques²³⁶. Dans ce type d'analyse non compartimentale, afin d'estimer l'aire sous la courbe, la méthode des trapèzes est couramment utilisée²³⁷. Ainsi, l'obtention de l'aire sous la courbe (AUC pour *Area Under Curve*) et l'extrapolation de cette AUC à l'infini permet le calcul des paramètres pharmacocinétiques classiques. De plus, l'analyse non compartimentale offre la possibilité d'optimiser ultérieurement le modèle pharmacocinétique de la molécule/particule pour mieux l'adapter aux données expérimentales obtenues²³⁸. L'analyse non compartimentale apparaît dès lors comme une méthode rapide et efficace pour la détermination des paramètres pharmacocinétiques tels que le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) et le volume de distribution apparent (V_d).

Ces paramètres permettent de caractériser au mieux le comportement des particules *in vivo*. Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) correspond au temps nécessaire pour que la concentration plasmatique soit réduite de 50 % tandis que le volume de distribution apparent représente la propension des objets à se distribuer dans les tissus périphériques. Le volume de distribution V_d peut être considéré comme une constante de proportionnalité reliant la quantité de nanoparticules au sein de l'organisme entier à la concentration plasmatique de nanoparticules à un moment donné²³⁹. Ainsi, un faible V_d est le reflet d'un confinement des nanoparticules dans le compartiment plasmatique induisant dès lors un temps de résidence dans la circulation sanguine important. Il est donc préférable dans le cas d'une nanoparticule exploitant seulement l'effet EPR de présenter un volume de distribution faible, entraînant un temps dans la circulation sanguine conséquent et permettant une accumulation au niveau tumoral plus importante.

En réalisant une analyse non compartimentale des données de biodistribution des micelles perfluorées, leurs paramètres pharmacocinétiques ont pu être calculés (*cf.* Annexe 2). Un temps de demi vie des micelles perfluorées de $4,53 \pm 1,18$ h ainsi qu'un volume de distribution de $0,12 \pm 0,04$ mL ont ainsi pu être mis en évidence.

²³⁶ Gabrielsson, J. *et al.*, Computational Toxicology: Volume I, Methods in Molecular Biology, vol. 929, Springer Science, **2012**

²³⁷ Curry, S. H. *et al.*, Introduction to Drug Disposition and Pharmacokinetics, First Edition, John Wiley & Sons, **2017**

²³⁸ Noe, D. A. *et al.*, *Clin. Pharm. Drug. Dev.*, **2020**, 9, S35

²³⁹ Toutain, P. L. *et al.*, *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **2004**, 27, 441–453

Le temps de demi-vie peut être directement relié à l'élimination des micelles du sang par le système phagocytaire mononucléé. Dès lors, les systèmes nanoparticulaires présentant des temps de demi-vie longs sont capables de contourner le système phagocytaire mononucléé induisant, *de facto*, une augmentation du temps de résidence dans la circulation sanguine. Par exemple, une étude de Magaña *et al.* ont mis en évidence l'influence du système phagocytaire mononucléé sur le temps de demi-vie de nanobâtonnets d'or (8×24 nm) présentant un revêtement PEG²⁴⁰. L'équipe a pu conclure que lorsque le système phagocytaire mononucléé est inhibé par des agents de blocage tels que le λ -carraghénane, le temps de demi-vie des nanoparticules d'or était augmenté ($t_{1/2} = 5,97 \pm 0,88$ h pour le groupe traité par l'inhibiteur du système phagocytaire hépatique en amont de l'administration de nano-bâtonnets d'or contre $t_{1/2} = 2,33 \pm 0,32$ h pour le groupe contrôle). D'autres techniques permettent d'échapper au système phagocytaire mononucléé telles que l'introduction à la surface nanoparticulaire de PEG, connu pour induire une limitation du phénomène d'adsorption des protéines circulantes⁸⁴. Plusieurs exemples de nanoparticules métalliques présentant un revêtement PEG sont recensés dans la littérature et leurs propriétés pharmacocinétiques ont été déterminées. Des temps de demi-vie entre 4 et 7 h ont ainsi été décrits pour ces nanoparticules inorganiques recouvertes de PEG²⁴¹. D'autres revêtements surfaciques comme le dextran par exemple peuvent conférer des propriétés de furtivité aux nanoparticules. Ainsi, des nanoparticules d'or sphériques de 20 nm de diamètre possédant un revêtement dextran, identifié depuis longtemps comme capable de limiter la reconnaissance par le système phagocytaire mononucléé²⁴², ont été développées par Bailly *et al.*²⁴³. Le groupe de recherche a pu mettre en avant un temps de demi-vie des nanoparticules d'or de 5,13 h.

Certains travaux ont, quant à eux, mis en évidence l'impact de la charge de surface sur le profil pharmacocinétique des nanoparticules. En ce sens, Arvizo *et al.* ont en effet étudié le comportement des plusieurs nanoparticules d'or sphériques possédant le même rayon hydrodynamique (*ca.* 10 nm) mais présentant des revêtements surfaciques différents (tétraéthylène glycol neutre, cationique, anionique et zwitterionique)²⁴⁴. L'équipe a ainsi pu démontrer que les nanoparticules présentant une charge surfacique anionique possédaient un temps de demi-vie plus court que leurs homologues neutres possédant une surface tétraéthylène glycol neutre ou zwitterionique ($t_{1/2} = 0,30$ h contre $t_{1/2} = 5,07$ h ou $t_{1/2} = 3,82$ h, respectivement).

²⁴⁰ Magaña, I. B. *et al.*, *Ther. Deliv.*, **2015**, 6, 777–783

²⁴¹ Yu, M. *et al.*, *ACS Nano.*, **2015**, 9, 6655–6674

²⁴² Amoozgar, Z. *et al.*, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, **2012**, 4, 219–233

²⁴³ Bailly, A-L. *et al.*, *Sci. Rep.*, **2019**, 9, 12890

²⁴⁴ Arvizo, R. R. *et al.*, *PLOS One*, **2011**, 6, e24374

Ceci met en exergue l'influence de la charge de surface des nanoparticules sur leur élimination du compartiment sanguin. De plus, les auteurs ont pu relier le temps de résidence dans la circulation sanguine des nanoparticules avec leur accumulation tumorale et ont pu conclure que plus le temps de demi-vie était important, plus l'accumulation tumorale des nanoparticules était accrue. Cette relation entre le temps de demi-vie et l'accumulation tumorale par effet EPR a déjà été décrite dans la littérature²²³.

Au vu des exemples cités ci-dessus, les micelles perfluorées présentent un temps de demi-vie cohérent avec les systèmes nanoparticulaires déjà décrits dans la littérature. En effet, la présence du PEG 2000 à la surface de nos micelles induit un temps de demi-vie conséquent, s'expliquant par la limitation de la reconnaissance par le système phagocytaire mononucléé et l'absence de charge surfacique. Il est important tout de même de noter que d'autres exemples de nanoparticules (principalement inorganiques) ont été décrits dans la littérature comme possédant un temps de demi-vie bien plus important que celui des micelles perfluorées²⁴⁵.

La faible valeur du volume de distribution des micelles perfluorées ($V_d = 0,12$ mL) est le reflet d'une importante rétention dans le compartiment sanguin. En comparaison, des nanoparticules d'or de 13 nm de diamètre revêtues de PEG 5000 ont été décrites dans la littérature comme présentant un volume de distribution d'environ 20 mL. Des volumes de distribution bien plus élevés ont aussi été mis en évidence pour d'autres nanoparticules d'or²⁴³. La résidence prolongée des micelles perfluorées dans le compartiment sanguin, mise en évidence par leur faible V_d , permet une extravasation importante au niveau de la tumeur par effet EPR, en accord avec la forte accumulation tumorale des objets ($7,12 \pm 0,74$ % DI cm^{-3}), observée par imagerie TEP 24 h post-injection.

Ainsi, les micelles perfluorées présentent une demi vie plasmatique permettant leur élimination rapide du compartiment sanguin et compatible avec une accumulation tumorale efficace. La faible valeur du volume de distribution peut expliquer l'accumulation importante observée au niveau tumoral, les micelles perfluorées étant majoritairement présentes dans l'organisme au niveau plasmatique, favorisant dès lors leur ciblage tumoral par effet EPR.

IV. Conclusion de chapitre

Dans ce chapitre nous avons mis au point la synthèse multi-étape d'un amphiphile perfluoré présentant une tête polaire desferrioxamine permettant la chélation du zirconium 89 afin

²⁴⁵ Lin, Z. *et al.*, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, **2015**, 7, 189–217

d'obtenir des informations quant à la biodistribution des micelles perfluorées au sein de l'organisme. L'amphiphile PFTD-DFO obtenu a été efficacement intégré à des micelles PFTD-PEG et a permis l'obtention de micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 stables en milieu aqueux. Les micelles mixtes ainsi formulées n'ont montré aucune cytotoxicité dans la lignée cellulaire B16F10 considérée et la validation de la tolérance des souris C57BL/6 saines vis-à-vis d'une injection intraveineuse de micelles perfluorées a permis de valider la transition vers une évaluation *in vivo*. Les micelles mixtes ont, par la suite, été radiomarquées efficacement au ^{89}Zr avec un rendement de radiomarquage supérieur à 90 %. Une fois radiomarquées, l'injection intraveineuse des micelles mixtes sur souris C57BL/6 porteuses d'allogreffes orthotopiques de mélanome (B16F10) a permis d'obtenir des images TEP résolues à différents temps (1 h, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 7 jours post-injection). L'analyse de ces images a permis d'extraire les données de biodistribution des micelles perfluorées au sein des organes principaux. Ainsi, on note, tout d'abord, une accumulation hépatique avec un maximum à 48 h ($36,3 \pm 4,9 \%$ DI cm^{-3}) et au niveau de la rate avec un maximum à 4 h ($11,4 \pm 2,3 \%$ DI cm^{-3}). Ceci traduit une prise en charge des micelles perfluorées par le système phagocytaire mononucléé. Au niveau hépatique, une diminution de la dose sur les derniers jours d'étude ($24,7 \pm 3,9 \%$ DI cm^{-3} au septième jour), suggère l'existence d'un phénomène d'élimination hépatobiliaire. La présence de micelles perfluorées radiomarquées au niveau intestinal ($9,6 \pm 0,7 \%$ DI cm^{-3} à 24 h post-injection et encore $1,9 \pm 0,5 \%$ DI cm^{-3} au septième jour) conforte l'hypothèse d'une excrétion hépatobiliaire des micelles perfluorées. D'autres études, plus poussées, pourraient être intéressantes afin de confirmer la voie d'excrétion des micelles.

L'accumulation tumorale des micelles perfluorées a été démontrée par analyse des images TEP avec $7,1 \pm 0,7 \%$ DI cm^{-3} à 24 h post injection et une rétention des micelles perfluorées au niveau tumoral jusqu'à 7 jours post injection ($2,5 \pm 0,8 \%$ DI cm^{-3}). Ces résultats d'accumulation passive se situent dans la moyenne supérieure des valeurs d'accumulation tumorale par effet EPR décrites dans la littérature et permettent de valider l'utilisation future des micelles perfluorées *in vivo* en tant qu'agent de radiosensibilisation sur souris porteuses d'allogreffes de tumeurs B16F10.

Chapitre 3

Les nanoparticules d’or comme agent de radioamplification

I. Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules d’or

Les nanoparticules d’or possèdent des propriétés intrinsèques particulières, différentes de celles du métal macroscopique. Suite à une exposition à la lumière, le champ électromagnétique lumineux induit une oscillation cohérente collective des électrons situés dans la bande de conduction de la nanoparticule d’or. Il se crée dès lors à la surface du nanomatériau une dissociation des charges, induisant la formation d’un moment dipolaire. Le phénomène d’oscillation atteint une amplitude maximale à une fréquence nommée résonance de plasmon de surface²⁴⁶. Ce phénomène appelé **effet SPR** (*Surface Plasmon Resonance*) n’est possible que si la taille de la nanoparticule est plus faible que la longueur d’onde incidente. Ceci induit une absorption importante de la lumière et est caractérisé par des bandes d’absorption particulières appelées bandes plasmon.

Dans le cas de nanoparticules sphériques, une seule bande plasmon est observée dans le domaine UV-visible Cette bande plasmon se décale vers des longueurs d’onde plus élevées quand le diamètre moyen de la nanoparticule augmente ($\sim \lambda_{\max} = 520$ nm pour une nanosphère d’or d’une dizaine de nm)²⁴⁷. Les nano-bâtonnets d’or, quant à eux, présentent deux bandes plasmon caractéristiques. En effet, les électrons à la surface des nano-bâtonnets d’or peuvent osciller le long d’un axe longitudinal et transversal, à l’origine d’une bande d’absorption dans le proche infrarouge et d’une bande d’absorption dans l’UV-visible, respectivement²⁴⁸. Les nano-étoiles, nano-cubes, nano-cages et nanocristaux d’or présentent eux-aussi une bande d’absorption dans le domaine du proche infrarouge. La largeur et la longueur d’onde maximale de cette bande d’absorption est dépendante de la forme et de la taille de ces nanomatériaux. La capacité d’absorption de ces nanomatériaux dans le proche infrarouge s’avère d’une grande utilité en thérapeutique étant donné que les tissus biologiques n’absorbent que très peu dans le domaine du proche infrarouge (650 – 1300 nm).

La taille, la forme et la structure interne des nanoparticules d’or peuvent aussi avoir une influence sur leurs propriétés radiatives et non radiatives. En effet, la nanoparticule d’or, après illumination, peut soit absorber la lumière incidente (voie non radiative) soit diffuser cette lumière (voie radiative). Dès lors, chaque nanoparticule est caractérisée par une section efficace d’absorption et une section efficace de diffusion, qui correspondent, respectivement, à la propension d’une nanoparticule à absorber l’énergie lumineuse incidente ou à diffuser la

²⁴⁶ Huang, X. *et al.*, *J. Adv. Res.*, **2010**, *1*, 13–28

²⁴⁷ Link, S. *et al.*, *J. Phys. Chem. B.*, **1999**, *103*, 4212–4217

²⁴⁸ Liu, X. Y. *et al.*, *Drug Discov.*, **2021**, *26*, 1284–1292

lumière. Il est important de noter que la probabilité d’absorption de la lumière est un paramètre essentiel pour la plupart des applications théranostiques des nanoparticules d’or comme la thérapie photothermique ou l’imagerie photoacoustique. La facilité d’optimisation de ce dernier paramètre *via* la modification de la taille et de la forme des nanoparticules d’or a donc permis le développement d’outils thérapeutiques toujours plus performants.

En **thérapie photothermique**, le phénomène SPR des nanoparticules d’or est largement exploité afin de lutter contre la croissance tumorale. En effet, la nanoparticule d’or est irradiée par un laser infrarouge à proximité de la tumeur. Le recours au laser infrarouge permet un traitement des tumeurs en profondeur et n’induit pas de cytotoxicité additionnelle. En fonction de la taille et de la forme de la nanoparticule, l’énergie lumineuse est absorbée et est convertie en énergie thermique. Ce phénomène induit une élévation locale de la température ce qui provoque la mort des cellules tumorales environnantes par hyperthermie. Ainsi, les nanoparticules d’or présentant un maximum d’absorption dans le domaine du proche infrarouge et une efficacité de conversion photothermique importante sont de très bons candidats pour la thérapie photothermique. Dans ce domaine, les nano-bâtonnets d’or, les nano-cages, les nano-coquilles et les nano-étoiles ont prouvé une efficacité thérapeutique sur plusieurs types de cancer²⁴⁹.

Les nanoparticules d’or peuvent aussi servir d’agent diagnostique en imagerie photoacoustique. L’**imagerie photoacoustique** repose sur l’effet photoacoustique. L’effet photoacoustique est un phénomène physique qui se produit dans tout milieu matériel absorbant une radiation électromagnétique. L’imagerie photoacoustique s’appuie donc sur l’interaction entre la lumière d’un laser et le milieu environnant. Une partie de l’énergie émise par le laser est convertie en chaleur, entraînant un régime transitoire thermoélastique et produisant l’émission d’ultrasons. Les ultrasons générés sont alors mesurés par un transducteur ultrasonore, puis analysés dans le but de générer des images résolues. Ainsi, les propriétés plasmoniques des nanoparticules d’or peuvent être exploitées pour la construction d’agents de contraste efficaces en imagerie photoacoustique. En effet, tout comme dans le cas de la thérapie photothermique, certaines nanoparticules d’or sont capables d’absorber l’énergie incidente du laser et de restituer une partie de cette énergie sous forme de chaleur, générant dès lors une onde acoustique, permettant d’obtenir un contraste tissulaire au point d’accumulation de la nanoparticule sur l’image reconstruite. Il est important de noter que les nanoparticules d’or utilisées pour cette application

²⁴⁹ Riley, S. R. *et al.*, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, **2017**, e1449

doivent, elles aussi, présenter un maximum d’absorption dans le domaine spectral du proche infrarouge, permettant une pénétration en profondeur de la lumière dans les tissus et limitant l’impact sur les tissus qu’elle traverse. De plus, les nanoparticules d’or utilisées doivent, comme dans le cas de la thérapie photothermique, présenter une section efficace d’absorption élevée et une efficacité de conversion photothermique conséquente. Ainsi, les nano-bâtonnets, les nano-coquilles et les nano-cages d’or ont été sélectionnés sur la base des critères énumérés précédemment et ont prouvé leur efficacité en tant qu’agents de contraste photostables en imagerie photoacoustique²⁵⁰.

Toujours dans une visée diagnostique, les nanoparticules d’or ont été identifiées comme de potentiels **agents de contraste en imagerie par rayons X ou tomographie**. Cette technique d’imagerie non invasive repose sur la transmission d’un rayon X incident à travers les tissus mous de l’organisme. Une fois produits, les rayons X traversent l’organisme et interagissent avec la matière. En interagissant avec la matière, les photons des rayons X peuvent soit être absorbés soit déviés par celle-ci. La somme de ces 2 phénomènes distincts conduit à l’atténuation de l’intensité du rayonnement incident. Cette atténuation de l’intensité incidente est régie par la loi de Beer-Lambert telle que :

$$I_{\text{transmise}} = I_0 e^{-\mu x / \rho} \quad (\text{Eq.7})$$

Avec I_0 l’intensité initiale du faisceau de rayons X, μ le coefficient d’atténuation linéaire aux rayons X (cm^{-1}) des tissus ou du matériau, x l’épaisseur du tissu ou du matériau et ρ sa densité (g cm^{-3}).

Ainsi, en fonction de la densité du matériau, le faisceau de rayons X sera plus ou moins transmis. En effet, les tissus denses tels que les tissus osseux absorbent les rayons X tandis que les tissus mous, peu denses, comme les poumons ou les muscles, laissent passer les rayons X sans les atténuer. En résulte donc un contraste différent pour ces tissus.

Une des limitations à l’utilisation de l’imagerie par rayons X est le faible rapport signal/bruit lié aux capacités d’atténuation limitées des tissus mous. Dès lors, il n’existe qu’une différence de contraste faible entre les différents tissus imagés. Ainsi, influencer sur le contraste de cette technique permettrait d’améliorer sa résolution et son efficacité en tant qu’imagerie diagnostique. De ce fait, le recours à des matériaux denses présentant un coefficient d’atténuation massique important a été envisagé afin d’améliorer le rapport signal/bruit et

²⁵⁰ Li, W. *et al.*, *Nanomedicine (Lond)*, **2015**, *10*, 299–320

augmenter le contraste sur l’image reconstruite. Il est important de noter que le coefficient massique d’atténuation μ est d’autant plus important que le numéro atomique du matériau est élevé²⁵¹. Ainsi, les nanoparticules d’or ($Z_{Au} = 79$) sont apparues comme un moyen potentiel d’amélioration du contraste en imagerie par rayons X et ont prouvé leur efficacité dans plusieurs modèles précliniques²⁵². La diversité de fonctionnalisation de surface de ces nanoparticules d’or permet de cibler spécifiquement le tissu à contraster en imagerie.

En plus de l’effet plasmon, les nanoparticules d’or présentent d’autres propriétés remarquables. En effet, à l’échelle nanométrique, le matériau est bien différent de l’or macroscopique. Ainsi, plus la taille de la nanoparticule d’or diminue, plus sa surface spécifique, c’est-à-dire la quantité d’atomes exposés à la surface du matériau augmente. Le **ratio surface spécifique/volume**, quant à lui, augmente. Ce dernier paramètre influe grandement sur les propriétés des nanoparticules et correspond à la proportion d’atomes exposés comparativement aux atomes au cœur de la nanoparticule. Ainsi, les nanoparticules d’or présentant un ratio surface spécifique/volume élevé peuvent être de très bons candidats pour des applications en catalyse, par exemple.

Les nanoparticules d’or possèdent des caractéristiques intrinsèques particulières qui peuvent être exploitées dans divers domaines allant de l’imagerie diagnostique à la thérapie photothermique. Tandis que les nanoparticules d’or principalement utilisées dans ces domaines sont sous forme de nano-bâtonnets, nano-cages ou nano-coquilles, nous nous intéresserons dans la suite de ce manuscrit aux nanoparticules d’or sphériques.

A. Voies de synthèse des nanoparticules d’or sphériques

1. Diagramme de LaMer

La formation de nanoparticules d’or est régie par des paramètres cinétiques et thermodynamiques et a été modélisée par le diagramme de LaMer. Ce modèle a été développé afin de rationaliser la formation de nanoparticules monodisperses en solution²⁵³. Dans ce modèle, la synthèse de nanoparticules est divisée en trois grandes étapes :

- *Nucléation* : Il s’agit d’un processus pendant lequel il y a formation spontanée de germes d’atomes dans une phase liquide sursaturée. Les noyaux/germes ainsi formés servent de modèle et support à la croissance cristalline de la nanoparticule. Si la nucléation n’est

²⁵¹ Ahn, S. *et al.*, *Molecules*, **2013**, *18*, 5858–5890

²⁵² Cole, L. E. *et al.*, *Nanomedicine (Lond)*, **2015**, *10*, 321–341

²⁵³ Whitehead, C. B. *et al.*, *Mater. Adv.*, **2021**, *2*, 186

pas facilitée autour de certains défauts (impuretés, bulles, interface préexistant...), elle est dite homogène. Cette étape de germination peut être expliquée par la théorie classique de nucléation largement utilisée de nos jours pour expliquer les phénomènes de cristallisation. Dans cette théorie, le germe en formation est approximé à une sphère de rayon r et on considère qu'il possède les mêmes propriétés que le matériau macroscopique (densité...). La formation de la phase stable (germe) à partir de la solution métastable se fait par l'apparition de noyaux solides. Cette transition a un coût énergétique puisqu'elle nécessite la formation d'une interface entre le solide et le liquide. Les petits germes possédant un rapport surface sur volume important vont donc avoir tendance à disparaître. Seuls les noyaux atteignant un rayon suffisant vont survivre, le gain énergétique de la formation d'un volume donné de la phase stable (germe) étant plus important que le coût payé pour la génération de l'interface.

Si l'on considère le système d'un point de vue thermodynamique, l'enthalpie libre du germe peut être considérée comme la somme de l'énergie libre de Gibbs de surface (liée à la création d'une interface entre le germe et le solvant) et de l'énergie libre volumique du germe, induite par la formation d'un nouveau volume ou d'une nouvelle phase dans le solvant. Ainsi, l'énergie libre du système est fortement dépendante de la taille du germe et plus particulièrement de son rayon r étant donné que pour de faibles valeurs de r on observe une grande énergie de surface liée à l'augmentation de la surface spécifique. En effet, l'énergie libre du système entier atteint un maximum quand le rayon de la sphère correspond au rayon critique r^* qui équivaut à la taille minimale qu'un germe doit posséder pour survivre en solution sans être re-dissous. Ainsi, si la barrière énergétique de nucléation est dépassée, il y a formation spontanée d'un germe et sa croissance est favorisée thermodynamiquement.

- *Croissance* : S'il y a formation d'un germe stable, toute augmentation de sa taille résultera en une diminution de son énergie libre par diminution de sa surface spécifique. Ainsi, il convient de prendre en compte différents paramètres que sont la capacité de diffusion des monomères à la surface du germe et leur potentiel d'incorporation au sein du germe induisant la croissance de ce dernier. Dès lors, on observe une chute de la concentration de monomères en solution due à leur incorporation au sein des nanocristaux. En-deçà d'une certaine concentration de monomères en solution, on n'observe plus qu'une croissance limitée voire un arrêt de la croissance lié à l'absence de monomères disponibles. Ainsi, plus la concentration en monomères dans la solution est importante, plus les particules vont croître rapidement.

- *Mûrissement* : Une fois la concentration en monomères stabilisée, on observe un phénomène de coalescence des nanoparticules formées. En effet, les petites nanoparticules présentant un rapport surface/volume important fusionnent avec de plus grosses nanoparticules, diminuant alors l’énergie interfaciale du système. Ce phénomène irréversible est appelé mûrissement d’Ostwald. On a donc croissance des nanoparticules en taille sans modification de la concentration de monomères en solution.

Ainsi, l’optimisation des paramètres de synthèse tels que la concentration en précurseur métallique et le temps de réaction peuvent influencer grandement sur la formation de nanoparticules et leur aspect final. Les procédés de synthèse des nanoparticules d’or permettent un contrôle précis de leur taille, de leur forme et de leur chimie de surface. La synthèse des nanoparticules d’or peut se diviser en trois étapes distinctes : la synthèse chimique de la nanoparticule, l’introduction de ligands de surface permettant la stabilisation du nanosystème et enfin la fonctionnalisation de la surface afin d’améliorer le ciblage ou la rétention dans l’organisme de la nanoparticule. En ce qui concerne l’obtention de nanoparticules d’or par voie chimique, on recense deux grandes voies de synthèse : la synthèse de Turkevich et la synthèse de Brust-Schiffrin.

2. Synthèse de Turkevich

La réduction de l’acide chloraurique par le citrate de sodium en conditions aqueuses a été décrite par Turkevich en 1951 et a permis l’obtention de nanoparticules d’or monodisperses stables en solution. Il s’agit d’une méthode simple et efficace pour obtenir de l’or colloïdal en phase aqueuse et cette technique constitue encore une référence dans le domaine. Le citrate de sodium joue le rôle d’agent réducteur mais aussi de stabilisant. En effet, en s’adsorbant à la surface des nanoparticules d’or, les molécules de citrate de sodium créent une couche de protection chargée négativement. Les phénomènes de répulsion électrostatique permettent de limiter l’agrégation des nanoparticules d’or et contribuent donc à la stabilité colloïdale. Les nanoparticules obtenues par ce type de synthèse possèdent des tailles variables, comprises entre 10 nm et une centaine de nanomètres. La taille des nanoparticules d’or synthétisées peut être optimisée en fonction du ratio HAuCl_4 : Citrate de sodium. Ainsi, il a été prouvé que plus la quantité de citrate de sodium était importante, plus la taille des nanoparticules d’or obtenues

était faible²⁵⁴. De nombreuses variantes de la synthèse de Turkevich ont vu le jour, toujours dans le but de contrôler plus finement la distribution de taille des nanoparticules d’or²⁵⁵.

3. Synthèse de Brust-Schiffrin

La synthèse de Brust-Schiffrin, décrite en 1994, permet d’obtenir des nanoparticules d’or sphériques possédant un diamètre moyen inférieur à 5 nm²⁵⁶. Ces nanoparticules d’or sont stabilisées par des ligands thiols, très affins pour l’or. La synthèse se déroule en système biphasique (toluène/eau) et nécessite l’emploi d’un agent de transfert de phase comme le bromure de tétraoctylammonium (TOAB). Ce transfert de phase permet le passage en phase organique des sels d’or et constitue une étape essentielle de la synthèse. Dans un second temps, l’introduction d’un alcane thiol puis d’une solution aqueuse de borohydrure de sodium (NaBH₄) permet l’obtention de nanoparticules d’or monodisperses stabilisées par des alcanes thiols. L’alcane thiol possède un rôle de stabilisant de surface mais a aussi été identifié comme impliqué dans le phénomène de réduction de l’or Au³⁺ en Au¹⁺ avant l’incorporation de l’agent réducteur NaBH₄²⁵⁷. Depuis sa découverte, la synthèse de Brust-Schiffrin a été largement étudiée et la compréhension des rôles de chacun des réactifs intéresse toujours la communauté scientifique²⁵⁸.

B. Fonctionnalisation des nanoparticules d’or

Une fois la nanoparticule d’or synthétisée, il apparaît nécessaire de fonctionnaliser sa surface afin d’améliorer sa biocompatibilité et sa stabilité. Il est à noter que cette fonctionnalisation peut se réaliser directement pendant la synthèse *via* l’utilisation par exemple de ligands thiols dans la méthode de Brust-Schiffrin. On distingue alors la fonctionnalisation directe et la fonctionnalisation indirecte.

1. Fonctionnalisation directe

La fonctionnalisation directe correspond à l’introduction de l’agent de fonctionnalisation directement à la surface de la nanoparticule. Cette fonctionnalisation peut se faire soit par échange de ligand soit par greffage direct à la surface de la nanoparticule d’or. Par exemple, après la synthèse de Turkevich, on obtient des nanoparticules d’or fonctionnalisées par des ligands citrate. Ces ligands ne sont liés que faiblement à la surface de la nanoparticule d’or et

²⁵⁴ Shi, L. *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.*, **2017**, 492, 191–198

²⁵⁵ Wuihschick, M. *et al.*, *ACS Nano*, **2015**, 9, 7052–7071

²⁵⁶ Brust, M. *et al.*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 801–802

²⁵⁷ Perala, S. R. K. *et al.*, *Langmuir*, **2013**, 29, 9863–9873

²⁵⁸ Daruich De Souza, C. *et al.*, *J. Alloys Compd.*, **2019**, 798, 714–740

peuvent ainsi être déplacés par des ligands présentant une affinité plus importante pour l’or tels que les thiols. Dans certains cas, une co-adsorption des différents ligands à la surface de la nanoparticule d’or peut être observée. Ce phénomène résulte de l’existence de liaisons intermoléculaires fortes entre les molécules de citrate adjacentes qui induit une résistance au déplacement de celles-ci par les molécules thiols. En résulte donc une coexistence à la surface de la nanoparticule d’or des deux entités, citrate et alcane thiol²⁵⁹.

2. Fonctionnalisation indirecte

La fonctionnalisation indirecte des nanoparticules d’or se déroule en deux temps : on a, tout d’abord, greffage d’une molécule à la surface de la nanoparticule d’or. Cette molécule présente à son extrémité libre une fonction réactive qui va permettre, dans un second temps, l’ancrage d’une biomolécule ou d’une autre molécule d’intérêt via réaction chimique. Les réactions chimiques les plus courantes sont, entre autres, les réactions de chimie click telles que les réactions alcyne-azoture ou thiol-maléimide. Par exemple, la fonctionnalisation indirecte des nanoparticules d’or via une réaction alcyne-azoture a été décrite pour la synthèse de nanoparticules d’or glycosylées²⁶⁰. Cette technique de fonctionnalisation indirecte peut aussi permettre le développement de nanomatériaux hybrides résultant de l’association d’une nanoparticule d’or et d’une enzyme, toutes deux liées de façon covalente²⁶¹. Enfin, les nanoparticules d’or peuvent être conjuguées aux biomolécules par interactions électrostatiques ou par interactions hydrophobes, sans lien de covalence. Ainsi, les protéines peuvent s’adsorber à la surface des nanoparticules d’or, majoritairement par interaction électrostatique et ainsi créer une « couronne » protéique protectrice et stabilisante²⁶².

C. Biocompatibilité des nanoparticules d’or

Il est à noter que, quel que soit le mode de fonctionnalisation, l’obtention de nanoparticules d’or stables est nécessaire pour une application biomédicale. Les nanoparticules d’or stabilisées doivent aussi présenter une compatibilité pour les milieux biologiques afin d’être utilisées pour des applications thérapeutiques ou diagnostiques. Dans ce contexte, la fonctionnalisation des nanoparticules d’or avec des revêtements polymériques hydrophiles permet de leur conférer une biocompatibilité apparente. Parmi ces revêtements polymériques hydrophiles, le poly(éthylène glycol) est de loin le plus utilisé. D’autres polymères hydrophiles ont été étudiés

²⁵⁹ Park, J. W. *et al.*, *ACS Nano*, **2015**, *9*, 1665–1682

²⁶⁰ Poonthiyil, V. *et al.*, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2018**, *14*, 11–24

²⁶¹ Brennan, J. L. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **2006**, *17*, 1373–1375

²⁶² Wang, A. *et al.*, *J. Phys. Chem.*, **2016**, *120*, 24231–24239

pour le développement de revêtements biocompatibles comme les biopolymères (chitosan...) ²⁶³ ou les polymères zwitterioniques (poly(carboxybétaïne)...) ²⁶⁴. Ces différents polymères améliorent donc la solubilité et la stabilité des nanoparticules d’or dans le compartiment sanguin. De plus, ils permettent de limiter l’adsorption de protéines circulantes en jouant le rôle de barrière stérique et contribuent donc à limiter le phénomène d’opsonisation et la reconnaissance par le système phagocytaire mononucléé, comme développé précédemment ²⁴².

D. Nanoparticules d’or et ciblage de la tumeur

Comme expliqué en amont, les nanoparticules à visée anti-cancéreuse (dont les nanoparticules d’or) doivent atteindre le tissu tumoral pour y exercer leur effet tumoricide. En fonction de leur fonctionnalisation de surface, celles-ci peuvent atteindre le tissu tumoral par ciblage passif et, éventuellement, interagir spécifiquement avec les cellules cancéreuses par ciblage actif.

En effet, tandis que certaines équipes de recherche choisissent de développer des nanoparticules d’or exploitant seulement l’effet EPR et ciblant ainsi passivement les tumeurs, d’autres décident de greffer à la surface de la nanoparticule d’or des molécules ou macromolécules dont les cibles sont surexprimées au niveau de la surface de cellules tumorales. Ainsi, cette dernière option permet une internalisation plus importante du système nanoparticulaire chez les cellules tumorales.

Pour augmenter la fraction nanoparticulaire au sein des cellules tumorales par ciblage actif, l’option de fonctionnalisation de nanoparticules d’or la plus courante est le recours aux protéines. Parmi ces différentes protéines, les **anticorps monoclonaux** sont les plus fréquemment utilisés afin d’améliorer l’adressage tumoral des nanoparticules. Ces anticorps (ou immunoglobulines) ciblent spécifiquement des récepteurs surexprimés à la surface des cellules tumorales et présentent des affinités de l’ordre du nM. Ces propriétés uniques en font des candidats de choix pour le ciblage actif de nanoparticules. En ce sens, des anticorps monoclonaux tels que le cetuximab ou le trastuzumab, tous deux utilisés en clinique depuis les années 2000, ont été identifiés comme capables de vectoriser activement les nanoparticules d’or ^{265,266}.

²⁶³ Da Silva, B. A. *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2020**, *161*, 977–998

²⁶⁴ Yang, W. *et al.*, *Biomaterials*, **2009**, *30*, 5617–5621

²⁶⁵ Cai, Z. *et al.*, *Pharm. Res.*, **2017**, *34*, 579–590

²⁶⁶ Li, S. *et al.*, *Nanomedicine (Lond)*, **2019**, *14*, 317–333

Ces anticorps peuvent être liés à la surface de la nanoparticule par adsorption *via* des interactions électrostatiques ou par liaison covalente. La bioconjugaison covalente fait souvent intervenir la réaction aléatoire d’un résidu lysine de l’anticorps avec un acide carboxylique terminal d’un espaceur moléculaire à la surface nanoparticulaire ou en modifiant la structure de l’anticorps *via* l’incorporation de groupements fonctionnels particuliers permettant la fixation à la nanoparticule d’or (groupements thiols par exemple). D’autres protéines ont été explorées pour améliorer la spécificité cellulaire des nanoparticules d’or telles que les facteurs de croissance. En effet, les cellules tumorales possèdent une densité plus importante de récepteurs aux facteurs de croissance à leur surface et exploiter cette caractéristique permet en théorie une internalisation spécifique. À titre d’exemple, le greffage du **facteur de croissance endothélial (EGF)** à la surface de nanoparticules d’or a été évalué afin d’améliorer leur internalisation au sein des cellules tumorales²⁶⁷. Le recours à des mutants d’EGF issus de recombinaison génétique et de mutations site-spécifiques a permis d’améliorer ses capacités de ciblage du phénotype tumoral considéré²⁶⁸. L’emploi de **protéines recombinantes** a aussi été décrit dans la littérature comme un moyen efficace de ciblage nanoparticulaire et d’amélioration des propriétés des protéines natives²⁶⁹. Il est à noter qu’en plus d’améliorer le ciblage nanoparticulaire, le greffage à la surface nanoparticulaire de facteurs de croissance ou de protéines endogènes limite les réactions immunogéniques vis-à-vis de la nanoparticule circulante.

Cependant, bien que ces méthodes de fonctionnalisation permettent un adressage sélectif des nanoparticules d’or conjuguées, l’introduction de macromolécules de haut poids moléculaire comme les anticorps ou les facteurs de croissance à la surface de la nanoparticule peut altérer son comportement et limiter sa pénétration tissulaire. De plus, il a été prouvé que la conjugaison de la nanoparticule à l’anticorps peut modifier les propriétés intrinsèques de l’immunoglobuline ainsi que son devenir intracellulaire²⁷⁰.

D’autres méthodes de fonctionnalisation des nanoparticules d’or permettent un adressage sélectif au tissu tumoral sans pour autant modifier de manière conséquente les propriétés et la morphologie de la nanoparticule. Ces méthodes mettent en jeu une fonctionnalisation avec de petites molécules de synthèse, des peptides ou des aptamères.

²⁶⁷ Kim, W. *et al.*, *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 10971

²⁶⁸ Zhang, A. *et al.*, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **2021**, 22, 616–626

²⁶⁹ Goddard, Z. R. *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, **2020**, 49, 8774–8789

²⁷⁰ Bhattacharyya, S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, 107, 14541–14546

Parmi les petites molécules utilisées pour la fonctionnalisation des nanoparticules d’or afin d’augmenter leur internalisation au niveau tumoral, les vitamines ont rapidement attiré l’attention de la communauté scientifique. En effet, les cellules cancéreuses sont caractérisées par une prolifération incontrôlée et leurs besoins en vitamines (*e.g.* **acide folique, biotine**) augmentent donc considérablement par rapport aux cellules saines. Dès lors, les cellules cancéreuses présentent une densité de récepteurs aux vitamines plus élevée que les cellules saines et l’exploitation de cette différence d’expression surfacique pourrait, en théorie, permettre un ciblage sélectif du tissu tumoral²⁷¹. Ainsi, plusieurs équipes se sont penchées sur l’élaboration de nanoparticules d’or décorées par des résidus biotine et acide folique afin d’améliorer le ciblage des cellules cancéreuses. La fonctionnalisation de nanoparticules d’or par des résidus d’acide folique a été mise en œuvre et il a été mis en évidence que cette modification de surface des nanoparticules induisait une amélioration de la prise en charge tumorale ainsi qu’une internalisation plus importante pour les cellules cancéreuses, comparativement aux cellules saines²⁷².

