



HAL
open science

Stratégies pour une meilleure exploitation des propriétés d'imagerie et de thérapie des nanoparticules d'or

Inaya Dabaja

► **To cite this version:**

Inaya Dabaja. Stratégies pour une meilleure exploitation des propriétés d'imagerie et de thérapie des nanoparticules d'or. Chimie inorganique. Université Bourgogne Franche-Comté, 2022. Français. NNT : 2022UBFCD062 . tel-04611759

HAL Id: tel-04611759

<https://theses.hal.science/tel-04611759>

Submitted on 14 Jun 2024

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

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



**UNIVERSITÉ DE
FRANCHE-COMTÉ**



Ecole doctorale n°553

École Doctorale Carnot-Pasteur

Doctorat de chimie

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

Préparée à l'Université de Franche-Comté

Thèse présentée et soutenue à Besançon le 12/12/2022 par

Mme Dabaja Inaya

**Stratégies pour une meilleure exploitation des propriétés
d'imagerie et de thérapie des nanoparticules d'or**

Composition du Jury :

Mme Ammar Souad	Professeur Université Paris Cité	Présidente
M. Lux François	Maitre de conférences – HDR Université de Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Mme Hervé Aubert Katel	Maitre de conférences – HDR Université François-Rabelais de Tours	Rapporteure
M. Denat Franck	Professeur Université Bourgogne Franche-Comté	Examineur
M. Roux Stéphane	Professeur Université Bourgogne Franche-Comté	Directeur de thèse
Mme Bazzi Rana	Maitre de conférences Université Bourgogne Franche-Comté	Co-directrice de thèse

Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Je souhaite remercier Pr Sylvain Picaud (Directeur de l'institut UTINAM), Pr Patrick Fievet (ancien directeur de l'équipe NCM) et Dr Sébastien Déon (directeur de l'équipe NCM) pour m'avoir accueillie au laboratoire. Je remercie la région Bourgogne Franche-Comté d'avoir financé cette thèse par le biais d'une thèse ISite.

Je tiens à remercier Dr François Lux et Dr Katel Hervé Aubert pour avoir accepté de rapporter ce manuscrit et de participer à ma soutenance. Merci également aux membres du jury Pr Frank Denat et Pr Souad Ammar d'avoir accepté d'en faire partie.

J'adresse mes chaleureux remerciements aux Pr Stéphane Roux (directeur de ma thèse) et Dr Rana Bazzi (codirectrice de ma thèse) pour leur compétence, leur disponibilité, leur enthousiasme et pour m'avoir guidée, soutenue et encouragée, chacun à sa manière, aussi bien dans le travail scientifique et la rédaction de la thèse que dans la vie quotidienne et personnelle surtout dans la période de confinement.

Je souhaite remercier toutes les personnes avec qui j'ai collaboré durant ces quatre années pour leur expérience enrichissante. Je remercie Pr Franck Denat, Dr Victor Goncalves, Adrien Dubois et Alix Deshotel (Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, Dijon) pour avoir synthétisé les chélateurs macrocycliques et le peptide VG qui entrent dans la composition des nanostructures développées au cours de ma thèse.

Je tiens à remercier Dr Rémi Chassagnon (Laboratoire Interdisciplinaire Carnot Bourgogne, Dijon) pour les images TEM des nanoparticules.

Merci à Dr Frédéric Bouyer (Laboratoire Interdisciplinaire Carnot Bourgogne, Dijon) pour les analyses ATG des nanoparticules.

Je remercie notamment Dr Alexandra Oudot, Dr Bertrand Collin et Dr Mathieu Morreau (Université de Dijon et CGFL) pour le radiomarquage et l'imagerie.

Je voudrais remercier Sylvaine Linget (QUALIO, Besançon) et Nadia Crini (Chrono-environnement, Besançon) pour les analyses ICP.

Dans l'équipe, merci à Gautier de m'avoir transmis ses connaissances et ses expériences et à Chahrazad d'avoir partagé le bureau avec moi. Je voudrais remercier mes collègues Farhan, Alix, Asli pour leur encouragement et les bons moments passer au sein du laboratoire.

Mes plus profonds remerciements et ma reconnaissance indéfectible vont à mes parents (Hassan et Jacqueline) pour m'avoir donné toutes les chances d'arriver jusqu'ici et pour leur soutien sans faille. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma gratitude. Merci à ma

sœur (Issrah) et mon Frère (Ali) pour leur soutien. Je tiens à remercier encore mes meilleurs amis (Zahraa, Mirna et Batoul) pour leur encouragement.

Enfin, un remerciement très profond et très spécial à mon mari, Moustafa, qui a largement contribué à la réalisation de ma thèse en m'encourageant et en me soutenant quotidiennement, ce qui m'a permis d'exprimer pleinement mon potentiel.

Résumé

Les nanoparticules d'or recouvertes de chélateurs ont un potentiel prometteur pour la radiothérapie guidée par imagerie par résonance magnétique (IRM) et pour le suivi de la biodistribution de ces nanoparticules radiosensibilisantes par imagerie IRM/TEP simultanée. Cependant, ce potentiel n'est pas pleinement exploité en raison d'une clairance rénale indispensable mais trop rapide.

Nous avons testé deux stratégies pour retarder la clairance rénale, qui demeure pourtant essentielle pour les nanoparticules non biodégradables : (1) l'introduction de chaînes de PEG de différentes longueurs dans la structure moléculaire des chélateurs utilisés pour la synthèse des nanoparticules d'or ; (2) l'utilisation de nanotransporteurs biodégradables composés de nanofleurs d'oxyde de fer.

Les chélateurs PEGylés sont composés d'un site d'ancrage, un fragment d'acide thioctique (TA), et d'un chélateur macrocyclique (DOTAGA). Une chaîne de polyéthylène glycol (PEG) de différentes longueurs (4, 11 unités) a été insérée entre TA et DOTAGA. Nous avons démontré que la réduction du sel d'or en présence de ces chélateurs PEGylés permettait d'obtenir des nanoparticules d'or ($\text{Au@TAPEG}_n\text{DOTAGA}$, avec $n = 0, 4$ et 11). Le marquage des nanoparticules par des ions gadolinium ou par des radio-isotopes permet de suivre la biodistribution des nanoparticules d'or recouvertes de chélateurs par IRM ou par imagerie nucléaire. Deux modèles ont été utilisés pour tester les nanoparticules PEGylées *in vivo*. La première étude de la biodistribution de différents types de nanoparticules a montré que la longueur de la chaîne PEG influence le comportement *in vivo* des nanoparticules injectées par voie intraveineuse chez des souris saines. La deuxième étude préliminaire a porté sur le potentiel radiothérapeutique de ces nanoparticules d'or. Une radiothérapie a été réalisée après administration de nanoparticules $\text{Au@TAPEG}_n\text{DOTAGA}$ sur des embryons de poulet porteurs de glioblastomes humains initiés à partir de la lignée cellulaire U87. Cette étude a montré un effet antimétastatique plus prononcé et une meilleure rétention des nanoparticules d'or PEGylées qui les rendent plus efficaces quand la radiothérapie est effectuée 24 h plutôt qu'une heure après l'administration.

La deuxième stratégie pour retarder la clairance rénale consiste à immobiliser les nanoparticules d'or enrobées de chélateurs sur des nanofleurs d'oxyde de fer biodégradables. La présence des nanoparticules d'or a considérablement amélioré la stabilité colloïdale des nanofleurs d'oxyde de fer et a ouvert la voie à l'exploitation des propriétés intéressantes de ces particules superparamagnétiques pour l'imagerie et l'hyperthermie magnétique. La biodistribution des nanofleurs décorées avec les nanoparticules d'or a été suivie par imagerie TEP/IRM simultanée après injection intraveineuse à des souris saines et à des souris présentant des plaques d'athérosclérose dans l'aorte. À partir des données recueillies par imagerie, nous avons déduit que les nanoparticules d'or sont moins rapidement éliminées du corps lorsqu'elles sont greffées sur les nanofleurs par rapport aux nanoparticules d'or libres. De plus, nous avons observé que les nanoparticules d'or ciblent mieux les plaques d'athérosclérose lorsqu'elles sont greffées aux nanofleurs.

Abstract

Chelator-coated gold nanoparticles exhibit promising potential for magnetic resonance imaging (MRI)-guided radiotherapy and for simultaneous PET/MRI imaging. However, this potential is not plentifully exploited due to a too rapid renal clearance.

We tested two strategies to postpone renal clearance, which is essential for non-biodegradable nanoparticles: (1) PEGylation, with different chain lengths, of the chelators used to synthesize gold nanoparticles; (2) the use of biodegradable nanocarriers composed of iron oxide nanoflowers.

PEGylated chelators are composed of an anchor site, a thioctic acid (TA) moiety, and a macrocyclic chelator (DOTAGA). A polyethylene glycol (PEG) chain of different lengths (4, 11 units) was inserted. We demonstrated that the reduction of the gold salt in the presence of these PEGylated chelators yielded gold nanoparticles (Au@TAPEG_nDOTAGA, with $n = 0, 4,$ and 11). Labeling the nanoparticles with gadolinium ions or radioisotopes allows monitoring the biodistribution of chelator-coated gold nanoparticles by MRI or nuclear imaging. Two models were used to test PEGylated nanoparticles *in vivo*. The first study of the biodistribution of different types of nanoparticles showed that the length of the PEG chain influences the *in vivo* behavior of intravenously injected nanoparticles in healthy mice. The second preliminary study focused on the radiotherapeutic potential of these gold nanoparticles. Radiotherapy was performed after the administration of Au@TAPEG_nDOTAGA nanoparticles on chicken embryos carrying human glioblastoma initiated from the U87 cell line. This study showed the anti-metastatic and retention effect of PEGylated gold nanoparticles.

The second strategy to postpone renal clearance lies in the immobilization of the chelator-coated gold nanoparticles on biodegradable iron oxide nanoflowers. The presence of the gold nanoparticles significantly improved the colloidal stability of the iron oxide nanoflowers and paved the way for exploiting the attractive properties of these superparamagnetic particles for imaging and magnetic hyperthermia. The biodistribution of nanoflowers decorated with gold nanoparticles was followed by simultaneous PET/MRI imaging after intravenous injection to healthy mice and mice with atherosclerotic plaques in the aorta. We deduced from the imaging data that gold nanoparticles are less rapidly cleared from the body when grafted to nanoflowers. In addition, we observed that gold nanoparticles better target atherosclerotic plaques when the nanoflowers carry them.

Liste d'abréviations

Sigles ou abréviations	Significations
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGuIX	Nanoparticules radiosensibilisante la radiothérapie
AHA	American heart association « Association américaine du cœur »
AMF	Alternating magnetic field « Champ magnétique alternative »
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	Acide ribonucléique interférent
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATG	Analyse thermogravimétrique
AuNC	Gold nanocluster « nanocluster d'or »
Au-NS	Gold nanoshells « nanocoquilles d'or »
AVC	Accident vasculaire cérébrale
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BSA	Bovine serum albumin « Albumine de sérum bovin »
Btxl	Docétaxel
CAM	Chorioallantoic membrane « Membrane chorioallantoïque »
CCM	Chromatographie à couche mince
CDDP	Cisplatine
CDs	Carbon dots « points de carbone »
CGFL	Centre George François Leclerc
CMC	Concentration micellaire critique
CML	Chronic myeloid leukemia « Leucémie myéloïde chronique »
CML	Cellules musculaires lisses
CNTs	Carbon nanotubes « nanotubes de carbone »

Sigles ou abréviations	Significations
cRGDK	Pentapeptide cyclique composé du motif « arginine-glycine-acide aspartique »
CT	Computed tomography « Tomodensitométrie »
CPG	« Chromatographie en phase gazeuse »
GC	Gas chromatography
DBP	Diastolic blood pressure « Pression sanguine diastolique »
DDS	Drug delivery system « Système de délivrance de principes actifs »
D_h	Diamètre hydrodynamique
DLS	Dynamic light scattering « Diffusion de lumière dynamique »
DOX	Doxorubicine
e⁻	Electron « électron »
EBRT	External beam radiation therapy « Radiothérapie externe »
EDS	Energy dispersive X-ray spectroscopy « Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie »
EPR	Enhanced permeability and retention effect « effet de perméabilité et de rétention accru »
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
FDA	Food and drug administration « Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux »
FGF	Fibroblast growth factor « Facteur de croissance des fibroblastes »
FRET	Fluorescence resonance energy transfer « Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes »
GDs	Graphene dots « points de graphène »
HCT	Hypoxic proportion of tumor « Proportion hypoxique de la tumeur »
HDL	High density lipoprotein « Lipoprotéine de haute densité »
HPLC	High performance liquid chromatography « Chromatographie en phase liquide à haute performance »

Sigles ou abréviations	Significations
HTA	Hypertension artérielle
ICAM	Intercellular adhesion molecule « Molécule d'adhésion intercellulaire »
ICP-MS	Inductively coupled plasma – mass spectrometry « Plasma à couplage inductif – spectrométrie de masse »
ICP-OES	Inductively coupled plasma – optical emission spectrometry « Plasma à couplage inductif – spectrométrie d'émission optique »
IL	Interleukine
IM	Intramusculaire
IMC	Indice de masse corporelle
IR	Infrarouge
IRM	Imagerie par résonance magnétique
MRI	Magnetic resonance imaging
IRT	Internal radiation therapy « Radiothérapie interne »
IV	Intraveineuse
IVUS	Intravascular ultrasound « Échographie intravasculaire »
LDL	Low density lipoprotein « Lipoprotéine de basse densité »
MCF-7	Michigan cancer foundation (lignée de cellules tumorale)
MCP	Monocyte chemoattractant protein « Protéine chimiotactique des monocytes »
MDA-MB	M.D. Anderson - metastatic breast (Lignée de cellule tumorale)
MDR	Multi drug resistance « Résistance multiples aux médicaments »
MEC	Matrice extracellulaire
MET	Microscopie électronique à transmission
TEM	Transmission electron microscopy
M_L	Aimantation longitudinale
MMP	Matrix metalloproteinase
MNP	Magnetic nanoparticles
M_T	Aimantation transversale
MVC	Maladies cardio vasculaire
M_w	Masse molaire moyenne en masse
NCM	Nanoparticules, contaminants et membranes

Sigles ou abréviations	Significations
NPs	Nanoparticules
NRs	Nanorods « nanobâtonnets »
OMS	Organisation mondiale de la santé
VG-196	Peptide de ciblage dirigé contre le VCAM-1
PET	Photoinduced electron transfer « Transfert d'électrons photoinduit »
pH	Potentiel d'hydrogène ($-\log[\text{H}_3\text{O}^+]$)
pIR	Proche infrarouge
NIR	Near infrared
PMI	Peptide de ciblage dirigé contre le MDM2
PTT	Photothermal therapy « Thérapie photothermique »
PTX	Pactitaxel
QDs	Quantum dots « points quantiques »
RDML	Real-time PCR data markup language « Langage de balisage de données PCR en temps réel »
RF	Radiofréquence
r_i	Relaxivité
R_i	Taux de relaxation
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPS	Résonance plasmonique de surface
SPR	Surface plasmonic resonance
RPSL	Résonance plasmonique de surface localisée
LSPR	Localised surface plasmon resonance
SBP	Systolic blood pressure « Pression artérielle systolique »
SC	Sous-cutané
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SLN	Solid lipid nanoparticles « Nanoparticules lipidiques solides »
SPIONs	Superparamagnetic iron oxide nanoparticles « Nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques »
SPM	Système phagocytaire mononucléé
MPS	Mononuclear phagocyte system

Sigles ou abréviations	Significations
SRE	Système réticulo-endothéliale
STEM-HAADF	Scanning transmission electron microscopy-high angle annular dark field « Microscopie électronique à transmission à balayage à champ noir annulaire à angle élevé »
t_{1/2}	Temps de demi-vie
TFN	Interferon « Interféron »
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
SPECT	Single photon emission computed tomography
TEP	Tomographie par émission de positons
PET	Positron emission tomography
TNF	Tumor necrosis factor « Facteur de nécrose tumoral »
TNM	Tumor, node, metastases « Tumeur, ganglion, métastases »
UICC	Union Internationale contre le cancer
USPIONS	Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles « Nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique ultrapetites »
UTINAM	Univers Temps-fréquence, Interfaces, Nanostructures, Atmosphères et environnement, Molécules
UV	Ultra-Violet
VCAM	Vascular cell adhesion molecule « Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire »
VEGF	Vascular endothelial growth factor « Facteur de croissance endothélial vasculaire »
Z	Numéro atomique

Symboles Chimiques	Significations
As	Arsenic
Au	Or
Ba	Baryum
Br	Brome
C	Carbone
Cl	Chlore
Cu	Cuivre
F	Fluor
Ga	Gallium
Gd	Gadolinium
H	Hydrogène
I	Iode
In	Indium
Lu	Lutécium
Mn	Manganèse
N	Azote
Na	Sodium
O	Oxygène
Pt	Platine
S	Soufre
Rb	Rubidium
Re	Rhénium
Sc	Scandium
Tc	Technétium
Tl	Thallium
Y	Yttrium
Zr	Zirconium

Produits chimiques	Significations
BOPTA	Dérivé du DTPA, chélateur de gadolinium Acide gadobénique
-COO⁻	Ion carboxylate
-COOH	Acide carboxylique
DEG	Diéthylène Glycol
DMF	N,N-Diméthylformamide
DOTA	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclodécane-1,4,7,10-tétraacétique
DOTAGA	Acide (10-(2,6-dioxotétrahydro-2H-pyran-3-yl)-1,4,7,10-tétraazacyclodécane-1,4,7-triyl)triacétique
DTDTPA	Dérivé dithiolé du DTPA (Acide diéthylènetriamine pentaacétique dithiolé)
DTPA	Acide diéthylènetriamine pentaacétique
EDC	N-[3-(diméthylamino)propyl]-N'-éthylcarbodiimide
EG	Ethylène glycol
EOB-DTPA	Dérivé éthoxybenzyl du DTPA
Fe₃O₄	Magnétite
Gd-DTPA-BMEA	Chélateur du gadolinium [8,11-bis(carboxyméthyl)-14-[2-[(2-méthoxyéthyl)amino]-2-oxoéthyl]-6-oxo-2-oxa-5,8,11,14-tetraazahexadecan-16-oato(3-)] gadolinium
Gd-HP-DO3A	Chélateur du gadolinium (10-(2-Hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetato)gadolinium
HA	Hyaluronic Acid
HAuCl₄	Acide tétrachloroaurique
HYNIC	Chélateur bifonctionnel Acide hydrazinonicotinique
NaBH₄	Tétrahydroborate de sodium
-NH₂	Groupe amine
-NH₃⁺	Ion ammonium
NHS	N-hydroxysuccinimide
NMDEA	N-méthyl-diéthanolamine
NODAGA	Acide 1,4,7-triaazacyclononane-1,4,7-triacétique
PEG	Poly(éthylène glycol)
PLGA	Ploy(lactide-co-glycolide)
PPE	Poly(p-phénylène éthylène)
-SH	Fonction thiol
TA	Acide Thioctique

Produits chimiques	Significations
TADOTA	Dérivé du DOTA modifié par l'acide thioctique
TADOTAGA	Dérivé du DOTAGA modifié par l'acide thioctique
TANODAGA	Dérivé du NODAGA modifié par l'acide thioctique
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Maghémite

Sommaire :

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : Nanoparticules multifonctionnelles pour des applications médicales	7
1. Nanomédecine	15
1.1. Avantages des nanoparticules en médecine	15
1.2. Principaux types de nanoparticules	18
1.2.1. Nanoparticules de polymères	19
1.2.2. Nanoparticules à base de lipides	20
1.2.3. Nanoparticules inorganiques	21
1.3. Bilan	25
2. Imagerie médicale	26
2.1. Imagerie par résonance magnétique	27
2.1.1. Principe	27
2.1.2. Les agents de contraste en IRM	28
2.2. Tomodensitométrie ou Imagerie X	31
2.2.1. Principe	31
2.2.2. Agents de contraste	32
2.3. Imagerie nucléaire	32
2.3.1. Scintigraphie et tomographie par émission mono-photonique TEMP (SPECT)	33
2.3.2. Tomographie par émission de positon TEP (PET)	33
2.4. Imagerie multimodale	34
2.5. Bilan	36
3. Cancer et athérosclérose : maladie différente mais traiter avec les mêmes nanoparticules	36
3.1. Cancer	36
3.1.1. Cancer ou cancers ?	38
3.1.2. Apparition et croissance	39
3.1.3. Angiogenèse tumorale et expansion métastatique	40

3.1.4.	Physiologie tumorale et implication thérapeutique	41
3.1.5.	Les méthodes de traitement du cancer	42
3.2.	Athérosclérose	54
3.2.1.	Les maladies cardiovasculaires	54
3.2.2.	Définition de l'athérosclérose	55
3.2.3.	Anatomie	55
3.2.4.	Mécanisme de formation, de progression et de rupture des plaques d'athérosclérose	59
3.2.5.	Facteur de risque de l'athérosclérose	62
3.2.6.	Diagnostics des plaques	63
3.2.7.	Traitement des plaques	64
3.3.	Bilan	64
4.	Nanoparticules inorganiques dans le domaine médical	64
4.1.	Introduction	64
4.2.	Intérêt des nanoparticules pour les applications médicales	65
4.3.	Contraintes d'utilisation des nanoparticules dans l'organisme	67
4.3.1.	Toxicité	68
4.3.2.	Voie d'administration	69
4.3.3.	Biodistribution	69
4.3.4.	Élimination	71
4.4.	Nanoparticules d'or	72
4.4.1.	Synthèse et structure des nanoparticules d'or	72
4.4.2.	Propriétés des nanoparticules d'or	75
4.4.3.	Utilisation potentielle des nanoparticules d'or dans le domaine médical	77
4.5.	Nanoparticules d'oxyde de fer	86
4.5.1.	Les propriétés physicochimiques des nanoparticules d'oxyde de fer à contrôler	87
4.5.2.	Utilisation dans le domaine médical	88
5.	Conclusion et Plan de la thèse	92
6.	Références	95
Chapitre II : PEGylation : Influence sur le comportement in vivo des nanoparticules d'or		137
1.	PEGylation	143

1.1.	Introduction	143
1.2.	Facteurs influençant la PEGylation	143
1.2.1.	Type de nanoparticules	144
1.2.2.	Conformation et longueur de la chaîne de PEG	145
1.2.3.	Extrémité de PEG	146
1.2.4.	Nature de la liaison entre les chaînes de PEG et les nanoparticules	147
1.2.5.	Agents de reconnaissance pour le ciblage actif	147
1.3.	Méthodes de caractérisation de la PEGylation	148
1.4.	Impact de la PEGylation sur les produits pharmaceutiques	149
1.5.	Nanomédicaments PEGylés en essais cliniques	150
1.6.	Bilan	154
2.	Synthèse des deux séries Au@TAPEG _n DOTA et Au@TAPEG _n DOTAGA	155
2.1.	Chélateurs macrocycliques	155
2.2.	Synthèse d'Au@X	157
2.3.	Complexation	158
2.3.1.	Complexation du gadolinium	158
2.3.2.	Complexation de l'indium-111	158
3.	Caractérisation des séries Au@TAPEG _n DOTA et Au@TAPEG _n DOTAGA	159
3.1.	Spectrophotométrie UV-Visible	159
3.2.	Dosage par ICP-OES d'or et du gadolinium	159
3.3.	Microscopie électronique à transmission	160
3.4.	Mesure du diamètre hydrodynamique et du potentiel Zêta	160
3.5.	Lyophilisation	161
3.6.	ATG	161
4.	Caractéristiques des nanoparticules Au@TAPE _n DOTA et Au@TAPEG _n DOTAGA	161
5.	Biodistribution de la série Au@TAPEG _n DOTAGA dans des souris saines	170
5.1.	Protocoles expérimentaux	170
5.1.1.	Animaux	170
5.1.2.	SPECT/CT	170
5.1.3.	Biodistribution <i>ex vivo</i>	170

5.1.4.	Analyse ICP-EOS	171
5.2.	Résultats et discussion	171
6.	Radiothérapie	178
6.1.	Protocole expérimental	180
6.1.1.	Description de l'étude	180
6.1.2.	Préparation des embryons de poulet	182
6.1.3.	Amplification et greffe de cellules tumorales	182
6.1.4.	Traitements	183
6.1.5.	Évaluation quantitative de la croissance tumorale	183
6.1.6.	Évaluation quantitative de l'invasion métastatique	183
6.1.7.	Évaluation quantitative de la tolérance embryonnaire	184
6.2.	Résultats et discussion	184
7.	Conclusion	190
8.	Références	193
Chapitre III : Nanofleur d'oxyde de fer : Transporteur prometteur de nanoparticules d'or		203
1.	Nanotransporteur : stratégie intéressante ?	209
2.	Nanofleurs	210
2.1.	Propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer	211
2.2.	Biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer	211
2.3.	Contexte de l'étude	212
3.	Synthèse des nanoparticules	213
3.1.	Synthèse des Au@(TADOTAGA) _{2x} (TA[NODAGA-lys-NH ₂]) _x	213
3.1.1.	Ligands macrocycliques	213
3.1.2.	Protocole de synthèse des nanoparticules d'or	214
3.2.	Synthèse des nanofleurs γ -Fe ₂ O ₃	215
3.3.	Formulation des nanofleurs dorées	217
3.4.	Greffage du peptide sur les nanoparticules	220
3.4.1.	Greffage du peptide VG-196 sur les nanoparticules d'or	221
3.4.2.	Greffage sur les nanofleurs dorées	222
3.5.	Complexation	222

3.5.1.	Complexation du gadolinium	222
3.5.2.	Complexation du cuivre	222
4.	Caractérisation des nanoparticules d'or et des nanofleurs dorées	223
4.1.	Spectrophotométrie UV-Visible	223
4.2.	Dosage par ICP-OES	223
4.3.	Microscopie électronique à transmission	224
4.4.	Mesure du diamètre hydrodynamique et du potentiel Zêta	224
4.5.	Lyophilisation	224
4.6.	ATG	224
5.	Résultats de la caractérisation des différentes nanoparticules	225
6.	Biodistribution des différents types de nanoparticules administrées à des souris saines	237
6.1.	Protocole	237
6.1.1.	Animaux	237
6.1.2.	IRM/TEP	237
6.1.3.	Analyse <i>ex vivo</i> de la biodistribution	238
6.1.4.	Analyse ICP-OES	238
6.2.	Résultats et discussion	239
7.	Biodistribution des différents types de nanoparticules administrées à des souris malades	247
7.1.	Protocole	247
7.1.1.	Animaux	247
7.1.2.	Imagerie simultanée IRM/TEP	248
7.1.3.	Comptage γ <i>post mortem</i> des organes	248
7.1.4.	Analyses ICP-OES	248
7.2.	Résultats et discussion	249
8.	Conclusion	254
9.	Références	257
	Conclusion et perspectives	259

Liste des Figures

Figure 1-1 : Evolution des nombres d'articles contenant le mot « nanoparticules » dans leur titre.	16
Figure 1-2 : Différentes disciplines dont les articles contiennent le mot « nanoparticules » dans leur titre	17
Figure 1-3 : Utilisation des nanoparticules dans le domaine biomédical	17
Figure 1-4 : Différents types de nanoparticules selon leur composant	18
Figure 1-5 : Représentation en 3D de différentes structures à base lipidique : (A) la micelle constituée d'une seule couche de lipides, (B) le liposome constitué de deux couches qui emprisonnent un compartiment aqueux et (C) la bicouche lipidique plane	21
Figure 2-1 : Exemples de quelques chélateurs commerciaux utilisés pour élaborer des agents de contraste paramagnétiques	30
Figure 2-2 : Emission d'un positon et réaction d'annihilation	34
Figure 3-1 : Estimation du nombre de morts par le cancer en France en 2020 et 2040	37
Figure 3-2 : Proportion des principaux cancers déclarés en 2020 en France	37
Figure 3-3 : Estimation du nombre de cas de cancer en France en 2020 et 2040	38
Figure 3-4 : Schéma des (a) phases initiales du cancer et (b) développement tumoral	39
Figure 3-5 : Mécanisme de l'angiogénèse	40
Figure 3-6 : Développement tumoral en plusieurs étapes: a) tumeur dormante, b) dilatation des vaisseaux sanguins, c) début de bourgeonnement angiogénique, d)bourgeonnement avancé et e) hypervascularisation tumorale	42
Figure 3-7: Chronologie des évènements après irradiation	46
Figure 3-8 : Schéma représentant les différentes phases constituant l'interaction d'un photon incident par effet photoélectrique : (i) absorption de la totalité de l'énergie d'un photon incident et (ii) éjection d'un photo-électron ; (iii) comblement de la vacance électronique résultante par un électron d'une couche électronique supérieure ; (iv) émission d'énergie sous forme (a) d'un photon de fluorescence ou (b) d'un électron Auger.	47
Figure 3-9 : Schéma représentant l'effet Compton	48
Figure 3-10 : Schéma représentant l'effet de matérialisation suivi par l'annihilation du positon formé et d'un électron du milieu. Les pertes d'énergie du positon et de l'électron, par interactions coulombiennes successives au sein du matériau, ne sont pas représentées. Par commodité, la représentation planétaire de l'atome est utilisée ici.	49
Figure 3-11 : Diagramme représentant les zones de prédominance des trois principaux modes d'interaction des photons avec la matière (effet photoélectrique, effet Compton et création de paires) en fonction de l'énergie des photons et du numéro atomique de la cible	50

Figure 3-12 : Représentation schématique des deux modes d'action des rayonnements ionisants sur les biomolécules constituant la cellule et les principaux dommages qui en résultent.	51
Figure 3-13 : Représentation des plaques d'athérosclérose	55
Figure 3-14 : Structures d'une artère saine	56
Figure 3-15 : Mécanismes moléculaire et cellulaire de l'initiation et la progression de la plaque d'athérosclérose	60
Figure 3-16 : Développement d'athérosclérose et caractérisation d'une plaque stable et d'une plaque instable	61
Figure 4-1 : Ciblage passif et ciblage actif des nanoparticules	67
Figure 4-2 : (A) Exemples de différentes structures des nanoparticules d'or, (B) exemples de différents revêtements de nanoparticules d'or et (C) une représentation schématique des plateformes à base de nanoparticules d'or pour l'utilisation in vivo	75
Figure 5-1 : Schéma des différentes molécules organiques utilisées comme chélateurs	93
Figure 1-1 : Structures chimiques de l'EG et du PEG	144
Figure 2-1 : Formules semi-développées des différents chélateurs	157
Figure 3-1 : Evolution de la température au cours du traitement thermique	161
Figure 4-1 : Spectres UV-visible entre 400 et 800 nm des suspensions de nanoparticules d'or de la série Au@TAPEG _n DOTA à deux temps différents juste après synthèse t ₀ et t ₀ + 3mois (3 mois après synthèse)	162
Figure 4-2 : Spectres UV-visible entre 400 et 800 nm des nanoparticules d'or de la série Au@TAPEG _n DOTAGA à deux temps différents juste après synthèse t ₀ et t ₀ + 3mois (3 mois après synthèse)	163
Figure 4-3 : Clichés TEM des différents types de nanoparticules Au@X	164
Figure 4-4 : Courbes d'analyse thermogravimétrique de poudres de nanoparticules d'or (a) Au@TADOTA, (b) Au@TAPEG ₄ DOTA, (c) Au@TAPEG ₁₁ DOTA, (d) Au@TADOTAGA, (e) Au@TAPEG ₄ DOTAGA et (f) Au@TAPEG ₁₁ DOTAGA	165
Figure 4-5 : Spectres UV-Visible des suspensions de nanoparticules d'or (a) Au@TADOTA, (b) Au@TAPEG ₄ DOTA, (c) Au@TAPEG ₁₁ DOTA, (d) Au@TADOTAGA, (e) Au@TAPEG ₄ DOTAGA et (f) Au@TAPEG ₁₁ DOTAGA enregistrés à différents pH (entre 1 et 11)	167
Figure 4-6 : Evolution du potentiel Zêta en fonction du pH des suspensions colloïdales de la série des nanoparticules Au@TAPEG _n DOTA	168
Figure 4-7 : Evolution du potentiel Zêta en fonction de pH des suspensions colloïdales de la série des nanoparticules Au@TAPEG _n DOTAGA	169
Figure 5-1 : Clichés SPECT/CT représentant l'évolution de la biodistribution des nanoparticules Au@TADOTAGA, Au@TAPEG ₄ DOTAGA et Au@TAPEG ₁₁ DOTAGA au cours du temps (1h et 24 h après injection intraveineuse)	172

Figure 5-2 : (a) pourcentage moyen de radioactivité injectée (%ID) et (b) pourcentage moyen de radioactivité injectée par gramme de tissu (%ID/g) déterminés à partir des données acquises par comptage gamma des organes prélevés sur des souris sacrifiées 24 heures après injection intraveineuse des différents types de nanoparticules d'or.	173
Figure 5-3 : (a) pourcentage moyen d'or injecté (%ID) et (b) pourcentage moyen d'or injecté par gramme de tissu (%ID/g) déterminés à partir des résultats d'analyse ICP-OES des organes prélevés sur des souris sacrifiées 24 heures après injection intraveineuse des différents types de nanoparticules d'or.	174
Figure 5-4 : Pourcentage moyen de dose de nanoparticules d'or injectée (%ID) calculé à partir des images acquises 1 heure et 24 heures après injection intraveineuse des différents types de nanoparticules à des souris saines	175
Figure 5-5 : Pourcentage moyen de dose de nanoparticules d'or injectée éliminé de l'organisme 24 heures après injection intraveineuse des suspensions de nanoparticules Au@TAPEG _n DOTAGA (n = 0, 4 et 11)	178
Figure 6-1 : Description de l'étude	181
Figure 6-2 : Protocole et vue du portoir pour l'irradiation	183
Figure 6-3 : La valeur moyenne de la masse tumorale (mg) pour les différents groupes d'embryons	185
Figure 6-4 : Le pourcentage de survie et de mort des embryons à la fin de l'étude	188
Figure 6-5 : Quantité relative de métastases pour les différents groupes d'analyse	190
Figure 3-1 : Formules topologiques des différents chélateurs, (a) TA(NODAGA-lys-NH ₂) et (b) TADOTAGA	214
Figure 3-2 : Schéma de la synthèse des nanofleurs de maghémite (γ -Fe ₂ O ₃)	216
Figure 3-3 : Variation de la température (°C) dans le milieu réactionnel en fonction du temps (min)	216
Figure 3-4 : Évolution du potentiel Zêta en fonction du pH des suspensions colloïdales de nanofleurs de maghémite.	218
Figure 3-5: Formule topologique de la dopamine	218
Figure 3-6 : Formule topologique de l'acide hydrocaféique	219
Figure 3-7 : Formules topologiques de l'EDC et du NHS.	219
Figure 3-8 : Formule topologique de la tétrazine Tz-COOH	220
Figure 3-9 : Formule topologique du peptide de ciblage nommé VG-196 (C ₇₃ H ₁₁₄ N ₂₄ O ₂₀ S)	221
Figure 4-1 : Evolution programmée de la température au cours du traitement thermique de l'ATG	225
Figure 5-1 : Spectre UV-Visible entre 400 et 800 nm des suspensions de nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA) _{2x} (TA[NODAGA-lys-NH ₂]) _x avec et sans peptide à deux temps différents	226
Figure 5-2 : Clichés TEM des différents types des nanoparticules d'or. (A) NPs-Au : Au@(TADOTAGA) _{2x} (TA[NODAGA-lys-NH ₂]) _x et (B) NPs-Au-pep : Au@(TADOTAGA) _{2x} (TA[NODAGA-lys-NH ₂]) _{0,7x} (TA[NODAGA-lys-VG169]) _{0,3x}	227

- Figure 5-3 : Spectres UV-Visible des suspensions de nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH₂])_x (a) sans peptide et (b) avec peptide à différents pH. 228
- Figure 5-4 : Evolution du potentiel Zêta en fonction du pH des suspensions colloïdales de nanoparticules d'or avec et sans peptide 229
- Figure 5-5 : Courbes d'analyse thermogravimétrique de poudres de nanoparticules d'or sans peptide (a) et avec peptide (b) 230
- Figure 5-6 : Clichés TEM des différents types de nanofleurs et nanofleurs dorées. (A) NF : nanofleurs de maghémite (barre d'échelle : 200 nm), (B) NF-Au : nanofleurs décorées par les nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH₂])_x et (C) NF-Au-pep : nanofleurs décorées par les nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH₂])_x fonctionnalisées par le peptide (barre d'échelle pour B et C : 20 nm). 232
- Figure 5-7 : Clichés STEM des différents types des nanofleurs dorées. (A) NF-Au et (B) NF-Au-pep (barre d'échelle 50 nm). 233
- Figure 5-8 : Spectres UV-Visible entre 400 et 800 nm des suspensions de nanofleurs dorées sans peptide à deux temps différents à pH physiologique 235
- Figure 5-9 : Courbes du potentiel Zêta des nanofleurs, des nanofleurs dorées avec et sans peptides en fonction du pH des suspensions colloïdales 236
- Figure 6-1 : Images IRM (T₁) centrées sur le foie et les reins et acquises 1 h et 24 h après injection intraveineuse des nanoparticules d'or avec et sans peptide (NPs-Au et NPs-Au-pep) à des souris saines 239
- Figure 6-2 : Images IRM (T₂) centrées sur le foie et les reins et acquises 1 h et 24 h après injection intraveineuse des nanofleurs dorées avec et sans peptide (NF-Au et NF-Au-pep) à des souris saines. 240
- Figure 6-3 : Images IRM/TEP acquises 1 h et 24 h après injection intraveineuse des nanoparticules à des souris saines. 241
- Figure 6-4 : Le pourcentage moyen de dose injectée (%ID) par comptage gamma des différentes nanoparticules en fonction des organes 1 heure et 20 heures après injection intraveineuse, (a) échelle complète et (b) agrandissement d'échelle 242
- Figure 6-5 : Le pourcentage moyen de dose injecté par gramme d'organe (%ID/g) par comptage gamma des différents nanoparticules 1 heure et 20 heures après injection intraveineuse (a) échelle complète et (b) agrandissement d'échelle 243
- Figure 6-6 : Le pourcentage moyen de dose injecté (%ID) par ICP des différents types de nanoparticules en fonction des organes 1 heure et 20 heures après injection intraveineuse (a) échelle complète et (b) agrandissement d'échelle 245

- Figure 6-7 : Le pourcentage moyen de dose injecté par gramme d'organes (%ID/g) par ICP des différents types de nanoparticules 1 heure et 20 heures après injection intraveineuse (a) échelle complète et (b) agrandissement d'échelle 246
- Figure 6-8 : Le pourcentage moyen de dose de nanoparticules injecté éliminé de l'organisme 1 h, 24 h et 120 h après injection intraveineuse des suspensions de nanoparticules d'or avec et sans peptide et des nanofleurs dorées avec et sans peptide 247
- Figure 7-1 : Comparaison des images obtenues 1 h après injection intraveineuse des différents nanoparticules dans des souris malades 250
- Figure 7-2 : La biodistribution des différents types de nanoparticules 24 h après injection intraveineuse à des souris porteuses de plaques d'athérosclérose par comptage gamma, (a) pourcentage moyen de dose injectée (%ID), (b) pourcentage moyen de dose injectée par gramme d'organe (%ID/g) 251
- Figure 7-3 : La biodistribution des différents types de nanoparticules 24 h après injection intraveineuse à des souris porteuses de plaques d'athérosclérose par ICP-OES (a) pourcentage moyen de dose d'or injectée (%ID) et (b) pourcentage moyen de dose d'or injectée par gramme de tissu (%ID/g) 252
- Figure 7-4 : Pourcentages moyens d'élimination des différentes nanoparticules 24 h après injection intraveineuse des suspensions de nanoparticules d'or avec et sans peptide et de nanofleurs dorées avec et sans peptide à des souris porteuses de plaques d'athérosclérose. 253
- Figure 7-5 : Microscopie optique et autoradiographie de la crosse aortique des souris porteuse de plaques d'athérosclérose 254

Liste des Tableaux

Tableau 1-1: Classification des nano-objets selon leur composition	19
Tableau 2-1: Principales propriétés des agents de contraste administrés par voie intraveineuse et approuvés par la FDA (Food and Drug Administration)	29
Tableau 2-2: Agents de contraste T ₂	31
Tableau 2-3: Caractéristiques des principales techniques d'imagerie médicale	35
Tableau 2-4 : Principaux avantages et inconvénients des techniques d'imagerie médicale	36
Tableau 3-1: Classification et caractérisation des DDS	44
Tableau 3-2 : Classification de Stary	57
Tableau 1-1 : Différents types de nanoparticules PEGylées conçues pour améliorer l'efficacité anticancéreuse des principes actifs	152
Tableau 1-2 : Nanoparticules anticancéreuses PEGylées en cours d'évaluation préclinique et clinique	154
Tableau 4-1 : Diamètre hydrodynamique des différents types de nanoparticules d'or mesuré par DLS	164
Tableau 4-2 : Composition de différents types de nanoparticules d'or	166
Tableau 6-1 : Description des groupes d'étude et de leur traitement.	182
Tableau 2-1 : Répartition du fer dans l'organisme humain	212
Tableau 5-1 : Diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or avec et sans peptide, des nanofleurs et des nanofleurs dorées avec et sans peptide.	234

Introduction

Depuis le milieu des années 2000, la nanomédecine qui est consacrée à l'application des nanosciences et nanotechnologies au domaine médical est en plein essor. Son développement repose sur le potentiel des nanoparticules pour l'imagerie et/ou la thérapie. L'intense activité de recherche consacrée à la nanomédecine a débouché sur la mise au point de nanoparticules multifonctionnelles dont les propriétés qui résultent de leur taille, de leur forme, de leur composition et de leurs interactions avec leur environnement permettent de combiner différentes modalités d'imagerie médicale et activités thérapeutiques télécommandées. Il a été démontré que ces objets possédaient les caractéristiques fondamentales pour améliorer la personnalisation des traitements grâce à leur capacité à guider la thérapie par l'imagerie. Parmi la large palette de nanoparticules multifonctionnelles prometteuses pour la nanomédecine, les nanoparticules d'or ont reçu une attention particulière en raison de la simplicité de leur mode de synthèse (en tous cas pour les nanoparticules quasi sphériques), du caractère biocompatible de l'or (à tempérer dans le cas des nanoparticules) et de leurs propriétés optiques modulables.

Les années 1994-1995 marquent un tournant dans le domaine des nanoparticules d'or avec la publication de deux articles de Brust et de ses collègues. [1], [2] Ils ont réussi à mettre au point la synthèse de nanoparticules d'or de diamètre inférieur à 5 nm et stabilisées par une couche organique de molécules thiolées. Ces travaux ont ouvert la voie vers les applications médicales des nanoparticules d'or. En raison de la faible taille qui caractérise cette synthèse, de la forte concentration en nanoparticules produites et de la possibilité d'adapter la composition de la couche organique, les nanoparticules d'or peuvent être désormais conçues de façon à répondre aux exigences des applications médicales. Les travaux pionniers de Hainfeld ont d'ailleurs mis en exergue le potentiel des nanoparticules d'or de petites dimensions et recouvertes d'une couche de molécules thiolées hydrophiles pour des applications en imagerie et en thérapie. L'accumulation de ces très petites nanoparticules d'or (diamètre du cœur d'or de 1,9 nm) au sein de la tumeur, qui peut être suivie par imagerie aux rayons X, a considérablement amélioré la survie des animaux traités par radiothérapie. [3] En plus de leurs nombreuses propriétés dont la plupart, comme les propriétés optiques modulables, sont indéniablement reliées à leur caractère nanométrique, les nanoparticules d'or du fait du numéro atomique élevé de l'élément or (^{79}Au) absorbent fortement les rayons X utilisés en imagerie médicale et en radiothérapie. Leur présence dans les tumeurs permet donc comme l'ont montré les travaux de Hainfeld d'améliorer à la fois le contraste des images acquises par tomographie X et les effets de la radiothérapie. Les nanoparticules d'or sont donc adaptées pour la radiothérapie guidée par imagerie qui se positionne comme une stratégie prometteuse pour personnaliser le traitement. Bien que le caractère radiosensibilisant des nanoparticules d'or résulte de la capacité de l'élément or à absorber les photons X et non de leur caractère nanométrique, la taille exerce tout de même une influence sur l'efficacité de la radiosensibilisation comme l'ont montré les

modélisations de Fred Currell et Kevin Prise [4]. Les particules d'or les plus petites sont les plus efficaces.

Dans ce contexte et en s'appuyant sur les travaux de Brust et de Hainfeld, l'équipe NCM de l'institut UTINAM a développé des nanoparticules d'or de dimensions réduites pour la radiothérapie guidée par imagerie par résonance magnétique (IRM). Cette stratégie permet d'exploiter le potentiel radiosensibilisant¹ des nanoparticules d'or au moment le plus opportun grâce aux données collectées par l'IRM qui présente des avantages par rapport à l'imagerie X, comme une meilleure sensibilité et un plus faible caractère invasif. Afin d'atteindre cet objectif, les nanoparticules d'or ont été conçues de façon à être recouvertes par une couche de chélateurs, d'abord linéaires (DTDTPA) puis, par un souci de sécurité sanitaire, macrocycliques (dérivés de la famille des DOTAGA et NODAGA), qui forment des complexes stables avec des ions d'intérêt pour l'imagerie médicale, gadolinium pour l'IRM et radioisotopes pour l'imagerie nucléaire. Ces nanoparticules recouvertes de chélates de gadolinium présentent un comportement sain après injection intraveineuse car d'après les études de biodistribution elles circulent librement sans accumulation dans les tissus sains à l'exception des organes impliqués dans l'élimination rénale (reins, vessie) et sont éliminées par la voie rénale. Le suivi par imagerie a confirmé leur présence dans les tumeurs qui a été exploitée pour traiter avec succès des tumeurs cérébrales par radiothérapie. Les animaux traités par radiothérapie après injection intraveineuse des nanoparticules d'or recouvertes de chélates de gadolinium présentent une médiane de survie deux fois supérieure à celle des animaux traités uniquement par radiothérapie (et cinq fois par rapport aux animaux non traités). Cependant, le potentiel de ces nanoparticules d'or radiosensibilisantes est sous-exploité car la clairance rénale, qui, bien qu'elle soit essentielle pour l'utilisation in vivo de ces nanoparticules non biodégradables, est beaucoup trop rapide.

Mes travaux de thèse ont donc été consacrés à l'exploration de stratégies visant à ralentir la clairance rénale pour mieux exploiter le potentiel des nanoparticules recouvertes de chélates de gadolinium et/ou de radioisotopes pour l'imagerie médicale et pour le traitement mais sans changer leur taille. Deux stratégies ont été imaginées et étudiées dans le cadre de ma thèse :

- le développement de nanoparticules d'or recouvertes de chélateurs PEGylées,

¹ Le mot radiosensibilisation (radiosensibilisant(e)) est utilisé dans ce manuscrit. Ce mot peut être remplacé par radiopotentialisation (radiopotentialisant(e)) ou radiorehaussement (radiorehaussant(e)) qui paraissent mieux adaptés. Mais nous avons conservé l'utilisation du terme « radiosensibilisation (radiosensibilisant(e)) » car il est largement utilisé dans la littérature

- le greffage des nanoparticules d'or recouvertes de chélateurs sur des nanofleurs de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

Avant d'aborder la description des expériences réalisées au cours de ma thèse et la discussion des résultats obtenus (Chapitres 2 et 3), un état de l'art sur le développement de nanoparticules pour des applications médicales est présenté dans le chapitre 1.

Référence

- [1] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, et R. Whyman, « Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid–liquid system », *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n° 7, p. 801-802, 1994.
- [2] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin, et C. Kiely, « Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles », *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n° 16, p. 1655-1656, 1995.
- [3] J. F. Hainfeld, D. N. Slatkin, et H. M. Smilowitz, « The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice », *Physics in Medicine & Biology*, vol. 49, n° 18, p. N309, 2004.
- [4] K. T. Butterworth, S. J. McMahon, F. J. Currell, et K. M. Prise, « Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization », *Nanoscale*, vol. 4, n° 16, p. 4830-4838, 2012.

CHAPITRE I

Nanoparticules multifonctionnelles pour des applications médicales

Table des matières

1. Nanomédecine	15
1.1. Avantages des nanoparticules en médecine	15
1.2. Principaux types de nanoparticules	18
1.2.1. Nanoparticules de polymères	19
1.2.2. Nanoparticules à base de lipides	20
1.2.3. Nanoparticules inorganiques	21
1.2.3.1. Nanoparticules semi-conductrices	21
1.2.3.2. Nanostructures de carbone	22
1.2.3.3. Nanoparticules plasmoniques	23
1.2.3.4. Nanoparticules magnétiques	24
1.2.3.5. Nanoparticules à base de silice	24
1.3. Bilan	25
2. Imagerie médicale	26
2.1. Imagerie par résonance magnétique	27
2.1.1. Principe	27
2.1.2. Les agents de contraste en IRM	28
2.1.2.1. Agent de contraste T_1	28
2.1.2.2. Agent de contraste T_2	30
2.2. Tomodensitométrie ou Imagerie X	31
2.2.1. Principe	31
2.2.2. Agents de contraste	32
2.3. Imagerie nucléaire	32

2.3.1.	Scintigraphie et tomographie par émission mono-photonique TEMP (SPECT)	33
2.3.2.	Tomographie par émission de positon TEP (PET)	33
2.4.	Imagerie multimodale	34
2.5.	Bilan	36
3.	Cancer et athérosclérose : maladie différente mais traiter avec les mêmes nanoparticules	36
3.1.	Cancer	36
3.1.1.	Cancer ou cancers ?	38
3.1.2.	Apparition et croissance	39
3.1.3.	Angiogenèse tumorale et expansion métastatique	40
3.1.4.	Physiologie tumorale et implication thérapeutique	41
3.1.5.	Les méthodes de traitement du cancer	42
3.1.5.1.	Chirurgie	42
3.1.5.2.	Chimiothérapie	43
3.1.5.3.	Radiothérapie	44
3.1.5.3.1.	Processus physique : interaction rayonnement ionisante/matière	46
3.1.5.3.2.	Processus physico-chimique et moléculaire	50
3.1.5.3.3.	Processus biochimiques et biologiques	52
3.1.5.3.4.	Agent radiosensibilisant	52
3.2.	Athérosclérose	54
3.2.1.	Les maladies cardiovasculaires	54
3.2.2.	Définition de l'athérosclérose	55
3.2.3.	Anatomie	55
3.2.4.	Mécanisme de formation, de progression et de rupture des plaques d'athérosclérose	59
3.2.5.	Facteur de risque de l'athérosclérose	62
3.2.6.	Diagnostics des plaques	63
3.2.7.	Traitement des plaques	64
3.3.	Bilan	64
4.	Nanoparticules inorganiques dans le domaine médical	64
4.1.	Introduction	64
4.2.	Intérêt des nanoparticules pour les applications médicales	65

4.3.	Contraintes d'utilisation des nanoparticules dans l'organisme	67
4.3.1.	Toxicité	68
4.3.2.	Voie d'administration	69
4.3.3.	Biodistribution	69
4.3.4.	Elimination	71
4.4.	Nanoparticules d'or	72
4.4.1.	Synthèse et structure des nanoparticules d'or	72
4.4.2.	Propriétés des nanoparticules d'or	75
4.4.3.	Utilisation potentielle des nanoparticules d'or dans le domaine médical	77
4.4.3.1.	Diagnostic	77
4.4.3.2.	Imagerie	78
4.4.3.2.1.	Imagerie optique	79
4.4.3.2.2.	Imagerie par rayons X	80
4.4.3.2.3.	Imagerie photoacoustique	80
4.4.3.3.	Thérapie	81
4.4.3.3.1.	Délivrance des principes actifs	81
4.4.3.3.2.	Thérapie photothermique (PTT)	83
4.4.3.3.3.	Radiothérapie	84
4.5.	Nanoparticules d'oxyde de fer	86
4.5.1.	Les propriétés physicochimiques des nanoparticules d'oxyde de fer à contrôler	87
4.5.2.	Utilisation dans le domaine médical	88
4.5.2.1.	Administration de principes actifs	89
4.5.2.2.	Thérapie par hyperthermie	90
4.5.2.3.	Agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique	91
5.	Conclusion et Plan de la thèse	92
6.	Références	95

Table des Figures

Figure 1-1 : Evolution des nombres d'articles contenant le mot « nanoparticules » dans leur titre.	16
Figure 1-2 : Différentes disciplines dont les articles contiennent le mot « nanoparticules » dans leur titre	17
Figure 1-3 : Utilisation des nanoparticules dans le domaine biomédical	17
Figure 1-4 : Différents types de nanoparticules selon leur composant	18
Figure 1-5 : Représentation en 3D de différentes structures à base lipidique : (A) la micelle constituée d'une seule couche de lipides, (B) le liposome constitué de deux couches qui emprisonnent un compartiment aqueux et (C) la bicouche lipidique plane	21
Figure 2-1 : Exemples de quelques chélateurs commerciaux utilisés pour élaborer des agents de contraste paramagnétiques	30
Figure 2-2 : Emission d'un positon et réaction d'annihilation	34
Figure 3-1: Estimation du nombre du morts par le cancer en France en 2020 et 2040	37
Figure 3-2 : Proportion des principaux cancers déclarés en 2020 en France	37
Figure 3-3 : Estimation du nombre de cas de cancer en France en 2020 et 2040	38
Figure 3-4: Schéma des (a) phases initiales du cancer et (b) développement tumoral	39
Figure 3-5 : Mécanisme de l'angiogenèse	40
Figure 3-6: Développement tumoral en plusieurs étapes: a) tumeur dormante, b) dilatation des vaisseaux sanguins, c) début de bourgeonnement angiogénique, d)bourgeonnement avancé et e) hypervascularisation tumorale	42
Figure 3-7: Chronologie des évènements après irradiation	46
Figure 3-8 : Schéma représentant les différentes phases constituant l'interaction d'un photon incident par effet photoélectrique : (i) absorption de la totalité de l'énergie d'un photon incident et (ii) éjection d'un photo-électron ; (iii) comblement de la vacance électronique résultante par un électron d'une couche électronique supérieure ; (iv) émission d'énergie sous forme (a) d'un photon de fluorescence ou (b) d'un électron Auger.	47
Figure 3-9 : Schéma représentant l'effet Compton	48
Figure 3-10 : Schéma représentant l'effet de matérialisation suivi par l'annihilation du positon formé et d'un électron du milieu. Les pertes d'énergie du positon et de l'électron, par interactions coulombiennes successives au sein du matériau, ne sont pas représentées. Par commodité, la représentation planétaire de l'atome est utilisée ici.	49
Figure 3-11 : Diagramme représentant les zones de prédominance des trois principaux modes d'interaction des photons avec la matière (effet photoélectrique, effet Compton et création de paires) en fonction de l'énergie des photons et du numéro atomique de la cible	50
Figure 3-12 : Représentation schématique des deux modes d'action des rayonnements ionisants sur les biomolécules constituant la cellule et les principaux dommages qui en résultent.	51
Figure 3-13 : Représentation des plaques d'athérosclérose	55

Figure 3-14 : Structures d'une artère saine	56
Figure 3-15 : Mécanismes moléculaire et cellulaire de l'initiation et la progression de la plaque d'athérosclérose	60
Figure 3-16 : Développement d'athérosclérose et caractérisation d'une plaque stable et d'une plaque instable	61
Figure 4-1 : Ciblage passif et ciblage actif des nanoparticules	67
Figure 4-2 : (A) Exemples de différentes structures des nanoparticules d'or, (B) exemples de différents revêtements de nanoparticules d'or et (C) une représentation schématique des plateformes à base de nanoparticules d'or pour l'utilisation in vivo	75
Figure 5-1 : Schéma des différentes molécules organiques utilisées comme chélateurs	93

Table des Tableaux

Tableau 1-1: Classification des nano-objets selon leur composition	19
Tableau 2-1: Principales propriétés des agents de contraste administrés par voie intraveineuse et approuvés par la FDA (Food and Drug Administration)	29
Tableau 2-2: Agents de contraste T ₂	31
Tableau 2-3: Caractéristiques des principales techniques d'imagerie médicale	35
Tableau 2-4 : Principaux avantages et inconvénients des techniques d'imagerie médicale	36
Tableau 3-1: Classification et caractérisation des DDS	44
Tableau 3-2 : Classification de Stary	57

CHAPITRE I

Nanoparticules multifonctionnelles pour des applications médicales

1. Nanomédecine

1.1. Avantages des nanoparticules en médecine

Depuis le début des années 2000, le nombre d'articles consacrés aux nanoparticules a augmenté considérablement (Figure 1-1) : ils mettent en valeur le potentiel des nanoparticules pour différentes applications prometteuses. Les travaux consacrés aux nanoparticules ont montré comme le prédisaient les physiciens théoriciens dès les années 1960 que les nanoparticules se distinguaient des matériaux massifs parents (*i.e.* des matériaux de même composition chimique mais de taille macroscopique) par l'apparition de nouvelles propriétés qui peut s'expliquer dans le cadre de la physique quantique. Ces caractéristiques ont stimulé une intense activité de recherche dont l'objectif était de synthétiser de nouvelles nanostructures en jouant sur la taille, la forme, la chimie de surface, l'assemblage discret afin de mieux comprendre le comportement de ces nouveaux objets et d'anticiper les futures applications qui exploiteraient les propriétés singulières des nanoparticules et nanomatériaux. Ces travaux ont entre autres permis la conception de nanoparticules multifonctionnelles qui possèdent des caractéristiques avantageuses pour des applications médicales. L'espoir de voir des nanoparticules apporter des solutions à des situations thérapeutiques désespérées est tel qu'une nouvelle discipline, la nanomédecine, a émergé comme l'atteste l'évolution du nombre d'articles consacrés à l'application médicale des nanoparticules entre 2000 et 2020 (Figure 1-2). En effet, de nombreuses nanoparticules, en raison de leurs caractéristiques uniques à l'échelle nanométrique, présentent un comportement qui permet d'envisager une variété d'utilisations diagnostiques et thérapeutiques innovantes. [1], [2] Même s'il est difficile de dresser un portrait-robot de la nanoparticule idéale car chaque situation nécessite d'ajuster les propriétés physico-bio-chimiques des agents thérapeutiques et/ou diagnostiques, l'engouement pour les nanoparticules dans le domaine de la nanomédecine repose sur les différences avantageuses qu'affichent les nanoparticules par rapport aux molécules. La littérature montre clairement que les nanoparticules permettent, contrairement aux molécules, un meilleur contrôle de leur biodistribution, une plus grande activité en raison du plus grand nombre d'éléments actifs contenus dans une nanoparticule, la combinaison plus aisée de différentes modalités d'imagerie pour une interprétation des images plus robuste et plus fiable, l'association de modalités d'imagerie avec une (ou plusieurs) activité thérapeutique commandée à distance pour la thérapie guidée par l'imagerie qui garantira une plus grande efficacité grâce à une personnalisation des traitements. Cependant les travaux consacrés à la nanomédecine ont mis en lumière la difficulté de franchir les barrières biologiques, de cibler spécifiquement les zones à imager ou à traiter qui peut conduire à une sous-exploitation du potentiel des nanoparticules. En outre, le mode d'administration et d'élimination doit être pris en compte dès la conception des nanoparticules à visée médicale

afin de ne pas gaspiller le temps, l'énergie et l'argent que demandent le développement de nouveaux médicaments. Ces nanoparticules et leurs applications seront abordées plus en détail ultérieurement (page 77 paragraphe 4.4.3).

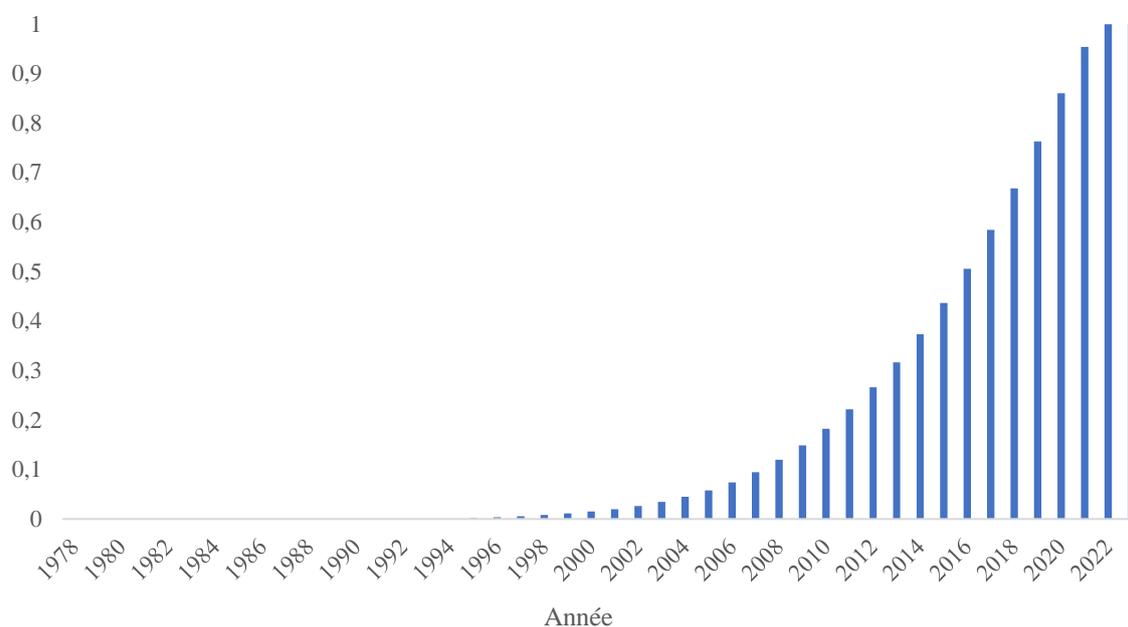


Figure 1-1 : Evolution des nombres d'articles contenant le mot « nanoparticules » dans leur titre.

En plus de leurs propriétés intrinsèques originales, les nanoparticules constituent également des supports idéaux pour divers agents moléculaires ou macromoléculaires actifs, qui peuvent être intégrés dans leur masse, incorporés dans leur réseau de pores et/ou reliés à la surface. En médecine, les nanoparticules utilisées comme système de transport et de livraison de principes actifs (DDS pour drug delivery system) offrent un certain nombre d'avantages par rapport aux médicaments moléculaires traditionnels.[3], [4] Pour commencer, ils permettent de délivrer des dispersions aqueuses stables d'agents moléculaires actifs mais insolubles dans l'eau ou dans l'environnement biologique. Leur composition, leur taille, leur forme et leurs caractéristiques de surface peuvent toutes être ajustées avec précision pour protéger les principes actifs encapsulés contre la dégradation par divers systèmes de défense endogènes lorsqu'ils sont introduits dans l'environnement biologique comme la dégradation enzymatique, l'immunodégradation, la séquestration dans la circulation par le système phagocytaire mononucléé (SPM)², l'hydrolyse acide dans l'estomac, la clairance mucociliaire dans les poumons et d'autres processus. Cette capacité d'ajustement des propriétés des nanoparticules permet de cibler des organes et des tissus spécifiques dans le corps, ainsi que la spécificité cellulaire et subcellulaire.[5] Un autre avantage significatif est qu'une famille de nanoparticules peut être créée pour la libération contrôlée

² anciennement connu sous le nom du système réticulo-endothélial (RES : Reticulo-endothelial system)

de principe actif dans des régions spécifiques, ce qui entraîne une activité thérapeutique optimale et durable.[6]–[8]



Figure 1-2 : Différentes disciplines dont les articles contiennent le mot « nanoparticules » dans leur titre

La multimodalité, ou la capacité d'effectuer plusieurs tâches diagnostiques et/ou thérapeutiques simultanément, est une caractéristique unique des nanoparticules multifonctionnelles.[9]–[12] Enfin, les nanoparticules développées pour des applications médicales doivent être non toxiques et éliminées en toute sécurité de l'organisme. Ces avantages et contraintes sont illustrés dans la Figure 1-3.

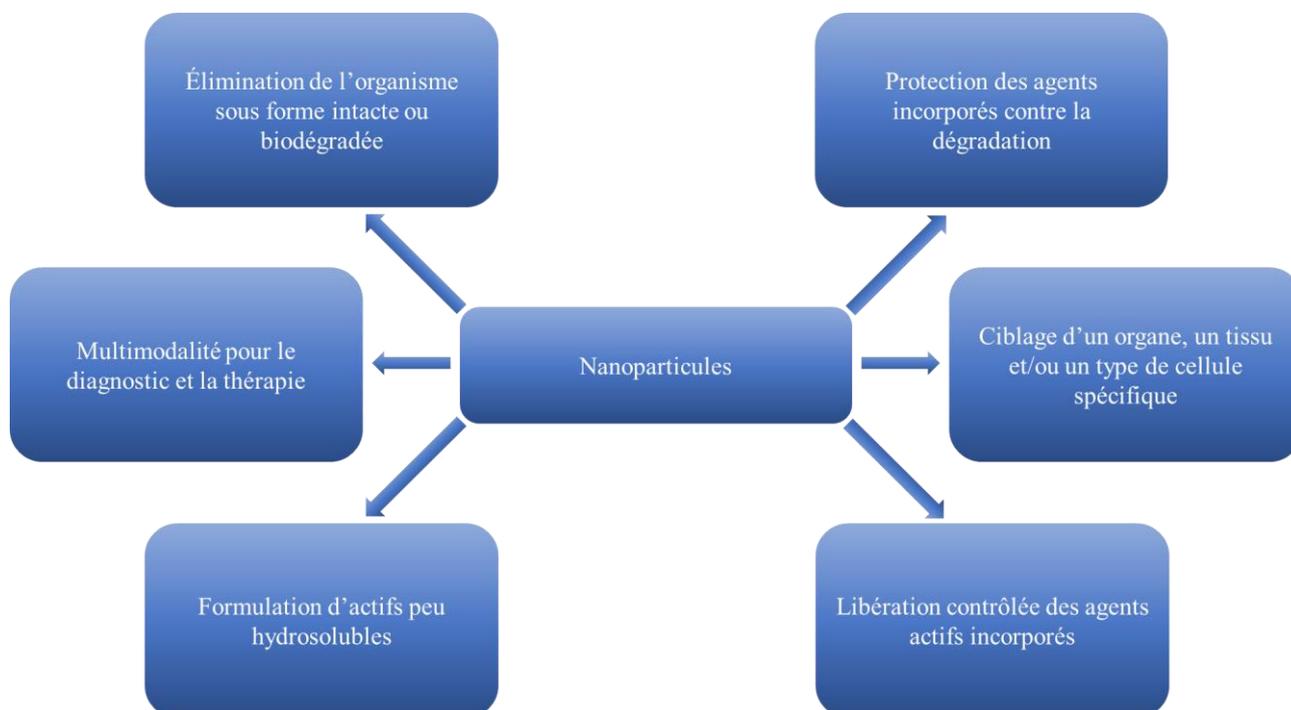


Figure 1-3 : Utilisation des nanoparticules dans le domaine biomédical

1.2. Principaux types de nanoparticules

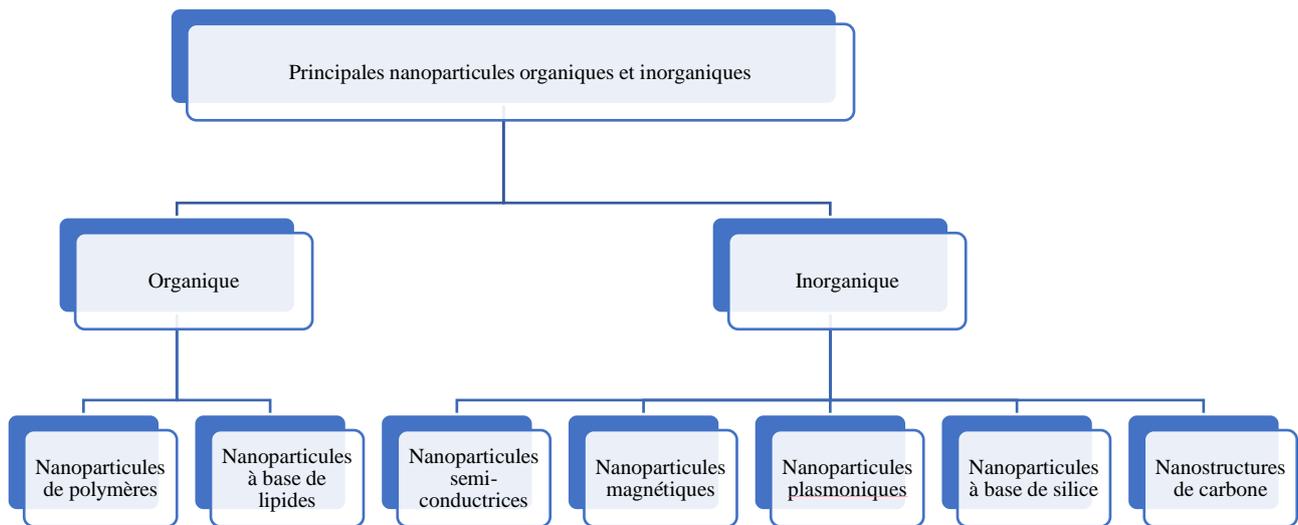


Figure 1-4 : Différents types de nanoparticules selon leur composant

La Figure 1-4 présente certaines des nanoparticules les plus décrites. Les nanoparticules présentent des formes et des structures différentes. Afin d'augmenter le nombre de propriétés intéressantes que possède une nanoparticule la structure cœur-coquille est une des solutions les plus prometteuses. Une structure de type cœur-coquille construite de manière hiérarchique, en plus d'une nanostructure de base, permet l'incorporation de diverses charges utiles thérapeutiques ou diagnostiques dans le noyau ou les différentes coquilles, ce qui les rend idéales pour des applications multimodales. Les principales utilisations biologiques des nanoparticules, ainsi que leurs définitions et leurs applications, sont résumées dans le Tableau 1-1.

Composition des nano-objets	Définition	Propriétés et Application
Inorganique	Céramiques, carbone, silice ou métaux comme or, argent ou fer, oxydes, fluorures, oxysulfures et	Grande stabilité aux conditions extrêmes : pH, température
Liposomes	Vésicules composées d'une ou de plusieurs couches de phospholipides enfermant un cœur hydrophile	Cosmétique. Solution injectable. Ne conviennent pas pour les formes orales. Oncologie, vaccins
Nanoparticules de lipides solides SLN (solid lipid nanoparticles)	Nanoparticules solides à 25°C formulées avec un tensio-actif dans un soluté aqueux.	Formes injectables, voie orale, topiques, IM, IV, SC. Stables et avec peu de toxicité. Franchissement de la barrière hématoencéphalique, libération de principes actifs sur plusieurs semaines
Nano-émulsions	Dispersion de phases aqueuse et lipidique maintenue à l'équilibre par des tensio-actifs	Formes injectables. Vaccinations, formes de principe actifs.
Polymères avec liaison covalente avec principes actifs	Polymères biodégradables et solubles dans l'eau au-delà de la valeur critique d'assemblage	Les matières actives sont incluses au cours de la formation puis libérées. Formes injectables, complexation avec de l'ADN
Micelles de polymères	Association de segments de polymères amphiphiles dans l'eau au-delà de la valeur critique d'assemblage	Les matières actives sont incluses au cours de la formation puis libérées. Formes injectables, complexation avec de l'ADN
Dendrimères	Architectures de polymères de formes régulières	Thérapie génique, vaccination

Tableau I-1: Classification des nano-objets selon leur composition

1.2.1. Nanoparticules de polymères

La composition chimique, la taille, la biodégradabilité, la forme et la fonctionnalité de surface des nanoparticules de polymères peuvent toutes être adaptées pour répondre à des besoins spécifiques[13]. Par conséquent, ils constituent des vecteurs de principes actifs excellents pour diverses applications de détection, d'imagerie et de thérapie. La biodégradation contrôlée du polymère ou l'activation par un stimulus approprié peuvent être utilisées pour affiner le schéma de libération du principe actif. Les stimuli de libération de principe actif reposent soit sur des méthodes passives (par exemple, un changement de pH dans un hydrogel

provoquant un gonflement)[14], [15] soit sur des méthodes actives, dirigées de l'extérieur (par exemple, la photodégradation par rupture induite par la lumière des liaisons photolabiles dans un squelette polymère).[16]–[18] Enfin, les polymères hydrophiles, y compris le polyéthylène glycol (PEG), sont fréquemment employés comme agents d'enrobage sur d'autres nanoparticules pour améliorer leur dispersion dans l'eau, leur biodisponibilité et leur efficacité de ciblage. [19] – [21]

Les polymères biodégradables ont souvent un squelette carboné contenant des hétéroatomes (O, N, S, etc.), qui facilite l'hydrolyse et la rupture des liaisons[22]. Ces nanoparticules peuvent être hydrolysées *in vitro* et *in vivo* dans certaines circonstances, ce qui permet de contrôler la libération du principe actif et de l'éliminer plus facilement du corps. Le poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) est un polyester approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) dont les micro et nanoparticules ont été efficacement utilisées dans des nanoformulations thérapeutiques. Pour une utilisation optimale *in vivo*, les nanoparticules de PLGA doivent, en raison de leur lipophilie, être recouvertes d'un polymère biocompatible hydrophile, tel que le PEG.[23]

Dans le domaine de l'administration de principes actifs, les copolymères séquencés comportant au moins un bloc hydrophile et un bloc lipophile ont également suscité beaucoup d'intérêt.[24] Ils s'auto-assemblent spontanément en une structure cœur-coquille avec un noyau interne hydrophobe dans les environnements aqueux. Comme elles ont des concentrations micellaires critiques (CMC) beaucoup plus faibles que celles des micelles de tensioactifs, ces nanomicelles polymériques restent intactes dans des fluides très dilués. Celles qui comportent un groupe sensible au pH ou à la température dans le bloc hydrophile, comme l'acrylamide, sont particulièrement attrayantes. Ces groupes font que les nanoparticules ressemblent à un hydrogel, provoquant un gonflement et la libération du principe actif lorsque le pH ou la température dépasse un seuil qui peut être modulé en fonction de la composition du polymère.

Les dendrimères, qui sont des structures supramoléculaires constituées d'unités organiques hyperbranchées bien définies, sont un type particulier de nanoparticules organiques. Ils ont été intensivement explorés pour une variété d'applications biologiques, allant de la détection à l'administration de principes actifs, en raison de leur diamètre minuscule (inférieur à 20 nm) qui est régulé par la génération et d'une distribution en taille très étroite.[25] Le principe actif est piégé dans les branches du dendrimère. La libération contrôlée du principe actif peut être réalisée en connectant le principe actif à une branche avec un lien chimique biodégradable. La chimie de la couronne extérieure d'un dendrimère peut également être utilisée pour le conjuguer au PEG pour contrôler la balance hydrophile/hydrophobe ou à un groupe de reconnaissance pour améliorer le ciblage.

1.2.2. Nanoparticules à base de lipides

Les trois principales nanoparticules à base de lipides sont : les nanomicelles de polymères phospholipidiques, les nanostructures vésiculaires à bicouche lipidique (liposomes) et les nanoparticules lipidiques solides (SLN : Solid Lipid Nanoparticles). Les deux premières classes sont constituées de diglycérides, tandis que la troisième est constituée de triglycérides à haut point de fusion.

Les nanoparticules liposomales à base de phospholipides comportent deux couches lipidiques organisées de façon à présenter une surface externe (en contact avec l'environnement) et une surface interne

hydrophiles.[26] Elles possèdent donc un compartiment aqueux polaire au cœur de la nanostructure. Les principes actifs hydrosolubles peuvent alors être ajoutés au compartiment aqueux, tandis que les charges utiles lipophiles peuvent être incorporées à la bicouche lipidique. La thérapie génique a utilisé des liposomes cationiques comme transporteurs de gènes. Pour une meilleure circulation et biodisponibilité, des chaînes PEG sont fréquemment immobilisées à leur surface.

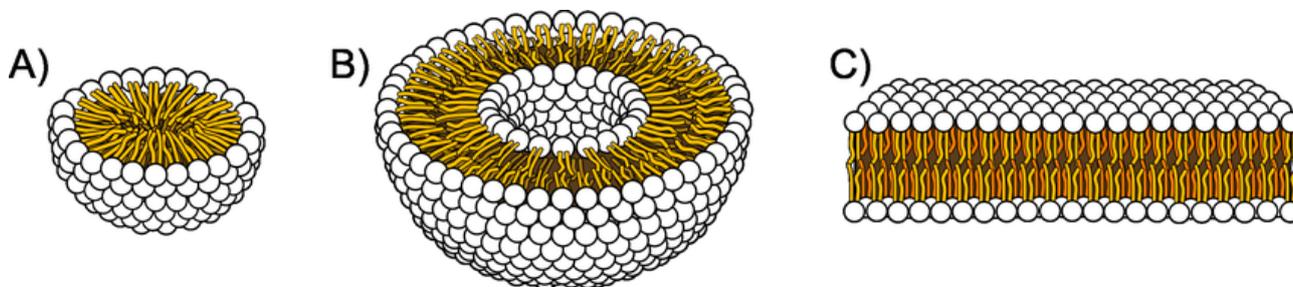


Figure 1-5 : Représentation en 3D de différentes structures à base lipidique : (A) la micelle constituée d'une seule couche de lipides, (B) le liposome constitué de deux couches qui emprisonnent un compartiment aqueux et (C) la bicouche lipidique plane[27]

Les SLN d'une taille comprise entre 10 et 1000 nm sont élaborés à partir de lipides à haut point de fusion. À température ambiante et à la température du corps, ils sont solides.[28], [29] Par rapport aux autres nanostructures lipidiques/micellaires, ils sont biocompatibles et biodégradables, avec beaucoup moins d'effets indésirables. Elles sont plus rigides, donc plus stables structurellement, et elles protègent mieux les principes actifs encapsulés contre la dégradation chimique.

1.2.3. Nanoparticules inorganiques

En tant que supports, les nanoparticules inorganiques ont l'avantage d'être extrêmement solides, stables et résistantes à la destruction par les enzymes. Elles peuvent être fabriquées dans des tailles très réduites (moins de 20 nm) de manière contrôlée pour orienter leur élimination vers la voie rénale ou la voie hépatobiliaire[30]. De plus, leurs propriétés électriques, optiques et magnétiques intéressantes peuvent être ajustées en gérant judicieusement leurs phases cristallines, leurs tailles, leurs formes, leurs compositions et leurs caractéristiques de surface afin de les rendre véritablement multifonctionnelles pour l'imagerie et le traitement.[30]

1.2.3.1. Nanoparticules semi-conductrices

Les points quantiques (QDs), qui sont des nanocristaux semi-conducteurs inorganiques, constituent une famille importante de nano-émetteurs. Des QDs de l'ordre de 3-10 nm peuvent être produits en utilisant la chimie des colloïdes chauds, et possèdent généralement une taille inférieure ou égale à la longueur du rayon de Bohr d'un exciton (une paire électron-trou). Ils présentent donc des effets de confinement quantique.[31] Contrairement aux matériaux semi-conducteurs massif, qui présentent des structures en forme de bande, le confinement spatial des excitons en trois dimensions crée des niveaux d'énergie distincts (quantifiés) dans la bande de valence à faible énergie et la bande de conduction vide des QDs. La taille du point quantique détermine l'écart énergétique entre le niveau quantifié occupé le plus élevé de la bande de valence et le niveau quantifié inoccupé le plus bas de la bande de conduction, ce qui entraîne des émissions accordables en

fonction de la taille lors d'une stimulation à une seule longueur d'onde. Les QDs se distinguent des fluorophores organiques par une exceptionnelle photostabilité, par une bande d'absorption large et une bande d'émission fine. Les QDs possèdent donc des caractéristiques de luminescence attrayantes pour développer une nouvelle génération de sondes optiques pour l'imagerie multicolore de longue durée et pour la biodétection *in vitro* et *in vivo*. Cependant, la plupart des QDs rapportés sont activés par la lumière UV ou visible, ce qui peut provoquer une autofluorescence et une diffusion de fond élevées pour la bioimagerie, ainsi qu'une profondeur de pénétration de la lumière relativement limitée dans les tissus biologiques, ce qui limite leur application dans l'imagerie optique des tissus profonds. De plus, la présence de métaux lourds toxiques dans ces QDs a soulevé certaines inquiétudes liées à leur utilisation biologique généralisée.[32] Il convient de noter que les QDs peuvent être couplés à une enveloppe poreuse en silice ou en polymère afin de permettre l'administration de principe actif ou des traitements activés par la lumière.

1.2.3.2. Nanostructures de carbone

Les fullerènes, les points de carbone (CDs : carbon dots), les nanotubes de carbone (CNTs : carbon nanotubes) et les points de graphène (GDs : graphen dots) sont des nanostructures de carbone dotées de caractéristiques électriques et de résistance à la traction uniques. Ces nanoparticules sont également caractérisées par leur propriétés de fluorescence dans le domaine proche infrarouge (pIR ou en anglais NIR pour near-infrared) qui correspond au domaine du spectre électromagnétique pour lequel les tissus biologiques sont les plus transparents. Les CNTs possèdent un large éventail d'utilisations potentielles en médecine, notamment la détection, l'imagerie et l'administration de principes actifs. Par exemple, en utilisant la photoluminescence intrinsèque des nanotubes de carbone à paroi unique, qui se trouve dans la "deuxième fenêtre d'imagerie optique" de 1000-1350 nm, l'imagerie microscopique intravitale à haute résolution des vaisseaux tumoraux sous la peau épaisse et l'imagerie *in vivo* de l'animal entier ont été démontrées avec succès.[33] Des stratégies ont été développées pour générer des groupes fonctionnels à leur surface des CNTs. Leur présence facilite la conjugaison avec des agents diagnostiques, thérapeutiques et de reconnaissance. Il a également été démontré que le volume interne des CNTs pouvaient servir à encapsuler des principes actifs dont la libération peut être contrôlée par différents types de stimulus.

Les points de carbone (CDs) sont un type de substance fluorescente intéressante pour des utilisations en médecine.[34] Ils possèdent une taille typique dans les trois dimensions de moins de 10 nm et peuvent être facilement fonctionnalisés pour favoriser leur dispersion dans les environnements aqueux. Comparés aux QDs semi-conducteurs, ils présentent une plus grande résistance au photoblanchiment, une meilleure biocompatibilité et une toxicité réduite. La longueur d'onde de leur luminescence est déterminée par leur taille, leur cristallinité et leur chimie de surface.[35], [36] Les CDs sont facilement éliminés de l'organisme et présentent un niveau de toxicité minimal, tout en fournissant des signaux optiques fiables. Les CDs enrobés de polyéthylène glycol (PEG) (diamètre inférieur à 5 nm) sont rapidement éliminés dans l'urine et ont une très faible rétention dans le foie.[37] Les CDs peuvent être conjugués avec une variété de produits chimiques pour délivrer des principes actifs spécifiques.[38] Leur capacité à être rapidement éliminés de l'organisme

par le rein renforce leur potentiel en tant qu'agents théranostiques et en tant que nanosystèmes pour l'administration de principe actif.

Les points de graphène (GDs) ont récemment été utilisés dans des applications biologiques. À l'échelle nanométrique, les GDs peuvent être considérés comme une entité constituée d'une seule couche atomique de graphite à deux dimensions.[39] En raison de l'énorme surface plane héritée du graphène en vrac, une large gamme de composés médicinaux avec une charge élevée en principe actifs peut être élaborée en s'appuyant sur la possibilité de fonctionnaliser leur deux faces (supérieure et inférieure). Cependant, la structure du graphène qui repose sur la répétition d'un motif hexagonal régulier compact d'atomes de carbone de type sp^2 impose que la post-fonctionnalisation des GDs soit réalisée en appliquant des réactions typiques des systèmes avec une conjugaison π - π pour l'adsorption physique ou pour le greffage covalent de différentes entités. A l'instar des autres nanoparticules semi-conductrices, la bande interdite des GDs peut ajustée et donc les propriétés optiques (photoluminescence) peuvent être modulées. Dans le cas des GDs, la largeur de la bande interdite est contrôlée par des effets de confinement quantique des électrons à l'intérieur de la couche nanométriques. Par exemple, des GDs à fluorescence verte ont été préparés par une méthode solvothermale en une étape. En raison d'un rendement quantique de luminescence élevé (11,4%), ils ont été utilisé efficacement pour l'imagerie cellulaire.[40] En outre, les progrès récents de la chimie en solution ont permis de produire des graphènes colloïdaux massifs et stables de taille et de forme uniformes.[41], [42] L'amélioration de la stabilité colloïdale des GDs ouvrent la voie à l'exploitation de leurs formidables propriétés optiques dans le cadre de la photothérapie et de l'imagerie du cancer.[43], [44]

1.2.3.3. Nanoparticules plasmoniques

Les nanostructures de métaux nobles, comme l'or et l'argent, de tailles et de formes diverses sont des exemples courants de nanostructures plasmoniques.[45] L'illumination des nanoparticules plasmoniques génère une oscillation collective des électrons de la bande de conduction. Lorsque la fréquence d'oscillation est égale à la fréquence des photons incidents, on observe alors le phénomène de la résonance plasmonique de surface localisée (RPSL ou en anglais LSPR pour localised surface plasmon resonance) qui se traduit par une forte absorption de la lumière.[46] Il en résulte que le spectre d'absorption optique d'une nanostructure plasmonique présente une bande intense d'absorption généralement dans les domaines du visible et du proche infrarouge pour les nanostructures métalliques d'or et d'argent appelée bande plasmon. La forme et la position de cette bande, et donc les propriétés optiques, dépendent de la taille, de la forme et de l'environnement diélectrique des nanoparticules plasmoniques. Les nanosphères, nanotubes, nanocoquilles (noyau diélectrique et coquille d'or), nanocages et autres nanomatériaux en or ont été largement utilisés en bioimagerie, bioimagerie photothermique [47]–[50] et traitement photothermique, ainsi qu'en bioimagerie photoacoustique. Les nanotubes d'or revêtus de façon à conférer une charge de surface positive ont également été utilisés pour transporter du matériel génétique dont la libération peut être générée par le phénomène de résonance plasmonique.[51]

Outre leur stabilité physicochimique et leur faible toxicité, les structures métalliques en or présentent deux avantages majeurs. Elles possèdent des caractéristiques d'absorption de la lumière exceptionnellement

élevées (coefficients d'extinction de $10^9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), permettant, dans les milieux biologiques, une luminescence à deux photons adéquate, un chauffage induit par laser significatif, et la génération d'ondes acoustiques provoquée par des cycles d'expansion thermique du milieu environnant les nanoparticules plasmoniques exposée à une lumière laser pulsée.[52] Leurs bandes d'absorption peuvent être facilement ajustées en variant leurs tailles et leurs formes pour se situer dans la région du proche infrarouge, où les tissus biologiques présentent une absorption et une diffusion considérablement plus faibles que dans les autres domaines du spectre de la lumière visible.[47]

De nouvelles structures plasmoniques incluant des porteurs libres dans des nanoparticules semi-conductrices non stœchiométriques ont également été créées.[53] Elles présentent une plus large gamme d'adaptation de la bande plasmonique et sont moins coûteuses que les structures plasmoniques métalliques. Des nanoparticules hétérogènes composées d'un domaine semi-conducteur fortement dopé (Cu_{2-x}Se) et d'un domaine métallique (Au) présentent une forte absorption de la lumière visible attribuée au phénomène de résonance plasmonique de la surface localisée dans les longueurs d'onde du visible et du proche infrarouge, résultant des interactions entre deux domaines plasmoniques. [54]

1.2.3.4. Nanoparticules magnétiques

De nombreuses études ont mis en lumière le formidable potentiel des nanoparticules magnétiques pour des applications en imagerie et en thérapie.[55] Quelques types de nanoparticules d'oxyde de fer, comme Fe_3O_4 (magnétite) et $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghémite), en sont les exemples les plus courants. Les SPIONs (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (Fe_3O_4)) ont été largement utilisés pour la bioséparation, la biodétection, l'administration de principe actifs et de gènes assistée par champ magnétique, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et le traitement magnétique du cancer.[55]–[57] Ces particules ont une distribution de taille limitée et peuvent être produites dans des tailles allant de quelques nanomètres à plusieurs micromètres, ce qui les rend adaptées à l'exploration et à la manipulation d'entités biologiques telles que des protéines (5-50 nm), des virus (20-450 nm), des gènes (2 nm de large et 10-100 nm de long) ou des cellules entières (10-100 μm).[57] Lorsqu'ils sont fabriqués et fonctionnalisés de manière appropriée, les SPIONs sont également inoffensifs et bien tolérés par les organismes vivants. Ils sont biocompatibles et peuvent être recouverts de biomolécules d'affinité pour une liaison extrêmement précise avec une cible biologique d'intérêt.[55], [56], [58] Les nanoparticules magnétiques sont couramment employées comme nanotransporteurs pour le ciblage par champ magnétique de principes actifs et de gènes vers une zone d'intérêt. Enfin, les nanoparticules magnétiques peuvent être utilisées dans la thérapie du cancer car elles induisent un chauffage localisé lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique alternatif de haute fréquence [59], [60].

1.2.3.5. Nanoparticules à base de silice

Les nanoparticules de silice qui sont reconnues pour leur biocompatibilité élevée sont en général synthétisées par chimie sol-gel. La chimie sol-gel, connue aussi sous le terme de « chimie douce », est un processus analogue à la polymérisation. Elle s'appuie sur des successions de réaction d'hydrolyse et de condensation pour transformer les précurseurs moléculaires (alcoxydes de silicium avec éventuellement des

organoalcoxysilanes) en un réseau d'hydroxyde, d'oxo-hydroxyde et d'oxyde plus ou moins hydraté selon les conditions opératoires. Lorsque l'hydrolyse et la polycondensation ont lieu en milieu alcalin, la formation de nanoparticules est favorisée.[61] Le procédé de Stöber exploite cette caractéristique pour obtenir des nanoparticules de silice de taille contrôlée avec une distribution en taille extrêmement étroite.[62] Elle a été adaptée par le groupe de recherche de Wiesner pour produire des nanoparticules de silice fluorescente (cœur de silice fonctionnalisé par des fluorophores organiques et enrobé d'une couche de silice transparente) dont la taille n'excède pas 10 nm, gamme de taille inaccessible par le procédé de Stöber.

Une autre méthode pour produire des nanoparticules de taille contrôlée consiste à réaliser l'hydrolyse alcaline et la condensation en milieu micellaire. La taille des micelles qui est fixée par la nature et la quantité des phases liquides et des molécules tensio-actives garantit le contrôle de la taille des nanoparticules : si les micelles sont uniformes et de même taille, les nanoparticules obtenues seront alors uniformes et de même taille. Chaque micelle se comporte comme un réacteur miniature. En général, les nanoparticules sont précipitées par ajout d'un liquide qui déstabilise les micelles.

Dans certaines conditions expérimentales en présence d'agents tensio-actifs, il est possible de synthétiser des nanoparticules de silice mésoporeuse dont, à la fois, le diamètre des nanoparticules et la taille et la disposition des pores peuvent être contrôlés.[63]

La synthèse par voie sol-gel qui est très performante pour produire des nanoparticules de silice de taille, de composition et de porosité contrôlées est également très appropriée pour enrober diverses nanoparticules inorganiques (telles que les nanoparticules d'oxyde de fer, les nanostructures quantiques, les nanoparticules d'or et les nanoparticules luminescentes à conversion ascendante) d'une coquille de silice afin de garantir la biocompatibilité et d'apporter des propriétés physico-chimiques complémentaires.[64]–[67]

Les nanoparticules de silice sont transparentes et, seules, elles ne présentent aucune propriété intéressante pour des applications biomédicales, à l'exception de leur caractère biocompatible. Mais les nanoparticules de silice, qu'elles soient mésoporeuses ou non, sont très intéressantes pour les applications biomédicales car leur composition peut être finement adaptée avant, pendant et/ou après leur synthèse (avant : par modification des précurseurs de type organoalcoxysilane dont il existe une grande variété, pendant : par incorporation physique ou chimique dans la matrice de silice en cours de formation, après : par greffage sur des sites d'ancrage dont la présence dépend de la nature des précurseurs). Elles sont donc dans la plupart des cas conçues comme des plateformes théranostiques pour combiner imagerie médicale et thérapie en incorporant dans la matrice et/ou à la surface des principes actifs (chimiothérapie), des colorants organiques (imagerie de fluorescence et chirurgie assistée par la fluorescence), des chélates de gadolinium (IRM), des agents photosensibilisateurs (thérapie photodynamique), des agents de reconnaissance (ciblage actif).[61], [68]–[75]

1.3. Bilan

Les nanoparticules multifonctionnelles sont donc des objets très prometteurs pour apporter des solutions à des situations thérapeutiques pour lesquelles l'arsenal actuellement à disposition des cliniciens n'est pas

suffisamment efficace. En particulier, les nanoparticules se démarquent des molécules actuellement utilisées en clinique par :

- un meilleur contrôle de la biodistribution qui garantit un traitement efficace tout en préservant les tissus sains environnants,
- la capacité, malgré le faible volume des nanoparticules, de rassembler un nombre d'espèces actives supérieur à celui présent dans les molécules qui rend les nanoparticules intrinsèquement plus efficaces,
- des propriétés nouvelles qui peuvent être exploitées pour mettre en œuvre des stratégies originales jusqu'à présent inaccessibles,
- de combiner des modalités d'imagerie complémentaire afin de rendre l'interprétation des images plus robuste et le diagnostic ou le suivi du traitement plus fiable,
- d'associer imagerie et activité thérapeutique télécommandée plus facilement que dans le cas des molécules avec l'espoir de personnaliser plus facilement les traitements car l'activité thérapeutique sera déclenchée à partir des données collectées par l'imagerie.

Malgré les avancées obtenues en nanomédecine qui montrent le potentiel des nanoparticules et leur supériorité face aux principes actifs et médicaments à base de molécules, il reste encore beaucoup de pistes à explorer pour concevoir des nanoparticules théranostiques. Avant d'aborder la description des nanoparticules qui ont été développées au cours de la thèse, les parties suivantes seront consacrées à l'imagerie et à la thérapie du cancer et de l'athérosclérose afin de mettre en lumière les besoins pour améliorer le diagnostic et le traitement que pourraient combler des nanoparticules dont la conception serait adaptée aux contraintes pour mieux exploiter le potentiel des nanoparticules.

2. Imagerie médicale

L'imagerie médicale est un outil puissant et essentiel dans le domaine médical. Elle participe au dépistage et au diagnostic des maladies. D'autre part, elle permet de suivre le développement de la maladie ainsi que l'évaluation de la réponse thérapeutique et de guider la thérapie. Plusieurs techniques d'imagerie non invasives sont devenues de plus en plus utilisées ces dernières années pour surveiller l'administration, la libération et l'efficacité des principes actifs comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM ou MRI : Magnetic Resonance Imaging), la tomodensitométrie X (CT : Computed Tomography) et l'imagerie nucléaire qui comprend la tomographie par émission de positons (TEP ou PET : Positron Emission Tomography) et la tomographie par émission monophotonique (TEMP ou SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography).[9], [11], [76]–[85] Parmi ces techniques, la tomodensitométrie X et l'IRM peuvent être mises en œuvre sans ou avec des agents de contraste. A l'inverse, dans le cas de l'imagerie nucléaire, aucun signal de fond n'est détecté en l'absence de radiotraceurs. L'administration d'agent d'imagerie radioactif est alors indispensable. En raison de leur importance en clinique, nous nous concentrerons dans cette partie sur ces quatre types d'imagerie.

2.1. Imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est fréquemment utilisée pour la recherche en nanomédecine, les évaluations de la pharmacocinétique, la biodistribution, la surveillance de libération des principes actifs. Elle est une technique d'imagerie médicale importante dans le diagnostic de différents types de maladie. Elle appartient à la famille des imageries anatomiques (comme la tomodensitométrie X) : elle permet de visualiser, sans avoir recours à des rayonnements ionisants, des tissus biologiques et des organes en trois dimensions avec une très bonne résolution spatiale en exploitant le phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN).[86], [87] L'IRM est une modalité d'imagerie très utile et largement applicable pour la recherche préclinique, le diagnostic clinique et le suivi thérapeutique en général.

2.1.1. Principe

L'imagerie par résonance magnétique repose sur un concept similaire à celui de la résonance magnétique nucléaire du proton (RMN¹H). La RMN¹H permet de suivre la réponse des protons excités par une onde radio à la fréquence de résonance (fréquence de Larmor) quand ils sont exposés à un champ magnétique intense et uniforme induit par un aimant. En absence de champ magnétique externe, les moments magnétiques de protons sont orientés de façon aléatoire et le moment magnétique global est nul. Lorsqu'on applique un champ magnétique intense \vec{B}_0 (valeur normale entre 0,5 et 3T), les moments magnétiques des protons présents en grand nombre dans les tissus (eau, biomolécules) s'alignent dans une direction parallèle ou antiparallèle au champ \vec{B}_0 . L'aimantation total \vec{M} devient non nulle et peut être décrite par deux composantes. L'aimantation longitudinale (\vec{M}_L) qui correspond à la composante selon l'axe du champ \vec{B}_0 (Z par convention) et l'aimantation transversale (\vec{M}_T) qui correspond à la composante dans le plan (X, Y) perpendiculaire à \vec{B}_0 . Après l'application de l'onde radiofréquence, les moments magnétiques reviennent à leur position d'équilibre : c'est la relaxation. On appelle T_1 , ou temps de relaxation longitudinale, le temps nécessaire pour que la valeur de l'aimantation longitudinale retrouve 63% de sa valeur initiale et T_2 , ou le temps de relaxation transversale, le temps nécessaire pour que la valeur de l'aimantation transversale revienne à 37% de sa valeur initiale). On définit les taux de relaxation comme l'inverse des temps de relaxation : $R_i = 1/T_i$ (taux de relaxation longitudinale (i=1) ou transversale (i=2)).

L'obtention de l'image à partir du signal RMN nécessite la localisation de ce signal dans les trois dimensions. Les paramètres à l'origine du contraste dans les clichés IRM sont les temps de relaxation T_1 et T_2 de l'aimantation ainsi que la densité de protons dans les tissus. Le temps de relaxation est sensible à l'environnement physico-chimique des protons présent dans les cellules. Pour cela, les cellules constituant le même type de tissus possèdent une relaxation propre qui se différencie d'un tissu à l'autre.

L'un des aspects les plus fascinants de l'IRM est la possibilité de « pondérer » le signal afin de modifier le contraste entre des tissus de composition différente. L'opérateur peut préférer le signal des tissus ayant un long T_1 ou T_2 (pondération T_1 et T_2 , respectivement) ou refléter les variations de la densité de protons entre les tissus en utilisant diverses séquences d'onde radiofréquence. Grâce à cette option, les images sont plus

contrastées, ce qui permet de distinguer plus facilement les différents tissus. Les lésions ou les tumeurs deviennent ainsi plus faciles à distinguer.

Sans avoir à recourir aux rayonnements ionisants, l'imagerie par résonance magnétique permet de visualiser des organismes en trois dimensions avec une grande résolution spatiale. L'IRM permet de recueillir des images anatomiques de haute qualité des tissus mous (qui contiennent de nombreux protons) et n'a aucune limite de profondeur. C'est la technique standard pour l'imagerie et l'étude du système nerveux central (cerveau), tant sur le plan anatomique que fonctionnel. L'IRM est l'une des méthodes d'imagerie médicale les plus utilisées aujourd'hui, notamment pour l'identification des tumeurs.

Cependant, l'IRM présente des inconvénients importants, notamment un temps d'acquisition long et l'impossibilité d'acquérir des images de vastes régions (par exemple, le corps entier) en un seul balayage. En outre, le coût élevé de l'équipement et la complexité des composants (aimants supraconducteurs) sont des obstacles à la prolifération des équipements d'IRM. Un autre défaut de cette méthode est sa faible sensibilité, qui rend difficile la détection de tissus malades dans certains cas. Pour pallier ce manque de sensibilité, des agents de contraste peuvent être administrés aux patients pour augmenter le contraste natif entre les différents types de tissus et améliorer de fait la précision du diagnostic médical. Plus d'un tiers des examens cliniques sont réalisées après administration d'agents de contraste.