Parmi les cibles protéiques potentielles permettant un adressage tumoral des nanoparticules d’or, certains sous-types d’intégrines ont été identifiés comme de possibles candidats. Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques présents à la surface des cellules endothéliales qui permettent l’adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. Certains sous-types d’intégrines tels que les intégrines $\alpha\nu\beta 3$ sont majoritairement exprimés au niveau de la vascularisation tumorale et sont capables d’influer grandement sur la progression tumorale ainsi que l’invasion métastatique. Ces intégrines $\alpha\nu\beta 3$ semblent donc être une cible pertinente afin d’améliorer l’accumulation des nanoparticules d’or au niveau tumoral. Les intégrines reconnaissent plusieurs types de ligands comme la vitronectine, le fibrinogène ou encore la fibronectine, dont la séquence de fixation à l’intégrine est constituée d’un tripeptide arginine-glycine-acide aspartique (RGD). Ce **motif RGD** s’avère essentiel à la fixation de l’intégrine $\alpha\nu\beta 3$ à la fibronectine et a été utilisé comme moyen de vectorisation de nanoparticules d’or. À titre d’exemple, en 2018, Enferadi *et al.* ont développé une nanoparticule d’or sphérique de 1.8 nm de diamètre et ont modifié sa chimie de surface en y liant un motif RGDfK cyclique afin de lui conférer de meilleures propriétés d’accumulation et d’internalisation tumorales²⁷³.

²⁷¹ Russell-Jones, G. *et al.*, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, 98, 1625–1633

²⁷² Samadian, H. *et al.*, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **2016**, 142, 2217–2229

²⁷³ Enferadi, M. *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.*, **2018**, 94, 124–136

Les **aptamères** ont ensuite été considérés afin d’améliorer le ciblage de la population cellulaire tumorale. Les aptamères sont des courtes séquences oligonucléotidiques d’ARN ou d’ADN simple brin qui adoptent une conformation tridimensionnelle unique *via* l’appariement de bases complémentaires. Cette structure tridimensionnelle permet la reconnaissance et l’interaction des aptamères avec leur cible présente à la surface des cellules tumorales. Il a été démontré que ces ligands de poids moléculaire modéré possèdent une sélectivité et une spécificité très élevées pour leur cible, comparables à celles d’un anticorps monoclonal²⁷⁴. Leur facilité de synthèse et les multiples possibilités de modification structurelle/chimique des séquences nucléotidiques rendent les aptamères très attractifs dans le domaine de la thérapie anti-cancéreuse ciblée²⁷⁵.

Parmi les aptamère développés jusqu’alors, le plus décrit est AS1411, un aptamère riche en résidus guanine de 26 oligonucléotides qui cible la nucléoline, récepteur surexprimé à la surface des cellules cancéreuses. Cet aptamère peut former un complexe dimérique stable capable d’adopter une structure secondaire dénommée quadruplexe G (G4) *via* un réarrangement organisé des résidus guanine de la séquence. C’est cette structure tridimensionnelle G4 qui est reconnue par la nucléoline avec une grande affinité et spécificité. Dès lors, l’emploi de AS1411 en tant qu’agent de fonctionnalisation a été envisagé afin de cibler les cellules tumorales surexprimant la nucléoline à leur surface. Le greffage de l’aptamère à la surface nanoparticulaire se fait généralement *via* un lien or-thiol résistant et permet un ciblage efficace des cellules tumorales. De plus, cette conjugaison ne modifie que très peu le rayon hydrodynamique de la nanoparticule d’or²⁷⁶.

D’autres petites molécules ont attiré l’attention de la communauté comme le **glucose** et les carbohydrates. En effet, il a été mis en avant que les cellules tumorales, de par leur métabolisme accru, possédaient à leur surface un nombre plus important de récepteurs au glucose GLUT, comparativement aux cellules saines. Exploiter cette différence d’expression surfacique pourrait ainsi induire un ciblage actif des cellules tumorales. À titre d’illustration, Hu *et al.* ont démontré une internalisation plus importante de nanoparticules fonctionnalisées par du glucose comparativement à des nanoparticules d’or simplement pégylées chez différentes lignées cellulaires cancéreuses²⁷⁷.

²⁷⁴ Nimjee, S. M., *et al.*, *Annu. Rev. Med.*, **2005**, *56*, 555–583

²⁷⁵ Sun, H. *et al.*, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **2014**, *3*, e182

²⁷⁶ Ai, J. *et al.*, *Talanta*, **2014**, *118*, 54–60

²⁷⁷ Hu, C. *et al.*, *Int. J. Nanomedicine*, **2015**, *10*, 2065–2077

Pour conclure, afin de développer des traitements anti-cancéreux toujours plus spécifiques du phénotype tumoral, les ciblage passif et actif ont tous deux prouvé une efficacité certaine. Dans le cas du ciblage actif, les différentes conjugaisons possibles peuvent avoir une influence non négligeable sur la taille et la structure de la nanoparticule, modifiant donc son comportement *in vivo*. Dès lors, il convient de sélectionner le type de ligand le plus adapté aux applications considérées.

E. Interactions entre la nanoparticule d’or et la cellule tumorale

Une fois que la nanoparticule d’or a atteint le tissu tumoral, cette dernière doit être internalisée pour pouvoir exercer son efficacité biologique. En fonction de l’aspect morphologique et de la chimie de surface des nanoparticules, leur taux d’internalisation cellulaire peut différer. En effet, l’influence de la forme et de la taille des nanoparticules d’or sur l’internalisation cellulaire est reconnue. Plusieurs études sur le sujet ont déjà vu le jour. Par exemple, en 2006, Chrithrani *et al.* ont synthétisé différentes nanoparticules d’or sphériques possédant des tailles distinctes (14 nm, 50 nm et 74 nm de diamètre) ainsi que des nanobâtonnets d’or de plusieurs dimensions (40×14 nm et 74×14 nm)¹³⁷. L’impact de ces différences de forme et de taille sur l’internalisation cellulaire a été évalué sur des cellules humaines du cancer du col de l’utérus. Il a pu être démontré, dans un premier temps, que les nanoparticules d’or sphériques de 50 nm de diamètre présentaient de meilleures propriétés d’internalisation cellulaire par rapport aux nanoparticules sphériques de 14 et 74 nm. De plus, il semblerait que la forme nanobâtonnet ne soit pas idéale en ce qui concerne l’internalisation cellulaire. L’une des explications avancées est que, lors de son internalisation, le nanobâtonnet d’or se fixe à des récepteurs membranaires le long de son axe longitudinal. Ainsi, le nanobâtonnet présentant une surface de contact plus importante que son homologue sphérique, moins de récepteurs sont disponibles pour internaliser d’autres nanobâtonnets. On observe donc un taux d’internalisation cellulaire des nanobâtonnets plus faible que celui des nanoparticules d’or sphériques. Enfin, il est à noter que les nanobâtonnets de taille plus faible s’internalisent plus au sein des cellules tumorales que les longs nanobâtonnets. Ces résultats ont été confirmés en 2017 par l’équipe de Chen qui a élaboré différentes nanostructures d’or de taille similaire (environ 50 nm de diamètre) présentant toutes des motifs PEG à leur surface: nanoparticules d’or sphériques, des nano-étoiles d’or et des nanobâtonnets d’or²⁷⁸. Ils ont ensuite marqué ces multiples formes de nanoparticules d’or avec 1% de FITC (fluorescéine isothiocyanate), une sonde fluorescente verte, et ont pu confirmer

²⁷⁸ Ma, N. *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, 9, 13037–13048

que les nanoparticules d’or sphériques présentaient la capacité d’internalisation cellulaire la plus importante, comparativement aux nano-étoiles et nanobâtonnets d’or.

Un taux d’internalisation nanoparticulaire important est essentiel afin d’obtenir une activité anti-cancéreuse suffisante, et ce, quelle que soit l’application considérée.

Comme explicité précédemment, les propriétés uniques des nanoparticules d’or peuvent être exploitées dans différents domaines de la lutte contre le cancer, que ce soit à des visées diagnostiques ou thérapeutiques. Pour notre part, nous décrivons dans la suite de cette partie introductive le rôle des nanoparticules d’or dans l’amélioration de l’efficacité radiothérapeutique.

F. Propriétés radioamplificatrices des nanoparticules d’or

Certains métaux à haut numéro atomique comme l’or interagissent avec les rayonnements ionisants. En effet, les particules composant le rayonnement ionisant incident présentent une énergie élevée dont une partie est déposée dans l’environnement direct du métal après collision avec les électrons de sa sphère de coordination. On a alors l’émission d’électrons ou photons secondaires, par effet Compton et effet photoélectrique, capables de potentialiser l’effet délétère des rayonnements ionisants au sein du tissu tumoral. Cet excédent d’énergie déposé au sein d’un tissu biologique permet d’augmenter la dose absorbée par ce même tissu et de générer plus d’espèces radicalaires instables conduisant à une élévation du stress oxydant cellulaire menant à l’apoptose (fig. 57).

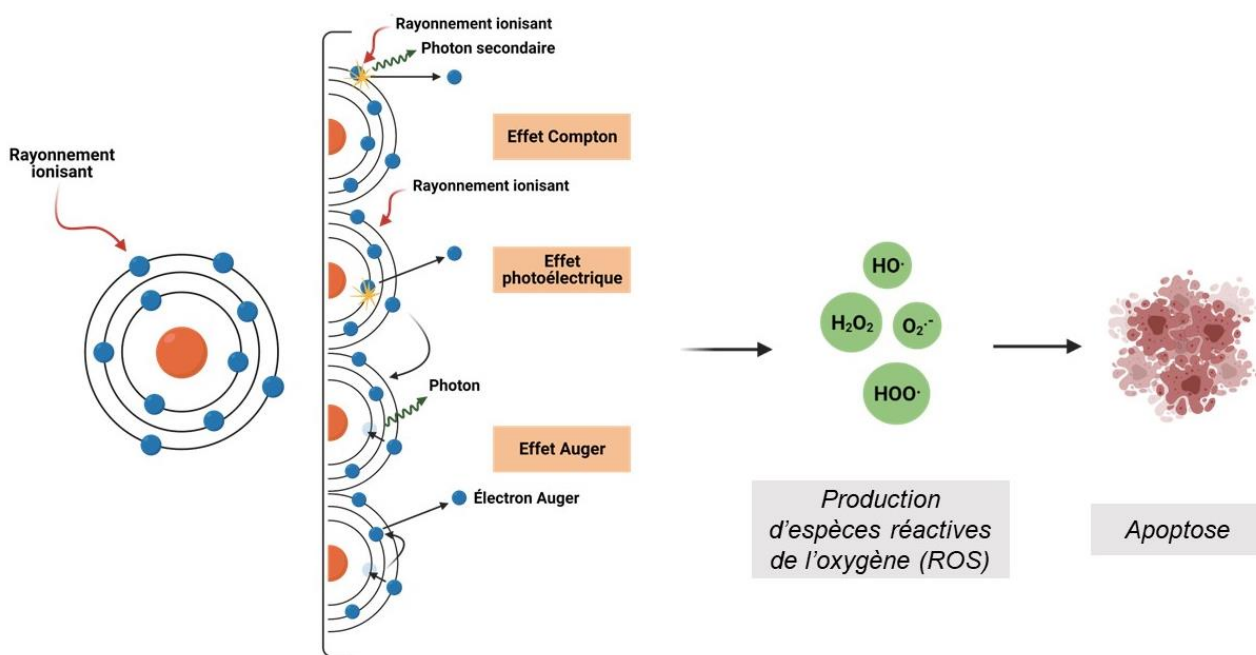


Figure 57. Schéma synthétique des modes d'interaction métal-photon.

La probabilité d'occurrence de ces phénomènes électroniques est différente en fonction de l'atome considéré et est proportionnelle à Z^n/E^3 dans le cas de l'effet photoélectrique où Z est le numéro atomique de l'atome ou métal considéré, E l'énergie du photon incident et n varie entre 3 et 4 en fonction de la nature du rayon incident (*cf.* Introduction générale. II. B.). Ainsi, l'or avec son numéro atomique élevé ($Z = 79$) constitue un excellent candidat pour l'absorption photoélectrique et la potentialisation de l'énergie incidente du rayonnement ionisant en radiothérapie par émission d'électrons Auger.

De plus, chaque élément atomique présente un coefficient d'atténuation massique qui correspond à la probabilité d'interaction par unité de masse de l'élément avec le photon incident et cette grandeur peut être reliée à la dose d'énergie déposée au niveau des tissus²⁷⁹. Ce coefficient d'absorption massique varie en fonction de la nature de l'élément et de l'énergie incidente. Les tissus mous ont, eux aussi, un coefficient d'atténuation massique déterminé. Malheureusement, il n'existe pas de différence d'absorption entre tissus mous et tumeurs ce qui rend la radiothérapie peu sélective. Afin de contourner ce problème, il est possible d'exploiter le coefficient d'absorption massique très élevé des métaux à haut numéro atomique comme l'or. Si les nanoparticules métalliques peuvent s'accumuler au niveau du tissu à traiter, la fraction de dose déposée au niveau de ce dernier sera plus importante que la fraction de dose déposée au niveau des tissus sains environnants, exempt de nanoparticules. Pour favoriser l'efficacité d'une telle approche, il est possible d'établir un ratio d'atténuation massique entre les tissus mous et l'or en fonction de l'énergie incidente (fig. 58). Il semble, dès lors, pertinent de se placer dans des gammes d'énergie de l'ordre du keV, valeur à laquelle le rapport entre les coefficients d'absorption de l'or et des tissus mous est le plus favorable. On pourra ainsi optimiser la sélectivité de l'action de la radiothérapie en focalisant le dépôt de dose sur la zone à traiter.

²⁷⁹ Butterworth, K. T. *et al.*, *Nanoscale*, **2012**, 4, 4830

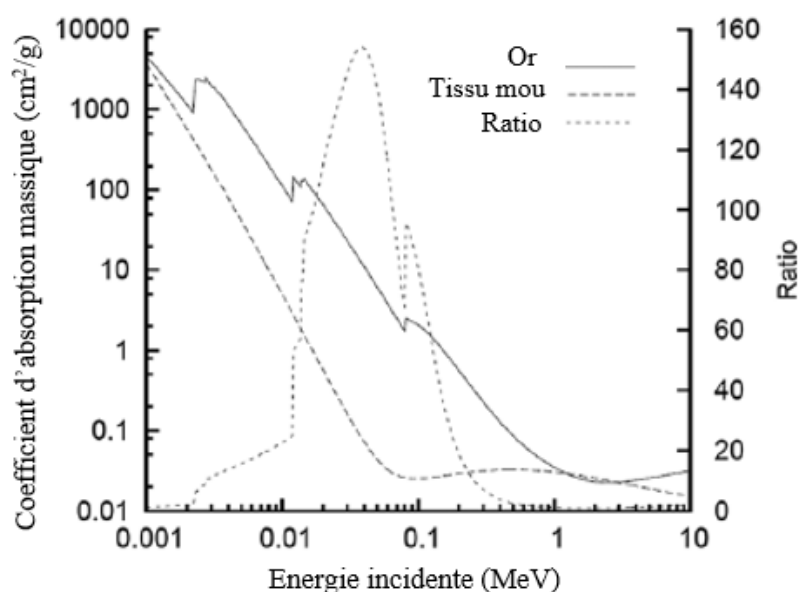


Figure 58. Diagramme de comparaison des coefficients d'absorption massique de l'or et des tissus mous en fonction de l'énergie incidente²⁷⁹.

Les nanoparticules d’or ont donc été identifiées comme capables d’augmenter le dépôt de dose au niveau du tissu tumoral, permettant dès lors l’instauration d’un contraste important entre ce dernier et les tissus sains, nécessaire à l’amélioration de la sélectivité et efficacité de la radiothérapie.

II. État de l’art des nanoparticules d’or pour l’amélioration de la radiothérapie

Les nanoparticules d’or ont été parmi les premières nanoparticules métalliques identifiées comme potentiels agents de radiosensibilisation. En 2000, les travaux d’Herold *et al.* ont été pionniers dans le domaine en démontrant qu’une administration intra-tumorale de microsphères d’or (1,5 à 3 μm de diamètre) préalable à une exposition aux rayonnements ionisants (rayons X ou rayons γ générés par une source de ^{137}Cs) induisait une diminution de la viabilité cellulaire sur des cellules tumorales murines ou des cellules du cancer de la prostate humain²⁸⁰. En 2004, Hainfeld *et al.* ont confirmé ces résultats préliminaires en mettant en avant le potentiel radioamplificateur de nanoparticules d’or de 1,9 nm de diamètre injectées par voie intraveineuse chez des souris porteuses de carcinomes mammaires murins²⁸¹. Ces résultats plus qu’encourageants ont permis de valider l’intérêt radioamplificateur des nanoparticules d’or. Plus tard, il a été prouvé que le ratio de facteurs d’atténuation entre l’or et les tissus mous peut atteindre 100 pour un rayon incident de 20 keV, ce qui induit une énergie absorbée 100 fois

²⁸⁰ Herold, M. *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.*, **2000**, 76, 1357–1364

²⁸¹ Hainfeld, J. F. *et al.*, *Phys. Med. Biol.*, **2004**, 49, N309–315

plus importante au niveau de la tumeur, si la nanoparticule se trouve dans son environnement proche²⁸². Cependant, il a été établi que les propriétés radiosensibilisantes de ces nanoparticules d’or dépendaient aussi grandement de leur taille, leur forme et leur chimie de surface. Dès lors, la recherche s’est accélérée pour développer des systèmes nanoparticulaires d’or toujours plus innovants et présentant un potentiel radioamplificateur plus important.

Afin d’exercer préférentiellement leur activité radioamplificatrice au sein du tissu tumoral, les nanoparticules d’or doivent s’y accumuler spécifiquement, pour y être présentes en quantité plus importante que dans les tissus sains. En ce sens, plusieurs nanoparticules d’or ont été élaborées afin d’exploiter l’effet EPR et cibler passivement les tissus tumoraux pour augmenter localement l’efficacité de la radiothérapie. Comme développé précédemment, cette accumulation passive de nanoparticules d’or au niveau tumoral dépend de la chimie de surface, de la taille et de la charge du nano-objet mais aussi et surtout de son temps de résidence dans la circulation sanguine. Des efforts ont donc été réalisés pour optimiser ce dernier facteur en modifiant les ligands à la surface de la nanoparticule d’or. Dans un premier temps, le recours à des revêtements biocompatibles, tels que le poly(éthylène glycol), aide à limiter l’opsonisation des nanoparticules et induit, de ce fait, un temps de circulation plus important permettant une accumulation plus efficace au niveau tumoral par effet EPR. Beaucoup de nano-systèmes pégylés ont ainsi vu le jour et ont démontré leur efficacité d’accumulation tumorale et de radioamplification sur plusieurs lignées cellulaires tumorales^{283,284}.

D’autres ligands conférant une biocompatibilité aux nanoparticules d’or et induisant une rétention dans la circulation sanguine suffisante pour une accumulation tumorale optimale ont été explorés. Parmi eux, le glutathion a rapidement été considéré comme une alternative viable au poly(éthylène glycol). Ce tripeptide naturel biocompatible est de plus en plus utilisé dans les nanosciences pour diverses applications. Dans le domaine de la radiosensibilisation, l’emploi d’un revêtement à base de glutathion pour la fonctionnalisation de nanoparticules d’or a permis d’obtenir une accumulation tumorale satisfaisante ainsi qu’une radioamplification efficace *in vitro* et *in vivo*²⁸⁵.

Plusieurs nano-systèmes à base d’or exploitant l’effet EPR et ciblant passivement le tissu tumoral ont donc été décrits dans la littérature. En parallèle, toujours dans le but d’augmenter

²⁸² Hainfeld, J. F. *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, **2010**, *60*, 977–985

²⁸³ Zhang X-D, *et al.*, *Biomaterials*, **2012**, *33*, 6408–6419

²⁸⁴ Joh D.Y., *et al.*, *PLoS One*, **2013**, *8*, e62425

²⁸⁵ Zhang, X-D. *et al.*, *Sci. Rep.*, **2015**, *5*, 8669

l’énergie déposée au niveau tumoral *via* une augmentation de la fraction nanoparticulaire présente au niveau tumoral, des stratégies de fonctionnalisation permettant un ciblage actif ont aussi été envisagées.

Parmi celles-ci, la conjugaison des nanoparticules d’or à un anticorps monoclonal dans le cadre du développement d’agents radioamplificateurs a prouvé son efficacité. Les nano-systèmes ainsi conjugués ont montré une différenciation tissulaire et une accumulation tumorale, induisant une augmentation du dépôt de dose au niveau de la zone à traiter^{286,287}. La conjugaison des nanoparticules d’or à des protéines présentant un tropisme majoritairement tumoral a aussi montré une amélioration de leurs propriétés de ciblage tumoral et de radioamplification comme dans le cas de nanoparticules d’or conjuguées à l’albumine sérique²⁸⁸. Outre le recours aux protéines, la décoration des nanoparticules d’or par de petites molécules de synthèse peut aussi permettre d’augmenter la fraction nanoparticulaire au niveau tumoral et donc améliorer localement l’efficacité de la radiothérapie. Afin d’accroître la dose délivrée aux tissus tumoraux en augmentant la fraction nanoparticulaire accumulée, on recense, par exemple, l’emploi de petites molécules, dont il a été question plus haut, telles que le glucose²⁸⁹, l’acide folique²⁹⁰ ou le motif RGD²⁷³. La plupart des mécanismes impliqués dans ces stratégies de fonctionnalisation par ciblage actif ont été exposés précédemment.

Les nanoparticules d’or, après avoir interagi avec les photons du rayonnement ionisant génèrent des électrons secondaires. Ces électrons peuvent agir directement sur l’ADN si la nanoparticule se trouve à proximité du compartiment nucléaire et générer des altérations génétiques létales pour la cellule. Leur action peut également être indirecte. Sur leur passage, les électrons vont ioniser les molécules d’eau formant des espèces réactives de l’oxygène. Ces espèces radicalaires instables vont se fixer à des bases de l’ADN, à des protéines ou aux lipides membranaires. L’augmentation du stress oxydant et l’accumulation de ces lésions mène à l’apoptose.

III. Objectifs de chapitre

Les nanoparticules d’or possèdent des propriétés remarquables qui peuvent être exploitées à des fins diagnostiques (imagerie photoacoustique) ou thérapeutiques (thérapie photothermique,

²⁸⁶ Chattopadhyay, N. *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, **2013**, *137*, 81–91

²⁸⁷ Li, S. *et al.*, *Nanomedicine (Lond.)*, **2019**, *14*, 317–333

²⁸⁸ Chen, N. *et al.*, *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 40514–40520

²⁸⁹ Wang C. *et al.*, *J. Nanoparticle Res.*, **2013**, *15*, 1642

²⁹⁰ Khoshgard, K. *et al.*, *Phys. Med. Biol.*, **2014**, *59*, 2249–2263

radiothérapie). Dans le cadre de la lutte contre le cancer, les nanoparticules d’or constituent une réelle avancée dans bien des domaines. En effet, outre leurs propriétés spectroscopiques, les nanoparticules d’or présentent des propriétés radioamplificatrices. Celles-ci sont expliquées par l’interaction des photons du rayonnement ionisant avec les électrons de l’atome d’or, générant la production d’électrons et photons secondaires. Ces événements sont à l’origine d’une potentialisation de la dose déposée au niveau tumoral et de la mort cellulaire associée *via* l’augmentation des dommages à l’ADN et la production accrue d’espèces radicalaires de l’oxygène. De plus, le recours à des formulations nanoparticulaires a permis d’améliorer la spécificité des traitements radiosensibilisants en limitant l’impact sur les tissus sains environnants. Cette spécificité peut être acquise par ciblage actif *via* la conjugaison des nanoparticules d’or à des molécules ou macromolécules spécifiques d’un récepteur surexprimé au niveau tumoral ou qui tirent profit des caractéristiques singulières des tumeurs telles que leur métabolisme accru. Une autre méthode de ciblage tumoral est l’exploitation des propriétés intrinsèques du microenvironnement de la tumeur. En effet, les néo-vaisseaux tumoraux présentent des pores dilatés et une couverture péricytaire incomplète, ce qui permet l’extravasation des nanoparticules au niveau du stroma tumoral. De plus, le dysfonctionnement du drainage lymphatique entraîne une stagnation des nanoparticules au niveau tumoral. Ainsi, en fonction de la taille des nanoparticules et de leur chimie de surface, l’effet EPR sera plus ou moins important, tout comme la fraction de nanoparticules accumulées.

Dans ce chapitre, nous développerons la synthèse de nanoparticules d’or sphériques et leur encapsulation dans une micelle perfluorée dans le but de construire une nano-plateforme multimodale pour améliorer l’efficacité de la radiothérapie. En effet, combiner une source de dioxygène (micelle perfluorée) et une nanoparticule métallique capable de générer une douche électronique après irradiation permettrait, en théorie, d’augmenter la formation d’espèces radicalaires de l’oxygène et ainsi de potentialiser les effets tumoricides de la radiothérapie.

IV. Résultats et discussion

A. Synthèse des nanoparticules d’or et encapsulation au sein des micelles perfluorées

Après avoir validé l’intérêt des micelles perfluorées en tant qu’adjuvant efficace de la radiothérapie, l’encapsulation d’une nanoparticule d’or a été envisagée, permettant de potentialiser les effets des rayonnements ionisants. Le nano-système ainsi pensé présenterait une action synergique, la source de dioxygène étant en contact direct de la nanoparticule d’or. Une fois irradiée, la nanoparticule d’or générerait des électrons secondaires interagissant avec

les molécules de dioxygène dans le cœur perfluoré de la micelle pour former des espèces radicalaires oxygénées, hautement réactives. Ainsi la présence d’oxygène dans le voisinage direct de la nanoparticule d’or potentialiserait la formation d’espèces réactives de l’oxygène, responsables d’une mort cellulaire accrue.

Dans un premier temps, la synthèse des nanoparticules d’or a été optimisée. Une variante de la synthèse de Brust-Schiffrin a été considérée.

Initialement, dans la méthode de synthèse des nanoparticules d’or décrite par Brust²⁵⁶, le bromure de tétraoctylammonium (TOAB) solubilisé dans le toluène et l’acide chloroaurique solubilisé dans l’eau sont mis en contact sous agitation. Un transfert de phase est observé, lié à l’action du bromure de tétraoctylammonium. En effet, en formant des micelles inverses (tête polaire au cœur de la micelle et chaîne hydrophobe à l’extérieur) permettant de prendre en charge le métal Au(III), le bromure de tétraoctyl ammonium (NR₄X) induit son transfert en phase organique, formant dès lors une espèce métallique stable [NR₄][Au(III)X₄]. L’ajout du thiol (RSH) va permettre la réduction en phase organique des espèces métalliques Au(III) en Au(I) et générer l’existence d’espèces [Au(I)SR] solubles et [Au(I)SR]_n polymériques insolubles. L’ajout subséquent d’un agent réducteur tel que le NaBH₄ permet l’obtention d’espèces métalliques Au(0) et la formation de nanoparticules d’or stables de faible diamètre stabilisées par le ligand thiol RSH. Il a été prouvé, depuis, que la formation d’espèces polymériques [Au(I)SR]_n augmentait la polydispersité des nanoparticules d’or synthétisées et sembleraient induire une diminution des rendements de synthèse²⁹¹. De plus il a été identifié que le précurseur métallique de la réaction de Brust n’était pas le complexe [Au(I)SR] comme pensé jusqu’alors mais plutôt [NR₄][Au(I)X₂]²⁹². D’après les résultats de Li *et al.*, il semblerait que la formation de la liaison métal-thiol serait consécutive à la réduction des espèces [NR₄][Au(I)X₂] par l’action du NaBH₄ en Au(0). Dès lors, ils proposent une version « inversée » de la synthèse de Brust-Schiffrin, limitant la formation d’espèces polymériques [Au(I)SR]_n. Dans cette version inversée de la synthèse décrite initialement, l’acide tétrachloroaurique solubilisé dans l’eau est mis en contact avec le bromure de tétraoctyl ammonium solubilisé dans le toluène sous agitation. Une fois le transfert de phase réalisé, le NaBH₄ est ajouté au milieu réactionnel ce qui induit la réduction des espèces métalliques *in situ* (dans la micelle inverse). Des nanoparticules Au(0) encapsulées dans des micelles inverses de TOAB sont alors obtenues. L’ajout du thiol après la synthèse des nanoparticules d’or conduit à

²⁹¹ Booth, S. G. *et al.*, *Chem. Sci.*, **2017**, 8, 7954

²⁹² Goulet, P. J. G. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 9582–9584

la formation de nanoparticules d’or stabilisées par ce même ligand thiol. Le ligand thiol peut diffuser à travers la micelle inverse de TOAB et ainsi se lier à la surface de l’or. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence l’obtention de nanoparticules monodisperses stables présentant des diamètres similaires aux nanoparticules synthétisées selon la méthode classique (± 2 nm). De plus, cette technique semblerait permettre un meilleur contrôle de la formation des nanoparticules d’or, comparativement à la méthode décrite initialement par Brust²⁹³.

Cette méthode de synthèse « inversée » a été sélectionnée pour la suite de l’optimisation de la synthèse, ceci nous permettant de limiter la formation d’espèces polymériques $[\text{Au}(\text{I})\text{SR}]_n$ perfluorées peu solubles dans la plupart des solvants, et donc difficilement séparables des nanoparticules qui sont purifiées par précipitation.

Le greffage à la surface de la nanoparticule d’or de thiols perfluorés tels que le 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorodecanethiol (PFSH) a déjà été décrit dans la littérature²⁹⁴. Dans cet article, les auteurs décrivent la synthèse de nanoparticules d’or perfluorées *via* un système 1:1:3 mol/mol/mol $\text{HAuCl}_4/\text{TOAB}/\text{PFSH}$ dans le trifluorotoluène. L’emploi de trifluoroéthylène à la place du toluène permet d’améliorer la solubilité du thiol perfluoré. L’ajout subséquent d’un excès de NaBH_4 solubilisé dans l’eau froide permet la réduction efficace des espèces Au(I) en Au(0). Suite à l’évaporation du trifluorotoluène et la resuspension des nanoparticules d’or perfluorées dans le toluène, plusieurs lavages au toluène sont réalisés afin d’éliminer l’excès de TOAB et de PFSH (sous forme de disulfure). Les nanoparticules d’or perfluorées, insolubles dans le trifluorotoluène, sont récupérées par des étapes de centrifugation/lavage successives. Les nanoparticules perfluorées ainsi obtenues ne sont solubles qu’en solvant perfluoré, tel que le perfluorohexane ou perfluorocyclohexane.

De légères modifications du protocole décrit ont été réalisées afin d’obtenir les nanoparticules d’or perfluorées d’intérêt. Ainsi, plutôt qu’utiliser un excès de thiol perfluoré pour déplacer le ligand transitoire TOAB, 0,33 équivalents de thiol perfluoré ont été employés en tant que ligands. En effet, la proportion d’atomes à la surface d’une nanoparticule d’or (capables d’interagir avec le thiol perfluoré) peut être considérée comme étant voisine de $1/d$ (avec d , diamètre de la nanoparticule d’or en nm). Par exemple, pour une nanoparticule de 3 nm de diamètre, la proportion d’atomes présents à la surface de la nanoparticule et disponibles pour réagir avec le thiol est donc de 33 %²⁹⁵. Ainsi, le recours à un défaut de thiol perfluoré dans la

²⁹³ Li, Y. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 2092–2095

²⁹⁴ Dass, A. *et al.*, *Langmuir*, **2008**, 24, 310–315

²⁹⁵ Nanda, S. *et al.*, *J. Chem. Educ.*, **2021**, 98, 1982–1987

synthèse des nanoparticules perfluorées permettrait de s’affranchir des étapes de purification supplémentaires afin d’éliminer le thiol perfluoré n’ayant pas réagi, peu soluble dans la plupart de solvants organiques et aqueux.

Enfin, la précipitation des nanoparticules perfluorées, présentant un revêtement perfluoré *via* leur stabilisation par le PFSH, dans les solvants organiques comme le toluène a déjà été mise en évidence²⁹⁶. En effet, l’ajout de PFSH dans la phase organique (toluène) induit la précipitation des nanoparticules d’or ayant perdu leur affinité pour le solvant, du fait de leur nouveau revêtement perfluoré²⁹⁷. La force motrice de cette réaction est la haute énergie de liaison or-thiol ($E_{Au-S} \sim 50 \text{ kcal mol}^{-1}$) qui rend cette liaison très stable et résistante, favorisant donc thermodynamiquement le greffage du thiol à la surface nanoparticulaire.

Ainsi, les nanoparticules d’or perfluorées d’intérêt ont ainsi été synthétisées selon la méthode de Brust-Schiffrin « inversée » décrite précédemment avec un défaut de thiol perfluoré dans le toluène, afin de favoriser leur précipitation.

Avec ces différents paramètres optimisés, un protocole de synthèse des nanoparticules d’or a été élaboré (fig. 59). À une solution aqueuse d’acide chloraurique (30 mM) est ajoutée une solution de TOAB dans le toluène (50 mM). Le système biphasique est soumis à une agitation vigoureuse pendant 20 min, jusqu’à ce que le transfert de phase soit complet, l’or se retrouvant dès lors dans la phase toluène. Une solution aqueuse de NaBH_4 (750 mM) est rajoutée au mélange et un changement de couleur est observé, reflet du changement du degré d’oxydation de l’or et de la formation d’or(0). La réaction est agitée pendant 3 h, afin que la réduction soit totale. La phase toluène est par la suite séparée de la phase aqueuse et le thiol perfluoré (PFSH) y est ajouté en défaut, provoquant une précipitation quasi-instantanée des nanoparticules d’or. Plusieurs étapes de centrifugation/lavage avec ultrasonication (≥ 6 lavages) sont ensuite réalisées afin de s’affranchir du TOAB en excès puis les résidus de solvant sont évaporés sous pression réduite. Ces nanoparticules ne sont solubles que dans des solvants perfluorés. Ainsi, elles ont été resuspendues dans le perfluorométhylcyclohexane (PFMC) afin de les stabiliser, comme déjà décrit dans la littérature²⁹⁸. Ce protocole a permis l’obtention de nanoparticules

²⁹⁶ Shimpi, J. R. *et al.*, *Langmuir*, **2018**, *34*, 13680–13689

²⁹⁷ Gentilini, C. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 15678–15682

²⁹⁸ Yonezawa, T. *et al.*, *Langmuir*, **2001**, *17*, 2291–2293

d’or NpAu@PFSH stabilisées par des ligands thiols perfluorés (1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorodécane-thiol).

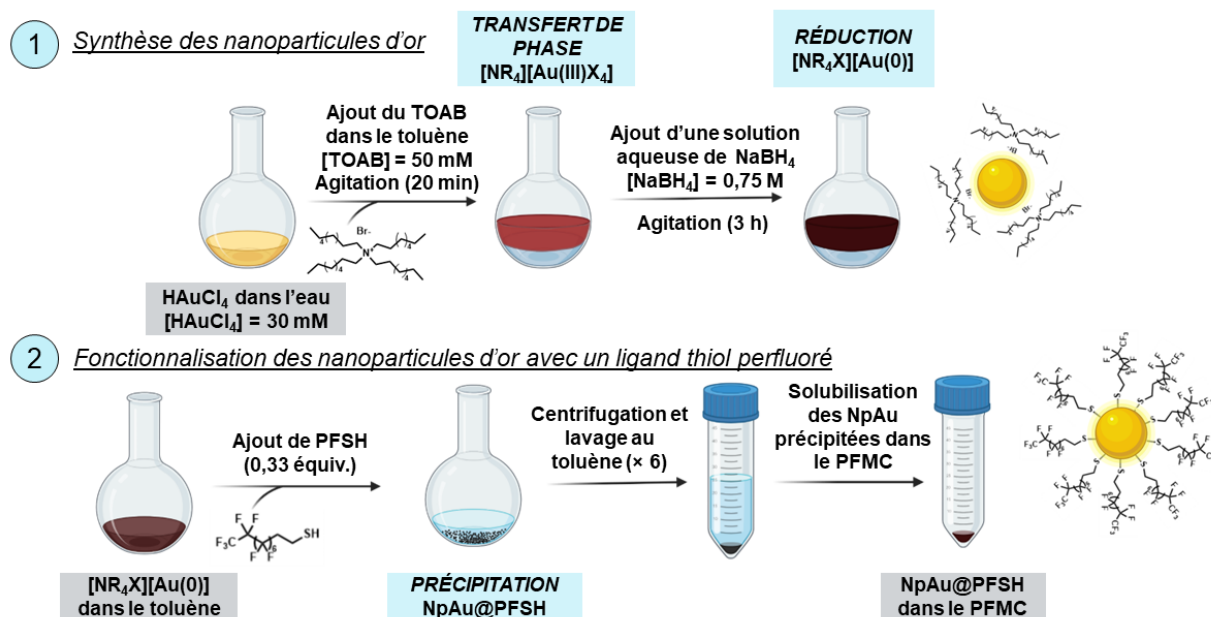


Figure 59.. Schéma de la synthèse des nanoparticules d’or perfluorées NpAu@PFSH.

Par la suite l’encapsulation au sein des micelles perfluorées PFTD-PEG a été abordée. Pour ce faire, le volume de solvant perfluoré solubilisant les nanoparticules perfluorées a d’abord dû être déterminé. La concentration moyenne en or des nanoparticules stabilisées par le TOAB (NpAu@TOAB) est de 10 mM. Les nanoparticules perfluorées issues de la précipitation des nanoparticules en suspension dans le toluène ont donc été resolubilisées dans 0,5 mL de solvant perfluoré. Un volume de NpAu@PFSH dans le PFMC de 0,1 mL a alors été mis en contact avec 1 mL de suspension micellaire PFTD-PEG 10 mg mL⁻¹ préalablement formulée. Ce mélange biphasique a été soumis à un traitement à la sonde ultrasonore divisé en trois cycles (300 ms d’impulsion par seconde, 10 min, 40 %) entre lesquels un repos d’une heure a été respecté. Une ultime étape de filtration sur un filtre de Nylon 0,2 µm a permis d’obtenir une suspension colloïdale stable de nanoparticules d’or perfluorées, encapsulées dans les micelles PFTD-PEG (NpAu@PFTD-PEG) (fig. 60).

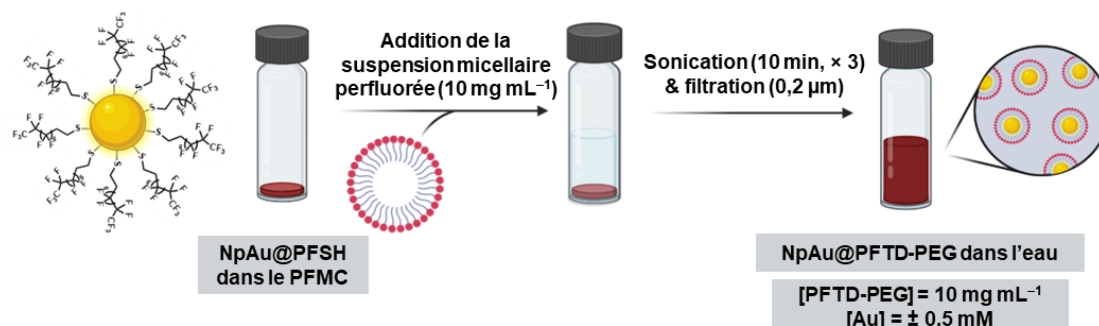


Figure 60. Schéma de l’encapsulation des NpAu@PFSH (PFMC) dans les micelles perfluorées [PFTD-PEG] = 10 mg mL⁻¹

Différentes caractérisations physico-chimiques des nanoparticules d’or stabilisées par les ligands TOAB (NpAu@TOAB) et des nanoparticules d’or perfluorées (NpAu@PFSH) encapsulées dans les micelles PFTD-PEG (NpAu@PFTD-PEG) ont été réalisées. Dans un premier temps, les spectres UV des différentes nanoparticules ont été obtenus. Tandis que les NpAu@TOAB montrent un λ_{SPR} à 520 nm, les NpAu@PFSH et NpAu@PFTD-PEG présentent un λ_{SPR} de 503 nm. Les spectres UV des nanoparticules sont rassemblés en annexe (*cf.* Annexe 3) et suggèrent un aspect sphérique des nanoparticules synthétisées. La différence de λ_{SPR} entre les NpAu@TOAB et les nanoparticules perfluorées (NpAu@PFSH et NpAu@PFTD-PEG) laisse deviner une taille des échantillons différente. L’analyse des échantillons par MET (Microscopie Électronique à Transmission) a permis de confirmer cette différence de taille des nanoparticules d’or en fonction de la nature du stabilisant ainsi que l’aspect sphérique des nanoparticules d’or synthétisées (fig. 61.b, 61.d, 61.f). De plus, l’étude de la distribution des nanoparticules à partir des images obtenues par MET a permis de calculer la taille moyenne des différentes nanoparticules. Cette étude a été réalisée sur au minimum 150 nanoparticules d’or. Ainsi, tandis que les NpAu@TOAB possèdent un diamètre moyen de $8,0 \pm 2,4$ nm (fig. 61.a), les nanoparticules d’or encapsulées au sein des micelles perfluorées (NpAu@PFTD-PEG) présentent un diamètre plus faible ($2,5 \pm 0,7$ nm) (fig. 61.e)

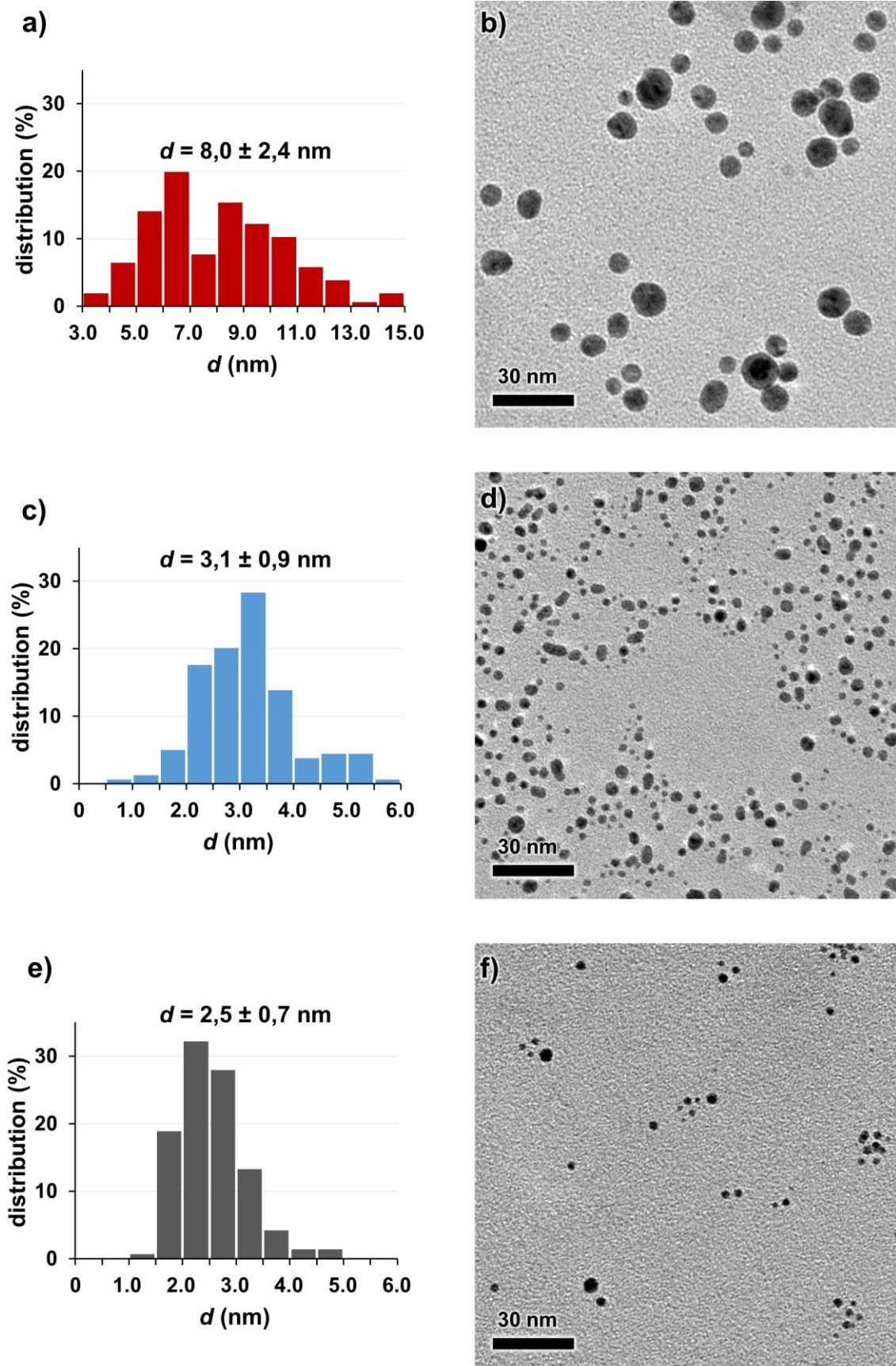


Figure 61. Caractérisations MET des nanoparticules obtenues durant la synthèse développée au laboratoire et distribution de taille des échantillons analysés par MET. a) Distribution de taille des NpAu@TOAB et b) Image obtenue par MET des NpAu@TOAB; c) Distribution de taille des NpAu@PFSH et d) Image obtenue par MET des NpAu@PFSH; e) Distribution de taille des NpAu@PFTD-PEG ($[PFTD-PEG] = 10 \text{ mg mL}^{-1}$) et f) Image obtenue par MET des NpAu@PFTD-PEG ($[PFTD-PEG] = 10 \text{ mg mL}^{-1}$)

Par la suite, la concentration en or des échantillons NpAu@PFTD-PEG a été déterminée par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (*Inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS). L’ICP-MS est une technique d’analyse élémentaire qui repose sur l’ionisation par un plasma à haute température des atomes composant un échantillon. Les ions ainsi formés sont transportés par le plasma jusqu’à un spectromètre de masse. Ils sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) et un détecteur reçoit un signal proportionnel à la concentration en ions. La concentration d’un échantillon peut ainsi être déterminée de manière précise par étalonnage à l’aide de matériaux de référence certifiés.

En ce qui concerne les NpAu@PFTD-PEG, des concentrations de l’ordre de 0,5 mM ont été calculées par ICP-MS. Dans le cadre d’un emploi des nanoparticules d’or NpAu@PFTD-PEG aux concentrations de travail déjà utilisées pour l’étude des micelles perfluorées *in vitro* ($c = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$, dilution 1/40 de la solution mère micellaire PFTD-PEG à 10 mg mL^{-1}), la concentration en or au contact des cellules B16F10 serait d’environ 12–13 μM . Un effet radioamplificateur de nanoparticules d’or simplement pégylées a déjà été démontré sur cellules B16F10 après incubation pendant 24 h des cellules B16F10 en présence de différentes concentrations de nanoparticules d’or ($c = 3 \text{ }\mu\text{M}$ ou $c = 30 \text{ }\mu\text{M}$). À 3 μM , une radioamplification est déjà observée, avec un $SE\text{R} = 1,11$. Sur d’autres lignées cellulaires tumorales, Jain *et al.* ont prouvé l’efficacité radioamplificatrice de nanoparticules de 1,9 nm de diamètre à une concentration de 12 μM avec des $SE\text{R}$ compris entre 1,16 et 1,41¹⁷⁵. Ainsi, des concentrations en or similaires à celles des NpAu@PFTD-PEG ont été employées *in vitro* dans la littérature et sembleraient induire une radioamplification efficace.

L’analyse thermogravimétrique (ATG) des nanoparticules d’or a aussi été réalisée et les résultats sont représentés dans la figure 62. Cette analyse nous permet d’accéder au pourcentage massique des différents éléments composant les NpAu@PFTD-PEG. En effet, cette analyse repose sur l’élévation progressive de la température, jusqu’à 800 °C. À une température donnée, un composé organique se dégrade et

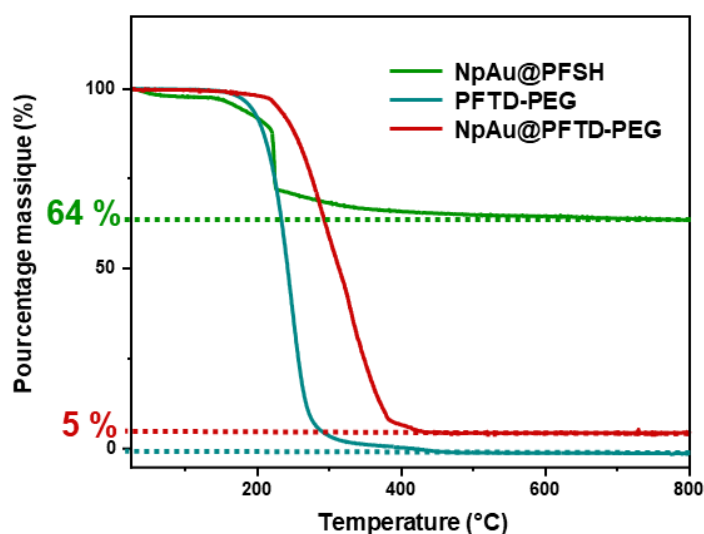


Figure 62. Profils ATG des NpAu@PFSH (courbe verte), NpAu@PFTD-PEG (courbe rouge) et PFTD-PEG (courbe bleue).

chaque échantillon organique, en fonction de sa structure chimique, se décomposera à des températures différentes. Le métal, quant à lui, ne se décomposera pas et constituera le résidu massique final. Ainsi, la composition massique des différents nano-objets métalliques peut être obtenue et il a été mis en évidence que les nanoparticules d’or stabilisées par le thiol perfluoré (NpAu@PFSH) présentaient à leur surface une couche organique qui correspondait à 36% de la masse totale de l’objet. En ce qui concerne les NpAu@PFSH encapsulées dans les micelles perfluorées, la nanoparticule d’or représente 5 % de la masse totale du nano-objet, les amphiphiles perfluorés possédant une masse molaire beaucoup plus élevée (~ 2600 g mol⁻¹).

Enfin, les nanoparticules d’or encapsulées dans les micelles perfluorées (NpAu@PFTD-PEG) ont été analysées par DLS (fig. 63.b) et une population monodisperse a été observée avec un diamètre hydrodynamique moyen de 14 nm (*PDI* = 11,5 %). La taille des micelles encapsulant les nanoparticules d’or est similaire à la taille des micelles vides, suggérant une très faible modification des propriétés physico-chimiques des micelles suite à l’encapsulation des nanoparticules d’or. L’étude du potentiel ζ des NpAu@PFTD-PEG a aussi été réalisée et a mis en avant un potentiel neutre semblable à celui observé pour les micelles vides (fig. 63.a).

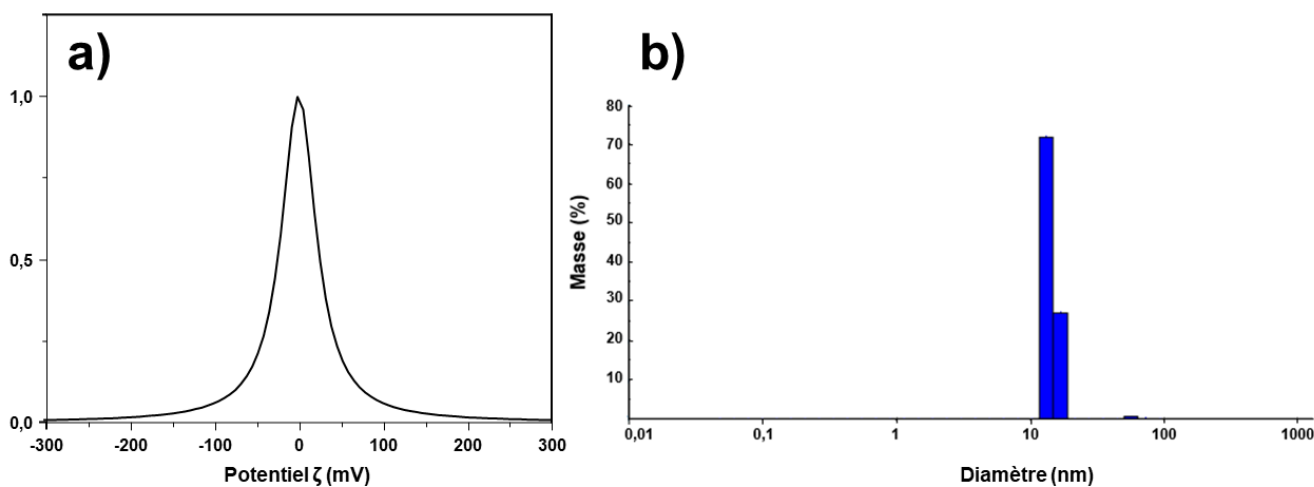


Figure 63. Mesure du potentiel ζ (a) et analyse DLS (b) des NpAu@PFTD-PEG ([PFTD-PEG] = 10 mg mL⁻¹)

En résumé, des nanoparticules d’or sphériques de 2 nm de diamètre environ ont été obtenues *via* une synthèse de Brust-Schiffirin modifiée. Ces nanoparticules d’or stabilisées par des ligands thiols perfluorés (NpAu@PFSH) ont été efficacement encapsulées au sein des micelles perfluorées PFTD-PEG grâce à plusieurs étapes d’ultrasonication (NpAu@PFTD-PEG). Les nanoparticules d’or NpAu@PFTD-PEG formulées ont été caractérisées par plusieurs techniques d’analyse : Le MET et la spectroscopie UV ont permis de confirmer l’aspect

sphérique des nanoparticules d’or ainsi que leur petite taille et leur distribution homogène, alors que l’analyse thermogravimétrique des échantillons a donné accès au pourcentage massique de ligand thiol au sein des NpAu@PFSH (~ 30 %) et au pourcentage massique d’or au sein des NpAu@PFTD-PEG (~ 5 %). La concentration en or des nanoparticules d’or dans le colloïde micellaire utilisé par la suite a été estimée à 0,5 mM par ICP-MS. Enfin, les analyses DLS et du potentiel ζ des NpAu@PFTD-PEG ont permis de mettre en avant des caractéristiques physico-chimiques similaires à celles des micelles vides.

B. Évaluation de la cytotoxicité des NpAu@PFTD-PEG

L’étude de la cytotoxicité constitue la première étape permettant de valider l’utilisation des nanoparticules sur cellules tumorales *in vitro*. L’évaluation de la toxicité sur cellules B16F10 a été réalisée par test MTS après 24 h d’exposition aux nanoparticules d’or encapsulées dans les micelles perfluorées NpAu@PFTD-PEG. Les résultats sont représentés dans la fig. 64. Par souci de simplicité et de comparaison avec les résultats obtenus pour les micelles perfluorées, les concentrations reportées sur le graphe sont les concentrations en PFTD-PEG et non en or. Ainsi, un échantillon à 0,1 mg mL⁻¹ (dilution 1/100 de la solution mère de NpAu@PFTD-PEG) contient 5 μ M d’or et un échantillon à 1 mg mL⁻¹ (dilution 1/10 de la solution mère de NpAu@PFTD-PEG) en contient 50 μ M.

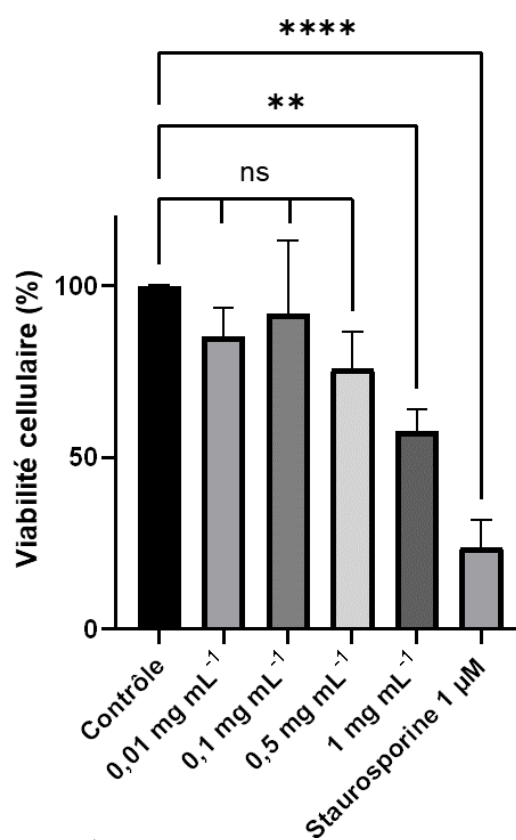


Figure 64. Évaluation de la viabilité cellulaire en fonction de la concentration en NpAu@PFTD-PEG par test MTS. ns : non significatif ; ** p < 0,01 ; **** p < 0,0001 (test ANOVA). Les résultats sont représentés en moyenne \pm écart-type.

Aucune toxicité cellulaire significative n’est observée pour des concentrations en micelles perfluorées variant de 0,01 à 0,5 mg mL⁻¹ (c’est-à-dire pour des échantillons avec une concentration en or comprise entre 5 et 25 μ M). À partir de 1 mg mL⁻¹ (ou [Au] = 50 μ M), une toxicité résiduelle est mise en évidence (avec environ 60 % de viabilité cellulaire après 24 h d’exposition). Une diminution significative de la viabilité cellulaire avait précédemment été

observée avec les micelles perfluorées à une concentration de 1 mg mL^{-1} (80 % de viabilité cellulaire après 24 h d'exposition, $p < 0,05$).

C. Évaluation de l'internalisation cellulaire des NpAu@PFTD-PEG

Afin d'exercer une activité radioamplificatrice, les micelles perfluorées chargées en nanoparticules d'or doivent être prises en charge par les cellules tumorales. Dans le but de valider l'internalisation des NpAu@PFTD-PEG dans les cellules tumorales B16F10, à l'instar des micelles perfluorées vides, un fluorophore hydrophobe, le DiD, a été encapsulé au cœur des nano-objets, à hauteur de 1 % massique (*cf.* Chapitre 1. IV. E. 1.). Ainsi, après 24 h d'incubation en présence des NpAu@PFTD-PEG ($[\text{PFTD-PEG}] = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) et coloration des noyaux à l'aide du colorant Hoechst 33342, les cellules tumorales B16F10 ont été observées par microscopie confocale (fig. 65). La présence du DiD dans les micelles perfluorées chargées en nanoparticules d'or a permis la visualisation de leur localisation intracellulaire.

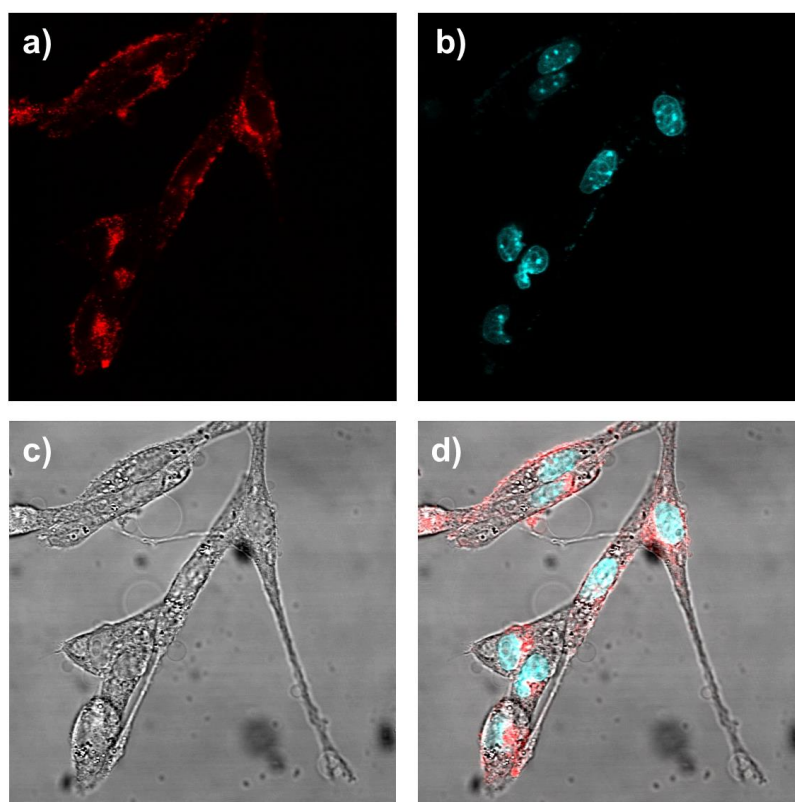


Figure 65. Images de microscopie confocale de cellules B16F10 incubées pendant 24 h en présence des micelles perfluorées encapsulant des nanoparticules d'or et chargées en fluorophore. a) DiD (NpAu@PFTD-PEG) ; b) Hoechst 33342 (noyaux) ; c) optique ; d) composite.

Ainsi, comme dans le cas des micelles perfluorées vides, les micelles perfluorées encapsulant des nanoparticules d'or présente une distribution homogène au sein du cytosol. Aucun signal

des NpAu@PFTD-PEG chargées en DiD n’a été mis en évidence au niveau du compartiment nucléaire.

D. Étude de la toxicité clonogénique des NpAu@PFTD-PEG

Dans le but d’investiguer le potentiel radioamplificateur des NpAu@PFTD-PEG sur la lignée cellulaire B16F10, il a fallu dans un premier temps confirmer l’absence d’effet des micelles perfluorées sur la capacité de prolifération des cellules tumorales. Les résultats sont représentés dans la figure 66. Dans un souci de simplicité et de comparabilité avec les résultats de toxicité clonogénique obtenus avec les micelles perfluorées, les concentrations reportées sur la figure 66 sont les concentrations en PFTD-PEG. La concentration en or de l’échantillon testé en toxicité clonogénique est de 0,5 mM ($[Au]_{mère} = 0,5$ mM)

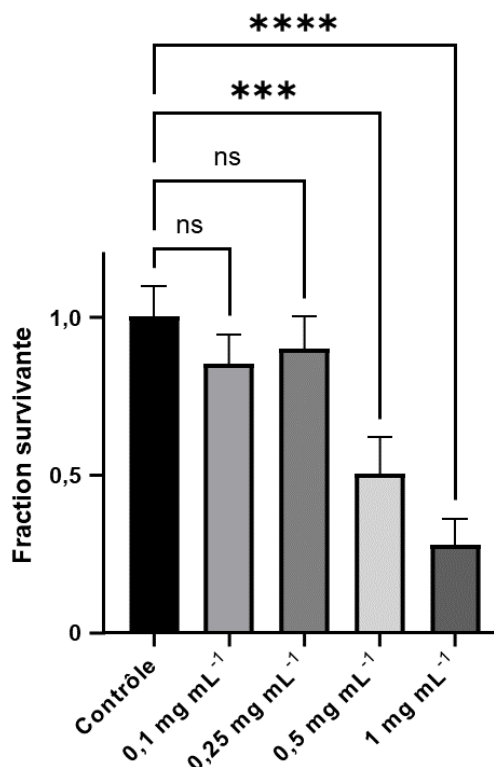


Figure 66. Étude de la toxicité clonogénique des NpAu@PFTD-PEG sur cellules B16F10. ns non significatif, *** $p < 0,0002$ **** $p < 0,0001$ (test ANOVA). Les données sont représentées en moyenne ± écart type.

Ainsi, une toxicité significative est remarquée aux fortes concentrations ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ et 1 mg mL^{-1}) tandis qu’à des concentrations inférieures ou égales à $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$, les NpAu@PFTD-PEG ne démontrent aucune influence sur la capacité de prolifération des cellules tumorales B16F10 (90 % de fraction survivante à $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$). Pour les micelles perfluorées vides, la concentration de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ a été sélectionnée pour l’étude de leur potentiel radiosensibilisant. Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus entre les NpAu@PFTD-PEG et les micelles perfluorées vides dans le but d’évaluer l’influence réelle de l’encapsulation de la nanoparticule d’or au sein de la micelle sur l’amélioration de l’efficacité des rayonnements ionisants, la concentration de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ a aussi été choisie pour les expériences futures.

Ainsi, ces études préliminaires de la toxicité des NpAu@PFTD-PEG ont permis de mettre en évidence une toxicité résiduelle à des concentrations supérieures à $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Cependant, aux concentrations de travail choisies ($c = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$), aucune toxicité significative n’a été remarquée, que ce soit en test MTS ou lors de l’évaluation de la toxicité clonogénique. Ces

résultats sont encourageants pour la suite que constitue l'évaluation *in vitro* du potentiel radioamplificateur des nanoparticules d'or NpAu@PFTD-PEG. Au vu des résultats très prometteurs des micelles perfluorées « vides », une augmentation de l'efficacité des rayonnements ionisants sur la lignée cellulaire tumorale B16F10 est attendue. En effet, outre l'effet radiosensibilisant de la micelle perfluorée, *via* une augmentation de la perfusion en dioxygène des cellules tumorales, un effet radioamplificateur de la nanoparticule d'or devrait être observé. L'évaluation de la l'efficacité synergique des deux composants des NpAu@PFTD-PEG sera donc réalisée par la suite sur la lignée cellulaire tumorale B16F10.

E. Évaluation du potentiel radioamplificateur des NpAu@PFTD-PEG

Une fois l'absence de toxicité des micelles perfluorées encapsulant des nanoparticules d'or avérée, leur potentiel radioamplificateur a été évalué sur les cellules B16F10. Comme pour les micelles perfluorées vides, après exposition des cellules tumorales B16F10 pendant 24 h aux NpAu@PFTD-PEG ou aux micelles vides perfluorées, les cellules sont irradiées à différentes doses puis ensemencées à différentes densités cellulaires et laissées à incuber pendant 7 jours. Après 7 jours, la fraction survivante pour chacune des conditions est déterminée par comptage des colonies formées (> 64 cellules, 8 mitoses). Une courbe de survie est alors établie pour les cellules de la condition contrôle, les cellules exposées aux micelles perfluorées vides et pour les cellules exposées aux NpAu@PFTD-PEG (fig.67).

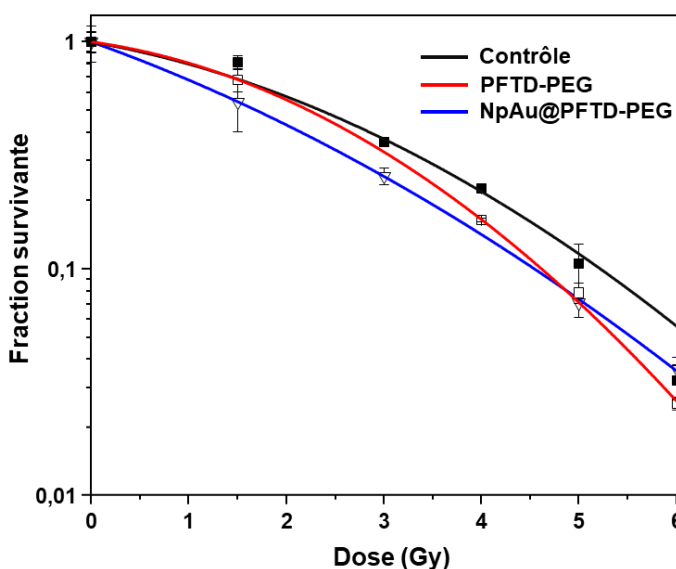


Figure 67. Évolution de la survie des cellules B16F10 en fonction de la dose d'irradiation (Gy) avec ou sans exposition préalable aux micelles perfluorées (0,25 mg mL⁻¹) ou aux NpAu@PFTD-PEG ([PFTD-PEG] = 0,25 mg mL⁻¹, [Au] = 12,5 μM). Les données sont représentées en moyenne ± écart-type et ont été modélisées à l'aide d'OriginPro par un modèle polynomial du 2nd ordre tel que $y = \text{Intersection} + ax + bx^2$. L'intersection dans les 3 conditions peut être approximée à 0. La courbe noire correspond au modèle polynomial de la condition contrôle ($R^2 = 0,978$), la courbe rouge correspond au modèle polynomial de la condition micelles PFTD-PEG 0,25 mg mL⁻¹ ($R^2 = 0,999$) et la courbe bleue correspond au modèle polynomial de la condition NpAu@PFTD-PEG ($R^2 = 1$).

Une modélisation à l'aide d'une fonction polynomiale du second ordre a permis l'accès à différents paramètres mettant en évidence le potentiel radioamplificateur des NpAu@PFTD-

PEG tels que le *SER*, la $SF_{2 Gy}$ ou encore le $DEF_{2 Gy}$ des cellules irradiées pré-exposées aux NpAu@PFTD-PEG. En ce qui concerne la $SF_{2 Gy}$, celle-ci est de 0,64 pour les cellules du groupe contrôle, de 0,55 pour les cellules traitées par les micelles perfluorées vides et de 0,43 pour les micelles perfluorées chargées en nanoparticules d’or. De plus, un DEF_{2Gy} de 1,45 ainsi qu’un *SER* de 1,26 ont été obtenus pour les cellules pré-exposées aux NpAu@PFTD-PEG. Ainsi, dans ces conditions, les micelles perfluorées chargées en nanoparticules d’or (NpAu@PFTD-PEG) semblent présenter une efficacité radiosensibilisante plus importante que celle des micelles perfluorées vides. Ces résultats mettent en lumière l’effet radioamplificateur du cœur nanoparticulaire métallique et la relation synergique existant entre la nanoparticule d’or et la micelle perfluorée, source de dioxygène. Il est à noter que l’action radioamplificatrice des nanoparticules AGuIX a été évaluée dans des conditions comparables sur le même type cellulaire tumoral B16F10. Ainsi, après exposition des cellules B16F10 à une concentration fixe de nanoparticules AGuIX ($c = 0,6 \text{ mg L}^{-1}$) et irradiation, des courbes de survie ont pu être obtenues. Une valeur de *DEF* de 1,3 ainsi qu’une $SF_{2 Gy}$ de 0,46 ont pu être calculés, mettant en évidence le potentiel radioamplificateur des nanoparticules AGuIX¹⁷². Dès lors, comparativement aux nanoparticules AGuIX dont l’action radioamplificatrice a été prouvée sur le même type tumoral B16F10, les micelles perfluorées chargées en nanoparticules d’or démontrent une efficacité équivalente, voire supérieure. De plus, par rapport à d’autres systèmes de nanoparticules d’or décrits dans la littérature, les micelles perfluorées chargées en nanoparticules d’or présentent une activité radiosensibilisante similaire¹⁷⁵.

Les micelles perfluorées chargées en nanoparticules d’or ont permis une radiosensibilisation efficace des cellules tumorales B16F10, supérieure à celle médiée par les micelles perfluorées vides. La combinaison du cœur nanoparticulaire métallique et de la micelle perfluorée, réservoir de dioxygène, semblerait induire une maximisation de l’efficacité tumoricide des rayonnements ionisants.

V. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre nous avons décrit la synthèse de nanoparticules d’or sphériques de 2 nm de diamètre environ présentant un revêtement perfluoré via une modification de la synthèse de Brust-Schiffrin. Les nanoparticules perfluorées ont été par la suite encapsulées au cœur des micelles perfluorées ce qui a permis l’obtention d’une suspension colloïdale stable de NpAu@PFTD-PEG. Ces nanoparticules perfluorées encapsulées au sein des micelles PFTD-PEG ont été caractérisées par plusieurs techniques (MET, UV, DLS, potentiel ζ) et un profil

sphérique ainsi qu'une distribution de taille homogène et une absence de charge de surface ont pu être mis en évidence. *In vitro*, la toxicité de ces nanoparticules a été déterminée en test MTS et en test de survie clonogénique. À la concentration utilisée afin d'induire une radiosensibilisation efficace avec les micelles perfluorées PFTD-PEG ($c = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$), les NpAu@PFTD-PEG ne présentent aucune toxicité significative, permettant dès lors de valider leur utilisation future *in vitro*. L'évaluation du potentiel radioamplificateur des nanoparticules perfluorées *in vitro* a été réalisée. Les résultats préliminaires obtenus sont très encourageants, mettant en avant une supériorité d'efficacité radiosensibilisante des NpAu@PFTD-PEG vis-à-vis des micelles perfluorées vides.

Pour rappel, le potentiel radioamplificateur des nanoparticules d'or se traduit par une augmentation du stress oxydant dans la cellule *via* la potentialisation de la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène après irradiation. Ainsi, afin de mettre en avant l'effet radioamplificateur des nanoparticules d'or, le dosage des espèces réactives de l'oxygène au sein de la cellule grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes sensibles à la quantité de ROS cytosoliques est envisagé par la suite. De plus, une étude quantitative *in vitro* de la génération de cassures double-brin et simple-brin en complément d'une irradiation pourrait nous permettre de confirmer le potentiel radioamplificateur des NpAu@PFTD-PEG.

Conclusion générale

| Conclusion générale

Conclusion générale

Dans le premier chapitre, nous avons décrit la synthèse d'un amphiphile perfluoré capable de s'auto-assembler sous forme de micelles en milieu aqueux. Cet amphiphile (PFTD-PEG) présente une queue hydrophobe perfluorée et une tête polaire poly(éthylène glycol) et a facilement été synthétisé à partir de produits de départ commerciaux. Les différentes caractérisations physico-chimiques des micelles perfluorées ainsi formulées ont été réalisées et ont pu mettre en évidence une valeur de CMC basse ($0,056 \text{ mg mL}^{-1}$) ainsi qu'un diamètre moyen d'une dizaine de nanomètres et une charge surfacique neutre. Dans le cadre d'une utilisation *in vivo*, les paramètres des micelles perfluorées sont optimaux. En effet, une valeur de CMC basse constitue une garantie de l'intégrité micellaire jusqu'au site tumoral et la faible taille des micelles peut faciliter leur extravasation et leur pénétration au sein de la matrice extracellulaire. En plus de favoriser la pénétration au sein du stroma tumoral, la petite taille des micelles permet en théorie de limiter leur prise en charge par le système phagocytaire mononucléé, tout comme la charge surfacique neutre. En ce sens, la couche hydrophile créée par le PEG de surface devrait, elle aussi, limiter l'interaction de la micelle avec les macrophages. La capacité de prise en charge du dioxygène des micelles perfluorées a été évaluée et les différentes expériences ont confirmé l'intérêt du cœur perfluoré, celui-ci permettant de solubiliser plus de dioxygène que certains surfactants hydrocarbonés courants (triton X 100, SDS). Un relargage plus lent du dioxygène a, par ailleurs, été observé pour la suspension micellaire perfluorée, en comparaison aux conditions contrôle (eau, triton X 100 et SDS). Ce phénomène de rétention peut s'avérer intéressant lors d'une utilisation des micelles *in vivo*. *In vitro*, les micelles n'ont démontré aucune cytotoxicité significative dans les conditions testées (de $0,01$ à $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) que ce soit en test MTS ou en test de toxicité clonogénique. La localisation intracellulaire ainsi que la cinétique d'internalisation des micelles perfluorées ont été étudiées et une accumulation intracellulaire des micelles perfluorées dépendante du temps d'exposition et de la concentration a été démontrée. L'étude du mécanisme d'endocytose des micelles perfluorées au sein des cellules tumorales B16F10 a pu prouver une internalisation des micelles majoritairement médiée par la voie des clathrines et des cavéoles. Enfin, un effet radiosensibilisant des micelles perfluorées ($c = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) a été mis en avant *in vitro* sur la lignée cellulaire de mélanome murin B16F10 sous irradiation γ (*SER* de 1,23). D'autres paramètres permettant de démontrer une action radiosensibilisante des micelles perfluorées ont pu être extrapolés à partir des courbes de survie obtenues. La valeur de ces paramètres est en adéquation avec ceux décrits dans la littérature pour d'autres nanoparticules utilisées en tant qu'agents radiosensibilisants ou radioamplificateurs. Dans cette première partie du travail, les micelles perfluorées ont été pleinement caractérisées et leur intérêt en tant qu'agent de transport

Conclusion générale

du dioxygène a été validé. Leur comportement *in vitro* a été déterminé et leur absence de cytotoxicité ainsi que leur internalisation cellulaire ont pu être confirmées. Enfin, l'efficacité radiosensibilisante des micelles perfluorées a été prouvée *in vitro*. En préambule d'une évaluation *in vivo* de l'efficacité thérapeutique des micelles perfluorées, il nous a fallu évaluer leur comportement au sein de l'organisme ainsi que leur tropisme tumoral. Cette évaluation a été détaillée dans le chapitre suivant.

Dans le chapitre 2, l'étude de la biodistribution des micelles perfluorées par imagerie TEP a donc été menée. Pour ce faire, un amphiphile perfluoré présentant une tête polaire desferrioxamine, agent chélatant de référence du ^{89}Zr , a été incorporé aux micelles perfluorées. Cet amphiphile a été obtenu *via* une synthèse multi-étape et intégré au sein des micelles perfluorées initiales, à hauteur de 10 % massiques (PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10). Les micelles mixtes perfluorées ont été formulées en milieu aqueux et caractérisées à l'aide de différentes techniques (DLS, zêta). Elles semblent posséder un profil semblable aux micelles perfluorées PFTD-PEG initiales avec une charge surfacique neutre ainsi qu'un diamètre moyen d'une dizaine de nanomètres. L'étude de l'efficacité de radiomarquage des micelles mixtes perfluorées au ^{89}Zr a été conduite et un rendement de radiomarquage supérieur à 90 % a été obtenu. La capacité des micelles mixtes perfluorées à prendre en charge de manière efficace le ^{89}Zr a donc été prouvée, confirmant dès lors leur potentiel en tant qu'agent radiotraceur dans le contexte d'un suivi du devenir de la micelle par imagerie TEP. *In vitro*, les micelles mixtes perfluorées n'ont démontré aucune cytotoxicité apparente à des concentrations inférieures à 1 mg mL^{-1} , au même titre que les micelles perfluorées initiales. Dans le cadre d'une utilisation des micelles perfluorées *in vivo*, une étude de tolérance a été réalisée sur souris saines et aucun signe clinique, reflet d'une souffrance physique, n'a été observé après leur injection par voie intraveineuse. Cette étape a permis de valider l'utilisation des micelles perfluorées sur modèle murin. L'étude de biodistribution a été concrétisée et par la suite, les micelles mixtes perfluorées radiomarquées PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 ont été injectées par voie intraveineuse sur des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées B16F10. Le devenir des micelles [^{89}Zr]-PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 a été suivi par imagerie TEP et l'analyse des images issues de la reconstruction du signal a permis de déterminer leur profil de distribution au sein de l'organisme sur 7 jours. L'analyse des images TEP a mis en évidence une accumulation tumorale importante des micelles perfluorées avec un maximum atteint 24 h après injection ainsi qu'une élimination majoritairement hépatique. L'accumulation tumorale des micelles perfluorées a ainsi été

démontrée, permettant de considérer une étude future de l'évaluation de l'efficacité radiosensibilisante des micelles perfluorées *in vivo*.