2.1.2. Les agents de contraste en IRM

Un agent de contraste, conçu pour être utilisé en IRM, agit sur le temps de relaxation longitudinale T_1 ou transversale T_2 des spins nucléaires des protons d'hydrogène. Les agents de contraste T_1 et T_2 ne sont donc pas immédiatement visibles mais les conséquences de leurs interactions avec les protons peuvent être observées. Les agents de contraste pour l'IRM se répartissent en deux familles : les agents superparamagnétiques et les agents paramagnétiques.[88]

2.1.2.1. Agent de contraste T_1

Le contraste positif caractéristique des images pondérées T_1 est réhaussé lorsque les molécules d'eau interagissent chimiquement avec des composés paramagnétiques comme le gadolinium (Gd^{3+}) ou le manganèse (Mn^{2+}). Les électrons non appariés des ions paramagnétiques composant les agents de contraste (7 électrons non appariés pour Gd^{3+} et 5 pour Mn^{2+}) créent des champs magnétiques puissants qui induisent, parmi les protons de l'eau qui se trouvent à proximité, une variation de la période de relaxation le long de l'axe longitudinal. Ils induisent alors une diminution du temps de relaxation T_1 des protons qui se trouvent dans leur voisinage. Un tel effet se traduit par une augmentation du contraste positif. Ces agents de contraste sont appelés agents de contraste positif (ou agents T_1) car ils produisent un éclaircissement sur les images IRM pondérées en T_1 . Comme sa structure électronique est caractérisée par la présence de sept électrons f non appariés, soit le plus grand nombre possible pour les éléments du tableau périodique, l'ion gadolinium (Gd^{3+}) possède un moment magnétique très élevé qui génère donc des perturbations très importantes dans le comportement des protons. Les composés contenant des ions Gd^{3+} sont d'excellents agents T_1 à condition de contenir son caractère hautement toxique.

Nom commercial, chimique et formule	Structure	Ionicité	Élimination $T_{1/2}$ (heures)	Osmolarité (mOsm/Kg)	Viscosité (cP, 20°C et 37°C)	Relaxivité (s ⁻¹)
Magnevist, Gadopentetate dimeglumine, Gd-DTPA	Linéaire	Ionique	Rénale 1,60 h	1960	4,9 ; 2,9	4,3
ProHance, Gadoteridol, Gd-HP-DO3A	Macrocyclique	Non ionique	Rénale 1,57 h	630	2,0 ; 1,3	4,4
Omniscan, Gadodiamid, Gd-DTPA-BMEA	Linéaire	Non ionique	Rénale 1,30 h	789	2,0 ; 1,4	4,6
OptiMARK, Gadoversetamide, Gd-DTPA	Linéaire	Non ionique	Rénale 1,73 h	1110	3,1 ; 2,0	5,2
MultiHance, Gadobenate dimeglumine, Gd-BOPTA	Linéaire	Ionique	96% Rénale 4% hépatique 1,2 à 2 h	1970	9,2 (6) ; 5,3	6,7
Eovist Gadoxelate disodium	Linéaire	ionique	0,91 à 0,95 h	688	1,19	8,7
Gadavist Gadobutrol	Macrocyclique	Ionique	1,6 à 2,91 h	1603	4,96	5,2 ; 6,1

Tableau 2-1: Principales propriétés des agents de contraste administrés par voie intraveineuse et approuvés par la FDA (Food and Drug Administration)[89]

Afin de contourner ce problème de toxicité, l'ion gadolinium est utilisé sous forme complexée (Tableau 2-1). Les agents de contraste positif administrés en clinique sont obtenus par complexation des ions gadolinium par des chélateurs linéaires ou cycliques de la famille des polyaminocarboxylates (Figure 2-1) car ils forment des complexes très stables ($16,5 < \text{Log}K_{\text{GdL}} < 25$).

Les complexes paramagnétiques sont principalement injectés par voie intraveineuse, à des concentrations de 0,5 à 1 mol.L⁻¹. Leur biodistribution dépend de leur taille et de leur caractère hydrophile/hydrophobe. Après injection intraveineuse, la faible masse moléculaire (< 1000 g.mol⁻¹) permet la répartition des agents dans les espaces extracellulaires. Le contraste positif augmente dans la zone dans laquelle ils se répartissent puis ils sont éliminés par le système urinaire. Au niveau du cerveau, ces agents ne franchissent la barrière hémato-encéphalique (BHE) que lorsque celle-ci est lésée, par exemple dans le cas d'une tumeur cérébrale.[88], [90] La faible demi-vie plasmatique de ces agents réduit la fenêtre temporelle d'acquisition et diminue la probabilité de réaliser durablement un ciblage passif des zones pathologiques.

Nom	Matériau du cœur	Surface	Diamètre du cœur (nm)	d_h (nm)	r_2 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Ferumoxides (Feridex)	Fe_3O_4 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Dextrane	4,96	160	120
Ferucarbotran (Combidexx)	Fe_3O_4	Carboxydextrane	4	60	186
Ferumoxtran (Combidex)	Fe_3O_4	Dextrane	5,85	35	65
CLIP-Tat	Fe_3O_4	Dextrane	5	30	62
FeNP	$\alpha\text{-Fe}$	PEG	10	-	129
MnMEIO	MnFe_2O_4	DMSA	6-12	-	208-358
CoMEIO	CoFe_2O_4	DMSA	12	-	172
NiMEIO	NiFe_2O_4	DMSA	12	-	152
Au- Fe_3O_4	Fe_3O_4	PEG	20	-	114
Au-FePt	FePt (fcc)	PEG	6	-	59

Tableau 2-2: Agents de contraste T_2 [91]

2.2. Tomodensitométrie ou Imagerie X

L'imagerie X, dont le développement s'est appuyé sur la découverte des rayons X par Roentgen en 1895, est la première méthode d'imagerie médicale. Pendant de nombreuses décennies, elle est restée la seule technique d'imagerie accessible. Les améliorations dont elle a bénéficié ont été rendues possibles grâce aux progrès de l'informatique.

2.2.1. Principe

L'imagerie par rayons X est une technologie d'imagerie médicale qui repose sur l'atténuation des rayons X pour créer une image bidimensionnelle du corps qu'ils traversent. L'accélération des électrons entre l'anode et la cathode produit les rayons X, c'est-à-dire un rayonnement électromagnétique constitué de photons (photons X) dont la gamme d'énergie est comprise entre quelques dizaines d'électrons-volts (eV) jusqu'à plusieurs MeV (1eV correspond à $1,602 \cdot 10^{-19}$ J). L'énergie maximale des photons du rayonnement X augmente avec la tension entre l'anode et la cathode. Les longueurs d'onde utilisées en radiologie sont d'environ 10^{-11} m (0,01 nm). Les photons associés à ces longueurs d'onde ont une énergie comprise entre 20 et 150 KeV. Comme le rayonnement γ , et les faisceaux d'ions, utilisées en médecine, le rayonnement X est un rayonnement ionisant car il provoque des ionisations lorsqu'il traverse la matière.

La tension utilisée pour générer les rayonnements utiles en imagerie est comprise entre 110 et 150 kV. Les rayons produits par ces hautes tensions sont appelés rayons durs. Ils ont un haut niveau de pénétration dans le corps. En revanche, il existe des rayons X mous. Des voltages plus faibles, allant de 20 à 30 kV, sont utilisés pour les créer. En raison de leur faible énergie, la pénétration des rayons X mous est trop modeste dans le corps pour être intéressants en imagerie.

Le contraste des images produites par cette approche dépend des variations d'absorption des rayonnements ionisants. Lorsque le patient est exposé à un faisceau de rayons X, une partie du faisceau incident traverse entièrement le corps, tandis qu'une autre partie est dispersée (effet Compton ou diffusion Rayleigh) et qu'une autre est absorbée (effet photoélectrique).

Cette modalité d'imagerie médicale présente plusieurs avantages, qui peuvent expliquer son utilisation généralisée dans les hôpitaux. Elle est abordable, extrêmement précise (résolution spatiale jusqu'à 0,1 mm) et ne nécessite qu'une brève exposition du patient aux rayonnements (les images sont obtenues rapidement), ce qui réduit les risques associés aux rayonnements ionisants. En revanche, elle fournit des images produites par une projection conique (aucune lentille n'est utilisée pour les rayons X), ce qui entraîne une projection déformée des caractéristiques anatomiques.

En outre, la projection des régions traversées sur un plan 2D entraîne une perte d'information, qui peut être considérablement minimisée grâce aux méthodes tomographiques (CT ou scanner). L'utilisation du traitement numérique des données en tomographie à rayons X (scanner ou CT) permet la génération immédiate d'une image 3D. L'enregistrement d'une collection de projections dans une section transversales du patient, réalisé par une rotation coordonnée du détecteur et de la source autour du patient, permet la production de cette image.[96]

2.2.2. Agents de contraste

Bien que cette modalité d'imagerie médicale offre une bonne résolution, elle souffre d'un manque de contraste. Les agents de contraste sont alors couramment utilisés en radiologie pour compenser le manque de contraste des images acquises par imagerie X. La capacité de ces agents à augmenter le contraste entre les différents tissus et organes facilite leur visualisation. En raison de leur propension à absorber les photons X, les éléments ayant un numéro atomique élevé (section efficace d'absorption des rayons X élevée) entrent dans la composition des agents de contraste pour l'imagerie X posés. Les agents préparés à partir de sulfate de baryum ($Z_{Ba} = 56$) et ceux contenant de l'iode ($Z_I = 53$) sont les plus utilisés en radiologie. Alors que les agents composés de sulfate de baryum ne peuvent être administrés que par voie orale, rectale, les composés iodés peuvent s'administrer par différentes voies : orale, rectale, intraveineuse, intravésiculaire, intravertébrale et intrasplénique.[97]

Les agents de contraste iodés, très utilisés en radiologie, ont été considérablement améliorés afin de s'affranchir des problèmes potentiels de toxicité rénale ou de réactions indésirables une fois dans l'environnement biologique [98].

2.3. Imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire consiste à détecter l'émission de photon γ par des isotopes radioactifs administrés principalement par voie intraveineuse au patient pour réaliser une imagerie fonctionnelle de l'organisme. Malgré différents types de contraintes liées à la préparation, à la manipulation, au stockage et aux traitements des matériaux radioactifs, cette modalité d'imagerie est adaptée pour étudier la biodistribution d'agents thérapeutiques (molécules, nanoparticules) en raison de sa sensibilité exceptionnelle.[99]–[101] Elle se divise

en deux catégories : la première utilise les émetteurs de photons γ (SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography), la deuxième utilise les émetteurs de positons β^+ (PET : Positron Emission Tomography).[102], [103]

2.3.1. Scintigraphie et tomographie par émission mono-photonique TEMP (SPECT)

La SPECT repose sur des rayons non coïncidents créés par des radionucléides, par opposition aux rayons coïncidents requis pour reconstruire des images. La SPECT permet donc d'imager le corps entier des patients et de représenter de manière tridimensionnelle la distribution d'un traceur radioactif au sein d'un organisme au cours du temps. En conséquence, la sensibilité de la SPECT est à peu près d'un ordre de grandeur inférieure à celle de la PET et sa mesure est plus complexe. $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$, $[^{111}\text{In}]\text{In}$, $[^{123}\text{I}]\text{I}$ et $[^{201}\text{Tl}]\text{Tl}$ sont quelques-uns des radio-isotopes les plus couramment utilisés en SPECT. Contrairement à la PET, où tous les photons libérés ont la même énergie de 511 KeV, la SPECT utilise une variété d'énergies, et l'imagerie dépendante de l'énergie permet l'évaluation simultanée de plusieurs radiotraceurs et donc de différentes sondes radiomarquées. Une grande sensibilité, des résultats quantitatifs et une profondeur de pénétration élevée sont les avantages les plus évidents de la SPECT. L'absence d'informations anatomiques, la limitation de la résolution spatiale et le caractère ionisant des sondes radioactives sont les inconvénients majeurs de cette technique.

2.3.2. Tomographie par émission de positon TEP (PET)

La PET est une méthode de quantification et de visualisation tridimensionnelle de la répartition des radionucléides émetteurs de positons. Lorsqu'un noyau émetteur β^+ se désintègre, il émet un positon (particule β^+) qui, en interagissant avec un électron du milieu traversé, conduit au phénomène d'annihilation qui se traduit par la disparition de deux particules. Deux photons γ d'énergie égale à 511 KeV sont alors émis simultanément dans des directions diamétralement opposées (Figure 2-2). L'imagerie PET repose sur la détection simultanée des paires de photons issus de chaque phénomène d'annihilation. $[^{11}\text{C}]\text{C}$, $[^{13}\text{N}]\text{N}$, $[^{15}\text{O}]\text{O}$, $[^{18}\text{F}]\text{F}$, $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}$, $[^{62}\text{Cu}]\text{Cu}$, $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$, $[^{72}\text{As}]\text{As}$, $[^{74}\text{As}]\text{As}$, $[^{76}\text{Br}]\text{Br}$, $[^{82}\text{Rb}]\text{Rb}$, $[^{86}\text{Y}]\text{Y}$, $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ et $[^{124}\text{I}]\text{I}$ sont des exemples d'isotopes émetteurs de positons couramment utilisés.[104]–[111] Compte tenu de la grande sensibilité des imageurs PET et des bonnes caractéristiques de pénétration tissulaire des photons γ , les concentrations radioactives dans la gamme picomolaire sont généralement suffisantes pour créer des rapports signal/bruit élevés et produire des images utilisables et des données quantitatives. En conséquence, la PET est souvent utilisée en clinique pour le diagnostic, la stadification et le suivi thérapeutique de la maladie.[112]–[115], [104] Elle est une technique d'imagerie fonctionnelle car elle est adaptée pour une étude du métabolisme et du fonctionnement des organes.

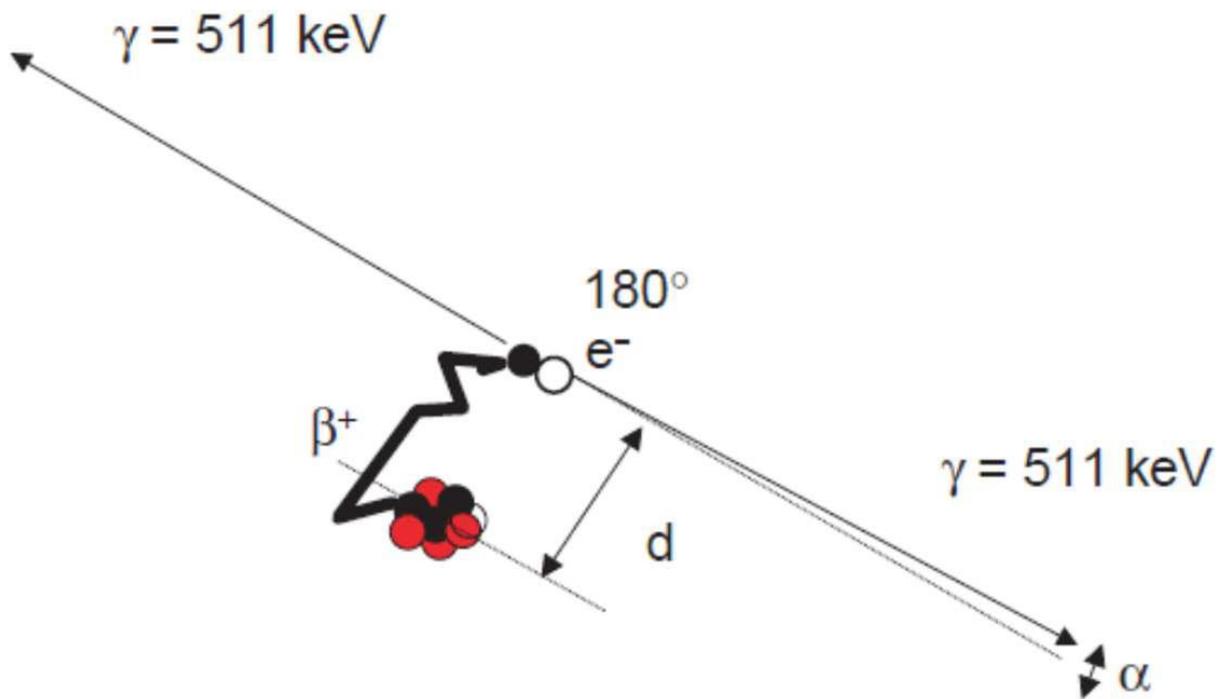


Figure 2-2 : Emission d'un positon et réaction d'annihilation [116]

La PET est un excellent outil pour le diagnostic clinique et la stadification mais également pour le développement préclinique d'agents thérapeutiques car elle permet de suivre leur biodistribution et de quantifier leur pharmacocinétique et leur accumulation en raison de sa grande sensibilité, de sa profondeur de pénétration infinie, de son caractère quantitatif et de sa large palette de radionucléides accessibles. Les sondes PET sont obtenues principalement selon deux voies :

- par complexation des radionucléides avec des groupes chélatants tels que les dérivés du DOTA, du DTPA ou du HYNIC.
- par incorporation des radioéléments ($[^{11}\text{C}]\text{C}$, $[^{18}\text{F}]\text{F}$...) dans la structure moléculaire des radiotraceurs.[107], [117]–[124]

Chacune de ses stratégies présentent des avantages et des inconvénients. La première stratégie (complexation) est relativement simple et rapide à mettre en œuvre mais est sujette à un risque de démétallation indésirable qui outre le caractère toxique de certains ions non complexés peut fausser l'interprétation des images. La deuxième stratégie est très intéressante car les molécules ainsi radiomarquées ont la même composition chimique et donc les mêmes comportements que les molécules « froides ».

Bien qu'elle possède de nombreux atouts, la PET est cependant pénalisée par un certain nombre d'inconvénients, comme notamment la nécessité d'utiliser des sondes radioactives et un manque d'informations anatomiques en raison d'une résolution spatiale limitée.

2.4. Imagerie multimodale

Les modalités d'imagerie médicale décrites précédemment (CT, IRM, PET, SPECT) présentent toutes des caractéristiques attrayantes mais également des limitations. Elles dépendent des caractéristiques physiques sur

lesquelles repose l'acquisition des images. En effet, CT et IRM sont caractérisées par une bonne résolution spatiale mais sont handicapées par une faible sensibilité alors que les techniques d'imagerie nucléaires (TEP, SPECT) se distinguent par leur excellente sensibilité. En revanche, elles sont pénalisées par leur faible résolution spatiale. Du fait de leurs caractéristiques physiques, la tomodensitométrie X et l'IRM fournissent des informations anatomiques avec un excellent résolution spatiale alors que l'imagerie nucléaire fournit des informations fonctionnelles avec une excellente sensibilité. L'IRM et CT ne donnent pas les mêmes informations que celles obtenues à partir de la PET et de la SPECT, mais elles sont complémentaires. Pour cette raison, il a été proposé d'associer ces modalités d'imagerie complémentaires.

Technique		Signal mesuré	Résolution spatiale	Temps d'acquisition	Sensibilité (mol.L ⁻¹ d'AI)	Profondeur maximum	Agent d'imagerie	Coût
Imagerie X		Rayons X	50 – 200 μ m	Minutes	10 ⁻³ M	Pas de limite	Molécules iodées	€€
IRM		RMN ¹ H	10 -100 μ m	Minutes à heures	10 ⁻³ – 10 ⁻⁵ M	Pas de limite	Chélates de Gd ³⁺ ; oxydes de fer	€€€€
Imagerie nucléaire	SPECT	Rayons γ	1 – 2 mm	Minutes	10 ⁻¹⁰ – 10 ⁻¹¹ M	Pas de limite	[^{99m} Tc]Tc, [¹¹¹ In]In, [²⁰¹ Tl]Tl	€€€
	PET	Rayons γ (511 KeV)	1 – 2 mm	10 secondes à minutes	10 ⁻¹¹ – 10 ⁻¹² M	Pas de limite	[¹¹ C]C, [¹⁸ F]F, [¹⁵ O]O, [⁶⁴ Cu]Cu	€€€€

Tableau 2-3: Caractéristiques des principales techniques d'imagerie médicale

L'imagerie multimodale résulte de la combinaison de deux ou plusieurs techniques d'imagerie afin d'obtenir des informations complémentaires. L'obtention des informations anatomiques et fonctionnelles dans une zone peut être réalisées en combinant des images acquises par la tomodensitométrie X et l'IRM et imagerie nucléaire.[125] Cette combinaison permet de coupler les points forts de chacune de ces modalités complémentaires et conduire à une meilleure interprétation des images qui rendra la localisation des zones pathologiques plus fiable. Des systèmes hybrides CT/PET, CT/SPECT, IRM/PET [126] et IRM/SPECT [127] ont récemment été conçus afin de limiter l'irradiation des patients tout en permettant l'imagerie des tissus mous avec une grande résolution spatiale et une haute sensibilité. D'autre combinaisons sont en cours de développement, tous ont un point commun : elles sont toutes à la recherche d'un impact synergique permettant de maximiser les bénéfices de chaque modalité employée (sensibilité, résolution spatiale, imagerie anatomiques ou fonctionnelles ...). L'objectif est de pouvoir détecter et localiser plus rapidement les lésions (notamment les cancers) afin de proposer aux patients une thérapie plus précoce et plus adaptée. Parallèlement au développement des méthodes d'imagerie multimodale, un effort de recherche intensif est mené dans le domaine des sondes multimodales.[128]

2.5. Bilan

L'imagerie multimodale (Tableau 2-4) est devenue l'un des principaux outils pour le diagnostic médical, le suivi des traitements et de l'évolution des maladies (surtout des cancers) ainsi que l'identification de la thérapie la plus adaptée. L'obtention des informations complémentaires améliore chaque phase de traitements de la maladie. Pour pouvoir combiner ces modalités, le développement d'une plateforme contenant les agents d'imagerie des deux types de modalités peut être requis. L'équipe NCM, impliquée dans le développement de nouvelles sondes multimodales pour l'imagerie multimodale, a développé des nanoparticules d'or pour l'imagerie simultanée IRM/PET (thèse de Farhan Bouraleh Hoch) dans le cadre du projet EquipEx IMAPPI (coordonnateur : Prof. François Brunotte puis Prof. Alexandre Cochet). Le traitement de certaines maladies comme le cancer et l'athérosclérose dépendent beaucoup de l'imagerie. Afin de mieux comprendre les enjeux concernant le développement de sondes d'imagerie et d'agents théranostiques plus efficaces dans le domaine du diagnostic et du traitement des cancers et de l'athérosclérose, ces maladies seront décrites dans la partie suivante.

Technique		Avantages	Inconvénients
Imagerie X		Haute résolution	Radiation ionisante Faible contraste
IRM		Technique non ionisante Haute résolution spatiale Haute corrélation anatomique intrinsèque	Faible sensibilité Danger des relargages d'éléments toxiques contenus dans les agents de contraste Vision « en coupes » du tissu
Imagerie nucléaire	SPECT	Haute sensibilité	Utilisation de radioisotopes Faible résolution
	PET	Possibilité de scanner le corps complet dans une image	

Tableau 2-4 : Principaux avantages et inconvénients des techniques d'imagerie médicale [129]

3. Cancer et athérosclérose : maladie différente mais traiter avec les mêmes nanoparticules

3.1. Cancer

Le cancer est une des préoccupations majeures de santé publique de ces dernières années. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer a été responsable de près de 10 millions de décès en 2020, soit 13% de l'ensemble des décès. Au cours des deux prochaines décennies, le nombre de nouveaux cas de cancer dans le monde devrait passer de 14 millions en 2012 à pas moins de 22 millions en 2040. En France, le nombre de nouveaux cas de cancer devrait augmenter de 35% en 2040. Les graphiques suivants montrent le nombre de

nouveaux cas en France en 2020 (Figure 3-2) et les estimations de taux d'incidence et de mortalité en France entre 2020 et 2040 (Figure 3-1 et Figure 3-3) selon l'organisation mondiale de la santé.

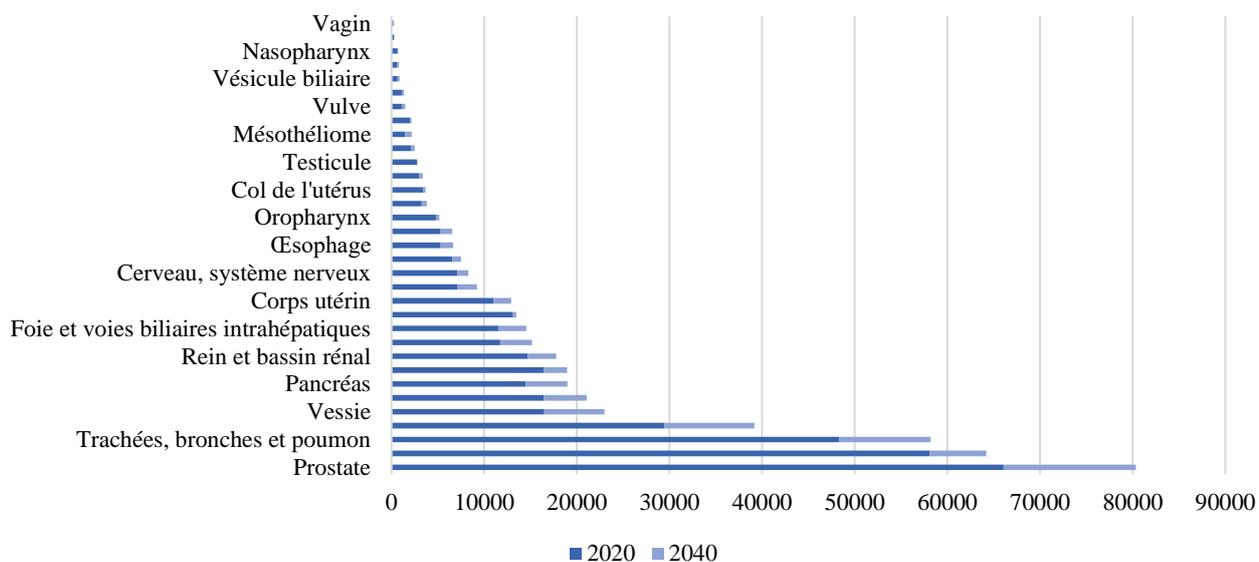


Figure 3-1: Estimation du nombre de morts par le cancer en France en 2020 et 2040

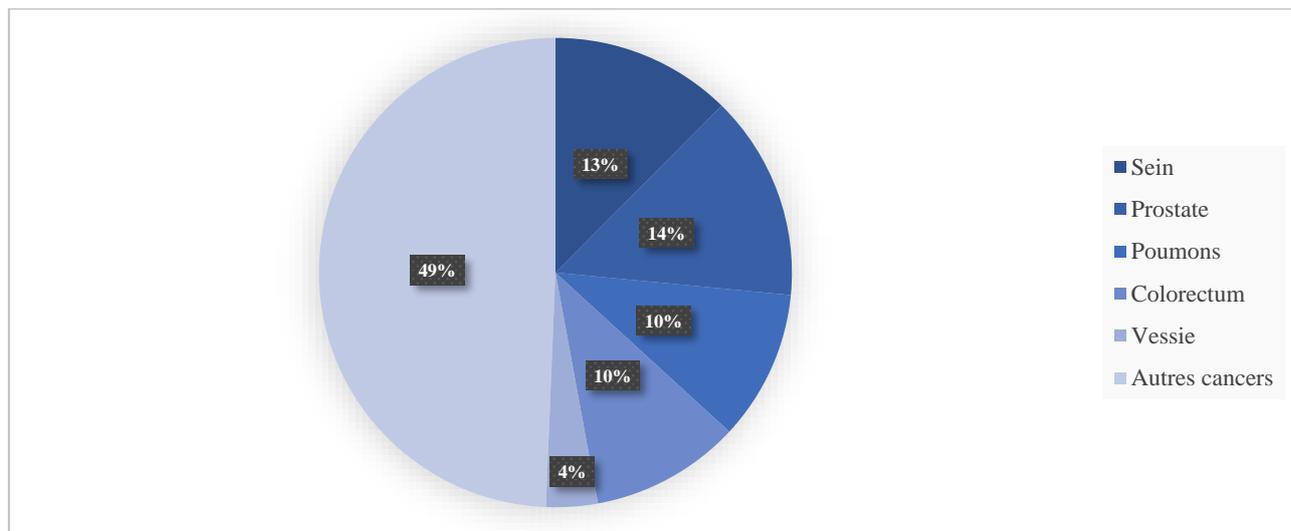


Figure 3-2 : Proportion des principaux cancers déclarés en 2020 en France

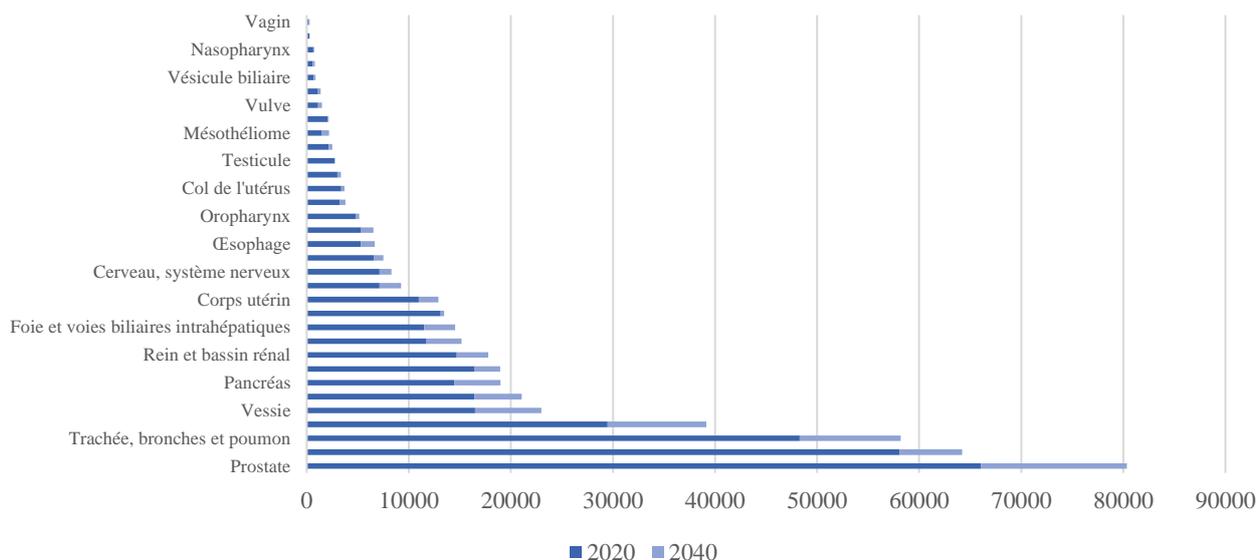


Figure 3-3 : Estimation du nombre de cas de cancer en France en 2020 et 2040

3.1.1. Cancer ou cancers ?

Le terme cancer représente plusieurs maladies résultantes d'une prolifération illimitée de cellules à cause de l'altération du patrimoine génétique. Ces cellules anormales échappent à tout contrôle de différenciation et de multiplication. Une surpopulation de cellules détruit les tissus environnants et peut s'accompagner d'une dispersion dans l'ensemble de l'organisme et provoque, en l'absence de traitement approprié, la mort.[130] Différents facteurs sont à l'origine de cette prolifération cellulaire. Certaines sont bien connues et d'autres suscitent encore le débat. Les plus connus sont les facteurs héréditaires, irradiation (rayons ultra-violet, rayonnements X ou γ), exposition à des composés chimiques mutagènes (carcinogène, solvants), tabac, alcool, etc.[131]

Bien que le terme cancer soit utilisé au singulier, suggérant une homogénéité, il existe en réalité différents types de cancer selon l'organe atteint, mais également selon le type de cellules dont la tumeur est issue. En outre, la variabilité biologique entre patients est à l'origine de différences notables dans le développement et le traitement d'un même type de cancer. Cette observation a suscité une réflexion sur la personnalisation des traitements. Chez les femmes, les cancers les plus répandus sont ceux du sein, du col de l'utérus et les cancers colorectaux, alors que chez l'homme, les cancers des poumons, de la prostate et les cancers colorectaux sont les plus fréquents.[132], [133] Selon leurs états, les cancers sont classés dans quatre catégories :

- Les cancers « solides » : les plus courants qui se développent dans les tissus autres que le sang ;
- Les cancers « liquides » : qui se développent dans le sang (leucémie) ou dans le système lymphatique (lymphome) ;
- Les cancers « métastatiques » qui se développent dans un ou plusieurs autres tissus éloignés de la tumeur primaire (propagation dans le corps) ;
- Les cancers secondaires consécutifs à un traitement.[134]

Quand le cancer est diagnostiqué, la détermination de son stade est importante. Les trois critères qui doivent être pris en compte sont :

- La taille et l'infiltration du cancer
- L'infection des ganglions lymphatiques par le cancer
- La présence ou non de métastases

L'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) a proposé la classification TNM des types de cancer qui repose sur ces trois critères : T pour le site primaire du cancer, N pour les ganglions lymphatiques impliqués (N car node en anglais signifie ganglion), M pour la présence ou l'absence de métastase. Cette classification permet une meilleure planification du traitement.

3.1.2. Apparition et croissance

Comme déjà mentionné, l'apparition d'un cancer peut avoir pour origine plusieurs facteurs. Cependant, quelle que soit le type de cancer, cette maladie comporte plusieurs phases (Figure 3-4) [130] :

- Initiation : correspond à une lésion d'ADN (acide désoxyribonucléique) non réversible d'une cellule. Cette mutation influence la division cellulaire, la croissance ou la différenciation de la cellule. Cette cellule est appelée cellule « initiée ». A ce stade, on ne parle pas encore de cancer ;
- Promotion : correspond à la stabilisation de la lésion par des expositions prolongées à des facteurs de risque. Cette lésion est conservée et transmise ;
- Propagation : Correspond à une perte de l'identité de la cellule qui acquiert de nouvelles propriétés de multiplication incontrôlables et conduit à une perte de différenciation. À ce stade, on parle d'une tumeur maligne ;

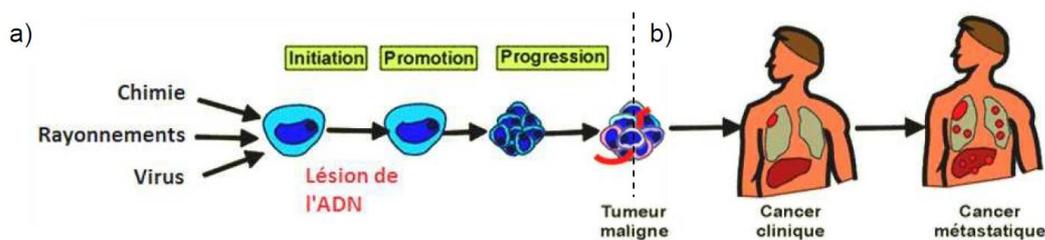


Figure 3-4: Schéma des (a) phases initiales du cancer et (b) développement tumoral

Les cellules cancéreuses sont différentes des cellules normales. Elles ont la faculté de contourner les systèmes de régulation de la population cellulaire (homéostasie) et obtiennent ainsi une « immortalité » qui leur permet de se diviser indéfiniment.[130], [135] En outre, elles peuvent développer différents mécanismes qui leur permettent d'éviter la détection ou la destruction par le système immunitaire (échappement tumoral) [135], [136], ce qui leur permet de se multiplier rapidement et de manière incontrôlée.

La croissance d'une tumeur maligne est donc extrêmement rapide, entraînant l'invasion et la destruction des tissus sains qui l'entourent (invasion tumorale). Les cellules tumorales détruisent la matrice extracellulaire en sécrétant des enzymes particulières, la rendant plus lâche et plus désordonnée. Les cellules tumorales

peuvent atteindre les artères nourricières grâce à une perte d'adhésion cellulaire et à l'acquisition de capacités de mobilité (migration cellulaire).[130], [136] Ces dernières sont essentielles au développement de la tumeur.

3.1.3. Angiogenèse tumorale et expansion métastatique

L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Elle est contrôlée par des mécanismes moléculaires complexes induits par des substances favorisant ou limitant ce processus.[137], [138]

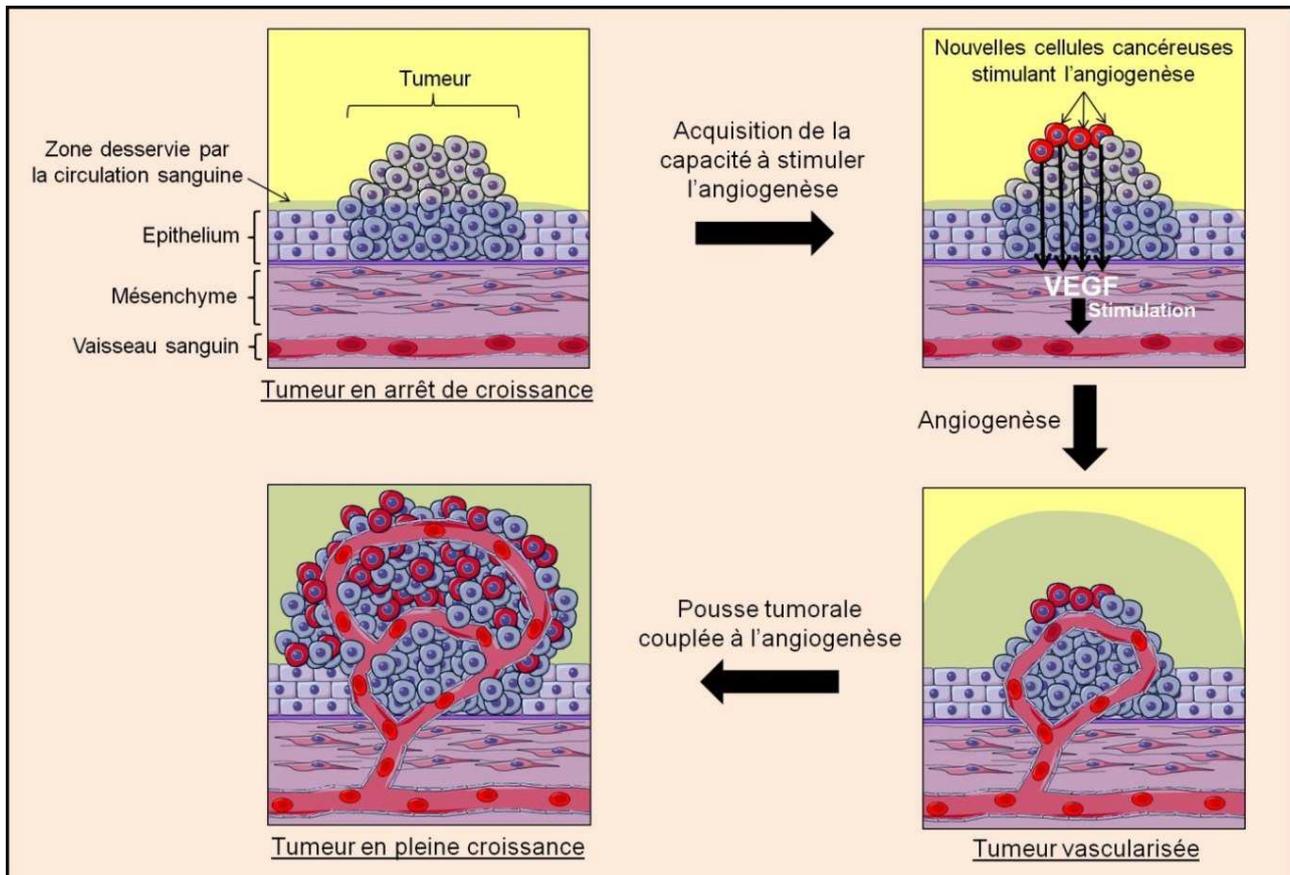


Figure 3-5 : Mécanisme de l'angiogenèse[139]

Le « switch angiogénique » est provoqué par l'hypoxie, qui survient lorsque la taille d'amas de cellules cancéreuses dépasse 1 à 2 mm³ en raison d'une prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses.[140] Ces derniers commencent à générer des facteurs de croissance favorisant l'angiogenèse, notamment le VEGF (vascular endothelial growth factor) et FGFs (fibroblast growth factors).[140]–[142] La libération de ces facteurs de croissance modifie l'équilibre entre les substances chimiques favorisant et celles limitant l'angiogenèse, promouvant la prolifération des cellules endothéliales, nécessaire à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ceux-ci assureront l'approvisionnement des tumeurs en oxygène et en nutriments, assurant ainsi leur développement (Figure 3-5). La néovascularisation est une étape critique et nécessaire non seulement pour la survie des tumeurs, mais aussi pour la création et la propagation des métastases dans les organes les plus éloignés. La cause la plus fréquente de mortalité par cancer est la propagation métastatique via le système vasculaire. [141], [143]–[147]

3.1.4. Physiologie tumorale et implication thérapeutique

La zone tumorale présente une physiologie différente de celle de la zone saine en raison d'un développement et d'une reproduction rapides et non contrôlés des cellules tumorales. Ce développement anarchique a besoin d'un apport supplémentaire d'oxygène et de nutriment assuré par une hypervascularisation, qui est structurellement et fonctionnellement anormale pour la plupart des tumeurs.[148], [149] Les vaisseaux sanguins irriguant le microenvironnement tumoral sont désorganisés, tortueux, présentent des imperfections dans leur paroi, une répartition spatiale hétérogène et un diamètre variable (Figure 3-5).[148], [150], [151] Les vaisseaux sanguins qui irriguent le microenvironnement tumoral présentent une « fenestration » de plusieurs centaines de nanomètres car les cellules endothéliales qui les composent ne sont pas jointives. Cette fenestration rend les vaisseaux sanguins poreux et augmente la perméabilité du flux sanguin irrégulier et anarchique.[148], [152]–[156] Cette anomalie des vaisseaux sanguins et l'absence de drainage lymphatique permettent l'accumulation d'entités ayant une taille inférieure à 1000 nm.[157] Ce phénomène connu sous le nom d'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention effect*) est présent dans différents types de cancer et joue un rôle essentiel pour le ciblage « passif » et « actif » des macromolécules et des nano-objets. L'effet EPR a été initialement découvert par Matsumara et Maeda [158] dans les années 1980. Il s'agit de l'un des principaux phénomènes permettant le diagnostic et le traitement des tumeurs solides.[159]

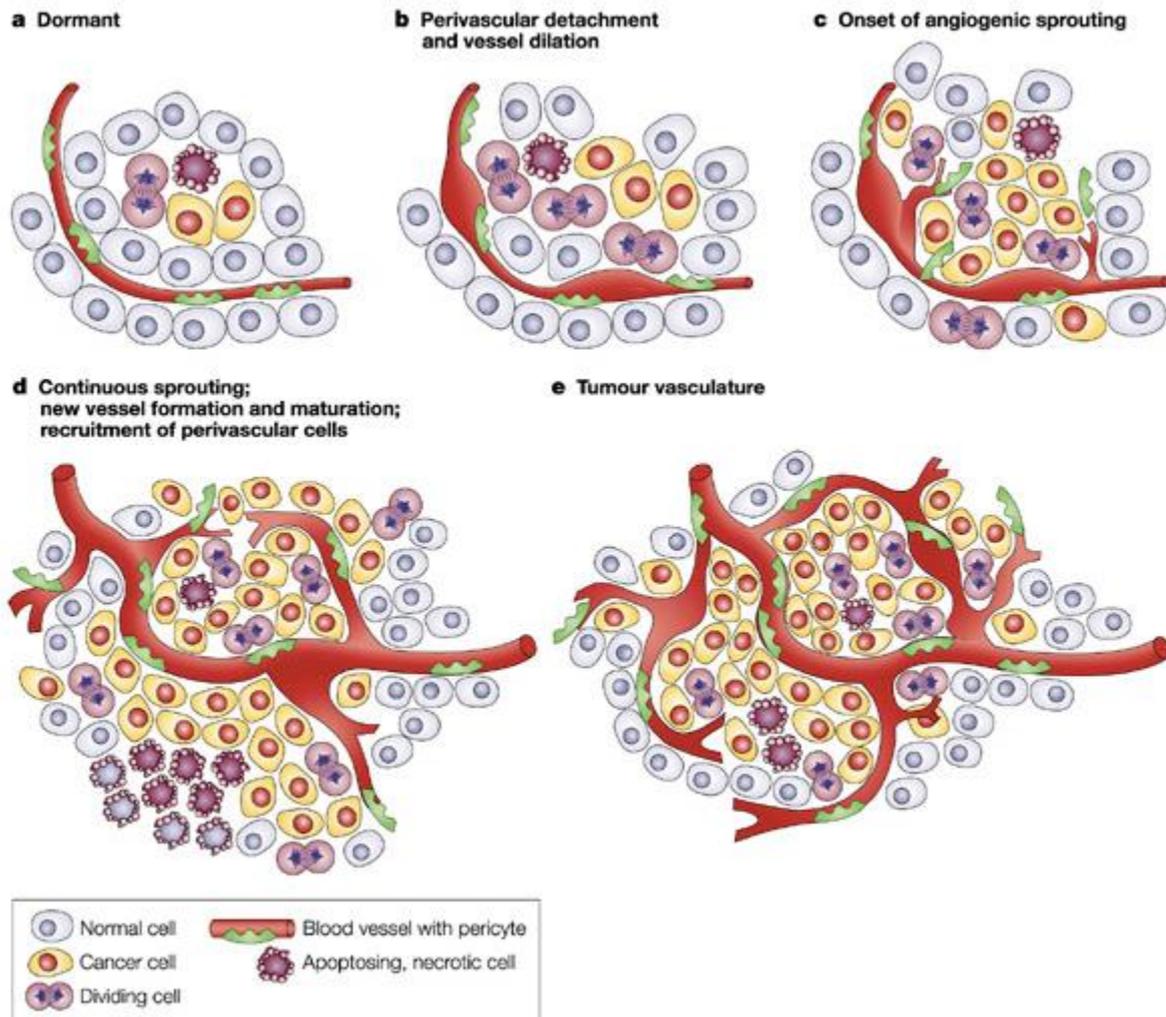


Figure 3-6: Développement tumoral en plusieurs étapes: a) tumeur dormante, b) dilatation des vaisseaux sanguins, c) début de bourgeonnement angiogénique, d)bourgeonnement avancé et e) hypervascularisation tumorale [141]

Les tumeurs se distinguent également par une surexpression abondante de récepteurs spécifiques à la surface des cellules qui les composent en raison d'un métabolisme accru. Cette surexpression ouvre la voie au ciblage actif de ces cellules avec des molécules spécifiques (protéines, anticorps, peptides...) qui présentent une forte affinité pour ces récepteurs. Il est essentiel de souligner que ce ciblage actif des tumeurs solides n'est possible que si les conditions physiologiques sont réunies pour le ciblage passif, par effet EPR.

3.1.5. Les méthodes de traitement du cancer

Le cancer, de nos jours, est traité par différents stratégies thérapeutiques, principalement la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Ces stratégies peuvent être utilisées seules ou combinées afin d'augmenter la possibilité de guérison chez les malades.

3.1.5.1. Chirurgie

Après le diagnostic du cancer, l'intervention chirurgicale est généralement la première étape du traitement. Selon la taille et la localisation de la tumeur, deux méthodes chirurgicales sont fréquemment utilisées pour le traiter :

- La mastectomie : implique l'ablation totale de la tumeur. Cette thérapie drastique, qui élimine la totalité des tissus afin de limiter les récurrences, est fréquemment pratiquée lorsque cette dernière ne présente pas de risque pour le patient. C'est le cas dans le cancer du sein.
- La tumorectomie : consiste à enlever une partie de l'organe où la tumeur était située. Elle est couramment utilisée pour traiter les petites tumeurs. Quand les tumeurs sont minuscules, cette thérapie est conservatrice.[160]

Cependant, l'opération présente certains inconvénients, tels que des infections au niveau de site chirurgical, un inconfort après l'opération et des problèmes d'anesthésie. En outre, elle est restreinte aux tumeurs malignes qui sont facilement accessibles, comme le cancer du sein ou de la prostate. En plus de la chirurgie, des thérapies supplémentaires telle que la chimiothérapie et/ou la radiothérapie sont utilisées pour améliorer les chances de guérison.

3.1.5.2. Chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement qui repose sur l'utilisation de médicaments visant à éliminer les cellules cancéreuses. Elle permet de prolonger la vie des patients traités mais avec des résultats très variables en fonction du type de cancer, de son stade et des patients.[161] Les agents de chimiothérapie couramment utilisés comme la doxorubicine (DOX),[162] le paclitaxel (PTX),[163] le docétaxel (Btx1) [164] et le cisplatine (CDDP) [165] sont capables de tuer rapidement les cellules cancéreuses dès leur absorption. Ces agents arrêtent le cycle cellulaire (effet cytostatique) et /ou provoquent une mort cellulaire (effet cytotoxique) principalement par apoptose. Les molécules sont le plus souvent administrées par perfusion intraveineuse. Cependant, la clairance rapide et la distribution non spécifique de ces substances chimiques réduisent considérablement l'efficacité de ces agents et induisent une toxicité systémique.[166] En outre, l'utilisation de médicaments sur une longue période entraîne souvent le développement par les cellules cancéreuses de voies de résistance aux agents chimiques, connues sous le nom de MDR (Multi Drug Resistance).[167]–[169] Pour surmonter ces difficultés, des systèmes d'administration de médicament (DDS : Drug Delivery System) conçus sur mesure pour transporter et livrer de façon ciblée les principes actifs dans les tumeurs ont été mis en œuvre, [170]–[173] garantissant une accumulation préférentielle dans les tumeurs grâce à des méthodes de ciblage passif ou actif. Au cours des dernières décennies, une large gamme de DDS organiques et inorganiques a été développée et produite pour l'administration de médicaments spécifiques aux tumeurs. Les DDS organiques qui comprennent les liposomes,[174] les micelles,[175] les dendrimères,[176] et les nanoparticules polymères[177] sont étudiées avec grand intérêt depuis les années 1960. En raison de leur excellente biocompatibilité et biodégradabilité, plusieurs de ces formulations ont même été utilisées pour le transport et la libération d'agents anticancéreux. Le potentiel de certains d'entre eux est évalué dans le cadre d'essais cliniques alors que d'autres, comme le Doxil[®], ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) [178]. Le Doxil[®] est constitué d'un liposome qui encapsule la doxorubicine (DOX).

Cependant leur large éventail d'applications est limité par leur stabilité et leur immunogénicité. En revanche, les DDS inorganiques, tels que les nanomatériaux de carbone,[179] les nanoparticules magnétiques,[180] les nanostructures d'or,[181] les nanoparticules de silice mésoporeuse [182] et les points quantiques [183] (QDs)

ont une dispersion /stabilité élevée, une grande capacité de chargement de principes actifs et une faible immunogénicité.[184]–[188] Ils constituent une alternative prometteuse pour surmonter les inconvénients des DDS organiques. Les DDS inorganiques purs, en revanche, sont pour la plupart caractérisés par un trop faible temps de résidence vasculaire, une clairance rapide par SPM, une toxicité à long terme et une faible biodégradabilité. Les DDS hybrides obtenus par la fonctionnalisation des DDS inorganiques par des molécules ou des polymères organiques paraissent mieux adaptés pour l’administration de médicaments car ils rassemblent les propriétés complémentaires des DDS organiques et des DDS inorganiques tout en minimisant leurs faiblesses.

Types	Avantages	Inconvénients	Exemples
DDS organique	Biocompatibilité élevée Bonne biodégradabilité Libération contrôlée du médicament	Faible stabilité Immunogénicité Purification fastidieuse	Liposomes [174] Micelles [175] Dendrimères [176] Nanoparticules polymères [177]
DDS inorganique	Haute dispersion/stabilité chimique Faible immunogénicité Grande capacité de chargement du principe actif Multifonctionnalisation facile	Clairance rapide par SPM Faible accumulation tumorale Courte circulation sanguine Faible biodégradabilité Toxicité à long terme	Nanomatériaux de carbone[179] Nanoparticules magnétiques[180] Nanostructures à base d’or [181] Nanoparticules de silice mésoporeuse [182] Points quantiques [183] (QDs)

Tableau 3-1: Classification et caractérisation des DDS

3.1.5.3. Radiothérapie

La radiothérapie est l’un des traitements les plus utilisés pour contrôler la croissance des tumeurs.[189] On estime que 50% des patients atteints d’un cancer doivent recevoir un traitement par radiothérapie, soit seul, soit associé à d’autres types de traitement (chirurgie, chimiothérapie [190] et/ou immunothérapie...). La radiothérapie présente le rapport efficacité/coût le plus favorable par rapport aux autres techniques thérapeutiques en oncologie, ce qui explique en grande partie son importante utilisation.[191] Le traitement par radio-isotopes internes (IRT) et la radiothérapie par faisceau externe (EBRT) sont deux types de radiothérapies.[192] L’IRT repose sur le rayonnement intrinsèque des radio-isotopes thérapeutiques (par exemple ^{131}I I, ^{177}Lu Lu, ^{90}Y Y, ^{188}Re Re...) administrés *in vivo* par voie systémique de manière peu invasive.[193]–[195] Cette méthode est capable de traiter des cancers locaux et métastatiques répartis dans tout le corps.[196] Il est important de noter que l’administration de radio-isotopes doit conduire

impérativement au ciblage de la tumeur pour minimiser la radiotoxicité systémique pour les organes sains.[197]–[199] La radiothérapie par faisceau externe (EBRT), la plus fréquente, s'appuie sur une source de rayonnements ionisants externes pour un traitement de précision des tumeurs solides profondes telles que celles des cancers du sein, du poumon, colorectal et du cerveau. Ce type de traitement est classé en trois catégories, selon la nature du rayonnement ionisant : traitements par faisceaux de protons (protonthérapie), thérapie par faisceaux d'ions lourds (hadronthérapie avec les ions carbone C^{6+}) et thérapie par rayons X, car elle est adaptée aux diverses sources de rayonnement ionisant, comme les protons, les faisceaux d'ions lourds (ions carbone) et les rayons X.[200]–[203]

Le traitement par rayons X à haute énergie (MeV) est la radiothérapie par faisceau externe la plus souvent utilisée en clinique pour limiter la croissance des cellules cancéreuses.[204] Une série de processus secondaires compliqués transfèrent l'énergie à travers la tumeur, entraînant la production de molécules hautement réactives qui modifient les protéines et le matériel génétique des cellules cancéreuses, ce qui entraîne la mort du tissu tumoral dans des conditions spécifiques. Comme le montre la Figure 3-7, ces événements peuvent être classés en différentes phases qui se produisent à des moments distincts [205] :

- L'étape physique initiale : transfert d'énergie du rayonnement au milieu qu'il traverse, en produisant des ionisations ou des excitations ;
- L'étape physico-chimique : formation d'espèces instables et très réactives, les radicaux libres ;
- L'étape moléculaire : modification des différentes molécules qui composent les cellules vivantes (l'ADN, les protéines, les phospholipides de la membrane) par les radicaux libres ;
- L'étape cellulaire : orientation vers la vie ou la mort d'une cellule selon l'efficacité des systèmes de réparation cellulaire.

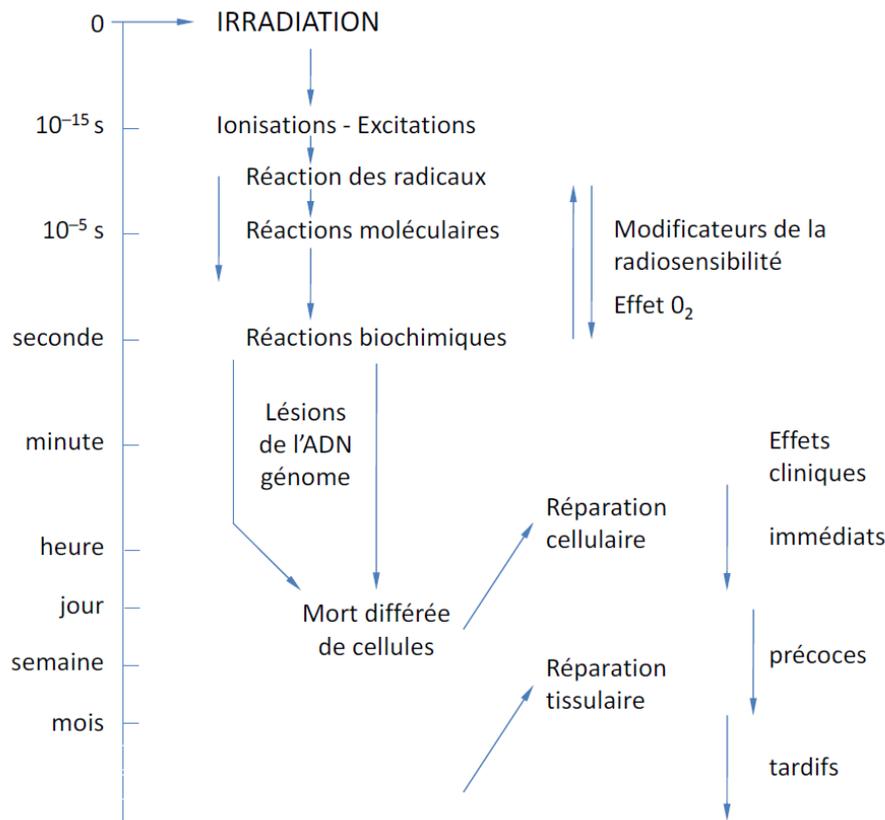


Figure 3-7: Chronologie des événements après irradiation [205]

3.1.5.3.1. Processus physique : interaction rayonnement ionisant/matière

Un rayonnement ionisant est un rayonnement qui produit des phénomènes d'ionisation et d'excitation dans la matière qu'il traverse. Une des conséquences d'ionisation est la formation de radicaux libres qui sont des espèces instables et très réactives. L'ionisation, en général, dans un milieu biologique requiert une énergie moyenne de 32 eV. Elle est distribuée de façon égale entre ionisation et excitation.[206] Les photons X de haute énergie sont le rayonnement ionisant utilisé en radiothérapie. Il s'agit de rayonnements indirectement ionisants, c'est-à-dire qu'ils produisent des particules chargées par interaction primaire et ces électrons secondaires provoquent un dépôt d'énergie par ionisation ou excitation du milieu traversé. Ces rayons X de haute énergie interagissent avec la matière par trois processus physiques prédominants : effet photoélectrique, effet Compton et création de paires. [207]

Effet photoélectrique

C'est un phénomène physique qui consiste en l'absorption totale de l'énergie d'un photon incident ($E = h\nu$) par des électrons de la couche interne de l'atome. Le photon incident transfère la totalité de son énergie à un électron du cœur et disparaît. L'électron est expulsé avec une énergie cinétique E_c qui est égale à la différence entre l'énergie incident E et l'énergie d'extraction W_i de l'électron ($E_c = E - W_i$). Cette interaction se produit seulement si l'énergie du photon incident est supérieure ou égale à l'énergie d'extraction de l'électron.

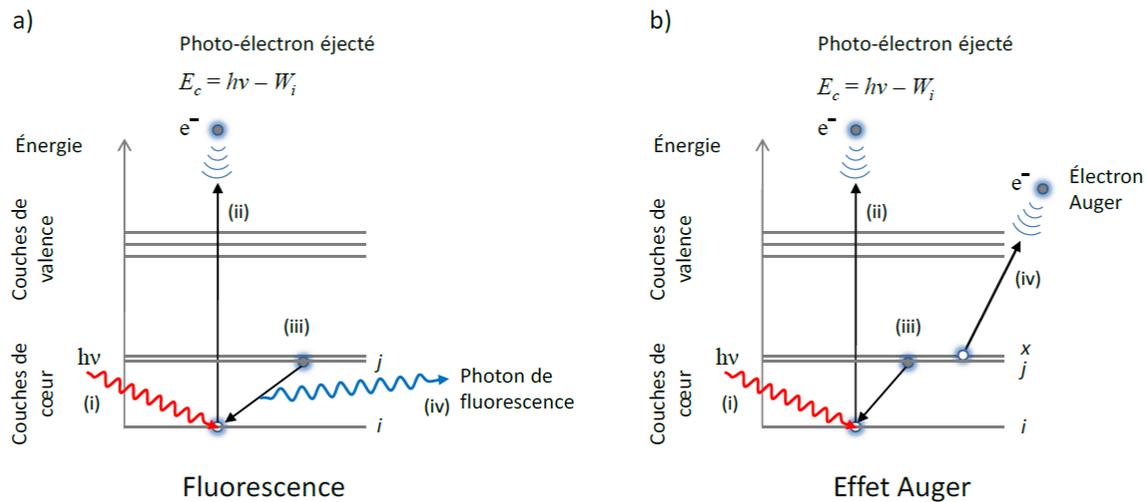


Figure 3-8 : Schéma représentant les différentes phases constituant l'interaction d'un photon incident par effet photoélectrique : (i) absorption de la totalité de l'énergie d'un photon incident et (ii) éjection d'un photo-électron ; (iii) comblement de la vacance électronique résultante par un électron d'une couche électronique supérieure ; (iv) émission d'énergie sous forme (a) d'un photon de fluorescence ou (b) d'un électron Auger.

L'expulsion d'un électron de couche interne (i) induit une vacance électronique qui est comblée par un électron externe moins lié provenant d'une couche extérieure (j). Ce comblement génère l'émission d'un photoélectron d'énergie E_{fluo} égale à la différence d'énergie entre le niveau supérieur j (W_j) et le niveau inférieur i (W_i) : $E_{fluo} = W_i - W_j$ (Figure 3-8a). Une voie non radiative peut également combler cette vacance : l'effet Auger (Figure 3-8b). Durant ce phénomène, l'énergie qui devait être libérée est absorbée par un électron de niveau x, supérieur au niveau j, et d'énergie W_x . L'électron est alors éjecté de l'atome avec une énergie cinétique T ($T = (W_i - W_j) - W_x$). Le comblement d'une vacance électronique par l'émission d'un électron Auger se traduit donc par l'apparition d'une deuxième vacance électronique, qui à son tour peut être comblée par effet Auger, ce qui induit finalement une cascade d'émission d'électrons laissant l'atome dans un état fortement chargé. L'effet photoélectrique est prédominant pour les faibles énergies de photon. Il s'observe en particulier pour les matériaux denses constitués d'éléments qui possèdent un numéro atomique (Z) élevé.

Effet Compton

L'effet Compton est une diffusion inélastique d'un photon incident sur un électron d'une couche électronique d'un atome.[207] Le photons incident ($E = hv$) donne une partie de son énergie (E_a) à l'électron, l'énergie restante E_s sera émis sous forme d'un photon « diffusé » avec une énergie inférieure à l'énergie initiale du photon incident. L'électron éjecté aura une énergie cinétique $E_c = E_a - W_i$, W_i est l'énergie de liaison de l'électron. La conservation de la quantité de mouvement permet de déterminer l'angle θ de diffusion ainsi que l'énergie du photon diffusé tout en connaissant l'énergie du photon incident. L'effet Compton est prédominant dans la gamme d'énergie usuellement utilisée en radiothérapie (4–25 MeV).[208] L'effet Compton est prépondérant pour les éléments légers, tels ceux qui composent les tissus biologiques, quand l'énergie diminue.

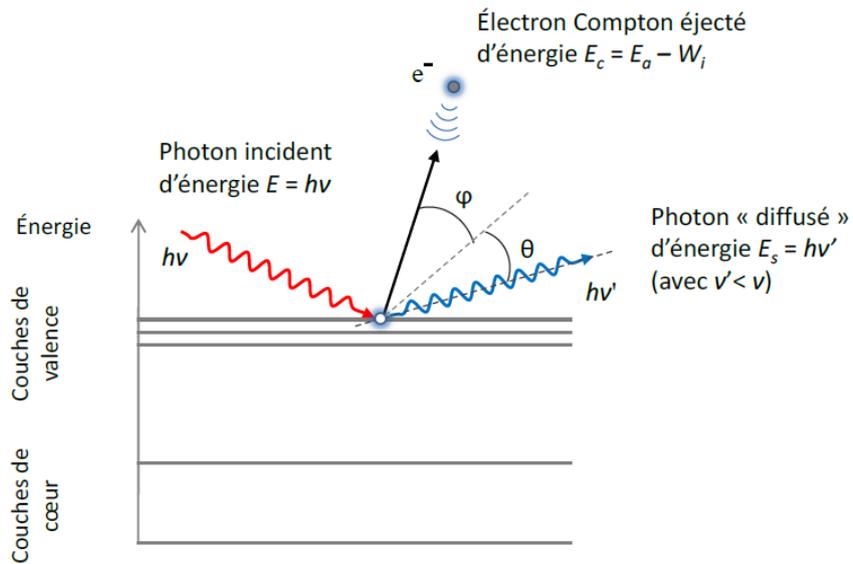


Figure 3-9 : Schéma représentant l'effet Compton

Création de paires

L'effet de matérialisation se traduit par la formation d'un couple (électron, positon) lorsqu'un photon passe à proximité du champ électrique intense régnant au voisinage d'un noyau (Figure 3-10). Le positon est identique à l'électron mais possède une charge positive.

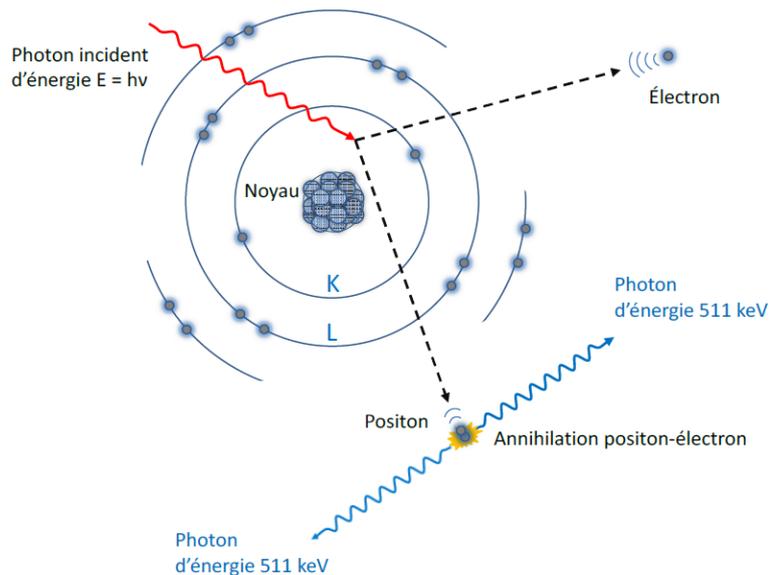


Figure 3-10 : Schéma représentant l'effet de matérialisation suivi par l'annihilation du positon formé et d'un électron du milieu. Les pertes d'énergie du positon et de l'électron, par interactions coulombiennes successives au sein du matériau, ne sont pas représentées. Par commodité, la représentation planétaire de l'atome est utilisée ici.

Le positon issu du phénomène de matérialisation va s'annihiler lors de sa rencontre avec un électron du milieu. Deux photons γ d'énergie égale à 511 KeV sont émis dans des directions diamétralement opposées (Figure 3-10).

Domaines de prédominance des différents effets

Les photons traversant un milieu peuvent subir différents types d'interaction. Le type d'interaction dépend de l'énergie du photon et du numéro atomique Z des éléments de la zone traversée.[207] Le diagramme de la Figure 3-11 montre que l'effet photoélectrique est prédominant à basse énergie pour les matériaux composés d'éléments avec un numéro atomique moyen et élevé. L'effet Compton est prédominant sur une large gamme d'énergie surtout pour les éléments légers de numéro atomique Z inférieur à 40. La création de paires est prédominant pour les très hautes énergies. La zone orange représente la zone d'interaction initiale (zone de travail) dans le cadre d'un traitement par radiothérapie (interactions de photons X de 4–25 MeV avec les tissus biologiques, $Z \leq 20$). La zone rouge représente la zone de travail de cette thèse : emploi d'un élément lourd (l'or, $Z_{Au} = 79$) et d'un faisceau X de basse énergie (40–350 keV) ou d'un rayonnement γ de moyenne énergie (662 keV).

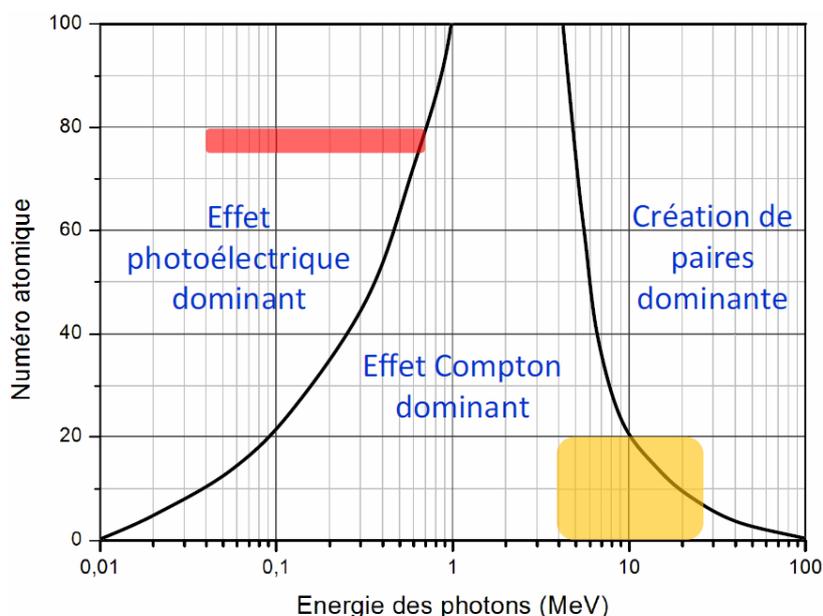


Figure 3-11 : Diagramme représentant les zones de prédominance des trois principaux modes d'interaction des photons avec la matière (effet photoélectrique, effet Compton et création de paires) en fonction de l'énergie des photons et du numéro atomique de la cible (modifié d'après Podgorsak, 2005). [209]

3.1.5.3.2. Processus physico-chimique et moléculaire

Après le processus physique décrit précédemment, les rayonnements primaire et secondaire (produit de l'interaction des rayonnements primaires) déposent l'énergie dans les cellules. Les cellules sont composées de différentes molécules comme l'eau, les protéines, les acides nucléiques... Ce dépôt d'énergie entraîne la formation d'ions ou de radicaux libres. L'oxygène étant un radiosensibilisateur, sa présence est un élément-clé qui peut améliorer l'efficacité de la radiothérapie. Lorsque la concentration en oxygène est faible, la radiothérapie est moins efficace, ce qui explique pourquoi quelques types de cancer sont radiorésistants.[206] Les altérations des molécules biologiques se produisent selon deux mécanismes différents (Figure 3-12) [206]:

- Interaction indirecte : formation des espèces réactives par radiolyse de l'eau. L'eau est le principal composant de la cellule. Il présente 70-80% en masse de la cellule. Les rayonnements peuvent exciter facilement l'eau en donnant naissance à des espèces radicalaires très réactives : le radical hydroxyle HO^\bullet , oxydant fort, l'électron solvaté (e^-_{aq}) et le radical hydrogène H^\bullet , réducteur fort. Ces espèces radicalaires sont trop instables et sont par conséquent caractérisés par une durée de vie très courte (de l'ordre de 10^{-7} secondes). Ces radicaux libres peuvent réagir entre eux ou avec le dioxygène O_2 en formant de nouvelles espèces extrêmement toxiques pour les cellules et très réactives qui peuvent dénaturer les biomolécules de la cellule. Ces nouvelles espèces sont le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le dihydrogène H_2 et l'ion radicalaire superoxyde O_2^\bullet .

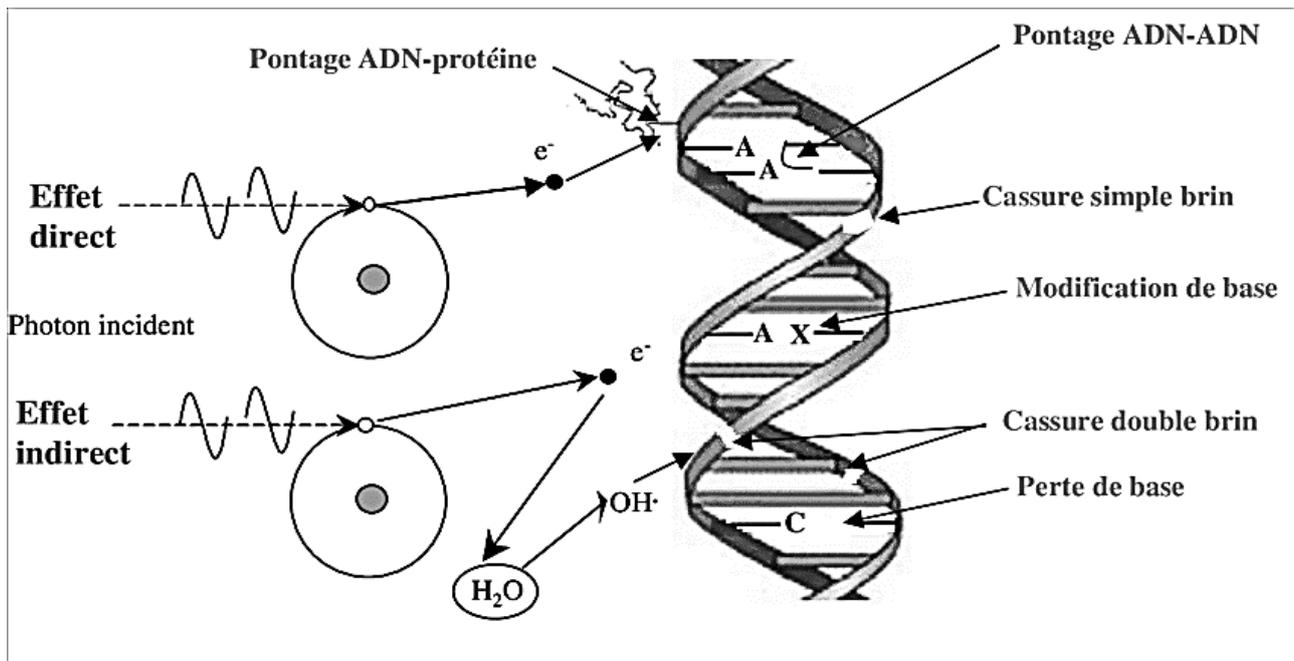


Figure 3-12 : Représentation schématique des deux modes d'action des rayonnements ionisants sur les biomolécules constituant la cellule et les principaux dommages qui en résultent.

- Interaction directe : excitation ou ionisation des biomolécules elles-mêmes. En rompant les liaisons covalentes, l'ionisation et l'excitation des biomolécules peuvent entraîner leur dénaturation. Les biomolécules rendues instables peuvent expulser l'énergie excédentaire en émettant des électrons Auger ou des photons de fluorescence qui peuvent interagir avec les composants biologiques environnants.

Le rayonnement ionisant agit sur tous les constituants cellulaires et les molécules qui les composent (membrane plasmique, cytoplasme, phospholipides, enzymes ...). La dénaturation de ces biomolécules peut conduire à la mort cellulaire. L'ADN (acide désoxyribonucléique) est une macromolécule formée de deux chaînes antiparallèles et complémentaires de nucléotides reliés par des ponts phosphodiester. Les deux chaînes forment une double hélice dont la structure est maintenue par des liaisons hydrogènes. Chaque nucléotide est formé d'une base azotée, d'un sucre (désoxyribose) et d'un groupement phosphate. L'ADN renferme les codes et les informations génétiques nécessaires à la synthèse de protéines, à la fonctionnalité et la survie cellulaire. Une détérioration dans l'ADN, si elle ne peut pas être réparée, peut entraîner la mort de la cellule. Dans le cas de la radiothérapie classique qui utilise les rayons X de haute énergie, les modifications de l'ADN sont causées principalement par interaction indirecte (entre 60 à 70% des lésions).[206] L'effet des électrons de très basse énergie (< 20 eV) sur des molécules d'ADN a été prouvé.[210] Les rayonnements ionisants provoquent différents types de dommages à l'ADN, illustrés dans la Figure 3-12. Le type de lésion, la quantité de lésions, leur concentration et la façon dont elles sont gérées par différents systèmes de réparation sont les facteurs qui déterminent le destin de la cellule (survie ou mort cellulaire). Bien que la plupart des dommages radio-induits soient relativement fréquents (cassures simple brin, perte ou altération des bases), il semble maintenant bien établi que les cassures double brin de l'ADN jouent un rôle prépondérant dans la mortalité radio-induite. [206], [211]

3.1.5.3.3. Processus biochimiques et biologiques

Après une lésion dans l'ADN, la cellule met en œuvre des dispositifs pour essayer de réparer les lésions et maintenir la survie cellulaire. Trois cas se présentent : (i) la lésion est réparée et la cellule poursuit sa survie, (ii) la lésion est mal réparée et la cellule survit mais avec modification dans les informations génétiques et (iii) la lésion ne peut pas être réparée et la cellule meurt. Le but de la radiothérapie consiste à empêcher les cellules souches de se multiplier en causant des lésions non réparables dans l'ADN de ces cellules. [206]

Cependant, les processus physique, physico-chimique et biologique concernent tous les types de cellules qu'elles soient cancéreuses ou saines. Par conséquent, l'efficacité de la radiothérapie dépend de la capacité à établir le meilleur équilibre possible entre :

- le dépôt de la totalité de la dose prescrite dans un volume égal au volume cible de la tumeur afin de la détruire ;
- la préservation des tissus sains environnants pour éviter les effets secondaires [212], [213]

3.1.5.3.4. Agent radiosensibilisant

Chimiquement parlant, les tissus cancéreux et les tissus sains sont très semblables. Ils ne présentent donc pas de différence dans l'absorption des rayonnements ionisants. Une modification chimique du microenvironnement tumoral par ajout d'agents capables d'absorber fortement les rayons X porte la promesse d'une radiothérapie plus efficace car plus sélective. Pour une dose donnée, le rayonnement induira alors une altération de la tumeur tout en préservant les tissus sains environnants. Ces agents chimiques sont nommés agents radiosensibilisants. Ils sont constitués d'éléments lourds à numéro atomique élevé. Comme il possède un grand nombre d'électrons (pour un atome de numéro atomique Z , le nombre d'électrons est égal à Z), ces éléments favorisent l'absorption du rayonnement X.[214] La concentration de ces agents radiosensibilisants dans la tumeur aide à focaliser le dépôt de la dose dans la zone, engendrant la cascade d'effets physique, chimique et biologique qui détruit la zone dans laquelle ils sont accumulés. Depuis les travaux pionniers de Hanifeld, de nombreuses recherches ont été effectuées pour déterminer la nature des composés radiosensibilisants et le type d'irradiation les mieux adaptés.

Aujourd'hui, la gamme d'énergie optimale, qui varie entre quelques dizaines de KeV à quelques centaines de KeV, utilisée pour obtenir un effet radiosensibilisation *in vivo* fait l'objet d'un consensus. L'intérêt d'utiliser des énergies faibles malgré leur moindre pénétration dans les tissus a été montré par plusieurs études.[215]–[217]

Comme ils sont conçus pour absorber les rayons X, les agents de contraste pour l'imagerie X (molécules contenant jusqu'à 6 atomes d'iode) pourraient être les objets de choix pour rehausser localement la dose par effet photoélectrique. En raison d'un numéro atomique relativement élevé, l'iode ($Z=53$) contribue fortement à l'atténuation d'un faisceau de photons X.

Plusieurs auteurs ont démontré des résultats prometteurs de l'impact radiosensibilisant de l'iode sur des cellules, sur des modèles précliniques de cancers animaux, et éventuellement sur des personnes, en utilisant

des rayons X provenant d'un scanner à rayons X personnalisé (20-110 keV, 120-140 kVp).[215], [218]–[220] Les molécules d'iode utilisées ne sont toutefois pas absorbées par les cellules et restent donc en dehors du noyau cellulaire et de ce fait éloignées de la molécule d'ADN qu'il contient. Les molécules d'iode devraient être incorporées dans le noyau cellulaire pour maximiser l'émission d'électrons Auger, qui se déplacent entre quelques nanomètres et quelques dizaines de nanomètres en fonction de leur énergie.[221]

Le platine semble être une option particulièrement attrayante car il possède un numéro atomique Z élevé ($Z=78$). Il présente l'avantage d'être utilisé sous forme de sels dans le cadre de chimiothérapie anticancéreuse. Le cis-platine est le composé à base de platine le plus couramment utilisée en chimiothérapie. Ce dernier peut atteindre le noyau des cellules à croissance rapide (cellules tumorales) et créer des adduits de platine sur les bases puriques de l'ADN. Ces adduits entravent la réparation de l'ADN (notamment les dommages induits par les radiations) et peuvent entraîner la mort cellulaire.[222] La création d'adduits intra ou inter-brins permet aux sels de platine utilisés en chimiothérapie de se concentrer près de la cible principale, la molécule d'ADN. Biston *et al.* [223] ont tiré parti de la proximité du platine avec l'ADN en photoactivant le cis-platine contenu dans l'ADN de cellules gliales radiorésistantes (lignée F98). L'irradiation des cellules par un rayonnement synchrotron monochromatique à une énergie de 400 eV supérieure au seuil K du platine ($E_K = 78,4$ keV) a entraîné un plus grand nombre de cassures double brin de l'ADN et une réparation plus lente que l'irradiation à une énergie de 400 eV inférieure au seuil K du platine. Cette découverte implique que les effets du dépôt de la dose à proximité de l'ADN sont amplifiés, notamment par l'émission de photoélectrons et d'électrons Auger. Néanmoins, l'irradiation de rats porteurs d'un gliome F98 après injection intratumorale de cis-platine a entraîné une augmentation comparable du temps de survie pour ces deux énergies (34% de survie à un an), soulignant les difficultés de transposer *in vivo* les résultats *in vitro*. [223]

Cependant, la question de savoir quel élément utiliser reste sans réponse. Bien qu'ils soient régulièrement utilisés dans les examens radiologiques, les agents de contraste iodés ne semblent pas être appropriés. En réalité, leur biodistribution extracellulaire et leur élimination rapide de l'organisme après injection intraveineuse entraînent une période de résidence à l'intérieur des régions tumorales qui est souvent trop brève pour permettre une accumulation significative à des fins thérapeutiques. Leur injection intratumorale semble quelque peu difficile à réaliser en clinique, notamment dans le cas de tumeurs présentes au sein d'organes extrêmement sensibles comme le cerveau. Les complexes de platine, qui s'accumulent dans l'ADN des cellules tumorales, pourraient constituer une option intéressante, à condition que ces sels toxiques ne s'accumulent pas dans des tissus sains. D'autre part, la forte concentration nécessaire pour obtenir un effet radiosensibilisant exposerait inévitablement les patients à plusieurs effets indésirables bien connus des chimiothérapies.[224] Le recours à des composés radiosensibilisants constitués d'éléments non toxiques en l'absence de photoactivation semble plus approprié.

L'or est un élément prometteur pour être utilisé comme agent radiosensibilisant. A l'échelle macroscopique, l'or est un métal biologiquement inerte. Son numéro atomique plus élevé ($Z_{Au} = 79$) et sa densité ($d_{Au} = 19,3$) permettent d'augmenter le dépôt de dose dans une tumeur en absorbant les rayons X. Herold *et al.* ont montré *in vitro* la capacité des microparticules d'or (1,5-3,0 μm de diamètre) à générer un impact radiosensibilisant

sur les cellules tumorales résistantes aux radiations (EMT-6) sous rayonnement X et γ . [225] Ces microparticules, lorsqu'elles sont injectées par voie intratumorale, provoquent un effet radiosensibilisant sur les cellules tumorales sous irradiation X, mais uniquement au niveau des sites d'injection, et non sur l'ensemble de la tumeur car leur énorme taille à l'échelle des cellules empêche leur diffusion dans les tissus. De plus, en raison de leur taille micrométrique, ces particules ne peuvent pas être injectées par voie intraveineuse, qui est pourtant la méthode privilégiée pour accéder aux tumeurs profondes. Toutefois, ces résultats sont encourageants car ils suggèrent que l'utilisation d'une structure composée d'or pourrait être envisagée si la taille est suffisamment petite pour permettre leur circulation dans les fluides et tissus biologiques. Plusieurs publications ont ainsi prouvé que l'utilisation de nanoparticules d'or radiosensibilisantes permet d'améliorer considérablement l'efficacité des traitements par radiothérapie en exploitant le rehaussement de l'effet de dose provoqué par l'absorption des rayons X par les nanoparticules d'or qui dans la plupart des cas se sont accumulées dans l'environnement tumoral grâce à l'effet EPR. [9]

3.2. Athérosclérose

3.2.1. Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont parmi les premières causes de mortalité dans le monde [226] et font environ 17,9 millions de morts chaque année soit 30% de la mortalité dans le monde selon l'organisation mondiale de la santé (OMS). Les maladies cardiovasculaires (MVC) composent l'ensemble des troubles du cœur, des vaisseaux sanguins et du cerveau. Elles sont le résultat d'une ischémie qui correspond à un manque d'apport d'oxygène et de nutriments à l'organe desservi par l'artère obstruée. L'ischémie peut endommager n'importe quel organe, mais les trois principales cibles sont les suivantes :

- L'obstruction des artères coronaires peut endommager le **muscle cardiaque (myocarde)**. La maladie des artères coronaires, souvent appelée ischémie myocardique, est le symptôme le plus fréquent. L'angine de poitrine est un symptôme de l'athérosclérose coronaire. Elle provoque une réduction transitoire du flux sanguin vers le myocarde, qui survient généralement lors d'un effort physique mais peut parfois survenir spontanément. Elle peut également provoquer un accident aigu, c'est-à-dire qu'une partie du myocarde est soudainement privée de tout débit sanguin, ce qui entraîne un infarctus du myocarde (mort ou nécrose musculaire) ou, dans de rares cas une mort rapide ;
- L'obstruction des artères cérébrales provoque des dommages au **cerveau**. Par suite de l'obstruction des artères carotides ou vertébrales dans le cou, et de leurs branches dans le crâne, l'ischémie cérébrales se manifeste par des attaques (accidents vasculaire cérébral, AVC), typiquement la paralysie d'une moitié du corps, qui peut être durable ou temporaire. Un « accident vasculaire cérébral » est un terme utilisé pour décrire une obstruction des artères cérébrales ;
- L'ischémie des membres inférieurs entraîne une gêne musculaire à la marche et peut conduire à une gangrène du pied si elle est sévère.

L'athérosclérose qui se caractérise par la formation de plaques dans les artères moyennes et larges est la cause principale et commune de ces maladies cardiovasculaires.

3.2.2. Définition de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie immuno-inflammatoire chronique des artères. Elle est liée à un mode de vie défini par l'inactivité et une alimentation riche en graisses. Il s'agit d'une maladie à évolution lente, généralement asymptomatique, qui touche surtout les artères moyennes et grosses. Il ne s'agit toutefois pas d'une maladie nouvelle. En effet, des enquêtes menées par Reuffer en 1911 et Randall Thompson en 2013 ont révélé l'existence de lésions d'athérosclérose sur des momies égyptiennes datant de plus de 3 000 ans.[227] L'OMS a défini pour la première fois en 1954 l'athérosclérose comme une « association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang, et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la média ».[228]



Figure 3-13 : Représentation des plaques d'athérosclérose [229]

3.2.3. Anatomie

L'intima, la média et l'adventice sont les trois couches qui constituent la paroi du vaisseau, de la couche la plus interne à la couche la plus externe (Figure 3-14). Des membranes élastiques divisent chacune de ces tuniques : une restriction élastique interne sépare l'intima de la media, tandis qu'une restriction élastique externe plus faible sépare la media de l'adventice. La couche la plus interne, l'intima, est en contact étroit avec la circulation sanguine. L'endothélium est formé par les cellules endothéliales qui tapissent cette couche. Cette dernière est engagée dans diverses activités, notamment la régulation de l'hémostase et l'inflammation. La couche moyenne (média) est la plus épaisse des trois. Des membranes limitantes élastiques internes et externes la confinent des deux côtés. Des cellules musculaires lisses avec un réseau de collagène, d'élastine et de mucopolysaccharides composent cette structure. Selon que les fibres élastiques ou les cellules musculaires prédominent, on distingue les artères élastiques, qui sont de gros vaisseaux proximaux, des artères musculaires, qui sont de minuscules artères périphériques à forte vasomotricité. L'adventice

représente la couche externe, qui est constituée d'un enchevêtrement de tissus conjonctifs. On y trouve également des fibroblastes et de solides fibres élastiques.

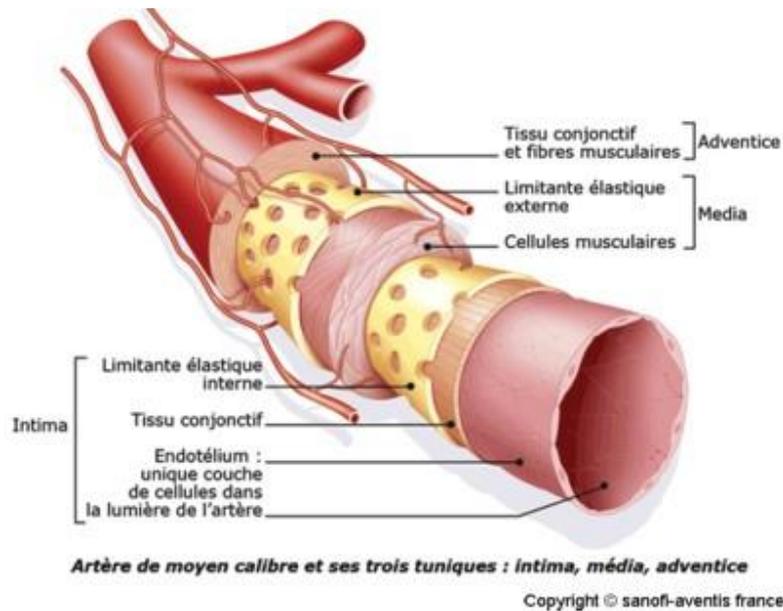


Figure 3-14 : Structures d'une artère saine [230]

L'intima des artères de gros et moyen calibre est affectée par l'athérosclérose. Pour cela, il est crucial de connaître les phases de la maladie afin de comprendre et d'expliquer les mécanismes qui contribuent à la création de la plaque d'athérome et les événements cliniques qui s'ensuivent. La classification internationale de Stary a fourni la première catégorisation anatomo-pathologique approfondie des phases du développement de l'athérosclérose dans le cadre du « Committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis » en 1992. L'« American Heart Association » (AHA) l'a approuvé en 1994 (Tableau 3-2).[231], [232] Les six phases de cette catégorisation sont basées sur l'observation d'un grand nombre d'artères d'enfants et de jeunes gens. On distingue les lésions cliniquement silencieuses précoces, qui correspondent aux stades de type I à III et se développent à bas bruit. L'épaississement de l'intima entraîne une réduction de la lumière artérielle dans les lésions avancées, qui correspondent aux stades IV à VI. Il existe alors des complications supplémentaires, telles que l'ulcération, l'hémorragie intraplaque ou le développement d'un thrombus, qui peuvent accélérer l'évolution de la maladie.

Type	Progression	Mécanisme principale	Âge d'apparition	Observation
Type I : Lésion initiale, macrophages isolés, spumeux		Croissance principalement par accumulation de lipides	< 10 ans	Asymptomatique
Type II : Strie lipidiques				
Type III : Lésion intermédiaire				
Type IV : Lésion athéromateuse, formation d'un centre lipidique sans fibrose		Augmentation du collagène et des cellules musculaires lisses	Dès 30 ans	Asymptomatique ou symptomatique
Type V : Lésion fibro-athéromateuse. Avec ou sans circulation				
Type VI : Lésion compliquée		Thrombose Hématome	Dès 40 ans	

Tableau 3-2 : Classification de Stary

Chaque phase présente ses propres caractéristiques :

- **Lésions de type I ou lésions initiales** : il s'agit de lésions de petite taille et ne sont pas visibles à l'œil nu (microscopiques). Elles sont surtout visibles chez les enfants et adolescents, mais elles peuvent également être détectées chez les adultes présentant une résistance à l'athérosclérose. Elles se distinguent par la présence de cellules spumeuses macrophagiques infiltrant l'intima. Ces macrophages spumeux isolés sont rares et ne peuvent être découverts qu'en examinant l'artère au microscope. La concentration de cellules macrophagiques dans l'intima va entraîner une augmentation significative de l'adhérence des monocytes à l'endothélium, accélérant le développement de ces lésions au stade II ;
- **Lésions de type II ou stries lipidiques** : il s'agit de lésions visibles à l'œil nu. Elle apparaît dès l'âge de 10-15 ans. Elles se caractérisent par une accumulation des macrophages en petits amas dans le sous-endothélium de l'intima : les stries lipidiques. Il existe deux variétés distinctes de lésion de type II. Les lésions de type IIa donnent naissance à la lésion de type III à cause de la présence de plusieurs couches superposées de cellules musculaire lisses. Les lésions de type IIb, les plus répandues, ne

progressent pas ou progressent seulement chez des sujets avec des concentrations plasmatiques très élevées de lipoprotéines athérogènes ;

- **Lésions de type III ou préathéromateuse** : c'est une phase intermédiaire entre lésions de type II et type IV. Elles sont présentes chez l'homme entre 10 et 20 ans. Elles sont semblables aux lésions de type II mais avec la présence de plusieurs couches superposées de cellules musculaires lisses et plus nombreuses et plus localisées. Le noyau lipidique n'est pas encore formé ;
- **Lésions de type IV ou athéromateuses** : elles apparaissent chez l'homme de 20 à 30 ans. Dans ce stade, le noyau lipidique est formé dû à l'accumulation de lipides extracellulaires beaucoup plus importante. Elles sont également riches en cristaux de cholestérol mais pauvres en cellules et dépourvues d'une réelle chape fibreuse. Ces lésions peuvent s'évoluer vers la plaque fibreuse (type V) ou la plaque rompue (type VI) ;
- **Lésions de type V ou fibroathéromateuses** : ce type de lésions typiques de l'athérosclérose correspond à la définition de l'OMS. Elles se développent avec l'âge et apparaissent vers 40 ans. Elles correspondent à la production de tissus fibreux dans l'intima qui sont riches en collagène et en cellules musculaires lisses. La chape fibreuse entoure le noyau lipidique. La lésion de type Va correspond à une chape fibreuse qui recouvre plusieurs noyaux lipidiques. La lésion de type Vb correspond à une chape fibreuse toujours présente. La lésion de type Vc est essentiellement fibreuse. Cette lésion est dominée par une réponse fibrotique impliquant les cellules musculaires lisses et la matrice extracellulaire, le noyau nécrotique, les cellules inflammatoires et les lipides disparaissant. Ces lésions de type V provoquent souvent une sténose artérielle, avec peu de ramifications pour les vaisseaux comme l'aorte mais présentent le potentiel de provoquer une sténose sévère dans les artères coronaires ou les carotides.
- **Lésions de type VI ou lésions compliquées** : l'apparition d'une plaque complexe est une étape critique dans la progression de l'athérosclérose puisqu'elle est responsable de la grande majorité des événements aigus. Elle apparaît généralement après 40 ans. Ces lésions apparaissent après les lésions de type IV ou V et peuvent avoir des caractéristiques variées. La présence de fissures à la surface de la lésion distingue les lésions de type VIa. Les lésions plus compliquées peuvent se limiter à une simple perte de la couche d'endothélium. Les fissures peuvent également être superficielles, comme les lésions d'érosion de plaque récemment identifiées, caractérisées par une perte de matériau de surface.[233], [234] Cependant, la rupture peut être plus profonde, atteignant le noyau nécrotique et permettant la décharge de gouttelettes lipidiques dans le sang circulant, transportant toute la plaque et, dans de rares cas, perforant le média pour provoquer de faux anévrysmes. Le développement d'hémorragies ou d'hématomes intraplaques caractérise les lésions de type VIb. Ces hémorragies sont principalement dues à la rupture de nouveaux vaisseaux en raison de limitations hémodynamiques. Le développement d'une thrombose est une caractéristique des lésions de type VIc. Le processus thrombotique commence par l'adhésion et l'agrégation des plaquettes sanguines et le développement d'un thrombus pariétal lorsque le sang circulant entre en contact avec le sous-endothélium et le contenu du noyau nécrotique. Si une thrombose se développe dans une artère de taille moyenne, elle peut

devenir rapidement occlusive. Cela est exceptionnel dans les grosses artères. Dans le cas contraire, l'incorporation dans la plaque d'athérosclérose du thrombus qui suit la rupture de la plaque va conduire à la diminution de la lumière artérielle et à l'évolution de la plaque.

3.2.4. Mécanisme de formation, de progression et de rupture des plaques d'athérosclérose

Les mécanismes qui expliquent le développement des plaques d'athérome sont complexes et ne sont pas complètement élucidés. Cependant, les recherches sur la pathologie d'une part, et les études définissant les types de cellules qui composent les plaques d'autre part, permettent de définir les nombreuses étapes menant à la maladie (Figure 3-15). Le transport des particules LDL (Low Density Lipoprotein) riches en cholestérol à travers l'endothélium et leur accumulation au niveau sous-endothélial constituent les débuts de l'athérosclérose.[235] Les LDL sont oxydées une fois qu'elles passent dans la circulation sanguine. Dans la création et la croissance de la plaque, cette transition est critique. En raison de cette oxydation, les LDL-ox perdent leur capacité à se connecter à leur récepteurs (qui constituent le principal mécanisme de purification des LDL). Ces LDL-ox vont non-seulement s'accumuler au niveau des lésions athéromateuses, formant des « stries lipidiques », mais elles vont également déclencher une inflammation en provoquant la production par les cellules endothéliales de facteurs d'adhésion, permettant aux monocytes et aux lymphocytes circulants d'être attirés et de traverser le sous-endothélium.[236]

Une fois retenues dans l'intima, les LDL-ox vont produire des facteurs d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et MCP-1) qui vont attirer les monocytes circulant à la surface de l'endothélium.[237] Les monocytes qui circulent vont alors se fixer à la surface de l'endothélium, le parcourir plusieurs fois et se transformer en macrophages. Les macrophages deviennent des « cellules spumeuses » lorsqu'ils captent les LDL oxydées grâce à des récepteurs (SR-AI, CD-36 et CD-68). Ces cellules spumeuses sont responsables du développement du noyau lipidique de la lésion et vont également entretenir la réponse inflammatoire. Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β (interleukine 1- β), le TNF- α (tumor-necrosis factor- α), l'IL-8, l'IL-12 et l'IFN- γ (Interféron gamma) sont sécrétées par les macrophages et les lymphocytes infiltrant la paroi artérielle par une action paracrine. La libération de ces molécules accroît l'impact des LDL-ox dans les cellules endothéliales, augmentant la production de VCAM-1 et de MCP-1. De plus, en stimulant le MCP-1, ces cytokines favorisent la migration des leucocytes vers le site inflammatoire, perpétuant l'inflammation et maintenant le processus athérogène. Les lésions athéromateuses peuvent potentiellement être déstabilisées par les cytokines pro-inflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires influencent en effet l'activité des cellules musculaires lisses (CML). L'IFN- γ inhibe la synthèse du collagène de type I et III par les CML,[238] tandis que l'IL-1 β et le TNF- α stimulent la libération de métalloprotéinases (MMP-2 et MMP-9), qui dégradent la matrice extracellulaire (MEC) et fragilisent la plaque.