Dans les chapitres 1 et 2, les micelles perfluorées ont donc été étudiées en profondeur. Leur comportement *in vitro* et *in vivo* a été caractérisé, de l'échelle cellulaire à l'échelle tissulaire et leur potentiel théranostique a pu être mis en évidence. Ainsi, leurs différentes caractéristiques semblent optimales pour envisager une évaluation de leur potentiel radiosensibilisant *in vivo*. Cet effet radiosensibilisant des micelles perfluorées semblerait résulter d'une augmentation de la perfusion en dioxygène des cellules tumorales, ceci entraînant une fixation des dommages à l'ADN ainsi qu'une synthèse accrue de ROS au sein de la cellule tumorale. Forts de ces résultats très encourageants, nous avons envisagé une complexification de l'assemblage micellaire afin d'exploiter au maximum les propriétés de transport du dioxygène du cœur perfluoré. Ainsi, l'encapsulation au sein de la micelle perfluorée d'une nanoparticule d'or faciliterait le rapprochement d'une source de dioxygène (le cœur perfluoré) et d'une entité métallique capable de générer une douche d'électrons secondaires sous irradiation. La synergie entre ces deux effets (apport d'oxygène et radioamplification) devrait induire la génération locale d'une grande quantité de ROS. La construction d'une telle plateforme multimodale a été considérée par la suite.

Dans le chapitre 3, la synthèse de nanoparticules d'or sphériques de 2 nm de diamètre recouvertes de ligands thiols perfluorés a été décrite. Leur encapsulation efficace au sein des micelles perfluorées a ensuite été réalisée et a conduit à l'obtention de solutions colloïdales stables NpAu@PFTD-PEG contenant 0,5 mM d'or. Ces nanoparticules ont été par la suite caractérisées par différentes techniques (DLS, TEM, UV, ATG) avant d'être utilisées *in vitro*. Enfin, les nanoparticules NpAu@PFTD-PEG n'ont pas démontré d'activité cytotoxique en-dessous de 0,5 mg mL⁻¹ chez les cellules de mélanome murin B16F10. L'évaluation du potentiel radiosensibilisant des NpAu@PFTD-PEG *in vitro* aux concentrations testées pour les micelles perfluorées vides ($c = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) a été réalisée et les résultats prometteurs obtenus restent à confirmer. La contribution radioamplificatrice de la nanoparticule métallique semblerait induire une amélioration significative de l'efficacité radiosensibilisante des micelles perfluorées.

Conclusion générale

| Bibliographie

Bibliographie

- ¹ Hanahan, D. *et al.*, *Cell*, **2000**, *100*, 57–70
- ² Hanahan, D. *et al.*, *Cell*, **2011**, *144*, 646–674
- ³ Whiteside, T. L. *et al.*, *Oncogene*, **2008**, *27*, 5904–5912
- ⁴ García-Figueiras, R. *et al.*, *Insights Imaging*, **2019**, *10*, 28
- ⁵ Sullivan, R. *et al.*, *Lancet Oncol.*, **2015**, *16*, 1193–1224
- ⁶ Baskar, R. *et al.*, *Int. J. Med. Sci.*, **2012**, *9*, 193–199
- ⁷ Khan, F. M. *et al.*, Khan's the physics of radiation therapy. 5th edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer; **2014**, 572 pages
- ⁸ Choi, W. H. *et al.*, *J. Korean Med. Sci.*, **2016**, *31*, S75–87
- ⁹ Knoll, G, Radiation Detection and Measurement, 4th edition, USA: John Wiley & Sons, Inc., **2010**, 816 pages
- ¹⁰ Hunter, N. *et al.*, *J. Radiol. Prot.*, **2009**, *29*, 5–21
- ¹¹ Tinganelli, W. *et al.*, *Cancers*, **2020**, *12*, 3022
- ¹² Thariat, J. *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*, 133
- ¹³ Lomax, M. E. *et al.*, *Clin. Oncol.*, **2013**, *25*, 578–585
- ¹⁴ Pinel, S., Thèse de doctorat : Conséquences de l'érythropoïétine recombinante humaine sur l'hypoxie tumorale et l'efficacité de la radiothérapie sur deux gliomes malins humains xenogreffés, Université de Lorraine, Juin, **2004**
- ¹⁵ Breen, A. P. *et al.*, *Free Radic. Biol. Med.*, **1995**, *18*, 1033–1077
- ¹⁶ Foray, N. *et al.*, *Radiology*, **2012**, *264*, 627–631
- ¹⁷ Iliakis, G. E. *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.*, **1990**, *57*, 1195–1211
- ¹⁸ Pawlik, T. M. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol.*, **2004**, *59*, 928–942
- ¹⁹ Withers, H. R. *et al.*, *Adv. Radiat. Biol.*, **1975**, *5*, 241–271
- ²⁰ Hennequin, C. *et al.*, *Cancer/Radiothérapie*, **2019**, *23*, 500–502
- ²¹ Genet, S. C. *et al.*, *J. Cell Physiol.*, **2013**, *228*, 1473–1481
- ²² Thoday, J. M. *et al.*, *Nature*, **1947**, *160*, 608
- ²³ Okunieff, P. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol.*, **1993**, *26*, 631–636
- ²⁴ Liu, C. *et al.*, *Radiat. Res.*, **2015**, *183*, 487–496
- ²⁵ Gray, L. H. *et al.*, *Br. J. Radiol.*, **1953**, *26*, 638–648
- ²⁶ Telarovic, I. *et al.*, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **2021**, *40*, 197
- ²⁷ Rockwell, S. *et al.*, *Curr. Mol. Med.*, **2009**, *9*, 442–458
- ²⁸ Barendsen, G. W. *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **1966**, *10*, 317–327
- ²⁹ Vaupel, P. *et al.*, *Cancer Metastasis Rev.*, **2007**, *26*, 225–239

Bibliographie

- ³⁰ Vaupel, P. *et al.*, *Appl. Magn. Reson.*, **2021**, *52*, 1451–1479
- ³¹ Chang, L. *et al.*, *Cell Death Dis.*, **2014**, *5*, e1437
- ³² Lee, J. M. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci.*, **1993**, *90*, 5742–5746
- ³³ Theys, J. *et al.*, *Radiother. Oncol.*, **2011**, *99*, 392–397
- ³⁴ Tsukamoto, H. *et al.*, *Gynecol. Oncol.*, **2007**, *107*, 500–504
- ³⁵ Barker, H. E. *et al.*, *Nat. Rev. Cancer*, **2015**, *15*, 409–425
- ³⁶ Baker, D. G. *et al.*, *Cancer Invest.*, **1989**, *7*, 287–294
- ³⁷ Yamauchi, M. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **2018**, *128*, 16–25
- ³⁸ Wang, Z. *et al.*, *Cell Commun. Signal.*, **2019**, *17*, 47
- ³⁹ Suwa, T. *et al.*, *Exp. & Mol. Med.*, **2021**, *53*, 1029–1035
- ⁴⁰ Kato, *et al.* *Cancer Cell Int.*, **2013**, *13*, 89
- ⁴¹ Huang, L. E. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci.*, **1998**, *95*, 7987–7992
- ⁴² Moeller, B. *et al.*, *Br. J. Cancer*, **2006**, *95*, 1–5
- ⁴³ Birner, P. *et al.*, *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 4693–4696
- ⁴⁴ Overgaard, J. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, **2007**, *25*, 4066–4074
- ⁴⁵ Lartigau, E. *et al.*, *Eur. J. Cancer*, **1998**, *34*, 856–861
- ⁴⁶ Levine, E. A. *et al.*, *Oncol. Res. Treat.*, **1993**, *16*, 79–87
- ⁴⁷ Thews, O. *et al.*, *Br. J. Cancer*, **1998**, *78*, 752–756
- ⁴⁸ Temkin, S. M. *et al.*, *Int. J. Gynecol. Cancer*, **2006**, *16*, 1855–1861
- ⁴⁹ Dicato, M. *et al.*, *Curr. Opin. Oncol.*, **2010**, *22*, 307–311
- ⁵⁰ Abraham, D. J. *et al.*, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 9141–9149
- ⁵¹ Rockwell, S. *et al.*, *Radiat. Oncol. Investig.*, **1998**, *6*, 199–208
- ⁵² Shaw, E. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, **2003**, *21*, 2364–2371
- ⁵³ Suh, J. H. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, **2006**, *24*, 106–114
- ⁵⁴ Eccles, C. L. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol.*, **2008**, *72*, S50
- ⁵⁵ Riess, J. G., *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, **2005**, *33*, 47–63
- ⁵⁶ Kirsch, P., *Modern fluoroorganic chemistry: Synthesis, reactivity, applications*, Wiley-VCH, **2006**, 320 pages
- ⁵⁷ Lin, C. Y. *et al.*, *Biomed. Res. Int.*, **2013**, 404361
- ⁵⁸ Cosco, D. *et al.*, *J. Fluor. Chem.*, **2015**, *171*, 18–26
- ⁵⁹ Jägers, J. *et al.*, *Pflügers Archiv – Eur. J. Physiol.*, **2021**, *473*, 139–150
- ⁶⁰ Clark, L. C. *et al.*, *Science*, **1966**, *152*, 1755–1756
- ⁶¹ Dalvi, V. H., *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci.*, **2010**, *107*, 13603–13607
- ⁶² Holman, R. *et al.*, *Front. Chem.*, **2022**, *9*, 810029

- ⁶³ Spahn, D. R. *et al.*, *Crit Care.*, **1999**, 3, R93–R97
- ⁶⁴ Martin, D. F. *et al.*, *Radiat. Res.*, **1987**, 112, 45
- ⁶⁵ Evans, R. G. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1990**, 19, 415–420
- ⁶⁶ Rose, C. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1986**, 12, 1325–1327
- ⁶⁷ Police, A. M. *et al.*, *Crit. Care Med.*, **1985**, 13, 96–98
- ⁶⁸ Johnson, J. L. H. *et al.*, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **2015**, 11, 274–281
- ⁶⁹ Anu, M. E. S. *et al.*, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, **2017**, 263, 032019
- ⁷⁰ Mitragotri, S. *et al.*, *MRS Bull.*, **2014**, 39, 219–223
- ⁷¹ Patel, K. D. *et al.*, *Mater. Horiz.*, **2019**, 6, 434–469
- ⁷² Wang, Y. *et al.*, *Trends Biotechnol.*, **2011**, 29, 205–212
- ⁷³ Pérez, E. M. *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44, 6425–6433
- ⁷⁴ Gobre, V. V. *et al.*, *Nat. Commun.*, **2013**, 4, 2341
- ⁷⁵ Ghaffari, M. *et al.*, Chapter 17 - Nanotechnology for pharmaceutical In *Industrial Applications of Nanomaterials*. Elsevier, **2019**, Pages 475–502
- ⁷⁶ Quarta, A. *et al.*, *Nanoscale*, **2012**, 4, 3319
- ⁷⁷ Storm, G. *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1995**, 17, 31–48
- ⁷⁸ Nie, S. *et al.*, *Nanomedicine (Lond)*, **2010**, 5, 523–528
- ⁷⁹ Tengjisi, *et al.*, *J. Colloid. Interface Sci.*, 2022, 606, 1737–1744.
- ⁸⁰ Hashizume, H. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, **2000**, 156, 1363–1380
- ⁸¹ Greish, K. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting, *Cancer Nanotechnology*. Totowa, Humana Press; **2010**, Pages 25–37
- ⁸² Maeda, H., *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, **2012**, 88, 53–71
- ⁸³ Brigger, I. *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2012**, 64, 24–36
- ⁸⁴ Fam, S. Y. *et al.*, *Nanomaterials*, **2020**, 10, 787
- ⁸⁵ Hoang, T. T. T. *et al.*, *Polymers*, **2020**, 12, 298
- ⁸⁶ Jiang, J. *et al.*, *Polymers (Basel)*, **2019**, 11, 1019
- ⁸⁷ Yang, W. *et al.*, *Nano Today*, **2014**, 9, 10–16
- ⁸⁸ Knop, K. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 6288–6308
- ⁸⁹ Fang, Y. *et al.*, *Drug Deliv.*, **2017**, 24, 22–32
- ⁹⁰ Kapse, A. *et al.*, Chapter 6 - Polymeric micelles: a ray of hope among new drug delivery systems, In *Advances in Pharmaceutical Product Development and Research, Drug Delivery Systems*, Academic Press, **2020**, Pages 235–289
- ⁹¹ Kopecký, F. *et al.*, *Acta Fac. Pharm. Univ. Comen.*, **2007**, 54, 84–94
- ⁹² Lu, Y. *et al.*, *Nano Res.*, **2018**, 11, 4985–4998

Bibliographie

- ⁹³ Lu, Y., *et al.*, *Nat. Biomed. Eng.*, **2018**, 2, 318–325
- ⁹⁴ Buwalda, S. *et al.*, *J. Colloid. Interf. Sci.*, **2018**, 514, 468–478
- ⁹⁵ Zhuang, W. R. *et al.*, *J. Control. Release*, **2019**, 294, 311–326
- ⁹⁶ Shuai, X. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **2004**, 15, 441–448
- ⁹⁷ Talelli, M. *et al.*, *Nano Today*, **2015**, 10, 93–117
- ⁹⁸ Ogier, J. *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 3902–3907
- ⁹⁹ He, Z. *et al.*, *Biomaterials*, **2016**, 101, 296–309
- ¹⁰⁰ Simoes, S. M. N. *et al.*, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2014**, 12, 1–22
- ¹⁰¹ Hoshyar, N. *et al.*, *Nanomedicine (Lond.)*, **2016**, 11, 673–692
- ¹⁰² Lee, H-Y. *et al.*, *Biomaterials*, **2015**, 53, 583–591
- ¹⁰³ Song, G. *et al.*, *Adv. Mater.*, **2016**, 28, 2716–2723
- ¹⁰⁴ Song, G. *et al.*, *Biomaterials*, **2017**, 112, 257–263
- ¹⁰⁵ Ninomiya, K. *et al.*, *Ultrason. Sonochem.*, **2016**, 28, 54–61
- ¹⁰⁶ Xu, L. *et al.*, *J. Transl. Med.*, **2016**, 14, 268
- ¹⁰⁷ Zhou, Z. *et al.*, *Theranostics*, **2018**, 8, 4898–4911
- ¹⁰⁸ Gao, M. *et al.*, *Adv. Mater.*, **2017**, 1701429
- ¹⁰⁹ Yu, P. *et al.*, *Adv. Therap.*, **2019**, 1900031
- ¹¹⁰ Cheng, Y. *et al.*, *Nat. Commun.*, **2015**, 6, 8785
- ¹¹¹ Wang, Q. *et al.*, *Biomater. Sci.*, **2018**, 6, 3096
- ¹¹² Mackiewicz, N. *et al.*, *Small*, **2011**, 7, 2786–2792
- ¹¹³ Jamgotchian, L. *et al.*, *Nanoscale*, **2021**, 13, 2373
- ¹¹⁴ Cerqueira, P. *et al.*, *Int. J. Pharmaceutics*, **2019**, 566, 282–290
- ¹¹⁵ Panja, P. *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.* **2020**, 11, 2363–2368
- ¹¹⁶ Chauhan, V. P. *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, **2012**, 7, 383–388
- ¹¹⁷ Xiao, K. *et al.*, *Biomaterials*, **2011**, 32, 3435e3446
- ¹¹⁸ Perinelli, D. R. *et al.*, *Langmuir*, **2020**, 36, 5745–5753
- ¹¹⁹ Fluksman, A. *et al.*, *Anal. Methods*, **2019**, 11, 3810–3818
- ¹²⁰ Bhattarai, A. *et al.*, *Scientific World*, **2014**, 12, 41–43
- ¹²¹ Fan, M. *et al.*, *ACS Appl. Bio Mater.*, **2018**, 1, 708–713
- ¹²² Pitarresi, G. *et al.*, *J. Fluor. Chem.*, **2008**, 129, 1096–1103
- ¹²³ Mäger, I. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, 1798, 338–343
- ¹²⁴ McManus, J. M. *et al.*, *PLoS One*, **2019**, 14, e0224081
- ¹²⁵ Penninckx, S. *et al.*, *Nanomedicine (Lond.)*, **2018**, 13, 2917–2937
- ¹²⁶ Carvalho, I. C. *et al.*, *Nanotheranostics*, **2021**, 5, 213–239

- ¹²⁷ Wu, Y. *et al.*, *Anal. Chem.*, **2019**, *91*, 14261–14267
- ¹²⁸ Trono, J. D. *et al.*, *J. Radiat. Res.*, **2011**, *52*, 103–109
- ¹²⁹ Zhang, B. *et al.*, *Small*, **2009**, *5*, 2716–2721
- ¹³⁰ Tsolou, A. *et al.*, *Int. J. Nanomedicine*, **2020**, *15*, 4899–4918
- ¹³¹ Chen, J. *et al.*, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2011**, *37*, 1339–1346
- ¹³² Lu, F. *et al.*, *Small*, **2009**, *12*, 1408–1413
- ¹³³ Nel, A. E. *et al.*, *Nat. Mater.*, **2009**, *8*, 543–557
- ¹³⁴ Bao, G. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 9997–9998
- ¹³⁵ Zhang, S. *et al.*, *ACS Nano*, **2015**, *8*, 8655–8671
- ¹³⁶ Deserno, M. *et al.*, *EPL*, **2003**, *62*, 767
- ¹³⁷ Chrithrani, B. D. *et al.*, *Nano Lett.*, **2006**, *6*, 662–668
- ¹³⁸ Chrithrani, B. D. *et al.*, *Nano Lett.*, **2007**, *7*, 1542–1550
- ¹³⁹ Li, Y. *et al.*, *Biomaterials*, **2014**, *35*, 8467–8478
- ¹⁴⁰ Francia, V. *et al.*, *ACS Nano*, **2019**, *13*, 11107–11121
- ¹⁴¹ De Almeida, M. S. *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, *50*, 5397
- ¹⁴² Lesniak, A. *et al.*, *ACS Nano*, **2012**, *6*, 5845–5857
- ¹⁴³ Jiang, X. *et al.*, *ACS Nano*, **2010**, *4*, 6787–6797
- ¹⁴⁴ Rennick, J. J. *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, **2021**, *16*, 266–276
- ¹⁴⁵ Mayor, S. *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2007**, *8*, 603–612
- ¹⁴⁶ Deirdre, P. O. *et al.*, *J. Cell Biol.*, **1998**, *141*, 101–114
- ¹⁴⁷ Le, P. U. *et al.*, *J. Cell Sci.*, **2003**, *116*, 1059–1071
- ¹⁴⁸ Parton, R. G. *et al.*, *Dev. Cell.*, **2004**, *7*, 458–460
- ¹⁴⁹ Heuser, J. E. *et al.*, *J. Cell Biol.*, **1989**, *108*, 389–400
- ¹⁵⁰ Wang, L. H. *et al.*, *J. Cell Biol.*, **1993**, *123*, 1107–1117
- ¹⁵¹ Casella, J. *et al.*, *Nature*, **1981**, *293*, 302–305
- ¹⁵² Koivisalo, M. *et al.*, *J. Cell Biol.*, **2010**, *188*, 547–563
- ¹⁵³ Pelkmans, L. *et al.*, *Traffic*, **2002**, *3*, 311–320
- ¹⁵⁴ Nabi, I. R. *et al.*, *J. Cell Biol.*, **2003**, *161*, 673–677
- ¹⁵⁵ Kozera, L. *et al.*, *PLOS One*, **2009**, *4*, e8312
- ¹⁵⁶ Pautu, V. *et al.*, *Cancers*, **2021**, *13*, 2028
- ¹⁵⁷ Du, R. *et al.*, *Int. J. Nanomedicine*, **2014**, *9*, 3091–3105
- ¹⁵⁸ Dutta, D. *et al.*, *Cell Logist.*, **2012**, *2*, 203–208
- ¹⁵⁹ Gravel, E. *et al.*, *Nanoscale*, **2013**, *5*, 1955
- ¹⁶⁰ Akinc, A. *et al.*, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2013**, a016980

Bibliographie

- ¹⁶¹ Wu, M. *et al.*, *Int. J. Nanomedicine*, **2019**, *14*, 4247–4259
- ¹⁶² Sulheim, E. *et al.*, *J. Nanobiotechnol.*, **2016**, *14*, 1
- ¹⁶³ Manzanares, D. *et al.*, *Pharmaceutics*, **2020**, *12*, 371
- ¹⁶⁴ Mazumdar, S. *et al.*, *Acta Pharm. Sin. B.*, **2021**, *11*, 903–924
- ¹⁶⁵ Yang, J. *et al.*, *ACS Cent. Sci.*, **2016**, *2*, 621–630
- ¹⁶⁶ Minafra, L. *et al.*, *Sci. Rep.*, **2019**, *9*, 1134
- ¹⁶⁷ Swanner, J. *et al.*, *Int. J. Nanomedicine*, **2015**, *10*, 3937–3953
- ¹⁶⁸ Roach, M. C. *et al.*, *J. Thorac. Dis.*, **2018**, *10*, S2465–S2473
- ¹⁶⁹ Subiel, A. *et al.*, *Theranostics*, **2016**, *6*, 1651–1671
- ¹⁷⁰ Detappe, A. *et al.*, *Cancer Nanotechnol.*, **2015**, *6*, 1–9
- ¹⁷¹ Lux F, *et al.*, *J. Soc. Fr. Radiother. Oncol.*, **2015**, *19*, 508–514
- ¹⁷² Kotb, S. *et al.*, *Theranostics*, **2016**, *6*, 418–427
- ¹⁷³ Štefančíková, L. *et al.*, *Cancer Nanotechnol.*, **2014**, *5*, 6
- ¹⁷⁴ Retif, P. *et al.*, *Theranostics*, **2015**, *5*, 1030–1044
- ¹⁷⁵ Jain, S. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **2011**, *79*, 531–539
- ¹⁷⁶ Chen, N. *et al.*, *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 40514
- ¹⁷⁷ Wang, C. *et al.*, *J. Nanopart. Res.*, **2013**, *15*, 1642
- ¹⁷⁸ Tchoryk, A. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **2019**, *30*, 1371–1384
- ¹⁷⁹ Ter-Pogossian, M. *et al.*, *Radiology*, **1975**, *114*, 89–98
- ¹⁸⁰ Sæterstøl, J., Thèse de doctorat : Characterization of Scintillation Crystals for Positron Emission Tomography, Bergen University, Juin, **2010**
- ¹⁸¹ Palmer, M. R. *et al.*, *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, **2005**, *52*, 1391–1395
- ¹⁸² Moses, W. W., *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A.*, **2011**, *648*, s236–240
- ¹⁸³ Raylman, R. R. *et al.*, *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, **1996**, *43*, 2460–2412
- ¹⁸⁴ Mohammadi, I. *et al.*, *Biomed. Phys. Eng. Express*, **2019**, *5*, 062001
- ¹⁸⁵ Vodovar, D. *et al.*, *Méd. Intensive Réa.*, **2019**, *8*, 347–352
- ¹⁸⁶ Moulin, F., Thèse de doctorat : Développement du Zirconium-89 pour le radiomarquage d'anticorps monoclonaux pour la tomographie par émission de positons, Université de Strasbourg, Avril, **2021**
- ¹⁸⁷ O'Hara, M. J. *et al.*, *J. Chromatogr. A.*, **2018**, *1545*, 48–58
- ¹⁸⁸ Holland, J. P. *et al.*, *J. Med. Biol.*, **2009**, *36*, 729–739
- ¹⁸⁹ Yoon, J. K. *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*, 4309
- ¹⁹⁰ Dahl, K. *et al.*, *Clin. Transl. Imaging*, **2017**, *5*, 275–289
- ¹⁹¹ Jacobson, O. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **2015**, *26*, 1–18

- ¹⁹² McInnes, L. E. *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, **2017**, 352, 499-516
- ¹⁹³ Feiner, I.V.J. *et al.*, *Cancers*, **2021**, 13, 4466
- ¹⁹⁴ Hummel, W. *et al.*, Chemical thermodynamics of compounds and complexes of U, Np, Pu, Am, Tc, Se, Ni and Zr with selected organic ligands, Volume 9, 1st edition, Elsevier, Amsterdam; Boston, **2005**, 1030 pages
- ¹⁹⁵ Saha, R. *et al.*, *J. Basic Microbiol.*, **2012**, 52, 1–15
- ¹⁹⁶ Meijjs, W. E. *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.*, **1992**, 3, 1443–1447
- ¹⁹⁷ Holland, J. P. *et al.*, *J. Nucl. Med.*, **2010**, 51, 1293–1300
- ¹⁹⁸ Holland, J. P. *et al.*, *Inorg. Chem.*, **2020**, 59, 2070–2082
- ¹⁹⁹ Börjesson, P. K. E. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **2006**, 12, 2133–2140
- ²⁰⁰ Jauw, Y. W. S. *et al.*, *Front. Pharmacol.*, **2016**, 7, 131
- ²⁰¹ Pandit-Taskar, N. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **2015**, 21, 5277–5285
- ²⁰² Wuensche, T. E. *et al.*, *Theranostics*, **2022**, 12, 7067–7079
- ²⁰³ Abou, D. S. *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, **2011**, 38, 675–681
- ²⁰⁴ Patra, M. *et al.*, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 11523–11525
- ²⁰⁵ Brandt, M. *et al.* *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2020**, 25, 789–796
- ²⁰⁶ Vugts, D. J. *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2017**, 44, 286–295
- ²⁰⁷ White, L. D. *et al.*, *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 11–18
- ²⁰⁸ Allott, L. *et al.*, *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 8529–8532
- ²⁰⁹ Sarbisheh, E. K. *et al.*, *Inorg. Chem.*, **2020**, 59, 11715–11727
- ²¹⁰ Alnahwi, A. H. *et al.*, *ACS Omega*, **2020**, 5, 10731–10739
- ²¹¹ Raavé, R. *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2019**, 46, 1966–1977
- ²¹² Pandya, D. M. *et al.*, *Chem. Sci.*, **2017**, 8, 2309–2314
- ²¹³ Deri, M. A. *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, **2013**, 40, 3–14
- ²¹⁴ Kretzschmar, R. *et al.*, *Geochem. Trans.*, **2009**, 10, 5
- ²¹⁵ Szijj, P. A. *et al.*, *Drug Discov. Today : Technol.*, **2018**, 30, 27–34
- ²¹⁶ Heskamp, S. *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, **2017**, 28, 2211–2223
- ²¹⁷ Verel, I. *et al.*, *J. Nucl. Med.*, **2003**, 44, 1271–1281
- ²¹⁸ Cohen, R. *et al.*, *Nat. Protoc.*, **2013**, 8, 1010–1018
- ²¹⁹ Giesen, D. *et al.*, *Sci. Rep.*, **2022**, 12, 6286
- ²²⁰ Ihnat, P. M. *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **2000**, 89, 1525–1536
- ²²¹ Bellotti, D. *et al.*, *Molecules*, **2021**, 26, 3255
- ²²² Vosjan, M. W. D. *et al.*, *Nat. Protoc.*, **2010**, 5, 739–743
- ²²³ Perrault, S. D. *et al.*, *Nano Lett.*, **2009**, 9, 1909–1915

Bibliographie

- ²²⁴ Poon, W. *et al.*, *ACS Nano*, **2019**, *13*, 5785–5798
- ²²⁵ Zhang, G. *et al.*, *Biomaterials*, **2009**, *30*, 1928–1936
- ²²⁶ Zhang, Y. N. *et al.*, *J. Control. Rel.*, **2016**, *240*, 332–348
- ²²⁷ Yu, M. *et al.*, *ACS Nano*, **2015**, *9*, 6655–6674
- ²²⁸ Truillet, C. *et al.*, *Mol. Pharm.*, **2016**, *13*, 2596–2601
- ²²⁹ Bort, G. *et al.*, *Theranostics*, **2020**, *10*, 1319–1331
- ²³⁰ Cabral, H. *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, **2011**, *6*, 815–823
- ²³¹ Lammers, T. *et al.*, *J. Control. Release*, **2005**, *110*, 103–118
- ²³² Dasgupta, A. *et al.*, *Theranostics*, **2020**, *10*, 956–967
- ²³³ Wihelm, S. *et al.*, *Nat. Rev. Mater.*, **2016**, *1*, 16014
- ²³⁴ Gupta, N. *et al.*, *Eur. J. Cancer*, **2002**, *38*, 2094–2107
- ²³⁵ Dhillon, S. *et al.*, Basic Pharmacokinetics In Clinical pharmacokinetics, Edition Pharmaceutical Press, London, **2006**, 44 pages
- ²³⁶ Gabrielsson, J. *et al.*, Computational Toxicology: Volume I, Methods in Molecular Biology, vol. 929, Springer Science, **2012**
- ²³⁷ Curry, S. H. *et al.*, Introduction to Drug Disposition and Pharmacokinetics, First Edition, John Wiley & Sons, **2017**
- ²³⁸ Noe, D. A. *et al.*, *Clin. Pharm. Drug. Dev.*, **2020**, *9*, S35
- ²³⁹ Toutain, P. L. *et al.*, *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **2004**, *27*, 441–453
- ²⁴⁰ Magaña, I. B. *et al.*, *Ther. Deliv.*, **2015**, *6*, 777–783
- ²⁴¹ Yu, M. *et al.*, *ACS Nano.*, **2015**, *9*, 6655–6674
- ²⁴² Amoozgar, Z. *et al.*, *WIREs. Nanomed. Nanobiotechnol.*, **2012**, *4*, 219–233
- ²⁴³ Bailly, A-L. *et al.*, *Sci. Rep.*, **2019**, *9*, 12890
- ²⁴⁴ Arvizo, R. R. *et al.*, *PLOS One*, **2011**, *6*, e24374
- ²⁴⁵ Lin, Z. *et al.*, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, **2015**, *7*, 189–217
- ²⁴⁶ Huang, X. *et al.*, *J. Adv. Res.*, **2010**, *1*, 13–28
- ²⁴⁷ Link, S. *et al.*, *J. Phys. Chem. B.*, **1999**, *103*, 4212–4217
- ²⁴⁸ Liu, X. Y. *et al.*, *Drug Discov.*, **2021**, *26*, 1284–1292
- ²⁴⁹ Riley, S. R. *et al.*, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, **2017**, e1449
- ²⁵⁰ Li, W. *et al.*, *Nanomedicine (Lond)*, **2015**, *10*, 299–320
- ²⁵¹ Ahn, S. *et al.*, *Molecules*, **2013**, *18*, 5858–5890
- ²⁵² Cole, L. E. *et al.*, *Nanomedicine (Lond)*, **2015**, *10*, 321–341
- ²⁵³ Whitehead, C. B. *et al.*, *Mater. Adv.*, **2021**, *2*, 186
- ²⁵⁴ Shi, L. *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.*, **2017**, *492*, 191–198

- ²⁵⁵ Wuithschick, M. *et al.*, *ACS Nano*, **2015**, 9, 7052–7071
- ²⁵⁶ Brust, M. *et al.*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 801–802
- ²⁵⁷ Perala, S. R. K. *et al.*, *Langmuir*, **2013**, 29, 9863–9873
- ²⁵⁸ Daruich De Souza, C. *et al.*, *J. Alloys Compd*, **2019**, 798, 714–740
- ²⁵⁹ Park, J. W. *et al.*, *ACS Nano*, **2015**, 9, 1665–1682
- ²⁶⁰ Poonthiyil, V. *et al.*, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2018**, 14, 11–24
- ²⁶¹ Brennan, J. L. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **2006**, 17, 1373–1375
- ²⁶² Wang, A. *et al.*, *J. Phys. Chem.*, **2016**, 120, 24231–24239
- ²⁶³ Da Silva, B. A. *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2020**, 161, 977–998
- ²⁶⁴ Yang, W. *et al.*, *Biomaterials*, **2009**, 30, 5617–5621
- ²⁶⁵ Cai, Z. *et al.*, *Pharm. Res.*, **2017**, 34, 579–590
- ²⁶⁶ Li, S. *et al.*, *Nanomedicine (Lond)*, **2019**, 14, 317–333
- ²⁶⁷ Kim, W. *et al.*, *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 10971
- ²⁶⁸ Zhang, A. *et al.*, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **2021**, 22, 616–626
- ²⁶⁹ Goddard, Z. R. *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, **2020**, 49, 8774–8789
- ²⁷⁰ Bhattacharyya, S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, 107, 14541–14546
- ²⁷¹ Russell-Jones, G. *et al.*, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, 98, 1625–1633
- ²⁷² Samadian, H. *et al.*, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **2016**, 142, 2217–2229
- ²⁷³ Enferadi, M. *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.*, **2018**, 94, 124–136
- ²⁷⁴ Nimjee, S. M., *et al.*, *Annu. Rev. Med.*, **2005**, 56, 555–583
- ²⁷⁵ Sun, H. *et al.*, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **2014**, 3, e182
- ²⁷⁶ Ai, J. *et al.*, *Talanta*, **2014**, 118, 54–60
- ²⁷⁷ Hu, C. *et al.*, *Int. J. Nanomedicine*, **2015**, 10, 2065–2077
- ²⁷⁸ Ma, N. *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, 9, 13037–13048
- ²⁷⁹ Butterworth, K. T. *et al.*, *Nanoscale*, **2012**, 4, 4830
- ²⁸⁰ Herold, M. *et al.*, *Int. J. Radiat. Biol.*, **2000**, 76, 1357–1364
- ²⁸¹ Hainfeld, J. F. *et al.*, *Phys. Med. Biol.*, **2004**, 49, N309–315
- ²⁸² Hainfeld, J. F. *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, **2010**, 60, 977–985
- ²⁸³ Zhang X-D, *et al.*, *Biomaterials*, **2012**, 33, 6408–6419
- ²⁸⁴ Joh D.Y., *et al.*, *PLoS One*, **2013**, 8, e62425
- ²⁸⁵ Zhang, X-D. *et al.*, *Sci. Rep.*, **2015**, 5, 8669
- ²⁸⁶ Chattopadhyay, N. *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, **2013**, 137, 81–91
- ²⁸⁷ Li, S. *et al.*, *Nanomedicine (Lond.)*, **2019**, 14, 317–333
- ²⁸⁸ Chen, N. *et al.*, *RSC Adv.*, **2015**, 5, 40514–40520

Bibliographie

- ²⁸⁹ Wang C. *et al.*, *J. Nanoparticle Res.*, **2013**, *15*, 1642
- ²⁹⁰ Khoshgard, K, *et al.*, *Phys. Med. Biol.*, **2014**, *59*, 2249–2263
- ²⁹¹ Booth, S. G. *et al.*, *Chem. Sci.*, **2017**, *8*, 7954
- ²⁹² Goulet, P. J. G. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 9582–9584
- ²⁹³ Li, Y. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 2092–2095
- ²⁹⁴ Dass, A. *et al.*, *Langmuir*, **2008**, *24*, 310–315
- ²⁹⁵ Nanda, S. *et al.*, *J. Chem. Educ.*, **2021**, *98*, 1982–1987
- ²⁹⁶ Shimpi, J. R. *et al.*, *Langmuir*, **2018**, *34*, 13680–13689
- ²⁹⁷ Gentilini, C. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 15678–15682
- ²⁹⁸ Yonezawa, T. *et al.*, *Langmuir*, **2001**, *17*, 2291–2293

| Liste des figures

Liste des figures

Figure 1. Caractéristiques communes à tous les types de cancer ²	5
Figure 2. Le microenvironnement tumoral.....	6
Figure 3. Différentes modalités de radiothérapie externe ⁸	8
Figure 4. Effet Compton.....	10
Figure 5. Effet photoélectrique et effet Auger.	11
Figure 6. Phénomène de production de paire.	11
Figure 7. Diagramme d'interaction des photons avec la matière en fonction de l'énergie incidente ⁹	12
Figure 8. Dépôt de dose en fonction de la profondeur dans l'eau ¹¹	13
Figure 9. Actions directe et indirecte des rayonnements ionisants sur la molécule d'ADN... 14	14
Figure 10. Lésions directes à l'ADN.	15
Figure 11. Courbe de survie de cellules situées en phase G2/M et en phase S tardive en fonction de la dose d'irradiation appliquée (en Gray) ¹⁷	18
Figure 12. Courbe de survie des tissus en fonction du ratio α/β et en fonction de la dose délivrée (Gy) ²⁰	19
Figure 13. Courbe de survie des tissus en fonction du nombre de doses fractionnées d'irradiation.....	20
Figure 14. Pourcentage d'aberrations chromosomiques en fonction de la présence d'oxygène ou d'azote dans le milieu en fonction de la durée post-exposition (en h) ²²	21
Figure 15. Diagramme schématique du microenvironnement tumoral ³⁹	25
Figure 16. Configuration moléculaire des composés perfluorés ⁵⁶	28
Figure 17. Schéma des différentes structures nanoparticulaires.	37
Figure 18. Schéma général illustrant l'effet EPR.	39
Figure 19. Synthèse du système nanoparticulaire développé par Song <i>et al</i> ¹⁰⁴	46
Figure 20. Nanoparticule développée par Zhou <i>et al</i> ¹⁰⁷	47
Figure 21. Structure et formulation de l'assemblage micellaire développé par Wang <i>et al</i> ¹¹¹ .49	49
Figure 22. Voie réactionnelle pour la synthèse de l'amphiphile PFTD-PEG. i. TsCl (5 équiv.), NEt ₃ (5 équiv.), DCM anh., TA, 16 h, 78 % ii. PFTD (4 équiv.), NaH 60 % (4 équiv.), 3 jours, 75 °C, 63 %	51

Liste des figures

- Figure 23.** a) Mesure DLS d'une suspension micellaire PFTD-PEG 100 % à 10 mg mL⁻¹ (H₂O). b) Mesure du potentiel ζ d'une suspension micellaire PFTD-PEG 100 % à 10 mg mL⁻¹ (H₂O).
..... 52
- Figure 24.** Mesure de l'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration d'amphiphile PFTD-PEG..... 54
- Figure 25.** Évolution de la concentration en O₂ au cours du temps dans différentes suspensions micellaires préalablement saturées en O₂ et tableau recensant les différents paramètres issus de l'exploitation du modèle exponentiel (OriginPro, R² > 0,9)..... 57
- Figure 26.** Suivi de l'évolution de la concentration en dioxygène au cours du temps après ajout dans un grand volume d'eau dégazée de 0,2 mL de suspension micellaire saturée en O₂. Modèle polynomial d'ordre 2 obtenu avec OriginPro (R² > 0,9)..... 58
- Figure 27.** Étude de la cytotoxicité des micelles PFTD-PEG sur cellules B16F10 par test MTS. * p < 0,05 **** p < 0,0001 (test ANOVA). Les données sont représentées en moyenne \pm écart type. 59
- Figure 28.** Images en microscopie confocale de cellules B16F10 incubées pendant 24 h en présence des micelles perfluorées chargées en fluorophore. a) DiD (micelles) ; b) Hoechst 33342 (noyaux) ; c) optique ; d) composite. 60
- Figure 29** Évolution de l'internalisation cellulaire de micelles PFTD-PEG en fonction du temps (lignée cellulaire B16F10). La courbe en pointillés représente le modèle exponentiel obtenu à l'aide d'OriginPro t.q. $y = a(1 - e^{-kt})$ (R² = 0,9981). Les données sont représentées en moyenne \pm SEM. 61
- Figure 30.** Schématisation de l'enveloppement des nanoparticules par endocytose médiée par la clathrine (A), par endocytose médiée par les récepteurs indépendamment de la clathrine (B) et par simple adsorption de la nanoparticule (ciblage passif) (C)¹³³. 63
- Figure 31.** Évolution de l'internalisation cellulaire de micelles perfluorées en fonction de la concentration [PFTD-PEG] (lignée cellulaire B16F10). La droite en pointillés représente le modèle de régression linéaire obtenu à l'aide d'OriginPro t.q. $y = ax + b$ (R² = 0,995). Les données sont représentées en moyenne \pm SEM..... 67
- Figure 32.** Principales voies d'endocytose des nanoparticules. Aml : Amiloride ; Gen. : Genistéine ; Sucr. : Sucrose..... 70
- Figure 33.** Étude de la cytotoxicité des différents inhibiteurs d'endocytose par test MTS sur cellules B16F10. ns: non significatif (p > 0,05) (test ANOVA). Les données sont représentées en moyenne \pm écart type..... 72
- Figure 34.** Évaluation du mécanisme d'endocytose des micelles perfluorées sur cellules tumorales B16F10. ns : non significatif, ****p < 0,0001 (test ANOVA). Les données sont représentées en moyenne \pm écart-type..... 72

- Figure 35.** Test de toxicité clonogénique sur cellules B16F10 en présence de concentrations croissantes de micelles PFTD-PEG. * $p < 0,05$ (test ANOVA). Les données sont représentées en moyenne \pm écart-type. 75
- Figure 36.** Évolution de la survie des cellules B16F10 en fonction de la dose d'irradiation (Gy) avec ou sans exposition préalable aux micelles perfluorées ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$). Les données sont représentées en moyenne \pm écart-type et ont été modélisées à l'aide d'OriginPro par un modèle polynomial du 2nd ordre tel que $y = \text{Intersection} + ax + bx^2$. L'intersection dans les 2 conditions peut être approximée à 0 ($-9,31 \cdot 10^{-4} \pm 0,0164$ pour la condition contrôle et $0,058 \pm 0,021$ pour la condition PFTD-PEG). La courbe pleine correspond au modèle polynomial de la condition contrôle ($R^2 = 0,996$) et la courbe en pointillés correspond au modèle polynomial de la condition PFTD-PEG $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ($R^2 = 0,997$). 76
- Figure 37.** Principe physique du TEP. 86
- Figure 38.** Erreur parallaxe¹⁸⁴ 89
- Figure 39.** Schéma de désexcitation du $^{89}\text{Zr}^{186}$ 91
- Figure 40.** Structure de la desferrioxamine B et structure DFT du complexe [^{89}Zr]-DFO¹⁹⁷ . 93
- Figure 41.** Structures des différents dérivés de la desferrioxamine¹⁹³ 95
- Figure 42.** Structure générale de l'amphiphile PFTD-DFO. 97
- Figure 43.** Voie de synthèse du thiol perfluoré (**II.5**) **i.** TsCl (0,1 équiv.), NaOH (1,6 équiv.), THF, 5 h, 0 °C à TA, 94 % **ii.** HSTrt (1,25 équiv.), NaOH (1,25 équiv.), toluène/éthanol/eau 1:1:0,4, 16 h, TA, 56 % **iii.** TsCl (2 équiv.), NET3 (5 équiv.), DCM anh., 16 h, 0 °C à TA, 79 % **iv.** PFTD (4 équiv.), NaH 60 % (4 équiv.), THF anh., 3 jours, 75 °C, 61 % **v.** TFA (5 équiv.), TIPS (5 équiv.), DCM anh., 16 h, TA, 72 % 99
- Figure 44.** Synthèse du PFTD-DFO **vi.** **II.6** (1,1 équiv.), DIPEA (1 équiv.), DMF/H₂O 10:1, 2 h, TA, 59 %, **vii.** **II.5** (1 équiv.), **II.7** (1 équiv.), K₂CO₃ (1 équiv.), DMSO anh., 24 h, TA, 34 % 99
- Figure 45.** Diagramme de distribution des espèces ioniques de la desferrioxamine en fonction du pH²²¹ 100
- Figure 46.** PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 a) Mesure du potentiel ζ d'une suspension micellaire PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 dans une solution aqueuse de NaOH 0,1 M ($c = 15 \text{ mg mL}^{-1}$) b) Mesure DLS d'une suspension micellaire PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 dans NaOH 0,1 M ($c = 15 \text{ mg mL}^{-1}$) c) Mesure du potentiel ζ d'une suspension micellaire PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 dans H₂O ($c = 10 \text{ mg mL}^{-1}$) d) Mesure DLS d'une suspension micellaire PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 dans H₂O ($c = 10 \text{ mg mL}^{-1}$) 102
- Figure 47.** iTLC des micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 après radiomarquage (A) et après purification sur PD10 (B). 103

Liste des figures

- Figure 48.** Test MTS des micelles mixtes PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 sur la lignée cellulaire B16F10. ns : non significatif, ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$ (test ANOVA). Les données sont représentées en moyenne \pm écart-type..... 104
- Figure 49.** Évaluation de la tolérance de souris C57BL/6 vis-à-vis d'une injection intraveineuse de suspension micellaire PFTD-PEG 100 %. $n = 3$, $V = 100 \mu\text{L}$ 105
- Figure 50.** a) Biodistribution des micelles mixtes perfluorées radiomarquées dérivée de l'analyse des images TEP via le logiciel PMOD ($n = 5$ souris) ** $p < 0,01$ et **** $p < 0,0001$ (test ANOVA) b) Biodistribution *ex vivo* des micelles mixtes perfluorées radiomarquées ($n = 5$ souris) **** $p < 0,0001$ (test de Student) c) Corrélation entre la quantification de l'accumulation des micelles mixtes perfluorées radiomarquées dans les tissus par biodistribution *ex vivo* et par analyse des images TEP (test de Pearson) $R^2 = 0,91$ $r = 0,95$. Les données sont représentées en moyenne \pm écart-type..... 106
- Figure 51.** Prise en charge des nanoparticules par le foie. Figure adaptée de Poon *et al.*²²⁴A: Prise en charge des grosses nanoparticules par les cellules de Kuppfer B: Extravasation des petites nanoparticules à travers les pores de l'endothélium hépatique vers l'espace de Disse C: Internalisation des petites nanoparticules par les hépatocytes et évacuation dans le canalicule biliaire..... 108
- Figure 52.** Évolution du pourcentage de dose injectée par unité de volume dans les intestins dérivée de l'analyse des images TEP à l'aide du logiciel PMOD. $n = 3$ souris. Les données sont représentées en moyenne \pm écart-type..... 109
- Figure 53.** Images TEP d'une souris injectée par voie intraveineuse avec des micelles mixtes perfluorées radiomarquées au ^{89}Zr . La flèche blanche indique la localisation de la tumeur. 111
- Figure 54.** Évolution des ratios tumeur/muscle et tumeur/sang au cours du temps. Évolution du pourcentage de dose injectée par unité de volume dans la tumeur et dans le sang au cours du temps. Les données sont représentées en moyenne \pm écart-type. 111
- Figure 55.** Autoradiographie (a, c) et coupes H&E (b, d) de sections tumorales de $5 \mu\text{m}$ à 24 (a, b) et 48 h (c, d) post-injection. 112
- Figure 56.** TAC plasmatique des micelles perfluorées radiomarquées extraite par imagerie TEP en Log10..... 113
- Figure 57:** Schéma synthétique des modes d'interaction métal-photon. 134
- Figure 58.** Diagramme de comparaison des coefficients d'absorption massique de l'or et des tissus mous en fonction de l'énergie incidente²⁷⁹. 136
- Figure 59.** Schéma de l'encapsulation des NpAu@PFSH (PFMC) dans les micelles perfluorées [PFTD-PEG] = 10 mg mL^{-1} 143
- Figure 60.** Schéma de la synthèse des nanoparticules d'or perfluorées NpAu@PFTD 144

- Figure 61.** Caractérisations MET des nanoparticules obtenues durant la synthèse développée au laboratoire et distribution de taille des échantillons analysés par MET. a) Distribution de taille des NpAu@TOAB et b) Image obtenue par MET des NpAu@TOAB; c) Distribution de taille des NpAu@PFSH et d) Image obtenue par MET des NpAu@PFSH; e) Distribution de taille des NpAu@PFTD-PEG ([PFTD-PEG] = 10 mg mL⁻¹) et f) Image obtenue par MET des NpAu@PFTD-PEG ([PFTD-PEG] = 10 mg mL⁻¹)..... 145
- Figure 62.** Profils ATG des NpAu@PFSH (courbe verte), NpAu@PFTD-PEG (courbe rouge) et PFTD-PEG (courbe bleue). 146
- Figure 63.** Mesure du potentiel ζ (a) et analyse DLS (b) des NpAu@PFTD-PEG ([PFTD-PEG] = 10 mg mL⁻¹)..... 147
- Figure 64.** Évaluation de la viabilité cellulaire en fonction de la concentration en NpAu@PFTD-PEG par test MTS. ns : non significatif ; ** p < 0,01 ; **** p < 0,0001 (test ANOVA). Les résultats sont représentés en moyenne \pm écart-type..... 148
- Figure 65.** Images de microscopie confocale de cellules B16F10 incubées pendant 24 h en présence des micelles perfluorées encapsulant des nanoparticules d'or et chargées en fluorophore. a) DiD (NpAu@PFTD-PEG) ; b) Hoechst 33342 (noyaux) ; c) optique ; d) composite..... 150
- Figure 66.** Étude de la toxicité clonogénique des NpAu@PFTD-PEG sur cellules B16F10. ns non significatif, *** p < 0,0002 **** p < 0,0001 (test ANOVA). Les données sont représentées en moyenne \pm écart type..... 150
- Figure 67.** Évolution de la survie des cellules B16F10 en fonction de la dose d'irradiation (Gy) avec ou sans exposition préalable aux micelles perfluorées (0,25 mg mL⁻¹) ou aux NpAu@PFTD-PEG ([PFTD-PEG] = 0,25 mg mL⁻¹, [Au] = 12,5 μ M). Les données sont représentées en moyenne \pm écart-type et ont été modélisées à l'aide d'OriginPro par un modèle polynomial du 2nd ordre tel que $y = \text{Intersection} + ax + bx^2$. L'intersection dans les 3 conditions peut être approximée à 0. La courbe noire correspond au modèle polynomial de la condition contrôle ($R^2 = 0,978$), la courbe rouge correspond au modèle polynomial de la condition PFTD-PEG 0,25 mg mL⁻¹ ($R^2 = 0,999$) et la courbe bleue correspond au modèle polynomial de la condition NpAu@PFTD-PEG ($R^2 = 1$)..... 152
- Figure 68.** UV (a) and DLS (b) profiles of micellar PFTD-PEG suspension containing 1% DiD w/w. 193

Experimental section

| Experimental section

Experimental section

General procedures

All commercially available reagents and solvents were purchased from Sigma Aldrich, VWR, Fluorochem or Acros Organic and were used without further purification. Anhydrous DMF was purchased in anhydrous form and used without further purification. THF was dried from sodium/benzophenone under nitrogen atmosphere and dichloromethane was distilled from calcium hydride under nitrogen. Reactions were monitored by TLC (silica 230-240 mesh, 0,25 mm, Merck) and organic compounds were visualized using UV light (254 nm), ninhydrine and potassium permanganate as developing agents. Purifications by column chromatography were performed using Silica Gel 60 (0.040–0.063 mm). Automated purifications were performed by flash chromatography on compact silica gel column on CombiFlash Rf 150 (Teledyne Isco) using RediSepRf columns (particle size: 40-63 μm , irregular, Mesh size: 230-400, pore size: 60 \AA).

^1H NMR (400 MHz), ^{13}C NMR (100 MHz), ^{19}F NMR (376 MHz) were performed on a Bruker Avance 400 MHz spectrometer. Chemical shifts were reported in parts per million (ppm) downfield from residual solvent peaks and coupling constants were reported in Hertz (Hz). Splitting patterns were designated as singlet (s), broad singlet (br. s), doublet (d), triplet (t). Splitting patterns that could not be interpreted or easily visualized were designated as multiplet (m). Spectra were analyzed using MestRenova software. Residual solvent peaks were marked with a cross on NMR spectra.

Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (UPLC-MS) analyses were performed using a Waters system equipped with an ELSD detector (SEDEX 100, SEDERE), a diode array detector (Acquity PDA e λ Detector) coupled with a simple quadrupole detector (SQ detector 2). The system is also equipped with a BEH Xbridge C18 (50 \times 2,1 mm; 1,7 μm) column (Solvent A : MilliQ water + 0.1% HCO_2H ; Solvent B : Acetonitrile + 0.1% HCO_2H). Mass spectra were recorded in positive and negative ion mode in a range of 100–2000 m/z and were treated with MassLynx software. Electrospray mass spectra were performed on a ESI-Quadrupole autopurify from Waters (pump 2545, mass ZQ2000) Mass Spectrometer. Quantifications were performed a Waters Autopurify system equipped with a DEDL detector (PL-ELS 1000), a diode array detector (Diode 2996) coupled with a quadrupole mass analyzer (Micromass ZQ). The system is also equipped with a BEH Xbridge C18 (100 \times 4.6 mm; 3.5 μm) column (Solvent A : MilliQ water + 0.1% HCO_2H ; Solvent B : Acetonitrile + 0.1% HCO_2H). Mass spectra were recorded in positive and negative ion mode in a range of 100–2000 m/z and were treated with MassLynx software.

Experimental section

High resolution mass spectroscopy of the final compounds were determined using a Xevo® G2-XS QToF. Absorbances were measured on a UV JASCO V-750.

Micelles were purified using NAP™-25 columns sold by GE Healthcare. Columns were prepacked with Sephadex G-25 DNA Grade resin and compound were eluted using distilled water by gravity.

Thermogravimetric analyses were carried out on a Mettler-Toledo TGA 2 machine using the STARe software for result exploitation.

Ultrasonic mixing was achieved using a Branson sonifier 550 system with a 3 mm tapered microtip (300 ms/s pulses, output power 40%).

Dynamic light scattering (DLS) experiments were performed on a VascoFlex instrument from Cordouan Technologies using a laser diode ($\lambda = 450$ nm) at 20 °C. For gold nanoparticle analysis, DLS analysis was performed on a NanoStar DLS analyzer (Wyatt technologies) with a 660 nm laser at 25 °C

Electron microscopy observations were acquired using a TECNAI 20 G2 FEI. microscope operated at 200 kV. Pictures were analyzed using ImageJ software.

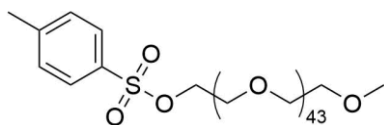
ICP-MS analyses were performed on an iCap Q spectroscope from Thermo Scientific and data was analysed with Qtegra software.

Flow cytometry acquisitions were performed on the Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer (Invitrogen). If otherwise mentioned, fluorescence intensity of 10 000 events was recorded by flow cytometry and a mean fluorescence intensity value was calculated. For each condition, mean values were corrected by subtraction of autofluorescence. Confocal images were obtained with a confocal laser scanning microscope (LEICA SP5). Image processing was performed with ImageJ. iTLC were analyzed using a radio-HPLC detector system (FlowCount FC-3600, BioScan). Irradiation experiments were carried out with a GSR-D1 gamma irradiator (^{137}Cs , 1 Gy min⁻¹, 0.6617 MeV, level 2).

Statistical data analysis was performed using GraphPad Prism (v9.1.2, GraphPad Software). For flow cytometry experiments, data are shown as mean \pm SEM whereas for irradiation experiments and toxicity experiments, data are shown as mean \pm SD. All experiments were carried out in triplicate. Student's t test or one-way ANOVA analysis of variance was utilized to determine the statistical significance between two or more groups. The significance of difference was indicated as $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). For irradiation and internalization experiments, data was fitted using OriginPro second order polynomial fit.

Chapter 1

Synthesis of compound **I.1**



Chemical formula: C₉₆H₁₈₆O₄₇S

Molecular weight: 2124.56 g mol⁻¹

Under N₂ atmosphere, to a solution of monomethyl ether PEG2000 (2 g, 1 mmol, 1 equiv.) in dry CH₂Cl₂ was added NEt₃ (0.7 mL, 5 mmol, 5 equiv.). The reaction mixture was cooled to 0 °C before the portion-wise addition of *p*-tosyl chloride (953 mg, 5 mmol, 5 equiv.). The reaction was warmed up to room temperature overnight and progress of the reaction was monitored by TLC (CH₂Cl₂/methanol 90:10). Once complete, reaction mixture was washed with water, saturated NH₄Cl solution, saturated NaHCO₃ solution, and brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Purification was carried out by precipitation of the product with Et₂O at -20 °C for 2 h. Compound **I.1** (1.9 g, 88%) was obtained as a white solid.

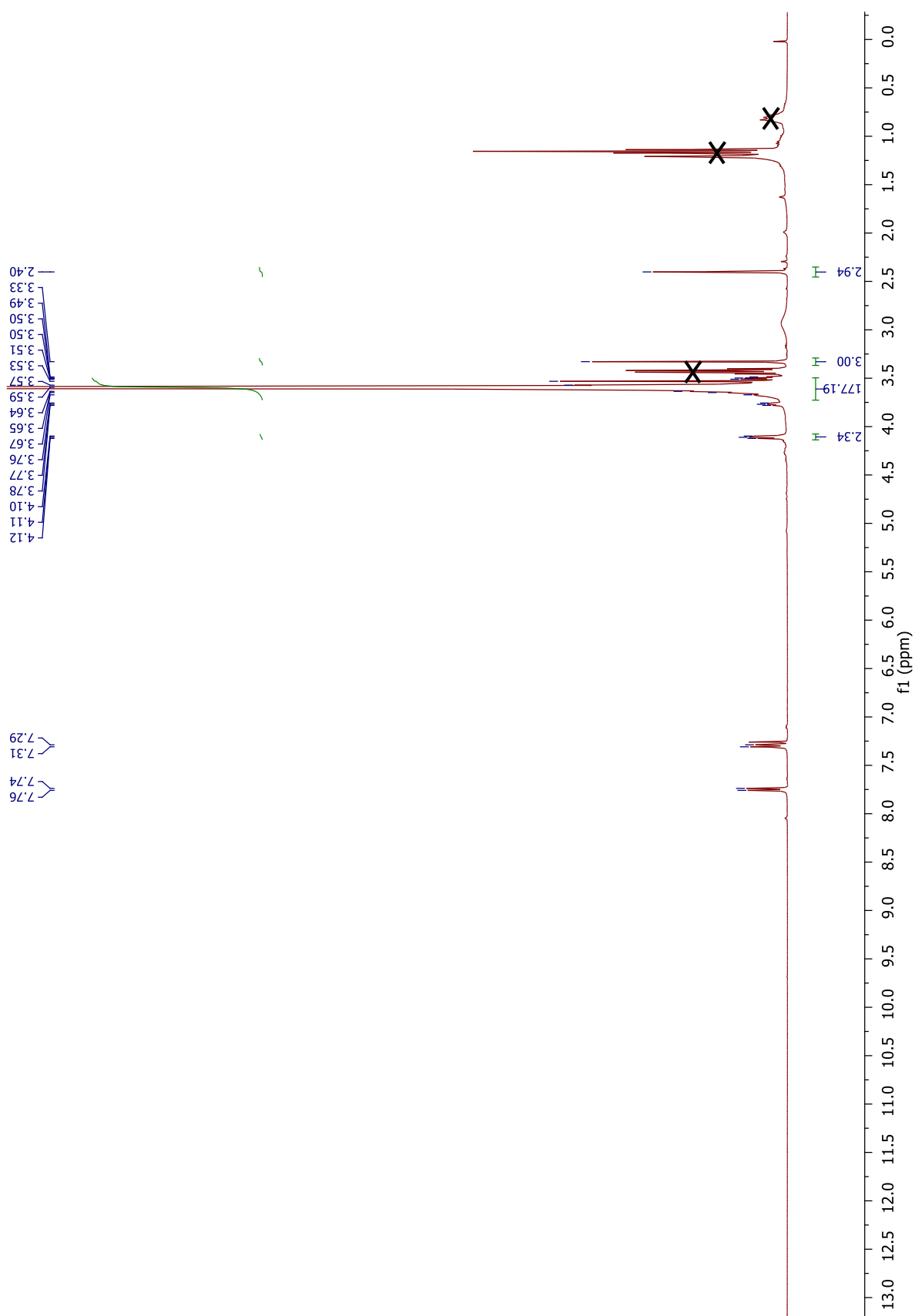
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.12–4.10 (m, 2H), 3.78–3.57 (m, 174H), 3.33 (s, 3H), 2.40 ppm (s, 3H).

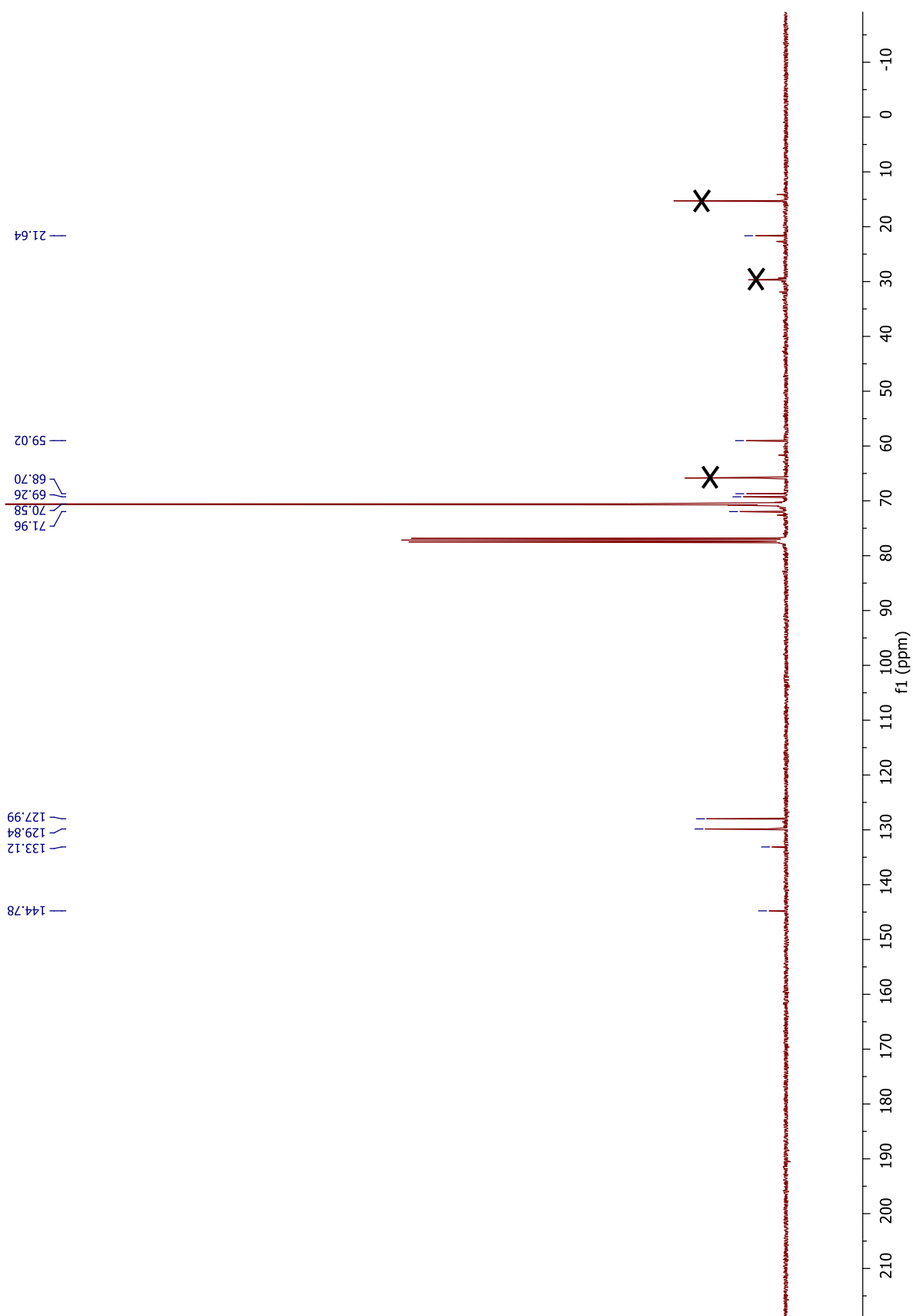
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 144.8, 133.1, 129.8, 128, 72, 70.6, 69.3, 68.7, 59, 29.7, 21.6 ppm.

ESI-MS (ES⁺): *m/z* [M + Na]⁺ observed: 2146.1777
m/z [M + Na]⁺ calculated: 2146.1782

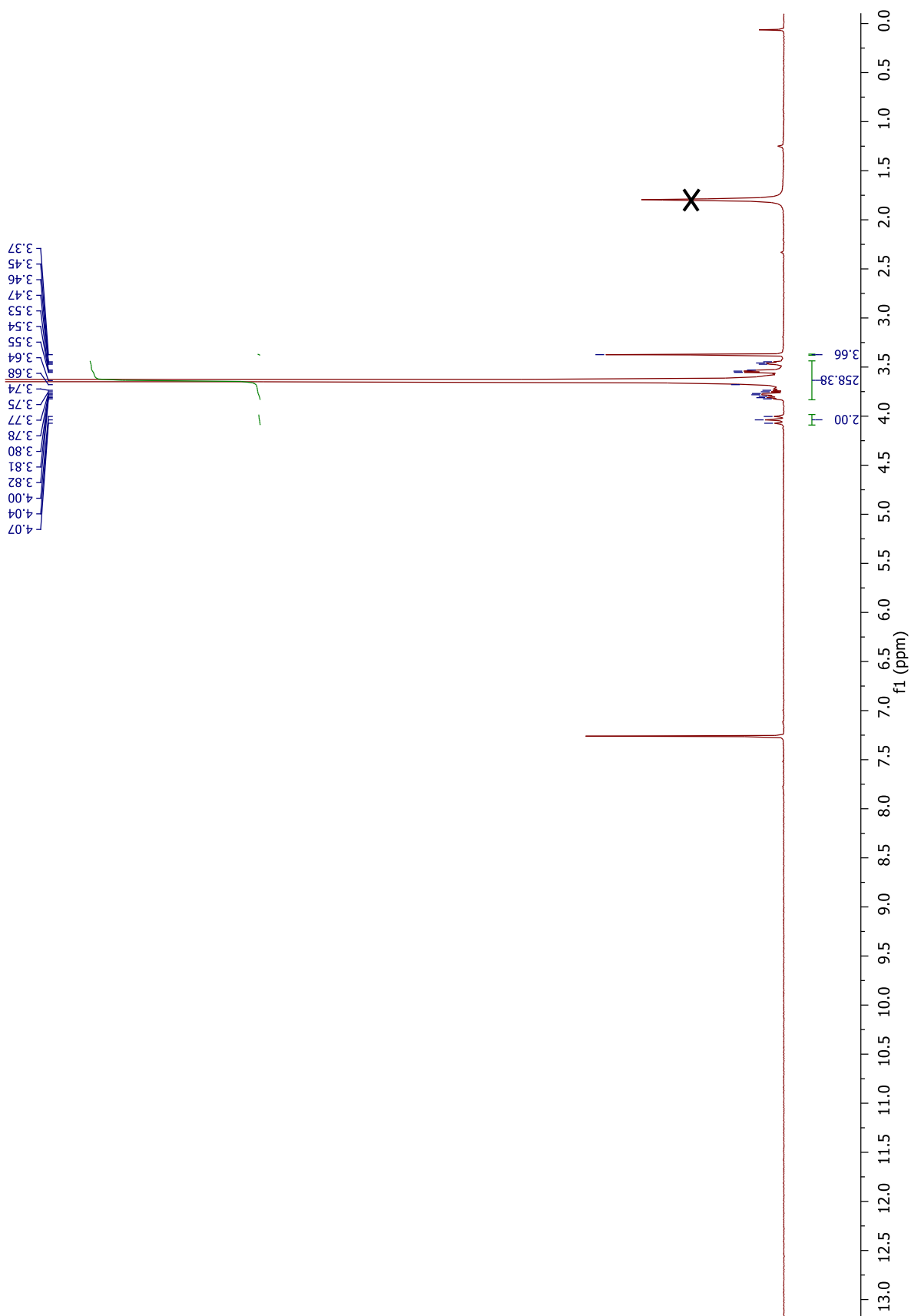
Experimental section

^1H NMR spectrum of compound **I.1** (400 MHz, CDCl_3)



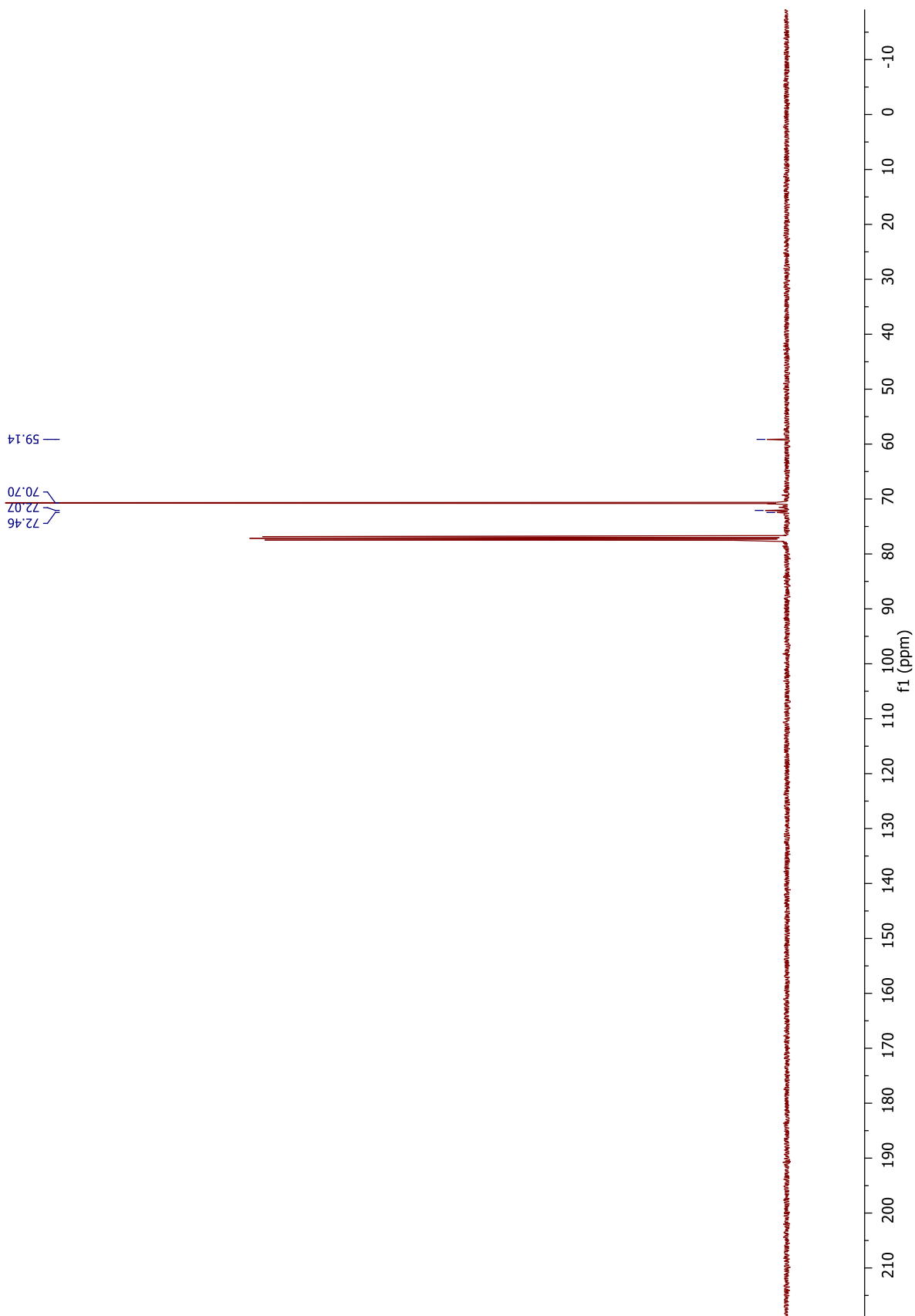
^{13}C NMR spectrum of compound **I.1** (100 MHz, CDCl_3)

^1H NMR spectrum of **PFTD-PEG** (400 MHz, CDCl_3)

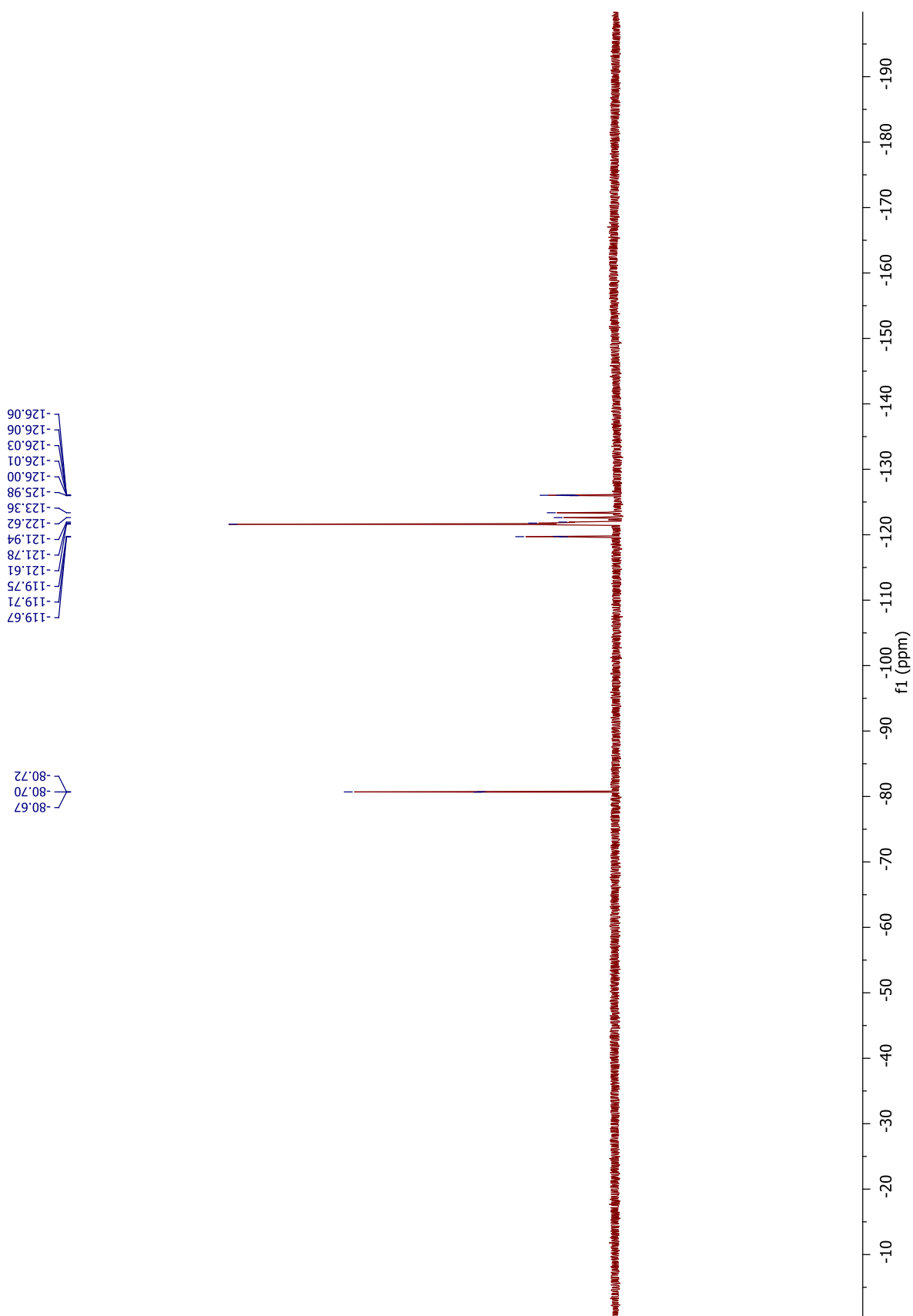


Experimental section

^{13}C NMR spectrum of **PFTD-PEG** (100 MHz, CDCl_3)



^{19}F NMR spectrum of **PFTD-PEG** (376 MHz, CDCl_3)



Experimental section

Assembly of PFTD-PEG micelles and micelle size analysis by DLS

A solution of PFTD-PEG (20 mg) in ultrapure water (2 mL) was sonicated with an ultrasonic probe (300 ms pulse per second, output 40%) for 10 min leading to a final micelle concentration of 10 mg mL⁻¹. Finally, the perfluorinated suspension was filtered on 0.2 μm nylon membrane. The mean hydrodynamic diameter of the PFTD-PEG micelles was measured by dynamic light scattering ($\lambda_{laser} = 450$ nm) at 20 °C.

Determination of Critical Micelle Concentration (CMC)

The CMC was evaluated by measuring the surface tension of micelle colloids. Suspensions at different concentrations of amphiphilic units (from 0.01 mg mL⁻¹ to 1 mg mL⁻¹) were prepared in water and the surface tension was measured (in triplicate), using the du Noüy-Padday method. The CMC value was obtained at the intersection of the two lines (see graph fig 24).

Determination of ζ potential of PFTD-PEG micelles

Zeta potential of PFTD-PEG micelles was measured in ultrapure water ($c = 10$ mg mL⁻¹). Measurements were performed over 7 runs of 15 s. Raw data was analyzed with ZetaQ V1.7.9.24080 software and the mean value of zeta potential is displayed.