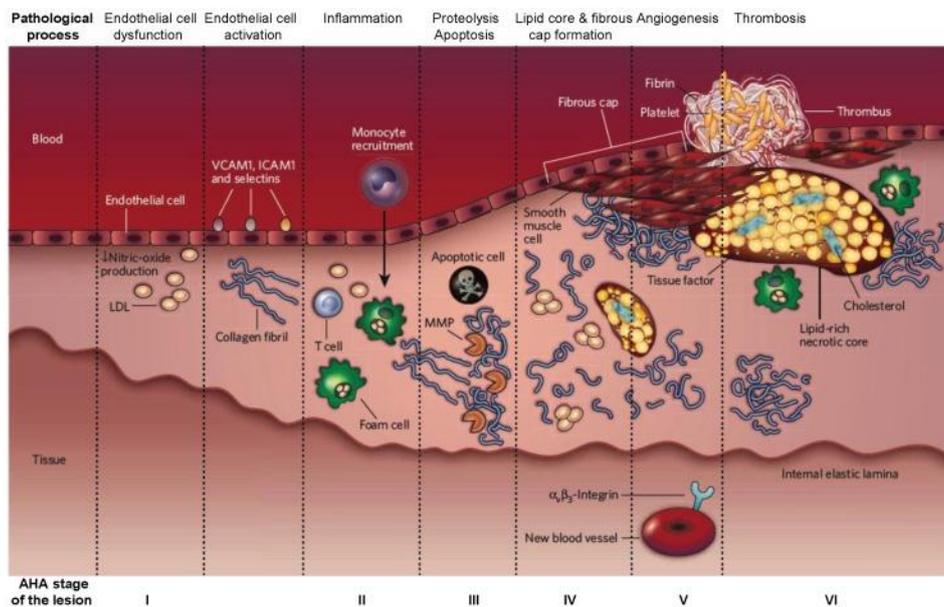


Figure 3-15 : Mécanismes moléculaire et cellulaire de l'initiation et la progression de la plaque d'athérosclérose[239]

L'augmentation considérable de la quantité de plaques d'athérome est caractéristique de la progression lente de la maladie qui peut durer plusieurs années. Le volume de la plaque augmente régulièrement en raison de l'accumulation de lipides et d'autres composants cellulaires et moléculaires qui la constituent. Cette progression s'accompagne d'un remodelage artériel, initialement excentrique, qui peut compenser la perte de diamètre de la lumière du vaisseau en augmentant le diamètre global de l'artère jusqu'à atteindre un nouveau stade de la maladie. On parle alors de remodelage compensatoire. La réduction du diamètre vasculaire associée au développement de la plaque aggravera à long terme le degré de sténose vasculaire. D'autres processus, comme la minéralisation de la plaque, se produisent pendant la formation des plaques. Comme cela a été montré dans d'autres contextes pathologiques tels que la tuberculose, la sclérodermie et certaines tumeurs malignes, l'environnement inflammatoire favorise la minéralisation. L'accumulation de cristaux d'hydroxyapatite dans la plaque d'athérome et le développement de calcifications vasculaires sont les résultats du processus de minéralisation vasculaire. L'existence de calcifications artérielles, qu'elles correspondent ou non à une tentative de stabilisation de la plaque athéromateuse, est toujours considérée comme une dysfonction endothéliale, qui est liée à un risque cardiovasculaire élevé.[240]

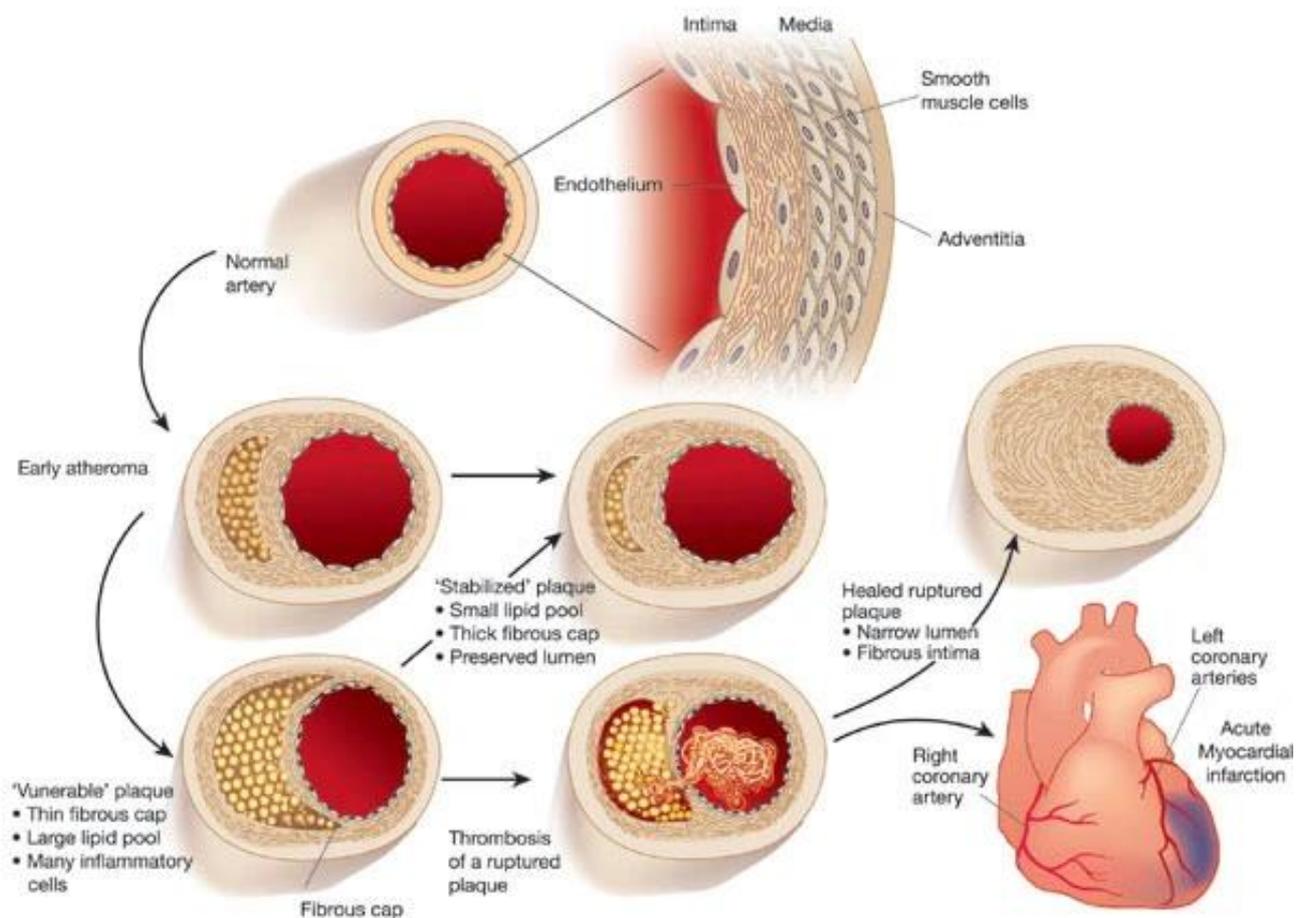


Figure 3-16 : Développement d'athérosclérose et caractérisation d'une plaque stable et d'une plaque instable [237]

En réalité, les segments athéromateux peuvent ne pas évoluer vers une sténose dans certains cas, mais dans des circonstances spécifiques et en fonction de leur localisation, les lésions athéromateuses peuvent rompre, entraînant des conséquences importantes.[241] Bien que les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la formation des anévrismes soient inconnus, on sait que celle-ci nécessite la dégradation et le désordre du tissu fibreux, notamment des composants structurels de la matrice extracellulaire et des fibres d'élastine. Les MMP (métalloprotéases matricielles, en anglais MMP : matrix metalloproteinase) à forte activité protéolytique peuvent détruire ces complexes très résistants et la rupture se produit au niveau de la chape fibreuse, mettant en contact le sang avec les composants thrombogènes du centre lipidique. La conséquence en est une thrombose (implication des plaquettes puis du système de coagulation). La rupture de plaque est le facteur le plus connu qui peut provoquer des accidents graves.

Il existe plusieurs facteurs qui peuvent provoquer cette rupture de plaque. Les stimuli extrinsèques, tels que les poussées hypertensives, le stress ou l'exercice physique intense, peuvent provoquer une rupture de la plaque. Ils augmentent les pressions exercées sur la plaque d'athérome, ce qui peut entraîner des accidents. Les facteurs les plus pertinents sont intrinsèques. Ils dépendent de la construction de la plaque. Le mélange relatif de lipides, de tissu fibreux et de cellules inflammatoires dans une plaque d'athérome est une indication de sa susceptibilité d'un point de vue structurel.[242] Selon des recherches cliniques récentes, les lésions sensibles comprennent un gros noyau lipidique représentant 30 à 40% de la plaque totale, une fine couche

fibreuse à faible teneur en CML et une concentration importante de cellules inflammatoires.[242] Les lésions vulnérables sont caractérisées par une fine chape fibreuse.[243] De plus, la concentration de macrophages et de lymphocytes T activés provoque une inflammation locale, qui contribue à l'instabilité des lésions. Les MMP (métalloprotéases matricielles) sont sécrétées par les macrophages actifs.[244] L'IFN- γ réduit également la résistance de la paroi fibreuse et favorise la rupture des plaques en inhibant la production de collagène dans les CML.[245] L'impact néfaste de l'inflammation dans la sensibilité des lésions a été confirmé par la présence des cellules inflammatoires symptomatiques en plus grand nombre que chez les individus asymptomatiques.[246] Des recherches récentes suggèrent que l'inflammation systémique joue un rôle clé dans l'instabilité des lésions athéromateuses et constitue un facteur de risque important d'épisodes ischémiques.[247], [248] Un minuscule noyau lipidique est généralement séparé de la lumière de l'artère par une paroi fibreuse épaisse dans les plaques les moins sensibles, c'est-à-dire celles dont la probabilité d'évoluer vers une attaque aiguë est minimale. Les lésions dites "stables" ne sont pas non plus particulièrement inflammatoires.[242], [246]

3.2.5. Facteur de risque de l'athérosclérose

Comme toutes les maladies, plusieurs facteurs peuvent déclencher la formation de plaque d'athérosclérose. Ces facteurs sont répartis en deux catégories, la première est liée au mode de vie et la deuxième catégorie est intrinsèque.

- **Mode de vie** [249]
 - o Alcool : la consommation d'alcool augmente la pression artérielle et la présence de triglycérides ;[250], [251]
 - o Tabagisme : est un facteur essentiel. D'après l'OMS la cigarette est responsable de 10% de décès et le deuxième facteur de risque cardiovasculaire. Il accentue l'inflammation et favorise l'athérosclérose.[252] Il augmente le taux de triglycérides, des LDL et diminue les HDL (High Density Lipoprotein) dans le sang. Les glycoprotéines libérées par la combustion du tabac et les hydrocarbures sont responsables d'une agression cellulaire endothéliale. [250], [251]
 - o Régime alimentaire : la consommation de matière grasse et l'absence de fruit et de légume augmentent dans le sang les molécules (lipides ...) qui favorisent la formation des plaques ;
 - o Inactivité physique : l'OMS a classé l'inactivité physique comme facteur de risque cardiovasculaire. Lorsqu'une personne adulte consacre moins de 30 minutes à une activité physique modérée 5 fois par semaine ou moins de 20 minutes à une activité intensive 3 fois par semaine, elle est selon l'OMS dans une situation d'inactivité physique. L'activité physique affecte directement le métabolisme des glucides et des lipides. Le sujet physiquement inactif présente deux fois plus de risque de développer des maladies cardiovasculaires par rapport au sujet actif. Donc l'activité physique diminue l'inflammation, la progression de l'athérosclérose et le développement des lésions vulnérables ;

- **Facteurs de risque intrinsèque** [249]

- Les dyslipidémies : le développement de l'athérosclérose et les accidents cardiovasculaires sont en grande partie causés par des anomalies du métabolisme lipidique. Un taux de cholestérol plasmatique élevé représente un risque majeur pour les accidents cardiovasculaires ;[253]
- L'obésité : Le risque de maladies coronariennes augmente avec l'indice de masse corporelle (IMC) ;[254]
- Le diabète : le risque d'accidents cardiovasculaires est deux à trois fois plus important chez les personnes diabétiques. L'hyperglycémie est responsable d'une athérosclérose accélérée, elle augmente le stress oxydatif, l'agrégation plaquettaire et favorise la thrombose ; [250], [251]
- Sexe [255] : Le nombre de crises cardiaques au-delà de 40 ans diffère considérablement entre les hommes et les femmes. Cela est dû principalement à des anomalies hormonales (la testostérone peut induire la formation de plaques, tandis que les œstrogènes l'inhibent).[232], [256]
- Âge : Les maladies coronariennes deviennent plus fréquentes à mesure que les gens vieillissent. Le système de régulation étant moins efficace, l'exposition aux facteurs de risque est plus importante, et le risque d'endommager l'endothélium est plus élevé à un âge donné.
- Génétique : Les gènes qui jouent un rôle dans la formation de l'athérosclérose sont encore à l'étude et ne sont pas complètement identifiés.
- Hypertension artérielle (HTA) : elle est établie lorsqu'une tension artérielle systolique (SBP) est supérieure ou égale à 140 mmHg et/ou une tension artérielle diastolique (DBP) est supérieure ou égale à 90 mmHg. Quand la pression augmente, elle stimule les molécules pro-inflammatoires et augmente le stress oxydant favorisant une augmentation des lésions ;

3.2.6. Diagnostics des plaques

Le diagnostic et l'évaluation de la progression de l'athérosclérose en clinique humaine peuvent être réalisés par différentes modalités d'imagerie, comme l'IRM. Pour détecter et étudier ces plaques instables, de nouvelles technologies sont en cours de développement comme l'angioscopie, l'échographie endocoronaire ou l'imagerie ultrasonore intravasculaire (IVUS), la tomographie par cohérence optique...

L'IRM permet de visualiser, d'analyser la composition des plaques et l'évaluation de différents constituants de la plaque.[257]–[259] Elle est utilisée chez l'homme pour évaluer la taille de la plaque (épaisseur, volume...). L'imagerie des lipides par l'examen du signal des protons des acides gras en contraste T_1 et l'imagerie de l'eau en contraste T_2 sont les deux modes d'imagerie envisageables. La combinaison des séquences de contraste T_2 et T_1 , des séquences de déplacement chimique, de diffusion et de transfert de magnétisation permet de déterminer la composition des plaques. Cependant, la taille de la sonde et l'apparition d'artéfacts liés aux mouvements cardiaques et au flux sanguin en limitent l'utilisation *in vivo*. Il convient toutefois de souligner que la réponse peut venir de l'administration d'agents de contraste

superparamagnétiques tels que les USPIOs (ultrasmall supermagnetic iron oxide nanoparticles) phagocytés, qui permettent un examen non seulement morphologique mais aussi fonctionnel des plaques.[260]–[265]

L'injection d'un traceur radiomarqué permet d'envisager une imagerie nucléaire par détection externe de la radioactivité. En raison du volume limité des plaques et de la liaison non spécifique des traceurs, la détection externe reste un défi. Malgré ces inconvénients, la PET reste la méthode privilégiée pour évaluer l'athérosclérose en raison de la variété des produits radiopharmaceutiques disponibles et de leur spécificité pour les événements qui se produisent pendant la formation et la progression de la plaque.

3.2.7. Traitement des plaques

Les plaques sont traitées en appliquant différentes méthodes. L'une d'elles consiste à prévenir la formation des plaques d'athérosclérose. Pour cela une adaptation vers un mode de vie saine avec un régime alimentaire approprié, une diminution de la consommation de tabac et d'alcool ou même l'arrêt de ces consommations est vivement conseillée pour prévenir et réduire le risque de formation des plaques d'athérosclérose. Une autre méthode pour traiter l'athérosclérose repose sur l'utilisation des médicaments de la famille statines. Ces médicaments sont prescrits dans le but de diminuer la concentration en cholestérol dans le sang, en particulier celle du LDL. [266]

3.3. Bilan

Les conséquences du cancer et de l'athérosclérose sur les patients et sur la société sont si importantes qu'il est nécessaire de développer des agents théranostiques pour le diagnostic médical et la thérapie suivie par imagerie qui permettraient d'intervenir suffisamment précocement et avec une plus grande efficacité. Dans ce contexte, les recherches menées en nanomédecine sont porteuses d'espoir car les nanoparticules multifonctionnelles rassemblent des atouts qui leur donnent un avantage significatif sur les molécules. En particulier, les nanoparticules se distinguent par une biodistribution et une pharmacocinétique plus adaptées que celles des molécules, par leur propriétés originales et par la possibilité de combiner plus facilement des propriétés complémentaires que ce qui peut être fait avec les molécules.

4. Nanoparticules inorganiques dans le domaine médical

4.1. Introduction

Les nanoparticules sont des assemblages de quelques dizaines à des milliers d'atomes de dimension inférieure à 100 nm. Elles présentent des propriétés différentes de celles observées à l'échelle macroscopique pour des matériaux de même composition. Elles se distinguent par des comportements mécaniques, thermiques, électriques, optiques et magnétiques uniques. Leur taille réduite les rend très attrayante pour des utilisations dans le domaine biomédical. Elle leur permet de circuler librement dans le corps.

4.2. Intérêt des nanoparticules pour les applications médicales

Face aux lourdes conséquences de certaines maladies graves (souffrance, invalidité, mortalité), le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques répond à un besoin réel et urgent. L'intense activité de recherche consacrée aux nanosciences et nanotechnologies a conduit à la mise au point de nanoparticules multifonctionnelles pour l'imagerie médicale, la thérapie ciblée et la thérapie guidée par imagerie. Comme les nanoparticules organiques, les nanoparticules inorganiques peuvent être conçues comme systèmes de système de délivrance de principes actifs (DDS). Une telle utilisation des nanoparticules inorganiques pourrait aider les principes actifs moléculaires actuellement disponibles à surmonter leurs problèmes de solubilité et de stabilité chimique. Une faible solubilité dans l'eau réduit la biodisponibilité d'un composé et peut entraver l'effet du principe actif.[267] L'incorporation des principes actifs dans une nanostructure fonctionnalisée constitue une solution efficace pour garantir la stabilité colloïdale dans les fluides biologiques. Deuxièmement, cette incorporation dans les nanoparticules assure une protection des principes actifs vis-à-vis de la biodégradation ou de l'excrétion. Les principes actifs qui sont clivés par des enzymes peuvent ainsi être protégés contre la dégradation enzymatique. Ce défi pourrait être relevé en encapsulant les principes actifs dans des nanotransporteurs (nanoparticules poreuses, nanoparticules creuses...). Troisièmement, les nanostructures inorganiques peuvent contribuer à une meilleure distribution et un meilleur ciblage des principes actifs. La pénétration des médicaments dans les tissus limite la distribution des principes actifs, qui est définie par leurs propriétés physico-chimiques.[268], [269] Toutes les nanoparticules n'ont pas la même capacité de pénétration.[270] Enfin, les nanoparticules peuvent être conçues pour libérer leur charge utile en réponse à un stimulus.[271]

Cependant contrairement à la plupart des nanoparticules organiques, les nanoparticules inorganiques ne se limitent pas à un rôle de transporteurs de principes actifs. Leur composition et leur forme leur confèrent des propriétés qui peuvent être exploitées pour l'imagerie et/ou la thérapie commandée à distance.

L'attrait des nanoparticules pour des applications médicales réside en partie dans leur taille qui peut être adaptée par les conditions de synthèse aux tissus visés. Les caractéristiques physiopathologiques de quelques maladies, ainsi que leur environnement, comme l'effet EPR dans le cas du cancer, ont été utilisées pour l'accumulation des nanoparticules. Contrairement aux molécules, la taille des nanoparticules peut être modulée pour être suffisamment large et empêcher la diffusion des nanoparticules dans les tissus sains et être suffisamment petite pour favoriser l'accumulation dans les tissus à traiter. [272], [273] Cette possibilité de contrôler la taille garantit aux nanoparticules une biodistribution et une pharmacocinétique adaptées contrairement aux molécules qui sont connues pour leur diffusion indésirable dans les tissus sains, leur faible accumulation dans les zones d'intérêt et leur trop rapide excrétion de l'organisme.

La deuxième caractéristique intéressante des nanoparticules est reflétée par la possibilité d'assembler différentes composantes au sein d'une même structure malgré la taille extrêmement réduite de l'objet final. C'est un des principaux atouts des nanoparticules qui les distingue avantageusement des molécules. Il est alors possible de réunir un grand nombre de propriétés complémentaires au sein d'une même nanoparticule dans laquelle peuvent être combinées différentes modalités d'imagerie et/ou activités thérapeutiques

« télécommandées ». Plusieurs exemples tirés de la littérature montrent l'intérêt des nanoparticules multifonctionnelles pour des applications médicales et en particulier pour la thérapie guidée par l'imagerie.[274]–[279] De plus une nanoparticule peut renfermer un grand nombre de molécules actives par rapport à une molécule (de quelques dizaines à quelques milliers) ce qui signifie qu'une seule nanoparticule est plus active qu'une seule molécule.

La troisième caractéristique importante se trouve dans la facilité à manipuler chimiquement la surface des nanoparticules afin d'introduire de nouvelles fonctions. Lorsque ces modifications chimiques sont effectuées après la synthèse des nanoparticules, on parle de post-fonctionnalisation. Cette dernière permet d'exercer subtilement une influence sur la biodistribution et la pharmacocinétique des nanoparticules dans l'organisme en changeant la charge de surface et la balance hydrophile/hydrophobe pharmacocinétique en modifiant par exemple la phase organique présente à la surface. Par la post-fonctionnalisation, la gamme d'applications médicales d'une famille de nanoparticules peut être élargie. Par exemple, l'immobilisation de chélates de gadolinium sur des nanoparticules leur confère un comportement d'agent de contraste pour l'IRM.

La post-fonctionnalisation donne la possibilité d'améliorer l'accumulation et le temps de résidence des nanoparticules dans les tissus à traiter et/ou imager. Certaines pathologies, comme le cancer, sont caractérisées par une surexpression des récepteurs membranaires qui peuvent servir à cibler préférentiellement les cellules cancéreuses. Le greffage de molécules de reconnaissance (ligands, groupes de ciblage) à la surface des nanoparticules devrait conduire à une meilleure rétention des nanoparticules dans les tumeurs solides en raison de l'interaction établie entre le récepteur et la molécule de reconnaissance portée par les nanoparticules. Ce type de ciblage, nommé dans la littérature « ciblage actif », ne s'oppose pas au ciblage passif qui repose sur la perméabilité des vaisseaux qui irriguent les tumeurs (effet EPR) (Figure 4-1). Le ciblage actif bénéficie également de l'effet EPR mais à la différence du ciblage passif il conduit à une accumulation plus durable des nanoparticules grâce à l'interaction entre les molécules de reconnaissance présentes sur les nanoparticules et les récepteurs surexprimés des cellules cancéreuses. De petits composés comme l'acide folique et les glucides, ainsi que des macromolécules comme les peptides, les protéines, les anticorps ont été utilisés pour le ciblage actif des nanoparticules.

Cependant le ciblage, actif ou passif, suppose une circulation suffisamment longue des nanoparticules après injection intraveineuse des nanoparticules. Or il existe de multiples obstacles pour une circulation longue des nanoparticules, comme une élimination rénale trop rapide ou l'occurrence du phénomène d'opsonisation.[280] Comme indiqué précédemment, le ciblage actif est subordonné à la présence de cibles dans les zones d'intérêt et de molécules de reconnaissance sur les nanoparticules. Cependant, l'optimisation de la densité des molécules de reconnaissance à la surface des nanoparticules est tout aussi importante pour obtenir non seulement une efficacité de ciblage élevée mais aussi une internalisation optimale.[281] L'absorption cellulaire des nanoparticules d'or dépend des concentrations d'anticorps à leur surface.[282], [283]

Les nanoparticules multifonctionnelles peuvent remplir plusieurs rôles à la fois, comme le transport et la délivrance ciblée et télécommandée de principes actifs, les traitements combinés ou la thérapie guidée par

imagerie. Malgré les contraintes imposées par les organismes vivants, différentes familles de nanoparticules multifonctionnelles récemment créées et décrites ont confirmé le fort potentiel pour des applications médicales. Cependant, il reste beaucoup d'effort à fournir pour proposer aux médecins des solutions satisfaisantes à base de nanoparticules multifonctionnelles. Cet objectif ambitieux que tente d'atteindre la communauté de la nanomédecine nécessite une bonne connaissance des contraintes physiques, chimiques et biologiques des organismes vivants.

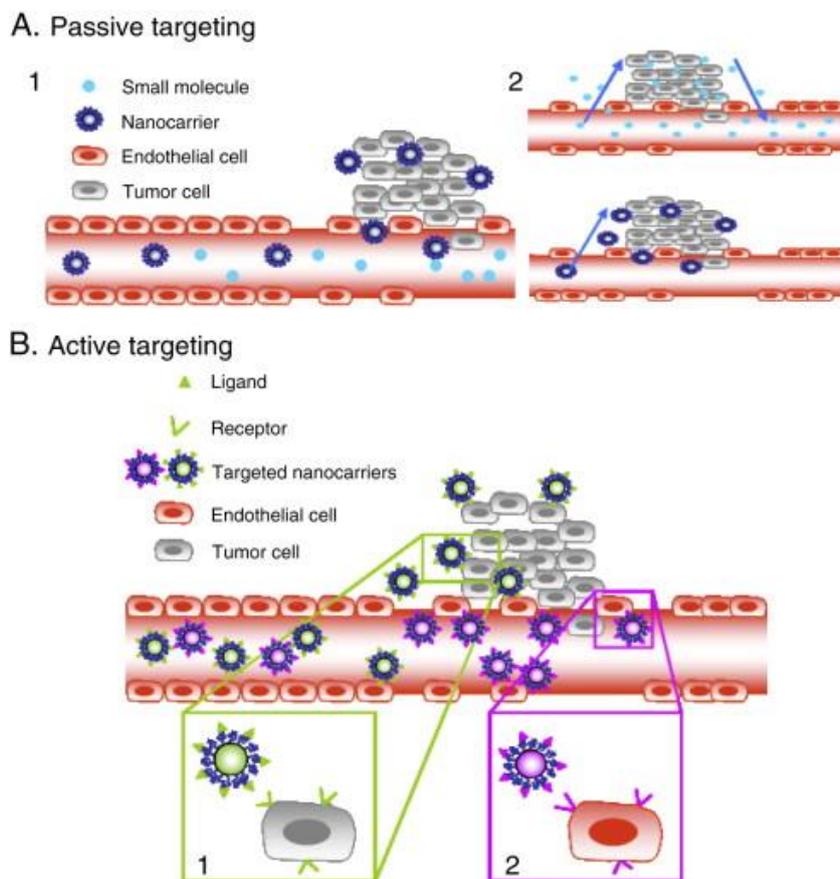


Figure 4-1 : Ciblage passif et ciblage actif des nanoparticules

4.3. Contraintes d'utilisation des nanoparticules dans l'organisme

La nanomédecine est une stratégie très prometteuse pour développer des traitements originaux et pour apporter des solutions à des situations thérapeutiques désespérées. Par conséquent, il est essentiel que les nanoparticules soient conçues de manière à surmonter les obstacles biologiques et possèdent des propriétés adaptées à l'application médicale visée et au mode d'administration.[284] Pour cela, plusieurs facteurs comme la toxicité, la voie d'administration, la biodistribution, la pharmacocinétique et l'élimination doivent être pris en compte lors de la synthèse des nanoparticules destinées à une utilisation médicale. Dans les paragraphes suivants, la description des contraintes nous donne les éléments à respecter pour choisir le type de nanoparticules le mieux adapté à l'application médicale visée.

4.3.1. Toxicité

L'utilisation généralisée des nanoparticules nécessite de répondre aux problèmes de toxicité pour la santé humaine et l'environnement. Les produits de la nanomédecine ont une taille à l'échelle nanométrique équivalente aux organelles intracellulaires ou aux biomolécules impliquées dans la signalisation cellulaire. Comme les nanoparticules présentent un fort potentiel pour les applications médicales, l'étude des interactions entre les nanoparticules et les cellules, les tissus et les organes est essentielle avant d'envisager leur utilisation en clinique. C'est pourquoi la nanotoxicologie est devenue un domaine d'étude à part entière.[285], [286] Néanmoins, il est difficile de comparer la toxicité des nanoparticules à celle des matériaux massifs parents. Les tests de toxicité pour les nanomatériaux sont actuellement les mêmes que pour les médicaments traditionnels. Par conséquent, les évaluations actuelles de la toxicité des nanoparticules peuvent être insuffisantes, et le développement de tests de toxicité supplémentaires pour les substances de la nanomédecine devrait être encouragé.[287], [288] La toxicité des nanomatériaux est influencée par un certain nombre de variables. À l'interface nano-bio, des propriétés telles que la taille, la forme, la surface, la charge de surface, la porosité et l'hydrophobie influencent le comportement et les performances des nanomédicaments. Les nombreux facteurs impliqués rendent difficile la caractérisation complète des nanoparticules d'un point de vue toxicologique. L'activation du complément, l'hémolyse, l'inflammation, le stress oxydatif et la diminution de la fonction mitochondriale sont des effets indésirables aigus courants des nanoparticules développées pour des applications médicales.[289], [290] L'analyse de la toxicité chronique est encore plus difficile à réaliser car les données sont peu nombreuses et la toxicité de chaque type de nanoparticules doit être étudié au cas par cas.

La caractéristique la plus évidente à déterminer est la toxicité inhérente de l'objet, qui est liée aux composants de la nanoparticule. Les QDs sont un exemple emblématique de la toxicité intrinsèque. Même s'il a été proposé de les protéger par une couche de polymère (organique ou polysiloxane) stable et résistante afin d'exploiter les exceptionnelles propriétés de luminescence de ces objets dans le cadre d'applications biomédicales,[291] il semble plus prudent de proscrire les éléments toxiques et de préférer les éléments biocompatibles. La chimie de surface et surtout la charge de surface joue un rôle important dans la détermination de la toxicité des nanoparticules. Celles chargées positivement sont généralement toxiques.[292] L'influence de la diminution de la taille sur la toxicité est un autre facteur à examiner. Si la taille des nanoparticules est un avantage dans les applications biologiques, elle peut aussi être un inconvénient car la forte valeur du rapport surface-volume qui caractérise les plus petites nanoparticules est à l'origine de la toxicité des nanoparticules. Par rapport aux particules, les nanoparticules sont plus réactives et interagissent plus avec l'environnement, ce qui peut entraîner des changements indésirables.[293] Enfin, la forme est un facteur qui ne doit pas être négligé. Selon une étude, la forme des nanoparticules d'oxyde de cuivre exerce une influence substantielle sur la toxicité *in vitro*. Il semble que la forme sphérique soit celle qui présente le moins de cytotoxicité pour ce type de nanoparticules.[294]

4.3.2. Voie d'administration

L'administration des nanoparticules dans l'organisme peut emprunter plusieurs voies comme la voie orale, transmuqueuse, percutanée, pulmonaire... La technique d'administration choisie est déterminée par l'emplacement de la cible. La voie intraveineuse qui consiste à introduire les agents d'imagerie et de thérapie dans la circulation sanguine semble être la meilleure option car le réseau vasculaire donne accès à tout l'organisme. Contrairement à la méthode orale, le risque de modification des agents est minime. Lorsque des nanoparticules d'or recouvertes de citrate sont injectées, la voie intraveineuse s'est avérée la moins toxique par rapport aux voies orale et intrapéritonéale.[295] Cependant, comme les résultats observés dépendent non seulement du cœur inorganique (or, argent, semi-conducteurs, oxydes métalliques...), mais aussi de la forme (sphères, bâtonnets, cubes...) et de la nature de la surface des nanoparticules recouvertes par des molécules (organiques, inorganiques, polymères, anioniques, cationiques...) présentes à la surface pour assurer la stabilité colloïdale et apporter des propriétés supplémentaires, ce résultat ne peut pas être généralisé et doit être nuancé. En utilisant le phénomène EPR, l'injection intraveineuse est fréquemment mise en œuvre pour concentrer préférentiellement les nanoparticules dans les tumeurs solides. En raison de la simplicité du geste médical et de la possibilité d'accéder à une grande partie de l'organisme, l'injection intraveineuse est plus souvent recommandée que l'injection intratumorale. Les essais cliniques réalisés avec les nanoparticules AGuIX® de la société NH-Theraguix (nanoparticules constitué d'un réseau de polysiloxane fonctionnalisé par des chélates de gadolinium, diamètre hydrodynamique inférieur à 5 nm) montrent clairement que l'injection intraveineuse est une voie prometteuse pour atteindre les métastases cérébrales.

L'injection intratumorale semble être la méthode la plus fiable pour délivrer des médicaments à une tumeur solide facilement accessible. En effet, la question de la biodistribution des nanoparticules ne se pose plus et la quantité de nanoparticules dans la tumeur est connue (en absence de fuite) si on considère que la dose injectée est intégralement répartie dans la tumeur. L'injection intratumorale est, par exemple, la voie suivie par Nanobiotix pour administrer NBTXR3, des nanoparticules radiosensibilisantes. Cette stratégie s'est révélée très efficace pour traiter le sarcome des tissus mous. Ce produit a obtenu l'autorisation de mise sur le marché en Europe pour le traitement des patients atteints de sarcomes des tissus mous sous la marque Hensify®. Cependant, ce mode d'administration est restreint à seulement quelques types de cancers puisque, à moins d'utiliser des méthodes plus intrusives, seules les tumeurs cutanées ou superficielles peuvent être traitées par injection intratumorale. D'autre part, ce mode d'administration n'est pas trivial car la forte viscosité du micro-environnement tumoral empêche la diffusion du liquide injecté et conduit à une distribution hétérogène des agents. Bien que l'injection intratumorale paraisse en mesure de contourner les limites de l'injection intraveineuse (faible pourcentage de la dose injectée dans la tumeur), l'injection intratumorale est finalement peu mise en œuvre. Lorsqu'elle est mal maîtrisée, elle risque en outre de favoriser la dissémination des cellules cancéreuses.

4.3.3. Biodistribution

La biodistribution est un facteur important qui conditionne l'arrivée ou non des nanoparticules dans la zone désirée avec une concentration satisfaisante après qu'elles ont été injectées par voie intraveineuse. Plusieurs

facteurs influencent la biodistribution des nanoparticules : (1) les propriétés physico-chimiques des nanoparticules, (2) les caractéristiques physiologiques comme le flux sanguin, la perméabilité des vaisseaux... Normalement, les nanoparticules circulent dans le sang et séjournent temporairement dans les organes à flux sanguin élevé. Mais leur distribution dépend également de la physiologie des organes qu'elles traversent et en particulier des barrières biologiques que constitue l'endothélium de ces organes.[296] Celles-ci peuvent être continues (poumons, vaisseau sanguin...), discontinues (foie...) ou fenestrées (reins, glandes...). La porosité des tissus influence la biodistribution et encore l'élimination des nanoparticules.

D'après la littérature, deux modes d'accumulation des nanoparticules dans les tissus d'intérêt (tumeur, plaques d'athérosclérose) sont décrits : le ciblage passif et le ciblage actif.

Le ciblage passif repose sur des phénomènes non sélectifs. Dans ce cas l'accumulation des nanoparticules s'explique essentiellement par des facteurs géométriques (taille adaptée à la fenestration tout en évitant l'opsonisation). L'absence d'interaction préférentielle voire spécifique limite le temps de résidence dans la zone d'intérêt. Le ciblage actif tente de surmonter cette limitation caractéristique du ciblage passif en adaptant la chimie de surface des nanoparticules. De nombreuses stratégies ont été décrites pour greffer des groupes de reconnaissance à la surface des nanoparticules. Grâce à ces groupements qui sont choisis pour leur affinité et leur capacité à interagir avec des structures identifiées de la cible (récepteurs...), les nanoparticules qui se sont accumulées dans les zones d'intérêt par ciblage passif seront retenues par les interactions entre les groupes de reconnaissance et les structures ciblées. Les nanoparticules fonctionnalisées séjourneront plus longtemps dans les zones à traiter et/ou à imager.

Les deux principales difficultés du ciblage actif résident dans l'identification d'un ligand de reconnaissance spécifique de la zone d'intérêt à cibler et dans la formation quasi inéluctable de la couronne de protéines qui pourrait masquer les groupes de reconnaissance et empêcher leur interaction avec la cible.

Si le ciblage actif semble une voie prometteuse pour améliorer la qualité des images ou l'effet thérapeutique, les travaux consacrés aux nanoparticules AGuIX montrent que, malgré l'absence de ciblage actif, ces agents théranostiques sont très performants pour traiter des tumeurs et des métastases cérébrales par radiothérapie guidée par IRM. [297], [298]

Dès leur introduction dans l'organisme, les nanoparticules peuvent déclencher une cascade de réponses immunitaires pour pouvoir les éliminer rapidement.[299] Parmi les différentes réactions de l'organisme induites par la présence d'un corps étranger dans le sang, l'opsonisation est probablement la plus courante. L'opsonisation débute par l'adhésion de protéines plasmatiques sur la surface des nanoparticules. Cela favorise alors leur capture par les cellules du système phagocytaire mononucléé (SPM, MPS : mononuclear phagocyte system) surtout par les cellules de Kupffer du foie ou les lymphocytes et les monocytes de la rate.[300] En raison de la capture fulgurante et massive des nanoparticules par le SPM, leur demi-vie plasmatique est considérablement réduite, ce qui diminue drastiquement leur chance d'interagir avec leur cible. La conception de nanoparticules pour des applications médicales (imagerie et/ou thérapie) doit prendre en compte cette réalité biologique pour élaborer des nanoparticules capables d'échapper au phénomène

d'opsonisation. Les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules, comme leur caractère hydrophile / hydrophobe, leur taille, leur forme, leur charge et chimie de surface exercent une influence déterminante dans la survenue de l'opsonisation. Bien que la façon dont ces facteurs affectent l'opsonisation et l'absorption par les cellules phagocytaires change en fonction du type de nanoparticules, quelques points communs émergent. Par exemple, les particules hydrophobes sont rapidement expulsées de la circulation sanguine et collectées par le SPM, mais les particules hydrophiles ont une demi-vie plasmatique prolongée.[301] Pour contourner la capture des nanoparticules par le SPM, le greffage de polymères hydrophiles (généralement du polyéthylène glycol, PEG) à la surface des particules est une approche courante car elle prolonge leur demi-vie plasmatique.[302], [303] D'autre part, il est bien connu que la taille et la charge des nanoparticules jouent un rôle important dans l'adhésion des opsonines. Cette adhésion peut être limitée par une réduction de la taille et/ou une charge de surface neutre ou négative. [296] En général, le risque d'adhésion de l'opsonine augmente avec la taille de la particule. Les propriétés physico-chimiques des nanoparticules comme la charge de surface et la taille influencent la distribution des nanoparticules dans l'organisme. En plus d'augmenter la toxicité, une charge de surface positive favorise également l'opsonisation qui conduit à la capture de ces nanoparticules par le foie et donc à la diminution de la demi-vie plasmatique alors que la charge neutre ou négative ne la favorise pas.[296], [299]

Si l'élimination induite par l'opsonisation n'est pas souhaitable, l'élimination des nanoparticules de l'organisme est en revanche indispensable. Lorsqu'elles sont biodégradables (liposomes, polymères), les nanoparticules sont « digérées » et éliminées par l'organisme après avoir été séquestrées par les cellules phagocytaires du SPM. Sinon, et c'est le cas de la plupart des nanoparticules inorganiques, elles sont conservées et accumulées dans les phagocytes. Leur devenir est inconnu et cette accumulation fait craindre une toxicité à long terme. [299] La question de l'élimination est donc une contrainte à prendre en compte dès la conception des nanoparticules. Selon leur taille, les nanoparticules sont éliminées par voie hépatobiliaire (diamètre hydrodynamique supérieur à 10 nm) ou par voie rénale (diamètre hydrodynamique inférieur à 10 nm). [296],[304]

4.3.4. Elimination

Les nanoparticules sont des corps exogènes à l'organisme, donc il est nécessaire qu'elles soient éliminées du corps. Les nanoparticules doivent donc être complètement éliminées après avoir rempli la mission qui leur est assignée. Après leur injection, la quantité de nanoparticules qui atteignent la cible biologique visée est souvent inférieure à 1% de la dose injectée.[305] Cela signifie que l'élimination concerne avant tout une part ultramajoritaire de nanoparticules inutiles car elles ne se sont pas accumulées dans les zones à traiter.

Les nanoparticules biodégradables peuvent être éliminées rapidement après leur dégradation dans l'organisme. Mais les nanoparticules inorganiques sont rarement biodégradables. Seules les nanoparticules de silice et d'oxyde de fer peuvent être considérées dans les cas les plus favorables comme biodégradables. L'élimination des nanoparticules non-biodégradables suit principalement deux voies : hépatobiliaire et rénale. La voie d'élimination hépatobiliaire peut entraîner la libération de produits secondaires dangereux dans le foie.[296], [304], [306] En effet, elle implique la capture des nanoparticules par les hépatocytes, dont

le métabolisme peut entraîner la dégradation des nanoparticules. La voie d'élimination rénale qui repose sur la filtration du sang préserve quant à elle l'intégrité physique et chimique des nanoparticules. Cette caractéristique rend la clairance rénale particulièrement adaptée pour l'élimination des nanoparticules. Cependant, elle impose une contrainte de taille pour la conception des nanoparticules car leur diamètre hydrodynamique ne doit pas excéder 10 nanomètres.

4.4. Nanoparticules d'or

Il y a plusieurs milliers d'années, l'or (numéro atomique $Z = 79$) a été un des premiers métaux que l'homme a travaillé. C'est un métal brillant, jaune, dense, mou et ductile dans sa forme la plus pure, solide dans des conditions normales. L'or est l'un des éléments chimiques les moins réactifs. La grande valeur de l'or a été reconnue depuis sa découverte en raison de sa rareté, de sa facilité de manipulation, de sa résistance à la corrosion et à d'autres réactions chimiques et, bien sûr, de sa teinte distinctive. L'or, métal noble, a été utilisé pour la fabrication de monnaie et de bijoux, et il est rapidement devenu un symbole de pouvoir et de richesse.[307]

Faraday a publié le premier article scientifique sur les nanoparticules d'or (NPs Au) en 1857, attribuant la teinte rouge à la nature colloïdale des NPs Au et décrivant leurs propriétés de diffusion de la lumière.[308] Les caractéristiques d'absorption visuelle des NPs Au ont été décrites à l'aide des équations électromagnétiques de Maxwell cinquante ans plus tard.[308] Faulk et Taylor, des chercheurs britanniques, ont mis au point une technique révolutionnaire de conjugaison anticorps-or colloïdal permettant l'observation directe par microscopie électronique des antigènes de surface des salmonelles en 1971.[309] Cette découverte a déclenché une série de recherches consacrées aux utilisations biomédicales des nanoparticules d'or au cours des 50 années suivantes, reconnaissant spécifiquement diverses biomacromolécules en raison de la fonctionnalisation de surface et des propriétés caractéristiques. Ces dernières sont généralement liées à des techniques de synthèse contrôlées qui permettent d'obtenir des NPs Au de formes et de tailles modulables.[310]–[313]

4.4.1. Synthèse et structure des nanoparticules d'or

Les techniques de synthèse peuvent être rangées dans deux familles différentes. La première est basée sur l'approche méthodologique (approches chimiques, physiques et biologiques), tandis que la seconde est basée sur la méthode de synthèse (top-down ou bottom-up).[314] La synthèse chimique des nanoparticules d'or, quels que soient la taille et la forme visées, repose sur des réactions de réduction d'un sel d'or ou d'un composé organométallique contenant de l'or à un état d'oxydation non nul. Les réducteurs les plus couramment utilisés sont les ions citrate, le tétrahydroborate de sodium (NaBH_4), [315]–[317] l'aspartate, [318] ou l'hydroquinone.[319] Dans le cas des nanoparticules sphériques, deux stratégies dominent : la méthode de Frens inspirée par les travaux de Turkevich (ions citrate) et celle de Brust-Schiffrin (NaBH_4). En parallèle, des méthodes physiques pour produire des NPs Au ont également été étudiées, notamment les micro-ondes,[320] les ondes ultrasoniques,[321] l'ablation laser [312] et la réduction électrochimique et photochimique.[322], [323] Ces méthodes physiques de synthèse permettent de contrôler avec une grande précision la taille, la composition et la forme des nanoparticules. Mais elles nécessitent des conditions

opératoires contraignantes (atmosphère contrôlée) et des installations parfois encombrantes et souvent coûteuses pour atteindre ces caractéristiques. En outre, les quantités obtenues sont relativement faibles, même si dans le cas de l'ablation laser des techniques de synthèse en continu ont été développées. Les méthodes chimiques paraissent mieux adaptées car elles conduisent à la formation de nanoparticules d'or en grande quantité, dans des conditions opératoires simples avec un assez bon contrôle de la taille et de la composition et une grande variété pour la méthode de Brust-Schiffrin de couches organiques.

Les travaux de Turkevich et de ses collègues, en 1951, ont amélioré la technique de synthèse issue des travaux de Faraday sur les nanoparticules d'or. Turkevich *et al.* ont établi l'une des premières synthèses chimiques de nanoparticules d'or. Ce protocole est très souvent mis en œuvre. Il implique la réduction de l'acide tétrachloroaurique (HAuCl_4) par le citrate trisodique (qui sert également de ligand pour les NPs Au fraîchement produites) à reflux dans l'eau. En fonction de la concentration initiale de citrate de sodium, cette réaction produit des suspensions aqueuses de nanoparticules sphériques modérément monodisperses dont la taille varie de 15 à 150 nm.[324] Dans cette synthèse, le citrate joue le rôle de réducteur et d'agent de surface car il prévient l'agrégation en introduisant une charge négative à la surface des nanoparticules. Le protocole de Turkevich a été étudié de manière approfondie par Frens.[325] En 1973, il a montré qu'il était possible de contrôler la taille moyenne des particules en faisant varier le ratio concentration de sel d'or sur concentration du citrate ($[\text{HAuCl}_4] / [\text{citrate}]$). Ainsi, en réduisant la quantité de citrate utilisée lors de la synthèse, on réduit la quantité d'ions citrate nécessaire pour la stabilisation des particules entraînant l'agrégation des petites particules en plus grosses particules d'aspect sphérique jusqu'à ce que la surface devienne assez grande pour être recouverte par les ions citrate présents. Malgré la couche de citrate adsorbée à la surface des nanoparticules, la stabilité colloïdale des suspensions de nanoparticules d'or citratées est relativement faible dans l'eau et en particulier dans les milieux salins où elles précipitent. Une telle instabilité limite leur utilisation en milieu biologique. L'une des solutions proposées consiste à remplacer les ions citrate de la surface par des molécules organosoufrées, i.e. des molécules organiques comportant au moins un atome de soufre. Parmi elles les thiols (R-SH) sont des molécules très utilisées pour fonctionnaliser les nanoparticules d'or. En effet, l'élément soufre possède une forte affinité pour les surfaces d'or qui garantit une immobilisation durable de la couche organique. Cependant, l'échange des ions citrate par les molécules organosoufrées n'est pas trivial et peut entraîner dans certaines conditions la précipitation des nanoparticules [326]. Afin de contourner cette réaction d'échange, Brust et Schiffrin ont proposé une stratégie de synthèse pour produire des nanoparticules d'or recouvertes en cours de synthèse par des molécules organosoufrées.[327] Elle consiste à réduire le sel d'or ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) par un réducteur puissant (NaBH_4) en présence de thiols. En fonction du caractère hydrophobe/hydrophile des thiols la réduction peut être réalisée en milieu biphasique eau/toluène (ou cyclohexane, chloroforme... inspirée par la synthèse de Faraday en 1861 et par les travaux de Giersig *et al.* en 1993 [328]) ou en milieu monophasique aquocalcoolique. Il a été montré que des nanoparticules d'or pouvaient être obtenues en remplaçant les thiols par d'autres dérivés soufrés. La présence des molécules soufrées est indispensable car la réduction par NaBH_4 suit une cinétique très rapide qui rend difficile le contrôle de la taille des nanoparticules. Les molécules organosoufrées dans le protocole de Brust-Schiffrin jouent donc plusieurs rôles : elles assurent (i) un contrôle

de la croissance des nanoparticules d'or et donc de la taille en s'adsorbant sur les germes en croissance, (ii) la stabilité colloïdale des nanoparticules et (iii) elles peuvent en fonction de leur composition apporter des propriétés supplémentaires aux nanoparticules d'or. Les nanoparticules d'or générées par cette méthode sont extrêmement stables dans les solvants apolaires lorsqu'elles sont recouvertes par des molécules organosoufrées hydrophobes [329] ou dans les solvants polaires lorsqu'elles sont recouvertes par des molécules organosoufrées hydrophiles, possèdent une taille comprise entre 1 et 5 nm en fonction des rapports molaires NaBH_4/Au et $\text{R-SH}/\text{Au}$ et présentent une distribution en taille assez étroite. Les molécules organosoufrées hydrophiles sont donc particulièrement intéressantes pour les applications biologiques. Cependant, les nanoparticules d'or recouvertes par une couche de molécules organosoufrées peuvent être utilisées pour des applications biomédicales à condition de les rendre plus hydrophiles, soit par un échange de ligand [330] soit par un revêtement supplémentaire avec des polymères ou des lipides amphiphiles.[331]

Les deux principales techniques de synthèse précédemment décrites produisent des nanoparticules d'or sphériques. Mais d'autres formes de nanoparticules d'or peuvent être synthétisées, notamment des bâtonnets, [332] des cages, [333] des tubes, [334] etc (Figure 4-2). Ces méthodes sont généralement basées sur le contrôle de la direction de croissance des germes. Les germes sont produits après la réduction de sel d'or avec un agent réducteur fort. Ces germes, sont ensuite ajoutées à une solution de sel métallique en présence d'un agent réducteur faible et d'un agent dirigeant la structure. C'est la méthode la plus appropriée pour synthétiser différentes structures de NPs Au anisotropes. [335] La modification de la concentration des germes, des agents réducteurs et des agents structurants peut changer la géométrie des nanostructures d'or. La plupart des nanoparticules anisotropes possèdent des propriétés optiques dans le domaine de l'IR et présentent à ce titre un potentiel pour l'imagerie photoacoustique.

Le choix de la couche organique qui recouvre les nanoparticules d'or est essentiel. Comme mentionné précédemment, cette couche organique peut être utilisée pour contrôler la taille des nanoparticules d'or et garantir la stabilité colloïdale. Elle empêche l'agrégation des nanoparticules et apportent des propriétés complémentaires aux NPs Au. Bien que l'or métallique qui constitue le cœur des nanostructures d'or soit un métal noble qui est donc relativement inerte, l'utilisation biologique nécessite souvent une fonctionnalisation supplémentaire de la surface des nanoparticules avec un revêtement biocompatible pour réduire la capture par le système phagocytaire mononucléé, empêcher la liaison non spécifique avec les molécules biologiques et diminuer la cytotoxicité. [85], [336] Les groupes thiol (-SH) réagissent facilement avec les surfaces en or, créant des liaisons $\text{Au}:\text{S}$ stables.[337] Par conséquent, les molécules organiques thiolées peuvent être utilisées, entre autres, pour ajouter des groupes de reconnaissance pour le ciblage, divers groupes fonctionnels pour des modifications chimiques ultérieures ou des composés pharmacologiques pour conférer à l'objet final une activité chimiothérapeutique.[338] Pour améliorer la biocompatibilité des NPs Au, un certain nombre de techniques de revêtement ont été proposées, notamment la substitution des molécules organiques de surface, le revêtement amphiphile et l'incorporation dans un support (encapsulation).[339] Le polyéthylène glycol (PEG) est le polymère d'enrobage le plus fréquemment utilisé car il a une charge modifiable qui dépend du groupement terminal et est extrêmement hydrophile, ce qui évite l'adsorption non

spécifique de protéines à la surface des nanoparticules, l'absorption par le système phagocytaire mononucléé. La PEGylation des nanoparticules d'or augmente les temps de circulation sanguine.[340]–[342]

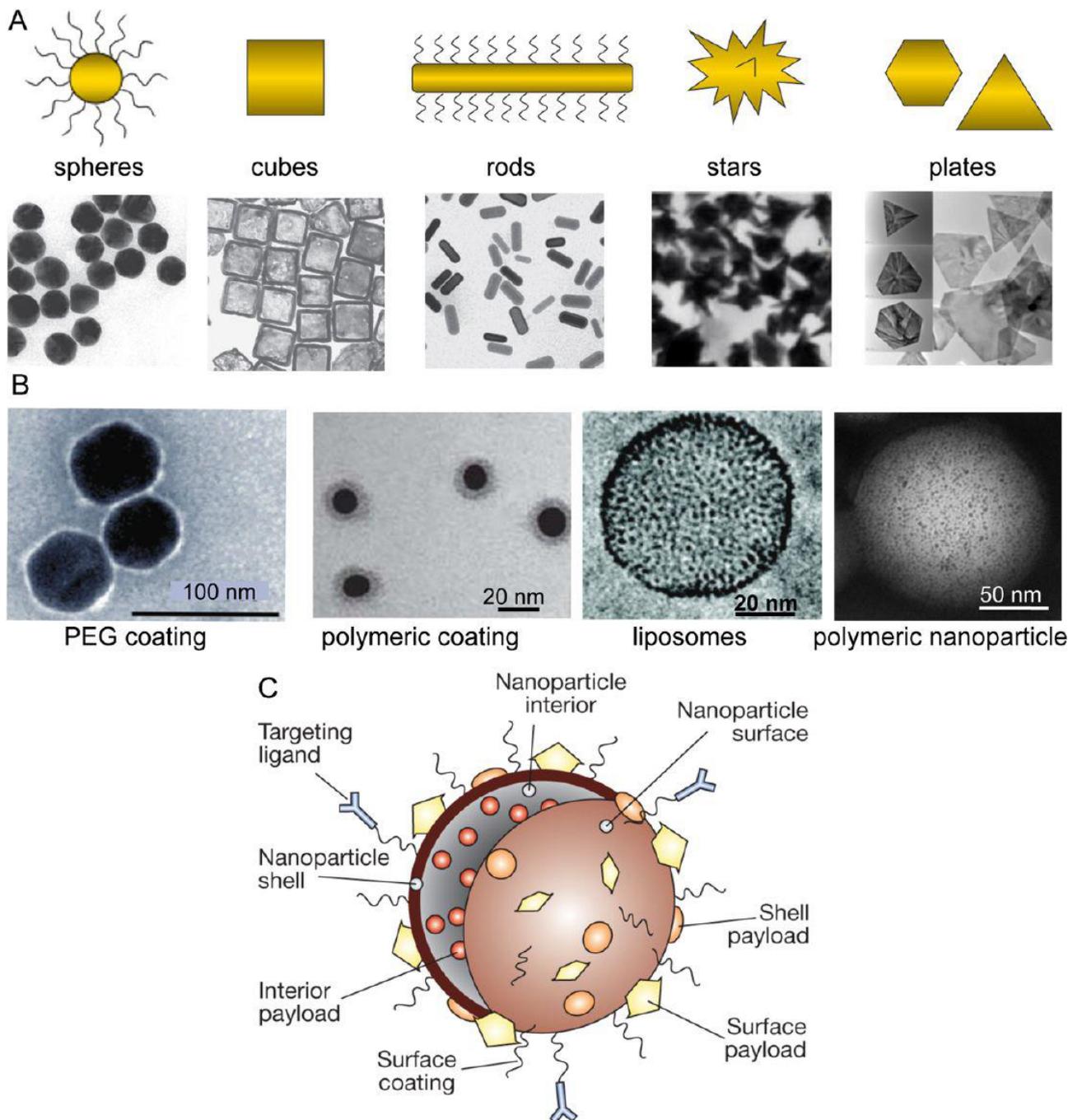


Figure 4-2 : (A) Exemples de différentes structures des nanoparticules d'or, (B) exemples de différents revêtements de nanoparticules d'or et (C) une représentation schématique des plateformes à base de nanoparticules d'or pour l'utilisation in vivo [343]–[350]

4.4.2. Propriétés des nanoparticules d'or

L'or est un élément chimique précieux. L'or métallique est de couleur jaune de structure cubique à faces centrées. Il est inerte et chimiquement très stable. Il est caractérisé par sa résistance à l'oxydation ce qui signifie qu'il ne se dégrade pas avec le temps. L'or possède un numéro atomique très élevé ($Z = 79$). Ce

numéro atomique Z permet à l'or d'absorber les photons X et γ . Cette propriété a conduit à envisager d'utiliser les nanoparticules d'or dans le domaine médical (imagerie, thérapie...) comme agents de contraste pour l'imagerie X et comme agents radiopotentialisants pour la radiothérapie. Les propriétés des nanoparticules d'or proviennent de l'élément or mais sont également la conséquence de la réduction de leur taille, de leur forme et de leur composition.

Les caractéristiques des nanostructures d'or peuvent être finement modulées grâce à des processus de synthèse qui garantissent un contrôle précis de la taille, de la forme et de la composition. La taille et la forme des nanoparticules d'or exercent une influence significative sur leurs propriétés tout en ayant un impact sur la stabilité, la mobilité et la biocompatibilité, [351]–[357] et doivent être ajustées pour des applications biologiques spécifiques. Par exemple, les nanoparticules conçues pour l'administration de principes actifs doivent être suffisamment petites pour pénétrer les barrières physiologiques ou infiltrer les cellules cibles, tout en étant assez grosses pour transporter une quantité suffisante d'agents thérapeutiques jusqu'au site d'action. [330], [358]

Il convient de noter que les propriétés physiques et chimiques des matériaux à l'échelle nanométrique (telles que la fluorescence, la conductivité électrique et la réactivité chimique) sont différentes de celles de leurs homologues macroscopiques. La teinte jaunâtre de l'or dans sa forme massive et la couleur rouge (pour les particules de moins de 60 nm) ou bleue/pourpre (pour les particules plus grandes, de l'ordre de 80-100 nm) des NPs Au, qui dépendent de leur forme et de leurs tailles, sont les meilleurs exemples de cette dépendance entre taille/forme et propriétés (en l'occurrence optiques). En outre, l'or colloïdal est considéré comme extrêmement réactif par rapport à l'or massif, ce qui élargit considérablement son potentiel d'application en offrant des caractéristiques optoélectroniques, catalytiques et antioxydantes, ainsi que la possibilité d'introduire des modifications de surface.

La résonance plasmonique de surface (SPR) est une propriété physique essentielle des NPs Au. Ce phénomène se produit lorsque la fréquence des oscillations des électrons libres de la bande de conduction est égale à celle du rayonnement lumineux entrant, induisant une forte absorption qui correspond sur les spectres UV-visible à la bande plasmonique. Les bandes SPR ont des coefficients d'extinction extraordinairement élevés, jusqu'à $10^{11} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, ce qui est plusieurs ordres de grandeur plus élevés que ceux des colorants organiques typiques. Les proportions de ces effets dépendent de la taille et de la forme des NPs Au, ainsi que du type de solvant, du ligand de surface, de la charge du cœur, de la température et de la proximité d'autres nanoparticules, [359], [360] autant de facteurs qui influencent la densité de charge électronique à la surface des particules. Le maximum de la bande d'absorption SPR est centré entre 500-550 nm dans le cas des NPs Au sphériques dont le diamètre est inférieur à 60 nm, ce qui explique leur teinte rouge. En raison de l'oscillation des électrons dans le sens de la longueur (bande plasmonique longitudinale) et de la largeur (bande plasmonique transversale) des nanoparticules anisotropes, deux bandes plasmoniques sont observées pour les nanoparticules anisotropes comme les nanobâtonnets (NRs Au, NRs pour nanorods). La bande transversale a une longueur d'onde autour de 520 nm, tandis que la bande longitudinale a une longueur d'onde qui varie en fonction du rapport longueur/largeur appelé facteur ou rapport d'aspect.[361] Les NRs Au ont

des bandes plasmoniques dont la position des maxima est comprise entre 500 et 1600 nm.[362] La position du maximum de cette bande est déplacée vers les grandes longueurs d'onde au fur et à mesure que le facteur d'aspect augmente. La modulation des caractéristiques de fluorescence des fluorophores proximaux est un autre phénomène intrigant qui dépend de la forme des nanoparticules d'or et qui est lié aux bandes plasmoniques de surface. Ceci est dû aux phénomènes de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET : Fluorescence resonance energy transfer), au processus de transfert d'électrons photoinduit (PET : Photoinduced electron transfer), [327], [363]–[366] et aux caractéristiques photothermiques, qui résultent de l'absorption de la lumière et de la dissipation d'énergie non radiative qui s'ensuit.[329], [331] Par conséquent, la modification de la forme des nanoparticules d'or leur confère des propriétés optiques intéressantes couvrant le spectre électromagnétique du visible au proche infrarouge (NIR), ce qui en fait des outils utiles pour la bioimagerie et les applications théranostiques.[367] Afin d'exploiter efficacement ces propriétés, il est essentiel de contrôler les propriétés morphologiques des NPs Au pendant la synthèse.

En raison de leur compatibilité, de leur réactivité et de leur sensibilité aux altérations, ainsi que de leurs propriétés optiques ajustables, les nanoparticules d'or de formes et de tailles diverses gagnent en importance dans le domaine médical (diagnostic, imagerie et thérapie). En outre, les NPs Au se sont avérées être des agents thérapeutiques efficaces ainsi que des transporteurs de principe actifs.

4.4.3. Utilisation potentielle des nanoparticules d'or dans le domaine médical

Les nanoparticules d'or possèdent plusieurs propriétés permettant d'envisager leur utilisation dans le domaine biomédical. Dans ce qui suit, quelques exemples d'utilisation de ces nanoparticules dans le domaine du diagnostic, de l'imagerie et de la thérapie seront décrits.

4.4.3.1. Diagnostic

Dans le domaine du diagnostic moléculaire, les NPs Au possèdent, en raison de la sensibilité de leur propriétés optiques aux modifications de leur environnement proche, un potentiel élevé.[368] Le développement de nanoparticules a suscité beaucoup d'espoir dans le domaine de la détection précoce d'agents pathogènes et de biomarqueurs. Il est essentiel de développer des stratégies de détection précoce afin de réduire les effets de la maladie et d'augmenter les taux de réussite des traitements. Les nanoparticules ont un rapport surface/volume élevé et peuvent être fonctionnalisées pour détecter des cibles spécifiques, ce qui permet d'abaisser les limites de détection et d'accroître la sélectivité par rapport aux méthodes traditionnelles. Elles ont été utilisées pour détecter des gaz, des ions, des biomarqueurs, des molécules et des modifications de l'ADN, entre autres.[369]–[372]

L'équipe de Mirkin a été un précurseur dans ce domaine en publiant plusieurs articles sur l'utilisation des NPs Au pour la détection colorimétrique.[369], [373]–[375] Le principe décrit dans un article fondateur publié en 1997 est relativement simple et astucieux.[376] Il repose sur le fait que la couleur des suspensions des nanoparticules d'or d'une taille donnée varie avec l'état d'agglomération. Une suspension de nanoparticules d'or d'une quinzaine de nanomètres est rouge alors qu'elle devient violette après agglomération de ces nanoparticules. Ce changement de couleur a été mis à profit par Mirkin et ses collaborateurs pour détecter

des brins d'ADN et déterminer leur séquence en jouant sur l'hybridation réversible des brins complémentaires. Pour cela, deux familles de nanoparticules d'or de même taille sont élaborées. Elles se distinguent par la nature des oligonucléotides thiolés adsorbés à la surface des nanoparticules. La moitié d'une séquence d'ADN cible est complémentaire aux 15 derniers nucléotides des brins portés par chaque les nanoparticules d'or de chaque famille. La complémentarité des brins portés par chaque type de nanoparticules d'or avec l'ADN-cible génère l'agglomération des nanoparticules qui s'accompagne d'un changement caractéristique de couleur de la suspension. La teinte des suspensions de nanoparticules Au passe alors du rouge au violet car l'agglomération résultant de l'hybridation des brins d'ADN modifie l'environnement diélectrique des nanoparticules. Comme les propriétés optiques des nanoparticules d'or dépendent de la taille, de la forme, de la composition et de l'environnement diélectrique, la modification d'un de ces paramètres induit un changement de couleur de la suspension des nanoparticules d'or. Cette stratégie de détection colorimétrique, basée sur les NPs Au, a été optimisée pour la conception de diagnostics approuvés par la FDA.

En utilisant des NPs Au recouvertes d'oligonucléotides, Conde *et al.* ont récemment publié la première mesure de l'expression des mutations dans l'ARNm extrait directement des cellules cancéreuses.[377] L'amplification de l'ARN n'est alors plus nécessaire. L'ADN correspondant à l'ARNm du transcrit de fusion BCR-ABL b3a2, qui cause la leucémie myéloïde chronique (CML : chronic myeloid leukemia), a été ajouté aux NPs Au. L'ARN total a été extrait de différents types de cellules et les NPs Au de 13 nm ont été modifiées à l'aide d'oligonucléotides thiolés. Les nanoparticules ne se sont pas combinées en l'absence de l'ADN-cible et sont restées de couleur rouge. Un changement de couleur notable a été observé lors de l'exposition à l'ARN isolé de cellules portant le gène mutant, ce qui a permis une identification colorimétrique directe. Lou *et al.* ont mis au point un capteur à "nez chimique" utilisant le polymère poly(p-phénylèneéthynylène) (PPE) et des NPs Au qui peuvent différencier sept protéines distinctes.[372] Cette méthode reposant sur les propriétés plasmoniques des NPs Au illustre parfaitement la façon dont les propriétés optiques modulables des nanoparticules d'or peuvent être utilisées spécifiquement pour améliorer les performances de détection. La spécificité est finement adaptée par le contrôle de la chimie de surface des NPs Au.

4.4.3.2. Imagerie

L'imagerie, comme déjà mentionnée, page 26 paragraphe 2, est un outil important pour le diagnostic et le suivi des traitements. Les nanoparticules d'or peuvent être utilisées dans différents types d'imagerie en raison des propriétés intrinsèques de l'or et des nanostructures d'or mais également à la suite de modifications chimiques de surface qui permettent d'immobiliser des agents moléculaires d'imagerie (page 75 paragraphe 4.4.2). La capacité de l'or à fortement absorber les rayons X confèrent aux nanoparticules d'or un comportement d'agents de contraste pour l'imagerie par rayons X. Comme les nanoparticules d'or présentent des propriétés optiques modulables, elles peuvent également agir comme agents d'imagerie pour l'imagerie optique et l'imagerie photoacoustique. Enfin, l'immobilisation de fluorophores organiques, de chélates de gadolinium, de complexes de radioisotopes élargit la gamme de modalités d'imagerie possibles pour les nanoparticules d'or.

4.4.3.2.1. Imagerie optique

Les nanoparticules plasmoniques se distinguent par leurs remarquables caractéristiques d'absorption et de diffusion de la lumière. Les modifications de la taille et de la forme des NPs Au exercent un effet sur la diffusion, ce qui permet d'ajuster leurs propriétés optiques pour obtenir une diffusion maximale de la lumière. Le coefficient de réflexion et la section transversale optique augmentant tous deux avec la taille, les nanoparticules les plus grosses diffusent la lumière plus efficacement que les plus petites.[355] Les NPs Au ont été étudiées comme agents de contraste pour l'imagerie par diffusion de la lumière en raison de leurs caractéristiques avantageuses.[355], [378], [378]–[380]

Les bandes de résonance plasmonique transversale et longitudinale des nanobâtonnets d'Or (NRs Au) sont causées par l'oscillation des électrons de surface le long des axes x et y, respectivement. Lorsque le rapport d'aspect d'un bâtonnet augmente pour un diamètre donné, la bande transversale reste constante tandis que la bande longitudinale est détectée vers le rouge. El-Sayed *et al.* ont découvert que ces nanoparticules d'or avec un rapport d'aspect de 2 avaient une émission maximale de 540 nm, tandis que l'augmentation du rapport d'aspect à 5,4 entraînait une émission maximale de 740 nm.[381] Ces caractéristiques de luminescence ont été utilisées pour la biodétection de l'ADN.[382] Li *et al.* ont fonctionnalisé les nanoparticules d'or avec des séquences d'ADN pour atteindre cet objectif.[383] Les nanoparticules d'or se sont agrégées et le signal de luminescence a diminué lorsque des séquences complémentaires ont été introduites. Lorsque les nanoparticules d'or ont été chauffées et se sont désagrégées, le processus s'est inversé.

Tang *et al.* ont utilisé les nanoparticules d'or pour identifier les vaisseaux sanguins intestinaux de souris et ont utilisé l'imagerie confocale NIR pour examiner la forme de la vascularisation.[383] En utilisant la photoluminescence générée par deux photons, Park *et al.* ont pu visualiser la distribution 3D de nanocoquilles d'or luminescentes (AuNS :Au-nanoshells) dans des tumeurs de souris.[384] En utilisant l'effet EPR, les AuNS recouvertes de polyéthylène glycol se sont accumulées dans la tumeur.

D'autres travaux exploitent ces propriétés optiques. Par exemple, Loo *et al.* ont développé des nanocoquilles immuno-ciblées à base de cœurs de silice et coquilles d'or. Ces nanocoquilles offrent des propriétés uniques de la diffusion et l'absorption option selon l'épaisseur de la couche d'or. Elles peuvent fournir un contraste de diffusion pour l'imagerie *in vitro* tout en présentant une absorption suffisante pour permettre une thérapie photothermique efficace.[385]

En plus de leurs remarquables caractéristiques d'absorption et de diffusion de la lumière, les nanoparticules d'or présentent une fluorescence élevée avec un rendement quantique allant jusqu'à 10^{-3} . [386], [387] Les nanoclusters d'or (AuNC), constitués de quelques centaines d'atomes d'or avec une taille de noyau inférieur à 2 nm, ont fait l'objet d'une attention particulière dans l'imagerie de fluorescence grâce à leurs excellentes propriétés de fluorescence. Parmi une variété d'AuNC, les AuNC fonctionnalisés par des peptides et des

protéines sont les plus utilisés en imagerie.[388] Par exemple, Wu et ses collègues ont montré le potentiel d'imagerie tumorale des AuNC en utilisant des BSA³-AuNC comme agents d'imagerie. [389]

En plus de leurs propriétés optiques, les différents types de nanoparticules d'or, peuvent être rendus plus lumineux en ajoutant des colorants organiques à leur surface. Toutes ces propriétés rendent les nanoparticules d'or très intéressantes comme nanoparticules multifonctionnelles.

4.4.3.2.2. Imagerie par rayons X

Pour des tensions de tube à rayons X de l'ordre 120 à 140 kV, le numéro atomique et la densité électronique élevés de l'or sont à l'origine de l'absorption efficace des rayons X des nanoparticules d'or. Elle est supérieure à celle des agents de contraste traditionnels, des molécules à base d'iode, actuellement utilisés en clinique.[390] Du fait de leur caractère particulière qui assure un meilleur contrôle de la biodistribution, comparativement aux molécules, les NPs Au sont également caractérisées par une durée de circulation plus longue que celle des agents traditionnels ce qui rend possible une imagerie sur une plus longue durée, le ciblage de certains types de cellules ou de récepteurs, et le suivi des cellules.[391]–[393] Les charges utiles des NPs Au peuvent également être soigneusement régulées dans des supports biocompatibles.[343] Ces caractéristiques, ainsi que la biocompatibilité de l'or par rapport à d'autres éléments qui atténuent de manière aussi significative les rayons X, ont conduit à l'étude des NPs Au en tant qu'agents de contraste pour les méthodes d'imagerie par rayons X telles que la tomodensitométrie (tomographie axiale calculée par ordinateur ou scanographie (CT en anglais)).[339], [394]–[408]

Hainfeld et ses collègues ont démontré que des nanoparticules d'or de taille réduite (environ 2 nm) avec une couche organique hydrophile exerce une augmentation du contraste dans les tumeurs solides après injection intraveineuse. Afin d'anticiper l'utilisation de la tomodensitométrie spectrale, en particulier pour la détection de plaques vulnérables d'athérosclérose, Pan des laboratoires de recherche de Philips et ses collègues ont développé des agents de contraste obtenus par encapsulation de nanoparticules d'or dans des particules lipidiques stabilisées par des phospholipides.[409] Ces nanoparticules ont été utilisées pour détecter des caillots de sang formés *in vitro*. En outre, après l'injection de nanostructures d'or dans le pied de la souris, des ganglions lymphatiques sentinelles ont pu être détectés par tomodensitométrie spectrale après injection intraveineuse de ces nanoparticules.

4.4.3.2.3. Imagerie photoacoustique

L'imagerie photoacoustique repose sur la conversion de la lumière incidente en ondes ultrasonores qui seront traitées pour construire une image. Le principe de cette modalité d'imagerie repose sur l'absorption de brèves impulsions laser qui est à l'origine de cycles d'expansion et de contraction des zones illuminées en raison de l'échauffement induit par l'absorption. La répétition de ces cycles génère des trains d'onde dans la gamme des ultrasons qui sont quotidiennement exploités dans des examens cliniques par

³ Bovine Serum Albumin

échographie. L'imagerie photoacoustique présente plusieurs avantages par rapport à d'autres techniques d'imagerie, notamment l'absence de rayonnement ionisant et l'utilisation d'ultrasons en sortie, ce qui permet d'obtenir une meilleure résolution spatiale que les méthodes optiques en raison de la diffusion réduite des ultrasons dans les tissus. Cette modalité d'imagerie peut différencier les tissus car les différents types de tissus biologiques ont des coefficients d'absorption de la lumière distincts. Les NPs Au conçues pour absorber dans la région spectrale du proche infrarouge (NIR), c'est-à-dire dans le domaine de transparence des tissus biologiques, se comportent comme agents de contraste prometteurs pour l'imagerie photoacoustique.[410][411]–[415] Cette approche d'imagerie a été utilisée avec une variété de nanostructures en or dont la taille et/ou la forme (par exemple, les cages, [416], [417] les nanosphères [418] et les nanobâtonnets [418]) ont été adaptées pour garantir l'absorption plasmonique dans la région du NIR.[419]–[423]

4.4.3.3. Thérapie

Les propriétés des nanoparticules d'or exploitées pour l'imagerie (absorption de la lumière NIR, des photons X) leur confèrent également un potentiel thérapeutique qui a été révélé par de nombreuses études. La possibilité de combiner imagerie et activité thérapeutique télécommandée est un atout indéniable des nanoparticules d'or pour des applications médicales car elle permet, entre autres, de guider la thérapie par l'imagerie pour une meilleure personnalisation des traitements. Les différences physiologiques entre chaque patient obligent pour une même pathologie à adapter le traitement aux caractéristiques individuelles des personnes malades. Un immense espoir est placé dans le développement d'agents théranostiques car leur capacité de guider la thérapie par l'imagerie s'inscrit parfaitement dans la stratégie de la médecine personnalisée qui est au cœur de nombreux développements visant à améliorer à la fois l'efficacité des traitements et le confort des patients.

En plus de leurs propriétés intrinsèques, les nanoparticules d'or du fait de leur structure particulière et de la relative facilité à les fonctionnaliser sont adaptées pour la délivrance contrôlée et ciblée de principes actifs.

4.4.3.3.1. Délivrance des principes actifs

Les NPs Au présentent un certain nombre de caractéristiques qui les rendent idéales pour l'administration de principes actifs. Le noyau en métal noble est inerte, ce qui se traduit par une toxicité minimale et une excellente biocompatibilité, deux éléments essentiels pour les applications biologiques.[356] L'accès relativement aisé à une large gamme de taille et de forme des NPs Au permet de sélectionner les structures optimales pour transporter et livrer de façon contrôlée et ciblée des principes actifs tels que des protéines, des peptides, des oligonucléotides ou de minuscules molécules pharmacologiques.[337], [338], [424] En outre, une large surface et une variété de chimies de surface facilitent l'immobilisation non seulement des agents thérapeutiques mais aussi d'autres entités, notamment des molécules de ciblage, des agents de couplage et des entités qui confèrent une modalité d'imagerie supplémentaire (agents de contraste pour l'IRM, traceurs). En raison du besoin considérable de nouvelles thérapies dans ce domaine, les NPs Au ont été largement étudiées [425]–[428] pour être utilisées dans la thérapie anticancéreuse.[429]–[434] Dans ce

contexte, l'effet EPR peut amener les NPs Au à se concentrer de manière préférentielle dans les tumeurs malignes.

Tomuleasa *et al.* ont étudié trois formulations différentes de NPs Au incorporant de la doxorubicine, du cisplatine ou de la capécitabine pour le traitement du cancer du foie dans un scénario classique.[435] Les principes actifs moléculaires ont été immobilisés de manière non covalente sur des NPs Au recouvertes d'acide aspartique. La comparaison des effets thérapeutiques a été réalisée avec des cellules de carcinome hépatocellulaire, des cellules de carcinome hépatocellulaire résistant à la chimiothérapie et des cellules hépatiques non cancéreuses. Par rapport aux principes actifs libres, les formulations constituées des conjugués NPs Au-principe actif ont obtenu de meilleurs résultats thérapeutiques. L'immobilisation des principes actifs sur les nanoparticules d'or permet de contourner les mécanismes de résistance. Il en résulte que les formulations développées par Tomuleasa et ses collègues sont capables d'éradiquer des cellules pourtant résistantes à la chimiothérapie.

Kumar *et al.* ont combiné traitement et ciblage actif en fonctionnalisant les NPs Au avec des peptides thérapeutiques et de ciblage.[436] Le premier peptide, PMI, interfère avec la voie p53 et peut ainsi induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Le deuxième peptide CRGDK se lie au récepteur de la neuropiline-1, qui est surexprimé sur les cellules cancéreuses. Les deux types de peptides ont été liés de manière covalente à des NPs Au d'un diamètre de 2 nm. Deux lignées cellulaires de cancer du sein qui expriment des récepteurs pour lesquels les peptides possèdent une affinité, les cellules MDA-MB-321 qui expriment fortement le récepteur de la neuropiline-1 et les cellules MCF-7S qui présentent une faible expression du même récepteur, ont été utilisées pour examiner l'internalisation et les effets thérapeutiques. L'incubation de ces cellules avec les nanoparticules d'or conduit à une mortalité *in vitro* plus forte pour les cellules MDA-MB-321 que pour MCF-7S. Cela reflète un fort potentiel pour la thérapie ciblée des nanoparticules d'or.

Heo *et al.* ont décrit une plateforme complexe à base de nanoparticules d'or qui comprend de la biotine comme ligand de ciblage, du paclitaxel comme principe actif anticancéreux, de la rhodamine B pour la détection par la fluorescence et du PEG pour une biocompatibilité accrue.[437] Afin de ne pas entraver son action thérapeutique, le paclitaxel n'a pas été greffé de façon covalente mais a été immobilisé par inclusion dans des molécules de cyclodextrine, qui recouvrent la surface des nanoparticules d'or. En raison de la surexpression des récepteurs de la biotine dans certaines cellules cancéreuses, la biotine a été utilisée comme agent de ciblage. Ces NPs Au ont été testées *in vitro* en utilisant une approche multimodale avec trois lignées de cellules cancéreuses (HeLa, A549 et MG63), ainsi que des fibroblastes (NIH3T3) comme témoins. Par rapport aux cellules témoins, les cellules cancéreuses présentaient un taux de viabilité deux fois moins élevé après avoir été traitées avec des NPs Au pendant 24 heures. Dans les trois lignées de cellules cancéreuses, la microscopie champ sombre et de fluorescence a montré une plus grande internalisation des nanoparticules d'or que dans le cas des cellules témoins. Cette étude met en lumière le potentiel de cette plateforme polyvalente qui se comporte comme un agent théranostique (agent combinant **thérapie et diagnostic**).

Paciotti *et al.* ont créé une formulation composée de NPs Au revêtues d'une combinaison de facteur de nécrose tumorale (TNF) et de polyéthylène glycol (PEG). Bien que le TNF présente une activité anticancéreuse reconnue, son application thérapeutique est limitée en raison de sa toxicité systémique.[438] L'idée mise en avant par l'équipe de Paciotti est de considérer que l'immobilisation de TNF sur les nanoparticules d'or permettrait de minimiser l'impact systémique du TNF tout en augmentant l'accumulation dans les tumeurs. Chez les souris porteuses de tumeurs, les études de la formulation NPs Au-TNF ont révélé une multiplication par 9 de l'accumulation de TNF dans la tumeur. En outre, le développement de la tumeur a été ralenti et la survie a été améliorée. Ces résultats encourageants ont incité à lancer une étude clinique de phase I chez des patients atteints de cancers solides avancés en utilisant les NPs Au-TNF.[439] Des doses allant jusqu'à 600 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ont été étudiées et se sont avérées sûres. Les NPs Au ont été trouvées dans les biopsies obtenues à partir des tumeurs malignes des patients, mais pas dans les tissus sains. L'efficacité de ce traitement chez les patients devra être évaluée dans de futures études cliniques de phase II.

4.4.3.3.2. Thérapie photothermique (PTT)

Les nanoparticules d'or présentent un grand intérêt pour le traitement photothermique (PTT) en raison de leurs caractéristiques uniques, telles que l'absorption et la diffusion des rayonnements électromagnétiques. La PTT consiste à éradiquer les cellules cancéreuses par une augmentation localisée de la température ($>42^\circ\text{C}$) induite par l'absorption d'un rayonnement électromagnétique (idéalement dans le domaine NIR). Depuis le XVII^e siècle, le chauffage local ou global du corps entier est utilisée dans le traitement des tumeurs.[440] L'hyperthermie (c'est-à-dire l'augmentation de température par des causes externes à l'organisme), tant locale que globale, induit une rupture de la membrane cellulaire et une dénaturation des protéines, ce qui entraîne la mort cellulaire. Malheureusement, les tissus sains sont également endommagés au cours de ce processus, ce qui constitue le principal défaut des PTT et empêche leur utilisation dans un cadre thérapeutique. L'utilisation du rayonnement laser, qui permet la destruction contrôlée des tissus cancéreux, a permis d'atténuer cet inconvénient.[441], [442] Les techniques modernes de PTT ont une spécificité accrue, sont moins invasives et possèdent une sélectivité spatio-temporelle précise, ce qui en fait une option viable pour le traitement des cancers résistant à la chimiothérapie.

L'efficacité de la PTT peut être encore améliorée en utilisant des agents photothermiques (en particulier des composés nanométriques), qui permettent une conversion plus efficace de la lumière en chaleur. Plusieurs thérapies photothermiques reposant sur des agents chauffants nanométriques ont été largement étudiées à cette fin. [443], [444] Les nanoparticules d'or de différentes formes présentent plusieurs avantages à cet égard, notamment un large spectre de maxima d'absorption (de l'UV au NIR) et de grandes sections transversales d'absorption. L'usage des nanoparticules d'or comme agents chauffants pour la PTT permet de réduire les périodes de dépôt de dose et la puissance laser par rapport à des agents chauffants moléculaires (en général, des colorants comme le vert d'indocyanine).[445] En particulier, la zone NIR est cruciale car, contrairement à la lumière visible, les plus grandes longueurs d'onde de la lumière peuvent pénétrer les tissus biologiques. Dans la "fenêtre de transparence des tissus biologiques" (650-900 nm), une

zone favorable à l'absorption SPR de certaines nanostructures à base d'or (cœur diélectrique, coquille d'or, nanobâtonnets d'or, nanocages d'or, multipodes d'or, étoiles/oursins d'or...), la pénétration de la lumière peut atteindre quelques centimètres. L'irradiation dans la gamme SPR est particulièrement intéressante car elle est suivie d'une conversion rapide de la lumière en chaleur.[307] L'utilisation des nanoparticules d'or en PTT est régie par leur taille, leur forme et leur structure, qui ont toutes un impact significatif sur les caractéristiques photothermiques.[446]–[448]

Hirsch *et al.* ont rapporté la première étude sur les possibilités d'utilisation des nanoparticules d'or dans le traitement photothermique en 2003. Ils ont utilisé des nanocoquilles d'or/silice modifiées par des chaînes de PEG avec un diamètre du cœur de silice de 110 nm et une épaisseur de coquille de 10 nm. Ces nanocoquilles sont caractérisées par une bande d'absorption centrée vers 820 nm. Une augmentation de la mortalité a été constatée lorsque des cellules cancéreuses épithéliales mammaires humaines SK-BR-3 incubées en présence de telles constructions ont été exposées à un rayonnement NIR. En revanche, les cellules non traitées exposées au même rayonnement n'ont présenté aucune perte de viabilité. En outre, des expériences *in vivo* ont indiqué que des doses modestes de lumière NIR génèrent une augmentation substantielle de la température dans les tumeurs solides traitées avec des NPs Au. Un tel échauffement était capable de causer des dommages permanents aux tissus.[158]

Plusieurs autres groupes de recherche se sont intéressés au potentiel photothermique des nanobâtonnets et des nanocoquilles d'or. Stern *et al.* ont étudié des nanocoquilles silice/or non modifiées dont la taille du cœur de silice est de 110 nm et celle de la coquille d'or de 10 nm. Ces nanoparticules ont été capables de déclencher la mort cellulaire de deux lignées cellulaires humaines de cancer de la prostate (PC-3 et C4-2) lorsqu'elles ont été exposées à la lumière NIR (810 nm), alors que les cellules soumises au rayonnement seul n'ont pas été endommagées.[449] Des expériences *in vivo* sur des souris porteuses de tumeur de la prostate (PC-3) ayant reçu des injections dorsales de nanoparticules d'or ont corroboré ce résultat.[450] Des expériences *in vivo* destinées à évaluer le potentiel des nanoparticules cœur/coquille silice/or PEGylées pour la photothermie induite par le NIR ont révélé que l'irradiation de modèles de souris saines perturbait le tissu musculaire dans la région de localisation des nanoparticules, mais qu'aucun autre tissu n'était endommagé.[451] En outre, chez des souris porteuses de tumeurs après implantation de cellule cancéreuse colorectales humaines, de telles nanocoquilles d'or à cœur de silice fonctionnalisées avec du PEG ont pu améliorer la perfusion tumorale après exposition à la lumière NIR, entraînant ainsi une diminution de la proportion hypoxique des tumeurs (HCT : hypoxic proportion of tumors).

4.4.3.3. Radiothérapie

Depuis qu'il a été démontré que les rayons X permettent de contrôler la croissance tumorale, la radiothérapie est largement utilisée en clinique, seule ou combinée avec la chirurgie et/ou la chimiothérapie. La radiothérapie repose sur l'effet cytotoxique des radiations ionisantes (X, γ , protons (protonthérapie), C^{6+} (hadronthérapie)) qui en altérant les acides nucléiques, les protéines, les organites cellulaires induisent un dysfonctionnement de la cellule. Malgré la mise en œuvre d'un ensemble de mécanismes de réparation, les dommages sont tellement nombreux et importants que les cellules irradiées meurent. Les cellules

cancéreuses et donc la tumeur peuvent être éradiquées par l'absorption des radiations ionisantes. Cependant, il est difficile de déposer la dose thérapeutique uniquement dans la tumeur. La différence de la composition chimique entre les tissus sains et la tumeur est trop faible pour garantir une absorption sélective des rayonnements ionisants. Il en résulte que le traitement par radiothérapie manque de sélectivité : les tissus sains sont trop altérés alors que la tumeur ne l'est pas assez. Comme il est impossible d'augmenter la dose d'entrée sans endommager les tissus dont la préservation est un objectif aussi important que l'éradication complète de la tumeur solide, il a été proposé plusieurs pistes pour augmenter la sélectivité de la radiothérapie. Trois axes ont été explorés pour détruire les tumeurs par radiothérapie tout en préservant les tissus sains :

- La nature du rayonnement : les ions (H^+ et C^{6+}) sont très prometteurs car ils permettent de déposer l'essentiel de la dose dans un volume réduit
- La balistique : en déplaçant la source d'irradiation autour du patient, il est possible d'augmenter la dose dans la tumeur tout en la maintenant à niveau faible dans les tissus sains
- Le radiorehaussement : en modifiant la composition chimique des tumeurs (et seulement des tumeurs) par des éléments de numéro atomique (Z) élevé, il est possible de favoriser le dépôt de dose dans la tumeur. Il en résulte que la tumeur peut être éradiquée avec une dose plus faible et que les tissus sains se trouvant sur le parcours sont mieux préservés.

Les travaux pionniers de Hainfeld et de ses collègues ont validé ce principe du radiorehaussement (souvent nommé à tort radiosensibilisation) en utilisant des nanoparticules d'or ($Z_{Au} = 79$) pour modifier la composition chimique des tumeurs. Hainfeld *et al.* ont testé des NPs Au recouvertes de molécules de glucose thiolé de 1,9 nm pour augmenter l'effet des radiations chez des animaux porteurs de tumeurs.[452] Le développement tumoral a été fortement ralenti voire inhibé chez les souris traitées aux rayons X après injection intraveineuse d'une suspension de ces nanoparticules d'or (1,35 g d'Au/kg), tandis que la croissance tumorale chez les animaux traités uniquement aux rayons X a persisté, bien que plus lentement que chez les souris non traitées. En outre, 86 % des souris auxquelles on a injecté 2,7 g d'Au/kg avant d'être exposées aux rayons X étaient encore en vie un an plus tard, soit une proportion nettement supérieure à celle des témoins. Ces travaux ont ouvert la voie au développement de nanoparticules pour améliorer les effets de la radiothérapie.

Liu *et al.* ont étudié les effets de diverses sources de rayons X sur la survie des cellules cancéreuses en présence et en l'absence de NPs Au recouvertes de PEG.[453] Ils ont découvert que lorsque les cellules étaient exposées aux rayons X en présence de NPs Au, leur survie diminuait d'une manière qui dépend de la dose. Les cellules survivantes présentaient un aspect déformé et une distribution irrégulière des organites, ce qui était un autre indicateur de l'impact thérapeutique.

Si les nanoparticules d'or ont été très étudiées comme agents rehausseurs de dose pour la radiothérapie externe (la dose est délivrée par une source externe), des travaux ont montré le potentiel des nanoparticules d'or radioactives pour la curiethérapie (les radiations thérapeutiques sont émises par les nanoparticules

d'or). Les NPs Au enrobées d'acide ascorbique et produits à partir de sels d'or-198 ont été étudiées pour leur potentiel radiothérapeutique dans les années 1950 et 1960 comme méthode alternative.[454]–[457] L'objectif dans ce domaine est que les nanoparticules se concentrent préférentiellement dans les tumeurs et émettent un rayonnement qui lorsqu'il est absorbé par les cellules cancéreuses induit la mort cellulaire. Cette stratégie a récemment été ressuscitée grâce à l'amélioration des procédés de fabrication des nanoparticules et des matériaux de revêtement. Un revêtement d'épigallocatechine comme agent de ciblage a été utilisé pour fabriquer des NPs Au radioactives.[457] L'épigallocatechine-gallate a été choisie car son efficacité a été démontrée dans le traitement du cancer de la prostate.[454] Pour établir que les particules ont été absorbées par les cellules cancéreuses de la prostate, les chercheurs ont utilisé la microscopie à champ sombre et la microscopie électronique de transmission. Lorsque ces nanoparticules ont été introduites dans des tumeurs de souris, le développement tumoral a été stoppé pendant 35 jours, ce qui montre que les nanoparticules d'or radioactives ont eu un impact thérapeutique.

D'autres types de nanoparticules, comme les nanoparticules radioactives palladium-or, sont apparues comme une alternative aux nanoparticules à base d'Or-198. La stratégie d'utiliser du palladium radioactif ($[^{103}\text{Pd}]\text{Pd}$) au lieu de l'or radioactif ($[^{198}\text{Au}]\text{Au}$) est basée sur l'utilisation du radio-isotope de palladium ($[^{103}\text{Pd}]\text{Pd}$) en curiethérapie à faible dose. Deux voies de synthèses principales ont été étudiées : 1) la réduction des sels métalliques et 2) le remplacement galvanique.[458]–[460] Un avantage incontestable de la voie de réduction est que la structure cœur-coquille améliore le dépôt de dose via l'effet radiosensibilisant. Dans ce cas, les photons interagissent avec la couche d'or des nanoparticules Au-Pd et les électrons secondaires émis par la couche d'or génèrent des cascades d'ionisation. La synthèse des nanoparticules Au-Pd se fait en deux étapes : 1) la réduction du $[^{103}\text{Pd}]\text{Pd}$ dans un milieu aqueux pour former le cœur des nanoparticules, 2) la réduction de l'or pour former la coquille entourant le cœur $[^{103}\text{Pd}]\text{Pd}$. Pour améliorer leur stabilité et leur biocompatibilité, des polymères de PEG sont greffés à leur surface. Dans cette étude, deux types de nanoparticules ont été développés : 1) les nanoparticules contenant $[^{103}\text{Pd}]\text{Pd}$ seulement ($[^{103}\text{Pd}]\text{Pd}@Au\text{-PEG}$) 2) les nanoparticules contenant ^{103}Pd combiné avec ^{198}Au . ($[^{103}\text{Pd}]\text{Pd}@[^{198}\text{Au}]\text{Au-PEG}$). Ces nanoparticules sont administrées par injection intratumorale dans des souris porteuses du cancer de la prostate (PC3). Après 4 semaines une diminution de 56% et de 75% du volume tumoral est observée par rapport aux témoins pour les nanoparticules $[^{103}\text{Pd}]\text{Pd}@Au\text{-PEG}$ et $[^{103}\text{Pd}]\text{Pd}@[^{198}\text{Au}]\text{Au-PEG}$ respectivement.[458]

4.5. Nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules magnétiques (MNP : magnetic nanoparticles) d'une taille comprise entre 1 et 100 nm sont devenues un nanomatériau essentiel pour la recherche et la technologie. Leurs caractéristiques distinctives, notamment un rapport surface/volume élevé et des propriétés magnétiques dépendant de la taille, les distinguent des matériaux massifs parents. Ces dernières années, de nombreux travaux ont été consacrés à la production de nanoparticules magnétiques (MNP), ainsi qu'à la compréhension de leur comportement et à l'amélioration de leur application dans divers domaines.[461], [462] Les caractéristiques physicochimiques, la stabilité colloïdale, le comportement et le devenir biologique des MNP sont tous régis par un contrôle précis

des conditions de synthèse et de la fonctionnalisation de surface. Les plateformes magnétiques destinées aux applications biologiques, pharmaceutiques et médicales, doivent avoir une taille minuscule et une distribution de taille étroite, ainsi que des valeurs de magnétisme élevées. Enfin, pour garantir la tolérance et la biocompatibilité, ainsi qu'une localisation précise à l'emplacement de la cible biologique, elles doivent présenter le revêtement de surface le plus adapté possible. L'administration de principes actifs, l'hyperthermie, l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'ingénierie tissulaire et la cicatrisation des tissus, la biodétection, les séparations biochimiques et la bioanalyse ont toutes été largement explorées à l'aide de MNP dotées d'une physicochimie adaptée et de caractéristiques de surface personnalisées. Ces nanoparticules satisfont parfaitement les critères requis pour les agents théranostiques, à savoir la combinaison de l'imagerie (IRM) et d'une activité thérapeutique (transports et délivrance de principes actifs, agents chauffants en hyperthermie magnétique). Les MNPs constituent donc des objets prometteurs pour le développement de la nanomédecine.[463] Plusieurs essais cliniques sont d'ailleurs en cours pour évaluer le potentiel des nanosystèmes magnétiques pour des applications médicales.[461], [464], [465]

4.5.1. Les propriétés physicochimiques des nanoparticules d'oxyde de fer à contrôler

La préparation des nanoparticules magnétiques pour des applications médicales nécessite le contrôle des propriétés physico-chimiques de ces nanoparticules. Plusieurs paramètres influencent ces propriétés comme la taille, la forme, la structure, la charge de surface... Les caractérisations magnétiques, par exemple, ont montré que la magnétisation à saturation des particules d'oxyde de fer diminue lorsque la taille des particules diminue. En IRM, il a été démontré que la taille des particules d'oxyde de fer affecte le signal (c'est-à-dire la relaxation transversale $R_2=1/T_2$), ce qui peut avoir des implications sur la précision du diagnostic.[466], [467]

D'autre part, la chimie de surface joue un rôle important pour pouvoir exploiter leurs propriétés en milieu biologique. Les nanoparticules magnétiques sont exposées à un pH physiologique légèrement basique (pH 7,4) et à une force ionique modérément élevée (140 mEq/L) après administration intraveineuse. L'aggrégation des nanoparticules est généralement causée par ces conditions.

En effet, la stabilité des suspensions colloïdales va être régie par les différentes interactions attractives et répulsives entre les nanoparticules et le milieu ainsi que les nanoparticules entre elles. Les interactions dipolaires magnétiques, dans le cas des nanoparticules magnétiques, viennent s'ajouter aux interactions de Van der Waals (forces attractives très fortes à courte distance entre objets de même nature), aux interactions électrostatiques (qui sont soit attractives, soit répulsives) et aux interactions par effet stérique (forces répulsives) présentes dans toute suspension colloïdale.

Pour assurer la stabilité colloïdale, il est évident que les forces répulsives doivent être supérieures aux forces attractives. Par conséquent, la stabilité des particules magnétiques *in vitro* et *in vivo* n'est possible que si ces effets sont compensés par : (1) une répulsion électrostatique entre des surfaces adéquatement chargées ; (2) des interactions hydrophiles entre particules (lorsque des particules hydrophobes sont en suspension dans des solutions hydrophiles, elles ont tendance à interagir avec des particules de leur type plutôt qu'avec le liquide hydrophile) ; et/ou (3) la présence d'une coquille adéquate (barrière stérique) à la surface de la

particule.[465], [468] Ces interactions doivent surpasser les interactions de Van der Waals et les interactions magnétiques dipolaires.

La stabilité colloïdale dans un milieu approprié est une nécessité pour les applications médicales des nanoparticules magnétiques. Les nanoparticules magnétiques présentent une faible sédimentation gravitationnelle dans le flux sanguin, en raison de leur densité moyenne modeste. Pour éviter l'agrégation des particules *in vitro* et *in vivo*, il faut s'assurer que les nanoparticules soient protégées contre l'agrégation, et contre les processus d'interaction avec les protéines plasmatiques (opsonisation). [465], [469]–[472]. La stabilisation stérique, en greffant des polymères biocompatibles (PEG), offre une stabilité adéquate même à de plus grandes concentrations d'électrolytes et dans une large gamme de valeurs de pH lorsque la densité de molécules à la surface des nanoparticules est suffisamment importante.[473]

Les propriétés magnétiques des nanoparticules utilisées doivent respecter ces contraintes [469], [470], [474], [475]. Pour cela leur magnétisation résiduelle en absence de champ magnétique doit être négligeable ou inexistante. Seules les nanoparticules superparamagnétiques ou constituées de matériaux ferro- ou ferri-magnétiques doux répondent à ce critère. C'est le cas des nanoparticules composées de magnétite (Fe_3O_4) ou de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), qui ont un cycle d'hystérésis limité et, par conséquent, une aimantation rémanente modeste.[465], [476]–[478]

En réalité, le magnétisme résiduel nul ou minimal des nanoparticules superparamagnétiques est une caractéristique intrigante qui empêche l'agrégation pendant le stockage et après l'administration intraveineuse. Les particules ne présentent plus d'interaction magnétique (rémanence et coercivité négligeables) lorsque le champ magnétique est supprimé. L'agglomération (ainsi que l'embolisation possible des vaisseaux capillaires) est donc évitée.[479], [480]

Les particules superparamagnétiques présentent d'autres avantages, notamment (1) un échauffement dû au processus de relaxation de Néel lorsqu'elles sont exposées à un champ magnétique alternatif (AMF: alternating magnetic field) [480], [481] et (2) une amélioration significative des durées de relaxation des protons T_1 et T_2 . [482]

Donc, l'utilisation des nanoparticules magnétiques pour des applications médicales est soumise à un contrôle précis de leurs propriétés physico-chimiques. La stabilité colloïdale et le magnétisme des nanoparticules sont des facteurs choisis selon le type, la forme et la taille des nanoparticules magnétiques choisies.

4.5.2. Utilisation dans le domaine médical

La délivrance par libération contrôlée de principes actifs a fait l'objet d'une attention particulièrement grande au cours des dernières décennies avec l'objectif d'améliorer l'efficacité et la sécurité pharmacologiques grâce à un contrôle accru de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamique des médicaments.[483], [484] En raison de leur réactivité au champ magnétique, les MNPs sont des transporteurs de principes actifs prometteurs : un champ magnétique extracorporel peut concentrer ces nanodispositifs sur le site souhaité, les y maintenir pendant une période déterminée jusqu'à ce que le principe actif encapsulé soit libéré, minimisant

ainsi les effets secondaires associés aux médicaments en raison d'une distribution non spécifique.[485]–[490]–[494] Par ailleurs, sous l'effet d'un champ magnétique alternatif (AMF) externe, la capacité des MNP à générer de la chaleur peut contribuer à un mécanisme thérapeutique appelé hyperthermie magnétique. L'échauffement localisé peut induire la mort cellulaire pour des températures supérieures à 42°C. Cette augmentation de température peut également être utilisée pour libérer de façon contrôlée les molécules de principe actif.