Determination of dioxygen loading and release capacity of PFTD-PEG micelles

For oxygen loading evaluation, perfluorinated micellar suspensions (5 mL) at different concentrations ($c = 1.9$ mM, 3.8 mM, and 7.6 mM) were saturated with dioxygen under agitation prior to the experiment. The O₂-saturated suspension (200 μL) was added to a large volume of degassed ultrapure water (100 mL) in a sealed environment. Evolution of the dioxygen concentration over time was recorded using a dissolved dioxygen sensor (Unisense®). A similar set up was used for control experiments (water, Triton X 100 3.8 mM and 7.6 mM, SDS 7.6 mM). Data was fitted to a polynomial model using OriginPro.

To further assess the dioxygen release capacity of PFTD-PEG micelles, PFTD-PEG micellar suspensions (4 mL, $c = 3.8$ mM and 7.6 mM) were pre-saturated with dioxygen under agitation in a sealed round-bottom flask. After saturation of the aqueous suspension with dioxygen, agitation was stopped and the O₂ saturated PFTD-PEG micellar suspension was left to equilibrate with ambient air. Evolution of dioxygen concentration in the aqueous medium over time was recorded using a dissolved dioxygen sensor (Unisense®). A similar set up was used for control experiments (water, Triton X 100 3.8 mM, SDS 9 mM). Data was fitted to a first order decay model using OriginPro as reported elsewhere¹²¹.

DiD loading of PFTD-PEG micelles

To an aqueous suspension of PFTD-PEG micelles ($c = 10 \text{ mg mL}^{-1}$) was added a stock solution DiD ($\epsilon = 193\,000$, $MW = 987.36 \text{ g mol}^{-1}$, $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 644/665 \text{ nm}$, CAS [127274-91-3]) in ethanol ($8 \mu\text{L}$, $c = 12 \text{ mg mL}^{-1}$). The resulting suspension was submitted to ultrasonication for 10 min using an ultrasonic probe (300 ms pulse per second, output 40%). Afterwards, the micellar suspension was filtered on a $0.2 \mu\text{m}$ nylon membrane and analyzed (DLS, UV spectrometry). The final DiD concentration of the micelle colloid was calculated using the Beer Lambert law ($A = \epsilon lc$) and found to be $[\text{DiD}]_{\text{micelle}} = 0.092 \text{ mg mL}^{-1}$, corresponding to a mass (w/w) ratio of *ca.* 1%.

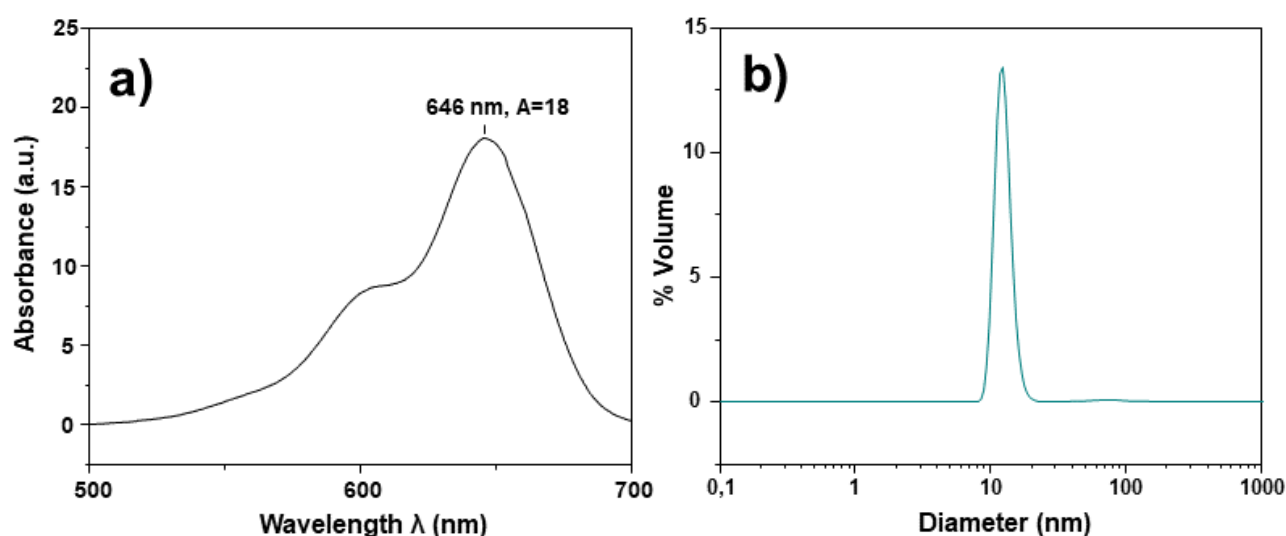


Figure 68. UV (a) and DLS (b) profiles of micellar PFTD-PEG suspension containing 1% DiD w/w .

Cellular experiments

B16F10 cells (ATCC®, CCL-6475™, mouse skin melanoma cells), were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium with Glutamax (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, $10\,000 \text{ U mL}^{-1}$). Cells were grown in a humidified incubator at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ and 5% CO_2 .

Cytotoxicity study of PFTD-PEG micelles by MTS assay

To assess the cytotoxicity of PFTD-PEG micelles, cell viability was determined by MTS assay (kit ab197010, Abcam, CAS [138169-43-4]). Briefly, B16F10 cells were plated into a 96-well plate at a density of 8×10^3 cells/well in medium ($100 \mu\text{L}$) and left to adhere for 24 h in a humidified 5% CO_2 atmosphere. After plating, B16F10 cells were incubated with PFTD-PEG micelles at a concentration of 0.1 to 1 mg mL^{-1} for 24 h, and then the MTS reagent ($20 \mu\text{L}$) was

Experimental section

added to each well. After incubation at 37 °C for 2 h, the plate was read on a microplate reader (ClarioStar, BMG Labtech) at 490 nm. The viability change of micelle-treated cells was expressed as a percentage compared to the cells without micelle treatment, and control cells were considered to have a viability value of 100%. Each experiment was conducted in triplicate.

Study of the internalization of perfluorinated micelles by confocal microscopy

B16F10 cells were seeded on 35 mm glass dishes in a 6-well plate at a cell density of 1.5×10^4 cells/well in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic antimycotic solution and left to adhere for 24 h in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. After 24 h, cells were incubated with perfluorinated micelles loaded with 1 wt% DiD ($c = 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$) in complete DMEM for 24 h. After exposure, cells were washed with DPBS $1 \times (1 \text{ mL} \times 3)$ and fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min. Cells were then stained with 1 μM Hoechst 33342 for 20 min, washed twice with DPBS (1 mL) and observed by confocal microscopy. DiD was excited at 644 nm and the fluorescence emission was detected in the 650–750 nm range. A confocal laser scanning microscope (LEICA SP5) was used to directly visualize the intracellular location of perfluorinated micelles loaded with 1 wt% DiD (hydrophobic fluorophore).

In vitro cellular uptake study of perfluorinated micelles by flow cytometry

B16F10 cells were seeded in 6-well plates at different cellular densities in order to reach 80–90% confluence for the time of the experiment, ranging from $7.5 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ to $4.5 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ in DMEM with 10% FBS and 1% antibiotic antimycotic solution and left to adhere for 24 h in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After 24 h, cells were incubated with perfluorinated micelles loaded with 1 wt% DiD. After different times, the medium was discarded, cells were washed with DPBS $1 \times (1 \text{ mL} \times 2)$ then trypsin (500 μL) was added to each well and cells were incubated for 5 min at 37 °C. Trypsin was inhibited by DMEM supplemented with 10% FBS (3 mL) and cells were transferred into flow cytometry tubes and centrifuged ($1\,000 \times g$, 5 min) before being resuspended in cold DPBS (200 μL). Cells were kept on ice until measurement by flow cytometry.

In vitro endocytosis pathway study by flow cytometry

24 h prior to the experiment, B16F10 cells were seeded in a 6-well plate at a density of $4.5 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ (2 mL per well) in DMEM with 10% FBS and 1% antibiotic antimycotic solution and left to adhere in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Cells were then incubated either with 800 μM amiloride, 400 μM genistein or 0.45 M sucrose. After 30 min of pretreatment, perfluorinated micelles loaded with 1 wt% DiD were added to the medium and cells were

incubated for another 2 h in the presence of micelles at 37 °C. To investigate the influence of the temperature, cells were kept at 4 °C for 2.5 h. After treatment, medium was discarded, cells were washed with DPBS 1× (1 mL × 3) and detached by trypsinization (500 µL). Trypsin was neutralized by addition of DMEM supplemented with 10% FBS (3 mL) and cells were transferred into flow cytometry tubes before being centrifuged (1000 ×g, 5 min) and resuspended in cold DPBS 1× (200 µL). Cells were kept on ice before measurement by flow cytometry. Fluorescence mean values were normalized with the control experiment (no inhibitor) taken as the 100% reference.

Clonogenic survival assay of PFTD-PEG micelles

For clonogenic survival assays, B16F10 cells were plated in T25 flask at a density of 2×10^4 cells mL⁻¹ ($V = 5$ mL) and left to adhere for 24 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After plating, the medium was discarded and cells were incubated for 24 h with different concentrations of perfluorinated micelles, ranging from 0.1 to 1 mg mL⁻¹. After treatment, the micelle-rich medium was discarded, cells were washed with DPBS 1× (2 mL), detached by trypsinization and counted. 100 cells were then seeded in 10 cm cell culture dishes and kept for 7 days in a humidified incubator at 37 °C. Subsequently, cells were stained with 0.5% crystal violet and the resulting colonies were counted. A colony was defined as a clone containing at least 64 cells. Plating efficiency (*PE*) was calculated relative to the control group (vehicle) and is defined as the ratio of the number of colonies formed to the number of cells seeded. Surviving fraction (*SF*) was calculated using the following formula:

$$SF = \frac{\# \text{ of colonies formed}}{\# \text{ of cells seeded}} \times \frac{1}{PE}$$

In vitro radiosensitization assay

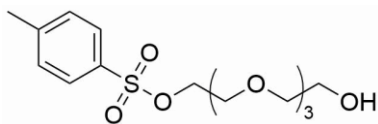
B16F10 cells were plated in T25 flasks at different seeding densities, from 100 to 2800 cells per flask (3 flasks per tested condition) and left to adhere for 24 h in culture medium at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After plating, cells were incubated for 24 h in culture medium with or without perfluorinated micelles ($c = 0.25$ mg mL⁻¹). After treatment, the medium was discarded and replaced by fresh medium and cells were irradiated with a ¹³⁷Cs sealed source at 1 Gy min⁻¹ (GSR-D1 gamma irradiator, ¹³⁷Cs) at Institut Curie in Orsay at different doses (0–6 Gy). After irradiation, cells were kept at 37 °C in a humidified incubator for 7 days. Subsequently, cells were stained with 0.5% crystal violet and the resulting colonies (> 64 cells) were counted. Plating efficiency (*PE*) was calculated relative to the control group

Experimental section

(0 Gy) and is defined as the ratio of the number of colonies formed to the number of cells seeded. Surviving fraction was calculated as described above.

Chapter 2

Synthesis of compound **II.1**



Chemical formula: C₁₅H₂₄O₇S
Molecular weight: 348.41 g mol⁻¹

To a solution of tetraethylene glycol (22 g, 113 mmol, 10.3 equiv., CAS [112-60-7]) in THF (4 mL, 0 °C) was added a solution of sodium hydroxide (0.7 g, 17.4 mmol, 1.6 equiv.) in H₂O (4 mL). A solution of *p*-tosyl chloride (2.08 g, 10.9 mmol, 1 equiv.) in THF (4 mL) was slowly added using a syringe pump over a period of 2 h. After completion of the *p*-tosyl chloride addition, reaction was carried out for another hour at 0 °C. The mixture was added to iced water (~ 100 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (× 3). The combined organic layers were washed with H₂O then dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure to afford the mono-activated tetra(ethylene glycol) derivative **II.1** as a slightly yellow oil (3.58 g, 94%).

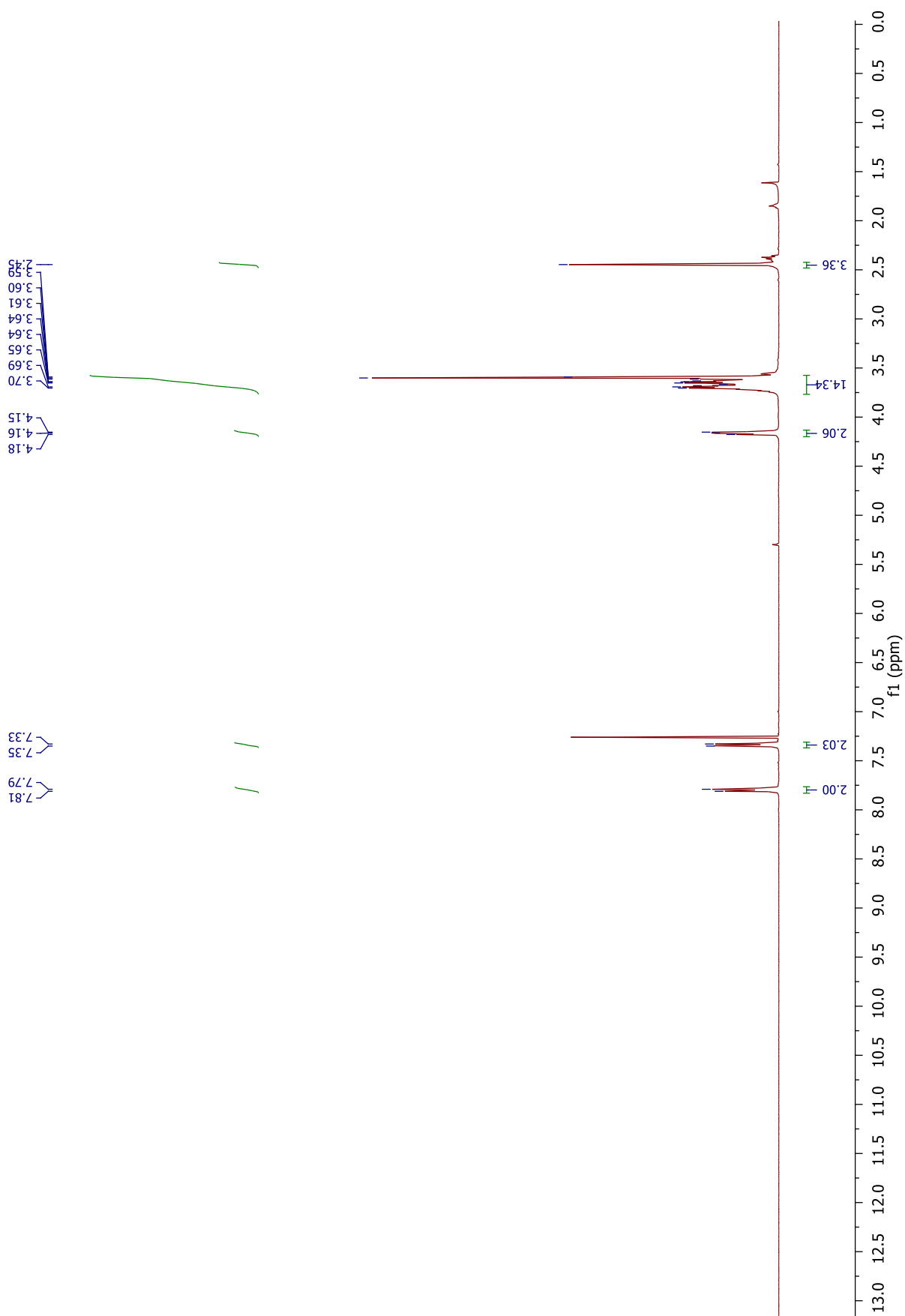
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.16 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.70–3.59 (m, 14H), 2.45 ppm (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 144.9, 133.1, 130, 128.1, 72.6, 70.9, 70.8, 70.6, 70.5, 69.4, 68.8, 21.8 ppm.

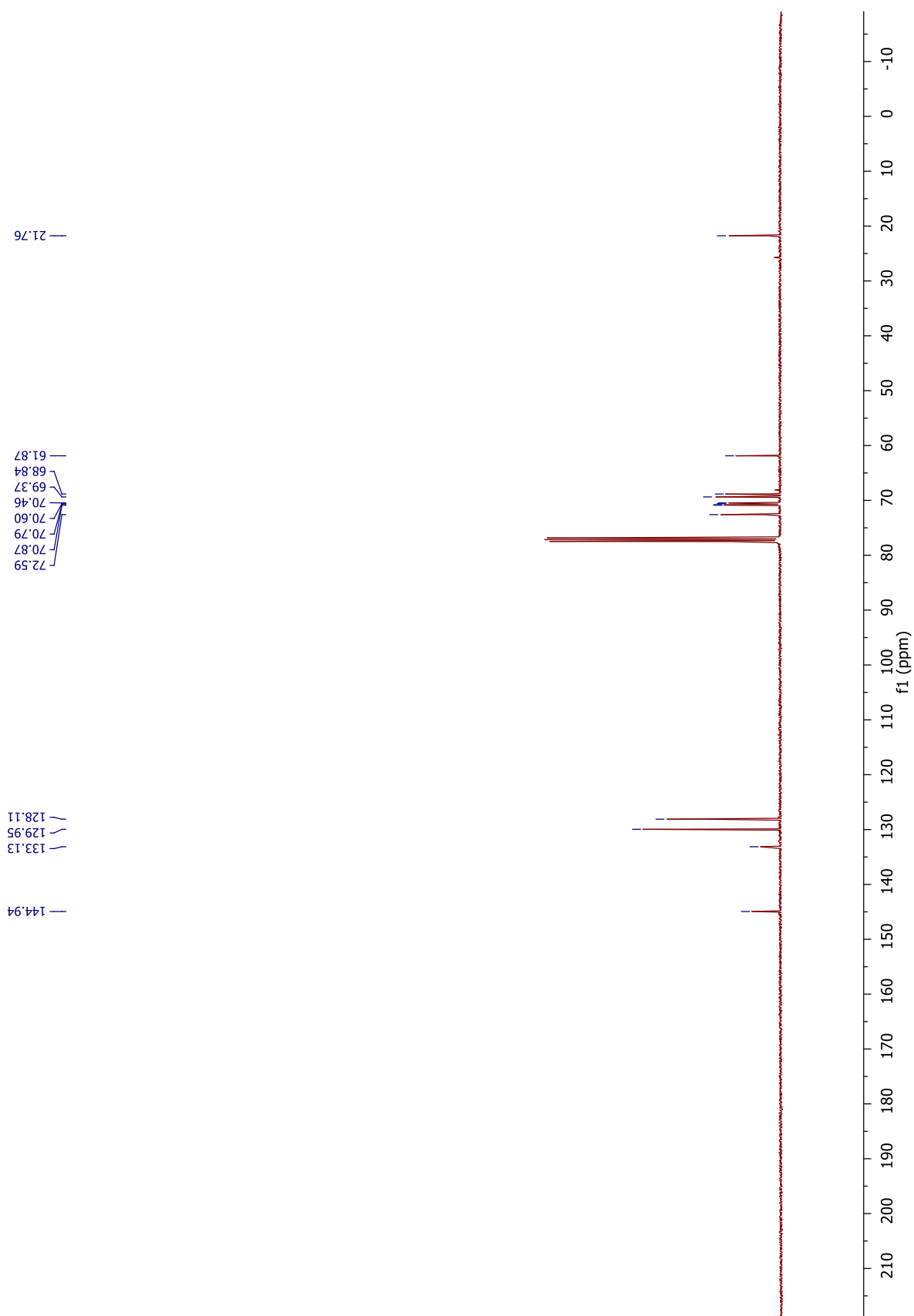
ESI-MS (ES⁺): *m/z* [M+H]⁺ 349.8

Experimental section

^1H NMR spectrum of compound **II.1** (400 MHz, CDCl_3)

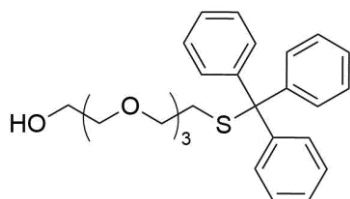


^{13}C NMR spectrum of compound **II.1** (100 MHz, CDCl_3)



Experimental section

Synthesis of compound **II.2**:



Chemical formula: C₂₇H₃₂O₄S
Molecular weight: 452.61 g mol⁻¹

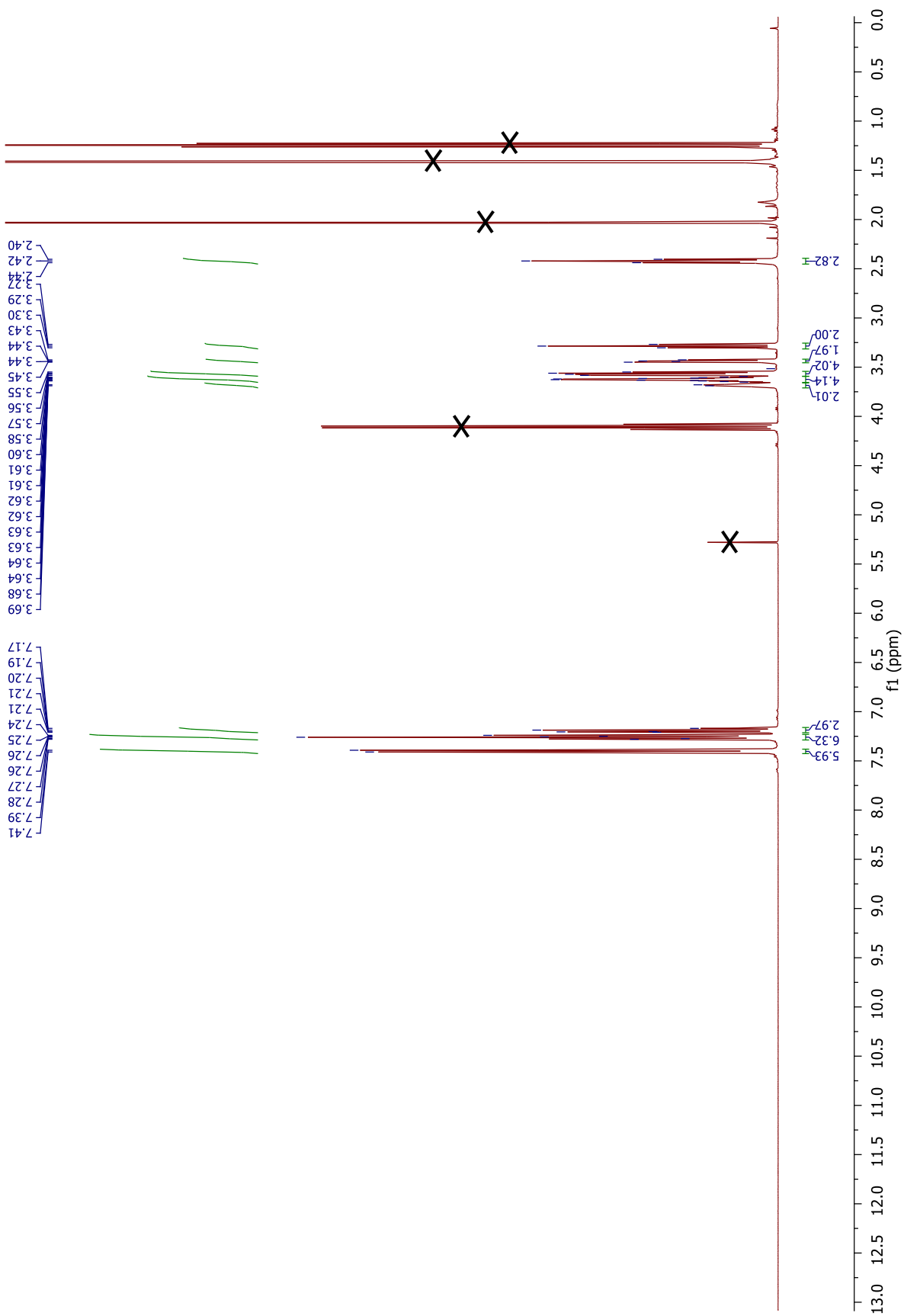
Ph₃CSH (3.55 g, 12.84 mmol, 1.25 equiv., CAS [3695-77-0]) was dissolved in 1:1 EtOH/toluene (35 mL) and NaOH (0.514 g, 12.84 mmol, 1.25 equiv.) in H₂O (7 mL) was added to the reaction mixture. The mono-activated tetra(ethylene glycol) derivative (3.58 g, 10.3 mmol, 1 equiv.) was then added to the medium and the resulting reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Progress of the reaction was monitored by TLC (cyclohexane/EtOAc 20:80) and once the reaction was completed, the mixture was poured into a saturated solution of NaHCO₃ and washed three times. Combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel eluting with cyclohexane/EtOAc from 80:20 to 20:80, yielding compound **II.2** as a yellowish oil (3.5 g, 76%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40 (d, *J* = 7.1 Hz, 6H), 7.28–7.24 (m, 6H), 7.21–7.17 (m, 3H), 3.70–3.67 (m, 2H), 3.65–3.60 (m, 4H), 3.58–3.55 (m, 4H), 3.45–3.43 (m, 2H), 3.29 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.42 ppm (t, *J* = 6.9 Hz, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 145.0, 129.8, 128.0, 126.8, 72.6, 70.8, 70.6, 70.5, 70.3, 69.8, 66.8, 61.9, 31.8 ppm.

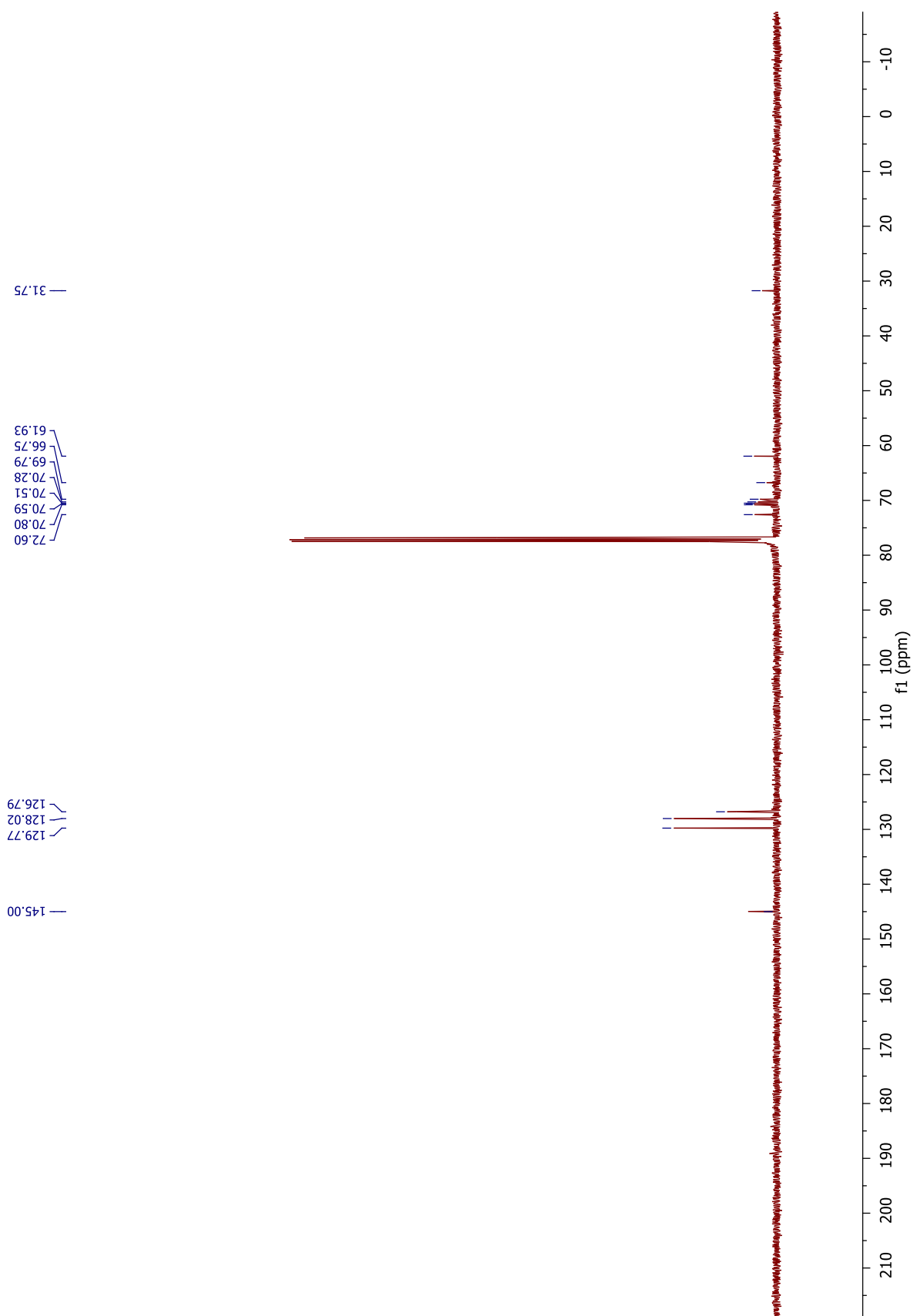
ESI-MS (ES⁺): *m/z* [M+Na]⁺ 475.3

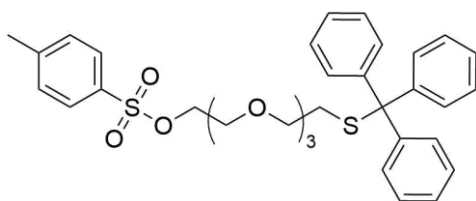
^1H NMR spectrum of compound **II.2** (400 MHz, CDCl_3)



Experimental section

^{13}C NMR spectrum of compound **II.2** (100 MHz, CDCl_3)



Synthesis of compound **II.3**:

Chemical formula: C₃₄H₃₈O₆S₂
 Molecular weight: 606.79 g mol⁻¹

Under N₂ atmosphere, to a solution of compound **II.2** (2.62 g, 5.8 mmol, 1 equiv.) in dry CH₂Cl₂ (100 mL) was added NEt₃ (4 mL, 29 mmol, 5 equiv.). The reaction medium was cooled to 0 °C and *p*-tosyl chloride (2.21 g, 11.6 mmol, 2 equiv.) was added portion-wise while stirring. The reaction was warmed up overnight to room temperature and progress of the reaction was monitored by TLC (cyclohexane/EtOAc 70:30). Once complete, the reaction mixture was washed with H₂O (× 2) and brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. Purification of the crude product by flash chromatography on silica gel eluting with cyclohexane/EtOAc from 90:10 to 70:30 provided tosylate **II.3** as a transparent oil (2.8 g, 80%).

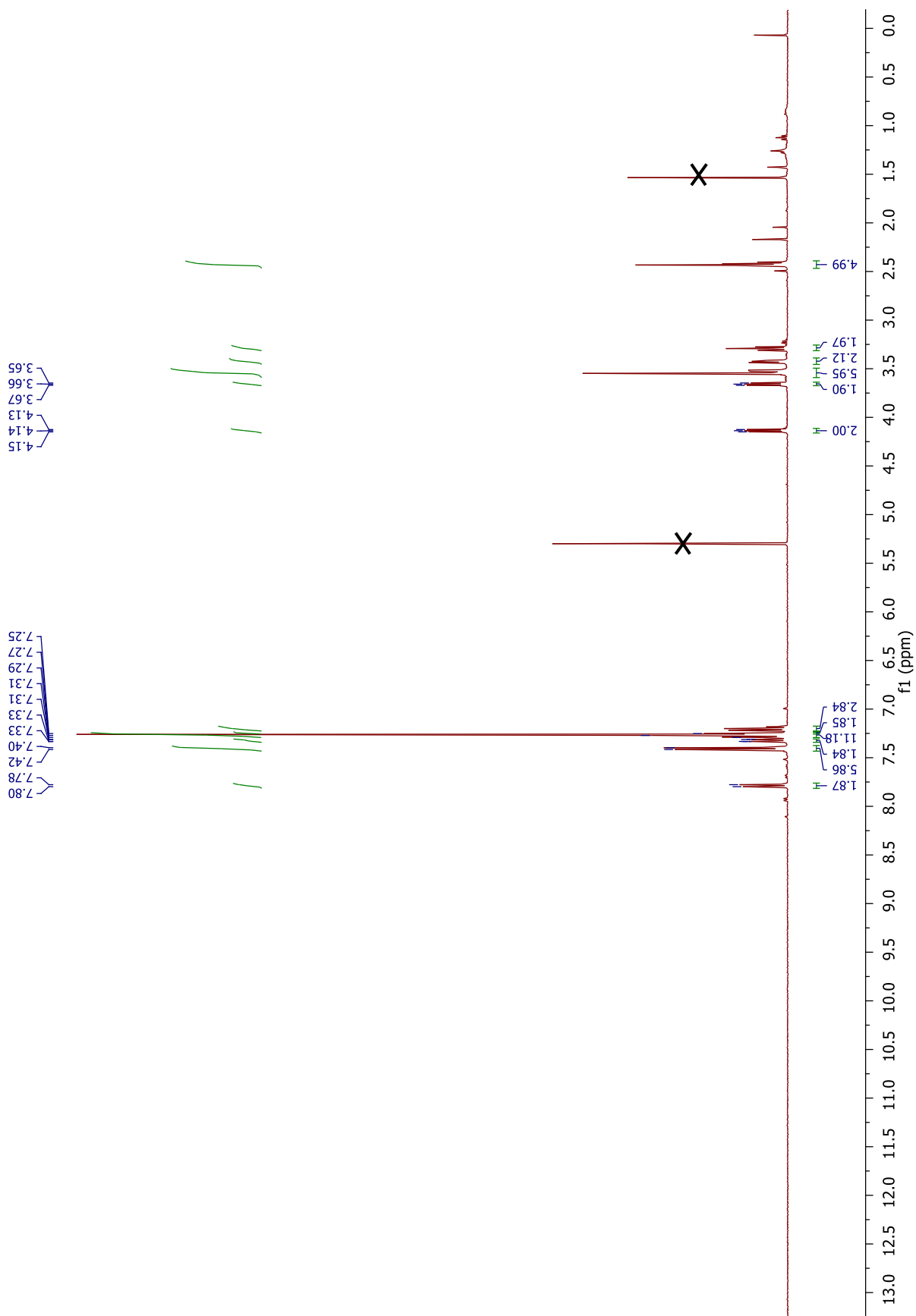
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.46–7.34 (m, 6H), 7.32 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.30–7.24 (m, 6H), 7.23–7.17 (m, 3H), 4.19–4.05 (m, 2H), 3.75–3.61 (m, 2H), 3.58–3.47 (m, 6H), 3.49–3.38 (m, 2H), 3.29 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.47–2.37 ppm (m, 5H).

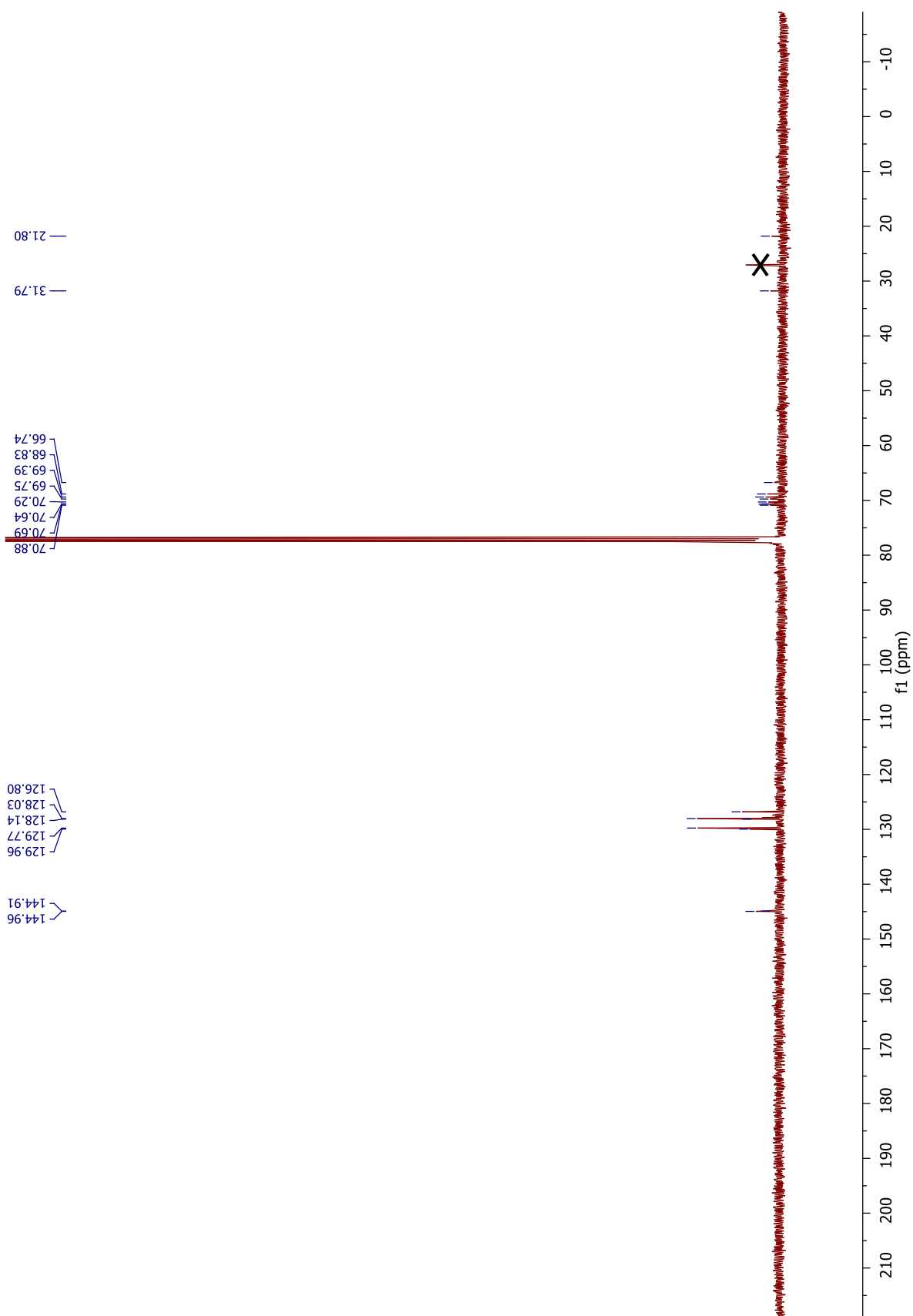
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 145.0, 144.9, 130.0, 129.8, 128.1, 128, 126.8, 70.9, 70.7, 70.6, 69.8, 69.4, 68.8, 66.7, 31.8, 21.8 ppm.