Si le guidage magnétique et l'hyperthermie magnétique reposent tous deux sur les propriétés magnétiques des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer, leur application dépendra en partie de leur taille. Les petites NPs ont une meilleure perméabilité tissulaire et sont donc meilleures pour la génération de chaleur, mais les plus grandes particules sont plus adaptées pour le ciblage magnétique en raison de leur sensibilité accrue au guidage magnétique.[495]

4.5.2.1. Administration de principes actifs

Senyei et Widder *et al.* ont suggéré l'idée d'utiliser des MNP/microbilles magnétiques comme supports pour des applications thérapeutiques ciblées à la fin des années 1970.[496], [497] Les substances thérapeutiques (telles que les principes actifs cytotoxiques pour la chimiothérapie et l'ADN pour le traitement génique) sont soit liées à la surface des supports magnétiques, soit encapsulées dans la matrice polymère qui les abrite. Ces assemblages particules-principes actifs sont administrés au patient par voie orale ou intraveineuse. Ils sont ensuite guidés et concentrés vers les endroits soumis à un champ magnétique extérieur à haut gradient. Les substances chimiques thérapeutiques sont libérées par le clivage enzymatique des liens retenant les principes actifs sur ou dans les nanoparticules, le contrôle des interactions électrostatiques, le changement de pH, la dégradation de la matrice polymère ou le chauffage des particules une fois qu'elles ont été concentrées sur la zone ciblée dans le corps.[486], [498]–[500] Le caractère non spécifique de la chimiothérapie, qui tue les cellules saines en plus des cibles primaires (c'est-à-dire les cellules cancéreuses), est considérablement réduit par cette approche de ciblage basée sur les porteurs magnétiques. De plus, en injectant et en délivrant avec précision les substances thérapeutiques dans les zones ciblées, elle diminue la dispersion systémique des produits chimiques cytotoxiques et permet une thérapie réussie avec des doses plus faibles.

Les MNPs sont parmi les supports magnétiques les plus utilisés pour l'administration de principes actifs. Pour augmenter la stabilité colloïdale, ces nanoparticules sont souvent recouvertes d'une matrice organique telle que des polysaccharides, des acides gras ou d'autres polymères.[461], [501]–[503] Lorsque le champ externe est supprimé, les MNP ne laissent aucune magnétisation résiduelle, ce qui empêche leur agrégation et facilite leur élimination de l'organisme. L'hypothèse qui sous-tend le ciblage magnétique est qu'en présence d'un gradient de champ magnétique, une force de translation est imposée à la combinaison particule-principes actifs, la poussant vers l'aimant et la piégeant à l'emplacement cible .[486], [504] Le débit sanguin, les caractéristiques de surface des supports magnétiques, les propriétés magnétiques des particules, l'intensité du champ magnétique et le gradient de champ magnétique jouent tous un rôle dans le succès du piégeage de l'assemblage particules-principes actifs dans la zone cible à traiter.

L'un des principaux obstacles à l'extension du ciblage magnétique des petits animaux à l'être humain est que l'intensité du champ magnétique diminue rapidement avec la distance[498]. C'est l'un des principaux obstacles qui empêche son application clinique. Outre le problème du champ magnétique, il existe un certain nombre d'autres obstacles à la distribution des principes actifs aux endroits ciblés, notamment l'absorption non spécifique par les cellules saines, la clairance rapide et l'agrégation dans la circulation. Pour surmonter ces obstacles, un vecteur médicamenteux idéal doit posséder les caractéristiques suivantes : une couche protectrice pour maintenir le vecteur stable et empêcher l'absorption cellulaire non spécifique, une capacité à cibler les tumeurs pour s'accumuler sur les sites tumoraux, une adhésion cellulaire médiée par un ligand pour une entrée cellulaire efficace, et une encapsulation efficace du principe actif pour permettre sa libération uniquement à l'intérieur des cellules tumorales.[505]

Comme les transporteurs superparamagnétiques possèdent diverses fonctionnalités, telles que l'administration ciblée de principes actifs anticancéreux, l'hyperthermie et l'imagerie, ils ont fait l'objet de nombreux travaux remarquables ces dernières années qui ont révélé leur potentiel prometteur pour la délivrance guidée et contrôlée des principes actifs.[506]–[512]

4.5.2.2. Thérapie par hyperthermie

L'hyperthermie magnétique est une thérapie potentielle contre le cancer qui est actuellement testée dans des études cliniques.[513]–[516] La thérapie par hyperthermie magnétique est basée sur l'échauffement des nanoparticules magnétiques présentes dans les tissus malades à une température supérieure à 42°C. Au-delà de cette température, la fragilisation voire la destruction des cellules tumorales est observée. Pour cela, un champ magnétique alternatif est utilisé pour provoquer une augmentation locale de la température dans les tissus cibles où se trouvent les nanoparticules. L'hyperthermie magnétique se sert des points faibles des tumeurs malignes : (1) l'accumulation des agents d'hyperthermie au sein de la tumeur à cause de l'effet EPR. (2) les cellules cancéreuses sont plus sensibles à l'hyperthermie que les cellules saines car elles ont un pH plus bas. En milieu acidifié, l'augmentation de la température aurait un effet plus déstabilisateur sur les protéines cellulaires ce qui engendre une perturbation des mécanismes enzymatiques maintenant les cellules en vie.[517] (3) l'organisme tente de lutter contre l'hyperthermie par la perfusion, or cette dernière est très irrégulière et faible au sein des tumeurs. La prolifération des tumeurs malignes stimule la formation anarchique de nouveaux vaisseaux sanguins. Ces vaisseaux se ramifient en nœuds et impasses, ils s'affaissent régulièrement et mettent souvent les zones tumorales en hypoxie. Les cellules en hypoxie n'étant plus en mesure d'éliminer suffisamment les substances toxiques du sang, elles ont un pH faible. Elles essayent alors de soustraire de l'oxygène au cellule. Ces mécanismes sont responsables des modifications très importantes dans la perfusion des tumeurs les rendant moins efficaces pour la lutte contre l'hyperthermie.

Le champ alternatif utilisé dans l'hyperthermie magnétique se situe dans la bande RF (Radiofréquence), entre quelques kHz et 1 MHz, qui est parfaitement sûre et a une profondeur de pénétration suffisante pour atteindre les organes et tissus à l'intérieur du corps. L'hyperthermie magnétique peut être provoquée par divers processus de chauffage, notamment les relaxations browniennes et de Néel.

Dans un environnement liquide, chaque nanoparticule superparamagnétique conserve un moment magnétique constant, et sa direction est régie par l'anisotropie effective de la particule. Le moment est décalé de sa direction préférée par un champ magnétique externe, et la relaxation du moment pour revenir à l'équilibre libre de l'énergie thermique, ce qui entraîne un chauffage local. [518]

Ces dernières années, de nombreuses études se sont concentrées sur l'optimisation de l'efficacité du chauffage des MNP en termes de propriétés intrinsèques telles que la taille des particules, [519]–[522] la constante d'anisotropie, [520], [523]–[525] l'aimantation à saturation, [526] les orientations des axes faciles, [527], [528] les propriétés extrinsèques telles que la fréquence et l'amplitude du champ alternatif, [519] et le rôle des interactions dipolaires.[515], [520], [527], [529]–[531]

4.5.2.3. Agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie non invasive qui permet de produire des images anatomiques à haute résolution. Comparés à d'autres agents de contraste IRM tels que les chélates d'ions paramagnétiques (complexe acide diéthylènetriaminopentaacétique- Gd^{3+} (DTPA- Gd^{3+}), agents T_1), les SPIONs sont d'excellents agents de contraste IRM en raison de leur propriété T_2^* avec une excellente sensibilité dans les images pondérées T_2^* et T_2 . [461], [464], [532], [533] En raison de l'induction d'une susceptibilité magnétique élevée sur les protons de l'eau autour des particules, ces effets de relaxation T_2 provoquent une diminution du signal sur les images pondérées T_2 , ce qui se traduit par un contraste sombre ou négatif.[534]

Les SPIONs (>50 nm de diamètre) sont rapidement séquestrés par les macrophages hépatiques et spléniques après injection intraveineuse (IV), ce qui donne des images pondérées en T_2 de tissus normaux. L'absence de cellules de Küpffer dans la tumeur du foie permet de distinguer les zones saines des zones malignes. Les SPIONs ayant un très petit diamètre (moins de 50 nm) échappent à une absorption importante par les macrophages du foie et de la rate, ce qui leur confère des caractéristiques de circulation prolongée. En fait, ces SPIONs peuvent s'extravaser de la circulation systémique vers l'espace interstitiel et accéder aux tissus malades plus profonds avant d'être absorbés par les macrophages inflammatoires locaux après une injection intraveineuse. [535]–[538] Plusieurs mécanismes sont proposés pour transporter les SPIONs de taille inférieure à 50 nm vers les tissus malades : (1) L'endocytose par les monocytes sanguins activés, suivie de la migration vers les tissus pathologiques ; (2) la transcytose à travers l'endothélium vasculaire, suivie de l'absorption par les macrophages dans les tissus pathologiques ; et (3) le passage direct à travers le système vasculaire inflammatoire non étanche.[539] Par conséquent, les très petits SPIONs ont été utilisés pour l'imagerie d'un large éventail de maladies et ont été évalués dans des contextes précliniques et cliniques.

Les SPIONs ont été utilisés pour imager avec succès les plaques d'athérosclérose sur la paroi artérielle.[540]–[542] L'examen des échantillons de plaques après la chirurgie a indiqué la présence de SPIONs dans les macrophages activés, probablement en raison de l'endocytose des SPIONs par les macrophages.[234] Les SPIONs n'ont pas été détectés dans l'endothélium vasculaire en raison de la fréquence importante de ces cellules phagocytaires dans les zones de plaques.[539] Chez les patients humains atteints de sténose

carotidienne, plusieurs autres études ont également montré l'accumulation des SPIONs injectés dans les macrophages des régions de la plaque, [542], [543] principalement dans la majorité des lésions rompues ou susceptibles de se rompre.

5. Conclusion et Plan de la thèse

Dans ce chapitre, j'ai présenté les informations de la littérature sur l'évolution des nanotechnologies jusqu'à l'introduction des nanoparticules dans les applications dans le domaine médical. J'ai ensuite exposé les types d'imagerie médicale et les deux maladies qui seront au centre de mes travaux de thèse (cancer et athérosclérose). Notre équipe NCM à l'institut UTINAM, depuis plusieurs années, travaille sur le développement d'une plateforme à base de nanoparticules d'or recouvertes par des chélateurs organiques pour la radiothérapie du cancer guidée par imagerie. Les premières nanoparticules d'or synthétisées étaient des nanoparticules d'or recouvertes d'un chélateur linéaire, le DTDTPA dérivé dithiolé du DTPA. L'or, comme déjà mentionné, présente plusieurs intérêts pour des applications médicales : son pouvoir radiosensibilisant peut être exploité pour améliorer les traitements par radiothérapie. Le chélateur DTDTPA est capable de former des complexes stables avec des ions d'intérêt pour l'imagerie médicale comme l'ion Gd^{3+} qui est un agent de contraste positif pour l'IRM et l'ion $[^{111}In]In^{3+}$ pour l'imagerie nucléaire. L'immobilisation de ces ions dans la couche organique de DTDTPA permet de suivre leur biodistribution et leur accumulation dans les zones d'intérêt. Les nanoparticules obtenues sont de petite tailles (diamètre de cœur métallique entre 2 à 3 nm et diamètre hydrodynamique inférieur à 10 nm). Elles sont stables en milieu physiologique sur une longue période. Le potentiel de ces nanoparticules pour des applications médicales ont été testées *in vivo* dans le cadre d'expériences précliniques. Comme la taille des nanoparticules est petite, on observe une élimination rénale rapide de ces nanoparticules non biodégradables. Comme ces nanoparticules présentent une biodistribution adaptée avec une accumulation dans les tumeurs (en particulier les gliosarcomes), elles ont permis de traiter efficacement les tumeurs par rayons X. L'IRM a joué un rôle déterminant car le délai entre l'injection des nanoparticules d'or, à la fois agents de contraste positif pour l'IRM et agents radiosensibilisants, et l'irradiation a été fixée de façon optimale grâce aux données collectées par l'imagerie. Les nanoparticules $Au@DTDTPA(Gd)$ possèdent un potentiel prometteur pour la radiothérapie guidée par IRM. Cependant avant d'envisager des essais cliniques, les chélateurs linéaires (DTDTPA) ont été remplacés par des chélateurs macrocycliques de type DOTAGA et NODAGA (thèse de Gautier Laurent et de Farhan Bouraleh Hoch). Les chélateurs macrocycliques de type DOTAGA possèdent un pouvoir complexant bien supérieur (environ 1000 fois) à celui du DTDTPA : cette caractéristique est essentielle pour envisager une application fiable de ces nanoparticules car elle limite considérablement la libération indésirable des ions Gd^{3+} toxiques. Les chélateurs macrocycliques qui ont été proposés sont le TADOTA, le TADOTAGA et le TANODAGA (Figure 5-1). Les trois chélateurs, développés dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Pr Franck Denat (P2DA, ICMUB, Dijon), sont capables de complexer différents types d'ions qui sont utilisés comme agent d'imagerie. TADOTA et TADOTAGA forment des complexes stables avec les ions gadolinium pour l'IRM et indium-111

pour la SPECT alors que TANODAGA a ouvert la voie à la PET car ce chélateur macrocyclique est plus sûr que TADOTAGA et TADOTA pour former des complexes stables avec les ions cuivre-64 et gallium-68. Le deuxième obstacle à l'utilisation en clinique de ces nanoparticules est leur élimination rénale nécessaire mais trop rapide. Il en résulte une sous-exploitation des propriétés radiosensibilisantes de ces nanoparticules. Plusieurs stratégies ont été proposées pour pouvoir augmenter le temps de résidence vasculaire des nanoparticules. La stratégie d'augmentation de la taille du cœur des nanoparticules a été écartée afin de conserver l'élimination rénale de ces nanoparticules.

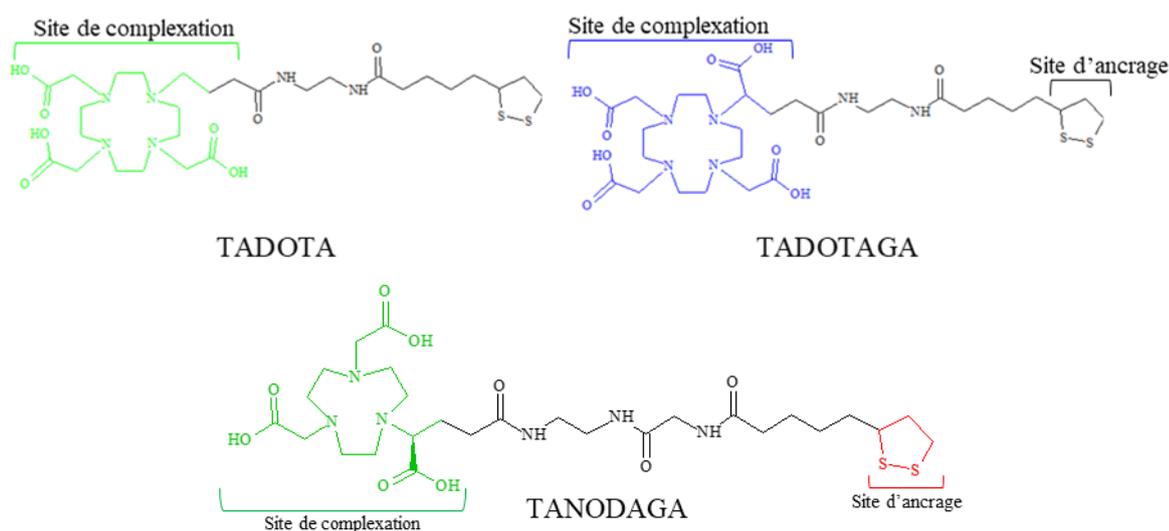


Figure 5-1 : Schéma des différentes molécules organiques utilisées comme chélateurs

Dans le cadre de la thèse, j'ai travaillé sur deux autres stratégies afin de surmonter cette sous-exploitation. Le chapitre 2 est consacré à l'étude de l'influence de la PEGylation sur le comportement *in vivo* des nanoparticules d'or et sur le traitement de tumeurs par radiothérapie. La seconde stratégie qui est présentée dans le chapitre 3, consiste à utiliser des nanotransporteurs biodégradables à base de nanofleurs d'oxyde de fer superparamagnétiques pour retarder l'élimination rénale des nanoparticules d'or et à fonctionnaliser ces nanostructures par des agents de reconnaissance pour un ciblage actif des nanoparticules. Dans les travaux antérieurs de l'équipe NCM (thèses de Gloria Jiménez Sánchez et Nasser Mohamed Saïd), des assemblages nanofleurs-nanoparticules d'or ont été obtenus et caractérisés. Ces assemblages sont également prometteurs pour la radiothérapie guidée par imagerie et pour la thérapie photothermique [544]. Dans le cadre de ma thèse, le potentiel des nanofleurs dorées pour l'imagerie de plaques d'athérosclérose a été évalué.

6. Références

- [1] P. Sharma, S. Brown, G. Walter, S. Santra, et B. Moudgil, « Nanoparticles for bioimaging », *Advances in colloid and interface science*, vol. 123, p. 471-485, 2006.
- [2] M. E. Davis, Z. Chen, et D. M. Shin, « Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer », *Nanoscience and technology: A collection of reviews from nature journals*, p. 239-250, 2010.
- [3] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, et R. Langer, « Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy », in *Nano-Enabled Medical Applications*, Jenny Stanford Publishing, 2020, p. 61-91.
- [4] G. S. Kwon et T. Okano, « Polymeric micelles as new drug carriers », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 21, n° 2, p. 107-116, 1996.
- [5] J. R. McCarthy et R. Weissleder, « Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, n° 11, p. 1241-1251, 2008.
- [6] J. Lu, E. Choi, F. Tamanoi, et J. I. Zink, « Light-activated nanoimpeller-controlled drug release in cancer cells », *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, vol. 4, n° 4, p. 421, 2008.
- [7] S. S. Agasti, A. Chomposor, C.-C. You, P. Ghosh, C. K. Kim, et V. M. Rotello, « Photoregulated release of caged anticancer drugs from gold nanoparticles », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, n° 16, p. 5728-5729, 2009.
- [8] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C.-W. Wu, et V. S.-Y. Lin, « Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, n° 11, p. 1278-1288, 2008.
- [9] A. Louie, « Multimodality imaging probes: design and challenges », *Chemical reviews*, vol. 110, n° 5, p. 3146-3195, 2010.
- [10] S. Jiang, M. K. Gnanasammandhan, et Y. Zhang, « Optical imaging-guided cancer therapy with fluorescent nanoparticles », *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 7, n° 42, p. 3-18, 2010.
- [11] J. V. Jokerst et S. S. Gambhir, « Molecular imaging with theranostic nanoparticles », *Accounts of chemical research*, vol. 44, n° 10, p. 1050-1060, 2011.
- [12] X. Ma, Y. Zhao, et X.-J. Liang, « Theranostic nanoparticles engineered for clinic and pharmaceuticals », *Accounts of chemical research*, vol. 44, n° 10, p. 1114-1122, 2011.
- [13] K. E. Uhrich, S. M. Cannizzaro, R. S. Langer, et K. M. Shakesheff, « Polymeric systems for controlled drug release », *Chemical Reviews-Columbus*, vol. 99, n° 11, p. 3181-3198, 1999.

- [14] Y. Bae, N. Nishiyama, et K. Kataoka, « *In vivo* antitumor activity of the folate-conjugated pH-sensitive polymeric micelle selectively releasing adriamycin in the intracellular acidic compartments », *Bioconjugate chemistry*, vol. 18, n° 4, p. 1131-1139, 2007.
- [15] H. Wei, S.-X. Cheng, X.-Z. Zhang, et R.-X. Zhuo, « Thermo-sensitive polymeric micelles based on poly (N-isopropylacrylamide) as drug carriers », *Progress in Polymer Science*, vol. 34, n° 9, p. 893-910, 2009.
- [16] S. Yang *et al.*, « Visible-light degradable polymer coated hollow mesoporous silica nanoparticles for controlled drug release and cell imaging », *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 1, n° 36, p. 4628-4636, 2013.
- [17] M. S. Yavuz *et al.*, « Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light », *Nature materials*, vol. 8, n° 12, p. 935-939, 2009.
- [18] J.-M. Schumers, C.-A. Fustin, et J.-F. Gohy, « Light-responsive block copolymers », *Macromolecular rapid communications*, vol. 31, n° 18, p. 1588-1607, 2010.
- [19] W.-S. Cho *et al.*, « Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles », *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 236, n° 1, p. 16-24, 2009.
- [20] L. Chronopoulou *et al.*, « Chitosan-coated PLGA nanoparticles: a sustained drug release strategy for cell cultures », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 103, p. 310-317, 2013.
- [21] C. Tassa, S. Y. Shaw, et R. Weissleder, « Dextran-coated iron oxide nanoparticles: a versatile platform for targeted molecular imaging, molecular diagnostics, and therapy », *Accounts of chemical research*, vol. 44, n° 10, p. 842-852, 2011.
- [22] M. Okada, « Chemical syntheses of biodegradable polymers », *Progress in polymer science*, vol. 27, n° 1, p. 87-133, 2002.
- [23] J. Cheng *et al.*, « Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for *in vivo* targeted drug delivery », *Biomaterials*, vol. 28, n° 5, p. 869-876, 2007.
- [24] M. Shi, J. Lu, et M. S. Shoichet, « Organic nanoscale drug carriers coupled with ligands for targeted drug delivery in cancer », *Journal of materials chemistry*, vol. 19, n° 31, p. 5485-5498, 2009.
- [25] S. M. Grayson et J. M. Frechet, « Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications », *Chemical reviews*, vol. 101, n° 12, p. 3819-3868, 2001.
- [26] W. J. Mulder, G. J. Strijkers, G. A. Van Tilborg, D. P. Cormode, Z. A. Fayad, et K. Nicolay, « Nanoparticulate assemblies of amphiphiles and diagnostically active materials for multimodality imaging », *Accounts of chemical research*, vol. 42, n° 7, p. 904-914, 2009.

- [27] J. Lemière, « Cytosquelette d'actine et déformations membranaires: du liposome à la reconstruction cellulaire », PhD Thesis, 2014. doi: 10.13140/RG.2.1.2488.4722.
- [28] S. P. Vyas *et al.*, « Solid lipid nanoparticles (SLNs) as a rising tool in drug delivery science: one step up in nanotechnology », *Current Nanoscience*, vol. 4, n° 1, p. 30-44, 2008.
- [29] B. Basu, K. Garala, R. Bhalodia, B. Joshi, et K. Mehta, « Solid lipid nanoparticles: A promising tool for drug delivery system », *J Pharm Res*, vol. 3, n° 1, p. 84-92, 2010.
- [30] P. N. Prasad, *Introduction to nanomedicine and nanobioengineering*, vol. 7. John Wiley & Sons, 2012.
- [31] P. Alivisatos, « The use of nanocrystals in biological detection », *Nature biotechnology*, vol. 22, n° 1, p. 47-52, 2004.
- [32] R. Hardman, « A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors », *Environmental health perspectives*, vol. 114, n° 2, p. 165-172, 2006.
- [33] K. Welsher *et al.*, « A route to brightly fluorescent carbon nanotubes for near-infrared imaging in mice », *Nature nanotechnology*, vol. 4, n° 11, p. 773-780, 2009.
- [34] S. Zhu *et al.*, « Highly photoluminescent carbon dots for multicolor patterning, sensors, and bioimaging », *Angewandte Chemie*, vol. 125, n° 14, p. 4045-4049, 2013.
- [35] Y.-P. Sun *et al.*, « Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, n° 24, p. 7756-7757, 2006.
- [36] X. Wang *et al.*, « Photoinduced electron transfers with carbon dots », *Chemical Communications*, n° 25, p. 3774-3776, 2009.
- [37] X. Huang *et al.*, « Effect of injection routes on the biodistribution, clearance, and tumor uptake of carbon dots », *ACS nano*, vol. 7, n° 7, p. 5684-5693, 2013.
- [38] R. Liu, D. Wu, S. Liu, K. Koynov, W. Knoll, et Q. Li, « An aqueous route to multicolor photoluminescent carbon dots using silica spheres as carriers », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 48, n° 25, p. 4598-4601, 2009.
- [39] R. Ye *et al.*, « Coal as an abundant source of graphene quantum dots », *Nature communications*, vol. 4, n° 1, p. 1-7, 2013.
- [40] S. Zhu *et al.*, « Strongly green-photoluminescent graphene quantum dots for bioimaging applications », *Chemical communications*, vol. 47, n° 24, p. 6858-6860, 2011.
- [41] X. Yan, X. Cui, et L. Li, « Synthesis of large, stable colloidal graphene quantum dots with tunable size », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, n° 17, p. 5944-5945, 2010.

- [42] L. Wang *et al.*, « Gram-scale synthesis of single-crystalline graphene quantum dots with superior optical properties », *Nature communications*, vol. 5, n° 1, p. 1-9, 2014.
- [43] M. Nurunnabi, Z. Khatun, G. R. Reeck, D. Y. Lee, et Y. Lee, « Photoluminescent graphene nanoparticles for cancer phototherapy and imaging », *ACS applied materials & interfaces*, vol. 6, n° 15, p. 12413-12421, 2014.
- [44] Q. Liu, B. Guo, Z. Rao, B. Zhang, et J. R. Gong, « Strong two-photon-induced fluorescence from photostable, biocompatible nitrogen-doped graphene quantum dots for cellular and deep-tissue imaging », *Nano letters*, vol. 13, n° 6, p. 2436-2441, 2013.
- [45] B. Wiley *et al.*, « Shape-controlled synthesis of silver and gold nanostructures », *Mrs Bulletin*, vol. 30, n° 5, p. 356-361, 2005.
- [46] P. N. Prasad, *Nanophotonics*. John Wiley & Sons, 2004.
- [47] E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, et M. A. El-Sayed, « The golden age: gold nanoparticles for biomedicine », *Chemical Society Reviews*, vol. 41, n° 7, p. 2740-2779, 2012.
- [48] J. L. West et N. J. Halas, « Engineered nanomaterials for biophotonics applications: improving sensing, imaging, and therapeutics », *Annual review of biomedical engineering*, vol. 5, n° 1, p. 285-292, 2003.
- [49] S. E. Skrabalak, L. Au, X. Li, et Y. Xia, « Facile synthesis of Ag nanocubes and Au nanocages », *Nature protocols*, vol. 2, n° 9, p. 2182-2190, 2007.
- [50] K. H. Song, C. Kim, C. M. Cobley, Y. Xia, et L. V. Wang, « Near-infrared gold nanocages as a new class of tracers for photoacoustic sentinel lymph node mapping on a rat model », *Nano letters*, vol. 9, n° 1, p. 183-188, 2009.
- [51] A. C. Bonoiu *et al.*, « Nanotechnology approach for drug addiction therapy: gene silencing using delivery of gold nanorod-siRNA nanoplex in dopaminergic neurons », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, n° 14, p. 5546-5550, 2009.
- [52] M. Zheng, F. Davidson, et X. Huang, « Ethylene glycol monolayer protected nanoparticles for eliminating nonspecific binding with biological molecules », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 125, n° 26, p. 7790-7791, 2003.
- [53] J. M. Luther, P. K. Jain, T. Ewers, et A. P. Alivisatos, « Localized surface plasmon resonances arising from free carriers in doped quantum dots », *Nature materials*, vol. 10, n° 5, p. 361-366, 2011.
- [54] X. Liu *et al.*, « Au-Cu_{2-x}Se heterodimer nanoparticles with broad localized surface plasmon resonance as contrast agents for deep tissue imaging », *Nano letters*, vol. 13, n° 9, p. 4333-4339, 2013.

- [55] Q. A. Pankhurst, N. T. K. Thanh, S. K. Jones, et J. Dobson, « Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine », *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 42, n° 22, p. 224001, 2009.
- [56] C. C. Berry, « Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine », *Journal of physics D: Applied physics*, vol. 42, n° 22, p. 224003, 2009.
- [57] C. C. Berry et A. S. Curtis, « Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine », *Journal of physics D: Applied physics*, vol. 36, n° 13, p. R198, 2003.
- [58] P. Majewski et B. Thierry, « Functionalized magnetite nanoparticles—synthesis, properties, and bio-applications », *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, vol. 32, n° 3-4, p. 203-215, 2007.
- [59] A. Hervault et N. T. K. Thanh, « Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer », *Nanoscale*, vol. 6, n° 20, p. 11553-11573, sept. 2014, doi: 10.1039/C4NR03482A.
- [60] G. Barrera *et al.*, « Specific Loss Power of Co/Li/Zn-Mixed Ferrite Powders for Magnetic Hyperthermia », *Sensors*, vol. 20, n° 7, Art. n° 7, janv. 2020, doi: 10.3390/s20072151.
- [61] H. Ow, D. R. Larson, M. Srivastava, B. A. Baird, W. W. Webb, et U. Wiesner, « Bright and stable core–shell fluorescent silica nanoparticles », *Nano letters*, vol. 5, n° 1, p. 113-117, 2005.
- [62] W. Stöber, A. Fink, et E. Bohn, « Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range », *Journal of colloid and interface science*, vol. 26, n° 1, p. 62-69, 1968.
- [63] Z. Li, J. C. Barnes, A. Bosoy, J. F. Stoddart, et J. I. Zink, « Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications », *Chemical Society Reviews*, vol. 41, n° 7, p. 2590-2605, 2012.
- [64] S. Santra, R. Tapeç, N. Theodoropoulou, J. Dobson, A. Hebard, et W. Tan, « Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in microemulsion: the effect of nonionic surfactants », *Langmuir*, vol. 17, n° 10, p. 2900-2906, 2001.
- [65] S. T. Selvan, P. K. Patra, C. Y. Ang, et J. Y. Ying, « Synthesis of silica-coated semiconductor and magnetic quantum dots and their use in the imaging of live cells », *Angewandte chemie*, vol. 119, n° 14, p. 2500-2504, 2007.
- [66] W. Liu *et al.*, « Gold nanorod@ chiral mesoporous silica core–shell nanoparticles with unique optical properties », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 135, n° 26, p. 9659-9664, 2013.
- [67] S. Liu, G. Chen, T. Y. Ohulchanskyy, M. T. Swihart, et P. N. Prasad, « Facile synthesis and potential bioimaging applications of hybrid upconverting and plasmonic NaGdF₄: Yb³⁺, Er³⁺/silica/gold nanoparticles », *Theranostics*, vol. 3, n° 4, p. 275, 2013.
- [68] P. Yang, S. Gai, et J. Lin, « Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery », *Chemical Society Reviews*, vol. 41, n° 9, p. 3679-3698, 2012.

- [69] J. Liu, W. Bu, L. Pan, et J. Shi, « NIR-triggered anticancer drug delivery by upconverting nanoparticles with integrated azobenzene-modified mesoporous silica », *Angewandte Chemie*, vol. 125, n° 16, p. 4471-4475, 2013.
- [70] H. S. Qian, H. C. Guo, P. C.-L. Ho, R. Mahendran, et Y. Zhang, « Mesoporous-silica-coated up-conversion fluorescent nanoparticles for photodynamic therapy », *small*, vol. 5, n° 20, p. 2285-2290, 2009.
- [71] J. Cichos et M. Karbowski, « A general and versatile procedure for coating of hydrophobic nanocrystals with a thin silica layer enabling facile biofunctionalization and dye incorporation », *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 2, n° 5, p. 556-568, 2014.
- [72] I. Roy *et al.*, « Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: a nonviral, nanomedicine approach for gene delivery », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, n° 2, p. 279-284, 2005.
- [73] R. Kumar *et al.*, « Covalently dye-linked, surface-controlled, and bioconjugated organically modified silica nanoparticles as targeted probes for optical imaging », *ACS nano*, vol. 2, n° 3, p. 449-456, 2008.
- [74] I. Roy *et al.*, « Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: A novel drug-carrier system for photodynamic therapy », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 125, n° 26, p. 7860-7865, 2003.
- [75] R. Kumar *et al.*, « *In vivo* biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles », *ACS nano*, vol. 4, n° 2, p. 699-708, 2010.
- [76] J. A. MacKay et Z. Li, « Development of theranostic agents that co-deliver therapeutic and imaging agents », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 62, n° 11, 2010.
- [77] B. Sumer et J. Gao, « Theranostic nanomedicine for cancer », 2008.
- [78] S. M. Janib, A. S. Moses, et J. A. MacKay, « Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 62, n° 11, p. 1052-1063, 2010.
- [79] T. Lammers, V. Subr, K. Ulbrich, W. E. Hennink, G. Storm, et F. Kiessling, « Polymeric nanomedicines for image-guided drug delivery and tumor-targeted combination therapy », *Nano Today*, vol. 5, n° 3, p. 197-212, 2010.
- [80] J. Xie, S. Lee, et X. Chen, « Nanoparticle-based theranostic agents », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 62, n° 11, p. 1064-1079, 2010.
- [81] X. Chen, S. S. Gambhir, et J. Cheon, « Theranostic nanomedicine », *Accounts of chemical research*, vol. 44, n° 10, p. 841-841, 2011.

- [82] E. Terreno, F. Uggeri, et S. Aime, « Image guided therapy: the advent of theranostic agents », *Journal of controlled release*, vol. 161, n° 2, p. 328-337, 2012.
- [83] T. Lammers, S. Aime, W. E. Hennink, G. Storm, et F. Kiessling, « Theranostic nanomedicine », *Accounts of chemical research*, vol. 44, n° 10, p. 1029-1038, 2011.
- [84] S. Kunjachan, J. Jayapaul, M. E Mertens, G. Storm, F. Kiessling, et T. Lammers, « Theranostic systems and strategies for monitoring nanomedicine-mediated drug targeting », *Current pharmaceutical biotechnology*, vol. 13, n° 4, p. 609-622, 2012.
- [85] D. P. Cormode, T. Skajaa, Z. A. Fayad, et W. J. Mulder, « Nanotechnology in medical imaging: probe design and applications », *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 29, n° 7, p. 992-1000, 2009.
- [86] R. A. Pooley, « Fundamental Physics of MR Imaging », *RadioGraphics*, vol. 25, n° 4, p. 1087-1099, juill. 2005, doi: 10.1148/rg.254055027.
- [87] H. O. A. Denis, *L'IRM pas à pas*. Lulu. com.
- [88] C. F. Geraldès et S. Laurent, « Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging », *Contrast media & molecular imaging*, vol. 4, n° 1, p. 1-23, 2009.
- [89] S.-P. Lin et J. J. Brown, « MR contrast agents: physical and pharmacologic basics », *Journal of Magnetic Resonance Imaging: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 25, n° 5, p. 884-899, 2007.
- [90] H. Gries, « Extracellular MRI contrast agents based on gadolinium », *Contrast Agents I*, p. 1-24, 2002.
- [91] H. B. Na, I. C. Song, et T. Hyeon, « Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents », *Advanced Materials*, vol. 21, n° 21, p. 2133-2148, 2009, doi: 10.1002/adma.200802366.
- [92] J. W. M. Bulte et D. L. Kraitchman, « Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging », *NMR in Biomedicine*, vol. 17, n° 7, p. 484-499, 2004, doi: 10.1002/nbm.924.
- [93] N. Wartenberg, « Développement de nano-traceurs à base d'organolanthanides pour applications biologiques et marquage de matériaux », Université Claude Bernard-Lyon I, 2012.
- [94] Y. Javed *et al.*, « Biodegradation Mechanisms of Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers and Tunable Shield Effect of Gold Coating », *Small*, vol. 10, n° 16, p. 3325-3337, 2014, doi: 10.1002/sml.201400281.
- [95] L. Lartigue *et al.*, « Cooperative Organization in Iron Oxide Multi-Core Nanoparticles Potentiates Their Efficiency as Heating Mediators and MRI Contrast Agents », *ACS Nano*, vol. 6, n° 12, p. 10935-10949, déc. 2012, doi: 10.1021/nm304477s.

- [96] J. Hsieh, *Computed tomography: principles, design, artifacts, and recent advances*, vol. 114. SPIE press, 2003.
- [97] J. M. Widmark, « Imaging-related medications: a class overview », in *Baylor University Medical Center Proceedings*, 2007, vol. 20, n° 4, p. 408-417.
- [98] J. Zhang *et al.*, « Polymers for Improved Delivery of Iodinated Contrast Agents », *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 8, n° 1, p. 32-53, janv. 2022, doi: 10.1021/acsbiomaterials.1c01082.
- [99] C. Alric *et al.*, « The biodistribution of gold nanoparticles designed for renal clearance », *Nanoscale*, vol. 5, n° 13, p. 5930, 2013, doi: 10.1039/c3nr00012e.
- [100] S. Guerrero *et al.*, « Synthesis and *In Vivo* Evaluation of the Biodistribution of a ¹⁸F-Labeled Conjugate Gold-Nanoparticle-Peptide with Potential Biomedical Application », *Bioconjugate Chem.*, vol. 23, n° 3, p. 399-408, mars 2012, doi: 10.1021/bc200362a.
- [101] Y. Wang *et al.*, « Evaluating the Pharmacokinetics and *In Vivo* Cancer Targeting Capability of Au Nanocages by Positron Emission Tomography Imaging », *ACS Nano*, vol. 6, n° 7, p. 5880-5888, juill. 2012, doi: 10.1021/nn300464r.
- [102] T. J. Ruth, « The uses of radiotracers in the life sciences », *Rep. Prog. Phys.*, vol. 72, n° 1, p. 016701, janv. 2009, doi: 10.1088/0034-4885/72/1/016701.
- [103] R. D. Badawi, « Nuclear medicine », *Physics education*, vol. 36, n° 6, p. 452, 2001.
- [104] R. Bar-Shalom, A. Y. Valdivia, et M. D. Blafox, « PET imaging in oncology », in *Seminars in nuclear medicine*, 2000, vol. 30, n° 3, p. 150-185.
- [105] A. Chopra, « [⁷⁴As]-Labeled monoclonal antibody against anionic phospholipids », *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)[Internet]*, 2008.
- [106] E. D. Pressly *et al.*, « Structural effects on the biodistribution and positron emission tomography (PET) imaging of well-defined ⁶⁴Cu-labeled nanoparticles comprised of amphiphilic block graft copolymers », *Biomacromolecules*, vol. 8, n° 10, p. 3126-3134, 2007.
- [107] N. K. Devaraj, E. J. Keliher, G. M. Thurber, M. Nahrendorf, et R. Weissleder, « ¹⁸F labeled nanoparticles for *in vivo* PET-CT imaging », *Bioconjugate chemistry*, vol. 20, n° 2, p. 397-401, 2009.
- [108] M. M. Herth, M. Barz, M. Jahn, R. Zentel, et F. Rösch, « ⁷²/⁷⁴As-labeling of HPMA based polymers for long-term *in vivo* PET imaging », *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, vol. 20, n° 18, p. 5454-5458, 2010.
- [109] F. Roesch, « Scandium-44: benefits of a long-lived PET radionuclide available from the ⁴⁴Ti/⁴⁴Sc generator system », *Current radiopharmaceuticals*, vol. 5, n° 3, p. 187-201, 2012.

- [110] C. Müller *et al.*, « Promising prospects for ^{44}Sc -/ ^{47}Sc -based theragnostics: application of ^{47}Sc for radionuclide tumor therapy in mice », *Journal of nuclear medicine*, vol. 55, n° 10, p. 1658-1664, 2014.
- [111] R. Chakravarty *et al.*, « Matching the decay half-life with the biological half-life: immunoPET imaging with ^{44}Sc -labeled cetuximab Fab fragment », *Bioconjugate chemistry*, vol. 25, n° 12, p. 2197-2204, 2014.
- [112] S. S. Gambhir, « Molecular imaging of cancer with positron emission tomography », *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, n° 9, p. 683-693, 2002.
- [113] K. C. Li, S. D. Pandit, S. Guccione, et M. D. Bednarski, « Molecular imaging applications in nanomedicine », *Biomedical Microdevices*, vol. 6, n° 2, p. 113-116, 2004.
- [114] W. Cai et X. Chen, « Nanoplatfoms for Targeted Molecular Imaging in Living Subjects », *Small*, vol. 3, n° 11, p. 1840-1854, nov. 2007, doi: 10.1002/sml.200700351.
- [115] W. Ping Li, L. A. Meyer, D. A. Capretto, C. D. Sherman, et C. J. Anderson, « Receptor-binding, biodistribution, and metabolism studies of ^{64}Cu -DOTA-cetuximab, a PET-imaging agent for epidermal growth-factor receptor-positive tumors », *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, vol. 23, n° 2, p. 158-171, 2008.
- [116] O. de Dreuille, P. Maszelin, H. Foehrenbach, G. Bonardel, et J.-F. Gaillard, « Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP) », *EMC - Radiologie*, vol. 1, n° 1, p. 2-35, févr. 2004, doi: 10.1016/j.emcrad.2003.12.001.
- [117] M. M. Herth *et al.*, « Radioactive labeling of defined HPMA-based polymeric structures using ^{18}F FETos for *in vivo* imaging by positron emission tomography », *Biomacromolecules*, vol. 10, n° 7, p. 1697-1703, 2009.
- [118] M. Nahrendorf *et al.*, « ^{18}F -4V for PET-CT Imaging of VCAM-1 Expression in Atherosclerosis », *JACC: Cardiovascular Imaging*, vol. 2, n° 10, p. 1213-1222, 2009.
- [119] E. J. Keliher, T. Reiner, A. Turetsky, S. A. Hilderbrand, et R. Weissleder, « High-Yielding, Two-Step ^{18}F Labeling Strategy for ^{18}F -PARP1 Inhibitors », *ChemMedChem*, vol. 6, n° 3, 2011.
- [120] J. A. Hendricks, E. J. Keliher, B. Marinelli, T. Reiner, R. Weissleder, et R. Mazitschek, « *In vivo* PET imaging of histone deacetylases by ^{18}F -suberoylanilide hydroxamic acid (^{18}F -SAHA) », *Journal of medicinal chemistry*, vol. 54, n° 15, p. 5576-5582, 2011.
- [121] T. Reiner, E. J. Keliher, S. Earley, B. Marinelli, et R. Weissleder, « Synthesis and *in vivo* imaging of a ^{18}F -labeled PARP1 inhibitor using a chemically orthogonal scavenger-assisted high-performance method », *Angewandte Chemie international edition*, vol. 50, n° 8, p. 1922-1925, 2011.

- [122] J. A. Hendricks, E. J. Keliher, D. Wan, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, et R. Mazitschek, « Synthesis of [18F] BODIPY: bifunctional reporter for hybrid optical/positron emission tomography imaging », *Angewandte Chemie*, vol. 124, n° 19, p. 4681-4684, 2012.
- [123] H. Schieferstein *et al.*, « 18F-Radiolabeling, Preliminary Evaluation of Folate-pHPMA Conjugates via PET », *Macromolecular bioscience*, vol. 14, n° 10, p. 1396-1405, 2014.
- [124] T. Hara *et al.*, « 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography enables the detection of recurrent same-site deep vein thrombosis by illuminating recently formed, neutrophil-rich thrombus », *Circulation*, vol. 130, n° 13, p. 1044-1052, 2014.
- [125] D. W. Townsend, « Multimodality imaging of structure and function », *Phys. Med. Biol.*, vol. 53, n° 4, p. R1-R39, févr. 2008, doi: 10.1088/0031-9155/53/4/R01.
- [126] B. J. Pichler, H. F. Wehrl, A. Kolb, et M. S. Judenhofer, « Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance Imaging: The Next Generation of Multimodality Imaging? », *Seminars in Nuclear Medicine*, vol. 38, n° 3, p. 199-208, mai 2008, doi: 10.1053/j.semnuclmed.2008.02.001.
- [127] C. Goetz, E. Breton, P. Choquet, V. Israel-Jost, et A. Constantinesco, « SPECT Low-Field MRI System for Small-Animal Imaging », *J Nucl Med*, vol. 49, n° 1, p. 88-93, janv. 2008, doi: 10.2967/jnumed.107.044313.
- [128] L. E. Jennings et N. J. Long, « 'Two is better than one'—probes for dual-modality molecular imaging », *Chem. Commun.*, n° 24, p. 3511, 2009, doi: 10.1039/b821903f.
- [129] B. Nikoobakht et M. A. El-Sayed, « Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method », *Chem. Mater.*, vol. 15, n° 10, p. 1957-1962, mai 2003, doi: 10.1021/cm020732l.
- [130] M. Delehedde, *Que sait-on du cancer?* EDP sciences, 2020.
- [131] « IARC: Home ». <https://www.iarc.fr/> (consulté le 5 septembre 2021).
- [132] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, et D. Forman, « Global cancer statistics », *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 61, n° 2, p. 69-90, 2011, doi: 10.3322/caac.20107.
- [133] « Global Cancer Observatory ». <https://gco.iarc.fr/> (consulté le 5 septembre 2021).
- [134] « Fondation contre le Cancer ». <https://www.cancer.be/> (consulté le 5 septembre 2021).
- [135] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « The Hallmarks of Cancer », *Cell*, vol. 100, n° 1, p. 57-70, janv. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [136] F. El Hage, S. Abouzahr-Rifai, F. Meslin, F. Mami-Chouaib, et S. Chouaib, « Immune response and cancer », *Bulletin du cancer*, vol. 95, n° 1, p. 57-67, 2008.

- [137] P. Carmeliet, « Angiogenesis in life, disease and medicine », *Nature*, vol. 438, n° 7070, p. 932-936, déc. 2005, doi: 10.1038/nature04478.
- [138] M. Zygunt, F. Herr, K. Münstedt, U. Lang, et O. D. Liang, « Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy », *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 110, p. S10-S18, sept. 2003, doi: 10.1016/S0301-2115(03)00168-4.
- [139] G. Ségala, « L'angiogenèse du tissu tumoral », *Futura*. <https://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-cancer-mecanismes-biologiques-1453/page/13/> (consulté le 27 décembre 2021).
- [140] A. Bikfalvi, « Tumor angiogenesis », *Bulletin du cancer*, vol. 94, n° 6, p. 193-198, 2007.
- [141] G. Bergers et L. E. Benjamin, « Tumorigenesis and the angiogenic switch », *Nat Rev Cancer*, vol. 3, n° 6, p. 401-410, juin 2003, doi: 10.1038/nrc1093.
- [142] D. Hanahan et J. Folkman, « Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis », *Cell*, vol. 86, n° 3, p. 353-364, août 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80108-7.
- [143] H. Verheul, E. Voest, et R. Schlingemann, « Are tumours angiogenesis-dependent? », *J. Pathol.*, vol. 202, n° 1, p. 5-13, janv. 2004, doi: 10.1002/path.1473.
- [144] R. Kerbel et J. Folkman, « Clinical translation of angiogenesis inhibitors », *Nat Rev Cancer*, vol. 2, n° 10, p. 727-739, oct. 2002, doi: 10.1038/nrc905.
- [145] R. Mazon, J. Bourhis, et E. Deutsch, « Angiogenèse et radiothérapie : tout ce qu'un oncologue radiothérapeute doit savoir », *Cancer/Radiothérapie*, vol. 12, n° 1, p. 50-60, janv. 2008, doi: 10.1016/j.canrad.2007.12.002.
- [146] R. K. Jain, « Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy », *Science*, vol. 307, n° 5706, p. 58-62, 2005.
- [147] P. Mehlen et A. Puisieux, « Metastasis: a question of life or death », *Nat Rev Cancer*, vol. 6, n° 6, p. 449-458, juin 2006, doi: 10.1038/nrc1886.
- [148] P. Carmeliet et R. K. Jain, « Angiogenesis in cancer and other diseases », *Nature*, vol. 407, n° 6801, p. 249-257, sept. 2000, doi: 10.1038/35025220.
- [149] S. M. Weis et D. A. Cheresh, « Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability », *Nature*, vol. 437, n° 7058, p. 497-504, sept. 2005, doi: 10.1038/nature03987.
- [150] D. M. McDonald et P. L. Choyke, « Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic », *Nat Med*, vol. 9, n° 6, p. 713-725, juin 2003, doi: 10.1038/nm0603-713.
- [151] D. Ribatti, B. Nico, E. Crivellato, et A. Vacca, « The structure of the vascular network of tumors », *Cancer Letters*, vol. 248, n° 1, p. 18-23, avr. 2007, doi: 10.1016/j.canlet.2006.06.007.

- [152] F. Yuan *et al.*, « Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence and Cutoff Size », p. 6.
- [153] S. K. Hobbs *et al.*, « Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, n° 8, p. 4607-4612, avr. 1998, doi: 10.1073/pnas.95.8.4607.
- [154] H. Hashizume *et al.*, « Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness », *The American Journal of Pathology*, vol. 156, n° 4, p. 1363-1380, avr. 2000, doi: 10.1016/S0002-9440(10)65006-7.
- [155] R. K. Jain, « Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors », *Journal of Controlled Release*, p. 19, 1998.
- [156] H. Maeda, G. Y. Bharate, et J. Daruwalla, « Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 71, n° 3, p. 409-419, mars 2009, doi: 10.1016/j.ejpb.2008.11.010.
- [157] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, et O. C. Farokhzad, « Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 66, p. 2-25, févr. 2014, doi: 10.1016/j.addr.2013.11.009.
- [158] L. R. Hirsch *et al.*, « Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, n° 23, p. 13549-13554, nov. 2003, doi: 10.1073/pnas.2232479100.
- [159] X. Wang, Y. Wang, Z. G. Chen, et D. M. Shin, « Advances of Cancer Therapy by Nanotechnology », *Cancer Res Treat*, vol. 41, n° 1, p. 1, 2009, doi: 10.4143/crt.2009.41.1.1.
- [160] N. Clere, « Les traitements du cancer du sein », *Actualités Pharmaceutiques*, vol. 55, n° 558, p. 20-25, sept. 2016, doi: 10.1016/j.actpha.2016.06.012.
- [161] S.-Y. Qin, A.-Q. Zhang, S.-X. Cheng, L. Rong, et X.-Z. Zhang, « Drug self-delivery systems for cancer therapy », *Biomaterials*, vol. 112, p. 234-247, 2017.
- [162] M. Li *et al.*, « Nanoscaled poly (L-glutamic acid)/doxorubicin-amphiphile complex as pH-responsive drug delivery system for effective treatment of nonsmall cell lung cancer », *ACS applied materials & interfaces*, vol. 5, n° 5, p. 1781-1792, 2013.
- [163] P. Ma et R. J. Mumper, « Paclitaxel nano-delivery systems: a comprehensive review », *Journal of nanomedicine & nanotechnology*, vol. 4, n° 2, p. 1000164, 2013.
- [164] H. J. Stemmler *et al.*, « Weekly docetaxel (Taxotere®) in patients with metastatic breast cancer », *Annals of oncology*, vol. 12, n° 10, p. 1393-1398, 2001.

- [165] Y. Li, S. Lim, et C. P. Ooi, « Fabrication of cisplatin-loaded poly (lactide-co-glycolide) composite microspheres for osteosarcoma treatment », *Pharmaceutical research*, vol. 29, n° 3, p. 756-769, 2012.
- [166] L. Li *et al.*, « *In vivo* delivery of silica nanorattle encapsulated docetaxel for liver cancer therapy with low toxicity and high efficacy », *ACS nano*, vol. 4, n° 11, p. 6874-6882, 2010.
- [167] M. M. Gottesman, T. Fojo, et S. E. Bates, « Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters », *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, n° 1, p. 48-58, 2002.
- [168] G. Szakács, J. K. Paterson, J. A. Ludwig, C. Booth-Genthe, et M. M. Gottesman, « Targeting multidrug resistance in cancer », *Nature reviews Drug discovery*, vol. 5, n° 3, p. 219-234, 2006.
- [169] L. Wang *et al.*, « Novel insights into combating cancer chemotherapy resistance using a plasmonic nanocarrier: enhancing drug sensitiveness and accumulation simultaneously with localized mild photothermal stimulus of femtosecond pulsed laser », *Advanced Functional Materials*, vol. 24, n° 27, p. 4229-4239, 2014.
- [170] C. Ju *et al.*, « Sequential intra-intercellular nanoparticle delivery system for deep tumor penetration », *Angewandte Chemie*, vol. 126, n° 24, p. 6367-6372, 2014.
- [171] P. Song *et al.*, « A Self-Powered Implantable Drug-Delivery System Using Biokinetic Energy », *Advanced Materials*, vol. 29, n° 11, p. 1605668, 2017.
- [172] Z. Luo *et al.*, « Engineering a hollow nanocontainer platform with multifunctional molecular machines for tumor-targeted therapy *in vitro* and *in vivo* », *ACS nano*, vol. 7, n° 11, p. 10271-10284, 2013.
- [173] A. Bansal et Y. Zhang, « Photocontrolled nanoparticle delivery systems for biomedical applications », *Accounts of chemical research*, vol. 47, n° 10, p. 3052-3060, 2014.
- [174] E. Yuba, A. Harada, Y. Sakanishi, S. Watarai, et K. Kono, « A liposome-based antigen delivery system using pH-sensitive fusogenic polymers for cancer immunotherapy », *Biomaterials*, vol. 34, n° 12, p. 3042-3052, 2013.
- [175] H. Wei, R.-X. Zhuo, et X.-Z. Zhang, « Design and development of polymeric micelles with cleavable links for intracellular drug delivery », *Progress in polymer Science*, vol. 38, n° 3-4, p. 503-535, 2013.
- [176] Y. Ma, « Theoretical and computational studies of dendrimers as delivery vectors », *Chemical Society Reviews*, vol. 42, n° 2, p. 705-727, 2013.
- [177] J. Chen, V. Kozlovskaya, A. Goins, J. Campos-Gomez, M. Saeed, et E. Kharlampieva, « Biocompatible shaped particles from dried multilayer polymer capsules », *Biomacromolecules*, vol. 14, n° 11, p. 3830-3841, 2013.

- [178] Y. Barenholz, « Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned », *J Control Release*, vol. 160, n° 2, p. 117-134, juin 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.020.
- [179] L. Nie *et al.*, « Early-stage imaging of nanocarrier-enhanced chemotherapy response in living subjects by scalable photoacoustic microscopy », *ACS nano*, vol. 8, n° 12, p. 12141-12150, 2014.
- [180] Y. Xu, A. Karmakar, W. E. Heberlein, T. Mustafa, A. R. Biris, et A. S. Biris, « Multifunctional magnetic nanoparticles for synergistic enhancement of cancer treatment by combinatorial radio frequency thermolysis and drug delivery », *Advanced healthcare materials*, vol. 1, n° 4, p. 493-501, 2012.
- [181] J. Song, P. Huang, H. Duan, et X. Chen, « Plasmonic vesicles of amphiphilic nanocrystals: optically active multifunctional platform for cancer diagnosis and therapy », *Accounts of chemical research*, vol. 48, n° 9, p. 2506-2515, 2015.
- [182] Q. He et J. Shi, « MSN anti-cancer nanomedicines: chemotherapy enhancement, overcoming of drug resistance, and metastasis inhibition », *Advanced materials*, vol. 26, n° 3, p. 391-411, 2014.
- [183] P. Zrazhevskiy, M. Sena, et X. Gao, « Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery », *Chemical Society Reviews*, vol. 39, n° 11, p. 4326-4354, 2010.
- [184] N. Erathodiyil et J. Y. Ying, « Functionalization of inorganic nanoparticles for bioimaging applications », *Accounts of chemical research*, vol. 44, n° 10, p. 925-935, 2011.
- [185] F. Tang, L. Li, et D. Chen, « Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery », *Advanced materials*, vol. 24, n° 12, p. 1504-1534, 2012.
- [186] M. Liong *et al.*, « Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery », *ACS nano*, vol. 2, n° 5, p. 889-896, 2008.
- [187] B. Fadeel et A. E. Garcia-Bennett, « Better safe than sorry: understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 62, n° 3, p. 362-374, 2010.
- [188] Y. Li et J. Shi, « Hollow-structured mesoporous materials: chemical synthesis, functionalization and applications », *Advanced Materials*, vol. 26, n° 20, p. 3176-3205, 2014.
- [189] W. P. Hogle, « The state of the art in radiation therapy », in *Seminars in oncology nursing*, 2006, vol. 22, n° 4, p. 212-220.
- [190] G. Delaney, S. Jacob, C. Featherstone, et M. Barton, « The role of radiotherapy in cancer treatment: Estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines », *Cancer*, vol. 104, n° 6, p. 1129-1137, sept. 2005, doi: 10.1002/cncr.21324.
- [191] P. Martin, « Le coût de la radiothérapie », *Bulletin du cancer*, vol. 90, n° 11, p. 969-975, 2003.

- [192] M. Sadeghi, M. Enferadi, et A. Shirazi, « External and internal radiation therapy: past and future directions », *Journal of cancer research and therapeutics*, vol. 6, n° 3, p. 239, 2010.
- [193] W. T. Phillips, A. Bao, A. J. Brenner, et B. A. Goins, « Image-guided interventional therapy for cancer with radiotherapeutic nanoparticles », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 76, p. 39-59, 2014.
- [194] L. Tian *et al.*, « Radionuclide I-131 labeled albumin-paclitaxel nanoparticles for synergistic combined chemo-radioisotope therapy of cancer », *Theranostics*, vol. 7, n° 3, p. 614, 2017.
- [195] X. Yi *et al.*, « Imaging-guided combined photothermal and radiotherapy to treat subcutaneous and metastatic tumors using iodine-131-doped copper sulfide nanoparticles », *Advanced Functional Materials*, vol. 25, n° 29, p. 4689-4699, 2015.
- [196] G. Ting, C.-H. Chang, H.-E. Wang, et T.-W. Lee, « Nanotargeted radionuclides for cancer nuclear imaging and internal radiotherapy », *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, 2010.
- [197] H. Chen *et al.*, « Novel “add-on” molecule based on Evans blue confers superior pharmacokinetics and transforms drugs to theranostic agents », *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 58, n° 4, p. 590-597, 2017.
- [198] M. Hamoudeh, M. A. Kamleh, R. Diab, et H. Fessi, « Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, n° 12, p. 1329-1346, 2008.
- [199] M. D’Huyvetter, C. Xavier, V. Caveliers, T. Lahoutte, S. Muyltermans, et N. Devoogdt, « Radiolabeled nanobodies as theranostic tools in targeted radionuclide therapy of cancer », *Expert opinion on drug delivery*, vol. 11, n° 12, p. 1939-1954, 2014.
- [200] S. Aziz, A. Taylor, A. McConnachie, A. Kacpersek, et E. Kemp, « Proton beam radiotherapy in the management of uveal melanoma: Clinical experience in Scotland », *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)*, vol. 3, p. 49, 2009.
- [201] C. Blattmann *et al.*, « Histone deacetylase inhibition sensitizes osteosarcoma to heavy ion radiotherapy », *Radiation Oncology*, vol. 10, n° 1, p. 1-11, 2015.
- [202] D. A. Bush, J. D. Slater, C. Garberoglio, G. Yuh, J. M. Hocko, et J. M. Slater, « A technique of partial breast irradiation utilizing proton beam radiotherapy: comparison with conformal x-ray therapy », *The Cancer Journal*, vol. 13, n° 2, p. 114-118, 2007.
- [203] C. D. Johnstone, R. LaFontaine, Y. Poirier, et M. Tambasco, « Modeling a superficial radiotherapy x-ray source for relative dose calculations », *Journal of applied clinical medical physics*, vol. 16, n° 3, p. 118-130, 2015.
- [204] P. Juzenas *et al.*, « Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, n° 15, p. 1600-1614, 2008.
- [205] M. Tubiana, J. Dutreix, et A. Wambersie, « Radiobiologie. Hermann », *Paris, France*, p. 67, 1986.

- [206] R. Ardaillou, « Radiobiologie: Maurice Tubiana », *Med Sci (Paris)*, vol. 24, n° 12, p. 1105-1106, déc. 2008, doi: 10.1051/medsci/200824121105.
- [207] J. Dutreix, A. Desgrez, et B. Bok, « Biophysique des radiations et imagerie médicale », 1993.
- [208] J. H. Hubbell, « Review of photon interaction cross section data in the medical and biological context », p. 22.
- [209] N. Suntharalingam, « BRACHYTHERAPY: PHYSICAL AND CLINICAL ASPECTS », p. 34.
- [210] B. Boudaffa, P. Cloutier, D. Hunting, M. A. Huels, et L. Sanche, « Resonant formation of DNA strand breaks by low-energy (3 to 20 eV) electrons », *Science*, vol. 287, n° 5458, p. 1658-1660, 2000.
- [211] R. Lacave, C.-J. Larsen, et J. Robert, *Cancérologie fondamentale*, vol. 1. John Libbey Eurotext, 2005.
- [212] J.-M. Cosset, « Effets secondaires des rayonnements sur les tissus sains et organes à risque », *Cancer/Radiothérapie*, vol. 14, n° 4-5, p. 228-231, juill. 2010, doi: 10.1016/j.canrad.2010.04.004.
- [213] H. B. Stone, C. N. Coleman, M. S. Anscher, et W. H. McBride, « Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms », *The Lancet Oncology*, vol. 4, n° 9, p. 529-536, sept. 2003, doi: 10.1016/S1470-2045(03)01191-4.
- [214] K. Kobayashi, N. Usami, E. Porcel, S. Lacombe, et C. Le Sech, « Enhancement of radiation effect by heavy elements », *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 704, n° 1-3, p. 123-131, avr. 2010, doi: 10.1016/j.mrrev.2010.01.002.
- [215] R. S. Mello, H. Callisen, J. Winter, A. R. Kagan, et A. Norman, « Radiation dose enhancement in tumors with iodine », *Medical physics*, vol. 10, n° 1, p. 75-78, 1983.
- [216] R. Nath, P. Bongiorno, P. I. Rossi, et S. Rockwell, « Enhanced IUdR radiosensitization by ^{241}Am photons relative to ^{226}Ra and ^{125}I photons at 0.72 Gy/hr », *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, vol. 18, n° 6, p. 1377-1385, 1990.
- [217] T. D. Solberg, K. S. Iwamoto, et A. Norman, « Calculation of radiation dose enhancement factors for dose enhancement therapy of brain tumours », *Physics in medicine & biology*, vol. 37, n° 2, p. 439, 1992.
- [218] K. S. Iwamoto *et al.*, « The CT scanner as a therapy machine », *Radiotherapy and Oncology*, vol. 19, n° 4, p. 337-343, 1990.
- [219] A. Norman, M. Ingram, R. G. Skillen, D. B. Freshwater, K. S. Iwamoto, et T. Solberg, « X-ray phototherapy for canine brain masses », *Radiation Oncology Investigations: Clinical and Basic Research*, vol. 5, n° 1, p. 8-14, 1997.

- [220] J. H. Rose, A. Norman, M. Ingram, C. Aoki, T. Solberg, et A. Mesa, « First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx) », *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, vol. 45, n° 5, p. 1127-1132, 1999.
- [221] A. I. Kassis, « The Amazing World of Auger Electrons », *International Journal of Radiation Biology*, vol. 80, n° 11-12, p. 789-803, janv. 2004, doi: 10.1080/09553000400017663.
- [222] L. Kelland, « The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy », *Nature Reviews Cancer*, vol. 7, n° 8, p. 573-584, 2007.
- [223] M.-C. Biston *et al.*, « Cure of Fisher Rats Bearing Radioresistant F98 Glioma Treated with *cis* - Platinum and Irradiated with Monochromatic Synchrotron X-Rays », *Cancer Res*, vol. 64, n° 7, p. 2317-2323, avr. 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3600.
- [224] A.-M. Florea et D. Büsselberg, « Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects », *Cancers*, vol. 3, n° 1, p. 1351-1371, 2011.
- [225] I. D. M. Herold, « Gold microspheres: a selective technique for producing biologically effective dose enhancement », *International journal of radiation biology*, vol. 76, n° 10, p. 1357-1364, 2000.
- [226] G. A. Roth *et al.*, « Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015 », *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 70, n° 1, p. 1-25, 2017.
- [227] A. Abdelfattah *et al.*, « Atherosclerotic cardiovascular disease in Egyptian women: 1570 BCE–2011 CE », *International journal of cardiology*, vol. 167, n° 2, p. 570-574, 2013.
- [228] WHO Study Group on the Classification of Atherosclerotic Lesions et W. H. Organization, « Classification of atherosclerotic lesions : report of a study group [meeting held in Washington, D.C. from 7 to 11 October 1957] », World Health Organization, 1958. Consulté le: 14 décembre 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40402>
- [229] « 2.1 La plaque d'athérome - Infarctus du myocarde ». <https://sites.google.com/site/infarctusdumyocarde3c4/qu-est-ce-que-l-infarctus/la-plaque-d-atherome> (consulté le 7 août 2021).
- [230] « Schémas d'Artère Humaine en Coupe Transversale », *Superprof Ressources*. <https://www.superprof.fr/ressources/scolaire/svt/schema-svt15/tous-niveaux-svt15/arteres-humaines-illustrations.html/> (consulté le 7 août 2021).
- [231] H. C. Stary *et al.*, « A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association », *Circulation*, vol. 92, n° 5, p. 1355-1374, 1995.

- [232] T. Gordon, W. B. KANNEL, M. C. HJORTLAND, et P. M. McNAMARA, « Menopause and coronary heart disease: the Framingham Study », *Annals of internal medicine*, vol. 89, n° 2, p. 157-161, 1978.
- [233] A. Farb *et al.*, « Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core: a frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death », *Circulation*, vol. 93, n° 7, p. 1354-1363, 1996.
- [234] R. Virmani, A. P. Burke, et A. Farb, « Sudden cardiac death », *Cardiovascular pathology*, vol. 10, n° 5, p. 211-218, 2001.
- [235] A. Tedgui et Z. Mallat, « Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways », *Physiological reviews*, vol. 86, n° 2, p. 515-581, 2006.
- [236] P. A. Wolf, J. B. Mitchell, C. S. Baker, W. B. Kannel, et R. B. D'Agostino, « Impact of atrial fibrillation on mortality, stroke, and medical costs », *Archives of internal medicine*, vol. 158, n° 3, p. 229-234, 1998.
- [237] P. Libby, « Inflammation in atherosclerosis », vol. 420, p. 7, 2002.
- [238] S. C. Whitman, P. Ravisankar, et A. Daugherty, « IFN- γ deficiency exerts gender-specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E^{-/-}mice », *Journal of interferon & cytokine research*, vol. 22, n° 6, p. 661-670, 2002.
- [239] H. Orbay, H. Hong, Y. Zhang, et W. Cai, « Positron Emission Tomography Imaging of Atherosclerosis », *Theranostics*, vol. 3, p. 894-902, nov. 2013, doi: 10.7150/thno.5506.
- [240] R. Rennenberg, A. G. H. Kessels, L. J. Schurgers, J. M. A. Van Engelshoven, P. W. De Leeuw, et A. A. Kroon, « Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis », *Vascular health and risk management*, vol. 5, p. 185, 2009.
- [241] M. J. Davies, « Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis: the Paul Dudley White Lecture 1995 », *Circulation*, vol. 94, n° 8, p. 2013-2020, 1996.
- [242] M. Naghavi *et al.*, « From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I », *Circulation*, vol. 108, n° 14, p. 1664-1672, 2003.
- [243] F. D. Kolodgie *et al.*, « The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes », *Current opinion in cardiology*, vol. 16, n° 5, p. 285-292, 2001.
- [244] J. J. Boyle, « Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture », *Current vascular pharmacology*, vol. 3, n° 1, p. 63-68, 2005.

- [245] S. Gupta, A. M. Pablo, X. c Jiang, N. Wang, A. R. Tall, et C. Schindler, « IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. », *The Journal of clinical investigation*, vol. 99, n° 11, p. 2752-2761, 1997.
- [246] A. C. Van Der Wal, A. E. Becker, C. M. Van der Loos, et P. K. Das, « Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. », *Circulation*, vol. 89, n° 1, p. 36-44, 1994.
- [247] P. Libby, P. M. Ridker, et A. Maseri, « Inflammation and atherosclerosis », *Circulation*, vol. 105, n° 9, p. 1135-1143, 2002.
- [248] A. Maseri, *Inflammation, atherosclerosis, and ischemic events—exploring the hidden side of the moon*, vol. 336, n° 14. Mass Medical Soc, 1997, p. 1014-1016.
- [249] A. Eckardstein, *Atherosclerosis: diet and drugs*, vol. 170. Springer Science & Business Media, 2006.
- [250] I. Gyárfás, M. Keltai, et Y. Salim, « Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries in a case-control study based on the INTERHEART study », *Orvosi hetilap*, vol. 147, n° 15, p. 675-686, 2006.
- [251] S. Yusuf *et al.*, « Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study », *The lancet*, vol. 364, n° 9438, p. 937-952, 2004.
- [252] J. A. Ambrose et R. S. Barua, « The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update », *Journal of the American college of cardiology*, vol. 43, n° 10, p. 1731-1737, 2004.
- [253] J. Stamler, M. L. Daviglius, D. B. Garside, A. R. Dyer, P. Greenland, et J. D. Neaton, « Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity », *Jama*, vol. 284, n° 3, p. 311-318, 2000.
- [254] E. B. Rimm *et al.*, « Body size and fat distribution as predictors of coronary heart disease among middle-aged and older US men », *American journal of epidemiology*, vol. 141, n° 12, p. 1117-1127, 1995.
- [255] L. C. Brown et J. T. Powell, « Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance », *Annals of surgery*, vol. 230, n° 3, p. 289, 1999.
- [256] Rap. Scott, S. G. Bridgewater, et H. A. Ashton, « Randomized clinical trial of screening for abdominal aortic aneurysm in women », *Journal of British Surgery*, vol. 89, n° 3, p. 283-285, 2002.
- [257] C. Yuan *et al.*, « *In vivo* accuracy of multispectral magnetic resonance imaging for identifying lipid-rich necrotic cores and intraplaque hemorrhage in advanced human carotid plaques », *Circulation*, vol. 104, n° 17, p. 2051-2056, 2001.

- [258] J. L. Fleg *et al.*, « Detection of high-risk atherosclerotic plaque: report of the NHLBI Working Group on current status and future directions », *JACC: Cardiovascular Imaging*, vol. 5, n° 9, p. 941-955, 2012.
- [259] R. Corti et V. Fuster, « Imaging of atherosclerosis: magnetic resonance imaging », *European heart journal*, vol. 32, n° 14, p. 1709-1719, 2011.
- [260] B. R. Smith *et al.*, « Localization to atherosclerotic plaque and biodistribution of biochemically derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) contrast particles for magnetic resonance imaging (MRI) », *Biomedical Microdevices*, vol. 9, n° 5, p. 719-727, 2007.
- [261] C. von Zur Muhlen *et al.*, « Superparamagnetic iron oxide binding and uptake as imaged by magnetic resonance is mediated by the integrin receptor Mac-1 (CD11b/CD18): implications on imaging of atherosclerotic plaques », *Atherosclerosis*, vol. 193, n° 1, p. 102-111, 2007.
- [262] T. Y. Tang *et al.*, « Correlation of carotid atheromatous plaque inflammation with biomechanical stress: utility of USPIO enhanced MR imaging and finite element analysis », *Atherosclerosis*, vol. 196, n° 2, p. 879-887, 2008.
- [263] T. Y. Tang *et al.*, « Correlation of carotid atheromatous plaque inflammation using USPIO-enhanced MR imaging with degree of luminal stenosis », *Stroke*, vol. 39, n° 7, p. 2144-2147, 2008.
- [264] J. Belliere *et al.*, « Unmasking silent endothelial activation in the cardiovascular system using molecular magnetic resonance imaging », *Theranostics*, vol. 5, n° 11, p. 1187, 2015.
- [265] P. M. Winter *et al.*, « Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with $\alpha\beta 3$ -integrin-targeted nanoparticles », *Circulation*, vol. 108, n° 18, p. 2270-2274, 2003.
- [266] N. J. Stone *et al.*, « 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines », *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 63, n° 25 Part B, p. 2889-2934, 2014.
- [267] H. D. Williams *et al.*, « Strategies to address low drug solubility in discovery and development », *Pharmacological reviews*, vol. 65, n° 1, p. 315-499, 2013.
- [268] O. Trédan, C. M. Galmarini, K. Patel, et I. F. Tannock, « Drug resistance and the solid tumor microenvironment », *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 99, n° 19, p. 1441-1454, 2007.
- [269] X.-Q. Zhang, X. Xu, N. Bertrand, E. Pridgen, A. Swami, et O. C. Farokhzad, « Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, n° 13, p. 1363-1384, 2012.
- [270] T. Lammers, F. Kiessling, W. E. Hennink, et G. Storm, « Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress », *Journal of controlled release*, vol. 161, n° 2, p. 175-187, 2012.

- [271] J.-Z. Du, X.-J. Du, C.-Q. Mao, et J. Wang, « Tailor-made dual pH-sensitive polymer–doxorubicin nanoparticles for efficient anticancer drug delivery », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, n° 44, p. 17560-17563, 2011.
- [272] V. Wagner, A. Dullaart, A.-K. Bock, et A. Zweck, « The emerging nanomedicine landscape », *Nature biotechnology*, vol. 24, n° 10, p. 1211-1217, 2006.
- [273] A. A. Gabizon, H. Shmeeda, et S. Zalipsky, « Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting », *Journal of liposome research*, vol. 16, n° 3, p. 175-183, 2006.
- [274] C. Wang, T. Wang, Z. Ma, et Z. Su, « pH-tuned synthesis of gold nanostructures from gold nanorods with different aspect ratios », *Nanotechnology*, vol. 16, n° 11, p. 2555, 2005.
- [275] F. Kretschmer, U. Mansfeld, S. Hoepfener, M. D. Hager, et U. S. Schubert, « Tunable synthesis of poly (ethylene imine)–gold nanoparticle clusters », *Chemical Communications*, vol. 50, n° 1, p. 88-90, 2014.
- [276] S. A. McCarthy, G.-L. Davies, et Y. K. Gun'ko, « Preparation of multifunctional nanoparticles and their assemblies », *Nature protocols*, vol. 7, n° 9, p. 1677-1693, 2012.
- [277] Y. Jin, C. Jia, S.-W. Huang, M. O'donnell, et X. Gao, « Multifunctional nanoparticles as coupled contrast agents », *Nature communications*, vol. 1, n° 1, p. 1-8, 2010.
- [278] F. Jia, X. Liu, L. Li, S. Mallapragada, B. Narasimhan, et Q. Wang, « Multifunctional nanoparticles for targeted delivery of immune activating and cancer therapeutic agents », *Journal of Controlled Release*, vol. 172, n° 3, p. 1020-1034, 2013.
- [279] O. L. Gobbo, K. Sjaastad, M. W. Radomski, Y. Volkov, et A. Prina-Mello, « Magnetic nanoparticles in cancer theranostics », *Theranostics*, vol. 5, n° 11, p. 1249, 2015.
- [280] P. Detampel, D. Witzigmann, S. Krähenbühl, et J. Huwyler, « Hepatocyte targeting using pegylated asialofetuin-conjugated liposomes », *Journal of drug targeting*, vol. 22, n° 3, p. 232-241, 2014.
- [281] L. M. Bareford et P. W. Swaan, « Endocytic mechanisms for targeted drug delivery », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 59, n° 8, p. 748-758, 2007.
- [282] S. Bhattacharyya, R. Bhattacharya, S. Curley, M. A. McNiven, et P. Mukherjee, « Nanoconjugation modulates the trafficking and mechanism of antibody induced receptor endocytosis », *Proceedings of the national academy of sciences*, vol. 107, n° 33, p. 14541-14546, 2010.
- [283] S. Bhattacharyya, R. D. Singh, R. Pagano, J. D. Robertson, R. Bhattacharya, et P. Mukherjee, « Switching the targeting pathways of a therapeutic antibody by nanodesign », *Angewandte Chemie*, vol. 124, n° 7, p. 1595-1599, 2012.

- [284] R. Gaspar et R. Duncan, « Polymeric carriers: preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 61, n° 13, p. 1220-1231, 2009.
- [285] M. A. Dobrovolskaia et S. E. McNeil, *Handbook Of Immunological Properties Of Engineered Nanomaterials (In 3 Volumes)*, vol. 6. World Scientific, 2016.
- [286] N. Lewinski, V. Colvin, et R. Drezek, « Cytotoxicity of nanoparticles », *small*, vol. 4, n° 1, p. 26-49, 2008.
- [287] V. Stone, H. Johnston, et R. P. Schins, « Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations », *Critical reviews in toxicology*, vol. 39, n° 7, p. 613-626, 2009.
- [288] C. M. Sayes, K. L. Reed, et D. B. Warheit, « Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing *in vitro* measurements to *in vivo* pulmonary toxicity profiles », *Toxicological sciences*, vol. 97, n° 1, p. 163-180, 2007.
- [289] A. Mayer, M. Vadon, B. Rinner, A. Novak, R. Wintersteiger, et E. Fröhlich, « The role of nanoparticle size in hemocompatibility », *Toxicology*, vol. 258, n° 2-3, p. 139-147, 2009.
- [290] E. Higueros, E. Roe, E. Granell, et E. Baselga, « Sturge-Weber syndrome: a review », *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, vol. 108, n° 5, p. 407-417, 2017.
- [291] A. Wolcott *et al.*, « Silica-Coated CdTe Quantum Dots Functionalized with Thiols for Bioconjugation to IgG Proteins », *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, n° 11, p. 5779-5789, mars 2006, doi: 10.1021/jp057435z.
- [292] S. E. McNeil, « Nanoparticle therapeutics: a personal perspective », *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 1, n° 3, p. 264-271, 2009, doi: 10.1002/wnan.6.
- [293] A. El-Ansary et S. Al-Daihan, « On the Toxicity of Therapeutically Used Nanoparticles: An Overview », *Journal of Toxicology*, vol. 2009, p. 1-9, 2009, doi: 10.1155/2009/754810.
- [294] S. K. Misra, S. Nuseibeh, A. Dybowska, D. Berhanu, T. D. Tetley, et E. Valsami-Jones, « Comparative study using spheres, rods and spindle-shaped nanoplatelets on dispersion stability, dissolution and toxicity of CuO nanomaterials », *Nanotoxicology*, vol. 8, n° 4, p. 422-432, juin 2014, doi: 10.3109/17435390.2013.796017.
- [295] Zhang, « Toxicologic effects of gold nanoparticles *in vivo* by different administration routes », *IJN*, p. 771, sept. 2010, doi: 10.2147/IJN.S8428.
- [296] F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, et O. C. Farokhzad, « Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles », *Mol. Pharmaceutics*, vol. 5, n° 4, p. 505-515, août 2008, doi: 10.1021/mp800051m.

- [297] M. Gries *et al.*, « Multiscale selectivity and *in vivo* biodistribution of NRP-1-targeted theranostic AGuIX nanoparticles for PDT of glioblastoma », *International Journal of Nanomedicine*, vol. 15, p. 8739, 2020.
- [298] G. Bort, F. Lux, S. Dufort, Y. Crémillieux, C. Verry, et O. Tillement, « EPR-mediated tumor targeting using ultrasmall-hybrid nanoparticles: From animal to human with theranostic AGuIX nanoparticles », *Theranostics*, vol. 10, n° 3, p. 1319, 2020.
- [299] M. A. Dobrovolskaia, P. Aggarwal, J. B. Hall, et S. E. McNeil, « Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution », *Molecular pharmaceutics*, vol. 5, n° 4, p. 487-495, 2008.
- [300] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, et J.-P. Benoit, « Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems », *Biomaterials*, vol. 27, n° 24, p. 4356-4373, 2006.
- [301] S. M. Moghimi et J. Szebeni, « Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties », *Progress in lipid research*, vol. 42, n° 6, p. 463-478, 2003.
- [302] H. Otsuka, Y. Nagasaki, et K. Kataoka, « PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 55, n° 3, p. 403-419, févr. 2003, doi: 10.1016/S0169-409X(02)00226-0.
- [303] A.-C. Faure *et al.*, « Control of the *in vivo* biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly (ethylene glycol) coatings », *Small*, vol. 5, n° 22, p. 2565-2575, 2009.
- [304] M. Longmire, P. L. Choyke, et H. Kobayashi, « Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats », 2008.
- [305] S. Wilhelm *et al.*, « Analysis of nanoparticle delivery to tumours », *Nat Rev Mater*, vol. 1, n° 5, p. 16014, mai 2016, doi: 10.1038/natrevmats.2016.14.
- [306] H. S. Choi et J. V. Frangioni, « Nanoparticles for Biomedical Imaging: Fundamentals of Clinical Translation », *Mol Imaging*, vol. 9, n° 6, p. 7290.2010.00031, nov. 2010, doi: 10.2310/7290.2010.00031.
- [307] L. A. Dykman et N. G. Khlebtsov, « Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects », *Acta Naturae (англоязычная версия)*, vol. 3, n° 2 (9), 2011.
- [308] G. Mie, « Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions », *Contributions to the optics of turbid media*, vol. 25, n° 3, p. 377-445, 1976.
- [309] W. P. Faulk et G. M. Taylor, « Communication to the editors: an immunocolloid method for the electron microscope », *Immunochemistry*, vol. 8, n° 11, p. 1081-1083, 1971.

- [310] P. Boisseau et B. Loubaton, « Nanomedicine, nanotechnology in medicine », *Comptes Rendus Physique*, vol. 12, n° 7, p. 620-636, 2011.
- [311] M. H. Magnusson, K. Deppert, J.-O. Malm, J.-O. Bovin, et L. Samuelson, « Size-selected gold nanoparticles by aerosol technology », *Nanostructured Materials*, vol. 12, n° 1-4, p. 45-48, 1999.
- [312] F. Mafuné, J. Kohno, Y. Takeda, T. Kondow, et H. Sawabe, « Formation of gold nanoparticles by laser ablation in aqueous solution of surfactant », *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 105, n° 22, p. 5114-5120, 2001.
- [313] C. Carnovale, G. Bryant, R. Shukla, et V. Bansal, « Size, shape and surface chemistry of nano-gold dictate its cellular interactions, uptake and toxicity », *Progress in Materials Science*, vol. 83, p. 152-190, 2016.
- [314] C. Daraio et S. Jin, « Synthesis and patterning methods for nanostructures useful for biological applications », in *Nanotechnology for biology and medicine*, Springer, 2012, p. 27-44.
- [315] D. V. Leff, L. Brandt, et J. R. Heath, « Synthesis and characterization of hydrophobic, organically-soluble gold nanocrystals functionalized with primary amines », *Langmuir*, vol. 12, n° 20, p. 4723-4730, 1996.
- [316] M. N. Martin, J. I. Basham, P. Chando, et S.-K. Eah, « Charged gold nanoparticles in non-polar solvents: 10-min synthesis and 2D self-assembly », *Langmuir*, vol. 26, n° 10, p. 7410-7417, 2010.
- [317] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, et R. Whyman, « Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system », *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n° 7, p. 801-802, 1994.
- [318] Y. Shao, Y. Jin, et S. Dong, « Synthesis of gold nanoplates by aspartate reduction of gold chloride », *Chemical Communications*, n° 9, p. 1104-1105, 2004.
- [319] S. D. Perrault et W. C. Chan, « Synthesis and surface modification of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of 50– 200 nm », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, n° 47, p. 17042-17043, 2009.
- [320] S. Kundu, L. Peng, et H. Liang, « A new route to obtain high-yield multiple-shaped gold nanoparticles in aqueous solution using microwave irradiation », *Inorganic chemistry*, vol. 47, n° 14, p. 6344-6352, 2008.
- [321] J.-H. Lee, S. U. Choi, S. P. Jang, et S. Y. Lee, « Production of aqueous spherical gold nanoparticles using conventional ultrasonic bath », *Nanoscale research letters*, vol. 7, n° 1, p. 1-7, 2012.
- [322] D. A. Fleming et M. E. Williams, « Size-controlled synthesis of gold nanoparticles via high-temperature reduction », *Langmuir*, vol. 20, n° 8, p. 3021-3023, 2004.

- [323] H. Ma *et al.*, « Synthesis of silver and gold nanoparticles by a novel electrochemical method », *ChemPhysChem*, vol. 5, n° 1, p. 68-75, 2004.
- [324] J. Turkevich, P. C. Stevenson, et J. Hillier, « A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold », *Discussions of the Faraday Society*, vol. 11, p. 55-75, 1951.
- [325] G. Frens, « Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions », *Nature physical science*, vol. 241, n° 105, p. 20-22, 1973.
- [326] S.-Y. Lin, Y.-T. Tsai, C.-C. Chen, C.-M. Lin, et C. Chen, « Two-step functionalization of neutral and positively charged thiols onto citrate-stabilized Au nanoparticles », *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 108, n° 7, p. 2134-2139, 2004.
- [327] K. E. Sapsford, L. Berti, et I. L. Medintz, « Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: beyond traditional donor–acceptor combinations », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 45, n° 28, p. 4562-4589, 2006.
- [328] M. Giersig et P. Mulvaney, « Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition », *Langmuir*, vol. 9, n° 12, p. 3408-3413, 1993.
- [329] M. A. El-Sayed, « Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes », *Accounts of chemical research*, vol. 34, n° 4, p. 257-264, 2001.
- [330] W. H. De Jong, W. I. Hagens, P. Krystek, M. C. Burger, A. J. Sips, et R. E. Geertsma, « Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration », *Biomaterials*, vol. 29, n° 12, p. 1912-1919, 2008.
- [331] N. S. Abadeer et C. J. Murphy, « Recent progress in cancer thermal therapy using gold nanoparticles », *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 120, n° 9, p. 4691-4716, 2016.
- [332] V. S. Marangoni, J. Cancino-Bernardi, et V. Zucolotto, « Synthesis, physico-chemical properties, and biomedical applications of gold nanorods—a review », *Journal of biomedical nanotechnology*, vol. 12, n° 6, p. 1136-1158, 2016.
- [333] B. Pang, X. Yang, et Y. Xia, « Putting gold nanocages to work for optical imaging, controlled release and cancer theranostics », *Nanomedicine*, vol. 11, n° 13, p. 1715-1728, 2016.
- [334] C. R. Bridges, P. M. DiCarmine, A. Fokina, D. Huesmann, et D. S. Seferos, « Synthesis of gold nanotubes with variable wall thicknesses », *Journal of Materials Chemistry A*, vol. 1, n° 4, p. 1127-1133, 2013.
- [335] Z.-C. Xu *et al.*, « Wet chemical synthesis of gold nanoparticles using silver seeds: a shape control from nanorods to hollow spherical nanoparticles », *Nanotechnology*, vol. 18, n° 11, p. 115608, 2007.

- [336] D. P. Cormode, B. L. Sanchez-Gaytan, A. J. Mieszawska, Z. A. Fayad, et W. J. Mulder, « Inorganic nanocrystals as contrast agents in MRI: synthesis, coating and introduction of multifunctionality », *NMR in Biomedicine*, vol. 26, n° 7, p. 766-780, 2013.
- [337] M.-C. Daniel et D. Astruc, « Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology », *Chemical reviews*, vol. 104, n° 1, p. 293-346, 2004.
- [338] M. J. Hostetler, S. J. Green, J. J. Stokes, et R. W. Murray, « Monolayers in three dimensions: synthesis and electrochemistry of ω -functionalized alkanethiolate-stabilized gold cluster compounds », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 118, n° 17, p. 4212-4213, 1996.
- [339] I.-C. Sun *et al.*, « Tumor-targeting gold particles for dual computed tomography/optical cancer imaging », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, n° 40, p. 9348-9351, 2011.
- [340] S. C. Boca et S. Astilean, « Detoxification of gold nanorods by conjugation with thiolated poly (ethylene glycol) and their assessment as SERS-active carriers of Raman tags », *Nanotechnology*, vol. 21, n° 23, p. 235601, 2010.
- [341] T. Niidome *et al.*, « PEG-modified gold nanorods with a stealth character for *in vivo* applications », *Journal of Controlled Release*, vol. 114, n° 3, p. 343-347, 2006.
- [342] T. Niidome *et al.*, « Poly (ethylene glycol)-modified gold nanorods as a photothermal nanodevice for hyperthermia », *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 20, n° 9, p. 1203-1215, 2009.
- [343] A. J. Mieszawska *et al.*, « Engineering of lipid-coated PLGA nanoparticles with a tunable payload of diagnostically active nanocrystals for medical imaging », *Chemical communications*, vol. 48, n° 47, p. 5835-5837, 2012.
- [344] X. Qian *et al.*, « *In vivo* tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags », *Nature biotechnology*, vol. 26, n° 1, p. 83-90, 2008.
- [345] G. P. Sahoo *et al.*, « Synthesis and photo physical properties of star shaped gold nanoparticles », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 375, n° 1-3, p. 30-34, 2011.
- [346] G. F. Schneider, V. Subr, K. Ulbrich, et G. Decher, « Multifunctional cytotoxic stealth nanoparticles. A model approach with potential for cancer therapy », *Nano letters*, vol. 9, n° 2, p. 636-642, 2009.
- [347] M. R. Rasch, E. Rossinyol, J. L. Hueso, B. W. Goodfellow, J. Arbiol, et B. A. Korgel, « Hydrophobic gold nanoparticle self-assembly with phosphatidylcholine lipid: membrane-loaded and janus vesicles », *Nano letters*, vol. 10, n° 9, p. 3733-3739, 2010.
- [348] E. C. Cho, Q. Zhang, et Y. Xia, « The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles », *Nature nanotechnology*, vol. 6, n° 6, p. 385-391, 2011.

- [349] W. J. Mulder, D. P. Cormode, S. Hak, M. E. Lobatto, S. Silvera, et Z. A. Fayad, « Multimodality nanotracers for cardiovascular applications », *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, vol. 5, n° 2, p. S103-S111, 2008.
- [350] B. Liu, J. Xie, J. Y. Lee, Y. P. Ting, et J. P. Chen, « Optimization of high-yield biological synthesis of single-crystalline gold nanoplates », *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, n° 32, p. 15256-15263, 2005.
- [351] Y. Xia, Y. Xiong, B. Lim, et S. E. Skrabalak, « Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics? », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 48, n° 1, p. 60-103, 2009.
- [352] K. Niikura *et al.*, « Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses *in vitro* and *in vivo* », *ACS nano*, vol. 7, n° 5, p. 3926-3938, 2013.
- [353] H. Chen, X. Kou, Z. Yang, W. Ni, et J. Wang, « Shape- and size-dependent refractive index sensitivity of gold nanoparticles », *Langmuir*, vol. 24, n° 10, p. 5233-5237, 2008.
- [354] X. Xie, J. Liao, X. Shao, Q. Li, et Y. Lin, « The effect of shape on cellular uptake of gold nanoparticles in the forms of stars, rods, and triangles », *Scientific reports*, vol. 7, n° 1, p. 1-9, 2017.
- [355] P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, et M. A. El-Sayed, « Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine », *The journal of physical chemistry B*, vol. 110, n° 14, p. 7238-7248, 2006.
- [356] E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy, et M. D. Wyatt, « Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity », *Small*, vol. 1, n° 3, p. 325-327, 2005.
- [357] A. N. Afrooz, S. T. Sivalapalan, C. J. Murphy, S. M. Hussain, J. J. Schlager, et N. B. Saleh, « Spheres vs. rods: The shape of gold nanoparticles influences aggregation and deposition behavior », *Chemosphere*, vol. 91, n° 1, p. 93-98, 2013.
- [358] K. Song *et al.*, « Smart gold nanoparticles enhance killing effect on cancer cells », *International journal of oncology*, vol. 42, n° 2, p. 597-608, 2013.
- [359] A. Liang, Q. Liu, G. Wen, et Z. Jiang, « The surface-plasmon-resonance effect of nanogold/silver and its analytical applications », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 37, p. 32-47, 2012.
- [360] F. Toderas, M. Baia, D. Maniu, et S. Astilean, « Tuning the plasmon resonances of gold nanoparticles by controlling their size and shape », *Journal of optoelectronics and advanced materials*, vol. 10, n° 9, p. 2282-2284, 2008.
- [361] X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, et M. A. El-Sayed, « Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy », 2007.

- [362] C. J. Murphy *et al.*, « Chemical sensing and imaging with metallic nanorods », *Chemical Communications*, n° 5, p. 544-557, 2008.
- [363] E. Dulkeith, M. Ringler, T. A. Klar, J. Feldmann, A. Munoz Javier, et W. J. Parak, « Gold nanoparticles quench fluorescence by phase induced radiative rate suppression », *Nano letters*, vol. 5, n° 4, p. 585-589, 2005.
- [364] C. Xue *et al.*, « Facile fabrication of 3D layer-by-layer graphene-gold nanorod hybrid architecture for hydrogen peroxide based electrochemical biosensor », *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 3, p. 7-11, 2015.
- [365] S. Same, A. Aghanejad, S. A. Nakhjavani, J. Barar, et Y. Omid, « Radiolabeled theranostics: magnetic and gold nanoparticles », *BioImpacts: BI*, vol. 6, n° 3, p. 169, 2016.
- [366] P. Anger, P. Bharadwaj, et L. Novotny, « Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence », *Physical review letters*, vol. 96, n° 11, p. 113002, 2006.
- [367] J. W. Bulte et M. M. Modo, *Design and applications of nanoparticles in biomedical imaging*. Springer, 2017.
- [368] Q. Huo, S. A. Litherland, S. Sullivan, H. Hallquist, D. A. Decker, et I. Rivera-Ramirez, « Developing a nanoparticle test for prostate cancer scoring », *Journal of translational medicine*, vol. 10, n° 1, p. 1-8, 2012.
- [369] A. K. Lytton-Jean, M. S. Han, et C. A. Mirkin, « Microarray detection of duplex and triplex DNA binders with DNA-modified gold nanoparticles », *Analytical chemistry*, vol. 79, n° 15, p. 6037-6041, 2007.
- [370] D. P. Cormode, J. J. Davis, et P. D. Beer, « Anion sensing porphyrin functionalized nanoparticles », *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, vol. 18, n° 1, p. 32-40, 2008.
- [371] A. Virel, L. Saa, et V. Pavlov, « Modulated growth of nanoparticles. Application for sensing nerve gases », *Analytical chemistry*, vol. 81, n° 1, p. 268-272, 2009.
- [372] C.-C. You *et al.*, « Detection and identification of proteins using nanoparticle–fluorescent polymer ‘chemical nose’ sensors », *Nature nanotechnology*, vol. 2, n° 5, p. 318-323, 2007.
- [373] G. Zheng, W. L. Daniel, et C. A. Mirkin, « A new approach to amplified telomerase detection with polyvalent oligonucleotide nanoparticle conjugates », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, n° 30, p. 9644-9645, 2008.
- [374] Y.-P. Kim, W. L. Daniel, Z. Xia, H. Xie, C. A. Mirkin, et J. Rao, « Bioluminescent nanosensors for protease detection based upon gold nanoparticle–luciferase conjugates », *Chemical communications*, vol. 46, n° 1, p. 76-78, 2010.

- [375] J.-S. Lee, P. A. Ulmann, M. S. Han, et C. A. Mirkin, « A DNA– gold nanoparticle-based colorimetric competition assay for the detection of cysteine », *Nano letters*, vol. 8, n° 2, p. 529-533, 2008.
- [376] R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, et C. A. Mirkin, « Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles », *Science*, vol. 277, n° 5329, p. 1078-1081, 1997.
- [377] J. Conde, J. M. de la Fuente, et P. V. Baptista, « RNA quantification using gold nanoprobe-application to cancer diagnostics », *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 8, n° 1, p. 1-8, 2010.
- [378] G. A. Craig, P. J. Allen, et M. D. Mason, « Synthesis, characterization, and functionalization of gold nanoparticles for cancer imaging », in *Cancer Nanotechnology*, Springer, 2010, p. 177-193.
- [379] H. He et J. Ren, « A novel evanescent wave scattering imaging method for single gold particle tracking in solution and on cell membrane », *Talanta*, vol. 77, n° 1, p. 166-171, 2008.
- [380] S. JunáZhen, J. YunáLi, Y. FangáLi, et C. ZhiáHuang, « Controllable preparation of metal nanoparticle/carbon nanotube hybrids as efficient dark field light scattering agents for cell imaging », *Chemical communications*, vol. 46, n° 24, p. 4303-4305, 2010.
- [381] M. B. Mohamed, V. Volkov, S. Link, et M. A. El-Sayed, « The lightning' gold nanorods: fluorescence enhancement of over a million compared to the gold metal », *Chemical Physics Letters*, vol. 317, n° 6, p. 517-523, 2000.
- [382] H. T. John, « Fluorescence properties of gold nanorods and their application for DNA biosensing », *Chemical communications*, n° 31, p. 3924-3926, 2005.
- [383] S.-C. Tang, Y.-Y. Fu, W.-F. Lo, T.-E. Hua, et H.-Y. Tuan, « Vascular labeling of luminescent gold nanorods enables 3-D microscopy of mouse intestinal capillaries », *ACS nano*, vol. 4, n° 10, p. 6278-6284, 2010.
- [384] J. Park *et al.*, « Two-photon-induced photoluminescence imaging of tumors using near-infrared excited gold nanoshells », *Optics Express*, vol. 16, n° 3, p. 1590-1599, 2008.
- [385] C. Loo, A. Lowery, N. Halas, J. West, et R. Drezek, « Immunotargeted Nanoshells for Integrated Cancer Imaging and Therapy », p. 3.
- [386] G. Wang, T. Huang, R. W. Murray, L. Menard, et R. G. Nuzzo, « Near-IR luminescence of monolayer-protected metal clusters », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, n° 3, p. 812-813, 2005.
- [387] J. P. Wilcoxon, J. E. Martin, F. Parsapour, B. Wiedenman, et D. F. Kelley, « Photoluminescence from nanosize gold clusters », *The Journal of chemical physics*, vol. 108, n° 21, p. 9137-9143, 1998.

- [388] Y. Zheng, L. Lai, W. Liu, H. Jiang, et X. Wang, « Recent advances in biomedical applications of fluorescent gold nanoclusters », *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 242, p. 1-16, avr. 2017, doi: 10.1016/j.cis.2017.02.005.
- [389] X. Wu, X. He, K. Wang, C. Xie, B. Zhou, et Z. Qing, « Ultrasmall near-infrared gold nanoclusters for tumor fluorescence imaging *in vivo* », *Nanoscale*, vol. 2, n° 10, p. 2244, 2010, doi: 10.1039/c0nr00359j.
- [390] M. W. Galper *et al.*, « Effect of computed tomography scanning parameters on gold nanoparticle and iodine contrast », *Investigative radiology*, vol. 47, n° 8, p. 475, 2012.
- [391] D. P. Cormode *et al.*, « Nanocrystal core high-density lipoproteins: a multimodality contrast agent platform », *Nano letters*, vol. 8, n° 11, p. 3715-3723, 2008.
- [392] D. R. Arifin *et al.*, « Trimodal gadolinium-gold microcapsules containing pancreatic islet cells restore normoglycemia in diabetic mice and can be tracked by using US, CT, and positive-contrast MR imaging », *Radiology*, vol. 260, n° 3, p. 790-798, 2011.
- [393] Q.-Y. Cai *et al.*, « Colloidal gold nanoparticles as a blood-pool contrast agent for X-ray computed tomography in mice », *Investigative radiology*, vol. 42, n° 12, p. 797-806, 2007.
- [394] H. Wang *et al.*, « Dendrimer-entrapped gold nanoparticles as potential CT contrast agents for blood pool imaging », *Nanoscale research letters*, vol. 7, n° 1, p. 1-8, 2012.
- [395] C. Peng *et al.*, « PEGylated dendrimer-entrapped gold nanoparticles for *in vivo* blood pool and tumor imaging by computed tomography », *Biomaterials*, vol. 33, n° 4, p. 1107-1119, 2012.
- [396] J. F. Hainfeld, D. N. Slatkin, T. M. Focella, et H. M. Smilowitz, « Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent », *The British journal of radiology*, vol. 79, n° 939, p. 248-253, 2006.
- [397] C. Xu, G. A. Tung, et S. Sun, « Size and concentration effect of gold nanoparticles on X-ray attenuation as measured on computed tomography », *Chemistry of Materials*, vol. 20, n° 13, p. 4167-4169, 2008.
- [398] D. Kim, S. Park, J. H. Lee, Y. Y. Jeong, et S. Jon, « Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for *in vivo* X-ray computed tomography imaging », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, n° 24, p. 7661-7665, 2007.
- [399] R. H. Menk *et al.*, « Gold nanoparticle labeling of cells is a sensitive method to investigate cell distribution and migration in animal models of human disease », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 7, n° 5, p. 647-654, 2011.
- [400] R. Popovtzer *et al.*, « Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer », *Nano letters*, vol. 8, n° 12, p. 4593-4596, 2008.

- [401] B. Aydogan *et al.*, « AuNP-DG: deoxyglucose-labeled gold nanoparticles as X-ray computed tomography contrast agents for cancer imaging », *Molecular imaging and biology*, vol. 12, n° 5, p. 463-467, 2010.
- [402] S. Narayanan, B. N. Sathy, U. Mony, M. Koyakutty, S. V. Nair, et D. Menon, « Biocompatible magnetite/gold nanohybrid contrast agents via green chemistry for MRI and CT bioimaging », *ACS applied materials & interfaces*, vol. 4, n° 1, p. 251-260, 2012.
- [403] J. Li *et al.*, « A novel functional CT contrast agent for molecular imaging of cancer », *Physics in Medicine & Biology*, vol. 55, n° 15, p. 4389, 2010.
- [404] T. Reuveni, M. Motiei, Z. Romman, A. Popovtzer, et R. Popovtzer, « Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer: an *in vivo* study », *International journal of nanomedicine*, vol. 6, p. 2859, 2011.
- [405] P. A. Jackson, W. N. W. A. Rahman, C. J. Wong, T. Ackerly, et M. Geso, « Potential dependent superiority of gold nanoparticles in comparison to iodinated contrast agents », *European journal of radiology*, vol. 75, n° 1, p. 104-109, 2010.
- [406] I.-C. Sun *et al.*, « Heparin-coated gold nanoparticles for liver-specific CT imaging », *Chemistry—A European Journal*, vol. 15, n° 48, p. 13341-13347, 2009.
- [407] D. Kim, Y. Y. Jeong, et S. Jon, « A drug-loaded aptamer– gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer », *ACS nano*, vol. 4, n° 7, p. 3689-3696, 2010.
- [408] J. F. Hainfeld, M. J. O'Connor, F. A. Dilmanian, D. N. Slatkin, D. J. Adams, et H. M. Smilowitz, « Micro-CT enables microlocalisation and quantification of Her2-targeted gold nanoparticles within tumour regions », *The British journal of radiology*, vol. 84, n° 1002, p. 526-533, 2011.
- [409] C. O. Schirra *et al.*, « Second generation gold nanobeacons for robust K-edge imaging with multi-energy CT », *Journal of materials chemistry*, vol. 22, n° 43, p. 23071-23077, 2012.
- [410] X. Yang, E. W. Stein, S. Ashkenazi, et L. V. Wang, « Nanoparticles for photoacoustic imaging », *Wiley interdisciplinary reviews: nanomedicine and nanobiotechnology*, vol. 1, n° 4, p. 360-368, 2009.
- [411] A. Agarwal *et al.*, « Dual-mode imaging with radiolabeled gold nanorods », *Journal of biomedical optics*, vol. 16, n° 5, p. 051307, 2011.
- [412] Y.-S. Chen *et al.*, « Enhanced thermal stability of silica-coated gold nanorods for photoacoustic imaging and image-guided therapy », *Optics express*, vol. 18, n° 9, p. 8867-8878, 2010.
- [413] K. Song et L. V. Wang, « Deep reflection-mode photoacoustic imaging of biological tissue », *Journal of biomedical optics*, vol. 12, n° 6, p. 060503, 2007.

- [414] G. Ku et L. V. Wang, « Deeply penetrating photoacoustic tomography in biological tissues enhanced with an optical contrast agent », *Optics letters*, vol. 30, n° 5, p. 507-509, 2005.
- [415] Y.-S. Chen, W. Frey, S. Kim, P. Kruizinga, K. Homan, et S. Emelianov, « Silica-coated gold nanorods as photoacoustic signal nanoamplifiers », *Nano letters*, vol. 11, n° 2, p. 348-354, 2011.
- [416] G. D. Moon *et al.*, « A new theranostic system based on gold nanocages and phase-change materials with unique features for photoacoustic imaging and controlled release », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, n° 13, p. 4762-4765, 2011.
- [417] X. Xia *et al.*, « An enzyme-sensitive probe for photoacoustic imaging and fluorescence detection of protease activity », *Nanoscale*, vol. 3, n° 3, p. 950-953, 2011.
- [418] W. Lu *et al.*, « Effects of photoacoustic imaging and photothermal ablation therapy mediated by targeted hollow gold nanospheres in an orthotopic mouse xenograft model of glioma », *Cancer research*, vol. 71, n° 19, p. 6116-6121, 2011.
- [419] S. Manohar, C. Ungureanu, et T. G. Van Leeuwen, « Gold nanorods as molecular contrast agents in photoacoustic imaging: the promises and the caveats », *Contrast media & molecular imaging*, vol. 6, n° 5, p. 389-400, 2011.
- [420] L.-C. Chen *et al.*, « Enhanced photoacoustic stability of gold nanorods by silica matrix confinement », *Journal of Biomedical optics*, vol. 15, n° 1, p. 016010, 2010.
- [421] K. H. Song, C. Kim, K. Maslov, et L. V. Wang, « Noninvasive *in vivo* spectroscopic nanorod-contrast photoacoustic mapping of sentinel lymph nodes », *European journal of radiology*, vol. 70, n° 2, p. 227-231, 2009.
- [422] R. Olafsson, D. R. Bauer, L. G. Montilla, et R. S. Witte, « Real-time, contrast enhanced photoacoustic imaging of cancer in a mouse window chamber », *Optics express*, vol. 18, n° 18, p. 18625-18632, 2010.
- [423] P.-C. Li *et al.*, « *In vivo* photoacoustic molecular imaging with simultaneous multiple selective targeting using antibody-conjugated gold nanorods », *Optics Express*, vol. 16, n° 23, p. 18605-18615, 2008.
- [424] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, et G. M. Whitesides, « Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology », *Chemical reviews*, vol. 105, n° 4, p. 1103-1170, 2005.
- [425] P. Ghosh, G. Han, M. De, C. K. Kim, et V. M. Rotello, « Gold nanoparticles in delivery applications », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, n° 11, p. 1307-1315, 2008.
- [426] C. Kim, P. Ghosh, et V. M. Rotello, « Multimodal drug delivery using gold nanoparticles », *Nanoscale*, vol. 1, n° 1, p. 61-67, 2009.

- [427] A. Mukhopadhyay, C. Grabinski, A. N. Afrooz, N. B. Saleh, et S. Hussain, « Effect of gold nanosphere surface chemistry on protein adsorption and cell uptake *in vitro* », *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 167, n° 2, p. 327-337, 2012.
- [428] S. Rana, A. Bajaj, R. Mout, et V. M. Rotello, « Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, n° 2, p. 200-216, 2012.
- [429] F. Wang, Y.-C. Wang, S. Dou, M.-H. Xiong, T.-M. Sun, et J. Wang, « Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells », *ACS nano*, vol. 5, n° 5, p. 3679-3692, 2011.
- [430] V. Venkatpurwar, A. Shiras, et V. Pokharkar, « Porphyrin capped gold nanoparticles as a novel carrier for delivery of anticancer drug: *in vitro* cytotoxicity study », *International journal of pharmaceuticals*, vol. 409, n° 1-2, p. 314-320, 2011.
- [431] J. You *et al.*, « Photothermal-chemotherapy with doxorubicin-loaded hollow gold nanospheres: A platform for near-infrared light-triggered drug release », *Journal of controlled release*, vol. 158, n° 2, p. 319-328, 2012.
- [432] S. Pearson, W. Scarano, et M. H. Stenzel, « Micelles based on gold-glycopolymer complexes as new chemotherapy drug delivery agents », *Chemical Communications*, vol. 48, n° 39, p. 4695-4697, 2012.
- [433] J. You, G. Zhang, et C. Li, « Exceptionally high payload of doxorubicin in hollow gold nanospheres for near-infrared light-triggered drug release », *ACS nano*, vol. 4, n° 2, p. 1033-1041, 2010.
- [434] A. François *et al.*, « Encapsulation of docetaxel into PEGylated gold nanoparticles for vectorization to cancer cells », *ChemMedChem*, vol. 6, n° 11, p. 2003-2008, 2011.
- [435] C. Tomuleasa *et al.*, « Gold nanoparticles conjugated with cisplatin/doxorubicin/capecitabine lower the chemoresistance of hepatocellular carcinoma-derived cancer cells. », *Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases*, vol. 21, n° 2, 2012.
- [436] A. Kumar *et al.*, « Gold nanoparticles functionalized with therapeutic and targeted peptides for cancer treatment », *Biomaterials*, vol. 33, n° 4, p. 1180-1189, 2012.
- [437] D. N. Heo *et al.*, « Gold nanoparticles surface-functionalized with paclitaxel drug and biotin receptor as theranostic agents for cancer therapy », *Biomaterials*, vol. 33, n° 3, p. 856-866, 2012.
- [438] G. F. Paciotti *et al.*, « Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery », *Drug delivery*, vol. 11, n° 3, p. 169-183, 2004.
- [439] S. K. Libutti *et al.*, « Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel PEGylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine », *Clinical cancer research*, vol. 16, n° 24, p. 6139-6149, 2010.

- [440] X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, et M. A. El-Sayed, « Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles », *Lasers in medical science*, vol. 23, n° 3, p. 217-228, 2008.
- [441] L. Zou *et al.*, « Current approaches of photothermal therapy in treating cancer metastasis with nanotherapeutics », *Theranostics*, vol. 6, n° 6, p. 762, 2016.
- [442] A. Masters et S. G. Bown, « Interstitial laser hyperthermia », in *Seminars in surgical oncology*, 1992, vol. 8, n° 4, p. 242-249.
- [443] V. Shanmugam, S. Selvakumar, et C.-S. Yeh, « Near-infrared light-responsive nanomaterials in cancer therapeutics », *Chemical Society Reviews*, vol. 43, n° 17, p. 6254-6287, 2014.
- [444] E. J. Hong, D. G. Choi, et M. S. Shim, « Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials », *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 6, n° 4, p. 297-307, 2016.
- [445] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, et M. A. El-Sayed, « Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, n° 6, p. 2115-2120, 2006.
- [446] S. Link et M. A. El-Sayed, « Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals », *International reviews in physical chemistry*, vol. 19, n° 3, p. 409-453, 2000.
- [447] N. Harris, M. J. Ford, et M. B. Cortie, « Optimization of plasmonic heating by gold nanospheres and nanoshells », *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, n° 22, p. 10701-10707, 2006.
- [448] B. N. Khlebtsov, V. A. Khanadeev, I. L. Maksimova, G. S. Terentyuk, et N. G. Khlebtsov, « Silver nanocubes and gold nanocages: Fabrication and optical and photothermal properties », *Nanotechnologies in Russia*, vol. 5, n° 7, p. 454-468, 2010.
- [449] J. M. Stern, J. Stanfield, Y. Lotan, S. Park, J.-T. Hsieh, et J. A. Caddeu, « Efficacy of laser-activated gold nanoshells in ablating prostate cancer cells *in vitro* », *Journal of Endourology*, vol. 21, n° 8, p. 939-943, 2007.
- [450] J. M. Stern, J. Stanfield, W. Kabbani, J.-T. Hsieh, et J. A. Caddeu, « Selective prostate cancer thermal ablation with laser activated gold nanoshells », *The Journal of urology*, vol. 179, n° 2, p. 748-753, 2008.
- [451] G. S. Terentyuk *et al.*, « Laser-induced tissue hyperthermia mediated by gold nanoparticles: toward cancer phototherapy », *Journal of biomedical optics*, vol. 14, n° 2, p. 021016, 2009.
- [452] J. F. Hainfeld, D. N. Slatkin, et H. M. Smilowitz, « The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice », *Physics in Medicine & Biology*, vol. 49, n° 18, p. N309, 2004.

- [453] C.-J. Liu *et al.*, « Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles », *Physics in Medicine & Biology*, vol. 55, n° 4, p. 931, 2010.
- [454] R. Shukla *et al.*, « Laminin receptor specific therapeutic gold nanoparticles (198AuNP-EGCg) show efficacy in treating prostate cancer », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, n° 31, p. 12426-12431, 2012.
- [455] S. W. Root, G. A. Andrews, R. M. Kniseley, et M. P. Tyor, « The distribution and radiation effects of intravenously administered colloidal Au198 in man », *Cancer*, vol. 7, n° 5, p. 856-866, 1954.
- [456] P. Rubin et S. H. Levitt, « The response of disseminated reticulum cell sarcoma to the intravenous injection of colloidal radioactive gold », *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 5, n° 8, p. 581-594, 1964.
- [457] J.-H. Jung, S.-H. Jung, S.-H. Kim, et S.-H. Choi, « Synthesis and characterization of radioisotope nanospheres containing two gamma emitters », *Applied Radiation and Isotopes*, vol. 70, n° 12, p. 2677-2681, 2012.
- [458] M. Laprise-Pelletier, J. Lagueux, M.-F. Côté, T. LaGrange, et M.-A. Fortin, « Low-Dose Prostate Cancer Brachytherapy with Radioactive Palladium–Gold Nanoparticles », *Advanced healthcare materials*, vol. 6, n° 4, p. 1601120, 2017.
- [459] D. Djoumessi, M. Laprise-Pelletier, P. Chevallier, J. Lagueux, M.-F. Côté, et M.-A. Fortin, « Rapid, one-pot procedure to synthesise 103 Pd: Pd@ Au nanoparticles en route for radiosensitisation and radiotherapeutic applications », *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 3, n° 10, p. 2192-2205, 2015.
- [460] S. Moendarbari *et al.*, « Theranostic nanoseeds for efficacious internal radiation therapy of unresectable solid tumors », *Scientific reports*, vol. 6, n° 1, p. 1-9, 2016.
- [461] S. Laurent *et al.*, « Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications », *Chemical reviews*, vol. 108, n° 6, p. 2064-2110, 2008.
- [462] C. Sun, J. S. Lee, et M. Zhang, « Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, n° 11, p. 1252-1265, 2008.
- [463] V. I. Shubayev, T. R. Pisanic II, et S. Jin, « Magnetic nanoparticles for theragnostics », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 61, n° 6, p. 467-477, 2009.
- [464] A. K. Gupta et M. Gupta, « Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications », *biomaterials*, vol. 26, n° 18, p. 3995-4021, 2005.
- [465] J. D. G. Durán, J. L. Arias, V. Gallardo, et A. V. Delgado, « Magnetic colloids as drug vehicles », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, n° 8, p. 2948-2983, 2008.

- [466] R. Weissleder, P. Reimer, A. S. Lee, J. Wittenberg, et T. J. Brady, « MR receptor imaging: ultrasmall iron oxide particles targeted to asialoglycoprotein receptors. », *AJR. American journal of roentgenology*, vol. 155, n° 6, p. 1161-1167, 1990.
- [467] R. Weissleder, G. Elizondo, J. Wittenberg, C. A. Rabito, H. H. Bengel, et L. Josephson, « Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. », *Radiology*, vol. 175, n° 2, p. 489-493, 1990.
- [468] R. J. Hunter, *Foundations of colloid science*. Oxford university press, 2001.
- [469] J. L. Ortega-Vinuesa, A. Martín-Rodríguez, et R. Hidalgo-Alvarez, « Colloidal stability of polymer colloids with different interfacial properties: mechanisms », *Journal of colloid and interface science*, vol. 184, n° 1, p. 259-267, 1996.
- [470] M. S. Romero-Cano, A. Martín-Rodríguez, et F. J. De Las Nieves, « Electrosteric stabilization of polymer colloids with different functionality », *Langmuir*, vol. 17, n° 11, p. 3505-3511, 2001.
- [471] M. Di Marco, I. Guilbert, M. Port, C. Robic, P. Couvreur, et C. Dubernet, « Colloidal stability of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles with different coatings », *International journal of pharmaceutics*, vol. 331, n° 2, p. 197-203, 2007.
- [472] Y. Ishikawa, Y. Katoh, et H. Ohshima, « Colloidal stability of aqueous polymeric dispersions: Effect of pH and salt concentration », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 42, n° 1, p. 53-58, 2005.
- [473] K. Thode, R. H. Müller, et M. Kresse, « Two-time window and multiangle photon correlation spectroscopy size and zeta potential analysis—Highly sensitive rapid assay for dispersion stability », *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 89, n° 10, p. 1317-1324, 2000.
- [474] J. J. M. Janssen, J. J. M. Baltussen, A. P. Van Gelder, et J. Perenboom, « Kinetics of magnetic flocculation. II. Flocculation of coarse particles », *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 23, n° 11, p. 1455, 1990.
- [475] J. J. Valle-Delgado, J. A. Molina-Bolivar, F. Galisteo-Gonzalez, et M. J. Gálvez-Ruiz, « Study of the colloidal stability of an amphoteric latex », *Colloid and Polymer Science*, vol. 281, n° 8, p. 708-715, 2003.
- [476] M. T. López-López, J. De Vicente, G. Bossis, F. González-Caballero, et J. D. G. Durán, « Preparation of stable magnetorheological fluids based on extremely bimodal iron–magnetite suspensions », *Journal of materials research*, vol. 20, n° 4, p. 874-881, 2005.
- [477] M. T. López-López, J. D. G. Durán, A. V. Delgado, et F. González-Caballero, « Stability and magnetic characterization of oleate-covered magnetite ferrofluids in different nonpolar carriers », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 291, n° 1, p. 144-151, 2005.

- [478] J. L. Viota, J. D. G. Durán, F. González-Caballero, et A. V. Delgado, « Magnetic properties of extremely bimodal magnetite suspensions », *Journal of magnetism and magnetic materials*, vol. 314, n° 2, p. 80-86, 2007.
- [479] C. Corot, P. Robert, J.-M. Idée, et M. Port, « Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 58, n° 14, p. 1471-1504, 2006.
- [480] T. Neuberger, B. Schöpf, H. Hofmann, M. Hofmann, et B. Von Rechenberg, « Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system », *Journal of Magnetism and Magnetic materials*, vol. 293, n° 1, p. 483-496, 2005.
- [481] W. Schütt *et al.*, « Applications of magnetic targeting in diagnosis and therapy—possibilities and limitations: a mini-review », *Hybridoma*, vol. 16, n° 1, p. 109-117, 1997.
- [482] R. Weissleder, A. Bogdanov, E. A. Neuwelt, et M. Papisov, « Long-circulating iron oxides for MR imaging », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 16, n° 2-3, p. 321-334, 1995.
- [483] P. Couvreur et C. Vauthier, « Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease », *Pharmaceutical research*, vol. 23, n° 7, p. 1417-1450, 2006.
- [484] J. L. Arias, « Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview », *Mini reviews in medicinal chemistry*, vol. 11, n° 1, p. 1-17, 2011.
- [485] M. Arruebo, R. Fernández-Pacheco, M. R. Ibarra, et J. Santamaría, « Magnetic nanoparticles for drug delivery », *Nano today*, vol. 2, n° 3, p. 22-32, 2007.
- [486] J. Dobson, « Magnetic nanoparticles for drug delivery », *Drug development research*, vol. 67, n° 1, p. 55-60, 2006.
- [487] A. Ibrahim, P. Couvreur, M. Roland, et P. Speiser, « New magnetic drug carrier », *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 35, n° 1, p. 59-61, 1983.
- [488] J. M. Gallo, P. K. Gupta, C. T. Hung, et D. G. Perrier, « Evaluation of drug delivery following the administration of magnetic albumin microspheres containing adriamycin to the rat », *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 78, n° 3, p. 190-194, 1989.
- [489] J. M. Gallo et U. Hafeli, « Correspondence re: AS Lübbe et al., Preclinical Experiences with Magnetic Drug Targeting: Tolerance and Efficacy. *Cancer Res.*, 56: 4694–4701, 1996; and Clinical Experiences with Magnetic Drug Targeting: A Phase I Study with 4'-Epidoxorubicin in 14 Patients with Advanced Solid Tumors. *Cancer Res.*, 56: 4686–4693, 1996 », *Cancer Research*, vol. 57, n° 14, p. 3063-3064, 1997.
- [490] C. Alexiou *et al.*, « Magnetic drug targeting—biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment », *Journal of drug targeting*, vol. 11, n° 3, p. 139-149, 2003.

- [491] C. Alexiou *et al.*, « *In vitro* and *in vivo* investigations of targeted chemotherapy with magnetic nanoparticles », *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 293, n° 1, p. 389-393, 2005.
- [492] N. Kohler, C. Sun, J. Wang, et M. Zhang, « Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells », *Langmuir*, vol. 21, n° 19, p. 8858-8864, 2005.
- [493] R. Gupta et A. K. Bajpai, « Magnetically guided release of ciprofloxacin from superparamagnetic polymer nanocomposites », *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 22, n° 7, p. 893-918, 2011.
- [494] J. L. Arias, « Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems », *Molecules*, vol. 13, n° 10, p. 2340-2369, 2008.
- [495] S. E. Barry, « Challenges in the development of magnetic particles for therapeutic applications », *International journal of hyperthermia*, vol. 24, n° 6, p. 451-466, 2008.
- [496] A. Senyei, K. Widder, et G. Czerlinski, « Magnetic guidance of drug-carrying microspheres », *Journal of Applied Physics*, vol. 49, n° 6, p. 3578-3583, 1978.
- [497] K. J. Widder, A. E. Senyei, et D. G. Scarpelli, « Magnetic microspheres: a model system for site specific drug delivery *in vivo* », *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 158, n° 2, p. 141-146, 1978.
- [498] J. Dobson, « Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery », *Gene therapy*, vol. 13, n° 4, p. 283-287, 2006.
- [499] Y. Chen, K. Ai, J. Liu, G. Sun, Q. Yin, et L. Lu, « Multifunctional envelope-type mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive drug delivery and magnetic resonance imaging », *Biomaterials*, vol. 60, p. 111-120, 2015.
- [500] G. Unsoy, R. Khodadust, S. Yalcin, P. Mutlu, et U. Gunduz, « Synthesis of Doxorubicin loaded magnetic chitosan nanoparticles for pH responsive targeted drug delivery », *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 62, p. 243-250, 2014.
- [501] S. Laurent, A. A. Saei, S. Behzadi, A. Panahifar, et M. Mahmoudi, « Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: opportunities and challenges », *Expert opinion on drug delivery*, vol. 11, n° 9, p. 1449-1470, 2014.
- [502] L. H. Reddy, J. L. Arias, J. Nicolas, et P. Couvreur, « Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications », *Chemical reviews*, vol. 112, n° 11, p. 5818-5878, 2012.
- [503] S. C. McBain, H. H. Yiu, et J. Dobson, « Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery », *International journal of nanomedicine*, vol. 3, n° 2, p. 169, 2008.

- [504] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, et Jjj. Dobson, « Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine », *Journal of physics D: Applied physics*, vol. 36, n° 13, p. R167, 2003.
- [505] J. Zhang *et al.*, « Multifunctional envelope-type mesoporous silica nanoparticles for tumor-triggered targeting drug delivery », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 135, n° 13, p. 5068-5073, 2013.
- [506] A. R. Chowdhuri, D. Bhattacharya, et S. K. Sahu, « Magnetic nanoscale metal organic frameworks for potential targeted anticancer drug delivery, imaging and as an MRI contrast agent », *Dalton Transactions*, vol. 45, n° 7, p. 2963-2973, 2016.
- [507] P. J. Kempen *et al.*, « Theranostic mesoporous silica nanoparticles biodegrade after pro-survival drug delivery and ultrasound/magnetic resonance imaging of stem cells », *Theranostics*, vol. 5, n° 6, p. 631, 2015.
- [508] T. Yadavalli, S. Ramasamy, G. Chandrasekaran, I. Michael, H. A. Therese, et R. Chennakesavulu, « Dual responsive PNIPAM–chitosan targeted magnetic nanopolymers for targeted drug delivery », *Journal of magnetism and Magnetic Materials*, vol. 380, p. 315-320, 2015.
- [509] F. Ye *et al.*, « Biodegradable polymeric vesicles containing magnetic nanoparticles, quantum dots and anticancer drugs for drug delivery and imaging », *Biomaterials*, vol. 35, n° 12, p. 3885-3894, 2014.
- [510] A. Hervault *et al.*, « Doxorubicin loaded dual pH-and thermo-responsive magnetic nanocarrier for combined magnetic hyperthermia and targeted controlled drug delivery applications », *Nanoscale*, vol. 8, n° 24, p. 12152-12161, 2016.
- [511] X. Yao *et al.*, « Graphene quantum dots-capped magnetic mesoporous silica nanoparticles as a multifunctional platform for controlled drug delivery, magnetic hyperthermia, and photothermal therapy », *Small*, vol. 13, n° 2, p. 1602225, 2017.
- [512] G. Wang, Y. Ma, Z. Wei, et M. Qi, « Development of multifunctional cobalt ferrite/graphene oxide nanocomposites for magnetic resonance imaging and controlled drug delivery », *Chemical Engineering Journal*, vol. 289, p. 150-160, 2016.
- [513] M. Bañobre-López, A. Teijeiro, et J. Rivas, « Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment », *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, vol. 18, n° 6, p. 397-400, 2013.
- [514] A. E. Deatsch et B. A. Evans, « Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia », *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 354, p. 163-172, 2014.
- [515] C. Haase et U. Nowak, « Role of dipole-dipole interactions for hyperthermia heating of magnetic nanoparticle ensembles », *Physical Review B*, vol. 85, n° 4, p. 045435, 2012.

- [516] R. R. Shah, T. P. Davis, A. L. Glover, D. E. Nikles, et C. S. Brazel, « Impact of magnetic field parameters and iron oxide nanoparticle properties on heat generation for use in magnetic hyperthermia », *Journal of magnetism and magnetic materials*, vol. 387, p. 96-106, 2015.
- [517] W. Andrä et H. Nowak, *Magnetism in medicine: a handbook*. John Wiley & Sons, 2007.
- [518] A. Aharoni, *Introduction to the Theory of Ferromagnetism*, vol. 109. Clarendon Press, 2000.
- [519] R. Hergt, S. Dutz, R. Müller, et M. Zeisberger, « Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy », *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 18, n° 38, p. S2919, 2006.
- [520] C. Martinez-Boubeta *et al.*, « Learning from nature to improve the heat generation of iron-oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia applications », *Scientific reports*, vol. 3, n° 1, p. 1-8, 2013.
- [521] E. L. Verde, G. T. Landi, J. de A. Gomes, M. H. Sousa, et A. F. Bakuzis, « Magnetic hyperthermia investigation of cobalt ferrite nanoparticles: Comparison between experiment, linear response theory, and dynamic hysteresis simulations », *Journal of Applied Physics*, vol. 111, n° 12, p. 123902, 2012.
- [522] B. Mehdaoui *et al.*, « Optimal size of nanoparticles for magnetic hyperthermia: a combined theoretical and experimental study », *Advanced Functional Materials*, vol. 21, n° 23, p. 4573-4581, 2011.
- [523] G. Vallejo-Fernandez et K. O'Grady, « Effect of the distribution of anisotropy constants on hysteresis losses for magnetic hyperthermia applications », *Applied Physics Letters*, vol. 103, n° 14, p. 142417, 2013.
- [524] H. Sohn et R. H. Victora, « Optimization of magnetic anisotropy and applied fields for hyperthermia applications », *Journal of Applied Physics*, vol. 107, n° 9, p. 09B312, 2010.
- [525] J. Carrey, B. Mehdaoui, et M. Respaud, « Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: Application to magnetic hyperthermia optimization », *Journal of Applied Physics*, vol. 109, n° 8, p. 083921, 2011.
- [526] S. Ruta, R. Chantrell, et O. Hovorka, « Unified model of hyperthermia via hysteresis heating in systems of interacting magnetic nanoparticles », *Scientific reports*, vol. 5, n° 1, p. 1-7, 2015.
- [527] D. Serantes *et al.*, « Multiplying magnetic hyperthermia response by nanoparticle assembling », *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 118, n° 11, p. 5927-5934, 2014.
- [528] D. B. Reeves et J. B. Weaver, « Nonlinear simulations to optimize magnetic nanoparticle hyperthermia », *Applied physics letters*, vol. 104, n° 10, p. 102403, 2014.
- [529] C. Martinez-Boubeta *et al.*, « Adjustable hyperthermia response of self-assembled ferromagnetic Fe-MgO core-shell nanoparticles by tuning dipole-dipole interactions », *Advanced Functional Materials*, vol. 22, n° 17, p. 3737-3744, 2012.

- [530] D. Serantes *et al.*, « Influence of dipolar interactions on hyperthermia properties of ferromagnetic particles », *Journal of Applied Physics*, vol. 108, n° 7, p. 073918, 2010.
- [531] G. T. Landi, « Role of dipolar interaction in magnetic hyperthermia », *Physical Review B*, vol. 89, n° 1, p. 014403, 2014.
- [532] L. J. Kroft, J. Doornbos, R. J. van der Geest, A. van der Laarse, H. van der Meulen, et A. de Roos, « Ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide (USPIO) MR imaging of infarcted myocardium in pigs », *Magnetic resonance imaging*, vol. 16, n° 7, p. 755-763, 1998.
- [533] E. Terreno, D. D. Castelli, A. Viale, et S. Aime, « Challenges for molecular magnetic resonance imaging », *Chemical reviews*, vol. 110, n° 5, p. 3019-3042, 2010.
- [534] R. Qiao, C. Yang, et M. Gao, « Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to *in vivo* MRI applications », *Journal of Materials Chemistry*, vol. 19, n° 35, p. 6274-6293, 2009.
- [535] I. Raynal, P. Prigent, S. Peyramaure, A. Najid, C. Rebutzi, et C. Corot, « Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10 », *Investigative radiology*, vol. 39, n° 1, p. 56-63, 2004.
- [536] K. Lind, M. Kresse, N. P. Debus, et R. H. Müller, « A novel formulation for superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles enhancing MR lymphography: comparison of physicochemical properties and the *in vivo* behaviour », *Journal of drug targeting*, vol. 10, n° 3, p. 221-230, 2002.
- [537] M. G. Mack, J. O. Balzer, R. Straub, K. Eichler, et T. J. Vogl, « Superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging of head and neck lymph nodes », *Radiology*, vol. 222, n° 1, p. 239-244, 2002.
- [538] D. L. Thorek, A. K. Chen, J. Czupryna, et A. Tsourkas, « Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging », *Annals of biomedical engineering*, vol. 34, n° 1, p. 23-38, 2006.
- [539] C. Corot *et al.*, « Macrophage imaging in central nervous system and in carotid atherosclerotic plaque using ultrasmall superparamagnetic iron oxide in magnetic resonance imaging », *Investigative radiology*, vol. 39, n° 10, p. 619-625, 2004.
- [540] S. A. Schmitz *et al.*, « Superparamagnetic iron oxide-enhanced MRI of atherosclerotic plaques in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits », *Investigative radiology*, vol. 35, n° 8, p. 460-471, 2000.
- [541] S. G. Ruehm, C. Corot, P. Vogt, S. Kolb, et J. F. Debatin, « Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaque with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in hyperlipidemic rabbits », *Circulation*, vol. 103, n° 3, p. 415-422, 2001.
- [542] R. A. Trivedi *et al.*, « Identifying inflamed carotid plaques using *in vivo* USPIO-enhanced MR imaging to label plaque macrophages », *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 26, n° 7, p. 1601-1606, 2006.

[543] M. E. Kooi *et al.*, « Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by *in vivo* magnetic resonance imaging », *Circulation*, vol. 107, n° 19, p. 2453-2458, 2003.

[544] A. Nicolás-Boluda *et al.*, « Photothermal depletion of cancer-associated fibroblasts normalizes tumor stiffness in desmoplastic cholangiocarcinoma », *ACS nano*, vol. 14, n° 5, p. 5738-5753, 2020.

CHAPITRE II

PEGylation : Influence sur le comportement *in vivo* des nanoparticules d'or

Table des matières

1. PEGylation	143
1.1. Introduction	143
1.2. Facteurs influençant la PEGylation	143
1.2.1. Type de nanoparticules	144
1.2.2. Conformation et longueur de la chaîne de PEG	145
1.2.3. Extrémité de PEG	146
1.2.4. Nature de la liaison entre les chaînes de PEG et les nanoparticules	147
1.2.5. Agents de reconnaissance pour le ciblage actif	147
1.3. Méthodes de caractérisation de la PEGylation	148
1.4. Impact de la PEGylation sur les produits pharmaceutiques	149
1.5. Nanomédicaments PEGylés en essais cliniques	150
1.6. Bilan	154
2. Synthèse des deux séries Au@TAPEG _n DOTA et Au@TAPEG _n DOTAGA	155
2.1. Chélateurs macrocycliques	155
2.2. Synthèse d'Au@X	157
2.3. Complexation	158
2.3.1. Complexation du gadolinium	158
2.3.2. Complexation de l'indium-111	158
3. Caractérisation des séries Au@TAPEG _n DOTA et Au@TAPEG _n DOTAGA	159
3.1. Spectrophotométrie UV-Visible	159
3.2. Dosage par ICP-OES d'or et du gadolinium	159
3.3. Microscopie électronique à transmission	160
3.4. Mesure du diamètre hydrodynamique et du potentiel Zêta	160
3.5. Lyophilisation	161

3.6.	ATG	161
4.	Caractéristiques des nanoparticules Au@TAPE _n DOTA et Au@TAPEG _n DOTAGA	161
5.	Biodistribution de la série Au@TAPEG _n DOTAGA dans des souris saines	170
5.1.	Protocoles expérimentaux	170
5.1.1.	Animaux	170
5.1.2.	SPECT/CT	170
5.1.3.	Biodistribution <i>ex vivo</i>	170
5.1.4.	Analyse ICP-EOS	171
5.2.	Résultats et discussion	171
6.	Radiothérapie	178
6.1.	Protocole expérimental	180
6.1.1.	Description de l'étude	180
6.1.2.	Préparation des embryons de poulet	182
6.1.3.	Amplification et greffe de cellules tumorales	182
6.1.4.	Traitements	183
6.1.5.	Évaluation quantitative de la croissance tumorale	183
6.1.6.	Évaluation quantitative de l'invasion métastatique	183
6.1.7.	Évaluation quantitative de la tolérance embryonnaire	184
6.2.	Résultats et discussion	184
7.	Conclusion	190
8.	Références	193

Table des Figures

Figure 1-1 : Structures chimiques de l'EG et du PEG	144
Figure 2-1 : Formules semi-développées des différents chélateurs	157
Figure 3-1 : Evolution de la température au cours du traitement thermique	161
Figure 4-1 : Spectres UV-visible entre 400 et 800 nm des suspensions de nanoparticules d'or de la série Au@TAPEG _n DOTA à deux temps différents juste après synthèse t ₀ et t ₀ + 3mois (3 mois après synthèse)	162
Figure 4-2 : Spectres UV-visible entre 400 et 800 nm des nanoparticules d'or de la série Au@TAPEG _n DOTAGA à deux temps différents juste après synthèse t ₀ et t ₀ + 3mois (3 mois après synthèse)	163
Figure 4-3 : Clichés TEM des différents types de nanoparticules Au@X	164
Figure 4-4 : Courbes d'analyse thermogravimétrique de poudres de nanoparticules d'or (a) Au@TADOTA, (b) Au@TAPEG ₄ DOTA, (c) Au@TAPEG ₁₁ DOTA, (d) Au@TADOTAGA, (e) Au@TAPEG ₄ DOTAGA et (f) Au@TAPEG ₁₁ DOTAGA	165
Figure 4-5 : Spectres UV-Visible des suspensions de nanoparticules d'or (a) Au@TADOTA, (b) Au@TAPEG ₄ DOTA, (c) Au@TAPEG ₁₁ DOTA, (d) Au@TADOTAGA, (e) Au@TAPEG ₄ DOTAGA et (f) Au@TAPEG ₁₁ DOTAGA enregistrés à différents pH (entre 1 et 11)	167
Figure 4-6 : Evolution du potentiel Zêta en fonction du pH des suspensions colloïdales de la série des nanoparticules Au@TAPEG _n DOTA	168
Figure 4-7 : Evolution du potentiel Zêta en fonction de pH des suspensions colloïdales de la série des nanoparticules Au@TAPEG _n DOTAGA	169
Figure 5-1 : Clichés SPECT/CT représentant l'évolution de la biodistribution des nanoparticules Au@TADOTAGA, Au@TAPEG ₄ DOTAGA et Au@TAPEG ₁₁ DOTAGA au cours du temps (1h et 24 h après injection intraveineuse)	172
Figure 5-2 : (a) pourcentage moyen de radioactivité injectée (%ID) et (b) pourcentage moyen de radioactivité injectée par gramme de tissu (%ID/g) déterminés à partir des données acquises par comptage gamma des organes prélevés sur des souris sacrifiées 24 heures après injection intraveineuse des différents types de nanoparticules d'or.	173
Figure 5-3 : (a) pourcentage moyen d'or injecté (%ID) et (b) pourcentage moyen d'or injecté par gramme de tissu (%ID/g) déterminés à partir des résultats d'analyse ICP-OES des organes prélevés sur des souris sacrifiées 24 heures après injection intraveineuse des différents types de nanoparticules d'or.	174
Figure 5-4 : Pourcentage moyen de dose de nanoparticules d'or injectée (%ID) calculé à partir des images acquises 1 heure et 24 heures après injection intraveineuse des différents types de nanoparticules à des souris saines	175

Figure 5-5 : Pourcentage moyen de dose de nanoparticules d'or injectée éliminé de l'organisme 24 heures après injection intraveineuse des suspensions de nanoparticules Au@TAPEG _n DOTAGA (n = 0, 4 et 11)	178
Figure 6-1 : Description de l'étude	181
Figure 6-2 : Protocole et vue du portoir pour l'irradiation	183
Figure 6-3 : La valeur moyenne de la masse tumorale (mg) pour les différents groupes d'embryons	185
Figure 6-4 : Le pourcentage de survie et de mort des embryons à la fin de l'étude	188
Figure 6-5 : Quantité relative de métastases pour les différents groupes d'analyse	190

Table des Tableaux

Tableau 1-1 : Différents types de nanoparticules PEGylées conçues pour améliorer l'efficacité anticancéreuse des principes actifs	152
Tableau 1-2 : Nanoparticules anticancéreuses PEGylées en cours d'évaluation préclinique et clinique	154
Tableau 4-1 : Diamètre hydrodynamique des différents types de nanoparticules d'or mesuré par DLS	164
Tableau 4-2 : Composition de différents types de nanoparticules d'or	166
Tableau 6-1 : Description des groupes d'étude et de leur traitement.	182

CHAPITRE II

PEGylation : Influence sur le comportement *in vivo* des nanoparticules d'or

1. PEGylation

1.1. Introduction

La fonctionnalisation de matériaux par des chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG) de différents poids moléculaires est connue sous le nom de PEGylation. Le polymère synthétique poly(éthylène glycol), ou PEG, est constitué de motifs de répétition (-O-CH₂-CH₂-) ayant une masse molaire de 44 g/mol.[1] La PEGylation en nanomédecine a été définie pour la première fois comme la modification covalente de protéines, de peptides ou de petits composés chimiques avec une ou plusieurs chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG) de différents poids moléculaires.[2] Davies et Abuchowsky ont initialement décrit la PEGylation dans les années 1970 dans le cadre de la modification de l'albumine et de la catalase.[3]–[6] Depuis lors, cette technologie a été largement utilisée dans la formulation de principes actifs et de systèmes de délivrance de principes actifs. La PEGylation offre un certain nombre d'avantages, notamment un temps de séjour plus long dans l'organisme, une dégradation enzymatique métabolique plus faible et une immunogénicité réduite voire annihilée.[3], [5], [7]–[12] L'expérience acquise depuis les années 70-80 dans l'amélioration de la biodistribution et de la pharmacocinétique de divers systèmes de délivrance désormais utilisés en clinique (liposomes, micelles, particules polymères, protéines...) a été profitable au développement de la nanomédecine. La littérature regorge d'exemples de nanoparticules PEGylées conçues pour des applications d'imagerie médicale et/ou de thérapie. L'énorme potentiel d'amélioration des performances des nanomédicaments est largement documenté [13] et il existe 30 médicaments PEGylés approuvés par la FDA pour une utilisation clinique et de nombreux autres sont en cours d'évaluation clinique[14], [15].

Comme nous cherchons à ralentir la clairance rénale des nanoparticules d'or recouvertes de chélateurs de gadolinium (ou de radioisotopes) pour mieux exploiter leur potentiel prometteur dans le traitement de cancers par radiothérapie guidée par l'imagerie (IRM, imagerie nucléaire), la PEGylation de ces nanoparticules est une stratégie qui mérite d'être explorée. Afin d'éclaircir nos choix, la littérature consacrée à la PEGylation des nanoparticules conçues pour des applications médicales sera passée en revue dans la partie suivante avant de détailler notre stratégie concernant les nanoparticules d'or recouvertes de chélateurs macrocycliques et de présenter et discuter les résultats obtenus.

1.2. Facteurs influençant la PEGylation

La Figure 1-1 représente le monomère éthylène glycol (EG) et la structure fondamentale du polymère avec les extrémités R₁ et R₂ et le nombre d'unités de répétition n qui exercent une influence sur les propriétés

physico-chimiques du PEG. En gardant à l'esprit l'amélioration du temps de circulation, les paramètres-clés ayant un impact sur le comportement des structures PEG-NPs sont discutés ci-dessous.

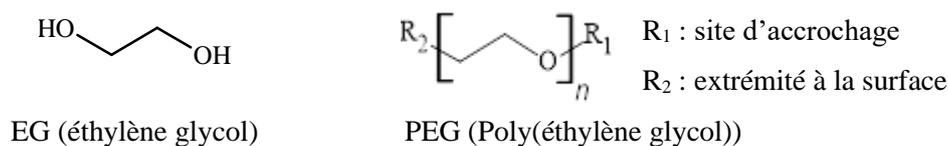


Figure 1-1 : Structures chimiques de l'EG et du PEG

1.2.1. Type de nanoparticules

La PEGylation des nanoparticules s'est imposée comme une stratégie efficace pour garantir la stabilité colloïdale et l'augmentation du temps de circulation. Cette dernière peut être associée au temps de demi-vie plasmatique ($t_{1/2}$) des nanoparticules, *i.e.* l'intervalle de temps qui sépare le moment de l'injection intraveineuse des nanoparticules de celui pour lequel il reste dans le sang la moitié des nanoparticules administrées. La taille, la charge et la composition des NPs exercent un fort impact sur leur comportement *in vivo*. Les liposomes de ganglioside, par exemple, ont une distribution qui dépend de leur taille : quand leur taille est inférieure à 70 nm, ils s'accumulent dans le foie alors qu'ils sont majoritairement présents dans la rate pour une taille supérieure à 200 nm. En revanche, les liposomes de phosphatidylsérine ont une accumulation hépatique indépendante de leur taille.[16] Cependant, pour une taille donnée, la biodistribution des liposomes et leur temps de demi-vie plasmatique peuvent être adaptés par la PEGylation, et en particulier par la longueur de chaîne de PEG.[17]–[20] Mais la PEGylation demeure inefficace pour modifier la biodistribution et augmenter le temps de circulation des NPs qui possèdent des charges de surface positives et des diamètres supérieurs à 100 nm : elles sont rapidement éliminées de la circulation malgré la présence de chaînes de PEG.[21], [22] Probablement parce qu'elles sont très petites ($D_h < 8\text{nm}$), Faure *et al.* [23] ont montré que le comportement de nanoparticules d'oxyde de gadolinium recouvertes d'une couche de polysiloxane chargée positivement était modifié avantageusement après PEGylation par des chaînes de PEG ($M_w = 2000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) dont l'extrémité libre était pourtant chargée positivement ($-\text{NH}_3^+$ à pH 7,4). En l'absence de PEGylation, ces nanoparticules étaient rapidement opsonisées, malgré leur dimension adaptée pour une élimination rénale. En moins de 15 minutes, ces particules se retrouvaient massivement dans le foie et les poumons. Ce comportement indésirable a été attribué à la charge positive. Cependant, la fonctionnalisation de ces nanoparticules chargées positivement par des chaînes de PEG ($M_w = 2000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) elles-mêmes chargées positivement a permis d'augmenter considérablement le temps de circulation des nanoparticules (de quelques minutes à plusieurs heures), de limiter l'accumulation indésirable dans le foie et d'éviter le piégeage de ces nanoparticules dans les poumons. De plus, le mécanisme menant à l'accumulation dans le foie semblait ne plus reposer sur le phénomène d'opsonisation qui se traduit par une accumulation massive et fulgurante dans le foie, la rate et les poumons. Elle résultait plutôt de l'élimination hépatobiliaire car l'accumulation dans le foie était plus progressive et moins massive comme l'illustre la forte augmentation du temps de résidence vasculaire des nanoparticules PEGylées par rapport aux nanoparticules dépourvues de PEG. Cette différence de

comportement illustre parfaitement le rôle positif de la PEGylation dans le contrôle de la biodistribution et de la pharmacocinétique. Cette influence dépend non seulement de la composition mais également de la longueur de la chaîne et du groupe terminal à l'extrémité libre du PEG. Comme le montre cette étude, l'accumulation dans le foie n'est plus visible et l'élimination rénale est très nettement favorisée quand le PEG chargé positivement est remplacé par un PEG de même masse moléculaire mais de charge négative (groupe COO⁻). La quantité de PEG-COO⁻ était suffisante pour inverser le signe du potentiel Zêta et donc le comportement des nanoparticules. Une élimination rénale encore plus rapide a été observée quand la chaîne de PEG-COO⁻ a été raccourcie (de $M_w = 2000 \text{ g.mol}^{-1}$ à 250 g.mol^{-1}).

Les types de PEG conçus pour contrôler le comportement *in vivo* des liposomes peuvent exercer un impact différent lorsqu'ils sont appliqués à des NPs métalliques solides, car les liposomes ressemblent davantage à des organismes circulants naturellement (c'est-à-dire la bicouche lipidique) et ne nécessitent donc pas un processus de PEGylation aussi strict. Lors du choix d'une méthode de conjugaison du PEG, la nature de la nanoparticule doit être prise en compte. Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (SPION) ont fait partie des premières nanoparticules étudiées pour des applications en imagerie comme le montrent les rapports sur ce type de nanomatériaux dès les années 1960. [24], [25] Depuis les SPION sont devenus des objets d'étude courants dans les années 1990.[26]–[28] La PEGylation ou l'enrobage par le dextrane de SPION et de USPIO améliore la qualité de l'image car elle prolonge le temps $t_{1/2}$ jusqu'à 200 minutes et favorise l'accumulation dans les tumeurs solides.[29]–[31] Dès les années 1970, les nanoparticules d'or ont été utilisées pour augmenter le contraste en microscopie électronique à transmission avant d'être adaptées comme agents de contraste en tomodensitométrie et en radiographie et comme agent radiosensibilisant.[32]–[34] Cette application *in vivo* des nanoparticules a conduit de nombreuses équipes à mettre en place des protocoles de PEGylation des nanoparticules d'or. Les nanoparticules et les nanobâtonnets d'or PEGylés sont depuis utilisés dans une variété d'applications.[35]–[40]

1.2.2. Conformation et longueur de la chaîne de PEG

La longueur de la chaîne de PEG augmente naturellement avec le nombre d'unités de répétition. Mais l'épaisseur de la couche de PEG n'augmente pas nécessairement de façon linéaire car les chaînes de PEG greffées à la surface des nanoparticules peuvent se replier. Il existe plusieurs façons de décrire la PEGylation : par le nombre d'unité de répétition (PEG₁₁ qui indique la présence de 11 unités de répétition), par la masse molaire moyenne en masse (M_w) ou la masse molaire moyenne en nombre (M_n).[41] L'épaisseur d'une couche greffée sur les nanoparticules dépend de la longueur et de la configuration spatiale de la chaîne de PEG. La conformation du polymère peut être exprimée par le rayon de Flory (F) où n désigne le nombre de monomères par chaîne polymère et α désigne la longueur d'un monomère en Angströms ($\alpha = 3,5 \text{ \AA}$ pour le PEG). [42], [43]

$$F = \frac{3}{5} \alpha n$$

Deux conformations peuvent être adoptées par les chaînes de PEG selon leur densité de greffage. Pour les faibles densités, la conformation en « champignon » est adaptée. Quand elle est élevée, les chaînes de polymères adaptent une configuration de type « brosse ».[42], [43] Les nanoparticules recouvertes de PEG en brosse présentent une circulation plus longue parce que les revêtements plus denses protègent mieux les nanoparticules contre le SPM. [44]

Il a été montré que la clairance des nanoparticules PEGylées diminue et l'absorption par le foie augmente lorsque le poids moléculaire du PEG augmente.[45] Pour retarder l'élimination rénale et maintenir une circulation dans le sang pendant un temps plus long, la fonctionnalisation des nanoparticules par des chaînes de PEG plus longues a été proposée. [46] L'augmentation du diamètre hydrodynamique induite par la PEGylation retarde voire empêche l'élimination rénale. [45] Cela se traduit par une augmentation du temps de résidence vasculaire qui est recherchée car elle garantit une meilleure accumulation dans les zones d'intérêt. Les nanoparticules dont le diamètre hydrodynamique est de l'ordre de 50 à 100 nm sont généralement recouvertes de PEG de plus petite longueur.[45]

1.2.3. Extrémité de PEG

Le comportement *in vivo* des nanoparticules PEGylées est également influencé par l'extrémité libre du polymère, représentée par R_2 (Figure 1-1). Comme une large gamme de PEG, se distinguant par la nature du groupe terminal (alcool, alcoxy, carbonyle, halo, azido, sulfo et thiol), est commercialement accessible, il est envisageable d'adapter finement le comportement des nanoparticules PEGylées en jouant sur la longueur de la chaîne mais également sur le groupe terminal.[47] Plusieurs types de terminaison du PEG (méthoxy, alcool) réduisent de plusieurs ordres de grandeur la liaison non spécifique (adsorption, liaison hydrogènes...).[48], [49] L'internalisation dans les cellules est contrôlée par la charge des nanoparticules qui peut être ajustée par la PEGylation avec des chaînes portant des groupes terminaux R_2 chargés. Comme les surfaces des cellules sont négativement chargées, la présence d'une charge négative à l'extrémité R_2 provoque une répulsion et empêche les phénomènes phagocytaires alors que la présence d'une charge positive à l'extrémité les favorise.[21] La fonction terminale R_2 peut jouer un rôle essentiel dans la post-fonctionnalisation des nanoparticules et apporter aux nanoparticules des fonctions supplémentaires. Il est possible d'utiliser R_2 comme site de greffage pour immobiliser des agents de reconnaissance pour le ciblage actif [50], des agents d'imagerie (fluorophores organique NIR, chélates de gadolinium (IRM) et/ou de radioisotopes (SPECT, PET)), des agents thérapeutiques.[51] Du fait de la variété des PEG, le greffage covalent de ces différents agents peut être réalisé en appliquant les réactions classiques de couplage entre R_2 et le groupe réactif de la molécule à coupler à la nanoparticule (estérification (-OH/COOH), amidification (-NH₂/COOH), chimie des esters activés (-NH₂/NHS), formation d'une liaison thioether (-SH/maléimide), formation d'urée ou thiourée (-NH₂/-NCO ou -NCS) ou d'uréthane (carbamate) (-OH/-NCO)). Dans le cas de la fonctionnalisation des nanoparticules PEGylées par des molécules organiques la chimie click bioorthogonale peut être préférée car elle met en jeu des groupements artificiels qui n'existent pas naturellement dans les constituants de la matière biologique. Une telle chimie est adaptée pour préserver les fonctions des biomolécules car le greffage

covalent ne viendra pas endommager ses sites actifs. Il existe, dans les catalogues de différents fournisseurs, des PEG terminés par des groupements azoture ou alcyne pour la cycloaddition 1,3-doipolaire de Huisgens, transcyclooctène ou norbornène pour la cycloaddition de Diels-Alder à demande inverse en électrons (IEDDA) qui sont parfaitement adaptés pour des réactions de chimie bioorthogonale dont les protocoles sont désormais maîtrisés.

1.2.4. Nature de la liaison entre les chaînes de PEG et les nanoparticules

Des liaisons covalentes ou non covalentes sont utilisées pour relier les chaînes de PEG aux nanoparticules. La PEGylation des nanoparticules d'or peut être réalisée aisément lorsque les chaînes de PEG portent un fonction thiol (SH) car l'élément soufre possède une forte affinité pour l'or.[52] Afin de garantir un ancrage plus solide des chaîne de PEG sur les nanoparticules d'or, il a été proposé de remplacer la fonction thiol par des groupements portant plusieurs atomes de soufre (par exemple, l'acide dihydrolipoïque).[53] De nombreuses nanoparticules hydrophobes (AuNPs, MWCNT, nanoparticules d'oxyde de fer, QDs, polymère..[54]–[58]) ont été développées pour des applications médicales (biodétection, imagerie, thérapie). Cependant, leur potentiel ne peut être exploité que si les nanoparticules sont rendues hydrophiles. La PEGylation des nanoparticules apparaît donc une stratégie opportune. Dans le cas des nanoparticules hydrophobes, les chaînes de PEG utilisées portent à une extrémité une entité hydrophobe, généralement une chaîne lipidique ou phospholipidique. La chaîne PEG est alors maintenue par des interactions hydrophobes entre les lipides et les nanoparticules. Il est également possible d'ajouter simplement des lipides PEGylés au mélange lipidique au moment de l'enrobage des nanoparticules par ce revêtement lipidique [59] ou d'incuber des nanocapsules lipidiques non PEGylées avec une solution micellaire aqueuse contenant des lipides PEGylés [60] pour obtenir des préparations liposomales. Une autre méthode d'immobilisation de chaîne de PEG à la surface de différents types de nanoparticules repose sur les liaisons covalentes formées après réaction entre les groupements actifs de l'extrémité R_1 du PEG et ceux présents à la surface des nanoparticules [61], [62] La purification du conjugué PEG-nanoparticules est réalisée par de multiples étapes de centrifugation et de lavage, par filtration, par dialyse ou par des techniques de séparation telles que la chromatographie d'exclusion de taille ou d'échange d'ions, quelle que soit la chimie d'immobilisation.

1.2.5. Agents de reconnaissance pour le ciblage actif

Grâce à une PEGylation adaptée, l'adsorption non spécifique des protéines est réduite, l'hydrophilie est augmentée, l'agrégation des nanoparticules est empêchée et la liaison d'un groupe de reconnaissance sur les nanoparticules pour le ciblage actif, d'un agent d'imagerie ou d'un agent thérapeutique est envisageable si l'extrémité libre R_2 du PEG est un groupement réactif. Il est attendu des nanoparticules fonctionnalisées par un élément de reconnaissance une accumulation accrue et plus spécifique dans la zone d'intérêt, par opposition au ciblage passif reposant uniquement sur l'effet EPR.[63]–[65] Les anticorps,[66] les peptides [65], [67]–[69], les lectines,[70] les protéines modifiées [71] et les fragments de protéines [72] sont tous des exemples d'agents de reconnaissance pour le ciblage actif. Comme les nanoparticules quittent plus facilement le système vasculaire que les molécules, elles sont

particulièrement utiles pour cibler les éléments biologiques impliqués dans l'angiogenèse (intégrine $\alpha_v\beta_3$) ou dans le développement de plaques d'athérosclérose (VCAM-1).[68] Il a récemment été démontré que les nanoparticules peuvent être conçues pour transporter efficacement l'ARN_i en dehors du système vasculaire.[73], [74]

L'utilisation de PEG avec des extrémités réactives est une option intéressante pour immobiliser de manière covalente ou non covalente les ligands (groupe de reconnaissance) car elle permet d'allier les propriétés des ligands (ciblage actif et spécifique) à celle des PEG (contrôle de la balance hydrophile/hydrophobe, augmentation du temps de résidence vasculaire, contrôle de la biodistribution). Du fait de l'encombrement stérique des agents de reconnaissance qui peut nuire à l'interaction entre les ligands et la cible, il est souvent recommandé d'en greffer un nombre limité sur les nanoparticules. Il en résulte qu'une partie des groupes réactifs R_2 restent intacts car ils ne sont pas impliqués dans les réactions de greffage. Afin d'éviter que leur réactivité perturbe le comportement *in vivo* des nanoparticules, une étape visant à désactiver les sites d'accrochage R_2 des PEG est généralement effectuée. [63] Cette opération peut être l'occasion d'adapter les charges de surface et/ou la balance hydrophile-hydrophobe.[51], [62], [74] Puisque la totalité des sites réactifs R_2 des PEG est rarement exploitée pour greffer des molécules d'intérêt comme les agents de ciblage actif, une stratégie attirante consiste à recouvrir les nanoparticules par une couche mixte de PEG à partir d'un mélange de PEG. Il est alors imaginable de constituer des couches de PEG comportant des chaînes garantissant la furtivité alors que d'autres assurent l'immobilisation des groupements de reconnaissance.[75] Cependant cette stratégie pose le problème de contrôler la composition de cette couche de PEG mixte.

1.3. Méthodes de caractérisation de la PEGylation

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour caractériser les nanoparticules après PEGylation et pour déterminer l'influence de celle-ci sur les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules. La taille (diamètre hydrodynamique), la distribution de taille et le potentiel Zêta des nanoparticules peuvent être évalués à l'aide de la diffusion dynamique de la lumière (DLS : dynamic light scattering).[76] Plusieurs facteurs, comme le pH, le solvant et les électrolytes utilisés, le type de nanoparticules ainsi que leur concentration exercent une influence sur les mesures. Quand le potentiel Zêta est supérieur à 10 mV (en valeur absolue), la répulsion interparticulaire est accrue, et il favorise alors la stabilité colloïdale. La charge déduite du potentiel Zêta fournit des indications sur le revêtement de surface des nanoparticules. Les ammoniums ($R-NH_3^+$, acides conjugués des amines) ont une charge positive tandis que les thiolates (S^- base conjuguée des thiols SH) et les carboxylates (COO^- , base conjuguée des acides carboxyliques COOH) ont une charge négative qui dépend du pH du milieu. La DLS est une méthode de caractérisation rapide qui peut être mise en œuvre pour suivre les augmentations successives de la taille pendant la PEGylation et la bioconjugaison. L'homogénéité de la solution colloïdale finale peut être évaluée par la distribution de la taille des nanoparticules. Bien que l'augmentation de taille constitue un indice relativement fiable de la PEGylation des nanoparticules et permet de distinguer entre les différentes configurations du PEG (brosse,

champignon), [77] la DLS est incapable de déterminer la densité de greffage (le nombre de chaînes de PEG par nanoparticule) et la composition de la couche de PEG, en particulier dans le cas de couches mixtes.

Pour une analyse qualitative et quantitative des PEG liés aux nanoparticules, il est nécessaire de mettre en œuvre d'autres méthodes de caractérisation. L'analyse thermogravimétrique (ATG), qui mesure la perte de masse de l'échantillon avec l'augmentation de la température [78], [79], est particulièrement utile pour établir dans le cas de nanoparticules hybrides la proportion de matière organique (la couche) et inorganique (le cœur). Si la couche organique n'est pas constituée que de PEG, il est possible de calculer la densité de greffage de PEG si on dispose de la taille des nanoparticules et d'un modèle pertinent pour estimer la surface des nanoparticules. La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut être utilisée pour identifier les protons du motif éthylèneoxy à 3,65 parties par million (ppm) mais elle ne peut pas donner des résultats quantitatifs exacts.[78], [79] Une autre méthode qui peut fournir des informations quantitatives indirectes sur les PEG accrochés aux nanoparticules est la chromatographie en phase liquide (HPLC) ou gazeuse (GC).[80] Pour pouvoir bien déterminer la concentration en PEG, il est nécessaire de tracer une courbe d'étalonnage.

Comme le montre la littérature, la PEGylation modifie le comportement *in vivo* des nanoparticules. Dans la plupart des cas, la PEGylation est une stratégie efficace pour contourner le phénomène d'opsonisation et éviter la capture massive et fulgurante des nanoparticules opsonisées par le SPM. Elle permet également de ralentir la clairance rénale. Finalement, la PEGylation améliore la biodistribution et la pharmacocinétique des nanoparticules. La méthode la plus adaptée pour observer les effets de la PEGylation sur le comportement des nanoparticules consiste à suivre par imagerie, mais également par analyse chimique *post-mortem*, le devenir des nanoparticules après administration *in vivo*. Probablement la caractérisation la plus importante consiste à mesurer le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de ces nanoparticules en injectant une quantité connue de nanoparticules à un animal et en prélevant du sang en série pour surveiller la quantité de nanoparticules dans la circulation en fonction du temps écoulé. Si l'imagerie fournit des indications qualitatives voire quantitatives intéressantes en particulier pour les imageries « corps entier » (SPECT, PET), les analyses *post-mortem* des organes sont beaucoup plus performantes pour quantifier la quantité de nanoparticules accumulées dans les différents tissus. Pour déterminer avec précision les paramètres pharmacocinétiques, l'analyse du sang prélevé régulièrement est préconisée. Le comptage γ (qui nécessite le radiomarquage des nanoparticules), l'analyse élémentaire et la spectrométrie de masse sont quelques-unes des méthodes permettant de mesurer avec précision la concentration des nanoparticules. Une PEGylation contrôlée des nanoparticules conduit à une augmentation des valeurs de $t_{1/2}$. Par exemple, le xyotax PEGylé (paclitaxel encapsulé dans un polymère polyglutamate biodégradable, également connu sous le nom d'OPAXIO) est caractérisé par un temps de circulation d'environ 120 heures chez l'homme largement supérieur à celui du composé non PEGylé (0,8 h).[81], [82]

1.4. Impact de la PEGylation sur les produits pharmaceutiques

Comme déjà décrit, la PEGylation des nanoparticules permet de surmonter les différents obstacles rencontrés après l'injection des nanoparticules non PEGylés. En particulier, le SPM qui est une composante

du système immunitaire entrave l'administration efficace des nanomédicaments. Ce mécanisme élimine rapidement de la circulation les nanoparticules [83] qui finissent par s'accumuler rapidement et massivement dans le foie, la rate ou la moelle osseuse. La PEGylation des nanoparticules permet d'échapper à l'opsonisation (et donc à la capture fulgurante, massive et indésirable par le SPM) car les chaînes de PEG limitent voire empêchent l'adsorption des protéines plasmatiques sur les nanoparticules. Cet effet bénéfique pour l'exploitation *in vivo* des propriétés des nanoparticules est attribué à la capacité d'hydratation du polymère PEG [35]. En présence d'eau, le volume de la couche constituée par les chaînes de PEG augmente fortement avec pour conséquence une réduction des interactions non spécifiques avec les protéines plasmatiques. La décoration de la surface des nanoparticules avec du PEG permet donc d'augmenter le temps de circulation en réduisant le processus d'opsonisation et l'activité de reconnaissance et d'absorption des monocytes et des macrophages, avec pour impact global une réduction de la dose et de la fréquence d'administration.[13] Comme les nanoparticules PEGylées présentent une circulation prolongée dans le réseau vasculaire et permettent d'éviter l'opsonisation, elles sont mieux adaptées pour augmenter le ciblage des médicaments grâce à l'effet EPR. Des nanoparticules PEGylées ont récemment été produites pour l'administration combinée de DOX et de curcumine comme traitement du cancer.[84] Ces nanoparticules ont présenté une meilleure pénétration dans la tumeur, une durée de circulation plasmatique prolongée et une accumulation locale d'agents anticancéreux plus importante. Les souris traitées avec des nanoparticules PEGylées ont présenté une activité antitumorale accrue qui démontre une amélioration de l'efficacité anticancéreuse des nanoparticules lorsqu'elles sont PEGylées.[84] Les nanoparticules PEGylées ont un potentiel plus élevé d'accumulation sélective de principes actifs chimiothérapeutiques dans les tissus cancéreux via l'effet EPR, tout en réduisant la toxicité systémique. La conjugaison en surface de nanoparticules PEGylées avec des groupements de reconnaissance peut améliorer l'administration d'agents anticancéreux spécifiques d'un type de tumeurs. D'autre part, la PEGylation génère une augmentation du rayon hydrodynamique, qui réduit la clairance rénale. Bien que le seuil de poids moléculaire pour la filtration des protéines dans les reins soit d'environ 65 kDa, le PEG de 30 kDa présente une faible perméabilité rénale.[85] Pour cette raison le choix de la longueur de la chaîne de PEG selon le type de nanoparticule est crucial pour contrôler le mode d'élimination le plus adéquat.

1.5. Nanomédicaments PEGylés en essais cliniques

En raison de la flexibilité, de la pertinence thérapeutique et du potentiel d'application clinique de cette méthode prometteuse, le développement récent de nanomédicaments anticancéreux PEGylés a fait l'objet d'une grande attention. Les nanomédicaments anticancéreux PEGylés ont fait l'objet de tests précliniques et cliniques approfondis, et certains d'entre eux ont été autorisés pour un usage clinique (Tableau 1-1 et Tableau 1-2). En raison du bénéfice de la PEGylation, de nombreux essais précliniques sont en cours avec l'espoir d'amener les nanoparticules PEGylées en clinique (Tableau 1-1). Une formulation liposomale PEGylée chargée de Paclitaxel (PTX) a montré une demi-vie plasmatique prolongée chez les rats et une meilleure activité antitumorale chez les souris « nude » porteuses d'une tumeur du cancer du sein humain MDA-MB-231 dans une étude préclinique. La PEGylation réduit l'accumulation du médicament dans les

organes du SPM tout en la renforçant dans les tissus tumoraux, selon des études de biodistribution dans un modèle de souris « nude » xénogreffées.[86] Les micelles polymères PEGylées chargées de PTX ont augmenté la toxicité du médicament contre la lignée cellulaire de cancer du sein MDA-MB-435 dans une autre étude préclinique, même à des doses plus faibles. Ces micelles PEGylées chargées de PTX ont également amélioré l'absorption du principe actif et la réduction de la taille des tumeurs chez les souris « nude » porteuses de tumeurs MDA-MB-435.[87] Chez des souris atteintes d'un cancer du côlon C26 implanté par voie sous-cutanée, une étude préclinique utilisant des nanoparticules lipidiques PEGylées chargées de docétaxel a montré une augmentation de la demi-vie biologique de l'agent anticancéreux avec une accumulation significative au niveau du site tumoral.[88] Chez des souris SCID porteuses de la tumeur HT 29, une étude préclinique reposant sur l'administration de nanoparticules polymériques PEGylées chargées de cisplatine a montré une suppression significative de la croissance tumorale. De même, les souris ayant reçu des nanoparticules polymères PEGylées chargées de cisplatine avaient un meilleur pronostic.[89]

Type de nanomédicaments	Méthode de PEGylation	Modèle d'étude	Paramètres d'étude	Principales conclusions	Référence
Nanoparticules PEGylées modifiées par HA	Autoassemblage	Souris porteuses de tumeurs	Temps de circulation et ciblage tumoral	Amélioration significative du temps de circulation, diminution de l'absorption du principe actif par le foie, amélioration du ciblage tumoral et efficacité anticancéreuse	[90]
Nanoparticules PEGylées HA-céramide	Autoassemblage	Cellules cancéreuse et rats	Pharmacocinétique et administration ciblée	Ciblage et pharmacocinétique améliorés	[86]
Liposomes PEGylés	Conjugaison chimique	Rats et souris	Pharmacocinétique et ciblage tumoral médicamenteux	Temps de circulation plasmatique amélioré et accumulation accrue du principe actif dans les cellules cancéreuses	[91]
Nanobâtonnets d'or PEGylés	Greffage de PEG sur les nanobâtonnets d'or	Souris porteuses de tumeurs	Temps de circulation et accumulation du médicament	Temps de circulation plasmatique prolongé et accumulation améliorée du principe actif dans les cellules tumorales via l'effet EPR	[92]
Dendrimères de lysine PEGylés	Conjugaison chimique	Souris porteuses de tumeurs	Ciblage de médicaments	Augmentation de l'accumulation du principe actif dans les tissus tumoraux grâce à l'effet EPR	[93]
Liposomes cationiques PEGylés	Conjugaison	Souris porteuses de tumeurs cancéreuses pulmonaires	Pénétration tumorale médicamenteuse	Pénétration plus profonde du principe actif dans les cellules du carcinome pulmonaire	[94]
Micelles de copolymères séquencés PEGylés	Autoassemblage	Souris porteuses de tumeurs	Ciblage de médicaments	Accumulation efficace du principe actif spécifique à la tumeur via l'effet EPR	[95]
Nanoparticules polymériques PEGylées	Conjugaison	Modèles de souris xénogreffées	Ciblage tumoral	Augmentation significative (3,77 fois) de l'internalisation du principe actif dans les cellules tumorales par rapport au témoin	[96]

Tableau 1-1 : Différents types de nanoparticules PEGylées conçues pour améliorer l'efficacité anticancéreuse des principes actifs

Chez la souris, un autre système de micelles polymères PEGylées conçues pour encapsuler l'agent anticancéreux DOX (NK911) a montré une accumulation tumorale efficace. La tolérance, la sécurité et la supériorité pharmacocinétique de la formulation chez les patients cancéreux ont été vérifiées dans des études cliniques de phase I. [97] Il a été découvert qu'une formulation liposomale PEGylée de cisplatine (SPI-77) réduisait la toxicité systémique et délivrait le cisplatine à la tumeur à une plus grande

concentration. Malgré des doses cumulatives massives, les essais cliniques de phase II ont démontré une efficacité thérapeutique considérable du médicament, sans effets indésirables majeurs.[98] Les micelles PEGylées contenant des dérivés du cisplatine (NC-6004 Nanoplatin™) ont démontré une libération prolongée, une accumulation dans les cellules cancéreuses considérablement plus importante et une néphrotoxicité et neurotoxicité réduites. Ces nanoparticules font actuellement l'objet d'études cliniques de phase III pour le cancer du pancréas, les tumeurs solides et le carcinome pulmonaire non à petites cellules. Parallèlement, le NK105, un nanosystème micellaire PEGylé encapsulant le PTX, fait l'objet d'études cliniques de phase II et de phase III pour les tumeurs de l'estomac et du sein, respectivement.[13] Dans les études précliniques, Lipoplatin™, une version liposomale PEGylée du cisplatine, a montré une efficacité prometteuse dans le ciblage des tumeurs. D'autres recherches ont indiqué que, lors des tests cliniques de phase I, II et III, cette formulation a considérablement réduit la toxicité rénale, la neuropathie périphérique, l'ototoxicité et la myélotoxicité, ainsi que les nausées/vomissements et l'asthénie associés au cisplatine.[99]

Doxil® a été le premier liposome PEGylé à être homologué par les autorités réglementaires, et il a été créé pour prolonger la demi-vie de la DOX dans la circulation, permettant le ciblage passif du médicament et son accumulation dans les tissus tumoraux via l'effet EPR. La DOX libre a une demi-vie d'élimination de 0,2 heure, qui a été considérablement augmentée à 2,55 heures dans le cas du Doxil®.[100] Il a été en outre démontré qu'il provoque moins de cardiotoxicité que la forme libre de la DOX. Il est donc adapté pour traiter les femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique qui présentent un risque plus élevé de maladie cardiaque, de cancer ovarien avancé et de sarcome de Kaposi associé au SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise). [101] En Corée du Sud, Genexol-PM, une formulation de PTX sous forme de micelles polymériques PEGylées, a été autorisée pour le traitement du cancer du sein et du cancer du poumon.[102] La formulation de co-polymère dibloc PLA-b-PEG [103] reste la formulation micellaire de PTX la plus réussie à ce jour. Par rapport au Taxol, le Genexol-PM a démontré une augmentation par trois du seuil de tolérance et par un facteur compris entre 2 et 3 de la concentration de PTX dans les cellules tumorales lors d'une étude préclinique *in vivo* sur des souris « nude ».[104] Ces micelles PEGylées ont amélioré la demi-vie plasmatique, la biodisponibilité et abaissé la toxicité systémique, selon les données cliniques.[105] Le Tableau 1-2 donne un aperçu des nanoparticules PEGylées en phase préclinique et clinique.

Type de nanomédicaments	Médicaments chargées	Indication	Statut	Référence
Liposomes PEGylés	PTX	Demi- vie plasmatique du principe actif chez le rat et effet antitumoral amélioré	Essai préclinique	[86]
Micelle de polymères PEGylés	PTX	Augmentation de l'absorption du principe actif chez les souris nude porteuses de tumeurs avec une diminution significative de la taille de la tumeur	Essai préclinique	[87]
Nanoparticule lipidiques PEGylées	Docetaxel	Demi-vie plasmatique prolongée du principe actif avec une accumulation importante dans la tumeur	Essai préclinique	[88]
Nanoparticules de polymères PEGylés	Cisplatine	Inhibition de la croissance tumorale	Essai préclinique	[89]
Micelles de polymères PEGylées (NK911)	DOX	Accumulation de principes actifs dans une tumeur solide	Essai clinique phase I	[97]
Liposomes PEGylés (SPI-77)	Cisplatine	Réduction de la toxicité systémique et augmentation de l'accumulation tumorale	Essai clinique phase II	[98]
Micelles PEGylées (NC-6004 NANoplatin™)	Dérivés du Cisplatine	Accumulation de principe actif dans les cellules cancéreuses avec néphrotoxicité et neurotoxicité	Essai clinique phase III	[13]
Liposomes PEGylés	Cisplatine	Ciblage tumoral avec diminution des événements indésirables	Essai clinique phase III	[99]
Liposomes PEGylés (Doxil®)	DOX	Toxicité systémique atténuée avec augmentation de la demi-vie de la circulation plasmatique et de l'accumulation tumorale	Approuvé	[100]
Micelles de polymères PEGylées (Genexol-PM)	PTX	Toxicité systémique atténuée, prolongation de demi-vie de circulation plasmatique, accumulation tumorale accrue et efficacité anticancéreuse améliorée	Approuvé en Corée de Sud	[102]

Tableau 1-2 : Nanoparticules anticancéreuses PEGylées en cours d'évaluation préclinique et clinique

1.6. Bilan

Comme le montre la littérature, la PEGylation a été profitable au développement de la nanomédecine en permettant de surmonter plusieurs obstacles biologiques. Celle-ci est une méthode prometteuse pour

essayer de prolonger le temps de circulation des nanoparticules d'or tout en conservant leur élimination rénale. Cependant, dans la plupart des cas, le greffage du PEG sur les nanoparticules est une post-fonctionnalisation difficile à contrôler et à caractériser. Pour cela, notre première stratégie consiste à fabriquer des nanoparticules d'or PEGylées en une seule étape sans aucune post-fonctionnalisation. Cette synthèse devrait nous permettre d'obtenir des nanoparticules d'or de taille maîtrisée, recouvertes de chaînes de PEG porteuses de la fonction d'intérêt que nous souhaitons immobiliser à la surface des nanoparticules.

2. Synthèse des deux séries Au@TAPEG_nDOTA et Au@TAPEG_nDOTAGA

Comme déjà mentionné dans le chapitre 1, il existe différentes méthodes de synthèse des nanoparticules d'or. Les deux principales voies d'accès aux nanoparticules d'or sphériques sont celles reposant sur la méthode de Tuckevitch-Frens [106] et la méthode de Brust.[107], [108] La première consiste à réduire le sel d'or (HAuCl₄) par un réducteur doux à chaud, généralement le citrate de sodium (C₆H₅Na₃O₇), qui joue aussi le rôle d'agent stabilisant. Cette méthode produit des nanoparticules d'or de diamètre compris entre 10 à 150 nm en variant le rapport réducteur/sel d'or. La deuxième méthode est basée sur la réduction du même sel mais par un réducteur fort, le tétrahydroborate de sodium (NaBH₄), en présence de chélateur thiolés dont le rôle consiste à contrôler la croissance et donc la taille des nanoparticules d'or et à garantir la stabilité colloïdale des nanoparticules. Les protocoles décrits par Brust sont appropriés pour produire des suspensions colloïdales plus stables composées de nanoparticules d'or de taille comprise entre 2 à 10 nm. Outre le fait que les nanoparticules d'or produites par les protocoles de Brust présentent une taille adaptée pour des applications *in vivo*, ce mode de synthèse est intéressant car il produit des nanoparticules d'or fonctionnalisées par une couche organique constituée de dérivés organosoufrés solidement ancrés à la surface des nanoparticules d'or grâce à la forte affinité entre l'or et le soufre. Cela implique un choix pertinent de ces molécules qui doivent à minima assurer la stabilité colloïdale des nanoparticules d'or en milieu biologique. Cependant leur rôle peut avantageusement aller au-delà de cette fonction essentielle mais qui n'exploite pas complètement leur potentiel. En effet, les molécules organosoufrées utilisées lors de la synthèse des nanoparticules d'or par une méthode de Brust peuvent être sélectionnées pour les propriétés additionnelles qui compléteront celles des nanoparticules d'or. En raison de l'impact de ces ligands sur la taille et les propriétés des nanoparticules d'or, le choix des molécules organosoufrées requiert une réflexion solide.

2.1. Chélateurs macrocycliques

L'objectif de la thèse est d'augmenter le temps de circulation des nanoparticules d'or afin de mieux exploiter les propriétés intéressantes de l'or. D'après la littérature, la PEGylation est l'une des méthodes les plus utilisées. En raison du potentiel des chaînes de PEG à favoriser la circulation des nanoparticules,

la thèse a été en partie consacrée à la synthèse de nanoparticules d'or multifonctionnelles PEGylées et à l'étude de l'influence des chaînes de PEG de différentes longueurs sur le comportement *in vivo* des nanoparticules après injection. Dans ce contexte, des chélateurs ont été spécialement développés par l'équipe du Pr. Franck Denat de l'ICMUB. Ces chélateurs sont des molécules bifonctionnelles caractérisées par la présence à une extrémité d'un groupement dérivé de l'acide thioctique (avec deux atomes de soufre endocycliques) qui assurera l'accrochage des chaînes de PEG sur les nanoparticules d'or et, à l'extrémité opposée, d'un chélateur macrocyclique qui garantira l'immobilisation, par complexation, des ions d'intérêt pour l'imagerie. Ces deux extrémités sont séparées par une chaîne de PEG avec 4 unités de répétition (PEG₄) ou 11 unités de répétition (PEG₁₁). Comme nous souhaitons suivre la distribution de ces nanoparticules par IRM et imagerie nucléaire, les macrocycles ont été choisis pour leur capacité à former des complexes stables avec les ions Gd³⁺ pour l'IRM et [¹¹¹In]In³⁺ pour la SPECT. Pour cette raison, notre attention s'est portée sur les chélateurs macrocycliques de la famille DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclodécane-1,4,7,10-tétraacétique) et DOTAGA (acide (10-(2,6-dioxotétrahydro-2H-pyran-3-yl)-1,4,7,10-tétraazacyclodécane-1,4,7-triyl)triacétique).[109] Les travaux antérieurs réalisés par notre équipe ont montré qu'il était possible de produire des nanoparticules d'or recouvertes de chélateurs macrocycliques de la taille DOTA et DOTAGA à condition que ces molécules soient modifiées par l'acide thioctique (TA) qui servira de site d'accrochage sur les cœurs d'or. En raison de la présence de deux atomes de soufre endocycliques dans sa structure, TA possède des caractéristiques très intéressantes pour immobiliser les chélateurs macrocycliques sur les nanoparticules d'or car le soufre est connu pour présenter une forte affinité avec l'or. En outre, plusieurs études montrent que la désorption des ligands est d'autant plus retardée qu'ils portent un nombre croissant d'atomes de soufre.[110]–[113] Deux familles de chélateurs seront donc au centre de l'étude dont les résultats sont présentés et discutés dans la suite de ce chapitre. Les familles TAPEG_nDOTA et TAPEG_nDOTAGA (TA pour acide thioctique, le site d'accrochage ; DOTA ou DOTAGA pour identifier le type de chélateur macrocyclique ; PEG_n avec n = 0, 4 et 11 qui représente la chaîne de PEG avec n le nombre de motif de répétition (n=0 correspond aux chélateurs TADOTA et TADOTAGA déjà étudiés et serviront de référence)) sont construites autour des chélateurs macrocycliques DOTA et DOTAGA (Figure 2-1).

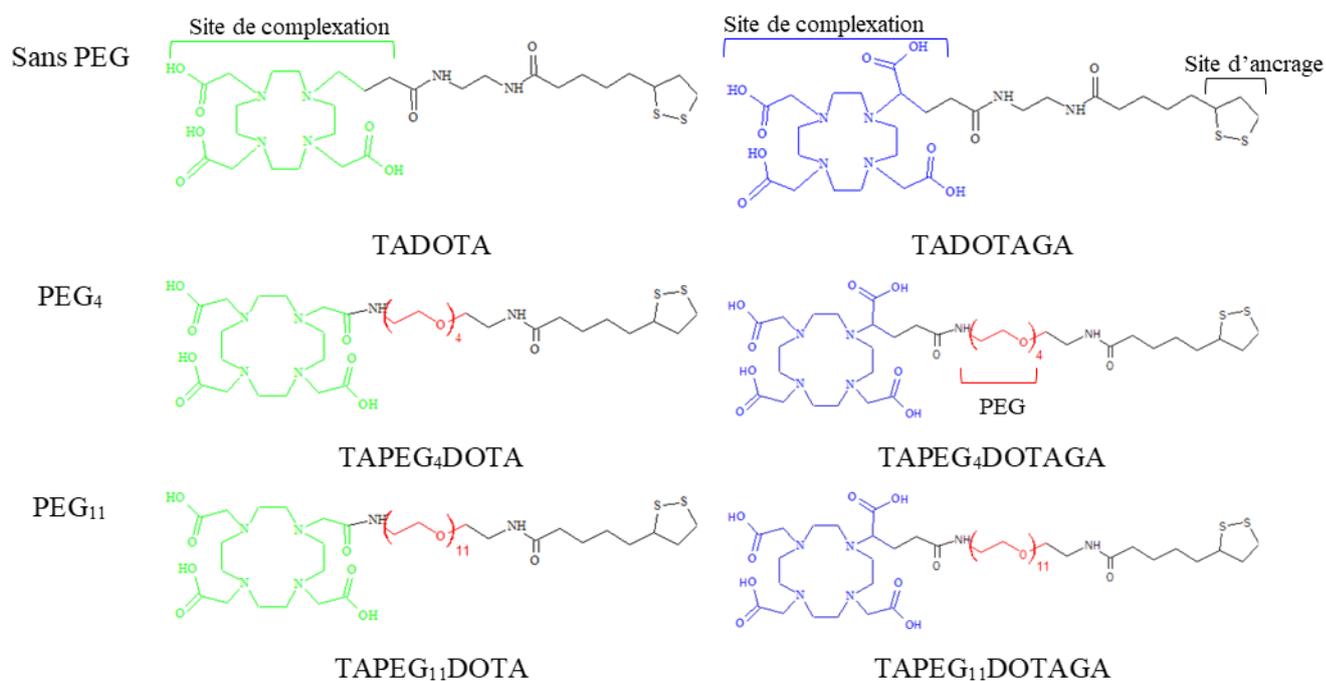


Figure 2-1 : Formules semi-développées des différents chélateurs

2.2. Synthèse d'Au@X

La synthèse des différents types de nanoparticules d'or Au@X recouvertes par différents chélateurs (X = TADOTAGA, TAPEG₄DOTAGA, TAPEG₁₁DOTAGA, TADOTA, TAPEG₄DOTA et TAPEG₁₁DOTA) est réalisée en adaptant le protocole en milieu monophasique décrit par Brust.[107] Cette méthode consiste à réduire un sel d'or (HAuCl₄) en présence d'un réducteur fort (NaBH₄) et de molécules organosoufrées. Ces molécules assurent le contrôle de la nucléation, la croissance et la taille des nanoparticules et la stabilité colloïdale des nanoparticules synthétisées. Ainsi les nanoparticules obtenues seront formées d'un cœur d'or d'apparence sphérique recouvert d'une couche organique.

Dans un ballon monocol de 250 mL, l'acide tétrachloroaurique H₂AuCl₄.3H₂O ($4,9 \cdot 10^{-4}$ mol, 192 mg) est dissous dans le méthanol CH₃OH (60 mL) sous agitation magnétique (solution S₁). Cette solution est de couleur jaune. Les molécules organosoufrées (les chélateurs macrocycliques X : $4,9 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissoutes dans l'eau distillée H₂O (38 mL) (solution S₂). S₂ est ajoutée à S₁ sous agitation magnétique. La couleur de la solution devient jaune orangé. Enfin, le réducteur est ajouté en deux portions sous la forme d'une solution aqueuse de tétrahydruoborate de sodium (NaBH₄ : $4,9 \cdot 10^{-3}$ mol, 182 mg dans l'eau déionisée (13 mL)) en maintenant une agitation magnétique vigoureuse. L'ajout s'accompagne d'un dégagement de dihydrogène gazeux. La solution devient noire instantanément. Cette couleur est caractéristique de la formation, à forte concentration, de germes d'or obtenus par la réduction de l'Au^(III) à Au⁽⁰⁾. La solution reste une heure sous agitation continue.

La suspension de nanoparticules d'or présente un excès de molécules organosoufrées libres et du méthanol qui doivent être éliminés pour les applications *in vivo*.

La dialyse est une méthode de purification basée sur le principe de l'osmose. La solution à purifier, le dialysat, est introduit dans un boudin de dialyse qui est une membrane semi-perméable. Ce boudin est immergé dans une solution, le contre-dialysat. Un échange de molécules entre le dialysat et le contre-dialysat par diffusion est généré par la différence de concentration entre le dialysat et le contre-dialysat afin de parvenir à l'équilibre entre les deux parties. La taille de pores de la membrane doit être adaptée pour laisser passer le méthanol et les chélateurs excédentaires et retenir les nanoparticules d'or.

Le boudin de dialyse utilisé pour la purification des nanoparticules Au@X est composé d'une membrane caractérisée par un seuil compris entre 6 et 8 kDa. En autres termes, les pores de cette membrane sont suffisamment larges pour le passage de l'eau, du méthanol, des chélateurs X et des impuretés mais suffisamment petits pour empêcher la diffusion des nanoparticules d'or vers le contre-dialysat. Le boudin contenant environ 100 mL d'une suspension colloïdale de nanoparticules Au@X fraîchement synthétisées est immergé dans 2 litres d'eau déionisée sous agitation pendant 72 heures. Le contre-dialysat est renouvelé 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 et 60 heures après le début de la dialyse. Ce changement est nécessaire pour conserver une importante différence de concentration et ainsi maintenir l'échange.

Après la dialyse, les nanoparticules d'or diluées sont concentrées par centrifugation en utilisant des tubes concentrateurs (Vivaspin® de 10 KDa) à 1500 tr/min. La solution colloïdale finale possède une concentration en or de l'ordre de 10 g/L.

2.3. Complexation

Les macrocycles DOTA et DOTAGA ont été choisis pour leur capacité à former des complexes stables avec des ions d'intérêt pour l'imagerie médicale (Gd^{3+} pour l'IRM, $[^{111}In]In^{3+}$ pour la SPECT).

2.3.1. Complexation du gadolinium

Le marquage au gadolinium est réalisé après synthèse. Le pH de la suspension de nanoparticules d'or Au@X est ramené à pH acide (pH entre 4 et 5) pour effectuer la complexation de l'ion gadolinium ($[Gd^{3+}] = 5 \text{ mM}$, 175 μL). Ensuite le pH des suspensions colloïdales a été ajusté à pH physiologique (7,4). Le marquage au gadolinium des nanoparticules nous permettra de suivre leur distribution par IRM.

2.3.2. Complexation de l'indium-111

Les suspensions colloïdales Au@X marquée par le gadolinium (III) sont ensuite envoyées au laboratoire de radiopharmacie de la plateforme d'imagerie nucléaire du CGFL de Dijon pour les radiomarquer avec le radionucléide d'indium ($[^{111}In]In^{3+}$). Ce radiomarquage est indispensable pour les études de suivi des nanoparticules d'Au@X par imagerie SPECT.

Les nanoparticules sont directement marquées à l'indium-111 en ajoutant une solution d'acide chlorhydrique 0,05M contenant $[^{111}In]InCl_3$ à une suspension colloïdale de nanoparticules. Typiquement, une suspension colloïdale d'Au@X (1 mL, à environ 10 g/L) en or est marqué avec environ 150 MBq de $[^{111}In]In^{3+}$ puis vortexée pendant vingt minutes. La chromatographie d'exclusion stérique est utilisée pour séparer les nanoparticules marquées Au@X($[^{111}In]In$) de l'indium-111 libre (colonne PD-10 Sephadex G-

25, GE Healthcare). La colonne est lavée avec 15 mL de tampon citrate de sodium (50 mM, pH ~ 5), puis la suspension colloïdale marquée est injectée et éluée avec le tampon citrate. Des fractions de 0,5 mL sont prélevées et leur activité est mesurée à l'aide d'un compteur approprié (chambre d'ionisation, Capintec CRC-15). La CCM (milieu ITLC-SG, Gelman Science) est utilisée pour déterminer la pureté radiochimique des fractions contenant des nanoparticules Au@X($[^{111}\text{In}]\text{In}^{3+}$). L'éluant est un tampon de citrate de sodium (50 mM, pH ~ 5). Un radiochromatographe est utilisé pour quantifier la radioactivité répartie sur les plaques CCM (miniGita, Raytest) après élution. Comme contrôle, une solution d'indium-111 libre (solution aqueuse de $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$) est utilisée.

3. Caractérisation des séries Au@TAPEG_nDOTA et Au@TAPEG_nDOTAGA

Les nanoparticules Au@TADOTA, Au@TAPEG₄DOTA, Au@TAPEG₁₁DOTA, Au@TADOTAGA, Au@TAPEG₄DOTAGA et Au@TAPEG₁₁DOTAGA sont caractérisées par différentes techniques avant leur application en milieu biologique.

3.1. Spectrophotométrie UV-Visible

Comme les nanoparticules d'or ont la particularité d'avoir des propriétés optiques modulables dans le domaine visible, la spectrophotométrie UV-visible est particulièrement adaptée pour caractériser les suspensions colloïdales de nanoparticules d'or. Malgré la simplicité de cette technique, il est possible d'obtenir des informations précises sur la taille, la forme, la dispersion en taille et la stabilité colloïdale des nanoparticules d'or car la position et la forme de la bande plasmon dépend de la taille, de la forme et de l'environnement des nanoparticules. L'instrument utilisé est un spectrophotomètre UV-visible de type SPECORD 210 avec une gamme de longueur d'onde de 400 à 800 nm. La largeur de la fente utilisée pour le tracé des spectres est de 2 nm, avec une résolution ($\Delta\lambda$) de 1 nm et une vitesse de balayage de 10 nm/s. Cette approche permet d'observer les spectres d'absorption des nanoparticules d'or. Comme les nanoparticules sont distribuées dans une solution aqueuse, l'eau est utilisée comme référence.

3.2. Dosage par ICP-OES d'or et du gadolinium

Le dosage par ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry : spectrométrie d'émission atomique après excitation au moyen d'un plasma) est une méthode d'analyse destructive qui permet de quantifier exactement et sélectivement la concentration en ions dans différentes solutions. Les études ont été réalisées à l'aide d'un ICP-OES (710 ES Varian/Agilent) avec une torche axiale, un nébuliseur concentrique et une chambre de nébulisation cyclonique. Les paramètres suivants ont été utilisés lors des mesures : une puissance de 1,2 kW, un débit de 15 L/min d'argon plasmagène et de 1,5 L/min d'argon auxiliaire, et une pression de nébulisation de 200 kPa. Les lignes d'émission utilisées pour quantifier la concentration d'or sont 267,594 nm, 242,794 nm et 208,207 nm, tandis que celle du gadolinium est

342,2446 nm. Pour améliorer la fiabilité des données, de nombreuses longueurs d'onde sont utilisées dans les mesures. Les éléments totaux peuvent être analysés par la méthode ICP-OES (sans faire intervenir les isotopes comme dans le cas de l'ICP-MS). L'étalon a été réalisé dans les mêmes conditions d'atomisation que les échantillons. Par conséquent, la faible efficacité d'atomisation signalée pour l'or n'aura aucun effet sur les résultats. Pour les mesures, un tampon d'ionisation est utilisé pour éliminer la majorité des interactions potentielles. La limite inférieure de cette technique pour détecter l'or dans un échantillon est de 20 µg d'or/L. Sylvaine Linget du laboratoire Qualio de l'Université de Franche-Comté (Besançon) a réalisé ces études. Avant de réaliser ces études, les suspensions colloïdales de nanoparticules Au@X (10 g/L d'or) sont minéralisées avec de l'eau régale (1/3 HNO₃ (68%) et 2/3 HCl (37%)).

3.3. Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET, TEM : Transmission electron microscopy) est une méthode puissante pour caractériser les matériaux. Elle permet de réaliser des analyses morphologiques, structurales et chimiques sur des matériaux solides à l'échelle atomique et nanométrique. Elle consiste à envoyer un faisceau d'électrons sur un échantillon.

Sur une grille de cuivre recouverte d'une feuille de carbone, une goutte (5 µL) d'un des échantillons de nanoparticules d'or préalablement dilués (0,20 g Au/L) a été placée. Les grilles ont ensuite été laissées à l'air libre pendant environ une nuit pour sécher. Les clichés sont réalisés à l'aide d'un microscope JEOL 2100F (200kV) au Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB) de Dijon par Dr Rémi Chassagnon.

3.4. Mesure du diamètre hydrodynamique et du potentiel Zêta

Les applications *in vivo* et *in vitro* nécessitent de connaître la charge de surface des nanoparticules d'or. Cette charge de surface des nanoparticules est importante pour l'internalisation cellulaire, la biodistribution et pour l'élimination de ces nanoparticules. Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules est déterminé par la taille du noyau d'or, l'épaisseur de la couche de ligand et l'épaisseur de la couche de solvation. Contrairement à la mesure de la taille effectuée à partir d'une image TEM, le diamètre hydrodynamique reflète la véritable dimension de la nanoparticule dans un milieu particulier. Pour ces différentes raisons, la mesure de potentiel Zêta ainsi que celle du diamètre hydrodynamique est nécessaire. Les méthodes de diffusion de la lumière telles que la diffusion dynamique de la lumière (DLS) peuvent être utilisées pour déterminer le diamètre hydrodynamique. Les mesures de potentiel Zêta sont réalisées avec le Nanosizer ZS de Malvern Instruments (équipé d'un laser He-Ne avec une longueur d'onde de 633 nm).

Pour ces mesures, les nanoparticules d'or sont diluées afin d'obtenir une concentration de 0,1 g/L et 1 M de chlorure de sodium NaCl et le pH des échantillons est ajusté à différents pH (1, 3, 5, 7, 9, 11) par ajout de solutions aqueuses d'hydroxyde de sodium (NaOH, 1M) ou d'acide chlorhydrique (HCl_(aq), 1M).

3.5. Lyophilisation

La lyophilisation consiste à extraire l'eau qui est sous forme de glace d'un échantillon par sublimation à basse pression. Pour cela l'échantillon à lyophiliser est congelé dans un congélateur à -18°C pendant 72 heures.

La transformation de la suspension colloïdale de nanoparticules d'or à différentes longueurs de PEG et différents chélateurs sous forme de poudre a été réalisée grâce à un lyophilisateur Christ Alpha 2-4 LSCbasic à -80°C et 0,00041 mbar.

3.6. ATG

Les analyses thermogravimétriques ont été réalisées sur un appareil Discovery de TA Instruments au sein du laboratoire ICB à l'Université de Bourgogne à Dijon par Dr Frédéric BOUYER. Les analyses ont été réalisées sous flux d'air reconstitué (80% N_2 et 20% O_2) avec un débit de 20 mL/min. L'évolution de la température au cours du traitement thermique est représentée dans la Figure 3-1.

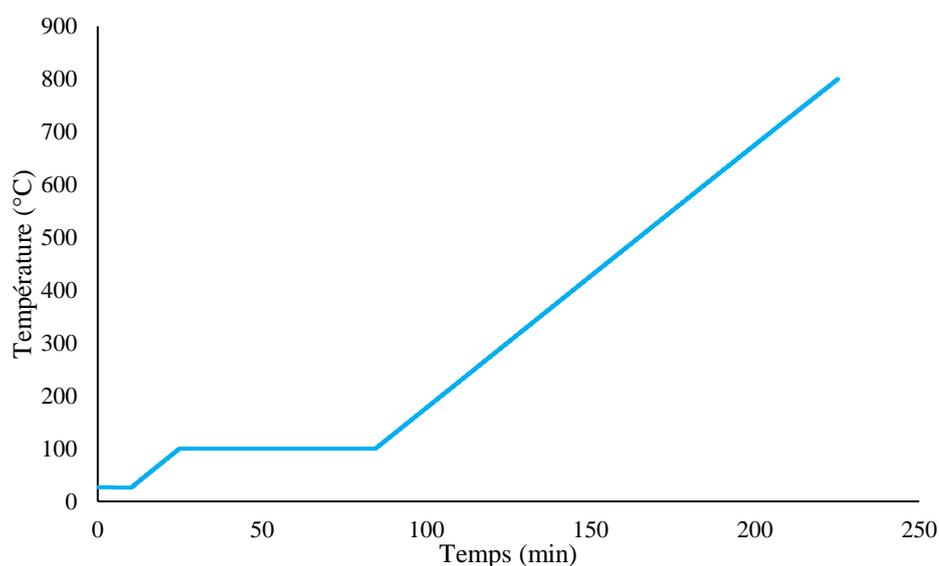


Figure 3-1 : Evolution de la température au cours du traitement thermique

4. Caractéristiques des nanoparticules $\text{Au@TAPE}_n\text{DOTA}$ et $\text{Au@TAPEG}_n\text{DOTAGA}$

Différents types de nanoparticules sont étudiées dans l'équipe NCM de l'institut UTINAM depuis plusieurs années. Pour chaque type de nanoparticules, une série de caractérisation a été réalisée pour confirmer une bonne répétabilité du protocole et s'assurer qu'elles possèdent le même type de caractéristiques.

Comme les propriétés optiques des nanoparticules d'or sont modulables dans le domaine visible en jouant sur leur taille, sur leur forme et sur leur environnement, tout changement concernant les caractéristiques

des nanoparticules d'or se traduiront par une modification de la bande plasmon qui pourra être observée par spectrophotométrie UV-visible. A partir des données extraites d'un spectre UV, il est possible de calculer, par des modèles complexes, le diamètre des nanoparticules.[114] D'une manière plus directe, le spectre UV-visible donne des indications sur la taille et la forme des objets à partir de la position, de l'allure et la largeur de la bande plasmonique.[115] L'évolution de cette bande plasmonique permet d'évaluer la stabilité colloïdale dans le temps et/ou en fonction de fluctuation de pH. Pour cela une étude de la stabilité colloïdale des nanoparticules en fonction de temps a d'abord été réalisée. Douze spectres UV-visible correspondant aux trois membres des deux familles de nanoparticules Au@TAPEG_nDOTA et Au@TAPEG_nDOTAGA (avec n = 0, 4, 11) ont été enregistrés à deux moments différents, après synthèse (t₀) et trois mois après synthèse (t₀ + 3 mois) (Figure 4-1 et Figure 4-2). Au pH choisi, la suspension colloïdale est diluée à une concentration de 0,1 g/L.

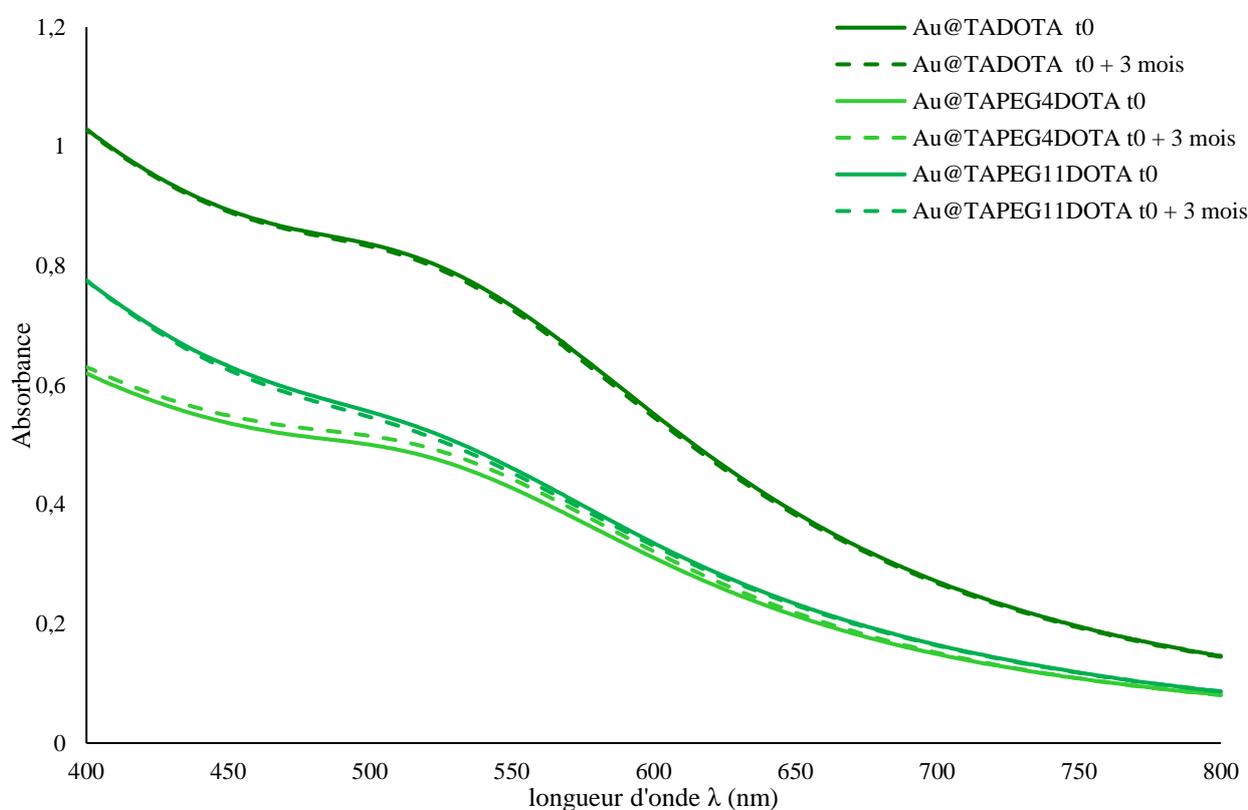


Figure 4-1 : Spectres UV-visible entre 400 et 800 nm des suspensions de nanoparticules d'or de la série Au@TAPEG_nDOTA à deux temps différents juste après synthèse t₀ et t₀ + 3 mois (3 mois après synthèse)

La comparaison entre les spectres des différentes nanoparticules d'une même famille pour un temps donné révèle des similitudes et des différences dans l'allure des spectres. Quel que soit le type de nanoparticules, les spectres présentent une bande plasmon vers 520 nm très tassée. Cette allure de la bande plasmon est caractéristique de nanoparticules d'or dont le cœur d'or possède un diamètre inférieur à 5 nm. Cette suggestion semble être en accord avec la couleur observée pour les différentes suspensions. La couleur brun noir pour toutes les suspensions de la série Au@TAPEG_nDOTA et Au@TAPEG_nDOTAGA est effectivement le signe que les nanoparticules d'or de ces deux familles ont un diamètre inférieur à 5 nm.