ESI-MS (ES⁺): *m/z* [M+Na]⁺ 629.9

Experimental section

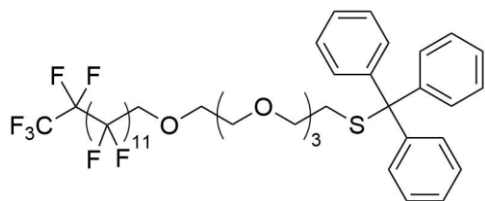
^1H NMR spectrum of compound **II.3** (400 MHz, CDCl_3)



^{13}C NMR spectrum of compound **II.3** (100 MHz, CDCl_3)

Experimental section

Synthesis of compound **II.4**:



Chemical formula: C₄₁H₃₃F₂₇O₄S

Molecular weight: 1134.73 g mol⁻¹

Under N₂ atmosphere, to a solution of perfluorotetradecanol (12.8 g, 18.4 mmol, 4 equiv., CAS [15622-57-8]) in dry THF (100 mL) was added NaH (698 mg, 60% in oil, 18.4 mmol, 4 equiv.). The reaction mixture was heated to 75 °C for 30 min to allow activation of the perfluorinated alcohol before addition of the tosylate (2.8 g, 4.6 mmol, 1 equiv.) dissolved in dry THF (10 mL). The reaction mixture was stirred for 3 days at 75 °C. Once complete, the reaction mixture was cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. The crude product was dissolved in CH₂Cl₂ and was filtered through Celite® to remove perfluorotetradecanol. The resulting filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel eluted with cyclohexane/EtOAc from 98:2 to 80:20. The desired perfluorinated thiol-protected product **II.4** was recovered as a white solid (1.93 g, 61%).

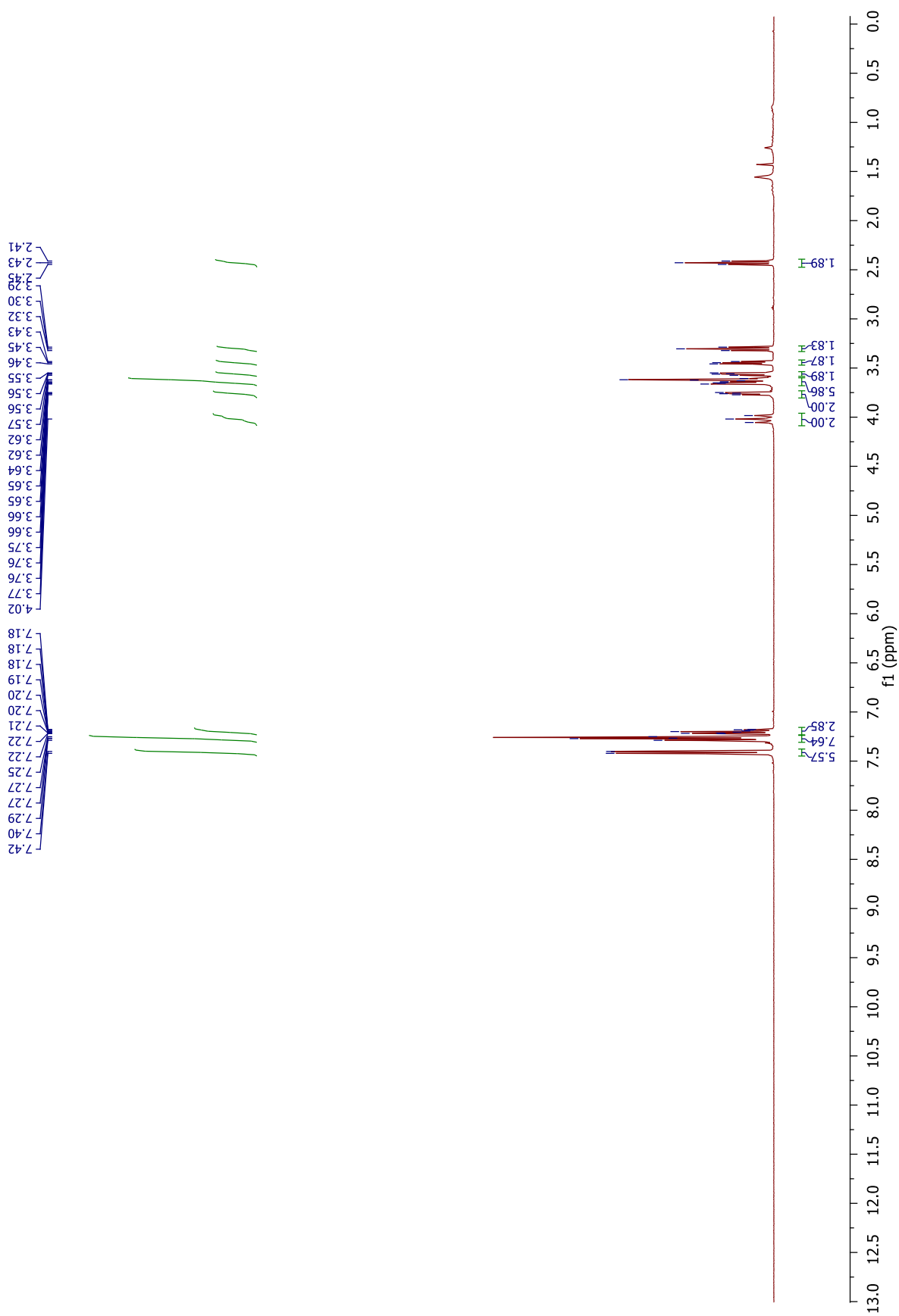
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.41 (d, *J* = 7.7 Hz, 6H), 7.29–7.25 (m, 6H), 7.22–7.18 (m, 3H), 4.02 (t, *J* = 14.0 Hz, 2H), 3.77–3.75 (m, 2H), 3.66–3.61 (m, 6H), 3.57–3.55 (m, 2H), 3.46–3.43 (m, 2H), 3.30 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.43 ppm (t, *J* = 6.9 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 145.0, 129.8, 128.0, 126.8, 72.5, 70.9, 70.8, 70.7, 70.6, 70.3, 69.8, 66.8, 31.8 ppm.

¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -80.70 (t, *J* = 10.0 Hz), -119.73 (t, *J* = 12 Hz), -121.52 to -122.09 (m), -122.66 (s), -123.38 (s), -126.02 to -126.14 ppm (m).

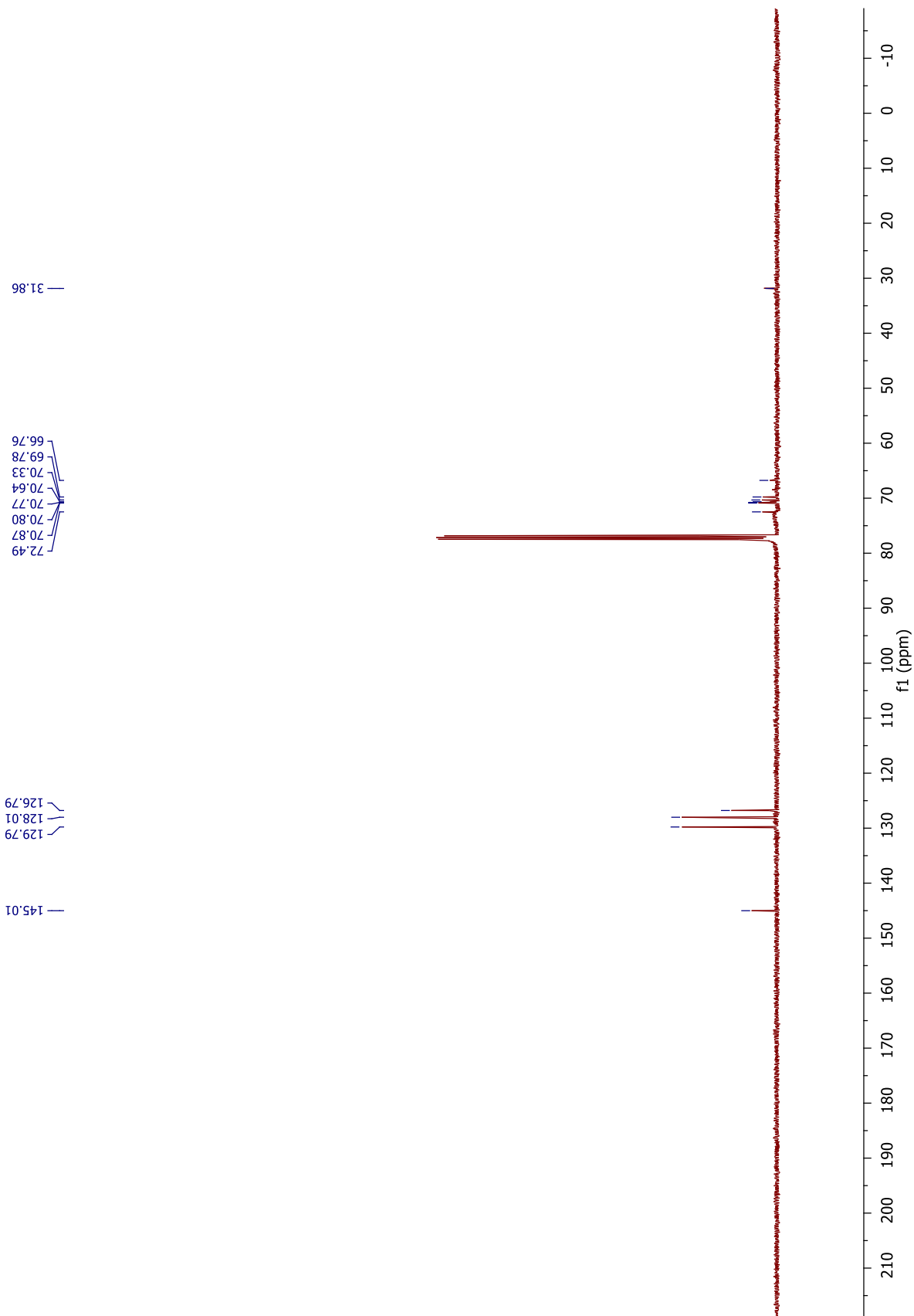
ESI-MS (ES⁺): *m/z* [M+Na]⁺ 1157.2

^1H NMR spectrum of compound **II.4** (400 MHz, CDCl_3)

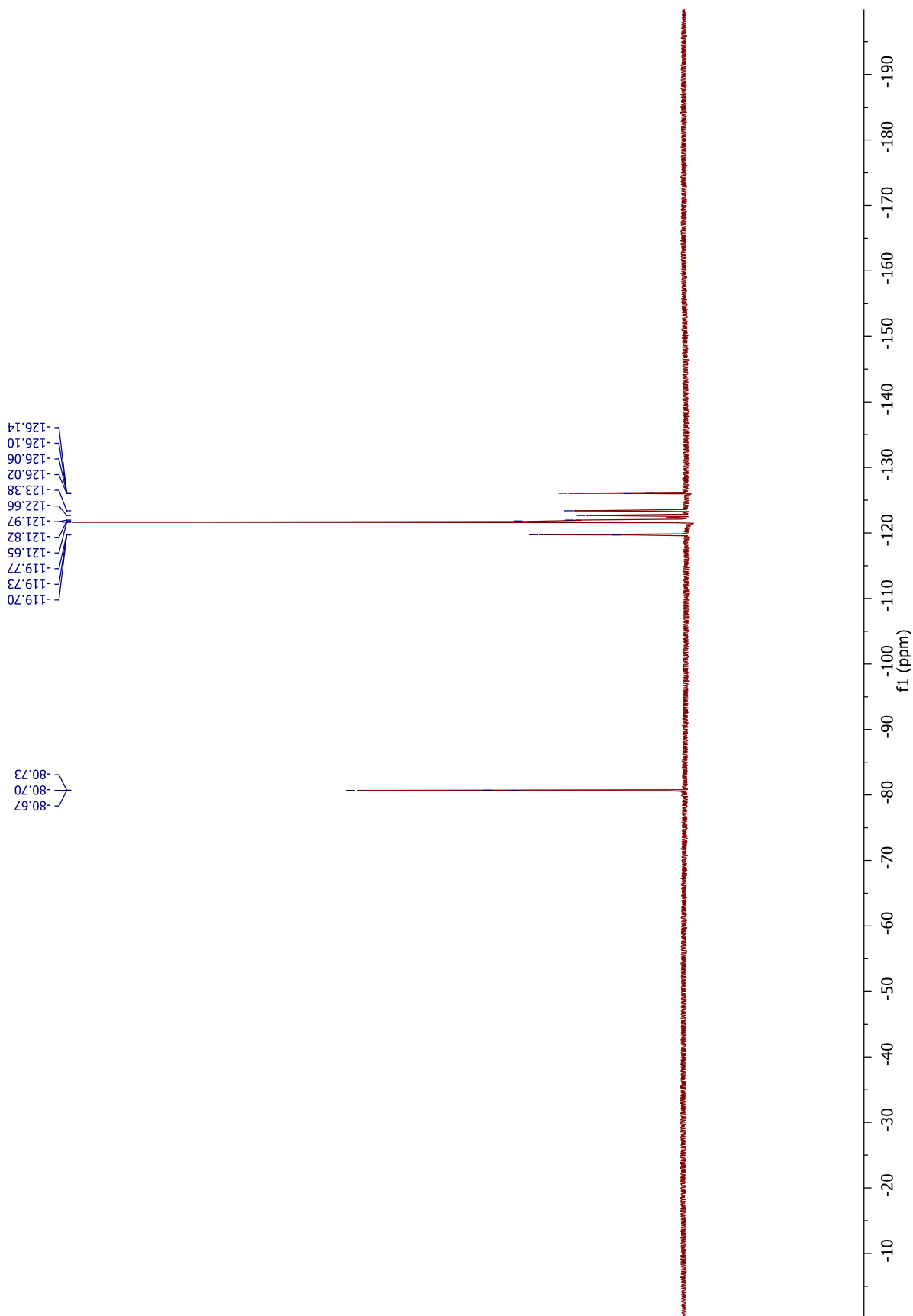


Experimental section

^{13}C NMR spectrum of compound **II.4** (100 MHz, CDCl_3)

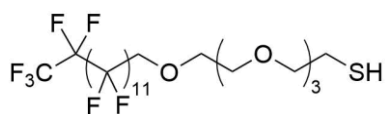


^{19}F NMR spectrum of compound **II.4** (376 MHz, CDCl_3):



Experimental section

Synthesis of compound **II.5**:



Chemical formula: C₂₂H₁₉F₂₇O₄S

Molecular weight: 892.41 g mol⁻¹

Under N₂ atmosphere, to a solution of perfluorinated thiol-protected compound (600 mg, 0.53 mmol, 1 equiv.) in dry CH₂Cl₂ (20 mL) was added TIPS (0.6 mL, 2.64 mmol, 5 equiv.). The reaction mixture was allowed to cool to 0 °C for 30 min before addition of TFA (0.2 mL, 2.64 mmol, 5 equiv.). The reaction mixture was warmed up overnight to room temperature and completion of the reaction was monitored by TLC (cyclohexane/EtOAc 80:20). Once TLC indicated complete consumption of the starting material, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*, adding acetone to the medium to facilitate TFA evaporation. The crude product was purified by column chromatography on silica gel eluted with cyclohexane/EtOAc 70:30 to give compound **6** as a white solid (360 mg, 72%).

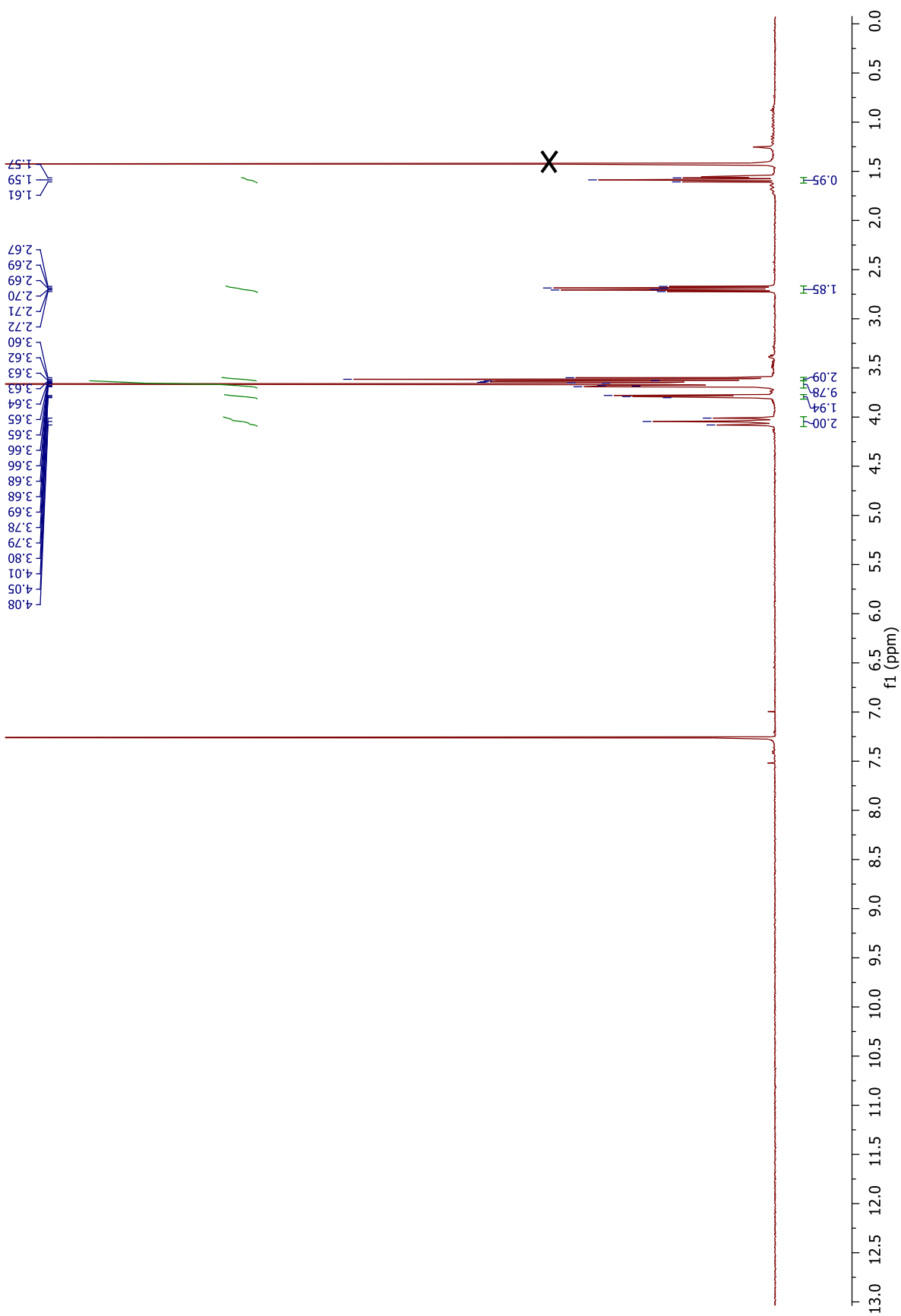
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.05 (t, *J* = 14.0 Hz, 2H), 3.82–3.77 (m, 2H), 3.71–3.64 (m, 10H), 3.62 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.70 (dt, *J* = 8.2, 6.4 Hz, 2H), 1.59 ppm (t, *J* = 8.2 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 73.0, 72.5, 70.9, 70.8, 70.8, 70.7, 70.4, 68.7, 68.4, 68.2, 24.4 ppm.

¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -80.72 (t, *J* = 9.9 Hz), -119.75 (t, *J* = 13.4 Hz), -121.30 to -122.11 (m), -122.67 (s), -123.40 (s), -125.83 to -126.37 ppm (m).

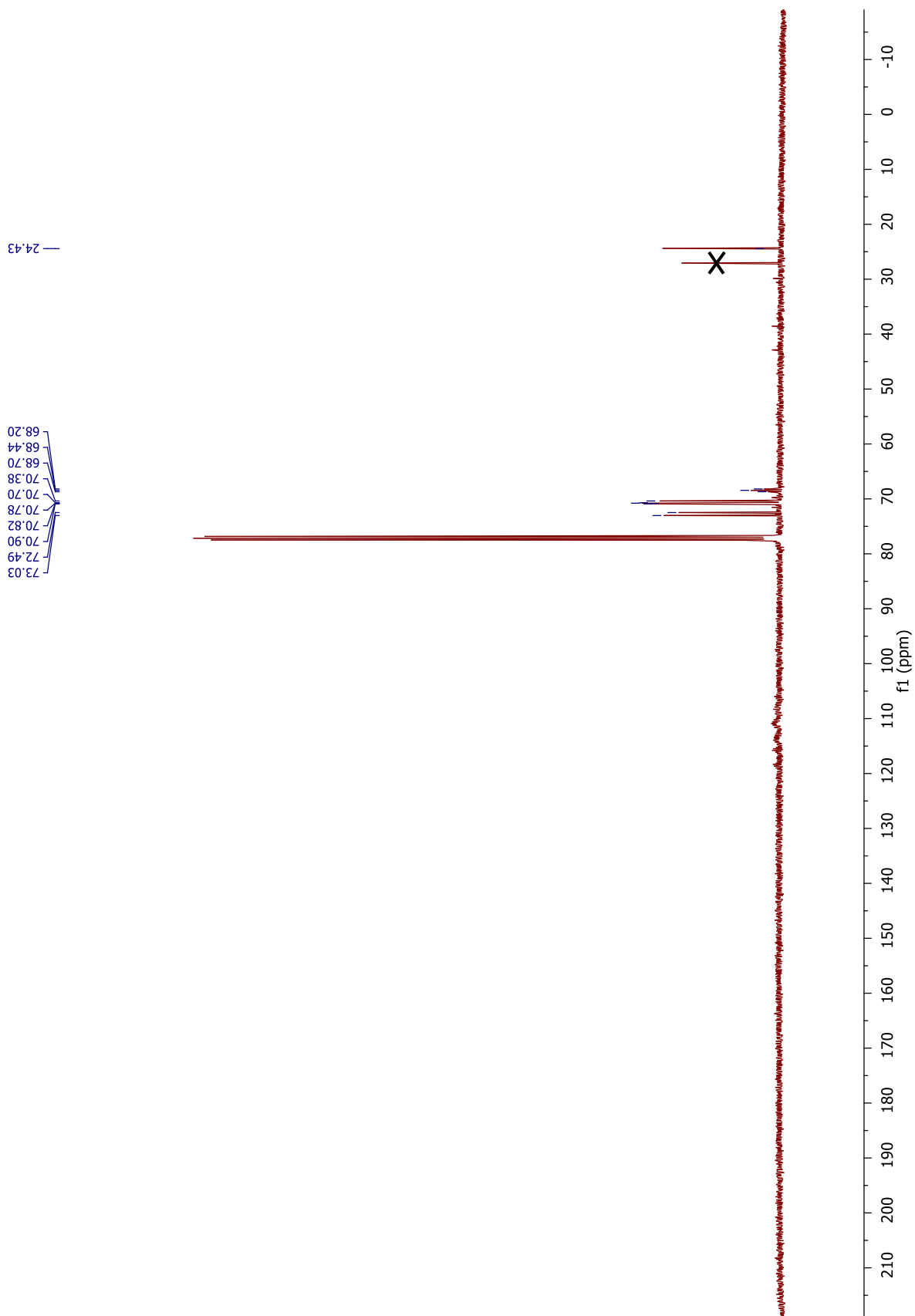
ESI-MS (ES⁺): *m/z* [M+Na]⁺ 914.6

^1H NMR spectrum of compound **II.5** (400 MHz, CDCl_3)

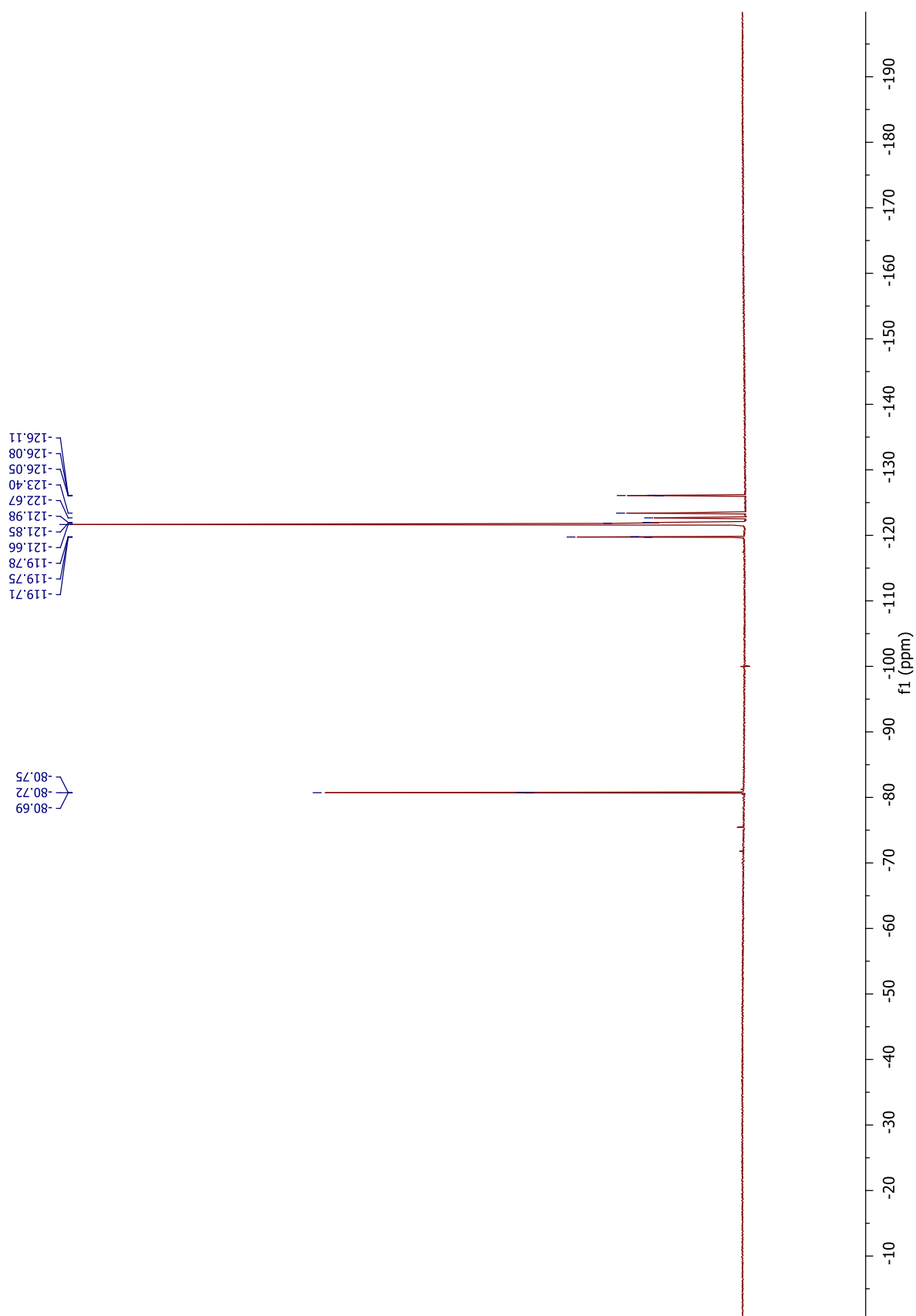


Experimental section

^{13}C NMR spectrum of compound **II.5** (100 MHz, CDCl_3)

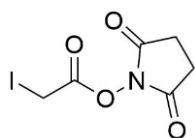


^{19}F NMR spectrum of compound **II.5** (376 MHz, CDCl_3):



Experimental section

Synthesis of compound II.6:



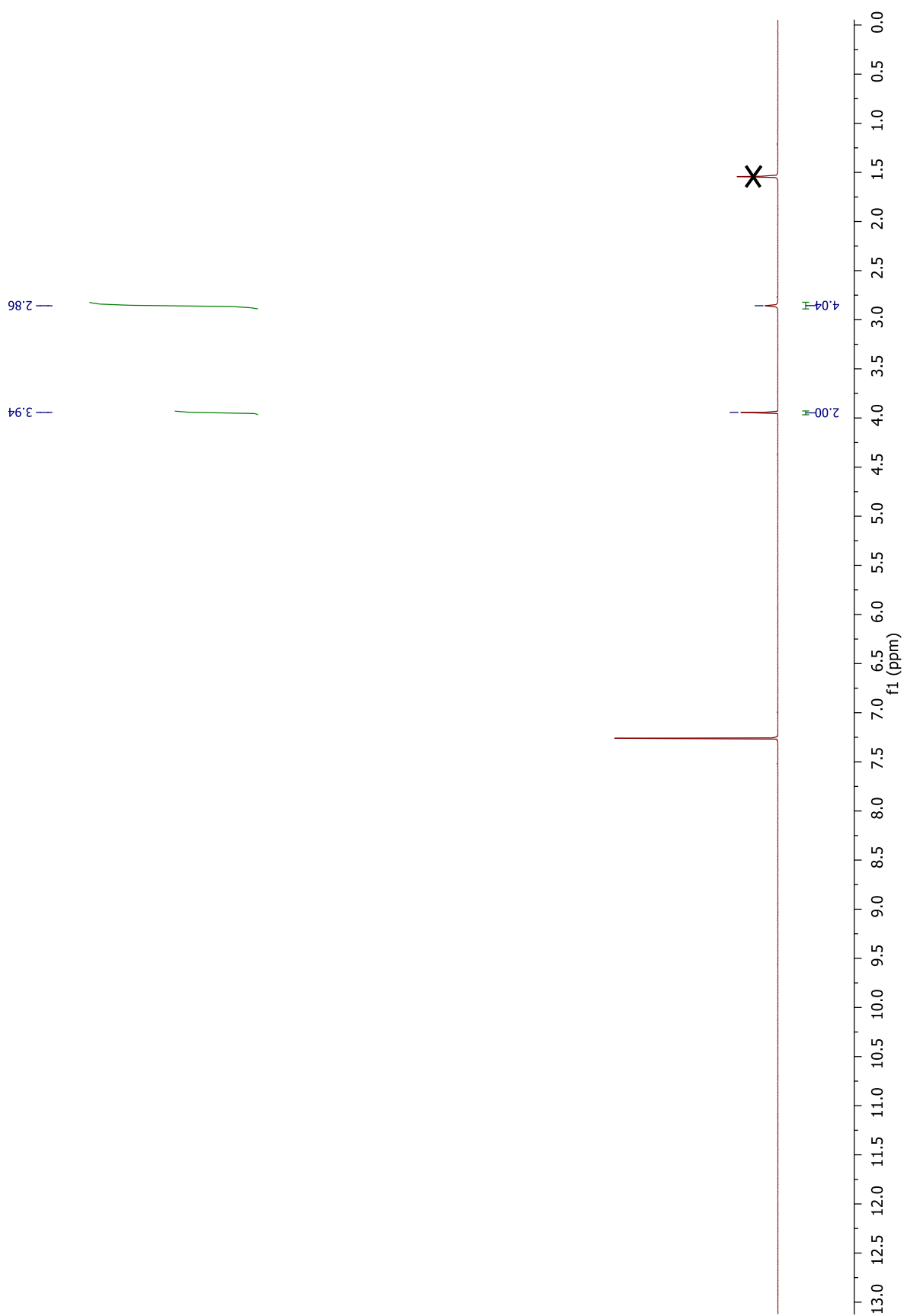
Chemical formula: C₆H₆INO₄
Molecular weight: 283.02 g mol⁻¹

Under N₂ atmosphere, to a solution of iodoacetic acid (372 mg, 2 mmol, 1 equiv.) in dry CH₂Cl₂ (20 mL) was added dicyclohexylcarbodiimide (412 mg, 2 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was cooled to 0 °C and NHS (230 mg, 2 mmol, 1 equiv.) was added portion-wise. The reaction was warmed up to room temperature and was stirred for 4 h before completion. Precipitated DCU was filtered off and the obtained filtrate was concentrated *in vacuo*. Recrystallization in isopropanol and filtration yielded *N*-hydroxysuccinimidyl iodoacetate **II.6** as a white solid (430 mg, 76%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.94 (s, 2H), 2.86 ppm (s, 4H).

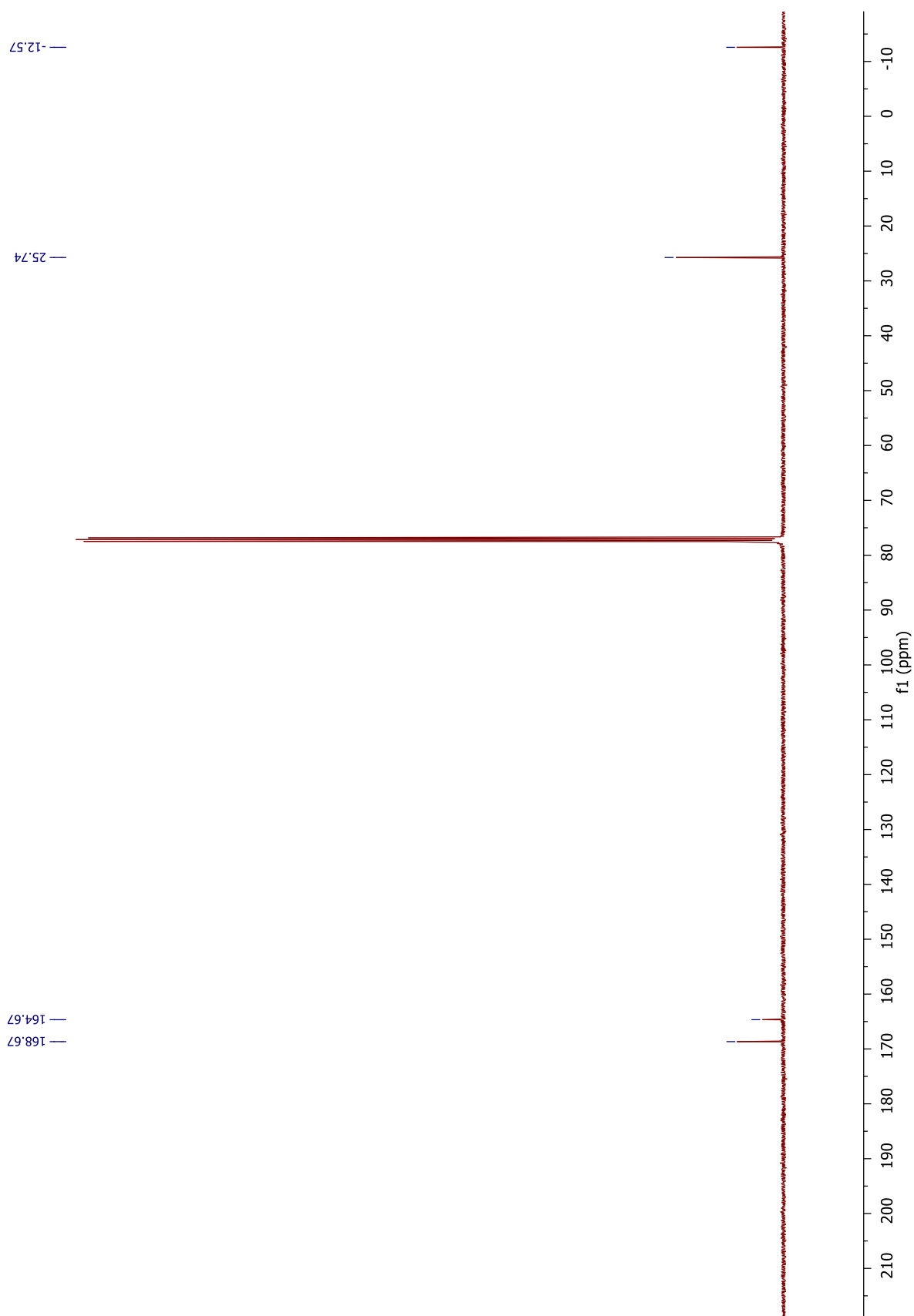
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 168.7, 164.7, 25.7, -12.6 ppm.

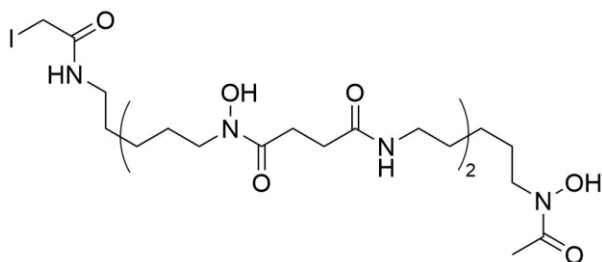
^1H NMR spectrum of compound **II.6** (400 MHz, CDCl_3):



Experimental section

^{13}C NMR spectrum of compound **II.6** (100 MHz, CDCl_3):



Synthesis of compound II.7

Chemical formula: C₂₇H₄₉IN₆O₉

Molecular weight: 728.63 g mol⁻¹

Desferrioxamine mesylate (200 mg, 0.30 mmol, 1 equiv., CAS [138-14-7]) and *N,N*-diisopropylethylamine (53 μ L, 0.30 mmol, 1 equiv.) were mixed in DMF (4 mL) and water (0.4 mL). *N*-hydroxysuccinimidyl iodoacetate (93 mg, 0.33 mmol, 1.1 equiv.) was added to the mixture and the reaction was stirred at room temperature for 2 h. Water (8 mL) was added and the precipitated product was filtered off, washed with water, and dried under reduced pressure. Compound **II.7** (129 mg, 59%) was obtained as a white powder.