Cependant la position et le tassement de la bande sont différents entre toutes les nanoparticules sans que nous soyons en mesure de tirer une conclusion claire au sujet de ces différences.

La comparaison des spectres pour un même type de nanoparticules mais à deux temps différents (t_0 et t_0+3 mois) montre que quelle que soit les nanoparticules les spectres sont superposés. Cela signifie que les nanoparticules d'or et leur environnement n'ont pas changé durant les trois mois de stockage. En d'autres termes, nous pouvons sur la base de ces spectres affirmer que la stabilité colloïdale des suspensions aqueuses de ces différentes nanoparticules est très élevée.

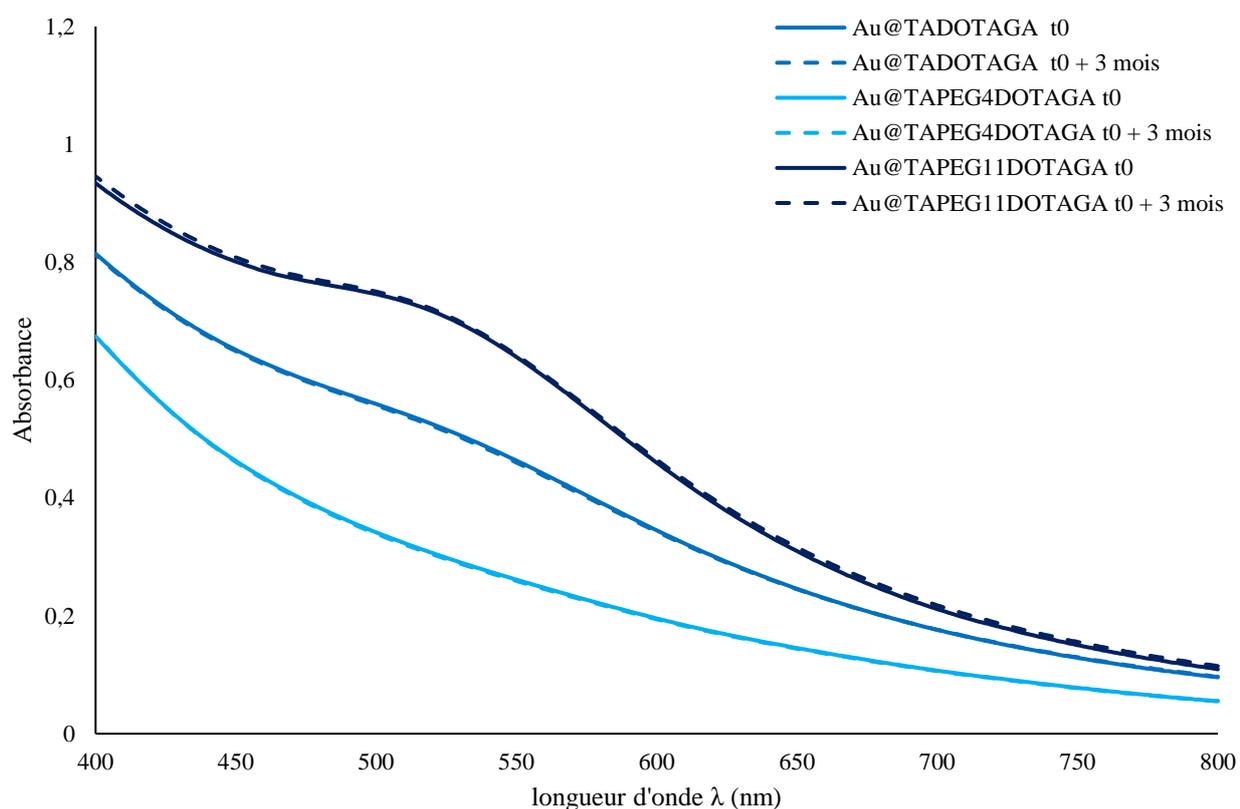


Figure 4-2 : Spectres UV-visible entre 400 et 800 nm des nanoparticules d'or de la série $Au@TAPEG_nDOTAGA$ à deux temps différents juste après synthèse t_0 et $t_0 + 3$ mois (3 mois après synthèse)

Le diamètre du cœur d'or des nanoparticules d'or peut être déterminé avec précision grâce à l'analyse des clichés obtenus par TEM (microscopie électronique à transmission). D'après les images TEM (Figure 4-3), toutes les nanoparticules d'or possèdent un diamètre inférieur à 5 nm. Néanmoins, nous pouvons constater que les nanoparticules $Au@TAPEG_4DOTA$, $Au@TAPEG_{11}DOTA$ et $Au@TAPEG_{11}DOTAGA$, présentent une hétérogénéité. Les estimations des diamètres moyens des nanoparticules sont inférieures à 2,5 nm avec un écart-type de 0,3 nm ($2,5 \pm 0,3$ nm).

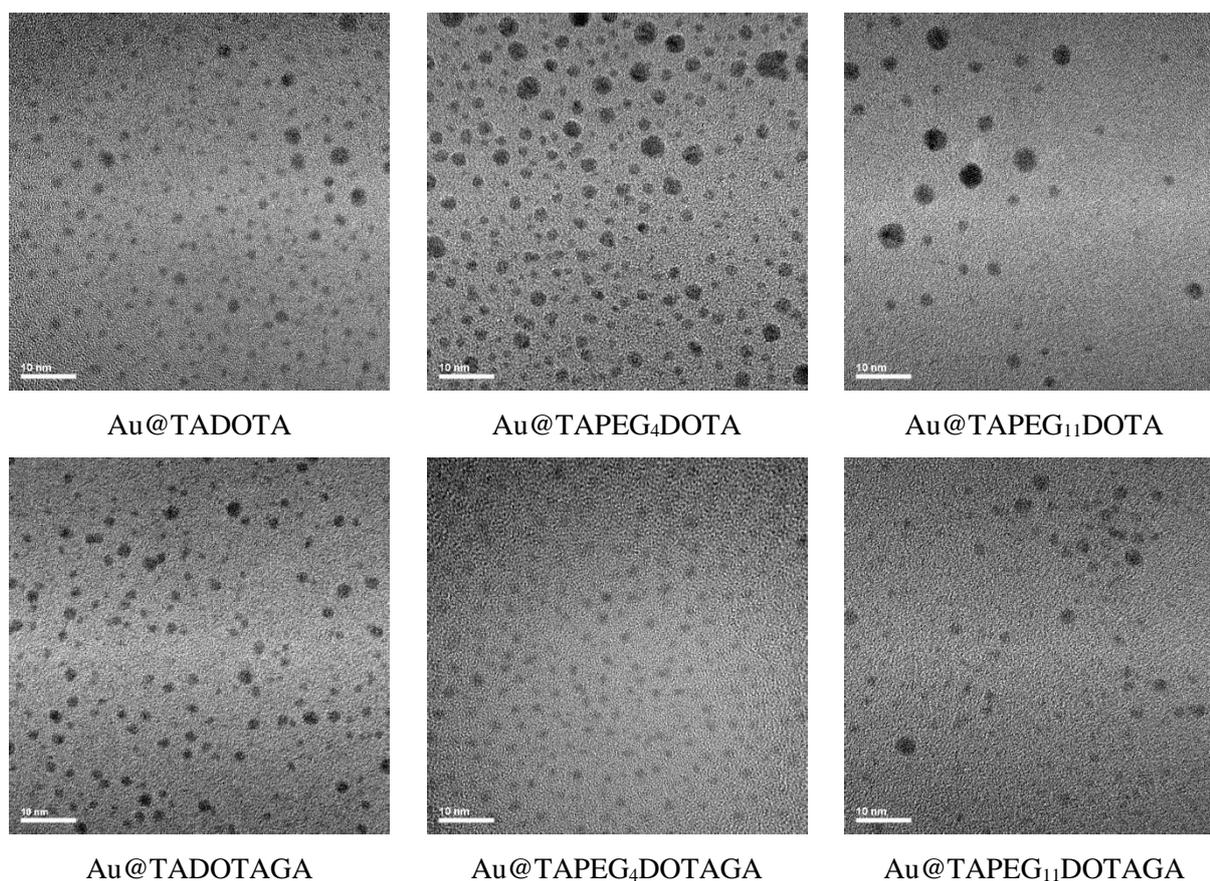


Figure 4-3 : Clichés TEM des différents types de nanoparticules Au@X

La DLS a été utilisée pour compléter les données TEM en mesurant le diamètre hydrodynamique des différentes suspensions colloïdales. La connaissance du diamètre hydrodynamique des nanoparticules est essentielle pour anticiper le mode d'élimination de ces nanoparticules après injection intraveineuse.

Nanoparticules	Au@TADOTA	Au@TAPEG ₄ DOTA	Au@TAPEG ₁₁ DOTA
Diamètre hydrodynamique (nm)	$7,6 \pm 1,5$	$5,0 \pm 2,4$	$8,1 \pm 2,5$
Nanoparticules	Au@TADOTAGA	Au@TAPEG ₄ DOTAGA	Au@TAPEG ₁₁ DOTAGA
Diamètre hydrodynamique (nm)	$6,4 \pm 2,3$	$6,4 \pm 1,9$	$8,3 \pm 1,7$

Tableau 4-1 : Diamètre hydrodynamique des différents types de nanoparticules d'or mesuré par DLS

Les diamètres hydrodynamiques de toutes les nanoparticules d'or des différentes familles sont inférieurs à 10 nm, ce qui signifie qu'elles peuvent être filtrées par les reins et être éliminées par l'urine. La PEGylation des nanoparticules d'or présente une légère modification du diamètre hydrodynamique mais qui n'est pas proportionnelle à la longueur de la chaîne choisie. Donc la longueur de chaîne de PEG n'exerce pas une influence directe sur le diamètre hydrodynamique contrairement à sa conformation étirée (en brosse) ou repliée (champignon) qui influence le diamètre hydrodynamique. Par exemple, une chaîne de PEG longue est mieux adaptée à se replier par rapport à une chaîne de PEG courte.

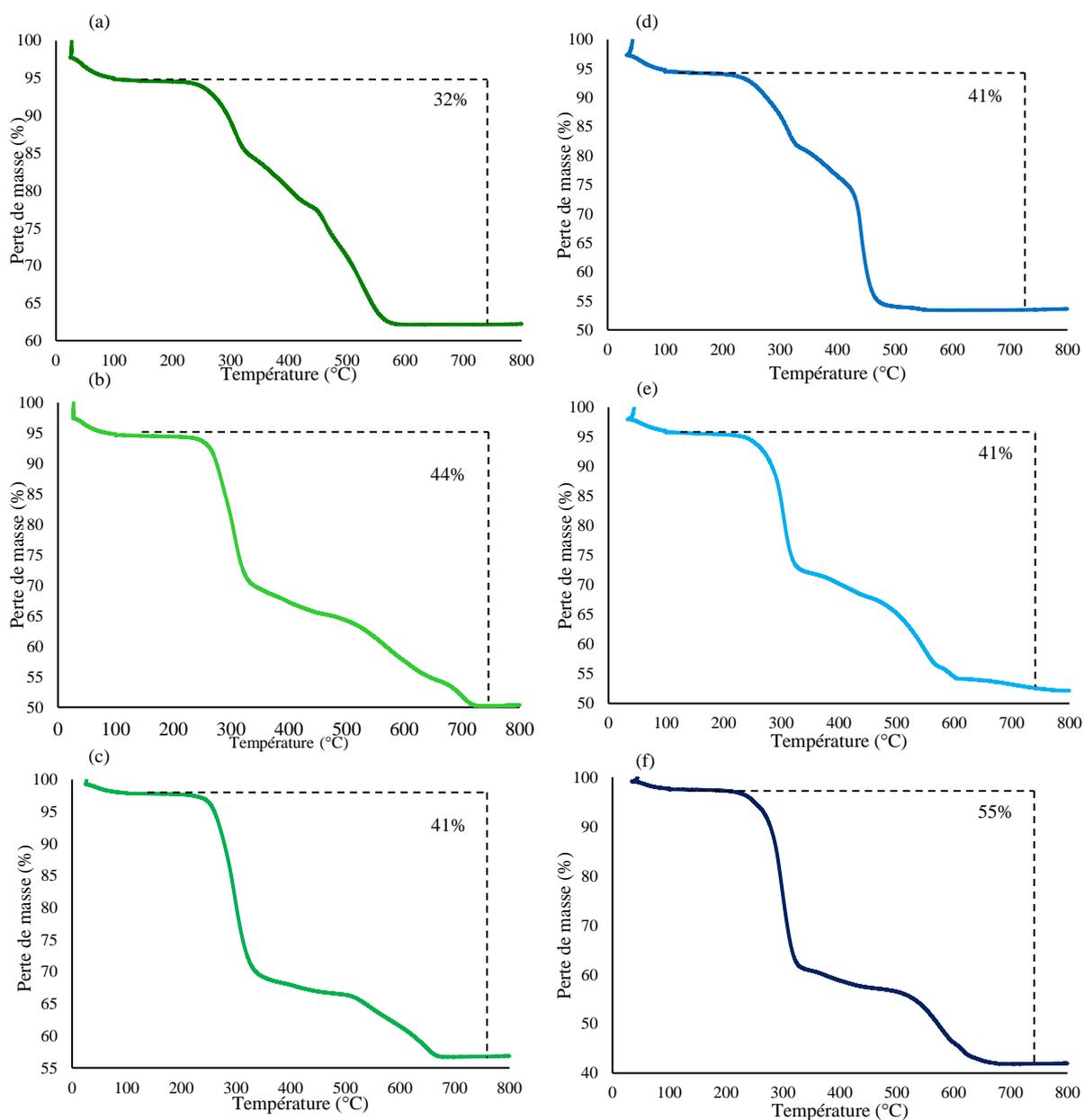


Figure 4-4 : Courbes d'analyse thermogravimétrique de poudres de nanoparticules d'or (a) Au@TADOTA, (b) Au@TAPEG₄DOTA, (c) Au@TAPEG₁₁DOTA, (d) Au@TADOTAGA, (e) Au@TAPEG₄DOTAGA et (f) Au@TAPEG₁₁DOTAGA

Pour mieux analyser la différence apportée par les différents chélateurs utilisés, une analyse thermogravimétrique a été réalisée (Figure 4-4). Pour les nanoparticules d'or qui ne comporte pas de PEG dans leur phase organique, le comportement est similaire. Pour les autres qui comportent du PEG dans leur phase organique, la perte de masse se fait en deux étapes. Cette différence est due à la présence de PEG dans le chélateur. La composition des deux phases des nanoparticules d'or est montrée dans le Tableau 4-2.

	Phase organique (%)	Or (%)	Nombre de chélateur par nanoparticule
Au@TADOTA	32	68	65
Au@TAPEG ₄ DOTA	44	56	81
Au@TAPEG ₁₁ DOTA	41	59	51
Au@TADOTAGA	41	59	85
Au@TAPEG ₄ DOTAGA	41	59	71
Au@TAPEG ₁₁ DOTAGA	55	45	87

Tableau 4-2 : Composition de différents types de nanoparticules d'or

Les données de l'ATG et la taille des nanoparticules obtenues par TEM permet de calculer le nombre de chélateurs présent à la surface d'une seule nanoparticule d'or. Pour la série d'Au@TAPEG_nDOTA, la différence du nombre de chélateurs est très grande alors que pour la série d'Au@TAPEG_nDOTAGA la différence est moins large. Cette différence peut expliquer les résultats obtenue par DLS. De plus, l'hétérogénéité de taille de la série Au@TAPEG_nDOTA aperçue en TEM peut résulter de cette différence.

Les spectres UV-visible enregistrés pour un même type de nanoparticules d'or Au@X à deux temps différents espacés de trois mois ont montré que les suspensions aqueuses préparées à partir de ces nanoparticules (pH 8) présentaient une excellente stabilité colloïdale dans le temps (Figure 4-1 et Figure 4-2). Ces suspensions de nanoparticules d'or sont également très stables sur une large gamme de pH, incluant le pH physiologique (Figure 4-5). Quel que soit le pH compris entre 1 et 11, les spectres UV-Visible de toutes les suspensions de nanoparticules d'or Au@X mettent en lumière l'absence de modification des nanoparticules et de leur environnement car ils sont superposés (Figure 4-5).

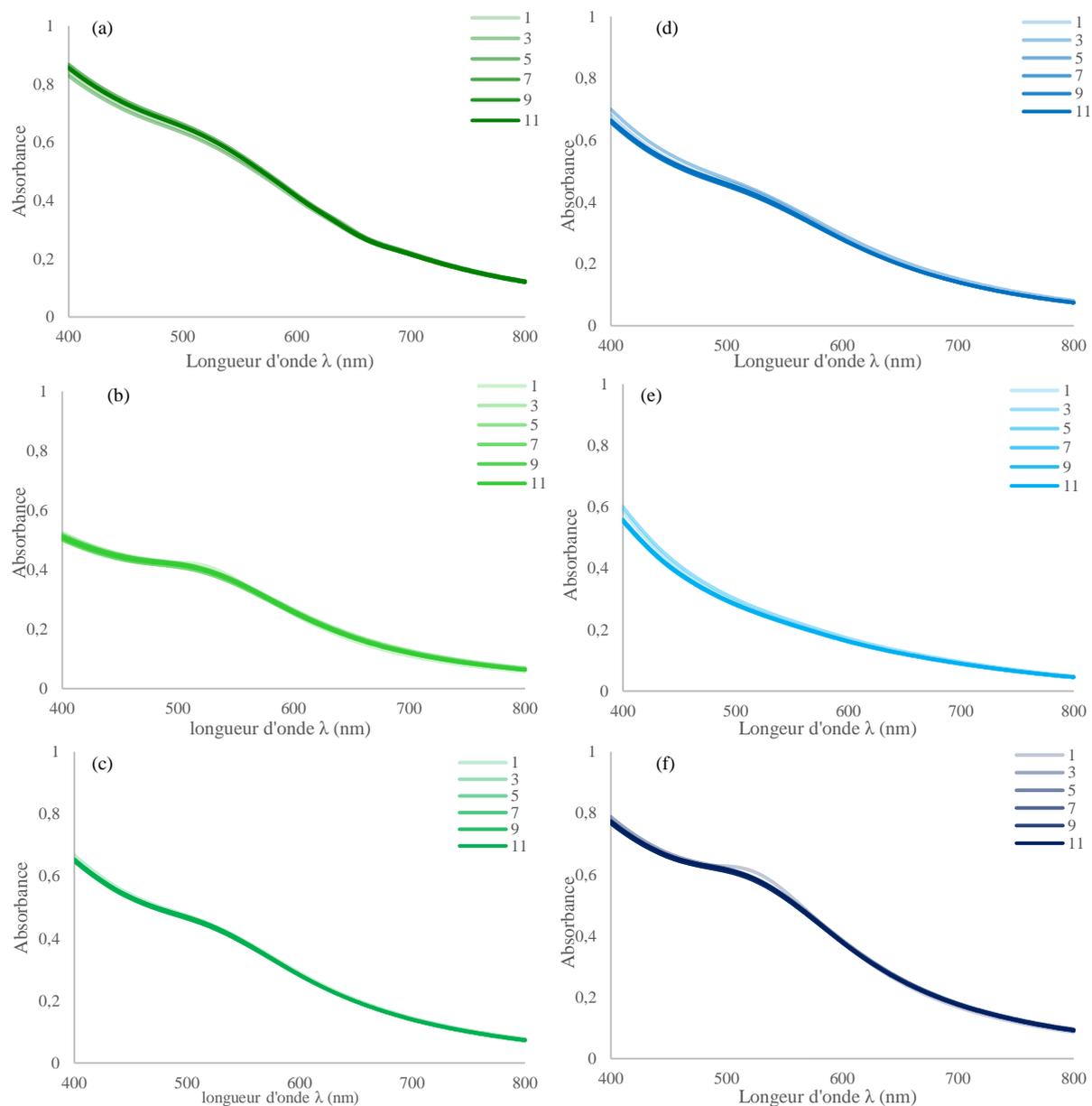


Figure 4-5 : Spectres UV-Visible des suspensions de nanoparticules d'or (a) Au@TADOTA, (b) Au@TAPEG₄DOTA, (c) Au@TAPEG₁₁DOTA, (d) Au@TADOTAGA, (e) Au@TAPEG₄DOTAGA et (f) Au@TAPEG₁₁DOTAGA enregistrés à différents pH (entre 1 et 11)

L'encombrement stérique des ligands présents à la surface des cœurs d'or, ainsi que la répulsion électrostatique entre nanoparticules de même charge, peuvent expliquer la stabilité colloïdale d'une suspension de nanoparticules. Comme les chélateurs TAPEG_nDOTA et TAPEG_nDOTAGA possèdent des groupements acido-basiques, ils peuvent porter des charges dont le signe dépendra du pH. Afin d'estimer l'évolution de la charge de surface en fonction du pH, des mesures du potentiel zêta ont été réalisées.

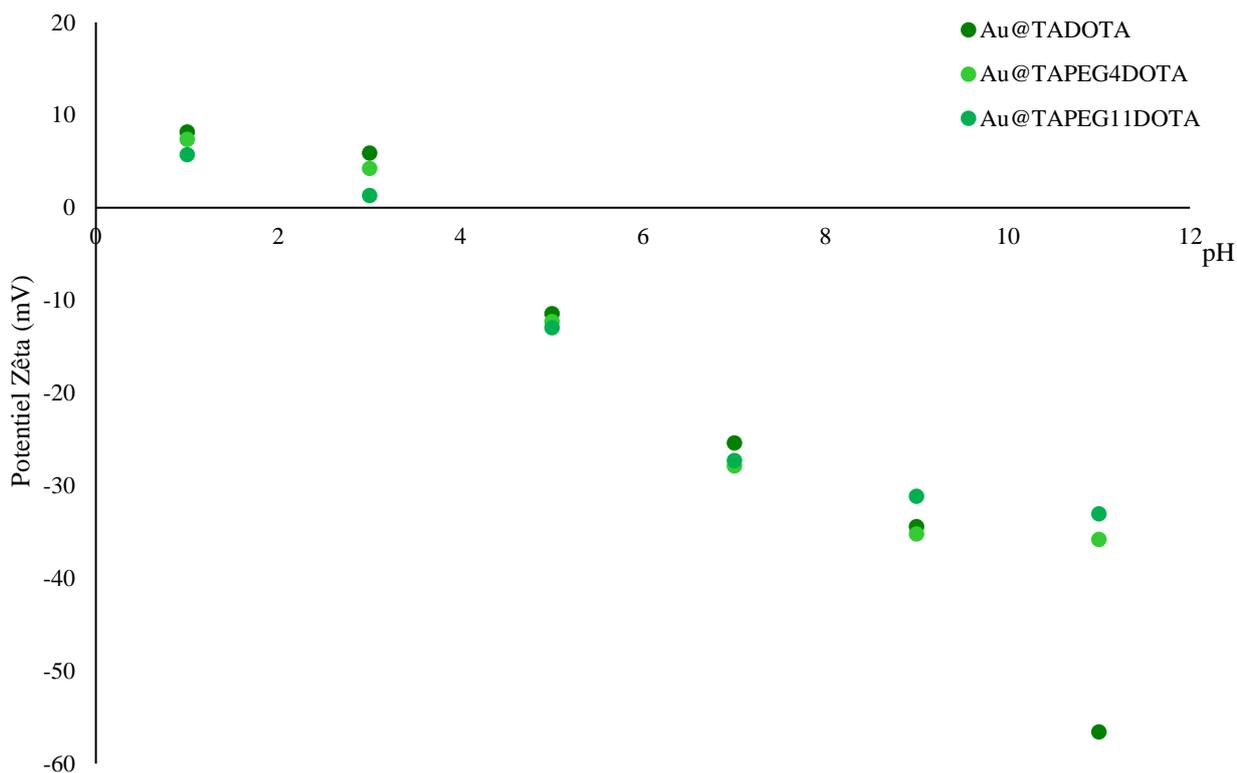


Figure 4-6 : Evolution du potentiel Zêta en fonction du pH des suspensions colloïdales de la série des nanoparticules $Au@TAPEG_nDOTA$

Les courbes de potentiel Zêta (ξ) montrent clairement que celui-ci est positif pour des pH inférieurs à 3 et négatif pour des pH supérieurs à 4 (Figure 4-6 et Figure 4-7). Le signe du potentiel ξ s'explique par la nature chimique du macrocycle DOTA ou DOTAGA présent dans les chélateurs $TAPEG_nDOTA$ et $TAPEG_nDOTAGA$. Ces chélateurs possèdent quatre fonctions amine tertiaire et trois (DOTA) ou quatre (DOTAGA) fonctions carboxylate. Ces fonctions sont sensibles à la variation de pH. Ainsi lorsque l'on se trouve à bas pH, les groupements amine et carboxylate sont respectivement protonés en cation ammonium (positif) et en acide carboxylique (neutre). Pour des pH plus élevés, ces fonctions perdent leurs protons et deviennent neutres (fonctions amine) ou négatives (groupements carboxylate). Il en résulte que les nanoparticules d'or $Au@TAPEG_nDOTA$ et $Au@TAPEG_nDOTAGA$ portent une charge positive à bas pH ($< 3-4$) alors qu'à pH plus élevé (>4) ces nanoparticules présentent une charge globale négative.

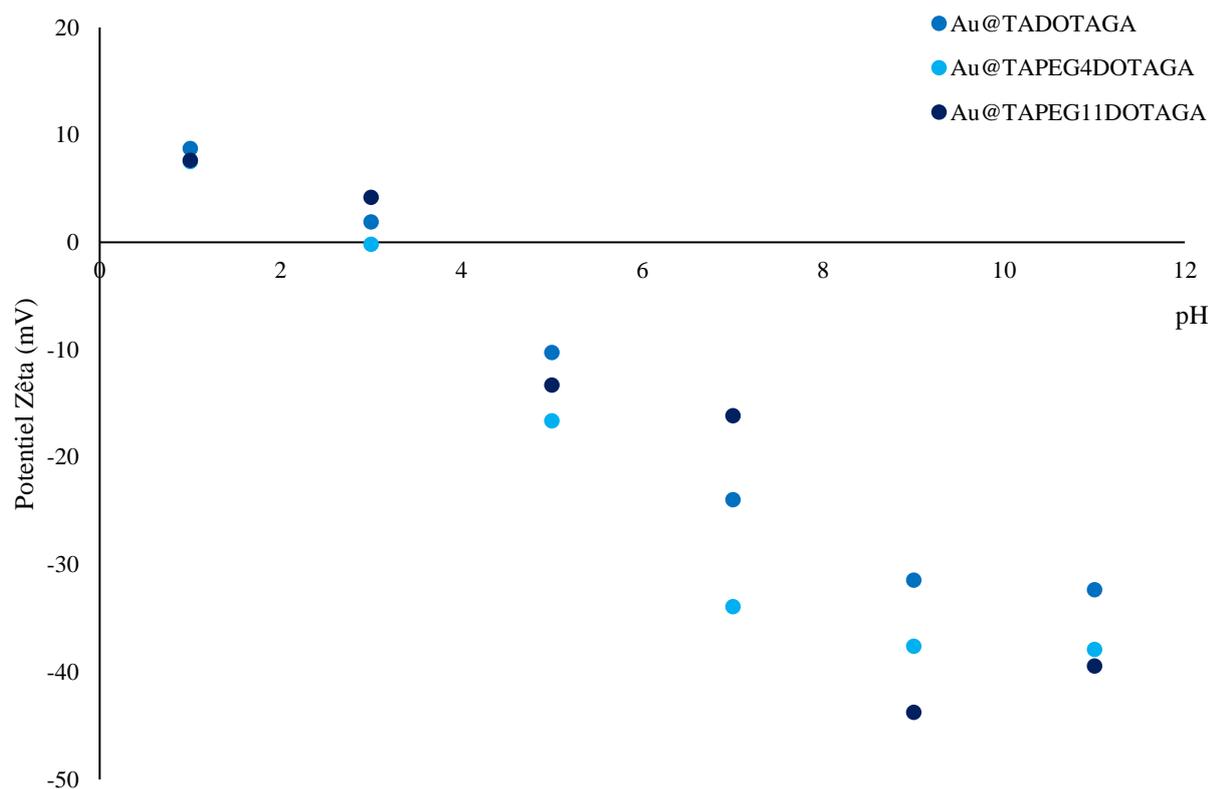


Figure 4-7 : Evolution du potentiel Zêta en fonction de pH des suspensions colloïdales de la série des nanoparticules Au@TAPEG_nDOTAGA

D'après les mesures du potentiel ξ en fonction du pH, les suspensions colloïdales de nanoparticules d'or auront un potentiel ξ négatif en milieu biologique (pH=7,4). La stabilité colloïdale sera ainsi garantie par répulsion électrostatique entre les nanoparticules d'or chargées négativement. En outre, la charge négative présente un avantage déterminant par rapport à la charges positive car elle devrait limiter le phénomène d'opsonisation qui peut être résumé par la formation d'une couronne de protéines (opsonines) autour des particules conduisant à une capture fulgurante et massive par les organes riches en cellules phagocytiques (SPM). Comme l'opsonisation entrave l'accumulation préférentielle dans les tumeurs (du fait de la capture massive des nanoparticules qui s'accumulent dans le foie, la rate, la moëlle épinière...), la réduction de ce phénomène est alors avantageuse pour les applications *in vivo*.

La petite taille des nanoparticules qui favorise leur élimination par voie rénale, la stabilité colloïdale des nanoparticules à pH physiologique (7,4) assurée par la répulsion électrostatique des nanoparticules de même taille, le pouvoir radiosensibilisant de l'or qui compose les nanoparticules et la capacité des ligands de surface à complexer le gadolinium et l'indium pour l'IRM et la SPECT respectivement constituent un ensemble de caractéristiques physico-chimiques prometteuses qui rendent l'utilisation des nanoparticules envisageable dans le domaine médical. Comme les nanoparticules Au@TAPEG_nDOTA et Au@TAPEG_nDOTAGA se distinguent par leur longueur de chaînes de PEG, il sera alors possible d'étudier l'influence de la PEGylation sur leur comportement *in vivo*.

5. Biodistribution de la série Au@TAPEG_nDOTAGA dans des souris saines

L'équipe NCM a montré que les deux macrocycles TADOTA et TADOTAGA [109] peuvent former des complexes stables avec les ions gadolinium et des radionucléides d'intérêt pour l'imagerie nucléaire (Indium-111). En outre, la pureté radiochimique et le rendement de la complexation des radio-isotopes sont élevés. D'autre part, la relaxivité des deux suspensions de nanoparticules est nettement supérieure à celle du Dotarem[®], qui est fréquemment utilisé en clinique comme agent de contraste pour l'IRM. Les trois nanoparticules de la série Au@TAPEG_nDOTAGA ont été choisies pour une étude comparative de biodistribution car le macrocycle DOTAGA qui porte une fonction acide carboxylique supplémentaire par rapport au DOTA forme des complexes plus stables.

5.1. Protocoles expérimentaux

5.1.1. Animaux

Des souris femelles BALB/cByJ âgées de 8 semaines ont été utilisées dans cette étude. Les souris ont reçu une injection intraveineuse de 100 µL de suspension de nanoparticules radiomarquées [¹¹¹In]Au@TAPEG_nDOTAGA(In) (3 souris par type de nanoparticules).

5.1.2. SPECT/CT

Un système NanoSPECT/CT[®] (Bioscan) a été utilisé pour réaliser l'imagerie SPECT/CT 1 et 24 heures après l'administration des nanoparticules. L'activité injectée pour la suspension Au@TADOTAGA est de 10,20 MBq, 5,21 MBq pour Au@TAPEG₄DOTAGA, et 12,83 MBq pour Au@TAPEG₁₁DOTAGA. Par conséquent, les images ne permettent pas une comparaison directe de la biodistribution entre les différentes suspensions. L'acquisition des images a été réalisée pendant que les souris étaient sous sédation (isoflurane). L'acquisition CT (55kVp, 34 mAs) dure 10-12 minutes, suivie de l'acquisition SPECT (15-45 minutes).

Le logiciel InVivoScope a été utilisé pour créer une fusion des images SPECT et CT. La gamma-caméra a été calibrée avec précision pour la quantification. Les résultats sont donnés en pourcentage de la dose administrée.

5.1.3. Biodistribution *ex vivo*

Après 24 heures, les souris sont sacrifiées et les organes ont été récupérés pour des études *ex vivo* de la biodistribution des nanoparticules en mesurant la radioactivité par comptage γ et la quantité d'or présente dans les différents organes (les reins, les poumons, le cœur, la rate, les os, les muscles, le sang et la vessie) de souris 24 h après l'injection intraveineuse des nanoparticules d'or (Au@X). L'activité de plusieurs organes d'intérêt prélevés sur les animaux étudiés en imagerie a été mesurée à l'aide d'un compteur gamma Cobra 418 (Perkin Elmer) afin d'estimer indirectement la quantité de nanoparticules présentes dans les

organes. La quantité d'or dans chacun des organes sélectionnés a été déterminés par ICP-OES après dissolution dans l'eau régale des organes et des nanoparticules qu'ils contenaient.

5.1.4. Analyse ICP-EOS

Les différents organes collectés à partir des souris ayant reçu une injection intraveineuse de nanoparticules sont minéralisés avec de l'eau régale chaude dans des tubes de minéralisation calibrés (DigiTUBEs, SCP Sciences). Les tubes sont placés dans un bloc de minéralisation (Digiprep, SCP science) afin d'atteindre une température de 120°C jusqu'à dissolution complète des organes. Le niveau est ajusté au trait correspond à un volume de 50 mL en utilisant de l'acide nitrique à 5%. La solution est ensuite filtrée à l'aide d'une seringue et d'un filtre de 0,22 mm afin d'éliminer tout résidu éventuel.

L'échantillon est ensuite analysé à l'aide d'un ICP-OES du laboratoire Qualio à Besançon, modèle 710 ES (Varian/Agilent) équipé d'une torche axiale, d'un nébuliseur concentrique et d'une chambre de nébulisation cyclonique. Les paramètres suivants ont été utilisés : une puissance de 1,2 kW, un débit d'argon plasmagène de 15 L.min⁻¹, un débit d'argon auxiliaire de 1,5 L.min⁻¹, et une pression de nébulisation de 200 kPa. Les longueurs d'onde d'émission utilisées pour mesurer la concentration de l'élément or sont 267,594 nm, 242,794 nm et 208,207 nm.

5.2. Résultats et discussion

Après le radiomarquage à l'indium-111 des nanoparticules d'or Au@TAPEG_nDOTAGA, des images SPECT/CT ont été acquises 1 h et 24 h après l'injection intraveineuse à des souris saines afin de déterminer la biodistribution des différents types de nanoparticules d'or et d'étudier l'effet de la longueur de la chaîne PEG sur celle-ci. Les images de souris après injection intraveineuse des différentes suspensions de nanoparticules Au@TADOTAGA, Au@TAPEG₄DOTAGA et Au@TAPEG₁₁DOTAGA révèlent initialement une radioactivité plus importante dans la vessie, les reins et le foie (Figure 5-1).

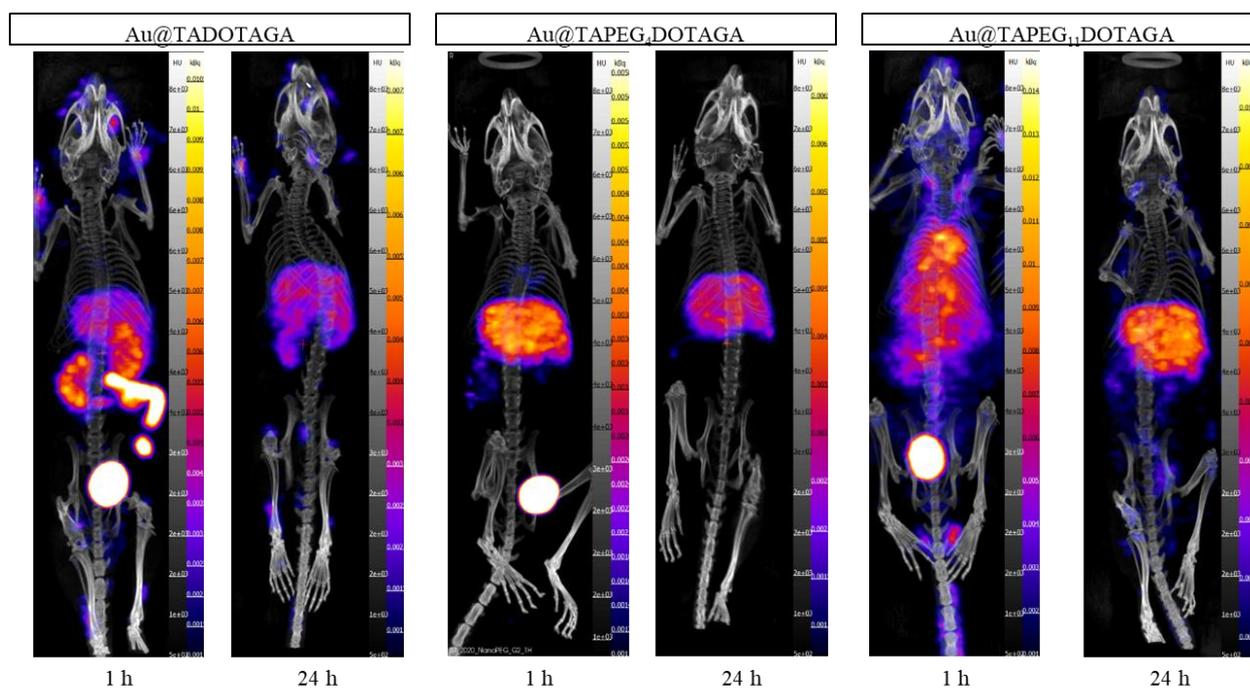


Figure 5-1 : Clichés SPECT/CT représentant l'évolution de la biodistribution des nanoparticules Au@TADOTAGA, Au@TAPEG₄DOTAGA et Au@TAPEG₁₁DOTAGA au cours du temps (1h et 24 h après injection intraveineuse)

Ces images nous permettent de suivre le radiotracer [¹¹¹In] In. Pour s'assurer que le traceur est encore associé aux nanoparticules d'or injectées, la comparaison entre le comptage γ et le dosage par ICP a été effectuée. Le comptage γ est une mesure qui permet d'estimer la radioactivité (*i.e.* la présence du radioélément dans les tissus biologiques analysés) alors que le dosage par ICP est mis en œuvre dans notre étude pour déterminer la quantité d'or contenue dans les tissus après injection intraveineuse.

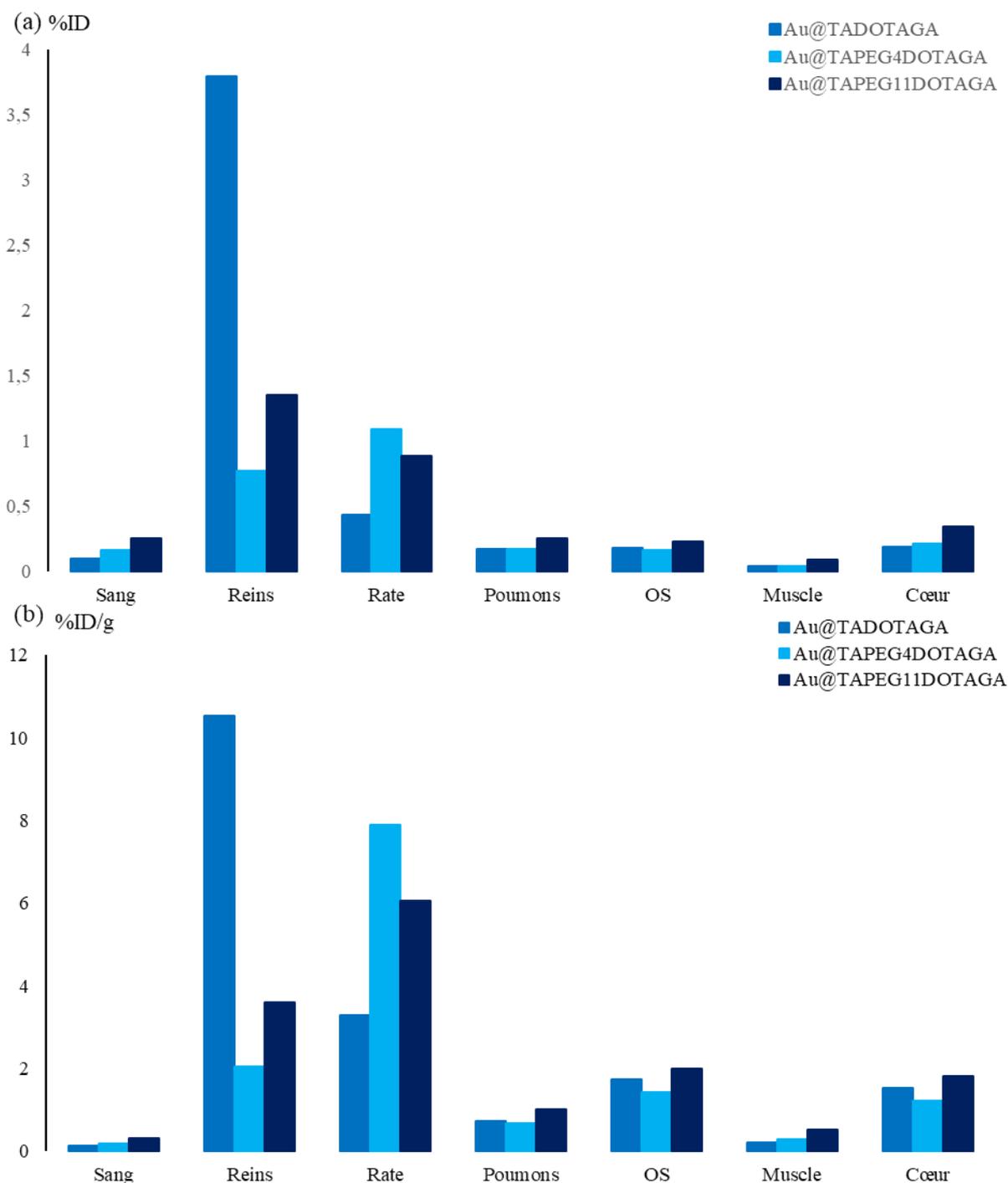


Figure 5-2 : (a) pourcentage moyen de radioactivité injectée (%ID) et (b) pourcentage moyen de radioactivité injectée par gramme de tissu (%ID/g) déterminés à partir des données acquises par comptage gamma des organes prélevés sur des souris sacrifiées 24 heures après injection intraveineuse des différents types de nanoparticules d'or.

La Figure 5-2 dresse le bilan des comptages γ *post-mortem* réalisés avec différents organes (sang, reins, rate, poumons, os, muscle et cœur) extraits 24 h après injection intraveineuse alors que la Figure 5-3 rend compte des analyses *post-mortem* ICP cherchant à déterminer la quantité d'or dans les mêmes organes.

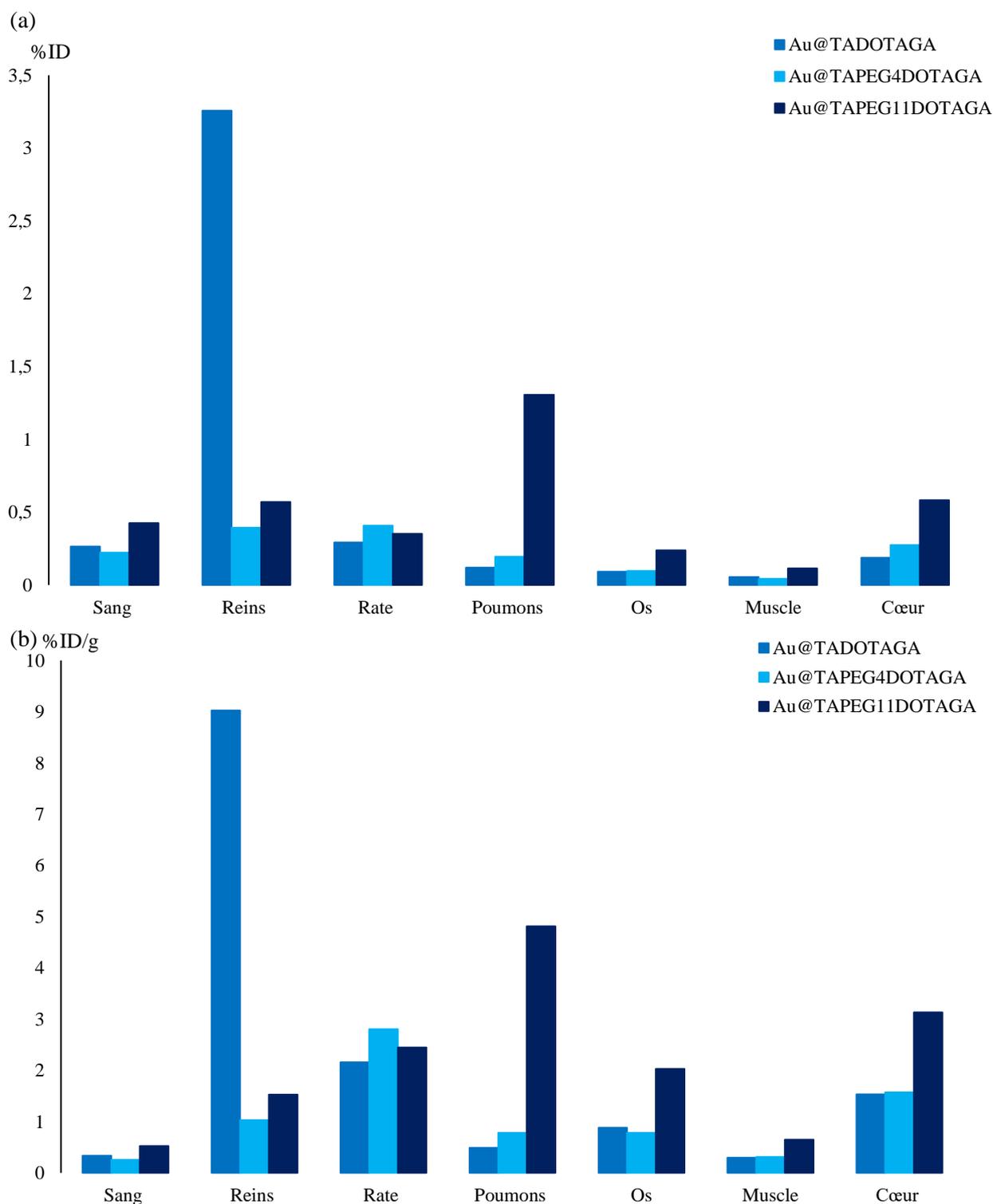


Figure 5-3 : (a) pourcentage moyen d'or injecté (%ID) et (b) pourcentage moyen d'or injecté par gramme de tissu (%ID/g) déterminés à partir des résultats d'analyse ICP-OES des organes prélevés sur des souris sacrifiées 24 heures après injection intraveineuse des différents types de nanoparticules d'or.

L'allure des histogrammes reportant pour différents organes le pourcentage de radioactivité injectée (Figure 5-2) (absolu (%ID) ou rapporté par gramme de tissu (%ID/g)) et le pourcentage de dose de nanoparticules d'or injectée (Figure 5-3), calculés à partir de deux méthodes d'analyse (comptage γ et analyse ICP), est

similaire. Cela montre donc une colocalisation entre le radioélément et les différents types de nanoparticules d'or. Ce qui permet d'associer la détection de la radioactivité à la présence des nanoparticules d'or.

Selon la Figure 5-1, après une heure d'injection, la vessie des souris est radioactive, quel que soit le type de nanoparticules radiomarquées. Cette observation confirme qu'une partie des nanoparticules sont éliminés par voie rénale. Dans le cas des nanoparticules d'or Au@TADOTAGA et Au@TAPEG₄DOTAGA (pas de chaîne de PEG et chaîne PEG la plus courte, respectivement), une accumulation des nanoparticules est également visible dans le foie 1 heure et 24 heures après injection intraveineuse alors que pour les nanoparticules d'or avec la chaîne PEG la plus longue (Au@TAPEG₁₁DOTAGA) la radioactivité est plus distribuée dans l'organisme (foie, cœur...) une heure après injection intraveineuse. Mais 24 heures après l'injection des nanoparticules Au@TAPEG₁₁DOTAGA, la radioactivité est concentrée principalement dans le foie.

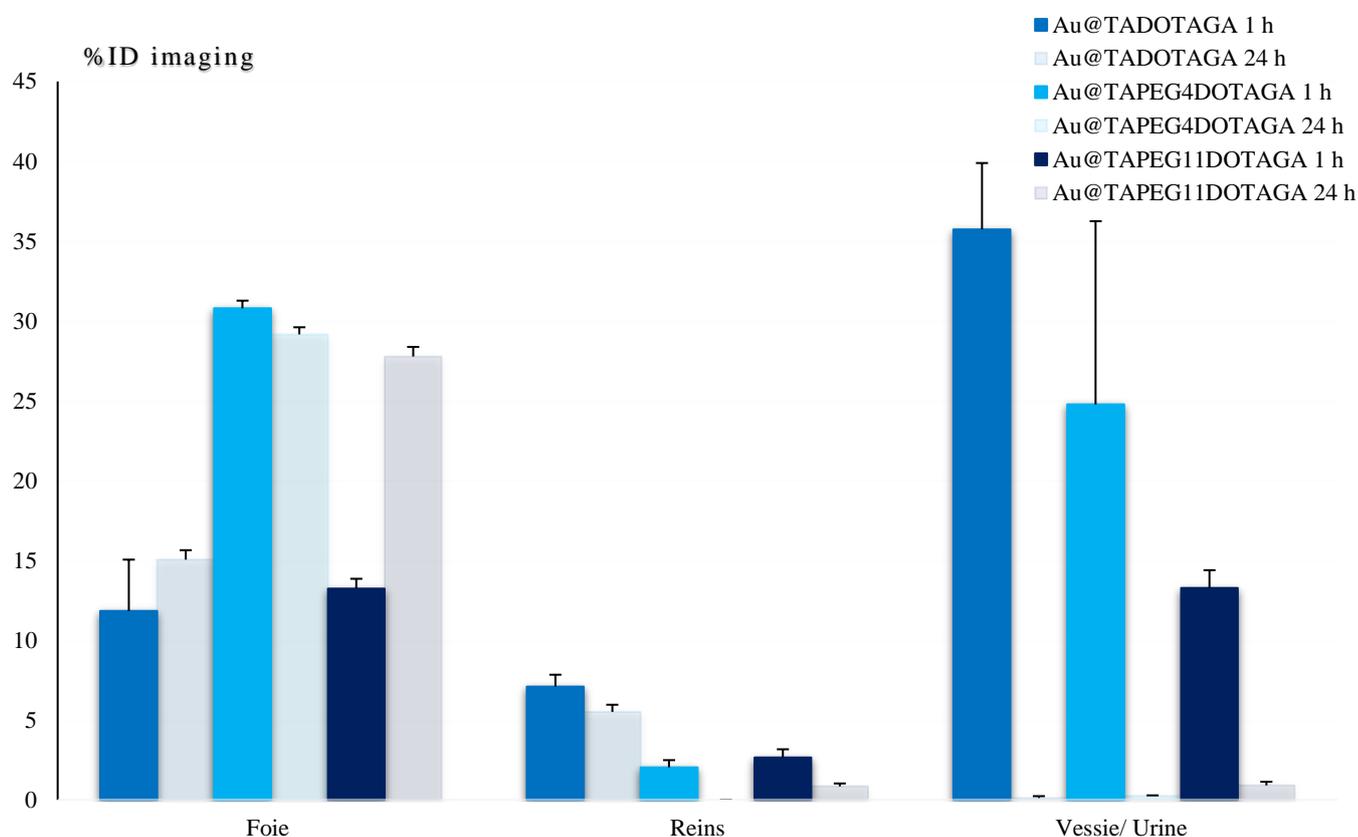


Figure 5-4 : Pourcentage moyen de dose de nanoparticules d'or injectée (%ID) calculé à partir des images acquises 1 heure et 24 heures après injection intraveineuse des différents types de nanoparticules à des souris saines

L'allure de l'histogramme de la Figure 5-4 qui montre le pourcentage de dose injectée calculé à partir des images acquises 24 h après l'injection intraveineuse des différentes nanoparticules est similaire de celle de l'histogramme construit à partir du comptage γ effectué 24 heures après injection (Figure 5-2a). Comme les Figure 5-2 et Figure 5-3 mettent en évidence la colocalisation des nanoparticules d'or et du radioélément et comme les Figure 5-2 et Figure 5-4 montrent que la dose déduite des comptages γ est similaire à celle

déduite des images 24 h après injection intraveineuse des différentes nanoparticules d'or, nous pouvons en conclure qu'il est possible de suivre directement sur les images acquises par SPECT-CT la biodistribution des nanoparticules d'or. L'intérêt de pouvoir suivre les nanoparticules par imagerie (%ID imaging) est d'avoir leur distribution une heure et 24 heures après injection intraveineuse ce qui n'était pas possible avec le comptage γ (pas pour des raisons scientifiques mais pour des raisons d'économie).

D'après la Figure 5-4, la quantité dans le foie des nanoparticules Au@TADOTAGA et Au@TAPEG₁₁DOTAGA, une heure après injection intraveineuse, est la même (à environ 10-15% près) alors que celle-ci est deux fois plus élevée pour les nanoparticules Au@TAPEG₄DOTAGA. Le pourcentage dans le foie pour les nanoparticules Au@TADOTAGA et Au@TAPEG₄DOTAGA reste constant 24 heures après injection intraveineuse alors que celui de Au@TAPEG₁₁DOTAGA augmente pour atteindre à peu près la même valeur que celle observée pour les nanoparticules Au@TAPEG₄DOTAGA.

Une heure après l'injection intraveineuse, les différentes nanoparticules d'or sont présentes dans les reins. Cependant la quantité dans cet organe est plus faible avec les nanoparticules fonctionnalisées par les chélateurs PEGylés. Cette tendance est préservée 24 heures après injection intraveineuse mais avec des valeurs plus faibles qui tendent vers zéro. La même tendance est observée pour la vessie une heure après injection intraveineuse (nous ne prendrons pas en compte les valeurs à 24h car la présence d'urine dans la vessie n'est pas garantie contrairement à ce qui est observé pour les animaux qui demeurent sous anesthésie depuis l'injection intraveineuse (cas du point d'observation à 1h)). La diminution de la quantité d'or dans les reins au cours du temps et la présence des nanoparticules d'or dans la vessie est révélateur de l'élimination rénale d'une partie d'entre elles. Cependant il est difficile de quantifier précisément la quantité éliminée car il faudrait prendre en compte les nanoparticules d'or contenues dans l'urine excrétée. Une telle mesure nécessite l'utilisation de cages métaboliques que ne possédait pas la plateforme d'imagerie du CGFL au moment de l'expérience.

L'élimination rénale n'est pas la seule voie d'élimination car quelle que soit la composition chimique de la couche organique adsorbée à la surface des nanoparticules d'or les images des Figures 5-1 et 5-4 révèlent la présence des nanoparticules d'or dans le foie (entre 15 et 30% selon le type de nanoparticules et le temps d'observation). Deux principales raisons permettent de justifier l'accumulation des nanoparticules dans le foie : l'opsonisation et l'élimination par la voie hépatobiliaire. L'opsonisation est une réponse de l'organisme vis-à-vis des corps étrangers qui conduit à une capture fulgurante et massive des espèces à retirer de la circulation sanguine par les organes riches en macrophages (foie, rate, moëlle épinière..., voir page 69 paragraphe 4.3.3). L'élimination hépatobiliaire repose sur les hépatocytes dont un des rôles consiste à collecter et à dégrader la matière en vue de l'éliminer par la voie fécale. Le profil de distribution des trois types de nanoparticules d'or au cours du temps ne correspond pas à celui de l'opsonisation car l'accumulation des nanoparticules dans le foie est relativement faible (au regard des données disponibles dans la littérature) et lente. En outre, la quantité accumulée dans la rate est trop faible pour attribuer l'accumulation dans le foie et la rate à un phénomène d'opsonisation.

Pour les nanoparticules non PEGylées, le %ID dans le foie, environ 15%, est relativement faible par rapport à celui des nanoparticules d'or PEGylées, environ 30%. Ce résultat peut paraître déroutant car la PEGylation est généralement mise en œuvre pour limiter l'accumulation dans le foie, en particulier en limitant le phénomène d'opsonisation. Or comme le montrent cette étude et les travaux antérieurs réalisés par l'équipe, les nanoparticules Au@TADOTAGA, particules de référence non PEGylées de l'étude, possèdent déjà, malgré l'absence de PEG, un comportement sain après injection intraveineuse (pas de phénomène d'opsonisation, faible accumulation dans les tissus sains, élimination essentiellement par voie rénale). L'incorporation d'une chaîne PEG n'est alors pas nécessaire pour limiter le phénomène d'opsonisation car les nanoparticules Au@TADOTAGA sont suffisamment petites, hydrophiles et chargées négativement pour échapper à l'opsonisation. Leur accumulation dans le foie est donc seulement le signe que ces nanoparticules sont également éliminées par la voie hépatobiliaire. Pourtant, l'incorporation d'une chaîne PEG dans la structure du chélateur TADOTAGA nous a paru justifiée car, si le contournement de l'opsonisation n'était pas nécessaire dans le cas des nanoparticules de référence, l'allongement du temps de circulation et de rétention tumorale constitue un objectif capital pour espérer mieux exploiter le potentiel radiosensibilisant des nanoparticules d'or ultrapetites (diamètre de cœur inférieur à 3 nm). En raison de valeurs relativement proches, la plus forte accumulation hépatique des nanoparticules PEGylées ne peut pas s'expliquer par une différence du diamètre hydrodynamique et/ou du potentiel zêta (Figure 4-7 et Tableau 4-1). La présence des chaînes de PEG génère probablement des interactions différentes avec le milieu environnant qui pourraient être à l'origine des différences d'accumulation observées dans le foie.

La longueur de la chaîne de PEG exerce également une influence sur la cinétique d'élimination de ces nanoparticules d'or car le %ID pour Au@TAPEG₄DOTAGA atteint 30% dans le foie une heure après injection alors que pour Au@TAPEG₁₁DOTAGA ce pourcentage est atteint 24 heures après injection intraveineuse ce qui suggère une circulation plus durable dans l'organisme des nanoparticules recouvertes par le chélateur PEGylé comprenant 11 unités de répétition (Au@TAPEG₁₁DOTAGA).

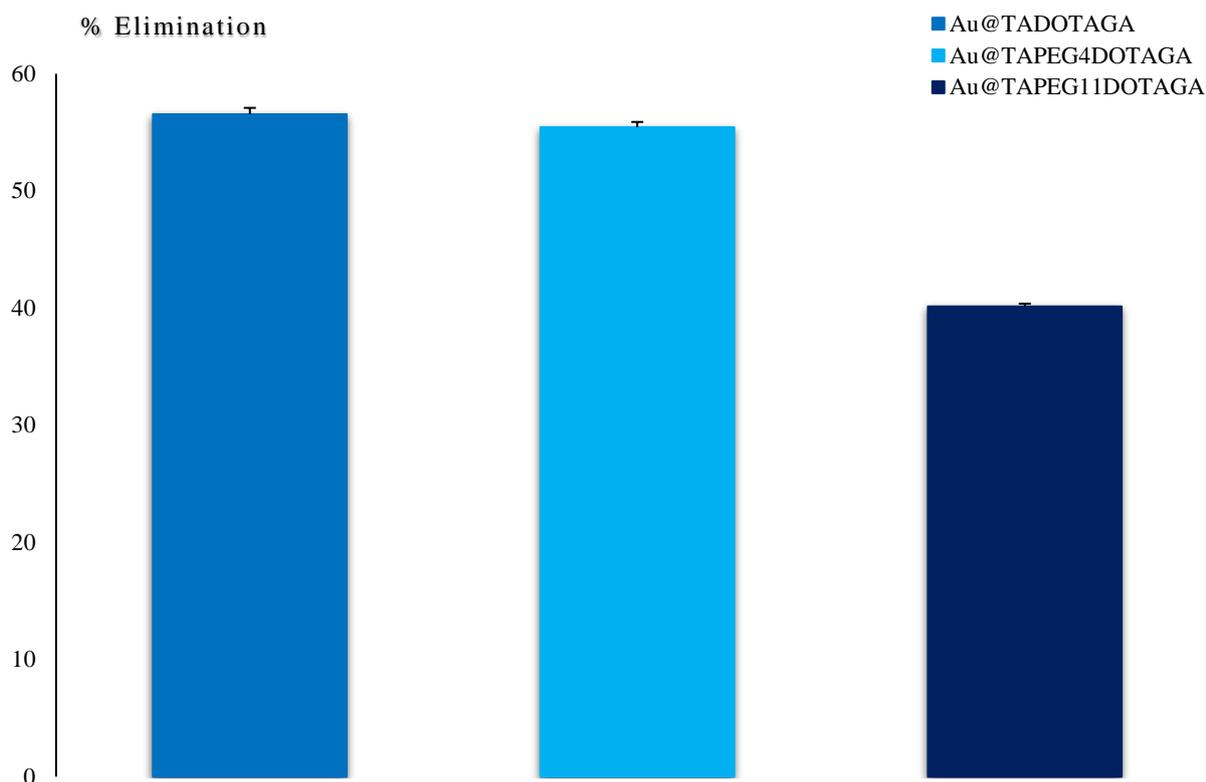


Figure 5-5 : Pourcentage moyen de dose de nanoparticules d'or injectée éliminée de l'organisme 24 heures après injection intraveineuse des suspensions de nanoparticules Au@TAPEG_nDOTAGA (n = 0, 4 et 11)

L'allongement du temps de circulation des nanoparticules Au@TAPEG₁₁DOTAGA qui se traduit par une élimination plus lente est vérifiée grâce à la comparaison des pourcentages moyens d'élimination (Figure 5-5). Environ 60% des nanoparticules Au@TADOTAGA et Au@TAPEG₄DOTAGA sont éliminées de l'organisme au bout de 24 h alors que le pourcentage des nanoparticules d'or Au@TAPEG₁₁DOTAGA éliminées de l'organisme dans la même durée est nettement plus faible (environ 40%).

La comparaison entre les données présentées dans les Figure 5-1 à Figure 5-4, montre que la présence d'une chaîne de PEG modifie le comportement des nanoparticules d'or. Les principales observations et conclusions de cette étude de biodistribution combinant imagerie SPECT-CT, analyses *post-mortem* des organes (comptage γ et dosage ICP-OES) concordent avec les données de la littérature. En effet, les nanoparticules d'or circulent plus longtemps et sont éliminées plus lentement lorsque la chaîne de PEG est suffisamment longue, ce qui est le cas des nanoparticules Au@TAPEG₁₁DOTAGA.

6. Radiothérapie

L'objectif de cette étude consiste à évaluer l'influence de la chaîne de PEG sur l'exploitation de l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'or. Dans une étude antérieure, il a été montré que les nanoparticules Au@TADOTAGA[109], injectées par voie intratumorale ou intraveineuse, sont capables d'améliorer le traitement par radiothérapie. L'irradiation en présence de ces nanoparticules d'or dans la tumeur (injection par voie intratumorale) ralentit considérablement la croissance tumorale par rapport aux animaux traités

uniquement par radiothérapie. D'autre part, la radiothérapie lorsqu'elle est réalisée après injection intraveineuse des nanoparticules Au@TADOTAGA permet d'améliorer la survie des animaux d'un facteur 2 par rapport aux animaux traités uniquement par radiothérapie et par un facteur 5 par rapport aux animaux non traités. Cependant, en nous appuyant sur la comparaison entre les nanoparticules d'or et les nanoparticules AGuIX® qui montre une efficacité similaire alors que les nanoparticules d'or devraient être plus efficaces (voir page 84 paragraphe 4.4.3.3.3), nous avons l'espoir d'améliorer le potentiel thérapeutique de ces nanoparticules d'or en introduisant une chaîne PEG dans la structure moléculaire des chélateurs qui recouvrent les nanoparticules d'or que nous développons. En effet, comme nous l'avons montré dans la partie précédente consacrée à l'étude de la biodistribution, les chaînes PEG, si elles sont suffisamment longues augmentent le temps de circulation et ralentissent l'élimination des nanoparticules PEGylées. De tels changements induits par les chaînes de PEG devraient favoriser l'accumulation tumorale et/ou augmenter le temps de rétention tumorale et conduire à mieux exploiter le potentiel radiosensibilisant des nanoparticules d'or. En outre, une piste encourageante avait été ouverte par une étude préliminaire réalisée à l'ESRF qui montrait que l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'or PEGylées était exploitable sans perte d'efficacité durant 24 heures après l'injection intraveineuse alors que le traitement par radiothérapie était moins efficace quand il était initié 24 h plutôt que 10 minutes après l'injection intraveineuse si les nanoparticules d'or ne contenaient pas de chaînes de PEG. Une telle différence entre particules PEGylées et non PEGylées peut s'expliquer par une plus forte accumulation et une meilleure rétention des nanoparticules d'or PEGylées dans les tumeurs cérébrales. Afin d'approfondir l'étude visant à montrer l'effet indirect mais bénéfique des chaînes de PEG, nous avons cherché à exploiter le potentiel radiosensibilisant des nanoparticules Au@TAPEG_nDOTAGA (n = 0 (i.e. Au@TADOTAGA, référence), 4 et 11) en traitant par radiothérapie, 1 h et 24 h après administration des nanoparticules, des tumeurs cérébrales humaines (glioblastome humain initié à partir de la lignée cellulaire U87) implantées dans des embryons de poulet (Voir page 180 paragraphe 6.1). Le choix de deux délais nettement différents entre l'administration des nanoparticules et l'irradiation a pour but de mettre en évidence l'effet de la rétention tumorale des nanoparticules qui devrait être meilleure dans le cas des nanoparticules PEGylées (i.e. n = 4 et 11). Jusqu'à présent, la stratégie développée dans l'équipe consistait à évaluer le potentiel radiosensibilisant des nanoparticules contenant des éléments à haut Z après injection intratumorale sur des rongeurs. Cette stratégie présente l'avantage de s'affranchir de la biodistribution. Cependant, elle est pénalisée par une certaine lourdeur en termes de gestion d'animaux qui conduit à limiter le nombre d'animaux par groupe et donc à dégrader la confiance dans les résultats. Pour contourner ces limitations et alléger la procédure visant à étudier *in vivo* l'effet radiosensibilisant et sa dépendance à des modifications apportées aux agents radiosensibilisants, nous avons opté pour une étude sur des embryons de poulet qui a été réalisée par la société INOVOTION localisée à Grenoble.

6.1. Protocole expérimental

6.1.1. Description de l'étude

L'objectif de cette étude consiste à mettre en évidence l'effet indirect des chaînes de PEG sur le traitement par radiothérapie en présence de nanoparticules d'or radiosensibilisantes. Nous évoquons un effet indirect car les chaînes de PEG n'ont aucun potentiel radiosensibilisant (contrairement aux cœurs d'or des nanoparticules) mais leur présence peut influencer sur l'accumulation et la rétention dans les tumeurs et donc sur l'exploitation de l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'or. Afin de mettre en évidence des différences d'efficacité en radiothérapie entre les nanoparticules d'or Au@TAPEG_nDOTAGA, neuf groupes de maximum 20 embryons ont été constitués de manière aléatoire (Tableau 6-1).

La Figure 6-1 décrit la stratégie mise en œuvre pour étudier l'influence des chaînes de PEG sur l'exploitation de l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'or Au@TAPEG_nDOTAGA. Au neuvième jour du développement des embryons (E9), des cellules cancéreuses de la lignée U87 sont introduites à l'intérieur de l'œuf à travers une ouverture réalisée dans la coquille. La prolifération de ces cellules conduit au développement d'une tumeur qui sera prélevé neuf jours plus tard (*i.e.* au dix-huitième jour du développement de l'embryon (E18)). A l'exception des deux groupes 1 et 3 (non traités (1) et traités uniquement par les nanoparticules d'or Au@TADOTAGA (3)), les embryons des autres groupes (2, 4-9) sont exposés à un rayonnement ionisant thérapeutique (dose : 2 Gy) deux jours après l'introduction des cellules cancéreuses (onzième jour du développement de l'embryon (E11)). Parmi les groupes traités par radiothérapie, le groupe 2 constitue le groupe témoin validant l'effet thérapeutique de la radiothérapie en l'absence d'effet radiosensibilisant (sans nanoparticules d'or) alors que les autres groupes (4-9) concernent des embryons irradiés par le même type de faisceau mais en présence d'un des trois types de nanoparticules. Afin d'évaluer l'influence de la rétention des nanoparticules sur le traitement radiothérapeutique, les nanoparticules sont administrées soit 24 h (H-24, un jour après l'incorporation des cellules cancéreuses (E10)), soit 1 h (H-1, deux jours après l'incorporation des cellules cancéreuses (E11)) avant l'irradiation.

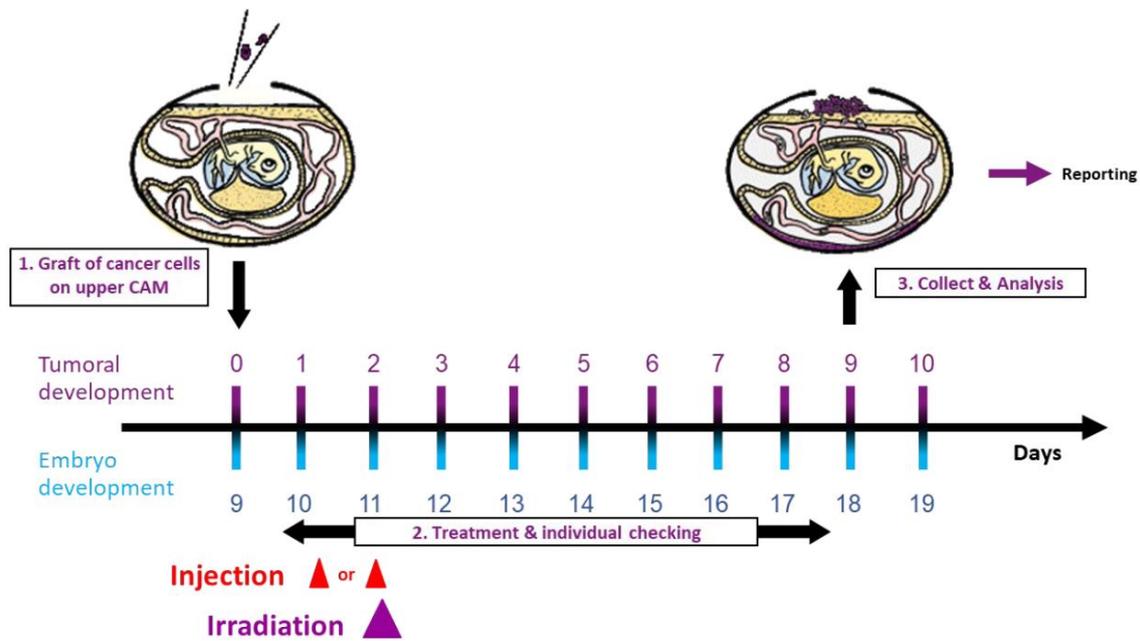


Figure 6-1 : Description de l'étude

Il est important de souligner que l'administration des nanoparticules est intermédiaire entre une injection intraveineuse et une injection intratumorale. Les suspensions de nanoparticules sont déposées sur la CAM (Chorioallantoic Membrane) au niveau de la tumeur mais ne sont pas introduites directement dans la tumeur. Une partie des nanoparticules diffuseront dans la tumeur et le reste diffusera dans l'œuf.

N°	Description du groupe	Composé injecté	Dose	[Au]	Finale [in ovo]	Temps
1	Contrôle négatif		-	-	-	-
2	Irradiation	-	2 Gy	-	2 Gy	E11
3	Nanoparticule d'or I	Au@TADOTAGA	1 mg/œuf	10 mg/mL	17 mg/kg	E11
4	Nanoparticule d'or I irradiée (1)	Au@TADOTAGA	1 mg/œuf 2 Gy	10 mg/mL -	17 mg/kg 2 Gy	E11 (H-1) E11
5	Nanoparticule d'or II irradiée (1)	Au@TAPEG ₄ DOT AGA	1 mg/œuf 2 Gy	10 mg/mL -	17 mg/kg 2 Gy	E11 (H-1) E11
6	Nanoparticule d'or III irradiée (1)	Au@TAPEG ₁₁ DO TAGA	1 mg/œuf 2 Gy	10 mg/mL -	17 mg/kg 2 Gy	E11 (H-1) E11
7	Nanoparticule d'or I irradiée (2)	Au@TADOTAGA	1 mg/œuf 2 Gy	10 mg/mL -	17 mg/kg 2 Gy	E10 (H-24) E11
8	Nanoparticule d'or II irradiée (2)	Au@TAPEG ₄ DOT AGA	1 mg/œuf 2 Gy	10 mg/mL -	17 mg/kg 2 Gy	E10 (H-24) E11
9	Nanoparticule d'or III irradiée (2)	Au@TAPEG ₁₁ DO TAGA	1 mg/œuf 2 Gy	10 mg/mL -	17 mg/kg 2 Gy	E10 (H-24) E11

Tableau 6-1 : Description des groupes d'étude et de leur traitement.

6.1.2. Préparation des embryons de poulet

Les œufs fécondés White Leghorn sont incubés à 37,5°C avec 50% d'humidité relative pendant 9 jours. A ce stade de développement embryonnaire (E9), la membrane chorioallantoïque (CAM) est décollée de la coquille en perçant un petit trou à travers la coquille d'œuf dans la chambre à air. Puis, une fenêtre de 1 cm² est découpée dans la coquille d'œuf au-dessus de la CAM afin d'introduire les cellules cancéreuses (voir page 182 paragraphe 6.1.3). Afin que les données soient recueillies à partir de groupes comportant un minimum de 16 œufs, au moins 20 œufs (selon le taux de survie des embryons après 9 jours de développement, il pourrait y avoir plus de 20 œufs par groupe) ont été greffés pour chaque groupe car le caractère invasif de l'acte chirurgical peut induire un certain nombre de décès au cours des heures qui suivent le greffage de la tumeur.

6.1.3. Amplification et greffe de cellules tumorales

La lignée cellulaire tumorale U87 est cultivée dans du milieu MEM additionné de 10% de FBS, 1% de glutamine, 1% de pyruvate et de pénicilline (100 unité/mL) / streptomycine (100 µg/mL). Au jour E9, les cellules sont lavées avec du milieu complet et mises en suspension dans le milieu de greffage. Un inoculum de 0,5x10⁶ cellules est ajouté sur la CAM de chaque œuf (E9) puis les œufs sont randomisés en groupes.

6.1.4. Traitements

Avant le traitement, la viabilité de chaque œuf est vérifiée et les œufs survivants sont distribués dans les différents groupes de manière aléatoire. Tous les œufs des groupes 3-9 sont traités avec un volume de 100 μ L d'une suspension de nanoparticules d'or fraîchement préparée, soit à E10 (24 heures avant l'irradiation ; H-24) soit à E11 (une heure avant l'irradiation, H-1), comme détaillé dans le Tableau 6-1.

A E11, tous les groupes sont transportés au CHUGA. Bien que les groupes 1 et 3 (contrôle négatif) ne soient pas irradiés, ils ont également été amenés au CHUGA afin de maintenir tous les œufs des différents groupes dans les mêmes conditions de température et d'humidité.

L'irradiation se fait avec un appareil Clinac 2100 (CHUGA). Tous les œufs d'un même groupe (16 œufs) sont irradiés en même temps. La Figure 6-2 présente l'étape d'irradiation. Au début de chaque séance d'irradiation, un étalonnage est d'abord effectué. Ensuite, dans les groupes irradiés, seule la partie supérieure de l'œuf (contenant les tumeurs mais pas l'embryon) recevra le rayonnement. L'irradiation se fait à 2 Gy, des deux côtés du portoir pour homogénéiser le niveau de rayonnement sur chaque œuf.

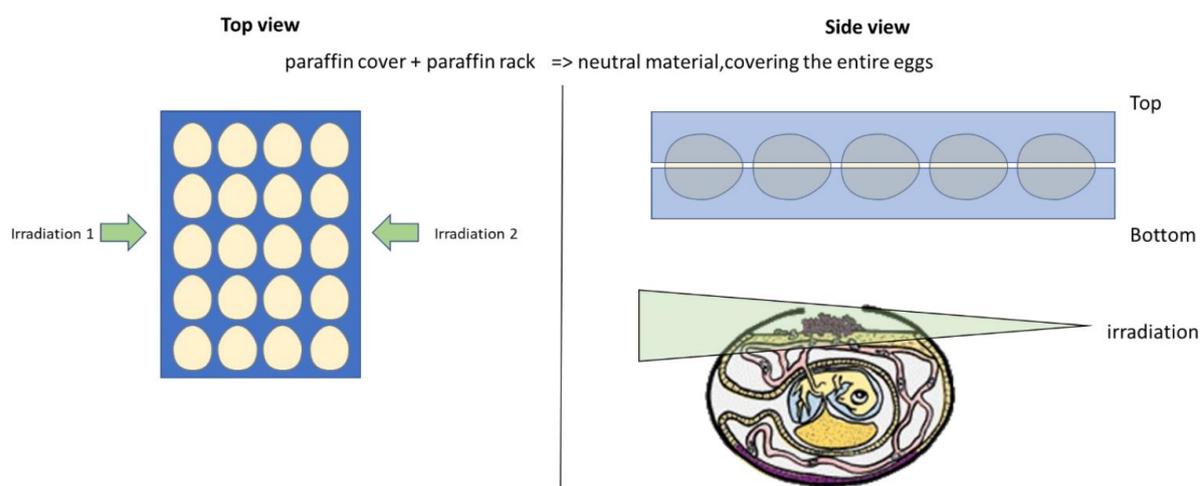


Figure 6-2 : Protocole et vue du portoir pour l'irradiation

6.1.5. Évaluation quantitative de la croissance tumorale

Au jour E18, la partie supérieure de la CAM (avec tumeur) est prélevée, lavée par un tampon PBS puis directement transférée dans du PFA (fixation pendant 48 h). Après cela, les tumeurs sont soigneusement séparées du tissu CAM normal et pesées.

6.1.6. Évaluation quantitative de l'invasion métastatique

Au jour E18, une portion de 1 cm^2 de la CAM inférieure (à l'opposé de l'emplacement de la tumeur) est prélevée pour évaluer le nombre de cellules métastatiques dans 8 échantillons par groupe ($n = 8$). L'ADN génomique est extrait de la CAM et analysé par qPCR avec des amorces spécifiques pour les séquences Human Alu. Pour tous les points effectués en qPCR, l'expression de GAPDH de poulet est également

analysée, en tant qu'expression de gène de référence, et utilisée pour normaliser l'expression d'Alu entre les échantillons.

Le calcul de cycle de quantification (Cq) pour chaque échantillon, le Cq moyen et les quantités relatives de métastases pour chaque groupe sont directement gérés par le logiciel Bio-Rad® CFX Maestro.

Selon la norme de données Real-Time PCR Data Markup Language (RDML) (<http://www.rdml.org>), Cq est défini comme le cycle auquel la courbure de la courbe d'amplification est maximale (cycles de PCR fractionnaires). Cq est pris dans la phase exponentielle où la courbe qPCR est linéaire. C'est le résultat de base de la qPCR : des valeurs de Cq plus faibles signifient un nombre de copies initiales plus élevé du gène cible. Lorsque l'efficacité de la PCR est de 100%, une différence de 1 cycle entre 2 réactions signifie qu'il y a deux fois plus de copies (gène) dans la réaction qui a la valeur Cq la plus faible que dans la réaction qui a la valeur Cq la plus élevée.

6.1.7. Évaluation quantitative de la tolérance embryonnaire

La viabilité embryonnaire est vérifiée quotidiennement. Le nombre d'embryons morts est également compté sur E18, pour évaluer la toxicité embryonnaire induite par le traitement.

Le taux de mortalité final et une courbe de Kaplan-Meier sont alors disponibles pour tous les groupes. Toute anomalie visible observée au cours de l'étude est également brièvement décrite.

6.2. Résultats et discussion

Le but de cette étude est d'évaluer l'influence de la présence du PEG et de la longueur de sa chaîne sur l'exploitation de l'effet radiosensibilisant des différents types de nanoparticules d'or Au@TAPEG_nDOTAGA (n = 0, 4 et 11). En d'autres termes, est-ce que l'incorporation d'une chaîne PEG de longueur contrôlée dans la structure du chélateur TADOTAGA permet d'améliorer encore plus l'effet de la radiothérapie (voir page 178 paragraphe 6) ? Afin de répondre à cette question, nous avons cherché à comparer la taille d'une tumeur U87 implantée sur des embryons de poulet après différents traitements (voir page 180 paragraphe 6.1). La Figure 6-3 rassemble les résultats obtenus auprès des neuf groupes constitués pour l'étude (Tableau 6-1).

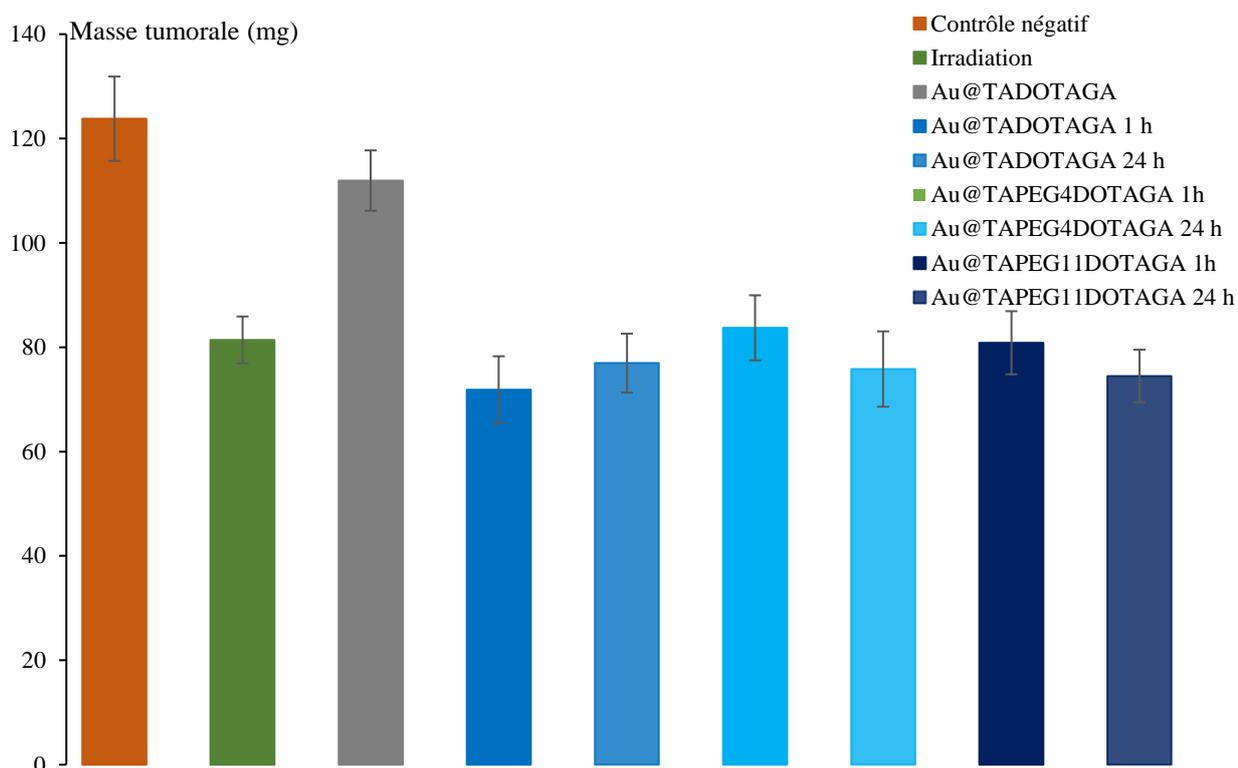


Figure 6-3 : La valeur moyenne de la masse tumorale (mg) pour les différents groupes d'embryons

La première observation issue de cette expérience est que la tumeur U87 a réussi à se développer après l'injection de cellules cancéreuses issues de la lignée humaine U87. La masse moyenne atteint une valeur proche de 124 mg au bout de 9 jours (E18). L'analyse de la Figure 6-3 fournit une deuxième information cruciale pour le traitement des données : le traitement par radiation ionisante avec une dose unique de 2 Gy est efficace puisque la masse tumorale a fortement diminué passant de 124 mg (groupe 1, aucun traitement) à environ 81 mg (groupe 2, traitement par radiothérapie uniquement), soit une baisse de 34,7%. Pour finir avec les groupes « contrôle », nous apprenons de cette expérience que les nanoparticules d'or n'ont qu'un faible pouvoir chimiothérapeutique car la masse tumorale des embryons du groupe 3 (administration de nanoparticules sans irradiation) n'a que faiblement diminué (112 mg contre 124 mg soit une diminution d'à peine 10% (9,7%)). En revanche, la perte de masse est plus importante quand les nanoparticules d'or sont présentes dans l'œuf au moment de l'irradiation (groupes 4-9). Malheureusement, cette perte de masse (entre 32% pour le groupe 6 et 42% pour le groupe 4, respectivement la plus faible et la plus élevée des valeurs) est du même ordre de grandeur que celle observée pour les embryons traités uniquement par radiothérapie (groupe 2, i.e. irradiation sans nanoparticules, 34,7 %). Dans le meilleur des cas (groupe 4, perte de masse de 42%), l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'or reste modeste alors que le pouvoir radiosensibilisant des nanoparticules Au@TADOTAGA (sans PEG) a été validé dans des expériences précédentes [109] mais avec un rayonnement synchrotron aux caractéristiques nettement différentes (peigne de microfaisceaux de dose élevée, flux de photons intense, irradiation croisée de la tumeur) et dans des conditions biologiques éloignées (rats avec tumeurs cérébrales (gliosarcome 9L) orthotopiques au lieu de tumeurs humaines à la surface des embryons de poulet). L'absence d'effet radiosensibilisant net peut

s'expliquer par les différences de rayonnement et de biologie mais également par le fait que la dose utilisée est en elle-même suffisamment efficace. Il est alors difficile d'améliorer l'effet de la radiothérapie par la radiosensibilisation. Pourtant, ces résultats sont encourageants lorsque nous nous focalisons sur les différences observées pour un même type de nanoparticules. Même si la significativité des résultats est discutable, une tendance intéressante se dessine lorsque sont comparés les résultats obtenus après irradiation pour un même type de nanoparticules mais à deux temps différents (comparaison entre les groupes 4 et 5, 6 et 7, 8 et 9). La perte de masse après irradiation avec un même type de nanoparticules n'est pas la même lorsque le délai entre l'administration des nanoparticules et l'irradiation passe de 1h à 24 h. Dans le cas des nanoparticules non PEGylées Au@TADOTAGA (groupes 4 (1 h) et 5 (24 h)), la perte de masse est plus importante lorsque que le délai entre administration des nanoparticules et irradiation est de 1 h (groupe 4) alors que pour les nanoparticules PEGylées Au@TAPEG_nDOTAGA (groupes 6 (1h) et 7 (24 h) pour n = 4 et groupes 8 (1 h) et 9 (24 h) pour n = 11) la perte de masse est plus importante quand le délai est fixé à 24 h. Cette piste mérite d'être explorée de manière plus approfondie car elle semble confirmer le rôle de la PEGylation sur le comportement des nanoparticules d'or qui ne se distinguent que par la présence et la longueur des chaînes de PEG. D'après les résultats obtenus au cours de cette expérience de radiothérapie, on peut suspecter que les nanoparticules non PEGylées (n = 0, i.e. la référence Au@TADOTAGA) diffusent plus vite dans l'œuf et sont donc présentes en plus faible quantité dans l'environnement tumoral à 24h qu'à 1h alors que la présence des chaînes de PEG ralentit le phénomène de diffusion et conduit à une accumulation plus lente mais à une meilleure rétention des nanoparticules d'or dans la tumeur qui expliquerait que l'effet sur la diminution de la tumeur soit plus important à 24h qu'à 1 h. Ce scénario est plausible puisque nous avons montré dans le cadre des expériences de biodistribution (Voir page 170 paragraphe 5) que la présence des chaînes de PEG et la longueur de ces chaînes influençaient la biodistribution et la cinétique des nanoparticules dans un sens compatible avec les observations réalisées dans le cadre du traitement par radiothérapie.

Si l'irradiation avec ou sans nanoparticules conduit à une réduction de la masse tumorale, elle n'apporte cependant pas de bénéfice sur la survie des embryons. La Figure 6-4 montre que le taux de mortalité des animaux traités (groupes 2-9) est semblable à celui des animaux non traités (groupe 1). Cependant plusieurs tendances méritent une attention particulière. La première concerne le groupe 3 (traitement uniquement avec les nanoparticules de référence Au@TADOTAGA) : la mortalité est relativement élevée (17,4%) comparée au groupe 1 dans lequel les animaux n'ont reçu aucun traitement (9,5%). Ce point est préoccupant car il peut annuler partiellement les effets bénéfiques de la radiosensibilisation. Malgré tout, les résultats obtenus avec les animaux traités par radiothérapie après administration des nanoparticules sont rassurants car dans la majorité des cas la mortalité est plus faible que dans le groupe 3 (administration des nanoparticules Au@TADOTAGA sans irradiation). En outre, nous constatons que la mortalité est nulle dans deux groupes traités par radiothérapie en présence des nanoparticules Au@TADOTAGA (groupe 4, délai 1h) et Au@TAPEG₄DOTAGA (groupe 7, délai 24h). Ces résultats confortent les observations réalisées pour ces groupes au sujet de la perte de masse de la tumeur après traitement. Pour les nanoparticules non PEGylées Au@TADOTAGA (référence), nous avons constaté que la perte de masse

était plus importante, donc le traitement plus bénéfique, lorsque le délai entre administration et irradiation était de 1 h (52 mg (groupe 4) au lieu de 47 mg pour le délai 24 h (groupe 5) avec une masse moyenne de la tumeur de 124 mg en l'absence de traitement (groupe 1), Figure 6-3). Aucun embryon du groupe 4 (perte de masse tumorale la plus importante) ne meurt alors que la mortalité des animaux du groupe 5 (même traitement, même nanoparticule (Au@TADOTAGA) mais délai de 24 h au lieu de 1 h) atteint une valeur élevée de 33% (la plus élevée de l'expérience). Nous pouvons effectuer le même type d'observation pour les groupes 6 et 7 qui comportent des embryons traités par radiothérapie en présence du même type de nanoparticules Au@TAPEG₄DOTAGA mais avec deux délais différents entre administration et irradiation (1 h pour le groupe 6 et 24 h pour le groupe 7). L'analyse de la Figure 6-3 montrait que la perte de masse était plus importante pour le groupe 7 (48 mg, délai 24 h) que pour le groupe 6 (40 mg, délai 1h). Or la Figure 6-4 qui rassemble les données sur la survie des embryons des groupes 1-9 montre que les embryons du groupe 7 (qui présentent la perte de masse tumorale la plus importante comparée au groupe 6) ne comptent aucun mort contrairement au groupe 6 dont la mortalité reste cependant faible (6,3%). Les exemples des groupes 4-5 et 6-7 montrent une corrélation pertinente entre perte de masse et survie : plus la perte de masse tumorale est grande, meilleur sera le taux de survie. Les groupes 8-9 (radiothérapie en présence des mêmes nanoparticules Au@TAPEG₁₁DOTAGA mais avec des délais différents, 1h pour le groupe 8 et 24 h pour le groupe 9) s'écartent de cette tendance car la mortalité pour le groupe 9 (délai 24 h) dont la perte de masse tumorale est la plus grande (49 mg au lieu de 43 pour le groupe 8) est étonnamment plus élevée (18,3%) que celle du groupe 8 (12,5%). Il apparaît clairement au regard des résultats présentés dans les Figure 6-3 et Figure 6-4 qu'une tendance intéressante se dessine : le potentiel radiosensibilisant des nanoparticules d'or PEGylées est mieux exploité lorsque la radiothérapie est mise en œuvre 24 h après l'administration des nanoparticules au lieu de 1 h alors que les nanoparticules d'or non PEGylées sont plus efficaces 1 h après leur administration. Ces interprétations confirment l'influence bénéfique des chaînes de PEG si on veut exploiter l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'or sur un temps plus long qui paraît plus compatible avec une utilisation clinique. Mais en raison de la faiblesse statistique de l'étude, il est nécessaire de confirmer ses résultats en recommençant cette expérience plusieurs fois avec des groupes plus importants mais également avec d'autres doses de radiation et d'autres teneurs en nanoparticules.

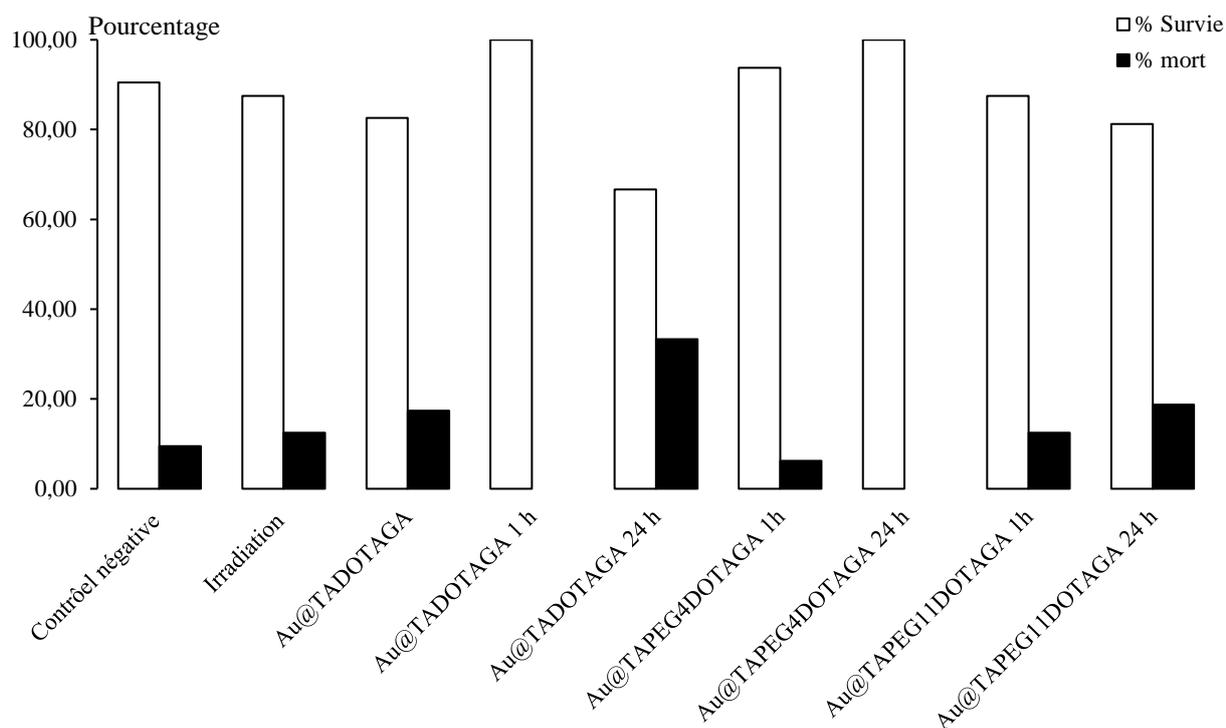


Figure 6-4 : Le pourcentage de survie et de mort des embryons à la fin de l'étude

Dans le cadre de cette étude sur les embryons de poulet, nous nous sommes également intéressés au développement des métastases après irradiation (Figure 6-5). En plus d'être à l'origine de cancers radioinduits qui surviennent plusieurs années après le traitement, la radiothérapie possède l'inconvénient de favoriser l'échappement et la migration de cellules depuis la tumeur primaire et de générer des métastases. Cette caractéristique indésirable est confirmée par l'analyse effectuée sur les embryons traités uniquement par radiothérapie (groupe 2) : par rapport aux embryons non traités (groupe 1), la quantité de métastase a augmenté de 41% après irradiation. Dans deux études précédentes réalisées en collaboration avec l'équipe de Sophie Pinel (CRAN, UL) et celle de Jérôme Devy (MEDyC, URCA) dans le cadre du projet eNano-RX (cancéropôle EST, Régions Grand Est et Bourgogne Franche-Comté), il a été clairement montré que les nanoparticules d'or recouvertes de chélateurs Au@DTDTPA exercent en plus de l'effet radiosensibilisant caractéristique des nanoparticules d'or un effet antimigratoire qui pourrait contrebalancer les effets indésirables de la radiothérapie [116, article soumis sur l'effet migratoire des nanoparticules d'or durant une radiothérapie]. Les similitudes entre les nanoparticules Au@TAPEG_nDOTAGA et Au@DTDTPA (ces particules ne diffèrent que par la nature du chélateur, linéaire pour DTDTPA et macrocyclique pour TADOTAGA) laissent présager un contrôle de la formation des métastases après administration des nanoparticules d'or Au@TAPEG_nDOTAGA. Par rapport au groupe 1 (embryons non traités), la Figure 6-5 montre une diminution (10%) du nombre de métastases dans le groupe 3 qui est constitué d'embryons traités uniquement par l'administration de nanoparticules Au@TADOTAGA. En l'absence d'irradiation, la présence des nanoparticules d'or Au@TADOTAGA limite donc la formation des métastases. Ce résultat va dans le sens de celui observé avec les nanoparticules Au@DTDTPA. Mais le constat le plus intéressant est que la présence de nanoparticules d'or pendant l'irradiation limite

considérablement, dans la plupart des cas, la formation des métastases par rapport aux embryons traités uniquement par radiothérapie (groupe 2). Dans tous les groupes correspondant aux embryons traités par radiothérapie après administration des nanoparticules (groupes 4-9), le nombre de métastases est inférieur à celui observé pour le groupe 2 (uniquement radiothérapie). Cependant, lorsque le délai entre administration et irradiation est de 1 h, l'effet anti-métastatique n'est visible que pour les nanoparticules d'or non PEGylées Au@TADOTAGA (groupe 4, réduction de 11% contre une augmentation de 41% dans le cas des embryons traités uniquement par radiothérapie (groupe 2)). En effet, si pour le même délai le nombre de métastases formées après irradiation en présence des nanoparticules PEGylées (groupes 6 et 8) est moins important que dans le cas d'une irradiation en l'absence de nanoparticules (groupe 2), il reste supérieur au nombre de métastases observé pour le groupe des embryons non traités (groupe 1). En revanche, que les nanoparticules soient PEGylées ou non, nous constatons à la lecture de la Figure 6-5 un fort effet anti-métastatique quand le délai entre administration des nanoparticules et irradiation est de 24 h (diminution comprise entre 15 et 36% selon le type de nanoparticules (groupes 5, 7 et 9)). Quel que soit le type de nanoparticules, l'effet anti-métastatique est plus prononcé quand le délai entre administration des nanoparticules est de 24 h alors que l'analyse de la perte de masse en fonction du délai montrait une influence de la PEGylation (Figure 6-3). Pour les nanoparticules PEGylées la perte de masse était plus importante pour un délai de 24 h, comme pour l'activité anti-métastatique, alors que pour les nanoparticules non PEGylées la perte de masse était moins importante pour le délai de 24 h, contrairement à ce qui est observé pour l'activité anti-métastatique de ces nanoparticules. Ces différences peuvent probablement s'expliquer par les mécanismes mis en jeu pour la perte de masse et l'activité métastatique dont la nature semble différente. En effet, en l'absence d'irradiation, l'effet des nanoparticules sur la perte de masse est relativement faible alors que l'activité anti-métastatique est aussi forte en l'absence d'irradiation qu'après irradiation pour les nanoparticules Au@TADOTAGA avec un délai de 1 h (comparaison entre groupes 3 et 4). Malgré ces différences, les observations concernant l'effet anti-métastatique des nanoparticules d'or en fonction de leur nature et du délai entre administration des nanoparticules et irradiation corroborent les observations faites lors de l'étude de la perte de masse de la tumeur. La plus faible vitesse d'accumulation des nanoparticules PEGylées et leur meilleure rétention tumorale expliqueraient qu'elles soient plus efficaces pour réduire la masse tumorale et le nombre de métastases lorsque le délai entre administration et irradiation est long (24 h) alors que les nanoparticules non PEGylées, plus mobiles, s'accumulent plus vite dans la tumeur et agissent donc très efficacement quand le délai est court (1 h). Au cours du temps, ces nanoparticules étant moins retenues dans la tumeur, leur action sur la réduction de la masse tumorale est moins probante. Cependant la quantité reste suffisante pour exercer un fort effet anti-métastatique car comme il s'exprime même en l'absence d'irradiation on peut imaginer un effet cumulatif qui améliore l'effet au fil du temps.

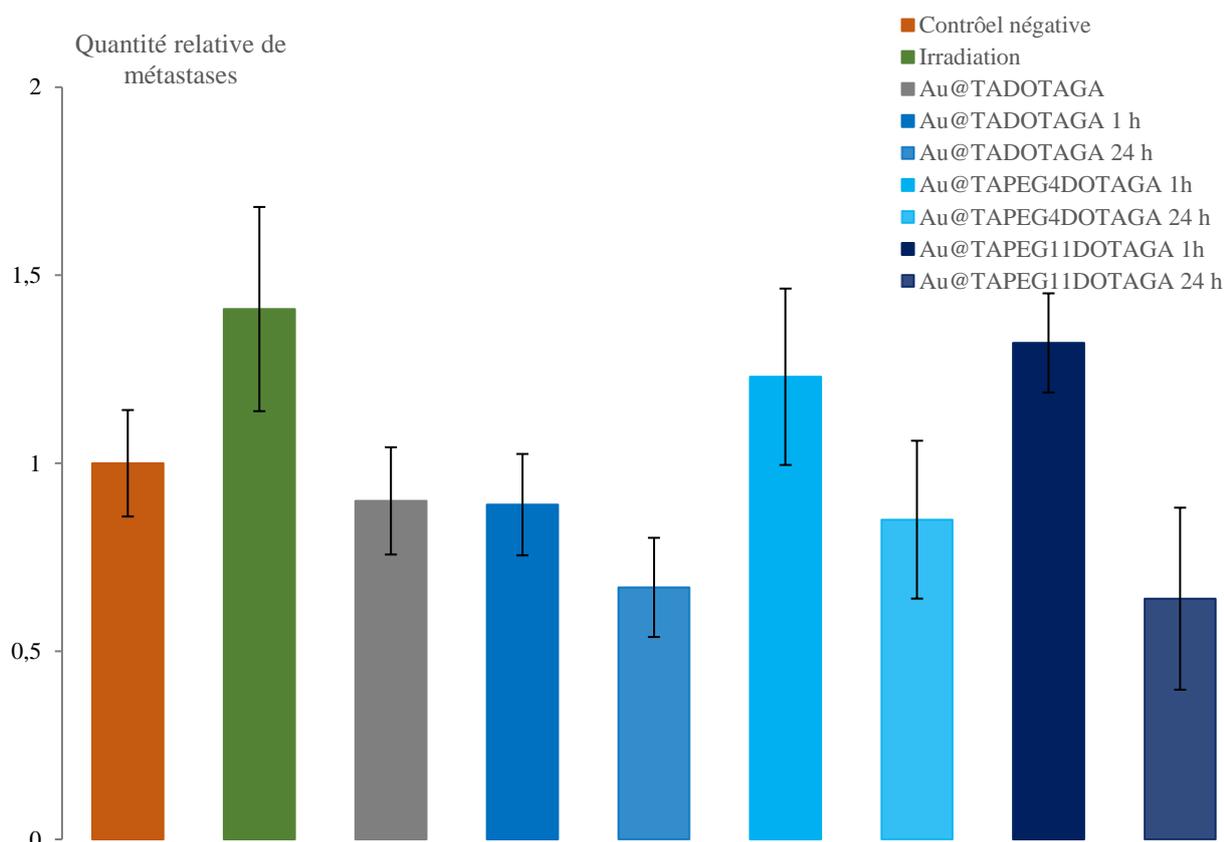


Figure 6-5 : Quantité relative de métastases pour les différents groupes d'analyse

7. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons démontré que les deux séries de nanoparticules Au@TAPEG_nDOTA et Au@TAPEG_nDOTAGA (avec n = 0, 4 et 11) sont facilement synthétisées et présentent les caractéristiques physico-chimiques désirées pour leur utilisation dans des applications médicales. Ces nanoparticules sont capables de complexer des ions d'intérêt pour l'imagerie médicale comme Gd³⁺ pour l'IRM et [¹¹¹In]In³⁺ pour la SPECT.

L'étude par imagerie SPECT/CT de la biodistribution des nanoparticules radiomarquées de la série Au@TAPEG_nDOTAGA (n=0, 4 et 11) a montré qu'elles présentent un comportement sain. Elles circulent librement sans opsonisation ni accumulation indésirable à l'exception des organes impliqués dans l'élimination.

Le comportement de ces nanoparticules dans des souris saines diffère en fonction de leur composition et en particulier de la présence de chaînes de PEG. Pour les nanoparticules sans PEG, l'élimination rénale rapide reste la voie d'élimination majoritaire. En présence de PEG, l'accumulation dans le foie des nanoparticules est plus évidente mais il ne s'agit pas d'opsonisation car le pourcentage reste modéré. De plus l'accumulation dans le foie reste lente contrairement à ce qui est observé dans le cas de l'opsonisation.

L'étude de la biodistribution révèle également une influence de la longueur de la chaîne de PEG. Quand elle est courte, la biodistribution des nanoparticules d'or Au@TAPEG_nDOTAGA est modifiée mais pas la cinétique d'élimination alors que la biodistribution et la cinétique d'élimination sont toutes deux affectées quand la chaîne de PEG est plus longue.

Nous pouvons donc conclure que la PEGylation a modifié la biodistribution, le mode d'élimination et le temps de circulation des nanoparticules d'or. D'après les expériences de radiothérapie pratiquées sur des embryons de poulet, la PEGylation, probablement parce qu'elle permet une accumulation plus lente et une meilleure rétention des nanoparticules, conduit à une meilleure exploitation de l'effet radiosensibilisant et de l'effet anti-métastatique des nanoparticules d'or lorsque le délai entre administration des nanoparticules et irradiation est de 24 h. Ce délai paraît plus adapté pour un traitement en clinique que le délai de 1 h.

Dans le chapitre suivant, nous exposerons une autre stratégie pour prolonger le temps de circulation des nanoparticules d'or. Elle repose sur le greffage des nanoparticules d'or à la surface de nanotransporteurs biodégradables avec ou sans peptide de ciblage.

8. Références

- [1] G. Pasut, M. Sergi, et F. M. Veronese, « Anti-cancer PEG-enzymes: 30 years old, but still a current approach », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, n° 1, p. 69-78, 2008.
- [2] Y. Eto, Y. Yoshioka, Y. Mukai, N. Okada, et S. Nakagawa, « Development of PEGylated adenovirus vector with targeting ligand », *International journal of pharmaceutics*, vol. 354, n° 1-2, p. 3-8, 2008.
- [3] A. Abuchowski, T. Van Es, N. C. Palczuk, et F. F. Davis, « Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 252, n° 11, p. 3578-3581, 1977.
- [4] L. Huynh, C. Neale, R. Pomès, et C. Allen, « Computational approaches to the rational design of nanoemulsions, polymeric micelles, and dendrimers for drug delivery », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 8, n° 1, p. 20-36, 2012.
- [5] A. Abuchowski, J. R. McCoy, N. C. Palczuk, T. van Es, et F. F. Davis, « Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 252, n° 11, p. 3582-3586, 1977.
- [6] R. W. Payne, B. M. Murphy, et M. C. Manning, « Product development issues for PEGylated proteins », *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 16, n° 5, p. 423-440, 2011.
- [7] C. Li et S. Wallace, « Polymer-drug conjugates: recent development in clinical oncology », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, n° 8, p. 886-898, 2008.
- [8] G. Pasut et F. M. Veronese, « Polymer–drug conjugation, recent achievements and general strategies », *Progress in polymer science*, vol. 32, n° 8-9, p. 933-961, 2007.
- [9] F. M. Veronese et G. Pasut, « PEGylation, successful approach to drug delivery », *Drug discovery today*, vol. 10, n° 21, p. 1451-1458, 2005.
- [10] S. Brocchini, A. Godwin, S. Balan, J. Choi, M. Zloh, et S. Shaunak, « Disulfide bridge based PEGylation of proteins », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, n° 1, p. 3-12, 2008.
- [11] R. Gaspar et R. Duncan, « Polymeric carriers: preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 61, n° 13, p. 1220-1231, 2009.
- [12] J. M. Harris et R. B. Chess, « Effect of pegylation on pharmaceuticals », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 2, n° 3, p. 214-221, mars 2003, doi: 10.1038/nrd1033.
- [13] D. Vllasaliu, R. Fowler, et S. Stolnik, « PEGylated nanomedicines: recent progress and remaining concerns », *Expert opinion on drug delivery*, vol. 11, n° 1, p. 139-154, 2014.

- [14] J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, et L. M. Ensign, « PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 99, p. 28-51, 2016.
- [15] « FDA Approved PEGylated Drugs Up To 2022 | Biopharma PEG ». <https://www.biochempeg.com/article/58.html> (consulté le 7 avril 2022).
- [16] D. Liu, A. Mori, et L. Huang, « Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1104, n° 1, p. 95-101, 1992.
- [17] M. Liu *et al.*, « Branched PEG-modification: A new strategy for nanocarriers to evade of the accelerated blood clearance phenomenon and enhance anti-tumor efficacy », *Biomaterials*, vol. 283, p. 121415, avr. 2022, doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121415.
- [18] S. E. Alavi, M. Koohi Moftakhari Esfahani, A. Raza, H. Adelnia, et H. Ebrahimi Shahmabadi, « PEG-grafted liposomes for enhanced antibacterial and antibiotic activities: An *in vivo* study », *NanoImpact*, vol. 25, p. 100384, janv. 2022, doi: 10.1016/j.impact.2022.100384.
- [19] M. Liu *et al.*, « Evasion of the accelerated blood clearance phenomenon by branched PEG lipid derivative coating of nanoemulsions », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 612, p. 121365, janv. 2022, doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.121365.
- [20] S. S. Nunes *et al.*, « PEGylated versus Non-PEGylated pH-Sensitive Liposomes: New Insights from a Comparative Antitumor Activity Study », *Pharmaceutics*, vol. 14, n° 2, p. 272, janv. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14020272.
- [21] F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, et O. C. Farokhzad, « Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles », *Mol. Pharmaceutics*, vol. 5, n° 4, p. 505-515, août 2008, doi: 10.1021/mp800051m.
- [22] O. Ishida, K. Maruyama, K. Sasaki, et M. Iwatsuru, « Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice », *International journal of pharmaceutics*, vol. 190, n° 1, p. 49-56, 1999.
- [23] A.-C. Faure *et al.*, « Control of the *in vivo* biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly (ethylene glycol) coatings », *Small*, vol. 5, n° 22, p. 2565-2575, 2009.
- [24] P. K. Gallagher et C. R. Kurkjian, « A study of the thermal decomposition of some complex oxalates of iron (III) using the Mössbauer effect », *Inorganic Chemistry*, vol. 5, n° 2, p. 214-219, 1966.
- [25] J. C. Anderson et B. Donovan, « Internal ferromagnetic resonance in magnetite », *Proceedings of the Physical Society (1958-1967)*, vol. 75, n° 1, p. 149, 1960.

- [26] R. Weissleder, G. Elizondo, J. Wittenberg, C. A. Rabito, H. H. Bengel, et L. Josephson, « Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. », *Radiology*, vol. 175, n° 2, p. 489-493, 1990.
- [27] D. Stanicki, T. Vangijzegem, I. Ternad, et S. Laurent, « An update on the applications and characteristics of magnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery », *Expert Opinion on Drug Delivery*, n° just-accepted, 2022.
- [28] S. Laurent *et al.*, « Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications », *Chemical reviews*, vol. 108, n° 6, p. 2064-2110, 2008.
- [29] A. K. Gupta et M. Gupta, « Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications », *biomaterials*, vol. 26, n° 18, p. 3995-4021, 2005.
- [30] S. A. Schmitz, M. Taupitz, S. Wagner, K.-J. Wolf, D. Beyersdorff, et B. Hamm, « Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaques using superparamagnetic iron oxide particles », *Journal of Magnetic Resonance Imaging: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 14, n° 4, p. 355-361, 2001.
- [31] J. Xie, C. Xu, N. Kohler, Y. Hou, et S. Sun, « Controlled PEGylation of monodisperse Fe₃O₄ nanoparticles for reduced non-specific uptake by macrophage cells », *Advanced Materials*, vol. 19, n° 20, p. 3163-3166, 2007.
- [32] M. Geso, « Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. », *The British journal of radiology*, vol. 80, n° 949, p. 64-5; author reply 65, 2007.
- [33] W. P. Faulk et G. M. Taylor, « Communication to the editors: an immunocolloid method for the electron microscope », *Immunochemistry*, vol. 8, n° 11, p. 1081-1083, 1971.
- [34] K. Yogo *et al.*, « Radiosensitization Effect of Gold Nanoparticles on Plasmid DNA Damage Induced by Therapeutic MV X-rays », *Nanomaterials*, vol. 12, n° 5, p. 771, 2022.
- [35] O. Tirosh, Y. Barenholz, J. Katzhendler, et A. Priev, « Hydration of polyethylene glycol-grafted liposomes », *Biophysical journal*, vol. 74, n° 3, p. 1371-1379, 1998.
- [36] A. B. Mayer et J. E. Mark, « Colloidal gold nanoparticles protected by water-soluble homopolymers and random copolymers », *European polymer journal*, vol. 34, n° 1, p. 103-108, 1998.
- [37] M. Möller, J. P. Spatz, A. Roescher, S. Mößmer, S. T. Selvan, et H.-A. Klok, « Mineralization of gold in block copolymer micelles », in *Macromolecular Symposia*, 1997, vol. 117, n° 1, p. 207-218.
- [38] M. Möller, J. P. Spatz, et A. Roescher, « Gold nanoparticles in micellar poly (styrene)-b-poly (ethylene oxide) films—size and interparticle distance control in monoparticulate films », *Advanced Materials*, vol. 8, n° 4, p. 337-340, 1996.

- [39] M. Fathalla, S.-C. Li, U. Diebold, A. Alb, et J. Jayawickramarajah, « Water-soluble nanorods self-assembled via pristine C60 and porphyrin moieties », *Chemical communications*, n° 28, p. 4209-4211, 2009.
- [40] G. Von Maltzahn *et al.*, « Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas », *Cancer research*, vol. 69, n° 9, p. 3892-3900, 2009.
- [41] Y. Hu, J. Xie, Y. W. Tong, et C.-H. Wang, « Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells », *Journal of Controlled Release*, vol. 118, n° 1, p. 7-17, 2007.
- [42] P. G. De Gennes, « Polymers at an interface; a simplified view », *Advances in colloid and interface science*, vol. 27, n° 3-4, p. 189-209, 1987.
- [43] P. de Gennes, « Conformations of polymers attached to an interface », *Macromolecules*, vol. 13, n° 5, p. 1069-1075, 1980.
- [44] S. M. Moghimi et J. Szebeni, « Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties », *Progress in lipid research*, vol. 42, n° 6, p. 463-478, 2003.
- [45] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, et U. S. Schubert, « Poly (ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives », *Angewandte chemie international edition*, vol. 49, n° 36, p. 6288-6308, 2010.
- [46] M. J. Roberts, M. D. Bentley, et J. M. Harris, « Chemistry for peptide and protein PEGylation », *Advanced drug delivery reviews*, vol. 54, n° 4, p. 459-476, 2002.
- [47] S. Zalipsky, « Functionalized poly (ethylene glycols) for preparation of biologically relevant conjugates », *Bioconjugate chemistry*, vol. 6, n° 2, p. 150-165, 1995.
- [48] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, et G. M. Whitesides, « A survey of structure– property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein », *Langmuir*, vol. 17, n° 18, p. 5605-5620, 2001.
- [49] K. L. Prime et G. M. Whitesides, « Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces », *Science*, p. 1164-1167, 1991.
- [50] B. Parrish, R. B. Breitenkamp, et T. Emrick, « PEG-and peptide-grafted aliphatic polyesters by click chemistry », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, n° 20, p. 7404-7410, 2005.
- [51] L. Zerrillo *et al.*, « Novel Fluorinated Poly (Lactic-Co-Glycolic acid) (PLGA) and Polyethylene Glycol (PEG) Nanoparticles for Monitoring and Imaging in Osteoarthritis », *Pharmaceutics*, vol. 13, n° 2, p. 235, févr. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13020235.

- [52] D. M. Collard et M. A. Fox, « Use of electroactive thiols to study the formation and exchange of alkanethiol monolayers on gold », *Langmuir*, vol. 7, n° 6, p. 1192-1197, 1991.
- [53] B. C. Mei, K. Susumu, I. L. Medintz, J. B. Delehanty, T. J. Mountziaris, et H. Mattoussi, « Modular poly (ethylene glycol) ligands for biocompatible semiconductor and gold nanocrystals with extended pH and ionic stability », *Journal of Materials Chemistry*, vol. 18, n° 41, p. 4949-4958, 2008.
- [54] Z. Liu, C. Davis, W. Cai, L. He, X. Chen, et H. Dai, « Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, n° 5, p. 1410-1415, 2008.
- [55] Y. C. Hong, D. H. Shin, S. C. Cho, et H. S. Uhm, « Surface transformation of carbon nanotube powder into super-hydrophobic and measurement of wettability », *Chemical physics letters*, vol. 427, n° 4-6, p. 390-393, 2006.
- [56] B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou, et A. Libchaber, « *In vivo* imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles », *Science*, vol. 298, n° 5599, p. 1759-1762, 2002.
- [57] H.-C. Huang *et al.*, « Formulation of novel lipid-coated magnetic nanoparticles as the probe for *in vivo* imaging », *Journal of Biomedical Science*, vol. 16, n° 1, p. 1-10, 2009.
- [58] J. M. Chan *et al.*, « PLGA–lecithin–PEG core–shell nanoparticles for controlled drug delivery », *Biomaterials*, vol. 30, n° 8, p. 1627-1634, 2009.
- [59] D. Goren, A. T. Horowitz, D. Tzemach, M. Tarshish, S. Zalipsky, et A. Gabizon, « Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump », *Clinical Cancer Research*, vol. 6, n° 5, p. 1949-1957, 2000.
- [60] D. Hoarau, P. Delmas, E. Roux, et J.-C. Leroux, « Novel long-circulating lipid nanocapsules », *Pharmaceutical research*, vol. 21, n° 10, p. 1783-1789, 2004.
- [61] H. Otsuka, Y. Nagasaki, et K. Kataoka, « Self-assembly of poly(ethylene glycol)-based block copolymers for biomedical applications », *Interface Science*, p. 8, 2001.
- [62] B. Zdyrko, V. Klep, et I. Luzinov, « Synthesis and Surface Morphology of High-Density Poly(ethylene glycol) Grafted Layers », *Langmuir*, vol. 19, n° 24, p. 10179-10187, nov. 2003, doi: 10.1021/la034974r.
- [63] Y. Nagasaki, H. Kobayashi, Y. Katsuyama, T. Jomura, et T. Sakura, « Enhanced immunoresponse of antibody/mixed-PEG co-immobilized surface construction of high-performance immunomagnetic ELISA system », *Journal of colloid and interface science*, vol. 309, n° 2, p. 524-530, 2007.
- [64] O. C. Farokhzad *et al.*, « Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo* », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, n° 16, p. 6315-6320, 2006.

- [65] P. M. Winter *et al.*, « Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with $\alpha v\beta 3$ -integrin-targeted nanoparticles », *Circulation*, vol. 108, n° 18, p. 2270-2274, 2003.
- [66] S. J. DeNardo *et al.*, « Development of tumor targeting bioprobes (111In-chimeric L6 monoclonal antibody nanoparticles) for alternating magnetic field cancer therapy », *Clinical Cancer Research*, vol. 11, n° 19, p. 7087s-7092s, 2005.
- [67] R. Banerjee, P. Tyagi, S. Li, et L. Huang, « Anisamide-targeted stealth liposomes: a potent carrier for targeting doxorubicin to human prostate cancer cells », *International journal of cancer*, vol. 112, n° 4, p. 693-700, 2004.
- [68] B. R. Smith, Z. Cheng, A. De, A. L. Koh, R. Sinclair, et S. S. Gambhir, « Real-time intravital imaging of RGD- quantum dot binding to luminal endothelium in mouse tumor neovasculature », *Nano letters*, vol. 8, n° 9, p. 2599-2606, 2008.
- [69] F. Sonvico *et al.*, « Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and *in vitro* experiments », *Bioconjugate chemistry*, vol. 16, n° 5, p. 1181-1188, 2005.
- [70] A. L. Lee, Y. Wang, W.-H. Ye, H. S. Yoon, S. Y. Chan, et Y.-Y. Yang, « Efficient intracellular delivery of functional proteins using cationic polymer core/shell nanoparticles », *Biomaterials*, vol. 29, n° 9, p. 1224-1232, 2008.
- [71] B. J. Hackel, A. Kapila, et K. D. Wittrup, « Picomolar affinity fibronectin domains engineered utilizing loop length diversity, recursive mutagenesis, and loop shuffling », *Journal of molecular biology*, vol. 381, n° 5, p. 1238-1252, 2008.
- [72] L. Yang *et al.*, « Receptor-targeted nanoparticles for *in vivo* imaging of breast cancer », *Clinical cancer research*, vol. 15, n° 14, p. 4722-4732, 2009.
- [73] M. E. Davis *et al.*, « Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles », *Nature*, vol. 464, n° 7291, p. 1067-1070, 2010.
- [74] P. V. Nguyen *et al.*, « Targeted nanomedicine with anti-EGFR scFv for siRNA delivery into triple negative breast cancer cells », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 157, p. 74-84, déc. 2020, doi: 10.1016/j.ejpb.2020.10.004.
- [75] K. Yoshimoto, T. Hirase, S. Nemoto, T. Hatta, et Y. Nagasaki, « Facile construction of sulfanyl-terminated poly (ethylene glycol)-brushed layer on a gold surface for protein immobilization by the combined use of sulfanyl-ended telechelic and semitelechelic poly (ethylene glycol) s », *Langmuir*, vol. 24, n° 17, p. 9623-9629, 2008.
- [76] M. Schmidt et W. Brown, « Dynamic light scattering », *Dynamic light scattering: the method and some applications. Clarendon, Oxford*, vol. 752, 1993.

- [77] O. Garbuzenko, Y. Barenholz, et A. Prieu, « Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer », *Chemistry and physics of lipids*, vol. 135, n° 2, p. 117-129, 2005.
- [78] M. Garcia-Fuentes, D. Torres, M. Martín-Pastor, et M. J. Alonso, « Application of NMR spectroscopy to the characterization of PEG-stabilized lipid nanoparticles », *Langmuir*, vol. 20, n° 20, p. 8839-8845, 2004.
- [79] W. J. Duncanson, M. A. Figa, K. Hallock, S. Zalipsky, J. A. Hamilton, et J. Y. Wong, « Targeted binding of PLA microparticles with lipid-PEG-tethered ligands », *Biomaterials*, vol. 28, n° 33, p. 4991-4999, 2007.
- [80] V. Zabaleta, M. A. Campanero, et J. M. Irache, « An HPLC with evaporative light scattering detection method for the quantification of PEGs and Gantrez in PEGylated nanoparticles », *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 44, n° 5, p. 1072-1078, 2007.
- [81] M. E. Davis, Z. Chen, et D. M. Shin, « Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 7, n° 9, p. 771-782, sept. 2008, doi: 10.1038/nrd2614.
- [82] A. V. Boddy *et al.*, « A phase I and pharmacokinetic study of paclitaxel poliglumex (XYOTAX), investigating both 3-weekly and 2-weekly schedules », *Clinical cancer research*, vol. 11, n° 21, p. 7834-7840, 2005.
- [83] D. E. Owens III et N. A. Peppas, « Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles », *International journal of pharmaceuticals*, vol. 307, n° 1, p. 93-102, 2006.
- [84] Y. Zhang *et al.*, « Co-delivery of doxorubicin and curcumin by pH-sensitive prodrug nanoparticle for combination therapy of cancer », *Scientific reports*, vol. 6, n° 1, p. 1-12, 2016.
- [85] T. Yamaoka, Y. Tabata, et Y. Ikada, « Distribution and tissue uptake of poly (ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice », *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 83, n° 4, p. 601-606, 1994.
- [86] T. Yang *et al.*, « Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: *in vitro* and *in vivo* evaluation », *International journal of Pharmaceuticals*, vol. 338, n° 1-2, p. 317-326, 2007.
- [87] Z. Hu *et al.*, « Arg-Gly-Asp (RGD) peptide conjugated poly (lactic acid)-poly (ethylene oxide) micelle for targeted drug delivery », *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of the Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol. 85, n° 3, p. 797-807, 2008.
- [88] M. N. Khalid, P. Simard, D. Hoarau, A. Dragomir, et J.-C. Leroux, « Long circulating poly (ethylene glycol)-decorated lipid nanocapsules deliver docetaxel to solid tumors », *Pharmaceutical research*, vol. 23, n° 4, p. 752-758, 2006.

- [89] G. Mattheolabakis, E. Taoufik, S. Haralambous, M. L. Roberts, et K. Avgoustakis, « *In vivo* investigation of tolerance and antitumor activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 71, n° 2, p. 190-195, 2009.
- [90] H.-J. Cho *et al.*, « Polyethylene glycol-conjugated hyaluronic acid-ceramide self-assembled nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin », *Biomaterials*, vol. 33, n° 4, p. 1190-1200, 2012.
- [91] T. Ramasamy *et al.*, « Layer-by-layer assembly of liposomal nanoparticles with PEGylated polyelectrolytes enhances systemic delivery of multiple anticancer drugs », *Acta biomaterialia*, vol. 10, n° 12, p. 5116-5127, 2014.
- [92] Y. Akiyama, T. Mori, Y. Katayama, et T. Niidome, « The effects of PEG grafting level and injection dose on gold nanorod biodistribution in the tumor-bearing mice », *Journal of Controlled Release*, vol. 139, n° 1, p. 81-84, 2009.
- [93] T. Okuda, S. Kawakami, N. Akimoto, T. Niidome, F. Yamashita, et M. Hashida, « PEGylated lysine dendrimers for tumor-selective targeting after intravenous injection in tumor-bearing mice », *Journal of controlled release*, vol. 116, n° 3, p. 330-336, 2006.
- [94] A. S. A. Lila, Y. Doi, K. Nakamura, T. Ishida, et H. Kiwada, « Sequential administration with oxaliplatin-containing PEG-coated cationic liposomes promotes a significant delivery of subsequent dose into murine solid tumor », *Journal of Controlled Release*, vol. 142, n° 2, p. 167-173, 2010.
- [95] T.-H. Kim, C. W. Mount, W. R. Gombotz, et S. H. Pun, « The delivery of doxorubicin to 3-D multicellular spheroids and tumors in a murine xenograft model using tumor-penetrating triblock polymeric micelles », *Biomaterials*, vol. 31, n° 28, p. 7386-7397, 2010.
- [96] J. Cheng *et al.*, « Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for *in vivo* targeted drug delivery », *Biomaterials*, vol. 28, n° 5, p. 869-876, 2007.
- [97] Y. Matsumura *et al.*, « Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin », *British journal of cancer*, vol. 91, n° 10, p. 1775-1781, 2004.
- [98] N. Seetharamu, E. Kim, H. Hochster, F. Martin, et F. Muggia, « Phase II study of liposomal cisplatin (SPI-77) in platinum-sensitive recurrences of ovarian cancer », *Anticancer research*, vol. 30, n° 2, p. 541-545, 2010.
- [99] T. Boulikas, « Clinical overview on LipoplatinTM: a successful liposomal formulation of cisplatin », *Expert opinion on investigational drugs*, vol. 18, n° 8, p. 1197-1218, 2009.
- [100] R.-D. Hofheinz, S. U. Gnad-Vogt, U. Beyer, et A. Hochhaus, « Liposomal encapsulated anti-cancer drugs », *Anti-cancer drugs*, vol. 16, n° 7, p. 691-707, 2005.

- [101] F. Danhier, O. Feron, et V. Pr at, « To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery », *Journal of Controlled Release*, vol. 148, n  2, p. 135-146, d c. 2010, doi: 10.1016/j.jconrel.2010.08.027.
- [102] M. E. Werner *et al.*, « Preclinical evaluation of Genexol-PM, a nanoparticle formulation of paclitaxel, as a novel radiosensitizer for the treatment of non-small cell lung cancer », *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, vol. 86, n  3, p. 463-468, 2013.
- [103] T.-Y. Kim *et al.*, « Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies », *Clinical cancer research*, vol. 10, n  11, p. 3708-3716, 2004.
- [104] P. Ma et R. J. Mumper, « Paclitaxel nano-delivery systems: a comprehensive review », *Journal of nanomedicine & nanotechnology*, vol. 4, n  2, p. 1000164, 2013.
- [105] T. Wang *et al.*, « Paclitaxel-loaded PEG-PE-based micellar nanopreparations targeted with tumor-specific landscape phage fusion protein enhance apoptosis and efficiently reduce tumors », *Molecular cancer therapeutics*, vol. 13, n  12, p. 2864-2875, 2014.
- [106] J. Turkevich, P. C. Stevenson, et J. Hillier, « A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold », *Discussions of the Faraday Society*, vol. 11, p. 55-75, 1951.
- [107] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin, et C. Kiely, « Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles », *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n  16, p. 1655-1656, 1995.
- [108] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, et R. Whyman, « Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system », *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n  7, p. 801-802, 1994.
- [109] G. Laurent *et al.*, « Minor changes in the macrocyclic ligands but major consequences on the efficiency of gold nanoparticles designed for radiosensitization », *Nanoscale*, vol. 8, n  23, p. 12054-12065, 2016, doi: 10.1039/C6NR01228K.
- [110] P.-J. Deboutti re *et al.*, « Design of gold nanoparticles for magnetic resonance imaging », *Advanced Functional Materials*, vol. 16, n  18, p. 2330-2339, 2006.
- [111] S. Roux *et al.*, « Synthesis, characterization of dihydrolipoic acid capped gold nanoparticles, and functionalization by the electroluminescent luminol », *Langmuir*, vol. 21, n  6, p. 2526-2536, 2005.
- [112] Z. Li, R. Jin, C. A. Mirkin, et R. L. Letsinger, « Multiple thiol-anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates », *Nucleic acids research*, vol. 30, n  7, p. 1558-1562, 2002.
- [113] B. Garcia *et al.*, « Sulfur K-edge XANES study of dihydrolipoic acid capped gold nanoparticles: dihydrolipoic acid is bound by both sulfur ends », *Chemical communications*, n  3, p. 369-371, 2005.

- [114] W. Haiss, N. T. Thanh, J. Aveyard, et D. G. Fernig, « Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV– Vis spectra », *Analytical chemistry*, vol. 79, n° 11, p. 4215-4221, 2007.
- [115] S. Link et M. A. El-Sayed, « Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles », *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 103, n° 21, p. 4212-4217, 1999.
- [116] A. Nicolas-Boluda, G. Laurent, R. Bazzi, S. Roux, E. Donnadieu, et F. Gazeau, « Two step promotion of a hot tumor immune environment by gold decorated iron oxide nanoflowers and light-triggered mild hyperthermia », *Nanoscale*, vol. 13, n° 44, p. 18483-18497, 2021, doi: 10.1039/D1NR03201A.

CHAPITRE III

Nanofleur d'oxyde de fer : Transporteur prometteur de nanoparticules d'or

Table des matières

1. Nanotransporteur : stratégie intéressante ?	209
2. Nanofleurs	210
2.1. Propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer	211
2.2. Biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer	211
2.3. Contexte de l'étude	212
3. Synthèse des nanoparticules	213
3.1. Synthèse des Au@(TADOTAGA) _{2x} (TA[NODAGA-lys-NH ₂]) _x	213
3.1.1. Ligands macrocycliques	213
3.1.2. Protocole de synthèse des nanoparticules d'or	214
3.2. Synthèse des nanofleurs γ -Fe ₂ O ₃	215
3.3. Formulation des nanofleurs dorées	217
3.4. Greffage du peptide sur les nanoparticules	220
3.4.1. Greffage du peptide VG-196 sur les nanoparticules d'or	221
3.4.2. Greffage sur les nanofleurs dorées	222
3.5. Complexation	222
3.5.1. Complexation du gadolinium	222
3.5.2. Complexation du cuivre	222
4. Caractérisation des nanoparticules d'or et des nanofleurs dorées	223
4.1. Spectrophotométrie UV-Visible	223
4.2. Dosage par ICP-OES	223
4.3. Microscopie électronique à transmission	224
4.4. Mesure du diamètre hydrodynamique et du potentiel Zêta	224
4.5. Lyophilisation	224
4.6. ATG	224

5.	Résultats de la caractérisation des différentes nanoparticules	225
6.	Biodistribution des différents types de nanoparticules administrées à des souris saines	237
6.1.	Protocole	237
6.1.1.	Animaux	237
6.1.2.	IRM/TEP	237
6.1.3.	Analyse <i>ex vivo</i> de la biodistribution	238
6.1.4.	Analyse ICP-OES	238
6.2.	Résultats et discussion	239
7.	Biodistribution des différents types de nanoparticules administrées à des souris malades	247
7.1.	Protocole	247
7.1.1.	Animaux	247
7.1.2.	Imagerie simultanée IRM/TEP	248
7.1.3.	Comptage γ <i>post mortem</i> des organes	248
7.1.4.	Analyses ICP-OES	248
7.2.	Résultats et discussion	249
8.	Conclusion	254
9.	Références	257

Table des Figures

Figure 3-1 : Formules topologiques des différents chélateurs, (a) TA(NODAGA-lys-NH ₂) et (b) TADOTAGA	214
Figure 3-2 : Schéma de la synthèse des nanofleurs de maghémite (γ -Fe ₂ O ₃)	216
Figure 3-3 : Variation de la température (°C) dans le milieu réactionnel en fonction du temps (min)	216
Figure 3-4 : Évolution du potentiel Zêta en fonction du pH des suspensions colloïdales de nanofleurs de maghémite.	218
Figure 3-5: Formule topologique de la dopamine	218
Figure 3-6 : Formule topologique de l'acide hydrocaféique	219
Figure 3-7 : Formules topologiques de l'EDC et du NHS.	219
Figure 3-8 : Formule topologique de la tétrazine Tz-COOH	220
Figure 3-9 : Formule topologique du peptide de ciblage nommé VG-196 (C ₇₃ H ₁₁₄ N ₂₄ O ₂₀ S)	221
Figure 4-1 : Evolution programmée de la température au cours du traitement thermique de l'ATG	225
Figure 5-1 : Spectre UV-Visible entre 400 et 800 nm des suspensions de nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA) _{2x} (TA[NODAGA-lys-NH ₂]) _x avec et sans peptide à deux temps différents	226
Figure 5-2 : Clichés TEM des différents types des nanoparticules d'or. (A) NPs-Au : Au@(TADOTAGA) _{2x} (TA[NODAGA-lys-NH ₂]) _x et (B) NPs-Au-pep : Au@(TADOTAGA) _{2x} (TA[NODAGA-lys-NH ₂]) _{0,7x} (TA[NODAGA-lys-VG169]) _{0,3x}	227
Figure 5-3 : Spectres UV-Visible des suspensions de nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA) _{2x} (TA[NODAGA-lys-NH ₂]) _x (a) sans peptide et (b) avec peptide à différents pH.	228
Figure 5-4 : Evolution du potentiel Zêta en fonction du pH des suspensions colloïdales de nanoparticules d'or avec et sans peptide	229
Figure 5-5 : Courbes d'analyse thermogravimétrique de poudres de nanoparticules d'or sans peptide (a) et avec peptide (b)	230
Figure 5-6 : Clichés TEM des différents types de nanofleurs et nanofleurs dorées. (A) NF : nanofleurs de maghémite (barre d'échelle : 200 nm), (B) NF-Au : nanofleurs décorées par les nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA) _{2x} (TA[NODAGA-lys-NH ₂]) _x et (C) NF-Au-pep : nanofleurs décorées par les nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA) _{2x} (TA[NODAGA-lys-NH ₂]) _x fonctionnalisées par le peptide (barre d'échelle pour B et C : 20 nm).	232
Figure 5-7 : Clichés STEM des différents types des nanofleurs dorées. (A) NF-Au et (B) NF-Au-pep (barre d'échelle 50 nm).	233
Figure 5-8 : Spectres UV-Visible entre 400 et 800 nm des suspensions de nanofleurs dorées sans peptide à deux temps différents à pH physiologique	235
Figure 5-9 : Courbes du potentiel Zêta des nanofleurs, des nanofleurs dorées avec et sans peptides en fonction du pH des suspensions colloïdales	236

Figure 6-1 : Images IRM (T_1) centrées sur le foie et les reins et acquises 1 h et 24 h après injection intraveineuse des nanoparticules d'or avec et sans peptide (NPs-Au et NPs-Au-pep) à des souris saines	239
Figure 6-2 : Images IRM (T_2) centrées sur le foie et les reins et acquises 1 h et 24 h après injection intraveineuse des nanofleurs dorées avec et sans peptide (NF-Au et NF-Au-pep) à des souris saines.	240
Figure 6-3 : Images IRM/TEP acquises 1 h et 24 h après injection intraveineuse des nanoparticules à des souris saines.	241
Figure 6-4 : Le pourcentage moyen de dose injectée (%ID) par comptage gamma des différentes nanoparticules en fonction des organes 1 heure et 20 heures après injection intraveineuse, (a) échelle complète et (b) agrandissement d'échelle	242
Figure 6-5 : Le pourcentage moyen de dose injecté par gramme d'organe (%ID/g) par comptage gamma des différents nanoparticules 1 heure et 20 heures après injection intraveineuse (a) échelle complète et (b) agrandissement d'échelle	243
Figure 6-6 : Le pourcentage moyen de dose injecté (%ID) par ICP des différents types de nanoparticules en fonction des organes 1 heure et 20 heures après injection intraveineuse (a) échelle complète et (b) agrandissement d'échelle	245
Figure 6-7 : Le pourcentage moyen de dose injecté par gramme d'organes (%ID/g) par ICP des différents types de nanoparticules 1 heure et 20 heures après injection intraveineuse (a) échelle complète et (b) agrandissement d'échelle	246
Figure 6-8 : Le pourcentage moyen de dose de nanoparticules injecté éliminé de l'organisme 1 h, 24 h et 120 h après injection intraveineuse des suspensions de nanoparticules d'or avec et sans peptide et des nanofleurs dorées avec et sans peptide	247
Figure 7-1 : Comparaison des images obtenues 1 h après injection intraveineuse des différents nanoparticules dans des souris malades	250
Figure 7-2 : La biodistribution des différents types de nanoparticules 24 h après injection intraveineuse à des souris porteuses de plaques d'athérosclérose par comptage gamma, (a) pourcentage moyen de dose injectée (%ID), (b) pourcentage moyen de dose injectée par gramme d'organe (%ID/g)	251
Figure 7-3 : La biodistribution des différents types de nanoparticules 24 h après injection intraveineuse à des souris porteuses de plaques d'athérosclérose par ICP-OES (a) pourcentage moyen de dose d'or injectée (%ID) et (b) pourcentage moyen de dose d'or injectée par gramme de tissu (%ID/g)	252
Figure 7-4 : Pourcentages moyens d'élimination des différentes nanoparticules 24 h après injection intraveineuse des suspensions de nanoparticules d'or avec et sans peptide et de nanofleurs dorées avec et sans peptide à des souris porteuses de plaques d'athérosclérose.	253
Figure 7-5 : Microscopie optique et autoradiographie de la crosse aortique des souris porteuse de plaques d'athérosclérose	254

Table des Tableaux

Tableau 2-1 : Répartition du fer dans l'organisme humain	212
Tableau 5-1 : Diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or avec et sans peptide, des nanofleurs et des nanofleurs dorées avec et sans peptide.	234

CHAPITRE III

Nanofleur d'oxyde de fer : Transporteur prometteur de nanoparticules d'or

1. Nanotransporteur : stratégie intéressante ?

L'équipe NCM a développé des nanoparticules d'or radiosensibilisantes pour la radiothérapie guidée par imagerie.[1]–[5] Ces nanoparticules d'or sont constituées d'un cœur d'or de taille contrôlée et réduite (< 5 nm) enrobée d'une couche organique constituée de chélateurs capables d'immobiliser des ions d'intérêt pour l'imagerie. Le diamètre hydrodynamique (D_h) de ces nanoparticules qui représente son encombrement réel dans un milieu donné est inférieur à 10 nm. Cette faible valeur est compatible avec l'élimination rénale de ces nanoparticules. Si l'élimination rénale est la voie d'élimination qui doit être favorisée dans le cas de nanoparticules non biodégradables, elle est cependant trop rapide dans le cas des nanoparticules d'or recouvertes de chélateurs (Au@DTDTPA, Au@TADOTAGA).[2], [3], [5], [6] Par conséquent, les nanoparticules n'ont que peu de temps pour s'accumuler en quantité suffisante dans la zone ciblée. La clairance rénale rapide constitue une pierre d'achoppement pour exploiter pleinement le potentiel thérapeutique de ces nanoparticules.

L'objectif de cette thèse consiste à développer des stratégies destinées à ralentir l'élimination rénale des nanoparticules d'or sans modifier la taille du cœur d'or. Le remplacement des chélateurs par des chélateurs possédant le même site de complexation (macrocycle de type DOTAGA) mais PEGylés a un impact sur le temps de circulation et sur la vitesse d'élimination lorsque la chaîne de PEG est suffisamment longue (chapitre 2). La deuxième stratégie qui a été explorée pour retarder l'élimination rénale repose sur le greffage des nanoparticules d'or sur des transporteurs biodégradables beaucoup plus larges que les nanoparticules d'or.

Les transporteurs biodégradables peuvent être créés de diverses manières, notamment en encapsulant des nanoparticules ou en les greffant sur un élément de plus grande taille. L'encapsulation des nanoparticules pose un certain nombre de problèmes. Les nanoparticules d'or Au@DTDTPA (qui sont hydrophiles) peuvent être incompatibles avec certaines méthodes d'encapsulation puisque la plupart des objets développés pour l'encapsulation ont une cavité hydrophobe. En outre, l'efficacité des nanoparticules radiosensibilisantes risque d'être limitée en raison de leur encapsulation. Si le rayonnement incident peut traverser l'enveloppe de ces « capsules » pour activer l'effet thérapeutique des nanoparticules d'or, les électrons et les photons produits par l'interaction or/rayons X ont une forte probabilité d'être absorbés par les composants de la capsule, ce qui limite la formation d'espèces réactives cytotoxiques et donc l'effet radiosensibilisant des nanoparticules.

Pour contourner les inconvénients de l'encapsulation, nous cherchons à greffer les nanoparticules d'or à la surface de nano-objets plus grands et biodégradables. Pour cela, nous avons sélectionné des nanofleurs d'oxyde de fer (maghémite, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) aux propriétés magnétiques qui peuvent être utilisées, entre autres, pour suivre la biodistribution et la biodégradation de ces nanofleurs par IRM (T_2).

2. Nanofleurs

Les caractéristiques magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer sont particulièrement fascinantes pour les applications d'imagerie (IRM) et thérapeutiques (hyperthermie magnétique). En outre, si la couche de surface organique est conçue de manière appropriée, ces matériaux sont biodégradables. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont de bons candidats pour la thérapie guidée par l'imagerie car leurs propriétés magnétiques leur confèrent un comportement d'agents de contraste négatif pour l'IRM et d'agents chauffants pour l'hyperthermie magnétique.

Les nanoparticules d'oxyde de fer dont le terme recouvre en fait une immense variété d'objets sont présentées dans la littérature sous différentes formes et tailles (voir page 86 paragraphe 4.5). Notre choix concernant des transporteurs biodégradables à base d'oxyde de fer s'est porté sur les nanofleurs de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) développées par le Dr Rana Bazzi car elles se distinguent par leurs propriétés magnétiques, qui leur confèrent un pouvoir chauffant plus important et un effet plus significatif sur le contraste négatif des images IRM. L'hyperthermie et l'imagerie par résonance magnétique pourraient être utilisées avec ces nanoparticules pour créer des agent théranostiques.

Les nanofleurs sont constituées d'un assemblage tridimensionnel de nanoparticules quasi sphériques de maghémite. Les études réalisées par l'équipe en collaboration avec celle de Dr Florence Gazeau (MSC, Paris Diderot) ont montré qu'une telle architecture renforçait la susceptibilité magnétique tout en réduisant la surface exposée au milieu (par rapport aux grains individuels). En même temps, cette construction préserve le superparamagnétisme et améliore le contraste négatif en IRM.[7] Un des résultats majeurs de ces études est d'avoir mis en évidence la biodégradation de ces nanofleurs. Bien qu'elle limite le suivi IRM des nanoparticules d'oxyde de fer dans le temps, la biodégradation peut être considérée comme un avantage lorsque les nanofleurs sont utilisées comme vecteurs de composés d'imagerie et/ou thérapeutiques. Cette biodégradabilité, combinée à la capacité des nanofleurs à agir comme agents de contraste négatif en IRM et comme éléments chauffants en hyperthermie magnétique rend ces nanoparticules très intéressantes pour prolonger la période de circulation des nanoparticules d'or radiosensibilisantes. En effet, la taille des nanofleurs peut être ajustée pour empêcher la clairance rénale et l'opsonisation, assurant ainsi un temps de circulation suffisamment long pour favoriser l'accumulation dans la zone désirée. Cela correspond à une gamme de taille de 10-50 nm, selon la littérature. Les nanoparticules plus petites pourraient être éliminées par les reins, mais celles de plus de 50 nm auraient plus de chance d'être capturées par les macrophages résidents du foie et les cellules de la rate (opsonisation). En modifiant le mode de chauffage, il est possible de contrôler la taille des nanofleurs dans une plage de 25 nm à 120 nm [8] Nous avons choisi une taille de nanofleur entre 25 et 30 nm en nous basant sur les données de la littérature concernant la biodistribution

des nanoparticules. Cette gamme de taille semble être un bon choix pour une application *in vivo* : les nanoparticules sont suffisamment grandes pour éviter une clairance rénale trop rapide sans être trop grandes pour favoriser une opsonisation non désirée. Une augmentation du temps de circulation après injection intraveineuse est susceptible de favoriser l'accumulation de nanoparticules d'or dans les zones d'intérêt pour cette gamme de taille. L'élimination des nanoparticules d'or par la voie rénale devrait toujours être réalisable en raison de la nature biodégradable des nanofleurs, elle sera simplement reportée.

2.1. Propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer

La maghémite est constituée d'ions de fer (III) (Fe^{3+}) et d'ions de l'oxygène (O^{2-}). Elle possède un moment magnétique attribué à sa structure spinelle inverse. Cette structure lui confère un moment magnétique permanent, qui est la somme des moments magnétiques élémentaires électroniques. Les nanoparticules de moins de 20 nm peuvent être comparées à des monodomains magnétiques, ou à de minuscules aimants.

Lorsqu'aucun champ magnétique n'est appliqué à ces particules, leurs moments magnétiques sont orientés de manière aléatoire, et le moment magnétique global est nul. Lorsqu'un champ magnétique permanent B_0 est appliqué, le moment magnétique de chaque particule est orienté dans la même direction que B_0 . Lorsque le champ B_0 est supprimé, les nanoparticules reviennent à leur état initial. Les nanoparticules sont alors appelées nanoparticules superparamagnétiques (c'est-à-dire que l'aimantation de l'échantillon dépend du champ externe appliqué mais pas de l'état d'aimantation précédent). Ces propriétés magnétiques peuvent être utilisées pour créer des objets multifonctionnels de détection et de thérapie. Leur utilisation en hyperthermie magnétique et comme agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique a été décrite dans le chapitre 1 (4.5.1).

2.2. Biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer

Chez l'homme, le fer est un élément présent à l'état naturel. Le fer peut être trouvé sous plusieurs formes dans les tissus humains, principalement sous forme de protéines ou de pigments :

- L'hémosidérine est un pigment insoluble présent dans le cytoplasme des macrophages, bien qu'on puisse également le trouver dans les hépatocytes et d'autres cellules épithéliales spécialisées du corps humain ;
- La ferritine est une protéine qui permet de stocker le fer. Cette protéine contrôle l'absorption et la libération du fer dans l'organisme pour le maintenir en quantité adéquate ;
- La transferrine est une protéine qui se lie au fer dans le côlon et le transporte vers le foie et les globules rouges jeunes ;
- L'hémoglobine est une protéine qui transporte l'oxygène des poumons vers les tissus tout en transportant le dioxyde de carbone vers les poumons ;

C'est le foie qui stocke le plus de fer ; cet organe riche en fer contient environ 0,2 mg de fer par gramme. La distribution du fer sous ces différentes formes est présentée dans le Tableau 2-1. La quantité de fer nécessaire pour l'imagerie médicale se situe actuellement entre 0,05 et 0,2 g, ce qui représente une quantité

très faible par rapport à la quantité de fer présente dans notre organisme. Le fer devient toxique uniquement quand la quantité administrée est supérieure à 0,004 g Fe/g. Pour un individu d'environ 80 kg cela correspond à un apport d'environ 320 g de fer (beaucoup plus élevé que la dose maximale administrée actuellement en clinique). [9]

	Homme de 70 kg	Femme de 60 kg
Fer actif		
- Hémoglobine (70% du fer)	3 g	2,5 g
- Myoglobine (6% du fer)	0,3 g	0,2 g
- Enzymes et cytochromes	0,3 g	0,3 g
Transport Plasmatique : transferrine	4 mg	4 mg
Stockage : ferritine + hémosidérine	0,8 – 1 g	0,4 – 0,5 g
Total du fer	50 – 60 mg/kg	40 – 50 mg/kg

Tableau 2-1 : Répartition du fer dans l'organisme humain

Les nanoparticules d'oxyde de fer qui composent les nanofleurs sont biocompatibles et peuvent être dispersées dans un milieu physiologique. Ces deux caractéristiques permettent d'envisager l'utilisation de leurs propriétés physico-chimiques dans des applications médicales. Des études *in vitro* ont démontré que lorsque ces nanofleurs sont incubées avec des cellules tumorales MCF-7, elles sont rapidement absorbées. D'après les études TEM, elles se retrouvent dans les endosomes et les lysosomes cellulaires après leur internalisation. Les nanofleurs sont détruites dans ces organites par une combinaison de pH acide (environ 4,7), d'enzymes digestives et de chélateurs de fer qui aident à réguler les niveaux de fer dans l'organisme. Il a récemment été démontré que les protéines de ferritine pouvaient capter le fer des nanoparticules. Le potentiel exceptionnel des nanoparticules pour l'hyperthermie et le suivi par IRM est restreint par cette dégradation. Il a été proposé d'enfermer les nanofleurs dans une coque en or pour les empêcher d'être détruites trop rapidement dans les lysosomes.[10]

2.3. Contexte de l'étude

Ce travail s'est inscrit dans le cadre du projet CARGOLD. Ce projet consistait à développer une nouvelle sonde multimodale pour l'imagerie simultanée IRM/TEP afin de détecter et traiter les plaques d'athérosclérose. Des travaux antérieurs menés dans l'équipe NCM ont permis de développer des nanoparticules d'or recouvertes d'une couche organique constituée de deux chélateurs différents.[11] Ces chélateurs sont capables de complexer des ions d'intérêt pour l'imagerie médicale comme le gadolinium pour l'IRM et les radioéléments (le cuivre-64 ou le galium-68) pour la TEP. Dans ce chapitre, le type de nanoparticules choisi pour cette étude est $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2x}\text{(TA[NODAGA-lys-NH}_2\text{])}_x$. Ces nanoparticules d'or comme toutes les autres nanoparticules d'or développées au sein de notre équipe possèdent un diamètre hydrodynamique inférieur à 10 nm. Les caractéristiques physico-chimiques de ces nanoparticules d'or non biodégradables (D_h , ζ , caractère hydrophile) garantissent leur élimination par la voie rénale qui est un prérequis nécessaire pour leur utilisation *in vivo*. La rapidité de cette élimination

rénale minimise l'exploitation des propriétés de ces nanoparticules comme agent théranostique. Afin de permettre aux nanoparticules d'or de circuler plus longtemps dans l'organisme, nous proposons dans cette étude de greffer ces nanoparticules d'or $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{2x} (\text{TA}[\text{NODAGA-lys-NH}_2])_x$ à la surface des nanofleurs d'oxyde de fer. Ces nanofleurs jouent le rôle de transporteurs biodégradables des nanoparticules d'or. La couche de nanoparticules d'or devrait permettre en retour de ralentir la destruction des nanofleurs à la suite de l'internalisation cellulaire tout en permettant d'exploiter l'action radiosensibilisante des nanoparticules d'or.

3. Synthèse des nanoparticules

3.1. Synthèse des $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{2x} (\text{TA}[\text{NODAGA-lys-NH}_2])_x$

3.1.1. Ligands macrocycliques

Les nanoparticules d'or qui seront formulées pour cette partie, comme déjà mentionné, seront formées d'une couche organique mixte. Pour avoir une phase organique mixte, deux molécules organiques différentes ont été développées au laboratoire ICMUB dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Pr. Franck Denat. Les deux molécules synthétisées sont le TADOTAGA et le TA(NODAGA-lys-NH₂) (Figure 3-1). Le chélateur TADOTAGA est une molécule bifonctionnelle : la première extrémité qui dérive de l'acide thioctique (TA) joue le rôle du site d'accrochage de la molécule sur les nanoparticules d'or et la deuxième extrémité est constitué du macrocycle DOTAGA qui joue le rôle du site de complexation des ions gadolinium pour l'IRM à contraste positif. La molécule TA(NODAGA-lys-NH₂) est trifonctionnelle : la première fonction est le site d'accrochage aux nanoparticules d'or (TA), la deuxième est le chélateur macrocyclique (NODAGA) destiné à immobiliser des émetteurs β^+ comme $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ et $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ pour la TEP et le troisième est une fonction amine primaire (NH₂) réactive. Le rôle de cette fonction amine libre est essentielle pour la post-fonctionnalisation des nanoparticules d'or recouvertes de ces molécules. Elle servira de site de greffage pour différents types de molécules tout en préservant le pouvoir complexant des chélateurs. Comme nous souhaitons réaliser simultanément de l'IRM et de l'imagerie nucléaire TEP, le premier macrocycle choisi est le DOTAGA pour complexer le gadolinium (Gd^{3+}) pour l'IRM et deuxième macrocycle choisi est le NODAGA pour complexer le cuivre-64 ($[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$) pour l'imagerie TEP. Les ions $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ forment des complexes stables avec les dérivés NODAGA. Le site d'accrochage choisi, comme déjà expliqué, est l'acide thioctique TA.[4], [12]–[15]

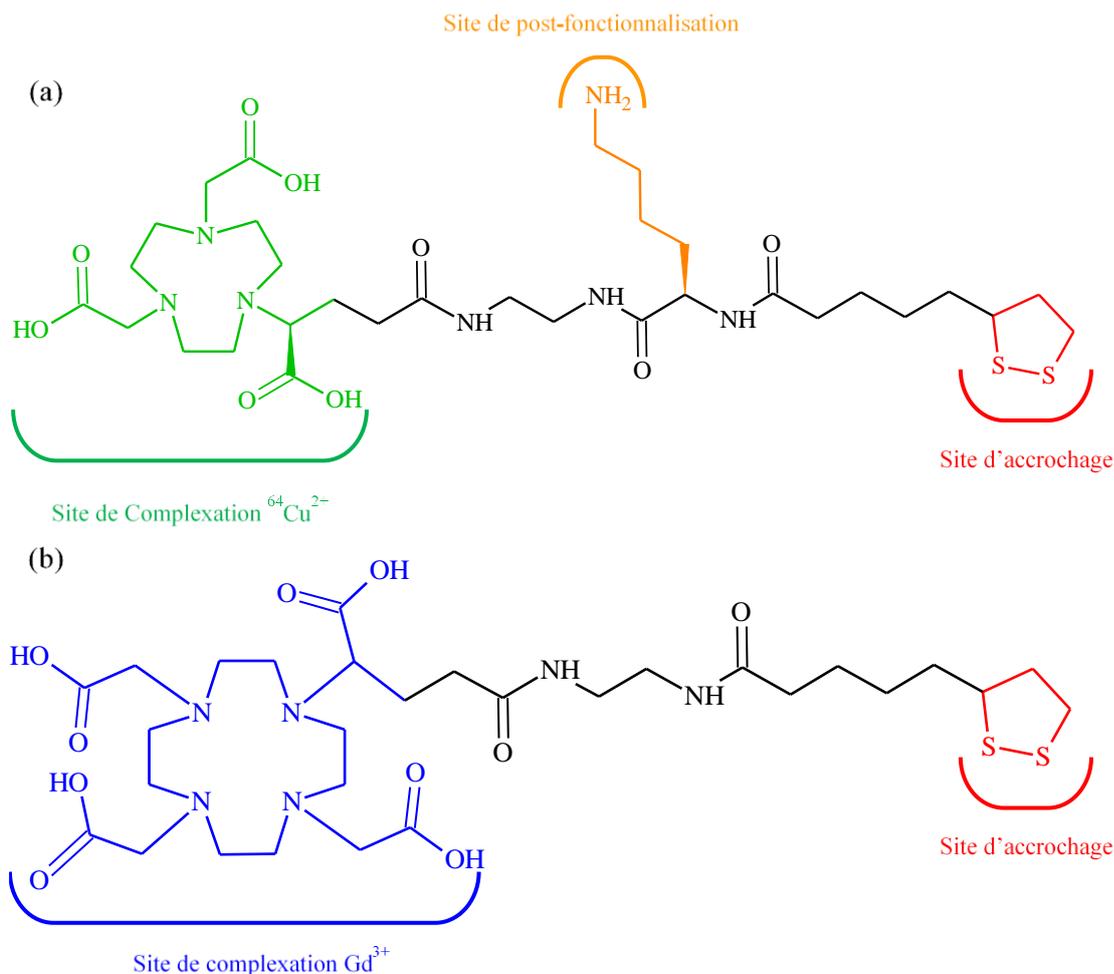


Figure 3-1 : Formules topologiques des différents chélateurs, (a) TA(NODAGA-lys-NH₂) et (b) TADOTAGA

3.1.2. Protocole de synthèse des nanoparticules d'or

La synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par une couche organique composée d'un mélange de chélateurs a été réalisée selon la méthode de Brust.[16] Comme déjà décrit dans le chapitre précédent, cette méthode consiste à réduire un sel d'or en présence d'un réducteur et de molécules organosoufrées. Ces dernières assurent le contrôle de la nucléation, la croissance et donc la taille des nanoparticules. Elles jouent également un rôle essentiel dans la stabilité colloïdale des nanoparticules synthétisées. Pour garantir l'immobilisation de Gd^{3+} et de $^{64}\text{Cu}\text{Cu}^{2+}$ (ou $^{68}\text{Ga}\text{Ga}^{3+}$) dans la même couche organique les nanoparticules d'or devront être recouvertes par deux macrocycles différents. Ainsi les nanoparticules obtenues, $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2x}\text{(TA[NODAGA-lys-NH}_2\text{])}_x$, seront formées d'un cœur d'or sphérique recouvert d'une couche organique mixte.

Dans un ballon monocol de 250 mL, l'acide tétrachloroaurique $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($4,9 \times 10^{-4}$ mol, 192 mg) est dissous dans le méthanol (60 mL) sous agitation magnétique. Cette solution est de couleur jaune. Le ligand TADOTAGA ($3,3 \times 10^{-4}$ mol) et le ligand TA(NODAGA-lys-NH₂) ($1,6 \times 10^{-4}$ mol) sont dissous dans l'eau distillée (38 mL) puis ajoutés à la solution d'or sous agitation magnétique. La couleur de la

solution devient jaune orangé. Avant la réduction, le mélange est acidifié en ajoutant de l'acide acétique ($3,5 \times 10^{-2}$ mol). L'acidification est nécessaire pour éviter la compétition entre les atomes de soufre de TA et d'azote de la fonction NH_2 pour l'accrochage sur les cœurs d'or. Enfin, le réducteur, le tétrahydroborate de sodium NaBH_4 ($4,9 \times 10^{-3}$ mol, 182 mg) dans l'eau (13 mL) est ajouté en deux fois sous agitation magnétique. La solution devient noire instantanément. Cette couleur est une des caractéristiques de la réduction de l' $\text{Au}^{(\text{III})}$ à $\text{Au}^{(0)}$. Lors de l'ajout, un dégagement de gaz de dihydrogène est remarqué. La solution reste une heure sous agitation continue.

La solution présente un excès de ligands non accrochés et du méthanol. Les excès doivent être éliminés pour pouvoir utiliser les nanoparticules d'or pour des injections *in vivo*. Pour cela une purification est nécessaire.

La dialyse est une méthode de purification reposant sur le principe de l'osmose. La solution à purifier, le dialysat, est introduit dans un boudin de dialyse qui est une membrane semi-perméable. Ce boudin est immergé dans une solution, le contre dialysat. Un échange de molécules entre le dialysat et le contre dialysat par diffusion est provoqué par la différence de concentration entre le dialysat et le contre dialysat afin de parvenir à l'équilibre. La taille de pores de la membrane doit être bien adapté pour faire passer les chélateurs en excès (non immobilisés sur les nanoparticules) et ne pas laisser passer les nanoparticules d'or. Le boudin de dialyse est composé d'une membrane dont les pores présentent un seuil de coupure compris entre 6 et 8 kDa. Le boudin qui contient environ 100 mL d'une suspension colloïdale de nanoparticules est immergé dans 2 litres d'eau distillée sous agitation modérée pendant 72 heures. Le contre-dialysat est changé 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, et 60 heures après le début de la dialyse. Ce changement est nécessaire pour conserver une importante différence de concentration et ainsi maintenir l'échange.

Après la dialyse, les nanoparticules d'or diluées sont concentrées par centrifugation en utilisant des tubes à ultrafiltration (Vivaspin[®] de 10 KDa) à 1500 tr/min. La solution colloïdale finale d'or obtenue a une concentration de 10 g/L en or.

3.2. Synthèse des nanofleurs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Trois étapes sont nécessaires pour fabriquer des nanofleurs d'oxyde de fer ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). La première étape consiste à faire réagir des sels ferriques et ferreux (rapport molaire $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} = 2$) avec une solution d'hydroxyde de sodium dans un mélange équimolaire de deux solvants polyols, le diéthylène glycol (DEG) et la N-méthyl-diéthanolamine (NMDEA). Différents lavages sont utilisés dans la deuxième étape pour recueillir les nanofleurs de magnétite (Fe_3O_4). Pour obtenir les nanofleurs de maghémite, les nanofleurs de magnétite sont traités avec du nitrate de fer et chauffés à haute température (80°C) dans la troisième étape.

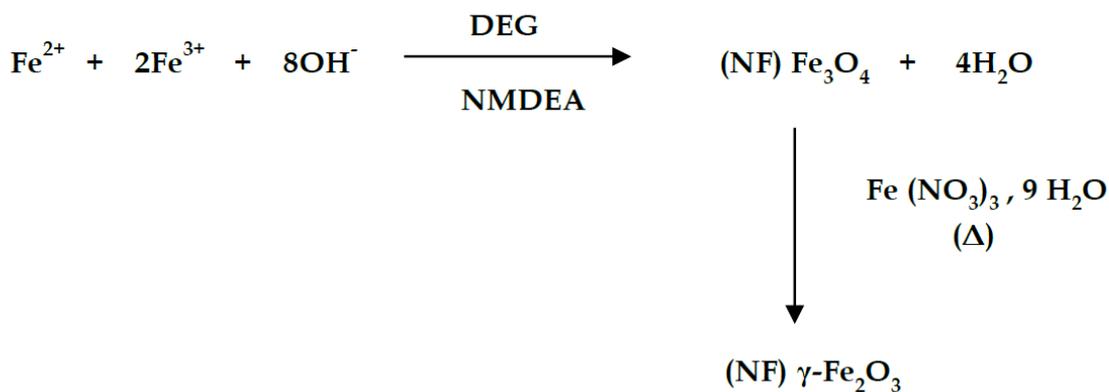


Figure 3-2 : Schéma de la synthèse des nanofleurs de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)

Une quantité d'hydroxyde de sodium NaOH (0,16 mol) est dissoute dans du diéthylène glycol (180 mL) dans une bouteille de 250 mL (S₁) deux jours avant de lancer la synthèse. Dans un ballon monocol de 500 mL lavé au préalable par l'eau régale et l'eau distillée, le chlorure de fer (II) tétrahydraté FeCl₂.4H₂O (4 x 10⁻³ mol) et le chlorure de fer (III) hexahydraté FeCl₃.6H₂O (8 x 10⁻³ mol) sont dissous dans du diéthylène glycol (DEG, 75 mL), et du N-méthyl-diéthanolamine (NMDEA, 75 mL). Après l'ajout du NMDEA la solution jaune-marron devient vert foncé. Ensuite, un volume équivalent de la solution S₁ préparée auparavant (DEG/NaOH) et de NMDEA sont ajoutées et laissée pendant 3 heures sous agitation. Le mélange présente un coloration orange-brun.

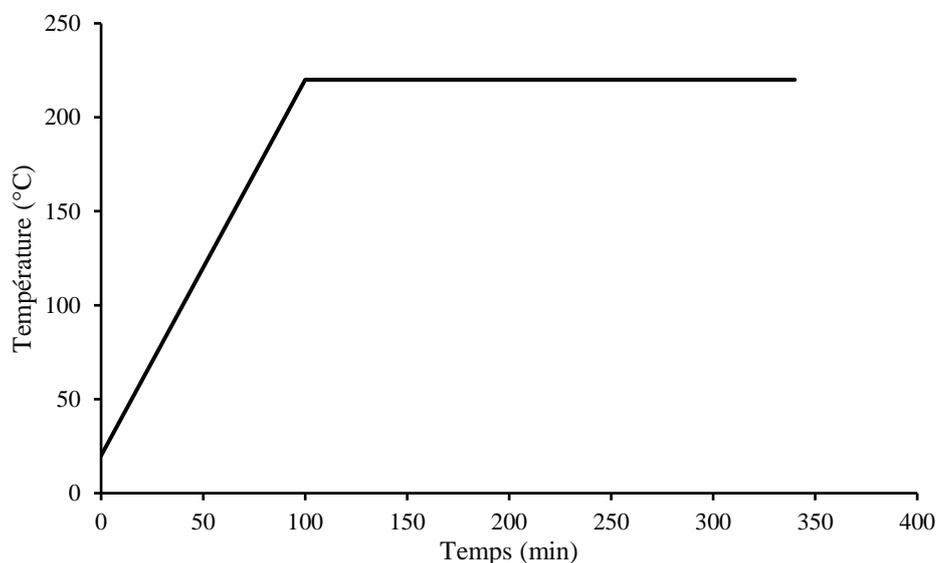


Figure 3-3 : Variation de la température (°C) dans le milieu réactionnel en fonction du temps (min)

Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 220°C avec une rampe de 10°C/5min puis la température est maintenue pendant 4 heures. Le contrôle de l'augmentation de la température et le plateau de 4 heures à 220°C permettent aux grains de magnétite monocristallins de 11 nm de se combiner et de produire des nanofleurs. Par la suite, la solution de magnétite colloïdale est lavée avec de l'éthanol et de l'acétate

d'éthyle, de l'acide nitrique, de l'eau distillée, de l'acétone et enfin de l'éther diéthylique. Le surnageant est éliminé après chaque lavage tandis qu'un aimant est utilisé pour maintenir la poudre au fond du bécher.

Après les différentes étapes de purification, la suspension de couleur noire des nanofleurs de magnétite (Fe_3O_4) est mélangée à une solution de nitrate de fer (III) ($\text{Fe}(\text{NO})_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) préalablement préparée (1 g de nitrate de fer (III) solubilisé dans 10 mL d'eau ultra pure). Le mélange est chauffé pendant 30 minutes à 80°C . Durant cette étape, les ions fer (II) contenus dans les nanofleurs de magnétite s'oxydent, ce qui donne une solution de couleur brune. Des nanofleurs de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sont présentes dans ce ferrofluide. Puis il est traité avec 2 mL d'acide nitrique tout en ajoutant 10 mL d'eau distillée, lavé deux fois avec de l'acétone et ensuite de l'éther diéthylique. L'éther diéthylique étant volatil, il peut être complètement éliminé en l'immergeant dans un bain d'eau à 50°C pendant 30 minutes. La poudre est ensuite mise en suspension dans de l'eau ultrapure avec une concentration d'environ 30 g/L. La suspension colloïdale a un pH compris entre 7 et 8.

3.3. Formulation des nanofleurs dorées

Notre équipe qui a développé la synthèse des nanofleurs de maghémite a précédemment étudié et caractérisé des nanofleurs de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). [8] Ces nanofleurs d'après la mesure du potentiel zêta en fonction de pH présentent une charge de surface positive pour des pH inférieur à 7 et négative pour des pH supérieurs à 8 (Figure 3-4). Elles sont caractérisées par une faible stabilité colloïdale entre pH 5-8 (c'est-à-dire à pH physiologie (pH=7,4)). En raison de leur faible stabilité colloïdale à pH physiologique, les nanofleurs d'oxyde de fer ne sont pas adaptées pour une utilisation directe dans l'organisme. Pour éviter l'agrégation des nanofleurs dans des conditions physiologiques, il est alors nécessaire de modifier leur surface. La stabilisation par adsorption d'ions citrate est l'une des fonctionnalisations largement utilisée.[7]

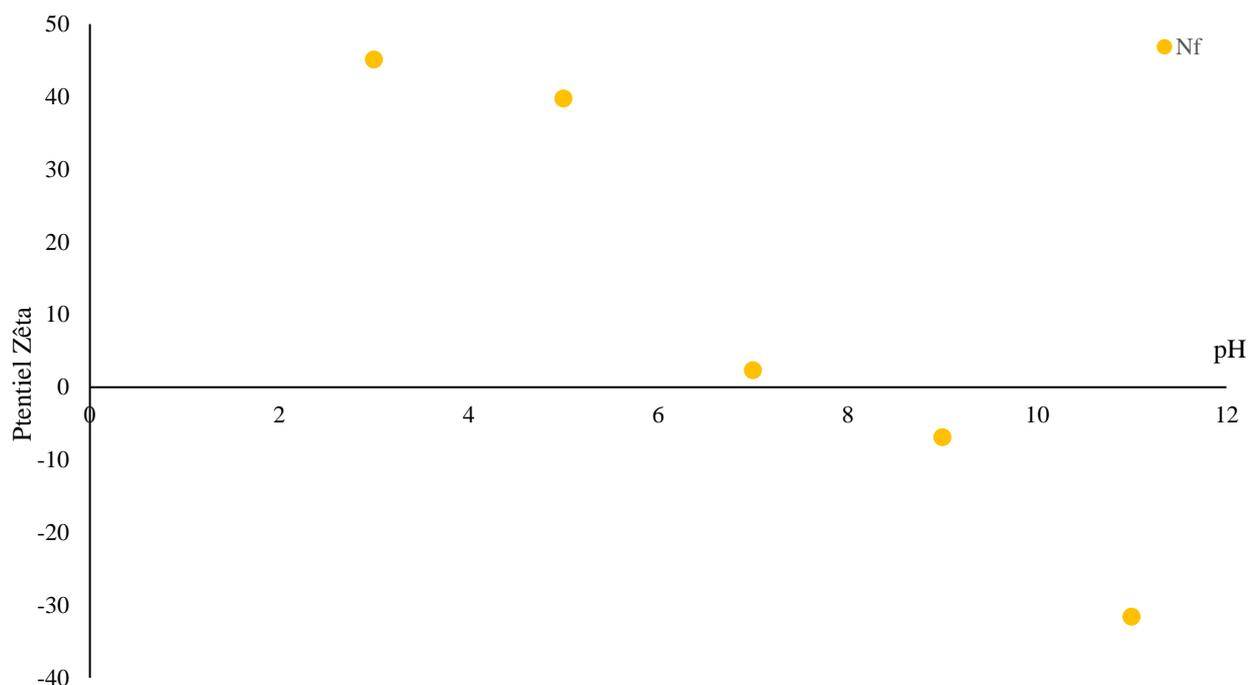


Figure 3-4 : Évolution du potentiel Zêta en fonction du pH des suspensions colloïdales de nanofleurs de maghémite.

Comme les nanoparticules d'or recouvertes de chélateurs de type DOTAGA et/ou NODAGA sont chargées négativement à pH physiologique, leur greffage sur les nanofleurs dont l'objectif est de mieux exploiter les propriétés des nanoparticules d'or peuvent contribuer à améliorer la stabilité colloïdale à pH physiologique. Nous avons travaillé sur une approche de greffage pour les nanoparticules d'or puisque notre objectif est d'utiliser ces nanofleurs comme transporteurs pour les nanoparticules $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{2x} (\text{TA}[\text{NODAGA-lys-NH}_2])_x$.

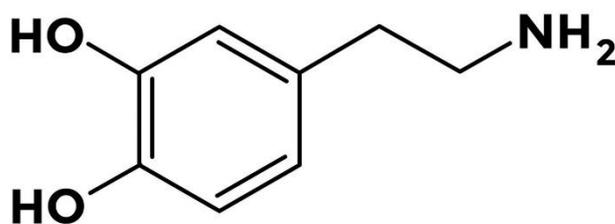


Figure 3-5: Formule topologique de la dopamine

Pour réussir à assembler ces deux types d'objet, les nanoparticules d'or ont été préalablement fonctionnalisées par l'acide hydrocaféique schématisé dans la Figure 3-6 (acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)propène-2-oïque, $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$) avant leur greffage sur les nanofleurs ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Cette molécule possède un groupement catéchol qui est connue pour sa grande affinité pour les surfaces d'oxyde de fer. La fonctionnalisation des nanoparticules d'or par cette molécule permettra donc de les décorer avec des entités qui faciliteront leur immobilisation sur les nanofleurs. Dans les travaux précédents, la dopamine (Figure 3-5) qui possède également le groupement catéchol avait été utilisée pour la fonctionnalisation des nanofleurs car sa fonction amine permettait de l'immobiliser à la surface des nanoparticules grâce à sa

réaction avec les groupements COOH des chélateurs DTDTPA et DOTAGA. Cependant, l'utilisation de ces groupements COOH influence négativement la chimie de coordination des chélateurs avec les ions comme le gadolinium.[17] Afin d'éviter le préjudice causé par le couplage de la dopamine sur les groupes COOH des chélateurs, nous proposons d'utiliser la molécule TA[NODAGA-lys-NH₂]. La fonction amine de cette molécule servira de site de greffage pour l'acide hydrocaféine. Il sera alors possible d'introduire le groupe catéchol qui assurera le greffage des nanoparticules d'or sur les nanofleurs tout en préservant les fonctions COOH qui sont indispensables pour la formation de complexes stables avec les ions d'intérêt pour l'imagerie.

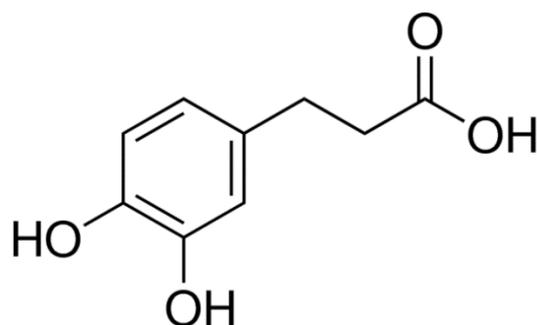


Figure 3-6 : Formule topologique de l'acide hydrocaféique

La première étape pour former les nanofleurs dorées réside dans la préparation d'une solution mère d'acide hydrocaféique activée. Dans un flacon, dissoudre l'acide hydrocaféique (47,2 mg, $2,6 \times 10^{-5}$ mol) dans l'éthanol absolu (2 mL). Dans un autre flacon, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC, C₈H₁₇N₃, $5,2 \times 10^{-4}$ mol) et le N-hydroxysuccinimide (NHS, C₄H₅NO₃, $1,04 \times 10^{-3}$ mol) sont dissous dans l'eau ultrapure (2 mL) (Figure 3-7). Les deux solutions sont mélangées et agitées à température ambiante pendant 45 minutes à pH 5,5.

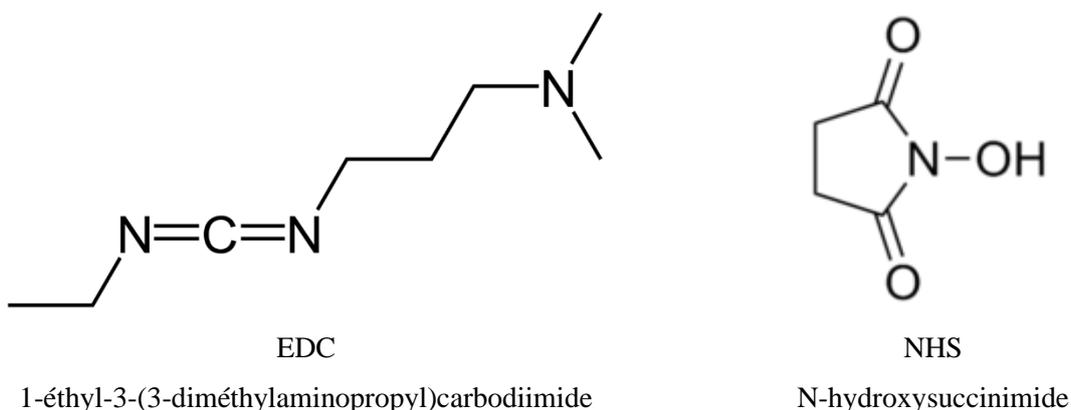


Figure 3-7 : Formules topologiques de l'EDC et du NHS.

La deuxième étape consiste à greffer l'ester activé de l'acide hydrocaféique sur les nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH₂])_x grâce à la réaction entre NHS et la fonction NH₂ présente dans la couche mixte des nanoparticules d'or. Ce greffage se produit en ajoutant la solution activée (1,21 x

10^{-5} mol, 186 μ L) dans une suspension colloïdale de nanoparticules Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGALys-NH₂])_x (5×10^{-4} mol) ajusté à un pH entre 6 et 7. Cette solution est maintenue sous agitation pendant 24 heures. La solution présente un excès d'acide hydrocaféique non accroché et de l'éthanol. Les excès doivent être éliminés pour pouvoir utiliser les nanoparticules d'or pour des injections *in vivo*. Pour cela une purification est nécessaire. La solution à purifier, le dialysat, est introduit dans un boudin de dialyse qui est une membrane semi-perméable. Ce boudin est immergé dans l'eau distillée, le contre-dialysat. Un échange de molécules entre le dialysat et le contre-dialysat par diffusion est provoqué par la différence de concentration entre le dialysat et le contre-dialysat. Le boudin de dialyse est composé d'une membrane dont les pores présentent un seuil compris entre 6 et 8 kDa. Le boudin qui contient environ 11 mL d'une suspension colloïdale de nanoparticules est immergé dans un litre d'eau distillée sous agitation pendant 72 heures. Le contre-dialysat est changé 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 et 60 heures après le début de la dialyse. Ce changement est nécessaire pour conserver une importante différence de concentration et ainsi maintenir l'échange.

La dernière étape est l'assemblage des nanoparticules d'or modifiées avec les nanofleurs (γ -Fe₂O₃). Le dialysat est ajouté à une solution de nanofleurs dont le pH est ajusté à 5,5. Ce milieu réactionnel est maintenu sous agitation à une température de 60°C pendant 24 heures. Par la suite, la solution est lavée par eau ultrapure plusieurs fois, puis à l'acétone et à l'éther diéthylique. Le surnageant est éliminé après chaque lavage tandis qu'un aimant est utilisé pour maintenir la poudre au fond du bécher. L'éther diéthylique étant volatil, il peut être complètement éliminé en l'immergeant dans de l'eau à 50°C pendant 30 minutes. La poudre est ensuite mise en suspension dans de l'eau ultrapure avec une concentration d'environ 30 g/L. La suspension colloïdale à un pH compris entre 7 et 8.

3.4. Greffage du peptide sur les nanoparticules

Le ciblage actif est un moyen prometteur d'augmenter la concentration de nanoparticules dans la zone visée et de prolonger le séjour de ces nanoparticules dans cette zone. Nous proposons que le site libre de l'amine NH₂ soit également utilisé pour greffer des peptides de ciblage en utilisant la chimie click bioorthogonale. Un dérivé de la tétrazine (Tz-COOH, C₁₀H₈N₄O₂) est utilisé comme agent de liaison entre l'amine libre (NH₂) et le peptide qui porte à son extrémité C-terminal le groupe bicyclononyne afin de pouvoir greffer le peptide sur les nanoparticules d'or et les nanofleurs dorées. La Figure 3-8 présente l'agent de liaison entre les nanoparticules et le peptide.

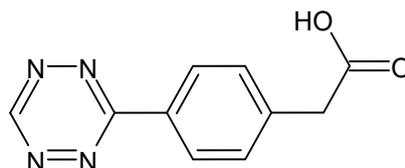


Figure 3-8 : Formule topologique de la tétrazine Tz-COOH

La Figure 3-9 présente le peptide VG196 capable de cibler la protéine VCAM-1 qui se trouve à la surface des vaisseaux sanguins. Elle participe à l'adhésion des lymphocytes et monocytes sur l'endothélium

vasculaire. Par le recrutement des monocytes, elle joue un rôle essentiel dans la formation des plaques d'athérosclérose. Le peptide VG-196 est donc intéressant pour améliorer la détection des plaques.

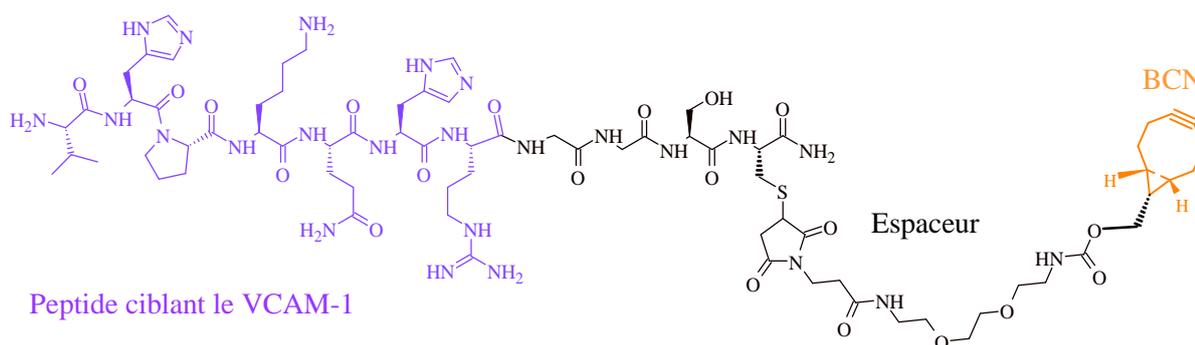


Figure 3-9 : Formule topologique du peptide de ciblage nommé VG-196 ($C_{73}H_{114}N_{24}O_{20}S$)

3.4.1. Greffage du peptide VG-196 sur les nanoparticules d'or

Le greffage du peptide VG-196 sur les nanoparticules $Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH_2])_x$ est effectué en trois étapes réactionnelles et deux étapes de purification. La première étape consiste à activer la tétrazine Tz-COOH ($9,24 \times 10^{-5}$ mol) par un mélange de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC, $C_8H_{17}N_3$, $1,85 \times 10^{-4}$ mol) et de N-hydroxysuccinimide (NHS, $C_4H_5NO_3$, $3,7 \times 10^{-4}$ mol) dans le N,N-diméthylformamide (DMF, 4 mL). Cette solution est maintenue sous agitation pendant 90 minutes. La deuxième étape consiste à ajouter la tétrazine Tz-COOH activée ($6,4 \times 10^{-6}$ mol) à une suspension de nanoparticules d'or $Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH_2])_x$ (10 g/L en Au) dispersée dans l'eau et DMF ($V_{eau}/V_{DMF} = 2$). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 24 heures à pH compris entre 6 et 7. Comme le DMF est un solvant non compatible pour les utilisations *in vivo*, une étape de purification est nécessaire pour l'éliminer. La suspension de nanoparticules d'or est introduite dans un boudin de dialyse qui est une membrane semi-perméable. Le boudin de dialyse est composé d'une membrane de pore qui présente un seuil compris entre 6 et 8 kDa. Le boudin qui contient environ 15 mL d'une suspension colloïdale de nanoparticules est immergé dans un litre et demi d'eau distillée sous agitation pendant 72 heures. Le contre-dialysat est changé 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 et 60 heures après le début de la dialyse. Ce changement est nécessaire pour conserver une importante différence de concentration et ainsi maintenir l'échange. Après la dialyse, les nanoparticules d'or diluées sont concentrées par centrifugation en utilisant des tubes à ultrafiltration (Vivaspin® de 10 KDa) à 1500 tr/min. La suspension colloïdale finale possède une concentration en or de 10 g/L. La suspension obtenue est ajustée à pH égal à 8.

La troisième étape consiste à ajouter le peptide VG-169 ($6,35 \times 10^{-6}$ mol) dans la suspension de nanoparticules d'or modifiées par la tétrazine qui est maintenue sous agitation pendant 24 heures. Une autre étape de purification par dialyse et de centrifugation par ultrafiltration est nécessaire pour éliminer le reste de peptide non greffé.

3.4.2. Greffage sur les nanofleurs dorées

Le greffage du peptide sur les nanofleurs dorées (*i.e.* les nanofleurs décorées par les nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2x}(\text{TA}[\text{NODAGA-lys-NH}_2])_x$) est effectué en trois étapes réactionnelles similaire à celle des nanoparticules d'or et deux étapes de purifications. La première étape est totalement semblable à celle du greffage du peptide sur les nanoparticules d'or. Pour la deuxième étape, le nombre de mole de la tétrazine activée ajoutée aux nanofleurs dorées diffèrent ($2,72 \times 10^{-6}$ mol au lieu de $6,4 \times 10^{-6}$ mol). Par la suite, la solution est lavée avec de l'eau ultrapure plusieurs fois afin d'éliminer l'excès de DMF et de la solution d'activation et des sous-produits de la réaction. Après les nanofleurs dorées sont redispersées dans l'eau dont le pH est ajusté à 8. Pour la troisième étape, le nombre de moles du peptide VG-169 ajouté dans la suspension de nanofleurs dorées est également différent ($7,56 \times 10^{-4}$ mol au lieu de $6,35 \times 10^{-6}$ mol). Après 24 heures d'agitation, la solution est lavée avec de l'eau ultrapure plusieurs fois, puis à l'acétone et à l'éther diéthylique. Le surnageant est éliminé après chaque lavage tandis qu'un aimant est utilisé pour maintenir la poudre au fond du bécher. L'éther diéthylique étant volatil, il peut être complètement éliminé en l'immergeant dans de l'eau à 50°C pendant 30 minutes. Cette purification permet d'éliminer les résidus du milieu réactionnel. La poudre est ensuite redispersée dans de l'eau ultrapure avec une concentration d'environ 30 g/L. Le pH de la suspension colloïdale est ensuite ajusté à la valeur du pH physiologique (7,4).

3.5. Complexation

Pour pouvoir suivre ces nanoparticules par imagerie simultanée IRM/TEP, les nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2x}(\text{TA}[\text{NODAGA-lys-NH}_2])_x$ sont fonctionnalisées par deux types de macrocycles différents DOTAGA et NODAGA. Ces chélateurs présents à la surface des nanoparticules d'or ont été sélectionnés pour leur capacité à former des complexes stables avec Gd^{3+} (pour DOTAGA) et $[^{64}\text{Cu}] \text{Cu}^{2+}$ (pour NODAGA). Les nanoparticules d'or seront ainsi marquées par deux types différents d'ions pour pouvoir les suivre simultanément en IRM (Gd^{3+}) et en TEP ($[^{64}\text{Cu}] \text{Cu}^{2+}$). En revanche, les nanofleurs dorées seront marquées seulement par le cuivre ($[^{64}\text{Cu}] \text{Cu}^{2+}$) pour la TEP car l'oxyde de fer, en raison de son caractère superparamagnétique, jouera le rôle d'agent de contraste négatif pour l'IRM.

3.5.1. Complexation du gadolinium

Le marquage au gadolinium est réalisé après la synthèse des nanoparticules d'or. Le pH de la suspension de nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2x}(\text{TA}[\text{NODAGA-lys-NH}_2])_x$ est ramené à pH acide (pH entre 4 et 5) pour effectuer la complexation de l'ion gadolinium qui est introduit dans la suspension par une solution aqueuse de GdCl_3 ($[\text{Gd}^{3+}] = 5 \text{ mM}$, $175 \mu\text{L}$). Ensuite le pH des suspensions colloïdales a été ajusté au pH physiologique (7,4).

3.5.2. Complexation du cuivre

Le laboratoire radiopharmaceutique de la plateforme d'imagerie nucléaire du CGFL à Dijon a réalisé les radiomarquages des suspensions colloïdales de nanoparticules d'or marquées au gadolinium (III) et des

nanofleurs dorées avec le radionucléide cuivre-64 pour des études de biodistribution utilisant l'imagerie simultanée IRM/TEP.

Une suspension colloïdale de nanoparticules d'or (500 μL) est introduite dans un microtube A contenant une solution tampon d'acétate d'ammonium AcONH_4 (137 μL). Puis une solution de ^{64}Cu CuCl_2 (137 μL) en présence d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M est ajoutée dans le même microtube. Pendant 45 minutes, le mélange réactionnel est incubé à 37°C. La radiochromatographie est ensuite utilisée pour déterminer la pureté radiochimique (AR-2000). Le protocole est similaire pour les nanofleurs dorées.

4. Caractérisation des nanoparticules d'or et des nanofleurs dorées

4.1. Spectrophotométrie UV-Visible

La spectrophotométrie UV-visible est une méthode de caractérisation simple à mettre en œuvre. L'instrument utilisé est un spectrophotomètre UV-visible de type SPECORD 210 avec une gamme de longueur d'onde de 400 à 800 nm. La largeur de la fente utilisée pour ces tests est de 2 nm, avec une résolution ($\Delta\lambda$) de 1 nm et une vitesse de balayage de 10 nm/s. Cette méthode permet d'enregistrer les spectres d'absorption des nanoparticules d'or. Les nanoparticules d'or ont la particularité d'avoir des propriétés optiques modulables qui peuvent être observées par spectre UV-Visible dans le domaine visible. Comme les nanoparticules sont dispersées dans une solution aqueuse, l'eau est utilisée comme référence. Au pH choisi, la suspension colloïdale est diluée à une concentration de 0,1 g/L en or.

4.2. Dosage par ICP-OES

Le dosage par ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry : spectroscopie d'émission optique après excitation au moyen d'un plasma) permet de quantifier la concentration des éléments dans différentes solutions de manière précise. Cette méthode est destructive. Les études ont été réalisées à l'aide d'un ICP-OES (710 ES Varian/Agilent) avec une torche axiale, un nébuliseur concentrique et une chambre de nébulisation cyclonique. Les paramètres suivants ont été utilisés lors des mesures : une puissance de 1,2 kW, un débit de 15 L/min d'argon plasmagène et de 1,5 L/min d'argon auxiliaire, et une pression de nébulisation de 200 kPa. Les lignes d'émission utilisées pour quantifier la concentration d'or sont de 267,594 nm, 242,794 nm et 208,207 nm, tandis que celle du gadolinium est de 342,2446 nm et celle du fer est de 234,35 nm, 238,204 nm, 239,563 nm et 259,940 nm. Pour améliorer la fiabilité des données, de nombreuses longueurs d'onde sont utilisées dans les mesures. Les éléments totaux peuvent être analysés par la méthode ICP-OES (sans faire intervenir les isotopes comme dans le cas de l'ICP-MS). L'efficacité de l'atomisation est de 100 % pour la majorité des éléments, de 90 % pour la moitié des éléments du tableau périodique et d'environ 60 % pour le platine et l'or. L'étalon a été réalisé dans les mêmes conditions d'atomisation que les échantillons. Par conséquent, la faible efficacité d'atomisation signalée pour l'or n'aura aucun effet sur les résultats. Pour les mesures, un tampon d'ionisation est utilisé pour éliminer la majorité des interactions potentielles. La limite inférieure de cette technique pour détecter l'or dans un échantillon est de 20 μg d'or/L. Sylvaine Linget du laboratoire Qualio de l'Université de Franche-Comté (Besançon) a

réalisé ces études. Avant de réaliser ces études, les suspensions colloïdales de nanoparticules d'or et de nanofleurs dorées (10 g/L d'or) sont minéralisées avec de l'eau régale (1/3 HNO₃ (68%) et 2/3 HCl (37%)).

4.3. Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (TEM) est une méthode puissante pour caractériser les matériaux. Elle permet de réaliser des analyses morphologiques, structurales et chimiques sur des matériaux solides à l'échelle atomique et nanométrique.

Sur une grille de cuivre recouverte d'une feuille de carbone a été déposée une goutte (5 µL) de chacun des échantillons de nanoparticules d'or, de nanofleurs et de nanofleurs dorées préalablement dilués (0,20 g Au/L). Les grilles ont ensuite été laissées à l'air libre pendant environ une nuit pour sécher. Les clichés ont été réalisés à l'aide d'un microscope JEOL 2100F, 200kV au Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB) de Dijon par le Dr Rémi Chassagnon.

4.4. Mesure du diamètre hydrodynamique et du potentiel Zêta

Les applications *in vivo* et *in vitro* nécessitent de connaître le diamètre hydrodynamique et la charge de surface des nanoparticules d'or. Ces caractéristiques sont importantes pour l'internalisation cellulaire, la biodistribution et pour l'élimination de ces nanoparticules. Pour ces raisons, la mesure de potentiel Zêta et celle du diamètre hydrodynamique sont nécessaires. Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules est déterminé par la taille du cœur d'or, l'épaisseur de la couche de ligands et l'épaisseur de la couche de solvation. Contrairement à la mesure de la taille effectuée à partir d'une image TEM, il reflète la véritable dimension de la nanoparticule dans un milieu particulier. Les méthodes de diffusion de la lumière telles que la diffusion dynamique de la lumière (DLS) peuvent être utilisées pour déterminer le diamètre hydrodynamique. La mesure du diamètre hydrodynamique et du potentiel Zêta est réalisée avec le Nanosizer ZS de Malvern Instruments (contenant un laser He-Ne avec une longueur d'onde de 633 nm).

Pour ces mesures, les nanoparticules d'or et les nanofleurs sont diluées afin d'obtenir des suspensions aqueuses de concentration de 0,1 g Au/L et 1 M de NaCl à différents pH (1, 3, 5, 7, 9 et 11). Le pH des suspensions est ajusté par ajout de solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique 1 M.

4.5. Lyophilisation

La lyophilisation consiste à extraire l'eau qui est sous forme de glace d'un échantillon par sublimation à basse pression. Pour cela l'échantillon à lyophiliser est congelé dans un congélateur à -18°C pendant 72 heures.

La transformation de la suspension colloïdale de nanoparticules d'or avec et sans peptide sous forme de poudre a été réalisée grâce à un lyophilisateur Christ Alpha 2-4 LSCbasic à -80°C et 0,00041 mbar.

4.6. ATG

Les analyses thermogravimétriques ont été réalisées sur un appareil Discovery de TA Instruments au sein du laboratoire ICB à l'université de Bourgogne à Dijon par le Dr Frédéric BOUYER. Les analyses ont été

réalisées sous flux d'air reconstitué (80% N₂ et 20% O₂) avec un débit e 20 mL/min. L'évolution programmée de la température au cours du traitement thermique est représentée dans la Figure 4-1.

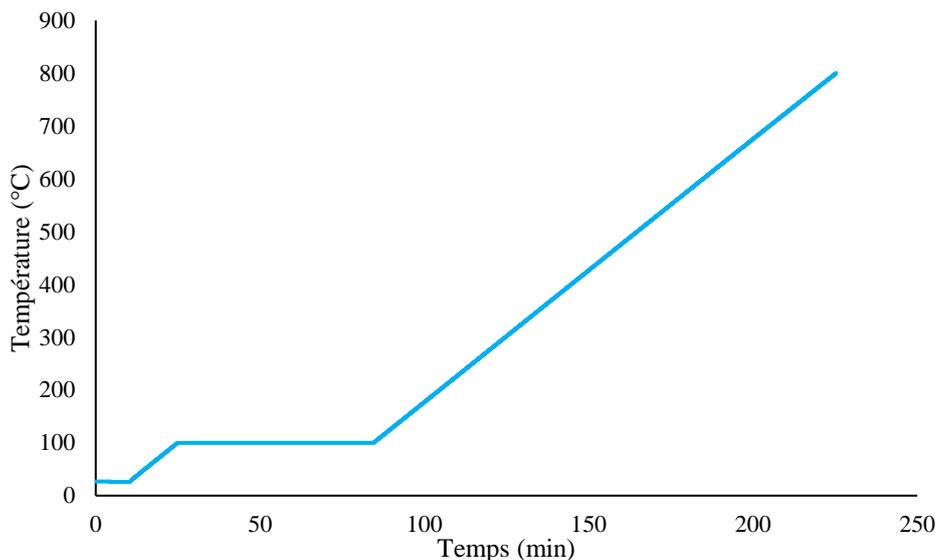


Figure 4-1 : Evolution programmée de la température au cours du traitement thermique de l'ATG

5. Résultats de la caractérisation des différentes nanoparticules

Les nanoparticules d'or, les nanofleurs (γ -Fe₂O₃) et les nanofleurs dorées ont subi une série de caractérisations pour confirmer la reproductibilité du protocole, déterminer avec la plus grande fiabilité possible leurs caractéristiques et étudier leur stabilité colloïdale surtout à pH physiologique.

L'une des principales caractéristiques des nanoparticules d'or est l'absorption de la lumière qui se manifeste par la présence d'une bande, appelée bande plasmon car elle résulte des phénomènes de résonance de plasmons. L'allure et la position de cette bande plasmon dépendent de la taille, de la forme et de leur environnement. La forme et la largeur de cette bande permet de manière simple de déterminer la taille, la distribution en taille des nanoparticules et l'état d'agrégation.[18], [19] Le comportement de cette bande plasmon permet de vérifier la stabilité colloïdale dans le temps et/ou en fonction du pH. Une étude de la stabilité colloïdale des nanoparticules en fonction de temps a d'abord été réalisée par spectrophotométrie UV-Visible de suspensions de nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH₂])_x sans ou avec peptide à deux moments différents (Figure 5-1).