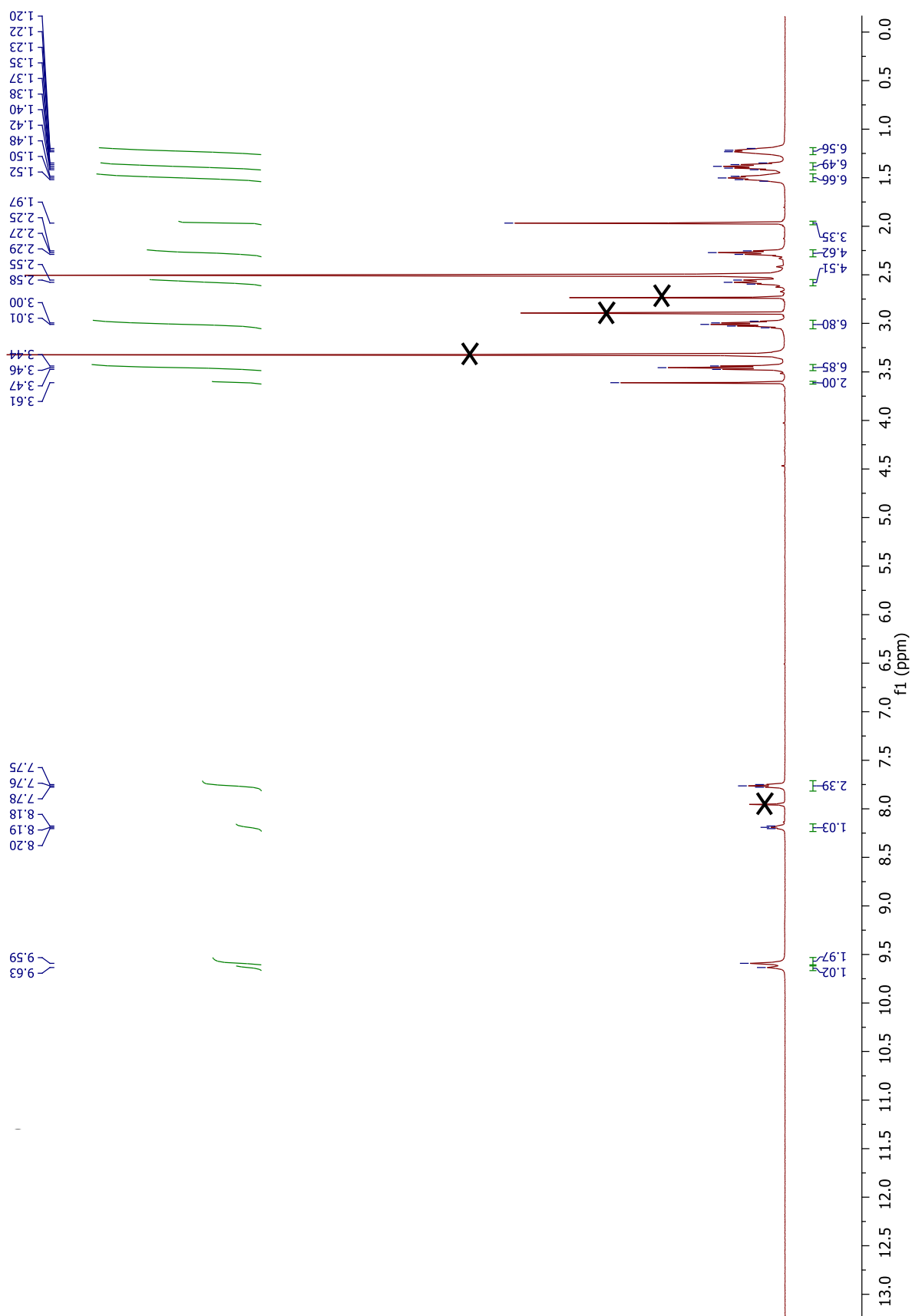
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.63 (s, 1H), 9.59 (s, 2H), 8.19 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.75 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.61 (s, 2H), 3.47–3.44 (m, 6H), 3.05–2.98 (m, 6H), 2.60–2.55 (m, 4H), 2.29–2.25 (m, 4H), 1.97 (s, 3H), 1.52–1.48 (m, 6H), 1.42–1.35 (m, 6H), 1.23–1.20 ppm (m, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.0, 171.3, 170.1, 167.5, 47, 46.8, 38.4, 29.9, 28.8, 28.4, 27.6, 26, 23.5, 23.4, 20.4, 0.9 ppm.

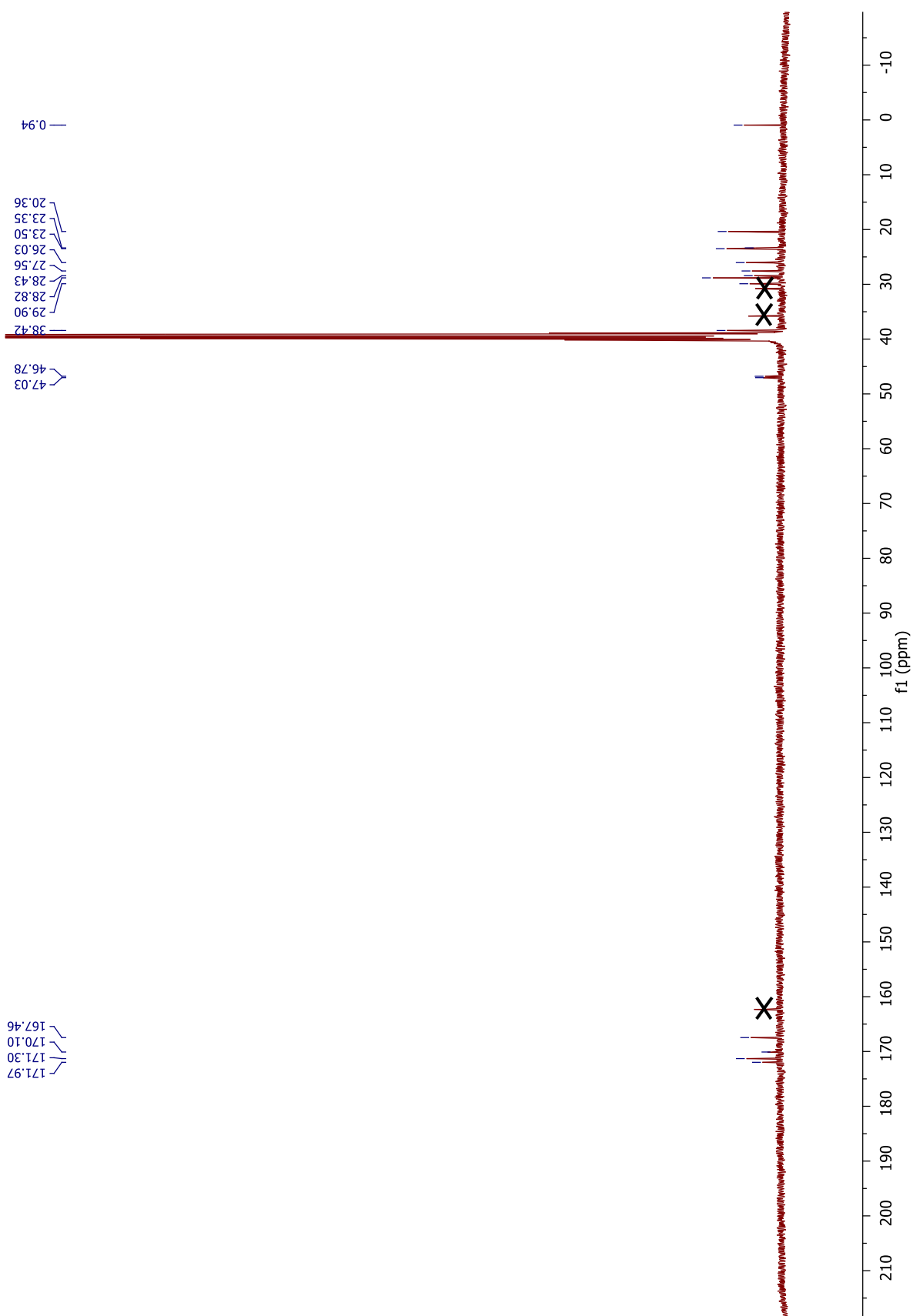
ESI-MS (ES⁺): *m/z* [M+H]⁺ 729.4

Experimental section

^1H NMR spectrum of compound **II.7** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):



^{13}C NMR spectrum of compound **II.7** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):

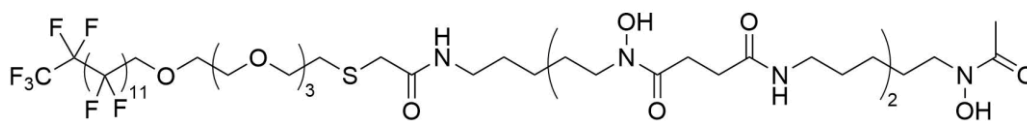


Experimental section

Synthesis of PFTD-DFO

Chemical formula: C₄₉H₆₇F₂₇N₆O₁₃S

Molecular weight: 1493.12 g mol⁻¹



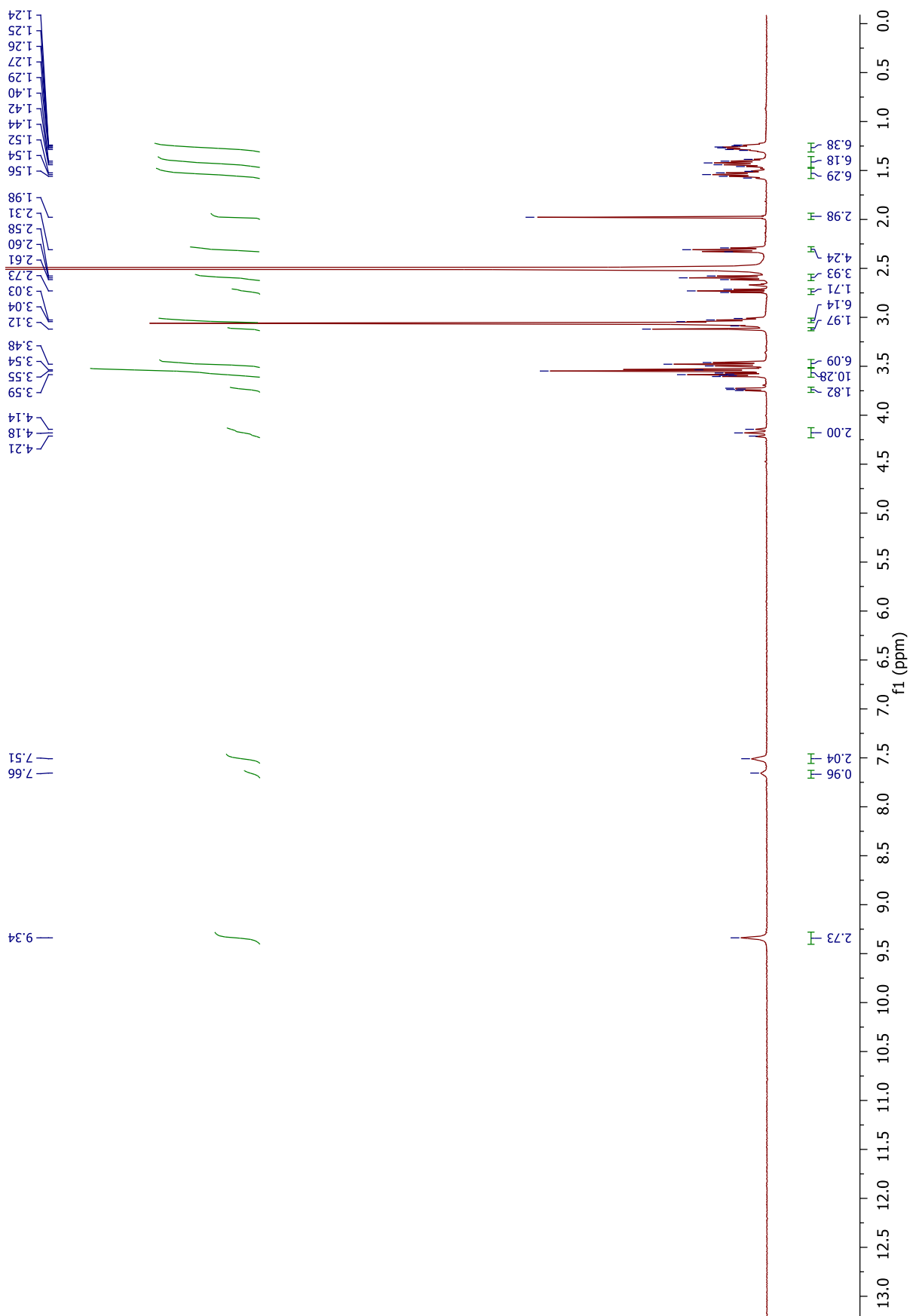
Under N₂ atmosphere, to a solution of compound **7** (20 mg, 0.027 mmol, 1 equiv.) and compound **6** (25 mg, 0.027 mmol, 1 equiv.) in dry DMSO (4 mL) was added K₂CO₃ (4 mg, 0.027 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h before being poured in water and lyophilized. Several washing steps with ultrapure water and EtOAc followed by centrifugation allowed the obtention of pure **PFTD-DFO** as a white solid (14 mg, 34%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO *d*₆, 343 K): δ 9.34 (s, 3H), 7.66 (s, 1H), 7.51 (s, 2H), 4.18 (t, *J* = 13.9 Hz, 2H), 3.75–3.72 (m, 2H), 3.60–3.54 (m, 10H), 3.50–3.46 (m, 6H), 3.12 (s, 2H), 3.04–3.01 (m, 6H), 2.73 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.61–2.58 (m, 4H), 2.33–2.29 (m, 4H), 1.98 (s, 3H), 1.58–1.51 (m, 6H), 1.46–1.39 (m, 6H), 1.29–1.24 ppm (m, 6H).

¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO *d*₆, 343 K): δ -79.98 (t, *J* = 10.0 Hz), -118.47 (t, *J* = 13.3 Hz), -120.45 to -121.14 (m), -121.68 (s), -122.41 (s), -124.90 to -125.06 ppm (m).

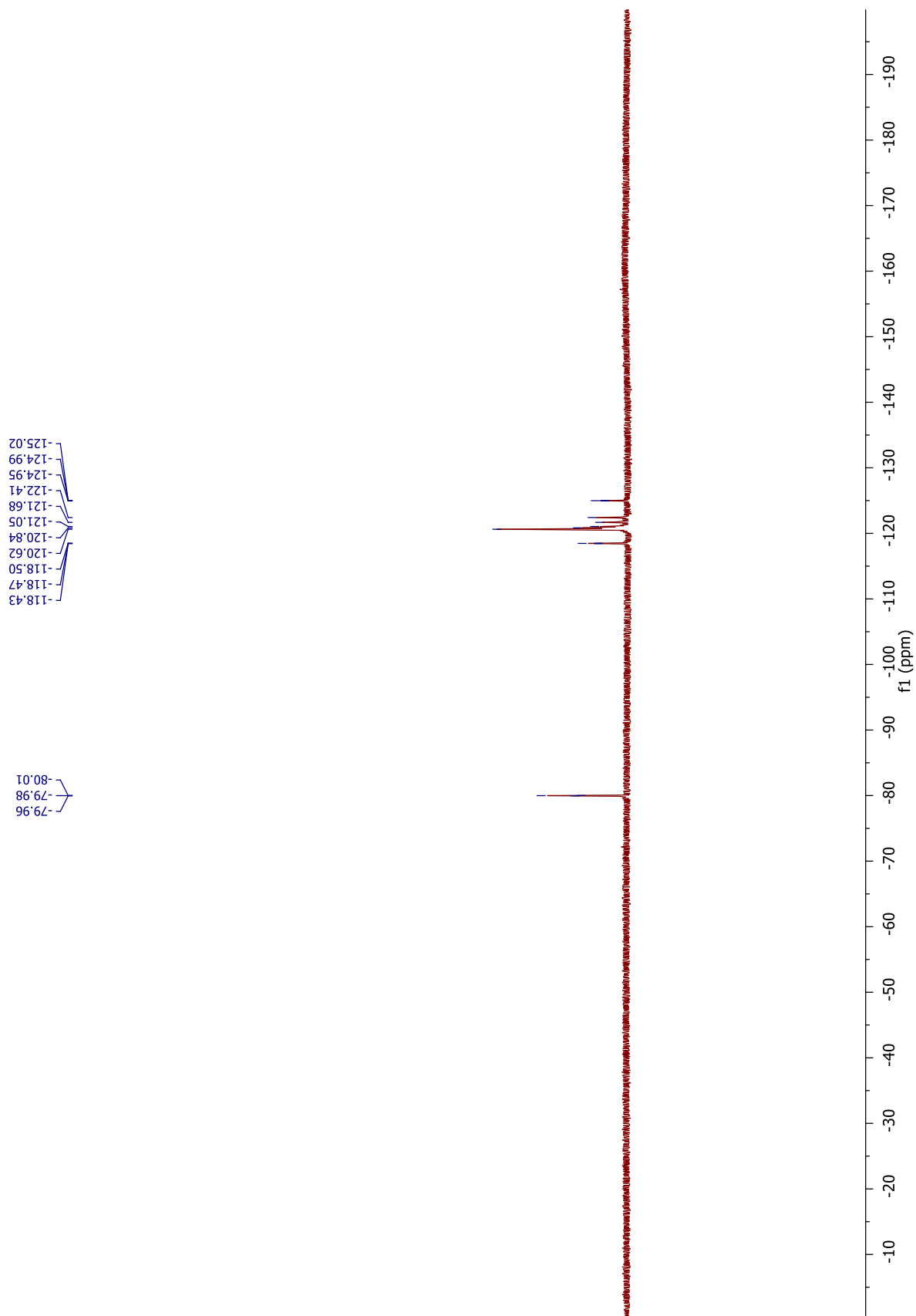
ESI-MS (ES⁺): *m/z* [M + H]⁺ observed: 1493.7261337
m/z [M + H]⁺ calculated: 1493.4518872

^1H NMR spectrum of **PFTD-DFO** (400 MHz, $\text{DMSO } d_6$, 343 K):



Experimental section

^{19}F NMR spectrum of **PFTD-DFO** (376 MHz, DMSO d_6 , 343 K):



Assembly of PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 micelles and micelle size analysis by DLS

PFTD-PEG (27 mg) and PFTD-DFO (3 mg) were suspended in a 0.1 M NaOH solution (3 mL). The resulting suspension was sonicated with an ultrasonic probe (300 ms pulse per second, output 40%) for 10 min. Buffer exchange using a NAP25 column (SephadexTM G-25 DNA Grade, GE Healthcare IllustraTM) and filtration on 0.2 μm nylon membrane led to the obtention of a clear micellar PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 suspension ($c = 10 \text{ mg mL}^{-1}$) in ultrapure water. The size of the PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 micelles in 0.1 M NaOH ($c = 15 \text{ mg mL}^{-1}$) or in ultrapure water ($c = 10 \text{ mg mL}^{-1}$) was measured by dynamic light scattering ($\lambda = 450 \text{ nm}$) at 20 °C.

Determination of ζ potential of PFTD-PEG micelles

Zeta potential of PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 micelles in ultrapure water ($c = 10 \text{ mg mL}^{-1}$) or in NaOH 0.1 M ($c = 15 \text{ mg mL}^{-1}$) was measured with a Wallis zeta potential analyzer (Cordouan, laser power 60%) at 20 °C. Measurements were performed over 7 runs of 15 s. Raw data was analyzed with ZetaQ V1.7.9.24080 software and the mean value of zeta potential for each condition is displayed.

Radiolabeling of perfluorinated micelles containing 10% PFTD-DFO amphiphile

An amount of [⁸⁹Zr]Zr-oxalic acid (85 μL , 3 mCi) (Perkin Elmer) was neutralized with 2 M Na₂CO₃ (38 μL) in an Eppendorf tube. The tube was gently shaken and degassed then 800 μL of PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 w/w micellar suspension in HEPES (0.5 M, pH 7.1–7.3) at 10 mg mL^{-1} was added to the mixture. The reaction was incubated at 37 °C under orbital shaking for 1 h and radiolabeling efficiency was determined by iTLC. Further purification on PD10 column (GE Healthcare) using DPBS ($V_{\text{DPBS}} = 1.6 \text{ mL}$) as the equilibration and elution buffer yielded 100% radiolabeled PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 w/w micelles in DPBS (2.84 mCi, 2.5 mL).

Instant thin layer chromatography

To assess the radiolabeling efficiency, a sample of the reaction (5 μL) was taken after 1 h incubation at 37 °C, deposited on iTLC-SG glass microfiber paper impregnated with silica gel (Agilent Technologies) and eluted with citrate sodium buffer (20 mM, pH 5). The activity on the paper was detected using a Mini-Scan TLC Imaging Scanner (Eckert & Ziegler, Germany) at 1 mm s^{-1} speed equipped with gamma detector B-FC-3600.

Experimental section

Cytotoxicity study of PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 micelles by MTS assay

To assess the cytotoxicity of PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 micelles, cell viability was determined by MTS assay (kit ab197010, Abcam, CAS [138169-43-4]). Briefly, B16F10 cells were plated into 96-well plate at a density of 8×10^3 cells/well in 100 μL of medium and left to adhere for 24 h in a humidified 5% CO_2 atmosphere. After plating, B16F10 cells were incubated with PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 micelles at a concentration of 0.1 to 1 mg mL^{-1} for 24 h, and then MTS reagent (20 μL) was added to each well. After incubation at 37 $^\circ\text{C}$ for 2 h, the plate was read on a microplate reader (ClarioStar, BMG Labtech) at 490 nm. The viability change of micelle-treated cells was expressed as a percentage compared to the cells without micelle treatment, and control cells were considered to have a viability value of 100%. Each experiment was conducted in triplicate.

Animal models

Animal experiments were performed according to the European Directive 2010/63/EU and to its transposition into the French law (Decree No. 2013-118). The research project was conducted at the CEA-SHFJ imaging platform and was approved by a local ethics committee. Animals were housed in individually ventilated cages with free access to food and water in a temperature (22 $^\circ\text{C}$) and humidity (40%)-controlled room, with a 12-h light/12-h dark cycle. Animal experiments were performed under anaesthesia with isoflurane in oxygen.

5-weeks-old female C57BL/6J mice were purchased from Janvier laboratory. For tumor imaging study, mice were subcutaneously injected with 1×10^6 B16F10 cells suspended in 100 μL DPBS $1\times$ into the left flank while anesthetized with 2% isoflurane.

Tolerance study of perfluorinated micelles in C57BL/6 healthy mice

Three healthy 5-week-old C57BL/6J purchased from Janvier laboratory were injected through the tail vein with 100 μL PFTD-PEG micellar solution in HEPES 0.5 M ($c_{\text{stock}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$) and monitored for 5 days to assess tolerance of mice to the perfluorinated micellar suspension (see Annex 1 for the scoring list).

Biodistribution study of PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 micelles

Subcutaneous B16F10 tumor bearing C57BL/6 mice (5 ± 1 weeks, 17.5 ± 1.4 g) were intravenously injected with the ^{89}Zr -labeled perfluorinated micelles (4.8 ± 0.2 MBq). PET emission scans were performed using an Inveon microPET scanner and an Inveon microPET/CT scanner (Siemens). A 60-min dynamic PET scan was performed immediately after micelle injection. 20-min static PET scans were subsequently acquired at selected times

(4 h, 24 h, 48 h, 72 h and 7 days) post-injection (p.i.). After each PET scan, a transmission scan or a CT scan was performed for photon attenuation correction. PET images were reconstructed with the Inveon Acquisition Workspace software (v2.1) using the OP-OSEM3D-MAP algorithm. Dynamic PET images were arranged into 24 frames ranging from 0.5 to 5 min each (3×0.5 min, 5×1 min, 5×2 min, 3×3 min, 3×4 min, 4×5 min and 1×2.5 min). CT images were reconstructed using a Feldkamp cone beam reconstruction algorithm, with a cubic voxel size of 0.21 mm^3 in a $496 \times 496 \times 630$ matrix. Normalization and corrections for dead-time, scatter, decay and attenuation were applied to all PET data. Volumes of interest (VOIs) were defined with the PMOD software (v3.9). Fixed-size spherical VOIs ($\sim 8 \text{ mm}^3$) were drawn in representative parts of the heart, liver, kidney, spleen, muscle and brain. Bones and subcutaneous tumors were delineated semi-automatically. The mean activity concentration (kBq cm^{-3}) in each VOI was divided by the total injected dose (kBq) to obtain the percentage of injected dose per volume of tissue ($\%ID \text{ cm}^{-3}$).

Ex vivo biodistribution of PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 micelles

After the last PET imaging session, mice were sacrificed by cervical dislocation. Blood and major organs (brain, heart, liver, intestine, kidney, spleen, intestine, tumor, muscle, bone) were collected, weighed, and counted with a Wizard2 gamma counter (PerkinElmer). Radioactivity data (kBq) were background-corrected, decay-corrected to injection time and divided by the total injected activity (kBq) and the organ weight (g), to obtain the percentage injected dose per gram of tissue ($\%ID \text{ g}^{-1}$).

Immunohistochemistry

At 24 h and 48 h p.i., tumors were resected and snap-frozen. Excised tumors were stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until processing. Frozen tumors were cryo-sectioned into $5\text{-}\mu\text{m}$ thick slices and the resulting tumor sections were stained with Harris hematoxylin (Sigma-Aldrich) and Eosin Y alcoholic (Sigma-Aldrich). H&E staining was performed on autoradiography slides and on adjacent tumor sections. Transmitted light images of stained tumor sections were acquired with the Axio Observer 5 microscope (Zeiss) at $10\times$ magnification. Image post-processing (stitching, white balance, global contrast adjustment) was performed with the ZEN software (v2.6, Zeiss).

Autoradiography study

Tumor slides were exposed to a storage phosphor screen in a cassette (Molecular Dynamics) for 24 h. The screen was read in an imager (Storm 860 Molecular Imager, Molecular Dynamics). The luminescence emitted from the screen corresponded directly to the radioactivity on the section. The images were acquired at $50 \mu\text{m}$ resolution.

Experimental section

Pharmacokinetic parameter data analysis

Blood pharmacokinetics results were analyzed according to a non-compartmental pharmacokinetic model (SimBiology[®], MathWorks[®]) to determine mean retention time (*MRT*), half-life (*t*_{1/2}), volume of distribution (*V*_d), total body clearance (*Cl*_t), and area under curve (*AUC*) for PFTD-PEG/PFTD-DFO 90:10 micelles.

Statistical analysis

Statistical data analysis was performed using GraphPad Prism (v9.1.2, GraphPad Software). Student's t test or one-way ANOVA analysis of variance was utilized to determine the statistical significance between two or more groups. The significance of difference was indicated as $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Chapter 3

Synthesis of NpAu@PFSH

Under vigorous stirring, to an aqueous solution of $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (30 mM, 29.5 mg, 2.5 mL, CAS [16961-25-4]) was added TOAB in toluene (50 mM, 191 mg, 7 mL, CAS [14866-33-2]). After 20 min, an aqueous solution of NaBH_4 (0.75 M, 25 mg, 0.85 mL) was added dropwise to the medium and the resulting burgundy mixture was left to stir for 3 h. Afterwards, the toluene phase was extracted and 1*H*-1*H*-2*H*-2*H*-perfluorodecanethiol (7 μL , 0.025 mmol, 0.33 equiv., CAS [34143-74-3]) was added to the toluene phase. Almost instant precipitation was observed. Several washing steps with toluene were needed to recover a dry black precipitate. Solubilization in perfluoromethylcyclohexane (PFMC, 0.5 mL) of this black precipitate yielded a colloidal solution of NpAu@PFSH.

Encapsulation of NpAu@PFSH in PFTD-PEG micelles

NpAu@PFSH in PFMC (0.1 mL) were added to perfluorinated micellar suspension in ultrapure water (1 mL, $c = 10 \text{ mg mL}^{-1}$) and the biphasic mixture was sonicated with an ultrasonic probe (300 ms pulse per second, output 40%) for 10 min. This step was repeated twice and after the third time the colloidal solution was filtered on 0.2 μm nylon membrane.

DLS analysis of NpAu@PFTD-PEG

NpAu@PFTD-PEG suspension ($[\text{PFTD-PEG}] = 10 \text{ mg mL}^{-1}$) was analyzed using a DLS instrument ($\lambda_{\text{laser}} = 660 \text{ nm}$) at 25 °C. Mean hydrodynamic diameter values of 10 acquisitions were displayed as a percent of mass.

TEM analysis of NpAu@TOAB, NpAu@PFSH and NpAu@PFTD-PEG

Liquid samples (5 μL) were deposited on carbon grids and were analyzed after overnight drying at room temperature.

Quantification by ICP-MS

NpAu@PFTD-PEG (50 μL) were digested overnight using *aqua regia* (3 mL HCl + 1 mL HNO_3) and then diluted in water (total volume $V_f = 5 \text{ mL}$). The resulting solution was analyzed by ICP-MS.

Experimental section

TGA analysis

5 mg of lyophilized nanoparticles (NpAu@PFSH and NpAu@PFTD-PEG) were put in a crucible that was placed in the furnace of the instrument. Temperature was allowed to rise to 800 °C and data was analyzed using the instrument software.

Cytotoxicity study of NpAu@PFTD-PEG by MTS assay

To assess the cytotoxicity of NpAu@PFTD-PEG, cell viability was determined by MTS assay (kit ab197010, Abcam, CAS [138169-43-4]). Briefly, B16F10 cells were plated into a 96-well plate at a density of 8×10^3 cells/well in medium (100 μ L) and left to adhere for 24 h in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After plating, B16F10 cells were incubated with NpAu@PFTD-PEG at a concentration of [PFTD-PEG] = 0.1 to 1 mg mL⁻¹ for 24 h, and then MTS reagent (20 μ L) was added to each well. After incubation at 37 °C for 2 h, the plate was read on a microplate reader (ClarioStar, BMG Labtech) at 490 nm. The viability change of micelle-treated cells was expressed as a percentage compared to the cells without micelle treatment, and control cells were considered to have a viability value of 100%. Each experiment was conducted in triplicate.

Study of the internalization of perfluorinated micelles by confocal microscopy

B16F10 cells were seeded on 35 mm glass dishes in a 6-well plate at a cell density of 1.5×10^4 cells/well in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic antimycotic solution and left to adhere for 24 h in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. After 24 h, cells were incubated with NpAu@PFTD-PEG loaded with 1 wt% DiD ([PFTD-PEG] = 0.5 mg mL⁻¹) in complete DMEM for 24 h. After exposure, cells were washed with DPBS 1 \times (1 mL \times 3) and fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min. Cells were then stained with 1 μ M Hoechst 33342 for 20 min, washed twice with DPBS (1 mL) and observed by confocal microscopy. DiD was excited at 644 nm and the fluorescence emission was detected in the 650–750 nm range. A confocal laser scanning microscope (LEICA SP5) was used to directly visualize the intracellular location of NpAu@PFTD-PEG loaded with 1 wt% DiD.

Clonogenic survival assay of NpAu@PFTD-PEG

For clonogenic survival assays, B16F10 cells were plated in T25 flask at a density of 2×10^4 cells mL⁻¹ ($V = 5$ mL) and left to adhere for 24 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After plating, medium was discarded and cells were incubated for 24 h with different concentrations of NpAu@PFTD-PEG, ranging from 0.1 to 1 mg mL⁻¹. After

treatment, NpAu@PFTD-PEG-rich medium was discarded, cells were washed with DPBS 1× (2 mL) and detached by trypsinization and counted. 100 cells were then seeded in 10 cm cell culture dishes and kept for 7 days in a humidified incubator at 37 °C. Subsequently, cells were stained with 0.5% crystal violet and the resulting colonies were counted. A colony was defined as a clone containing at least 64 cells. Plating efficiency (*PE*) was calculated relative to the control group (vehicle) and is defined as the ratio of the number of colonies formed to the number of cells seeded. Surviving fraction (*SF*) was calculated using the following formula:

$$SF = \frac{\text{\# of colonies formed}}{\text{\# of cells seeded}} \times \frac{1}{PE}$$

In vitro radiosensitization assay

B16F10 cells were plated in 6-well-plates at a density of 2×10^5 cells/well and left to adhere for 24 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After plating, complete medium was discarded and cells were incubated for 24 h in complete culture medium containing either the vehicle (control), NpAu@PFTD-PEG, ([PFTD-PEG] = 0.25 mg mL⁻¹) or PFTD-PEG micelles ([PFTD-PEG] = 0.25 mg mL⁻¹). After treatment, the medium was discarded and replaced by fresh medium and cells were irradiated with a ¹³⁷Cs sealed source at 1 Gy min⁻¹ (GSR-D1 gamma irradiator, ¹³⁷Cs) at Institut Curie in Orsay at different doses (0–6 Gy). After irradiation, cells were washed with DPBS 1× (2 mL), detached by trypsinization and counted. Then, for each condition, B16F10 cells were plated in 10 cm cell culture dishes at different seeding densities, from 100 to 2800 cells per dish (3 dishes per tested condition). The cells were kept at 37 °C in a humidified incubator for 7 days. Subsequently, cells were stained with 0.5% crystal violet and the resulting colonies (> 64 cells) were counted. Plating efficiency (*PE*) was calculated relative to the control group (0 Gy) and is defined as the ratio of the number of colonies formed to the number of cells seeded. Surviving fraction was calculated as described above.

Experimental section

Annexes

Annexe 1 : Tableau des différents paramètres surveillés durant l'étude de tolérance (souris C57BL/6)

		Score
Posture		
Normale	0	
Dos légèrement courbé	1	
Dos modérément courbé	3	
Dos sévèrement courbé	5*	
Yeux		
Yeux ouverts (>75%)	0	
Yeux partiellement ouverts (50-75%)	1	
Yeux partiellement fermés (25-50%)	3	
Fermeture Complète (<25%)	5	
Niveau d'activité		
Normale	0	
Légère diminution	1	
Moyenne diminution	3	
Forte diminution ou absence d'activité	5	
Comportement		
Normale	0	
Démarche légèrement anormale	1	
Lenteur et diminution de la vigilance (Léthargie)	2	
Démarche anormale marquée	5	
Poids corporel (par rapport au poids avant le début du protocole)		
Normale	0	
Perte de poids de 5 à 10%	1	
Perte de poids de 11 à 15%	3	
Perte de poids de 16 à 20%	5*	
Perte de poids de plus de 20%	NE	
"Body Score" - voir Annexe		
Condition normale (BC3)	0	
Sous Condition-légère perte de poids (BC3-)	2	
Sous Condition-perte de poids (BC2)	5*	
Sous Condition-Emaciation sévère (BC1)	NE	
Etat du pelage		
Normale	0	
Pelage légèrement hirsute	1	
Légère piloérection	2	
Horripilation marquée	4*	
Fonctions corporelles		
Tachypnée (respiration rapide)	1	
Dyspnée (difficultés respiratoires)	4*	
Environnement		
Selles molles ou diarrhée	1	
Selles liquides avec plus de particules solides que liquide	2	
Selles liquides avec plus de liquide que de particules solides	3	
Diarrhée sanglante	NE	
Déshydratation		
Retour du repli de la peau de 1 à 2 secondes	0	
Retour du repli de la peau de 2 à 3 secondes	3	
Retour du repli de la peau de plus de 3 secondes	5*	
Taille de la tumeur		
<1cm	0	
Entre 1 cm et 1,2cm	1	
Entre 1,2cm et 1,5cm	3	
>1,5cm	NE	
Etat physique générale		
Présence d'Ascite	5*	
Présence de ganglions hypertrophiés	5*	
Tumeur entravant le déplacement	NE	
Ulcération de la tumeur	NE	
Total		

Interprétation de la perte/Gain de poids

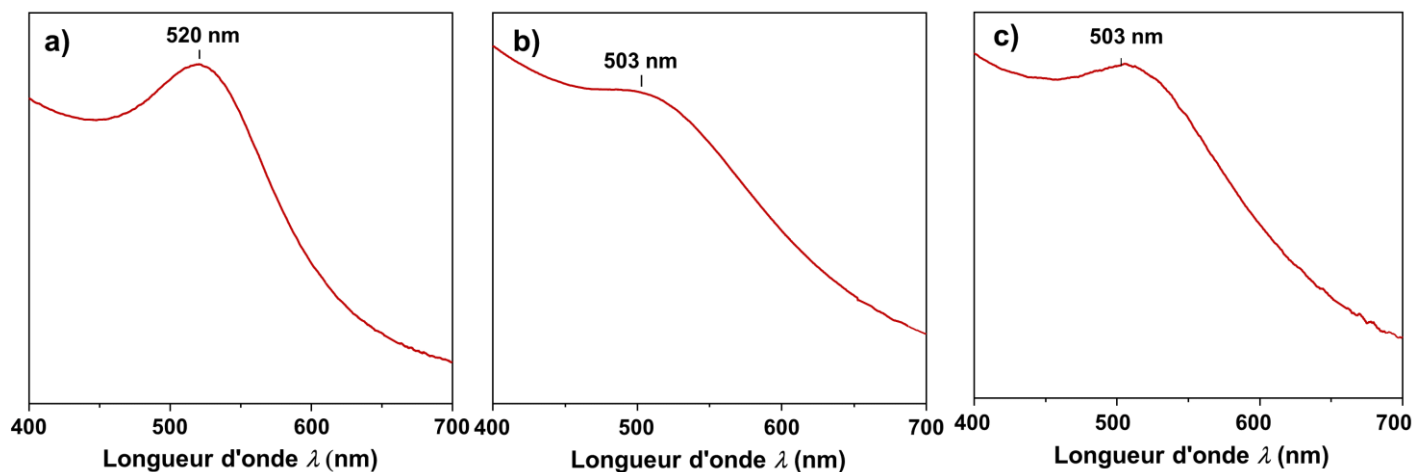
Spécifique à la tumeur

Annexes

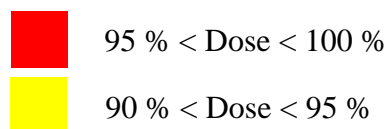
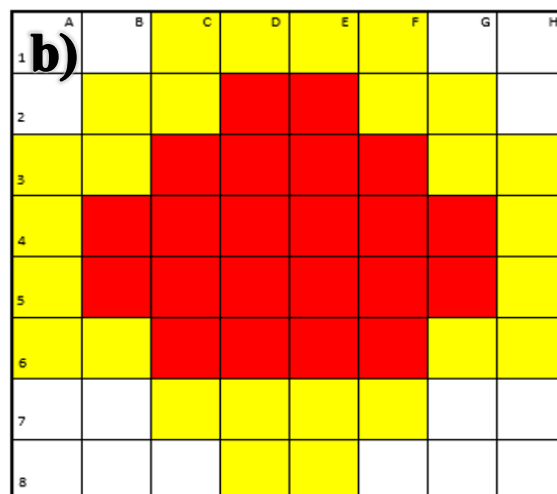
Annexe 2 : Tableau récapitulatif des différents paramètres pharmacocinétiques calculés à partir de l'analyse des images TEP avec le logiciel PMOD

Paramètre	Moyenne	Écart-type	Unité
$t_{1/2}$	4,53	1,18	h
	271,8	70,8	min
AUC_0_last	62822,06	3869,89	kBq h mL ⁻¹
AUC_infinity	72942,99	8096,41	kBq h mL ⁻¹
AUMC_0_last	54742,32	2311,63	kBq h ² mL ⁻¹
AUMC	139380,62	69667,98	kBq h ² mL ⁻¹
Clairance	0,07	0,01	mL h ⁻¹
MRT	1,85	0,78	h
	0,08	0,03	j
V _{ss} (V _d apparent)	0,12	0,04	mL
V _z (V _d à l'équilibre)	0,43	0,09	mL

Annexe 3 : Spectres UV des NpAu@TOAB (a), NpAu@PFSH (b) et NpAu@PFTD-PEG (c)



Annexe 4 : Photographie de l'irradiateur γ GSR1 utilisé durant les expériences d'irradiation (a), répartition de la dose (niveau 2) (b et b') et photographie de l'installation des F25 sur le plateau avant l'irradiation (c):



Niveau +2

b')

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	85,33	88,02	90,55	91,99	92,10	91,96	89,12	85,50
2	87,62	91,41	94,49	95,12	95,15	92,98	91,21	89,22
3	91,38	94,00	96,26	98,11	98,15	97,15	94,19	91,56
4	92,65	95,47	98,57	100,00	99,72	97,95	95,68	92,73
5	93,01	95,71	98,80	99,86	99,17	97,31	96,05	93,24
6	90,82	93,19	96,66	97,23	98,48	96,12	94,75	91,56
7	86,34	89,63	91,58	92,89	94,42	92,01	89,68	88,18
8	81,97	86,61	88,75	90,11	90,68	88,80	87,05	84,13

4,625 cm (hauteur d'une case)

37 cm (largeur totale)