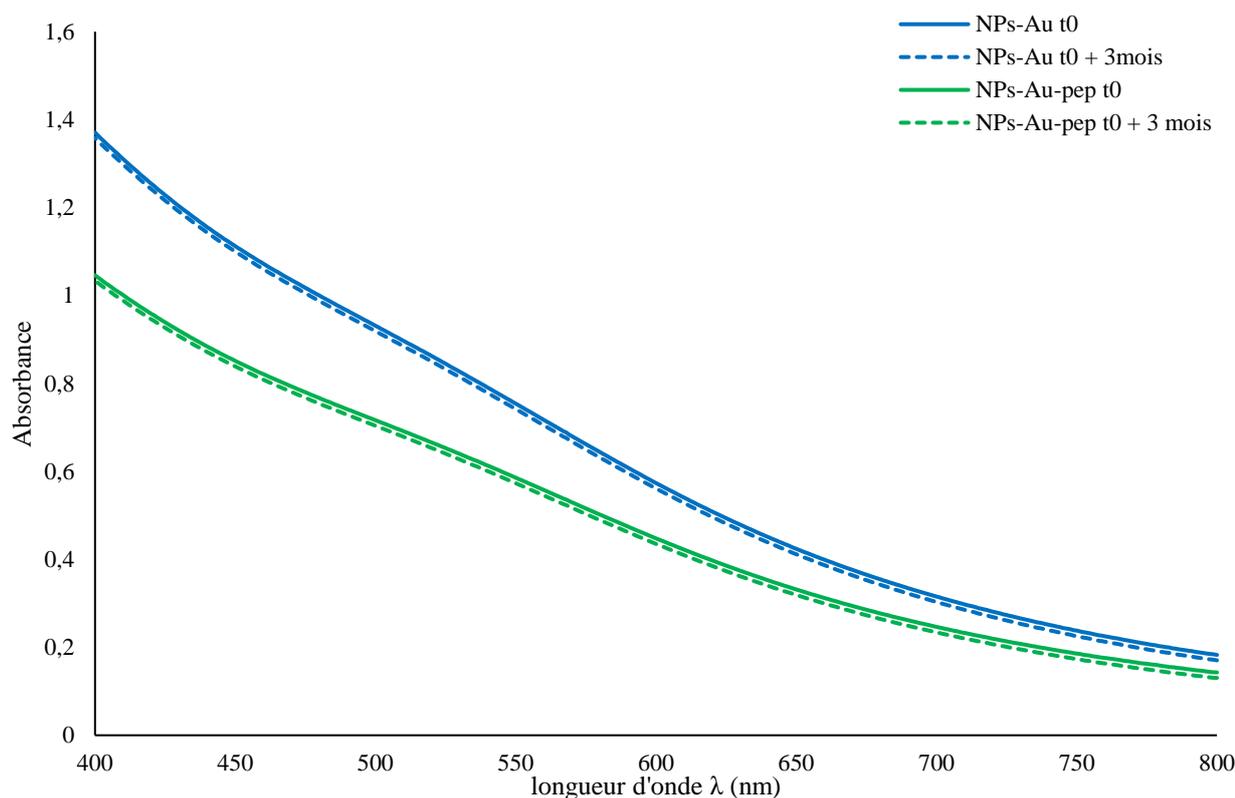


Figure 5-1 : Spectre UV-Visible entre 400 et 800 nm des suspensions de nanoparticules d'or $Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH_2])_x$ avec et sans peptide à deux temps différents

Une bande plasmon très aplatie peut être observée aux alentours de 520 nm pour les différentes suspensions colloïdales. Pour chaque type de suspensions colloïdales, les spectres enregistrés à trois mois d'intervalle sont parfaitement superposés. Bien que ces nanoparticules soient obtenues après réduction du sel d'or en présence de deux chélateurs différents, l'allure des spectres est semblable à ceux des nanoparticules synthétisées en présence d'un seul type de chélateurs. Ces résultats suggèrent que les nanoparticules d'or obtenues ont une taille inférieure à 5 nm. En effet il a été montré que les bandes plasmons ne sont pas ou peu visibles lorsque la taille des nanoparticules d'or est inférieure à 3-5 nm. Cette suggestion semble être en accord avec la couleur brun-noir des différentes suspensions. De plus, le greffage du peptide ne semble pas influencer la bande plasmon des nanoparticules d'or $Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH_2])_x$. La parfaite superposition des spectres enregistrés à deux temps différents (après synthèse et trois mois après synthèse) indique qu'il n'y a pas de changement dans la composition des colloïdes et donc que les suspensions colloïdales possèdent une stabilité colloïdale élevée au cours du temps.

Le diamètre du cœur d'or des nanoparticules et le diamètre des nanofleurs peuvent être déterminés avec précision grâce à des image de TEM (microscope électronique à transmission), ce qui permet de confirmer les interprétations précédentes au sujet des spectre UV-Visible des suspensions de nanoparticules d'or.

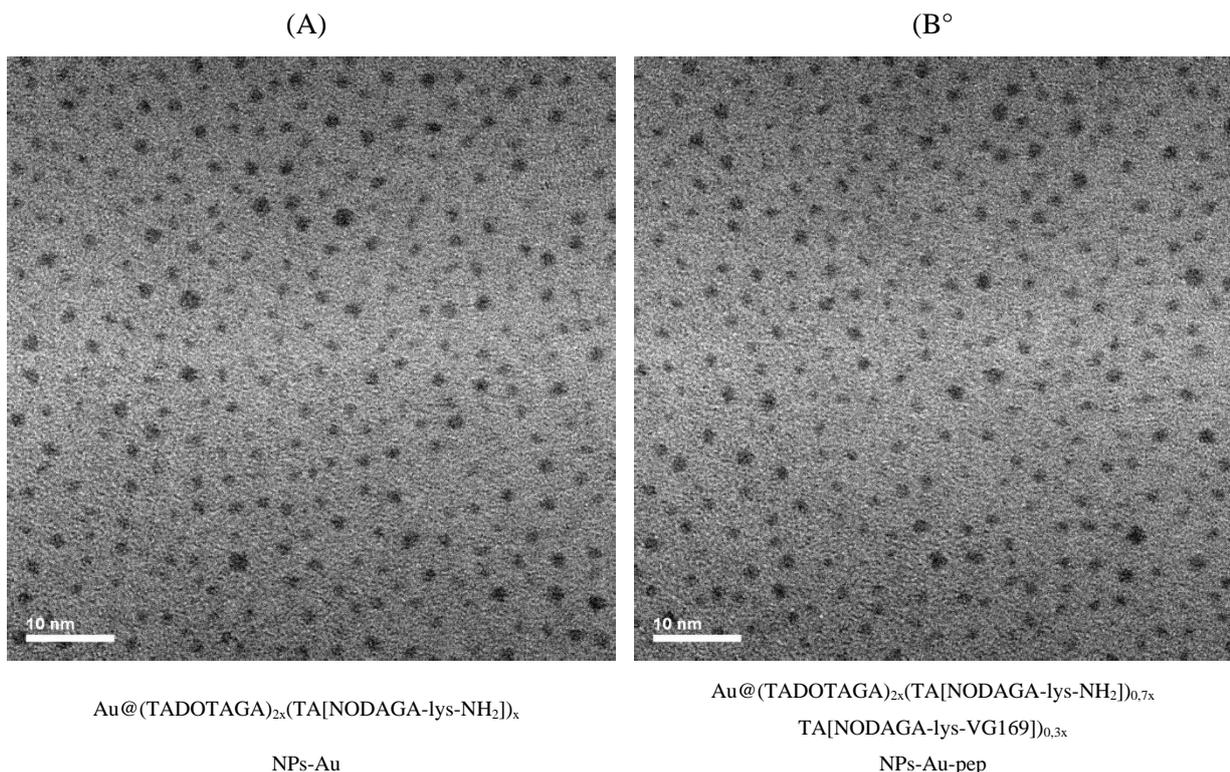


Figure 5-2 : Clichés TEM des différents types des nanoparticules d'or. (A) NPs-Au : $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{2x} (\text{TA} [\text{NODAGA-lys-NH}_2])_x$, et (B) NPs-Au-pep : $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{2x} (\text{TA} [\text{NODAGA-lys-NH}_2])_{0,7x} (\text{TA} [\text{NODAGA-lys-VG169}])_{0,3x}$

La Figure 5-4 montre que les nanoparticules d'or avec et sans peptide présentent la même distribution avec un diamètre moyen autour de 2,6 nm ($2,6 \pm 0,3$ nm). La DLS a été utilisée pour apporter des informations complémentaires à celles fournies par l'interprétation des clichés TEM en mesurant le diamètre hydrodynamique des différentes nanoparticules d'or. La connaissance du diamètre hydrodynamique de ces nanoparticules est nécessaire pour anticiper leur mode d'élimination de l'organisme après leur administration. Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or sans peptide est de 6,9 nm alors que celui des nanoparticules d'or avec peptide est de 6,5 nm (Tableau 5-1). Les diamètres hydrodynamiques des nanoparticules d'or avec et sans peptide est toujours inférieur à 10 nm, ce qui indique qu'elles peuvent passer à travers les reins et être éliminées par voie rénale.

La taille n'est pas le seul paramètre à prendre en considération pour les applications *in vivo* des nanoparticules d'or. Les suspensions de nanoparticules qui seront administrées par voie intraveineuse doivent posséder une excellente stabilité colloïdale. Le pH physiologique étant de pH 7,4, les spectres UV-Visible ont été enregistrés sur une large gamme de pH autour de 7,4 afin de déterminer la zone de pH dans laquelle les colloïdes sont stables (Figure 5-3).

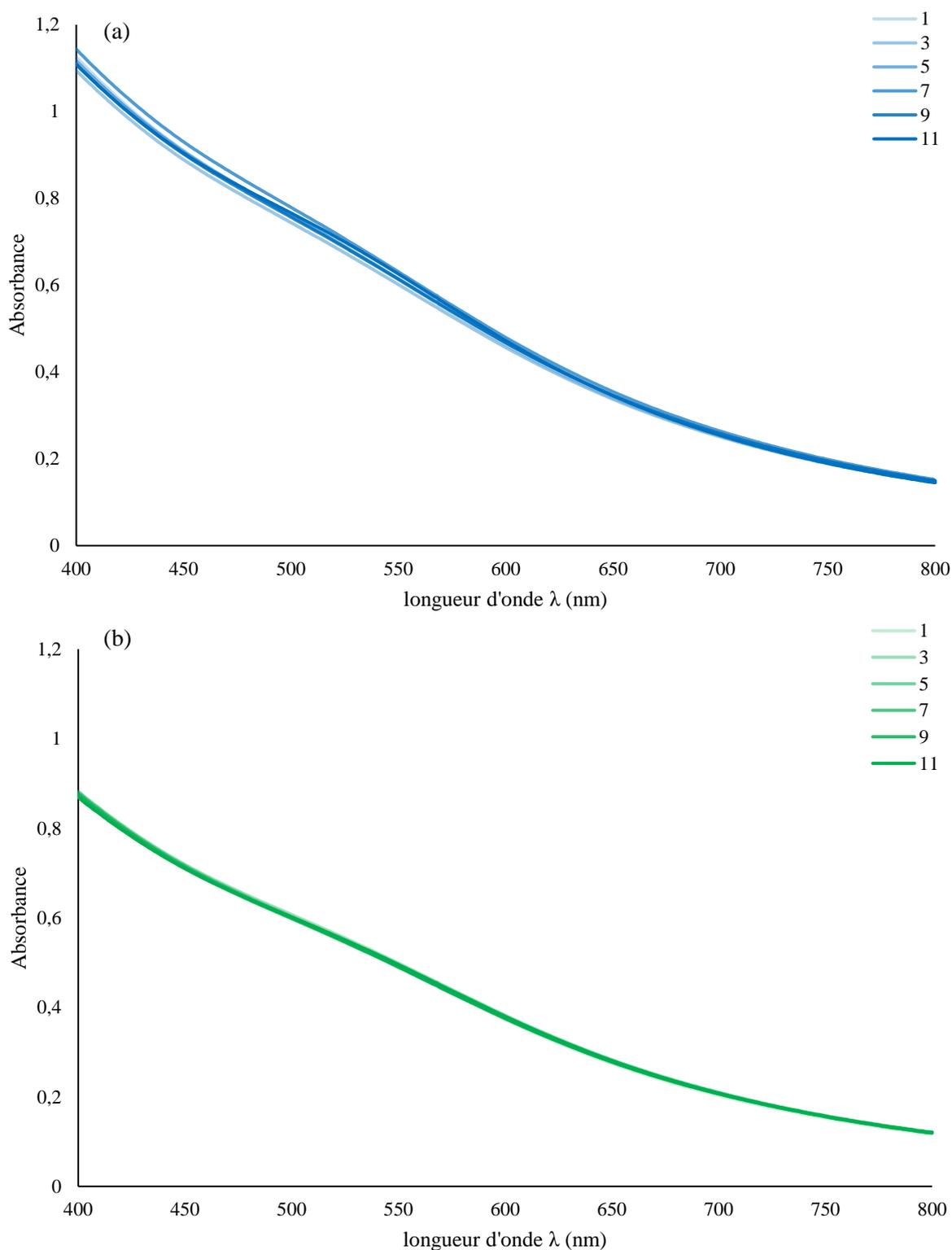


Figure 5-3 : Spectres UV-Visible des suspensions de nanoparticules d'or $Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH_2])_x$ (a) sans peptide et (b) avec peptide à différents pH.

Comme les spectres UV-Visible de toutes les suspensions de nanoparticules sont superposés quel que soit le pH, nous pouvons en déduire que les nanoparticules d'or avec et sans peptide présentent une stabilité colloïdale sur toute la gamme de pH, notamment à pH physiologique.

Les nanoparticules d'or étant recouvertes par des molécules organiques portant des fonctions ionisables selon le pH (acide carboxylique, amine), la charge de surface qui joue un rôle important dans la stabilité colloïdale peut donc varier en fonction du pH. Même s'il ne représente pas réellement la charge de surface, le potentiel permet d'avoir des informations indirectes sur la nature et l'intensité de la charge globale de surface. Pour comprendre l'origine de la stabilité des nanoparticules d'or, nous avons mesuré le potentiel Zêta des nanoparticules d'or à différents pH (Figure 5-4).

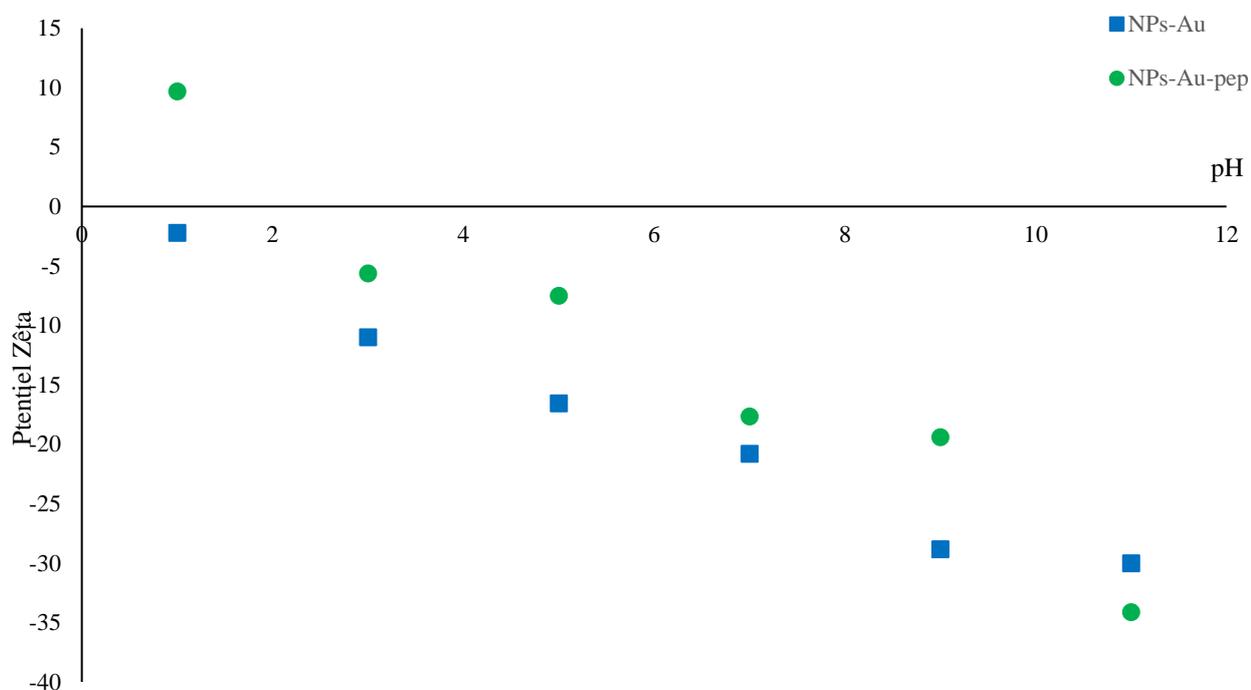


Figure 5-4 : Evolution du potentiel Zêta en fonction du pH des suspensions colloïdales de nanoparticules d'or avec et sans peptide

Les valeurs de potentiel Zêta (ζ) pour les nanoparticules $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{2x} (\text{TA}[\text{NODAGA-lys-NH}_2])_x$ sans peptide sont négatives pour les pH supérieurs à 1. Elles restent négatives après greffage du peptide mais à partir d'un pH plus élevé (pH 2). Le signe du potentiel Zêta ζ s'explique par la nature chimique des macrocycles DOTAGA et NODAGA et de la présence de la fonction amine NH_2 . Le DOTAGA possède quatre fonctions carboxylate et quatre fonctions amine tertiaire alors que NODAGA-lys- NH_2 possède trois fonctions carboxylate, trois fonctions amine tertiaire et une fonction amine primaire NH_2 . Ces fonctions sont sensibles à la variation de pH. Ainsi lorsque l'on se trouve à bas pH, les groupements amine et carboxylate sont respectivement protonés en cation ammonium (positif) et en acide carboxylique (neutre). Pour des pH plus élevés, ces fonctions perdent leurs protons et deviennent neutres (fonctions amine) ou négatives (groupements carboxylate).

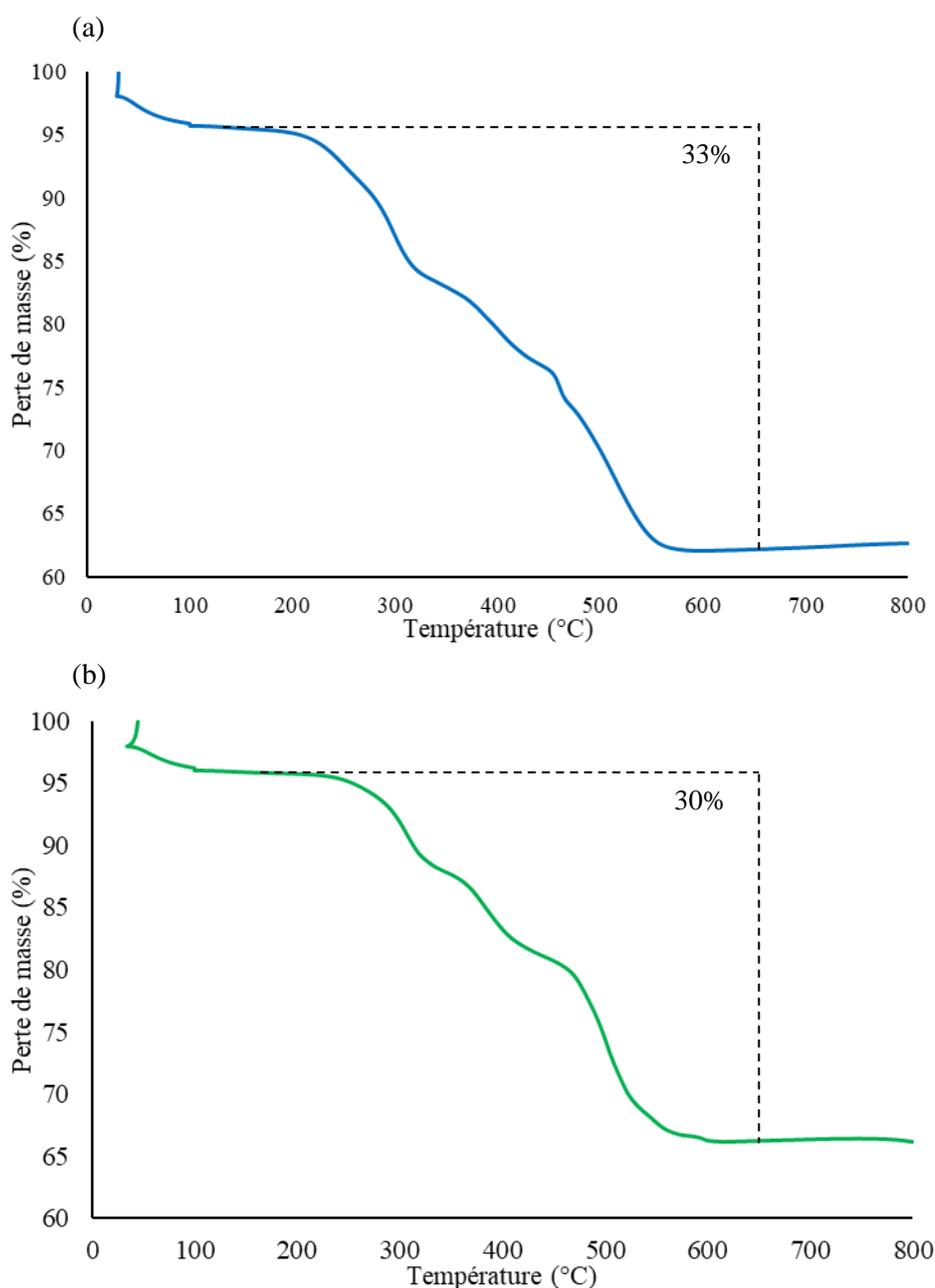


Figure 5-5 : Courbes d'analyse thermogravimétrique de poudres de nanoparticules d'or sans peptide (a) et avec peptide (b)

Pour pouvoir quantifier le nombre de ligands par nanoparticules, l'analyse thermogravimétrique (ATG) semble la meilleure méthode. La lyophilisation des nanoparticules est l'étape première pour obtenir la poudre. La Figure 5-5 montre un comportement similaire des nanoparticules d'or avec et sans peptide. La perte de masse pour une température inférieure à 140°C correspond à la désorption des molécules d'eau. En mesurant le pourcentage de perte massique à partir de 150°C, ces courbes indiquent une perte de masse d'environ 33% pour les nanoparticules d'or sans peptide et 30% pour les nanoparticules d'or avec peptide. En d'autres termes, les nanoparticules d'or avec et sans peptide sont composées de 70% d'or et 30% de matière organique. Ces chiffres nous permettent de remonter aux nombres de ligands par nanoparticule. Après calcul, nous pouvons considérer que les nanoparticules d'or sont recouvertes d'environ 60 chélateurs par nanoparticule.

L'un des objectifs des travaux décrits dans ce chapitre consiste à utiliser les nanofleurs d'oxyde de fer comme transporteur des nanoparticules d'or. Les nanofleurs dorées sont obtenues par greffage des nanoparticules d'or (caractérisées précédemment), après modification par l'acide hydrocaféique, sur les nanofleurs d'oxyde de fer ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). À la suite de ce greffage, les nanofleurs dorées ont été caractérisées pour mettre en évidence par comparaison avec les nanofleurs la présence des nanoparticules d'or et leur influence sur les caractéristiques des nanofleurs dorées.

Afin de révéler la présence des nanoparticules d'or sur les nanofleurs, les échantillons de nanofleurs de maghémite (NF), de nanofleurs après réaction de greffage avec les nanoparticules d'or recouvertes de la couche mixte de chélateurs $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2x}\text{(TA[NODAGA-lys-NH}_2\text{])}_x$ avec et sans peptide VG-169 (NF-Au et NF-Au-pep, respectivement) ont été imagés par TEM et STEM (Figure 5-6 et Figure 5-7). La comparaison des clichés TEM des différents échantillons montrent deux points essentiels (Figure 5-6). Le premier est que la structure caractéristique des nanofleurs résultant de l'auto-assemblage des nanoparticules sphérique de maghémite est préservée après les réactions de greffage des nanoparticules d'or et après la post-fonctionnalisation par le peptide VG-169. Cela laisse espérer que les propriétés magnétiques singulières des nanofleurs seront préservées. Le second point révélé par les clichés TEM concerne le greffage des nanoparticules d'or. En comparant les clichés des nanofleurs avant et après greffage des nanoparticules d'or nous constatons la présence de points noirs sur les nanofleurs. Ces points noirs sont associés à la présence des nanoparticules d'or. D'autre part, l'analyse de plusieurs clichés TEM de différents grossissements montre que les points noirs ne sont présents que sur les nanofleurs. Quasiment aucun d'eux n'est présent entre les nanofleurs, confirmant l'efficacité des étapes de lavage mis en œuvre après les réactions de greffage.

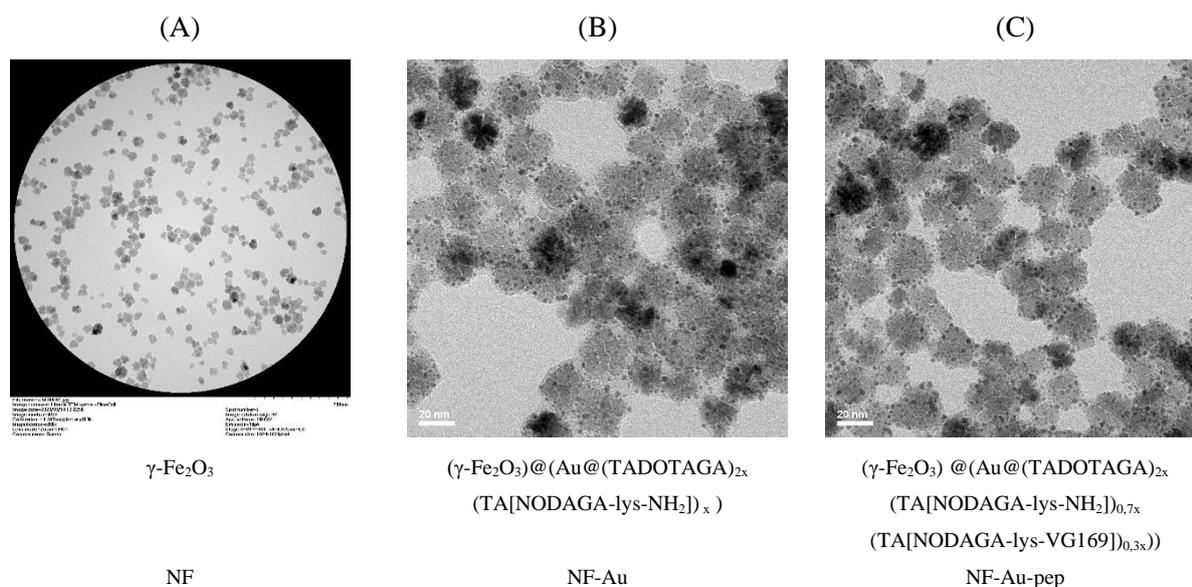


Figure 5-6 : Clichés TEM des différents types de nanofleurs et nanofleurs dorées. (A) NF : nanofleurs de maghémite (barre d'échelle : 200 nm), (B) NF-Au : nanofleurs décorées par les nanoparticules d'or $\text{Au}@(\text{TADOTAGA})_{2x}(\text{TA}[\text{NODAGA-lys-NH}_2])_x$ et (C) NF-Au-pep : nanofleurs décorées par les nanoparticules d'or $\text{Au}@(\text{TADOTAGA})_{2x}(\text{TA}[\text{NODAGA-lys-NH}_2])_x$ fonctionnalisées par le peptide (barre d'échelle pour B et C : 20 nm).

Même si les analyses EDS montrent la présence de l'élément or seulement dans les échantillons de nanofleurs soumis aux réactions de greffage des nanoparticules d'or, les clichés TEM ne suffisent pas à confirmer la réussite du greffage des nanoparticules d'or. D'autre part, le faible contraste entre les nanoparticules d'or et les nanofleurs de maghémite rend difficile l'interprétation des images. Pour ces raisons, les échantillons ont également été imagés en utilisant la technique de microscopie STEM-HAADF dont le contraste des images obtenues repose sur la différence de numéro atomique des éléments contenus dans les échantillons analysés. Plus le numéro atomique est élevé, plus les zones de l'image qui contiennent cet élément seront brillantes. Or, l'examen des clichés STEM-HAADF révèle des points très brillants sur des formes grises qui se dégagent d'un fond noir (Figure 5-7). Comme l'élément or contenu dans les nanoparticules d'or possède un numéro atomique nettement plus élevé que celui du fer (79 contre 26), nous pouvons en déduire que les points très brillants sur les formes grises sont les nanoparticules d'or greffées sur les nanofleurs de maghémite. L'excellent contraste entre les nanoparticules d'or (points très brillants) et la grille (fond noir) confirme, d'une façon encore plus catégorique, l'efficacité des étapes de purification car aucun point brillant isolé ne se détache du fond noir. En clair, toutes les nanoparticules d'or présentes dans les échantillons imagés après les réactions de greffage se trouvent exclusivement sur les nanofleurs.

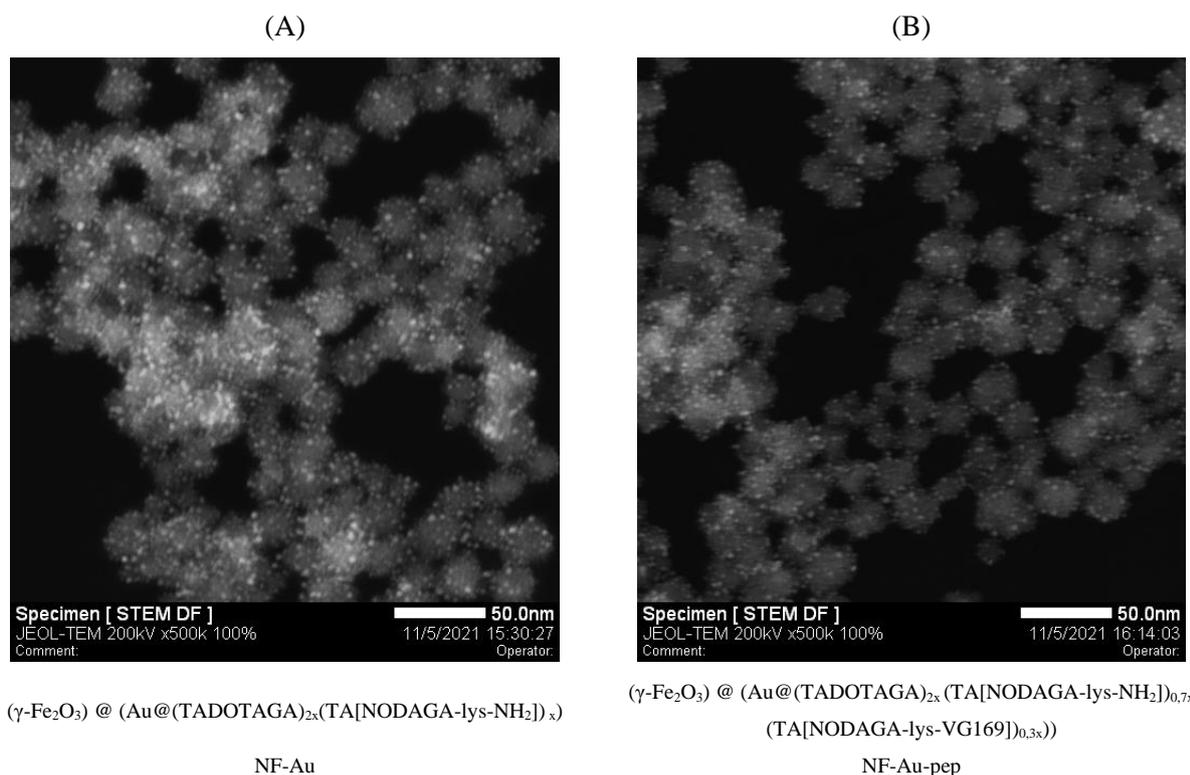


Figure 5-7 : Clichés STEM des différents types des nanofleurs dorées. (A) NF-Au et (B) NF-Au-pep (barre d'échelle 50 nm).

Grâce à la microscopie électronique, il a été possible de déterminer la taille des nanofleurs et des nanofleurs dorées. Comme les nanoparticules d'or sont de taille nettement plus petite que celle des nanofleurs et comme elles ne forment pas une coquille uniforme autour des nanofleurs dont la forme n'est pas régulière, leur présence n'exerce pas une réelle influence sur la taille des objets finaux. Le diamètre des nanofleurs et des nanofleurs dorées est par conséquent semblable, compris entre 20 et 30 nm (Figure 5-6 et Figure 5-7).

Cependant, la mesure du diamètre hydrodynamique met en évidence une augmentation de la taille des nanofleurs après le greffage des nanoparticules d'or et après la post-fonctionnalisation par le peptide VG-169 (Tableau 5-1). En effet, la taille obtenue à partir des clichés TEM et le diamètre hydrodynamique recouvrent des réalités physiques et chimiques différentes. Alors que les dimensions déterminées à partir du TEM ne prennent en compte que les parties denses visibles en TEM, le diamètre hydrodynamique inclut en plus des parties denses, les couches organiques présentes à la surface des nanostructures et les couches de solvation solidaires des nanofleurs (i.e. indépendantes du milieu liquide dont elles proviennent). L'épaisseur de ces différentes couches dépendent des interactions avec le milieu environnant. De plus, les formes complexes des nanofleurs ne facilitent pas la mesure de leurs dimensions à partir des clichés TEM qui a été réalisée en prenant la dimension qui semblait la plus large (en ignorant par exemple la hauteur de ces objets). Si la forme irrégulière constitue également une difficulté pour la mesure du diamètre hydrodynamique, la mesure semble tout de même plus fiable car elle concerne une population plus vaste de nanofleurs qui, en outre, ne sont pas figées dans une position privilégiée du fait des mouvements au sein de la suspension.

Nanoparticules	NPs-Au	NPs-Au-pep	Nf	Nf-Au	Nf-Au-pep
Diamètre hydrodynamique (nm)	6,9 ± 3,2	6,5 ± 1,1	46,7 ± 14,3	66,1 ± 35,7	73,4 ± 35,9

Tableau 5-1 : Diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or avec et sans peptide, des nanofleurs et des nanofleurs dorées avec et sans peptide.

D'après le Tableau 5-1 qui rassemble les diamètres hydrodynamiques des nanoparticules d'or avec et sans peptide, des nanofleurs et des nanofleurs dorées avec et sans peptide, l'immobilisation des nanoparticules d'or sur les nanofleurs conduit à une augmentation du diamètre hydrodynamique des nanofleurs dorées. Dans le cas des nanofleurs dorées sans peptide, la différence de diamètre hydrodynamique avec celui des nanofleurs « nues » est légèrement supérieur à deux fois le diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or. Ce résultat est cohérent avec la présence, même discontinue, de nanoparticules sur toute la surface des nanofleurs. La différence de taille est encore plus grande entre les nanofleurs et les nanofleurs dorées avec peptide, ce qui semble indiquer la présence du peptide sur les nanoparticules d'or greffées sur les nanofleurs. En plus d'une augmentation du diamètre hydrodynamique, le greffage des nanoparticules d'or sur les nanofleurs s'accompagne d'un élargissement de la distribution en taille. L'écart-type des mesures est nettement plus grand pour les nanofleurs dorées avec et sans peptide (Tableau 5-1). Une telle différence reflète probablement un accroissement de la complexité des nanostructures après le greffage des nanoparticules d'or.

L'information la plus importante que nous pouvons extraire de la mesure du diamètre hydrodynamique concerne le comportement *in vivo* des nanoparticules d'or et des nanofleurs dorées. Le faible diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or (moins de 10 nm) est compatible avec une élimination rénale alors que les nanofleurs dorées présentent un diamètre hydrodynamique largement supérieur au seuil en dessous duquel l'élimination rénale peut être observée (Tableau 5-1). Contrairement aux nanoparticules d'or mais conformément à notre objectif, ces nanofleurs ne pourront pas être éliminées par voie rénale.

Si la taille, et en particulier le diamètre hydrodynamique, constitue un paramètre important pour le comportement *in vivo* des nanoparticules, d'autres caractéristiques, au moins autant déterminantes, doivent être prises en compte. Parmi elles, la stabilité colloïdale est cruciale car aucune application *in vivo* n'est envisageable si elle n'est pas suffisante. Comme déjà mentionnée, les suspensions de nanofleurs d'oxyde de fer ne sont pas stables à pH physiologique car leur potentiel Zêta (Figure 3-4) est proche de zéro (point isoélectrique). En plus des phénomènes magnétiques, la faible répulsion électrostatique, caractéristique des nanoparticules neutres ou faiblement chargées, favorise l'agglomération des nanofleurs et déstabilise les suspensions colloïdales préparées à partir de ces nanofleurs à pH physiologique. [17]

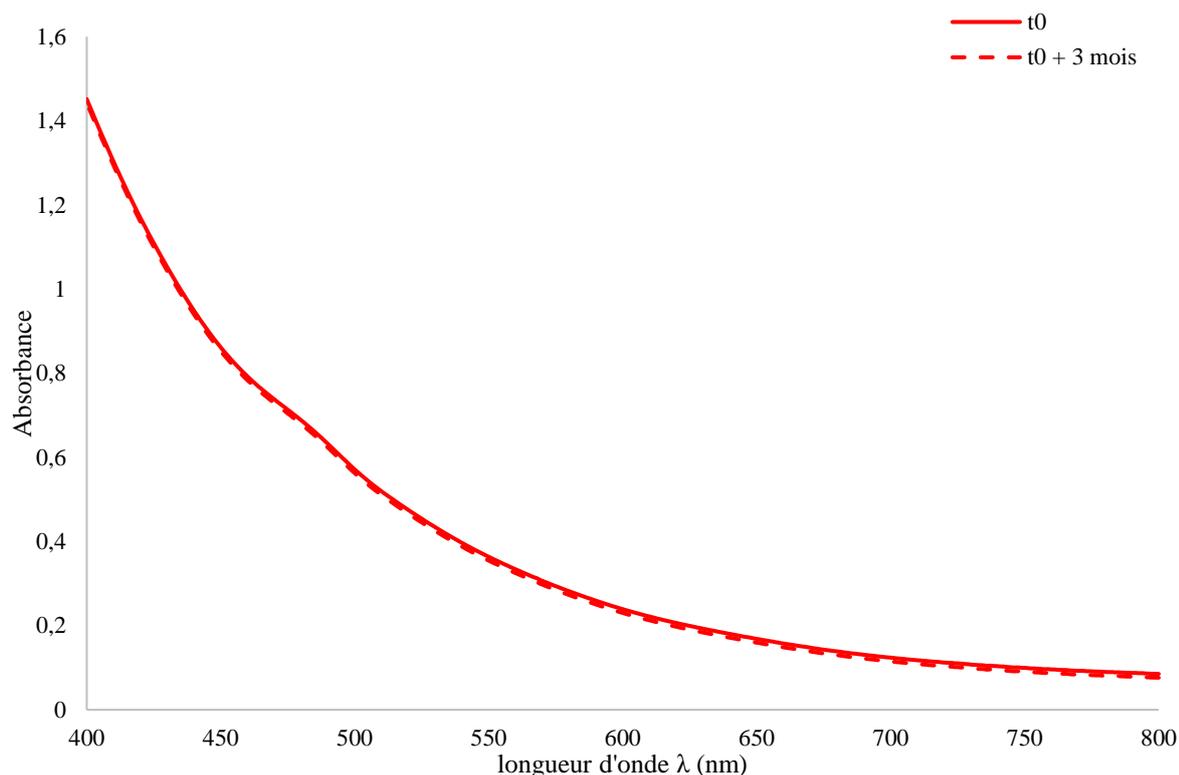


Figure 5-8 : Spectres UV-Visible entre 400 et 800 nm des suspensions de nanofleurs dorées sans peptide à deux temps différents à pH physiologique

Mais le greffage des nanoparticules d'or $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{2x} (\text{TA}[\text{NODAGA-lys-NH}_2])_x$ améliore considérablement la stabilité colloïdale des nanofleurs (Figure 5-8). Comme les spectres enregistrés à trois mois d'intervalle à pH physiologique sont parfaitement superposés, nous pouvons en déduire que la composition du colloïde et la distribution des nanofleurs dorées dans la suspension ne sont pas modifiées pendant au moins trois mois. Autrement exprimé, la stabilité colloïdale des nanofleurs dorées est observée au moins pendant les trois mois qui suivent la mise en suspension des nanofleurs dorées alors que les nanofleurs sans nanoparticules d'or précipitent après quelques heures. Cette amélioration drastique de la stabilité colloïdale induit par le greffage des nanoparticules d'or s'explique par la forte charge négative des nanoparticules d'or sur une large gamme de pH ($\text{pH} > 2$, Figure 5-4). Elle modifie nettement l'évolution du potentiel zêta des nanofleurs en fonction du pH (Figure 5-9).

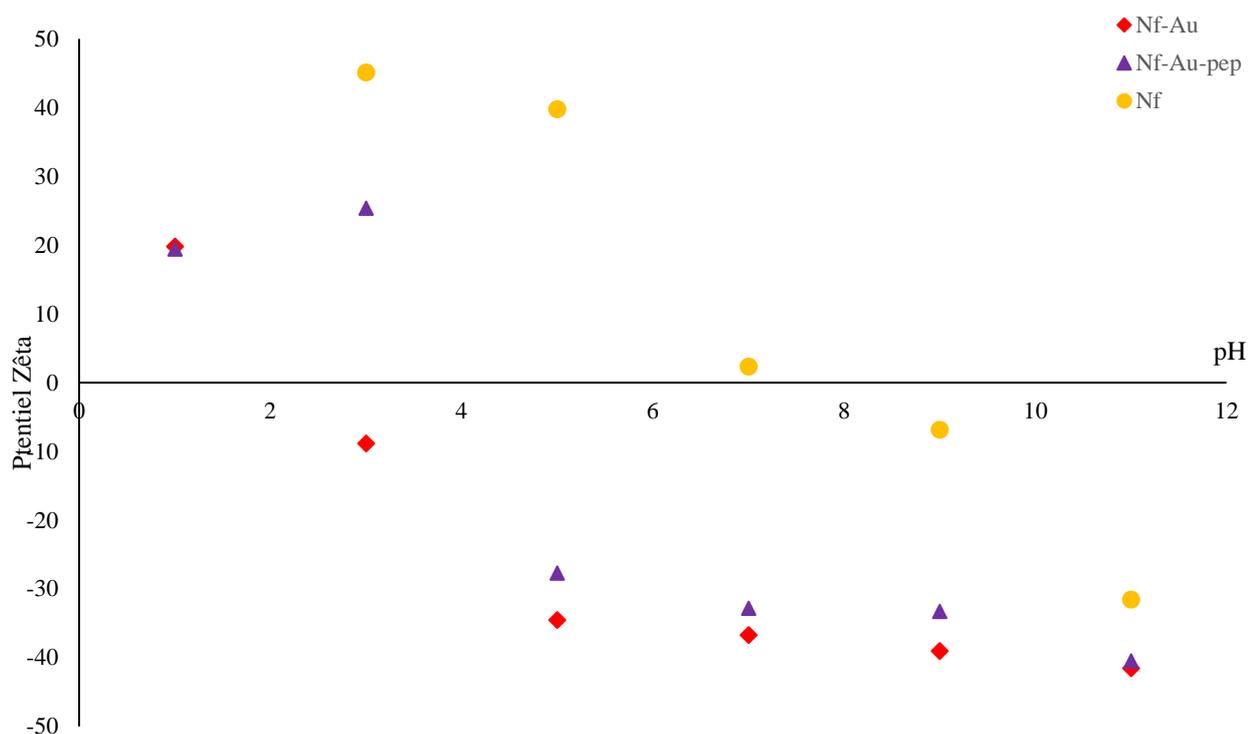


Figure 5-9 : Courbes du potentiel Zêta des nanofleurs, des nanofleurs dorées avec et sans peptides en fonction du pH des suspensions colloïdales

L'évolution du potentiel zêta en fonction du pH est effectivement nettement différente entre les nanofleurs et les nanofleurs dorées (avec ou sans peptide). Dans le cas des nanofleurs nues, le pH de charge nulle est situé aux alentours de pH 8 (c'est-à-dire proche du pH physiologique) alors que pour les nanofleurs dorées, le pH de charge nulle est compris entre 1 et 4 (selon la présence ou non de peptides). Les nanofleurs dorées présentent donc un potentiel Zêta négatif à pH physiologique (7,4) alors que celui des nanofleurs est proche de zéro à pH 7,4.

D'autre part, le potentiel Zêta à pH 3 des nanofleurs dorées avec peptide est de 20 mV alors qu'il est de -10 mV pour les nanofleurs dorées sans peptide. Cette différence peut être expliquée par la présence des groupements amines attribués aux peptides à la surface des nanofleurs dorées. Cela peut être une indication de la présence du peptide ce qui peut être vérifié par d'autres caractérisations comme l'XPS.

Ces résultats montrent que les nanofleurs dorées sont mieux adaptées que les nanofleurs pour les applications médicales *in vivo*. D'après les mesures du potentiel ζ en fonction du pH, les suspensions colloïdales de nanoparticules d'or avec et sans peptide et les nanofleurs dorées avec et sans peptide auront un potentiel ζ négatif en milieu biologique (pH=7,4). La stabilité colloïdale sera ainsi garantie par répulsion électrostatique entre les nanoparticules chargées négativement. En outre la charge négative devrait limiter le phénomène d'opsonisation qui peut être résumé par la formation d'une couronne de protéines (opsonines) autour des particules conduisant à une capture fulgurante et massive par les organes riches en cellules phagocytiques. Comme l'opsonisation entrave l'accumulation préférentielle dans les tumeurs (du fait de la

capture massive des nanoparticules qui s'accumulent dans le foie, la rate, la moëlle épinière...), la réduction de ce phénomène est alors avantageuse pour les applications *in vivo*.

La caractérisation physico-chimique des nanoparticules d'or et des nanofleurs a révélé qu'elles possèdent des propriétés adaptées pour leur utilisation *in vivo*. La comparaison entre les nanoparticules d'or et les nanofleurs dorées permettra d'étudier l'influence des nanotransporteurs et du peptide de ciblage sur le comportement *in vivo* des nanoparticules d'or. Alors que le greffage des nanoparticules d'or sur les nanofleurs avait été imaginé pour mieux exploiter le potentiel des nanoparticules d'or, nous constatons que cette stratégie bénéficie également à l'objet final qui, du fait de sa meilleure stabilité colloïdale et de sa charge négative, sera plus facile à manipuler en milieu biologique.

6. Biodistribution des différents types de nanoparticules administrées à des souris saines

6.1. Protocole

6.1.1. Animaux

Des souris femelles BALB/cByJ âgées de 8 semaines sont utilisées dans cette étude. Les souris reçoivent une injection intraveineuse de 100 μ L de suspension de nanoparticules d'or et de nanofleurs dorées (3 souris par type de nanoparticules). L'activité injectée pour la suspension Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH₂])_x est de 4,38 MBq, 4,88 MBq pour les nanoparticules d'or avec peptide Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH₂])_{0,7x}(TA[NODAGA-lys-VG169])_{0,3x}, 12,25 MBq pour NF-[Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH₂])_x] (nanofleurs dorées) et 11,04 MBq pour NF-[Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH₂])_{0,7x}(TA[NODAGA-lys-VG169])_{0,3x}] (nanofleurs dorées avec peptide). Par conséquent, les images ne permettent pas une comparaison directe de la biodistribution après injection intraveineuse des différentes suspensions.

6.1.2. IRM/TEP

Un système intégré d'imagerie IRM/TEP créé dans le cadre du projet IMAPPI a été utilisé pour imager des souris saines. Elles ont été placées sur un lit qui a été inséré dans la chambre d'imagerie IRM/TEP après avoir été anesthésiées à l'isoflurane (2% d'oxygène). Une imagerie IRM/TEP simultanée a été réalisée 1, 24 et 120 heures après injection de nanoparticules radiomarquées au cuivre-64. Un imageur IRM (aimant sec 7T ; Powerscan MRS-7024-PW MR solutions, Guiford, UK) a été connecté à un imageur TEP (SiPM dual-ring TEP-I-802 insert) dans l'imageur IRM/TEP. Les acquisitions de l'IRM et de la TEP ont été effectuées en même temps. Un capteur de pression abdominale et un logiciel personnalisé ont été utilisés pour surveiller la respiration des animaux (PC Sam, SAI, Stony Brook, USA). Le système TEP a été utilisé pour recueillir des données pendant 30 à 60 minutes. Avec deux itérations, 32 sous-ensembles et une taille de voxel isotrope de 0,28 mm³, les images ont été reconstruites à l'aide de la méthode OSEM (maximisation attendue des sous-ensembles ordonnés en 3D) intégrée au système.

Avec une synchronisation respiratoire et des séquences dans les plans axial et coronal, des images IRM à spin rapide pondérées en T_1 et T_2 ont été obtenues. Les séquences T_1 ont été obtenues avec un temps de répétition (TR) de 1000 ms et un temps d'écho (TE) de 11 ms. Les séquences T_2 ont été enregistrées avec un TR de 4000 millisecondes et un TE de 45 millisecondes. Les paramètres suivants ont été imposés: angle de bascule de 90° , moyenne de 4 signaux, épaisseur de tranche de 1 mm, taille de pixel transaxial de $0,15 \times 0,15 \text{ mm}^2$ et matrice de 256×256 pixels.

6.1.3. Analyse *ex vivo* de la biodistribution

Après 24 heures, les souris sont sacrifiées et les organes sont récupérés pour des analyses *ex vivo* de la biodistribution des nanoparticules en mesurant la radioactivité par comptage γ et la quantité d'or par ICP-OES dans les différents organes des souris ayant reçu une injection des nanoparticules par voie intraveineuse.

La radioactivité de plusieurs organes d'intérêt prélevés sur les animaux étudiés en imagerie a été mesurée à l'aide d'un compteur gamma Cobra 418 (Perkin Elmer) afin d'estimer la quantité de radioéléments présents dans les organes. Cette mesure a été réalisée par les personnels du CGFL sous la direction de Dr Alexandra Oudot.

L'ICP-OES a permis de déterminer la quantité d'or après dissolution des organes et des nanoparticules qu'ils contenaient.

6.1.4. Analyse ICP-OES

Les différents organes collectés des souris après injection par des nanoparticules sont minéralisés avec de l'eau régale chaude dans des tubes de minéralisation calibrés (DigiTUBEs, SCP Sciences). Il faut préciser que, dans le cas où des nanoparticules d'or radiomarquées ont été administrées, le prélèvement a été effectué après décroissance radioactive complète. Les tubes sont placés dans un bloc de minéralisation (Digiprep, SCP science) afin d'atteindre une température de 120°C jusqu'à dissolution complète des organes. Le volume est ensuite ajusté au trait de jauge (50 mL) en utilisant de l'acide nitrique à 5%. La solution est ensuite filtrée à l'aide d'une seringue munie d'un filtre de $0,22 \mu\text{m}$ afin d'éliminer tout résidu éventuel.

L'échantillon est ensuite analysé à l'aide d'un ICP-OES modèle 710 ES (Varian/Agilent) équipé d'une torche axiale, d'un nébuliseur concentrique et d'une chambre de nébulisation cyclonique du laboratoire Qualio à Besançon. Les paramètres suivants ont été utilisés : une puissance de 1,2 kW, un débit d'argon plasmagène de $15 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, un débit d'argon auxiliaire de $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, et une pression de nébulisation de 200 kPa. Les longueurs d'onde d'émission utilisées pour mesurer la concentration en or sont 267,594 nm, 242,794 nm et 208,207 nm.

6.2. Résultats et discussion

Après le radiomarquage au cuivre-64 ($[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$) des nanoparticules, des images IRM/TEP ont été acquises 1 h, 24 h et 120 h après injection intraveineuse pour vérifier l'effet des nanotransporteurs d'oxyde de fer et du peptide de ciblage sur la biodistribution des nanoparticules d'or (Figure 6-1 et Figure 6-2).

Les ions gadolinium, complexés par les chélateurs DOTAGA présents à la surface des nanoparticules d'or, se comportent comme des agents de contraste positif pour l'IRM alors que les nanofleurs d'oxyde de fer sont des agents de contraste négatif pour l'IRM.

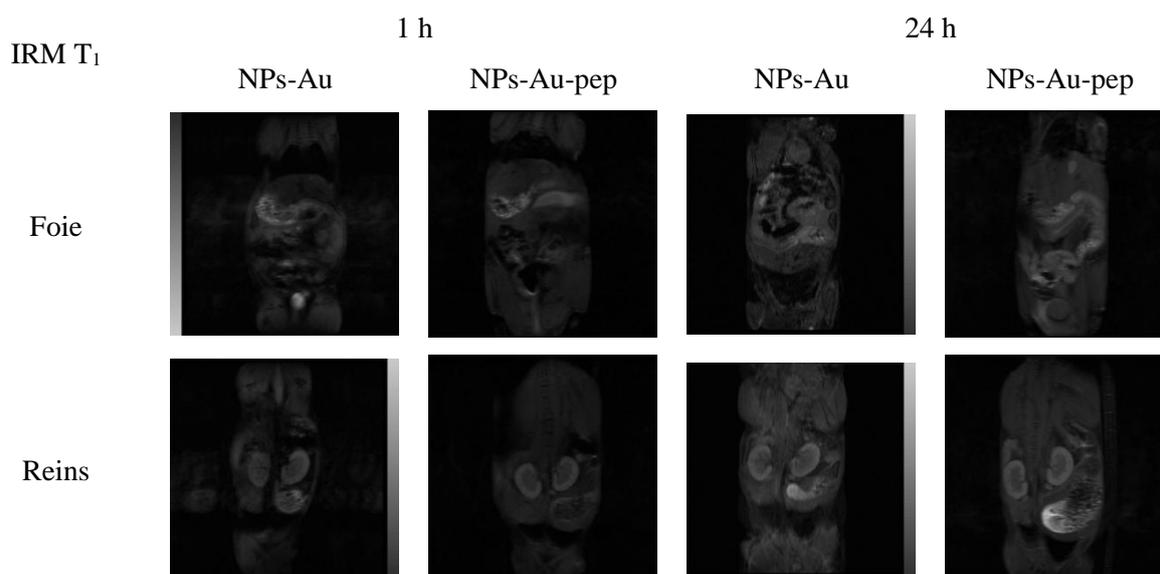


Figure 6-1 : Images IRM (T_1) centrées sur le foie et les reins et acquises 1 h et 24 h après injection intraveineuse des nanoparticules d'or avec et sans peptide (NPs-Au et NPs-Au-pep) à des souris saines

La capacité des nanoparticules d'or et des nanofleurs dorées de contraster les images acquises par IRM est vérifiée par les images IRM. Dans le cas des nanoparticules d'or marquées au gadolinium (ion paramagnétique), un rehaussement de contraste positif caractérisé par un blanchiment de l'image est observé dans le foie et les reins qui paraissent plus clairs quand les souris saines ont reçu une dose de nanoparticules d'or avec et sans peptide par injection intraveineuse (Figure 6-1). Dans le cas des nanofleurs dorées, le caractère superparamagnétique de la maghémite induit un rehaussement du contraste négatif sur les images IRM (T_2) au niveau du foie et des reins qui paraissent plus sombres chez les souris après injection intraveineuse d'une suspension de nanofleurs dorées avec et sans peptide (Figure 6-2).

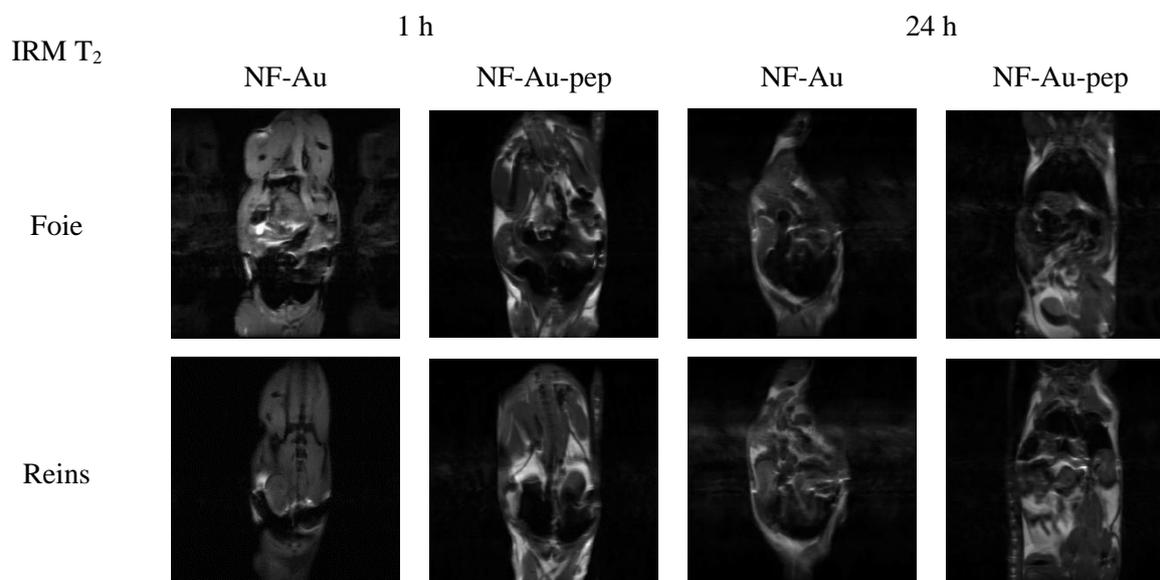


Figure 6-2 : Images IRM (T₂) centrées sur le foie et les reins et acquises 1 h et 24 h après injection intraveineuse des nanofleurs dorées avec et sans peptide (NF-Au et NF-Au-pep) à des souris saines.

En plus de complexer le gadolinium, la couche organique des nanoparticules d'or contient le chélateur NODAGA qui est réputé pour former des complexes stables avec des radioéléments comme le cuivre-64. La présence sur une même nanoparticule d'or d'ions gadolinium et cuivre-64 permet de recourir à l'imagerie simultanée IRM/TEP. Dans le cas des nanofleurs dorées, l'imagerie simultanée IRM/TEP est rendue possible par le caractère superparamagnétique des nanofleurs (IRM pondérée T₂) et par le radiomarquage des nanoparticules d'or greffées sur les nanofleurs avec les ions cuivre-64 émetteurs de positons.

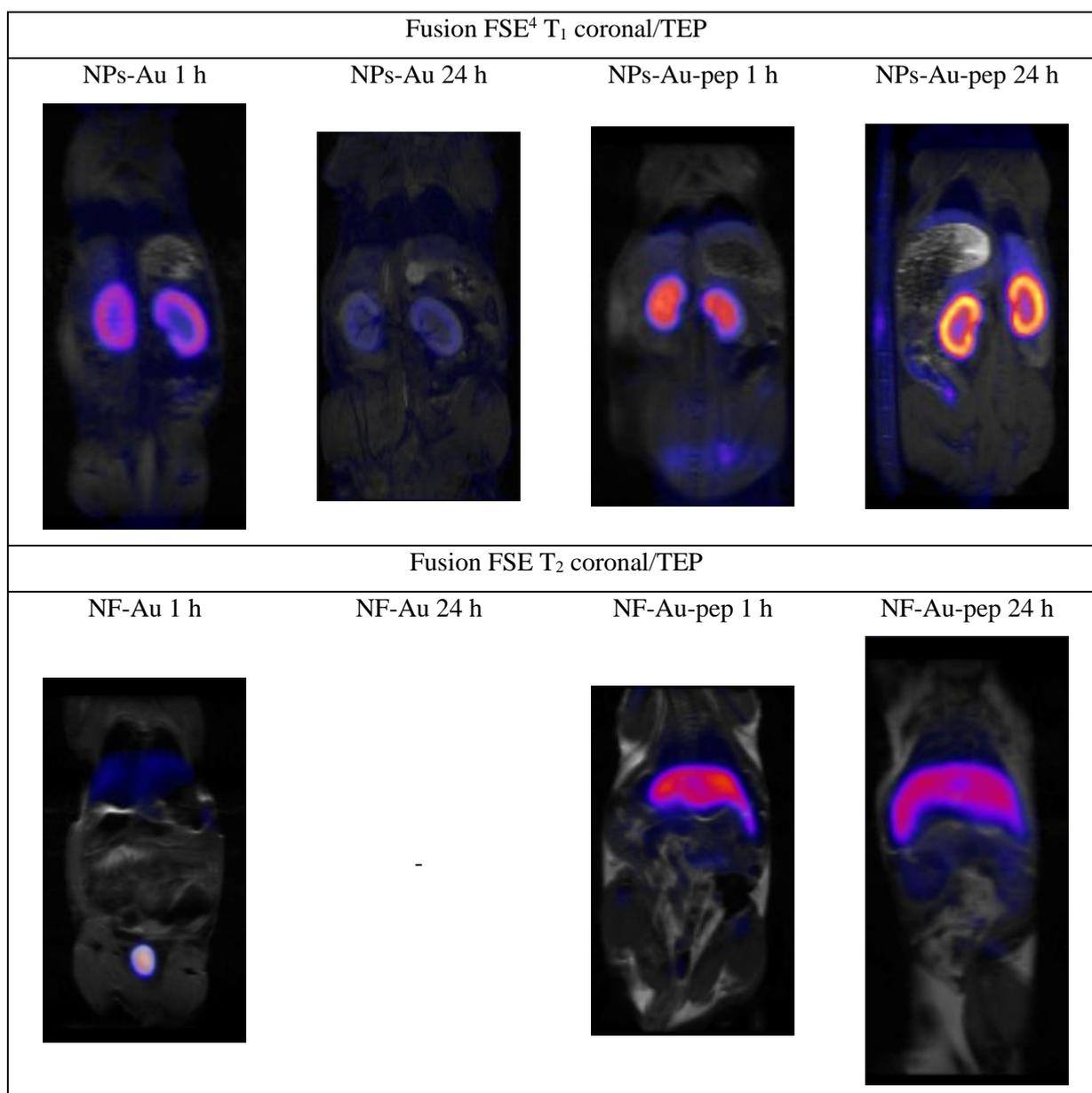


Figure 6-3 : Images IRM/TEP acquises 1 h et 24 h après injection intraveineuse des nanoparticules à des souris saines.

Les images de souris après injection intraveineuse de différentes suspensions de nanoparticules d'or avec et sans peptide et de nanofleurs dorées avec et sans peptide révèlent initialement une radioactivité importante dans différents organes, suggérant la présence de nanoparticules radioactives et donc la possibilité de suivre ces nano-objets. D'après les images fusionnées à partir des acquisitions simultanées IRM/TEP, nous constatons que les nanoparticules d'or sont majoritairement présentes dans les reins 1 h et 24 h après l'injection intraveineuse alors que les nanofleurs dorées sont préférentiellement retenues dans le foie et y séjournent au moins 24 h. Les nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH₂])_x dont le profil de biodistribution est très similaire à celui des nanoparticules d'or Au@TADOTAGA semblent être plus rapidement éliminées de l'organisme que les nanofleurs. Rapidement elles s'accablent

⁴ Fast spin-echo

dans les reins mais la quantité de nanoparticules dans les reins diminuent rapidement car elle est nettement plus faible 24 h qu'une heure après l'injection. Quel que soit le type de nanoparticules, l'absence d'accumulation dans les organes autres que ceux impliqués dans l'élimination (reins, foie) est le signe que ces différentes nanoparticules possèdent un comportement sain.

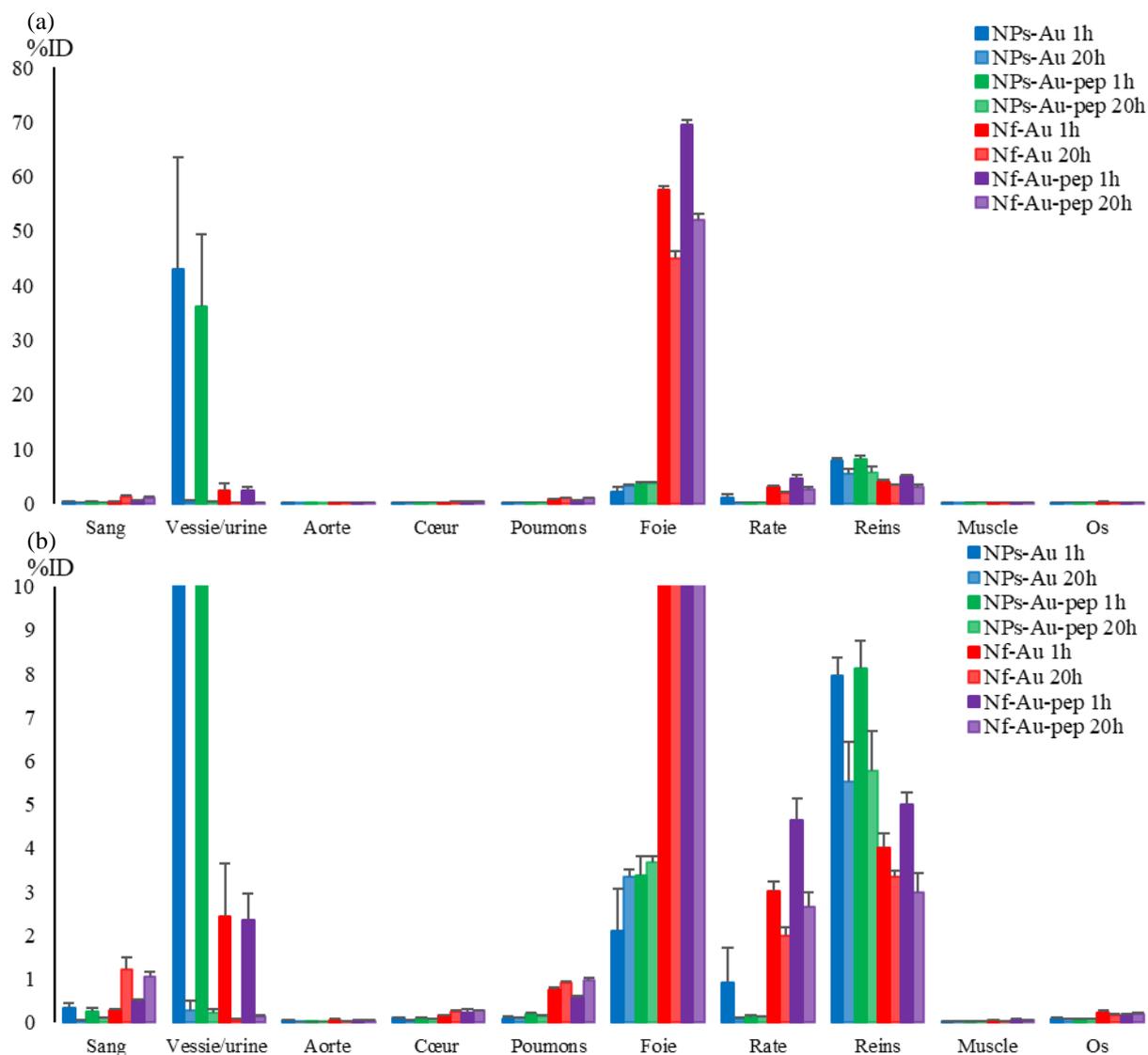


Figure 6-4 : Le pourcentage moyen de dose injectée (%ID) par comptage gamma des différentes nanoparticules en fonction des organes 1 heure et 20 heures après injection intraveineuse, (a) échelle complète et (b) agrandissement d'échelle

L'étude de biodistribution a été complétée par le dosage de la quantité d'or dans les organes des animaux ayant reçu le même lot de nanoparticules afin de confirmer les résultats du comptage gamma (Figure 6-4 et Figure 6-5) et les données collectées par l'imagerie simultanée IRM/TEP.

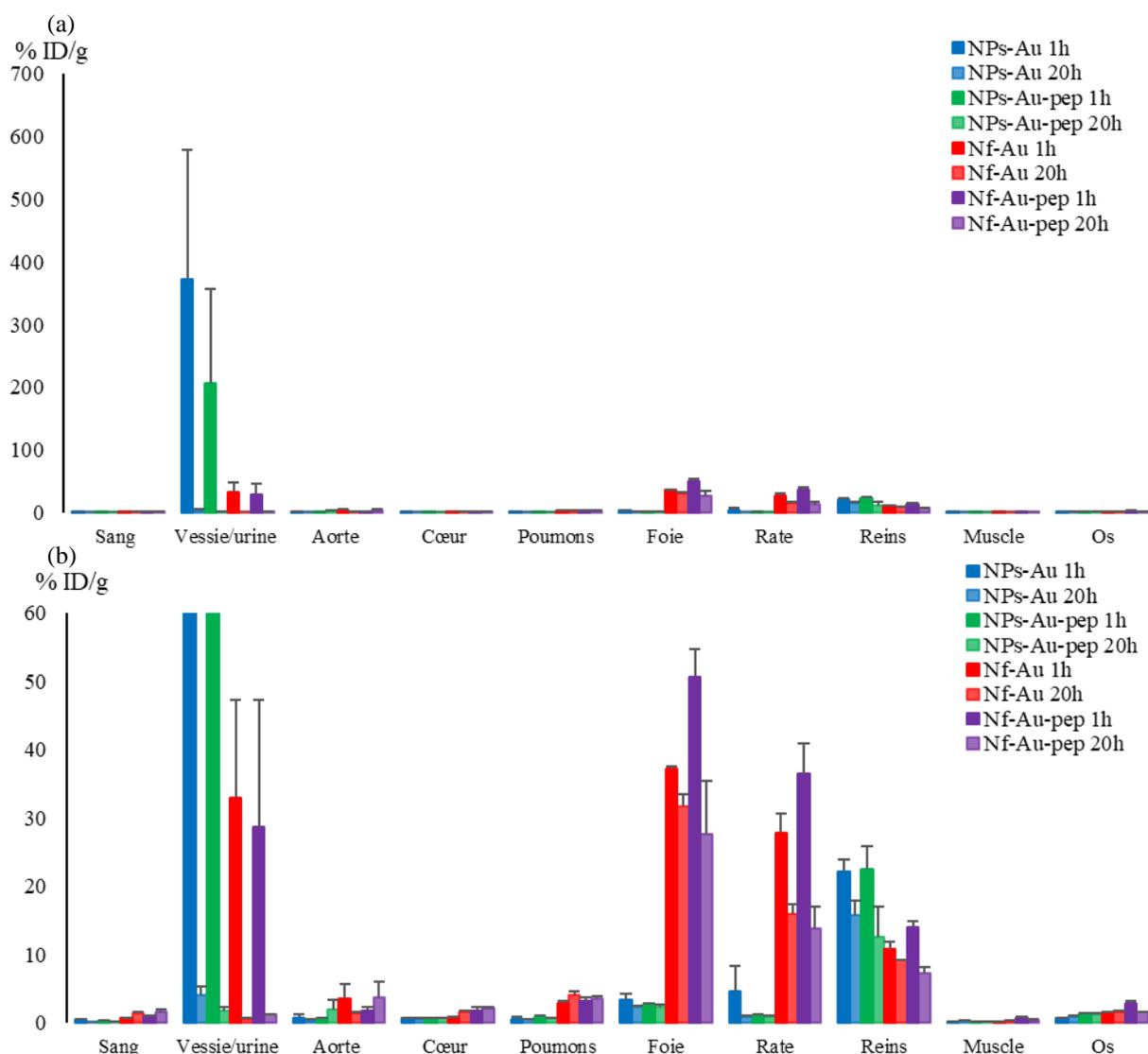


Figure 6-5 : Le pourcentage moyen de dose injecté par gramme d'organe (%ID/g) par comptage gamma des différents nanoparticules 1 heure et 20 heures après injection intraveineuse (a) échelle complète et (b) agrandissement d'échelle

Les résultats obtenus par dosage ICP-OES (Figure 6-6 et Figure 6-7) semblent cohérents avec ceux obtenus par comptage gamma (Figure 6-4 et Figure 6-5). Globalement, l'allure des graphes tracés à partir du comptage γ et de l'analyse ICP est semblable. Cette similitude entre comptage γ et dosage chimique suggère une colocalisation de l'or et du radionucléide et confirme l'interprétation des images acquises par imagerie simultanée IRM/TEP.

D'une manière générale, les nanoparticules $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{2x} (\text{TA}[\text{NODAGA-lys-NH}_2])_x$ avec et sans peptide et les nanofleurs dorées avec et sans peptide sont présentes en quantité importante dans le foie, les reins, la rate et l'urine (entre 60% et 80%) par rapport aux autres organes. Ces organes sont impliqués dans l'élimination rénale et hépatobiliaire. D'autre part, ces nanoparticules ne s'accumulent pas dans d'autres organes comme les poumons, le cœur, les muscles. Le comportement de ces différentes nanoparticules est sain car elles ne s'accumulent pas dans les organes autres que ceux impliqués dans l'élimination des nanoparticules.

Les nanoparticules d'or se trouvent en quantité importante principalement dans la vessie et les reins 1 heure après injection intraveineuse. L'accumulation de ces nanoparticules n'est pas durable car la quantité déduite des comptages γ et des dosages ICP est plus faible 24 h après injection intraveineuse. La présence des nanoparticules d'or dans l'urine et la diminution du nombre de nanoparticules dans les reins prouvent leur élimination rapide de l'organisme par la voie rénale. Cette étude confirme les observations réalisées au cours de travaux antérieurs avec des nanoparticules d'or semblables (Au@DTDTPA et Au@TADOTAGA) qui circulent librement après injection intraveineuse sans accumulation indésirable dans les organes autre que ceux impliqués dans l'élimination. La petite taille et le caractère hydrophile de ces nanoparticules sont probablement à l'origine de cette élimination rapide par voie rénale. Mais leur comportement est différent lorsqu'elles sont greffées sur les nanofleurs.

Les nanofleurs dorées avec et sans peptide sont plus présentes dans le foie et la rate que ne le sont les nanoparticules d'or. Il faut noter que la quantité accumulée dans le foie et la rate diminue au cours du temps. Leur accumulation dans le foie n'est pas le résultat de l'opsonisation car elle n'est ni fulgurante, ni massive, ni durable. Elle suggère que les nanofleurs dorées sont éliminées par la voie hépatobiliaire. Cette voie d'élimination semble dans le cas des nanofleurs dorées privilégiée. En effet, leurs dimensions, nettement supérieures à la limite observée pour l'élimination rénale (D_h de l'ordre de 40 nm pour un seuil de clairance rénale de 6-10 nm) ne sont pas compatibles avec une élimination par voie rénale. Cependant, les images acquises par imagerie simultanée IRM/TEP et les graphes tracés à partir des données recueillies par le comptage γ et les analyses ICP montrent la présence de nanoparticules d'or dans la vessie et les reins. Cette présence suggère un détachement de quelques nanoparticules d'or à partir des surfaces de nanofleurs. Malgré leur large taille, les nanofleurs ne s'accumulent pas dans les organes autres que ceux impliqués dans l'élimination des nanoparticules. Malgré le détachement des nanoparticules d'or que semble suggérer la présence de la radioactivité de l'or dans la vessie (urine) et les reins, des nanofleurs dorées présentent tout comme les nanoparticules d'or un comportement sain après injection intraveineuse car les nanoparticules détachées sont éliminées par la voie rénale et les nanofleurs dorées sont éliminées par la voie hépatobiliaire sans qu'il y ait d'accumulation des nanostructures dans d'autres organes.

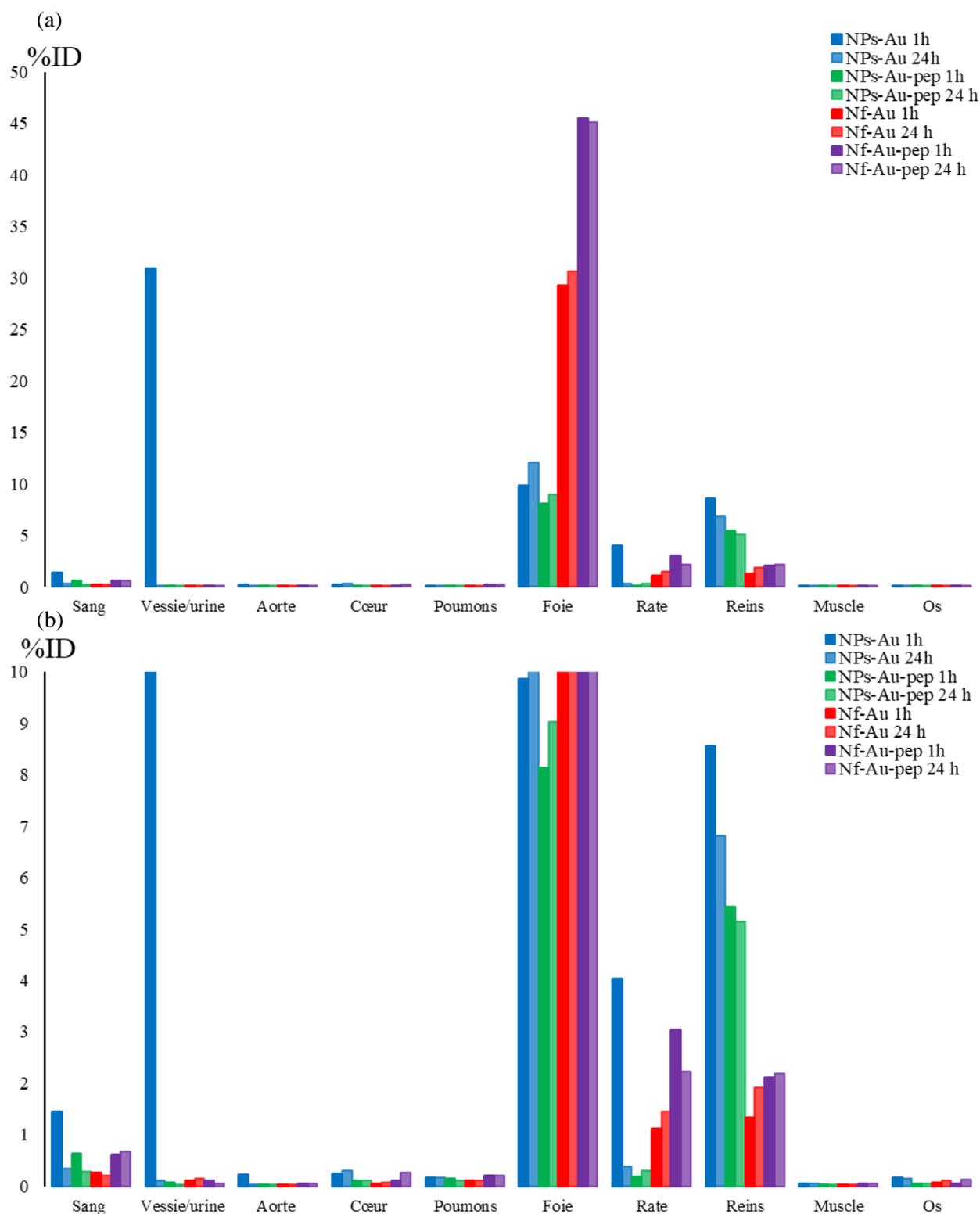


Figure 6-6 : Le pourcentage moyen de dose injecté (%ID) par ICP des différents types de nanoparticules en fonction des organes 1 heure et 20 heures après injection intraveineuse (a) échelle complète et (b) agrandissement d'échelle

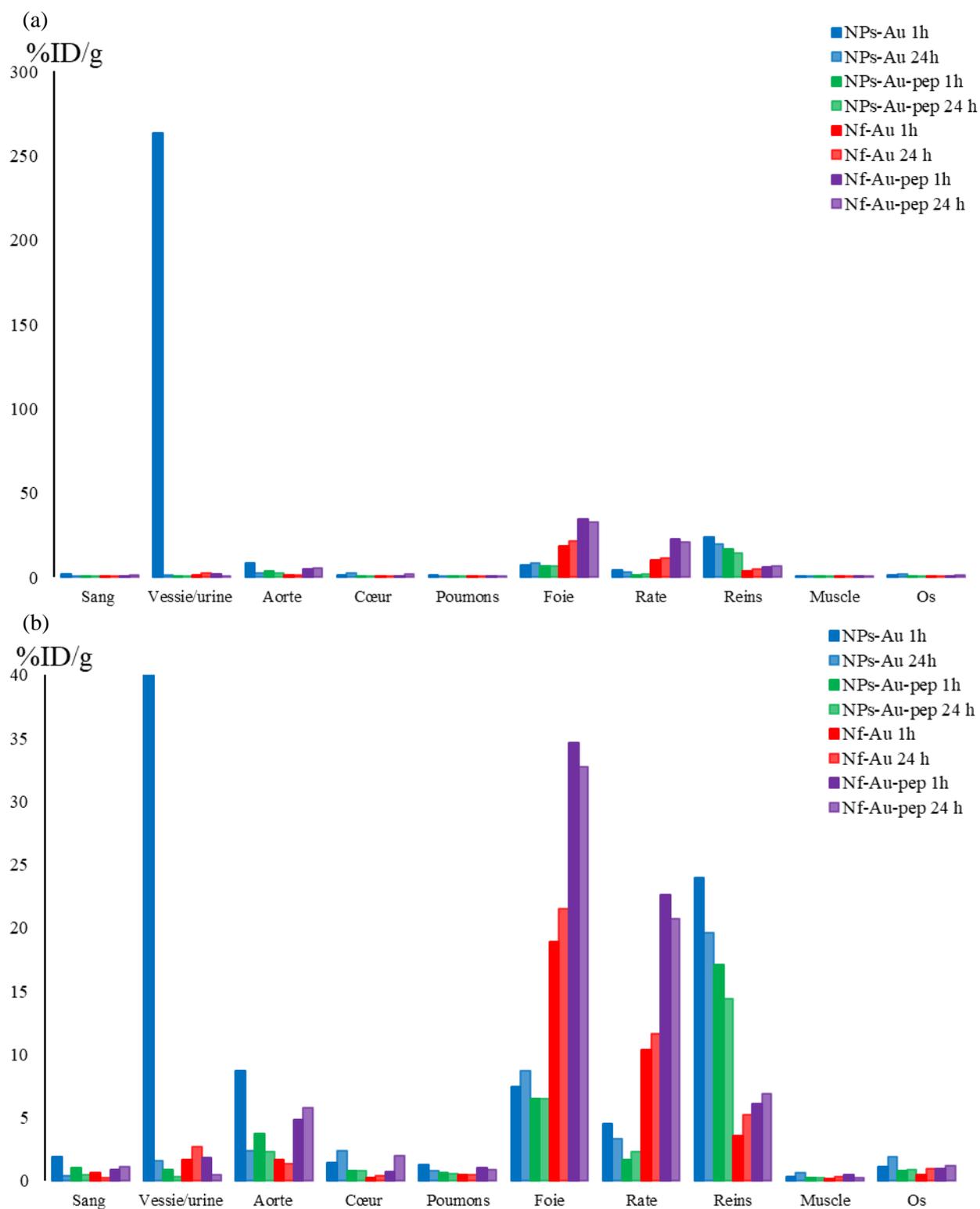


Figure 6-7 : Le pourcentage moyen de dose injecté par gramme d'organes (%ID/g) par ICP des différents types de nanoparticules 1 heure et 20 heures après injection intraveineuse (a) échelle complète et (b) agrandissement d'échelle

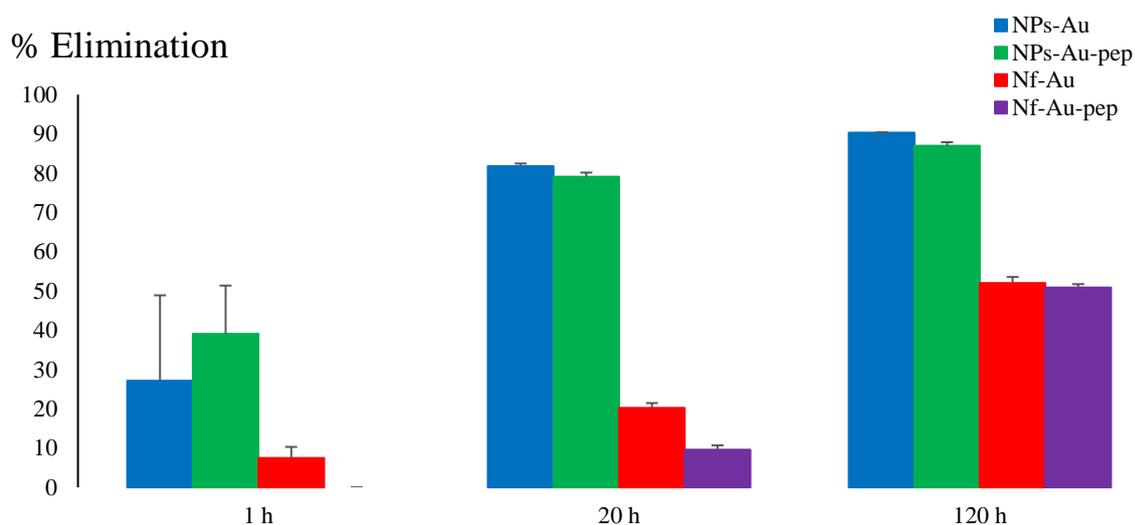


Figure 6-8 : Le pourcentage moyen de dose de nanoparticules injecté éliminé de l'organisme 1 h, 24 h et 120 h après injection intraveineuse des suspensions de nanoparticules d'or avec et sans peptide et des nanofleurs dorées avec et sans peptide

La Figure 6-8 montre que les nanoparticules d'or avec et sans peptide sont éliminées au bout de 20 heures après injection intraveineuse (le pourcentage d'élimination est supérieur à 80%) alors que les nanofleurs dorées avec et sans peptide sont éliminées de façon plus lente. Le graphique montre que 120 heures après l'injection environ 50% des nanofleurs sont éliminées de l'organisme contre environ 90% pour les nanoparticules d'or non supportées. Le greffage des peptides sur les nanoparticules d'or n'influence pas leur élimination très rapide. L'élimination des nanofleurs dorées avec peptide est moins rapide que celle des nanofleurs dorées sans peptide durant les vingt premières heures qui suivent l'injection intraveineuse. Comme les souris sont saines, le ciblage par le peptide ne peut pas être effectif. La différence observée dans l'élimination des nanofleurs avec et sans peptide peut donc être attribuée à la modification de la chimie de surface des nanofleurs dorées qui exerce alors une influence sur la pharmacocinétique.

7. Biodistribution des différents types de nanoparticules administrées à des souris malades

7.1. Protocole

7.1.1. Animaux

Des souris LDLr KO qui n'expriment pas le récepteur aux LDL (Jackson laboratory – USA) ont été nourries avec un régime enrichi en graisse : Western-type Diet, réf n°1635 (0,2% cholestérol et 21% beurre laitier), de la société SAFE (Augy, France) pour une période de 12 semaines à partir de l'âge de 9 semaines.

Ces souris ont reçu une injection intraveineuse de 100 μ L de suspension de nanoparticules d'or avec et sans peptide et de nanofleurs dorées avec et sans peptide. Les nanoparticules et nanofleurs ont été radiomarquées par l'ion cuivre-64 ($[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$). L'activité injectée pour la suspension de nanoparticules

d'or sans peptide $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2x}\text{(TA[NODAGA-lys-NH}_2\text{])}_x$ est de 4,48 MBq, 12,53 MBq pour $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2x}\text{(TA[NODAGA-lys-NH}_2\text{])}_{0,7x}\text{(TA[NODAGA-lys-VG169])}_{0,3x}$ (nanoparticules d'or avec peptide), 11,84 MBq pour $\text{NF-}[\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2x}\text{(TA[NODAGA-lys-NH}_2\text{])}_x]$ et 12,09 MBq pour $\text{NF-}[\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2x}\text{(TA[NODAGA-lys-NH}_2\text{])}_{0,7x}\text{(TA[NODAGA-lys-VG169])}_{0,3x}]$ (nanofleurs dorées avec et sans peptide, respectivement). Par conséquent, les images ne permettent pas une comparaison directe de la biodistribution entre les différentes suspensions.

7.1.2. Imagerie simultanée IRM/TEP

Comme les nanoparticules d'or et les nanofleurs dorées sont conçues pour exercer un effet sur le rehaussement du contraste (positif pour les nanoparticules d'or en raison de la présence des ions gadolinium et négatif du fait du caractère superparamagnétique des nanofleurs de maghémite) et émettre des positons (radiomarquage par des ions cuivre-64), nous avons cherché à exploiter le potentiel de l'imagerie simultanée IRM/TEP pour collecter des informations sur la biodistribution des nanoparticules d'or et des nanofleurs dorées. Les images IRM/TEP ont été enregistrées 1, 24 et 120 heures après injection intraveineuse des nanoparticules et nanofleurs radiomarquées au cuivre-64. L'acquisition des images IRM et TEP a été effectuée en même temps grâce à un imageur intégrant IRM et TEP qui a été développé dans le cadre du projet EquipEx IMAPPI (coordonné par le Professeur François Brunotte puis le Professeur Alexandre Cochet).

7.1.3. Comptage γ *post mortem* des organes

Après 24 heures, les souris sont sacrifiées et les organes sont prélevés pour des analyses *ex vivo* de la biodistribution des nanoparticules en mesurant la radioactivité par comptage γ et la quantité d'or par ICP-OES dans les différents organes des souris ayant reçu une injection des nanoparticules par voie intraveineuse.

La radioactivité de plusieurs organes d'intérêt prélevés sur les animaux étudiés en imagerie a été mesurée à l'aide d'un compteur gamma Cobra 418 (Perkin Elmer) afin d'estimer la quantité de radioéléments présents dans les organes. Cette mesure a été réalisée par les personnels du CGFL sous la direction de Dr Alexandra Oudot.

7.1.4. Analyses ICP-OES

L'ICP-OES a permis de déterminer la quantité d'or après dissolution des organes et des nanoparticules qu'ils contenaient. Les différents organes prélevés sur les souris ayant reçu une injection de suspension de nanoparticules par voie intraveineuse sont minéralisés avec de l'eau régale chaude dans des tubes de minéralisation calibrés (DigiTUBEs, SCP Sciences). Les tubes sont placés dans un bloc de minéralisation (Digiprep, SCP science) afin d'atteindre une température de 120°C jusqu'à dissolution complète des organes. Le volume est ajusté au trait de jauge (50 mL) en utilisant de l'acide nitrique à 5%. La solution est ensuite filtrée à l'aide d'une seringue et d'un filtre de 0,22 μm afin d'éliminer tout résidu éventuel.

L'échantillon est ensuite analysé à l'aide d'un ICP-OES modèle 710 ES (Varian/Agilent) équipé d'une torche axiale, d'un nébuliseur concentrique et d'une chambre de nébulisation cyclonique du laboratoire Qualio à Besançon. Les paramètres suivants ont été utilisés : une puissance de 1,2 kW, un débit d'argon plasmagène de 15 L.min⁻¹, un débit d'argon auxiliaire de 1,5 L.min⁻¹, et une pression de nébulisation de 200 kPa. Les longueurs d'onde d'émission utilisées pour mesurer la concentration des éléments sont 267,594 nm, 242,794 nm et 208,207 nm.

7.2. Résultats et discussion

Après le radiomarquage au cuivre-64 ($[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$) des différents types de nanoparticules, des images IRM/TEP (Figure 7-1) ont été acquises après injection intraveineuse des nanoparticules à des souris porteuses des plaques d'athérosclérose. Cette étude a été réalisée pour vérifier la capacité des différentes nanoparticules à cibler ces plaques. Elle a été complétée par des analyses *post-mortem* des organes (comptage γ et dosage ICP-OES des organes prélevés sur des animaux sacrifiés 24 h après l'injection intraveineuse). La comparaison des Figure 7-2 et Figure 7-3 montre que lorsque les organes sont fortement radioactifs, ils contiennent beaucoup d'or alors que les organes faiblement radioactifs sont pauvres en or. Il y a donc co-localisation de la radioactivité et de l'or qui confirme que les radioéléments immobilisés dans la couche organique des nanoparticules d'or ne s'échappent pas après injection. En d'autres termes, la mesure de la radioactivité sur les images reflète la présence des nanoparticules d'or.

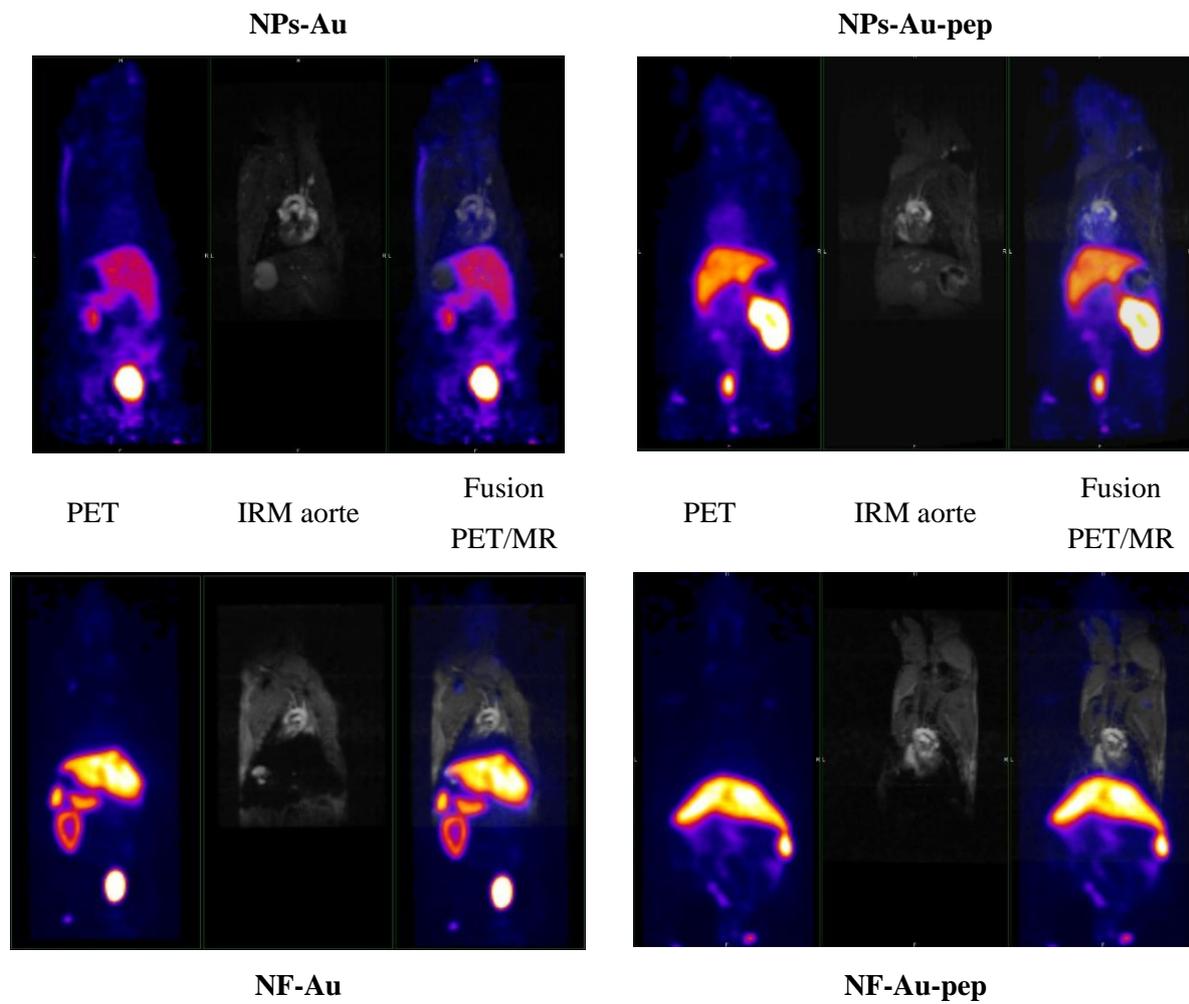


Figure 7-1 : Comparaison des images obtenues 1 h après injection intraveineuse des différents nanoparticules dans des souris malades

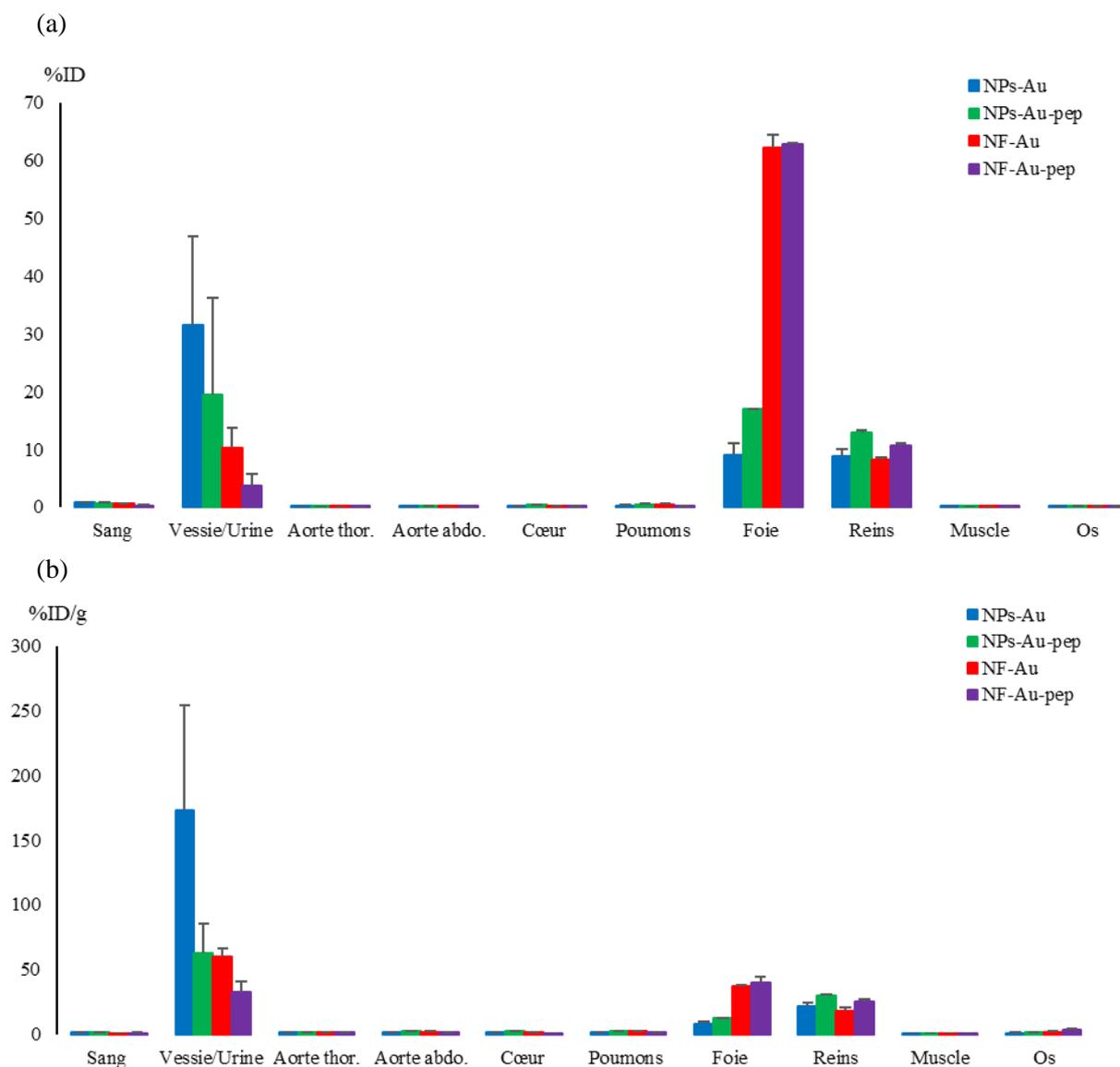


Figure 7-2 : La biodistribution des différents types de nanoparticules 24 h après injection intraveineuse à des souris porteuses de plaques d'athérosclérose par comptage gamma, (a) pourcentage moyen de dose injectée (%ID), (b) pourcentage moyen de dose injectée par gramme d'organe (%ID/g)

Les résultats obtenus par comptage gamma et par dosage de la quantité d'or dans les organes d'animaux montrent une accumulation des nanoparticules d'or avec et sans peptide et des nanofleurs dorées avec et sans peptide dans le foie, les reins et la vessie (Figure 7-2 et Figure 7-3). Ces organes sont impliqués dans l'élimination des nanoparticules par voie rénale et par voie hépatobiliaire. Les nanoparticules ne présentent aucune accumulation dans les autres organes.

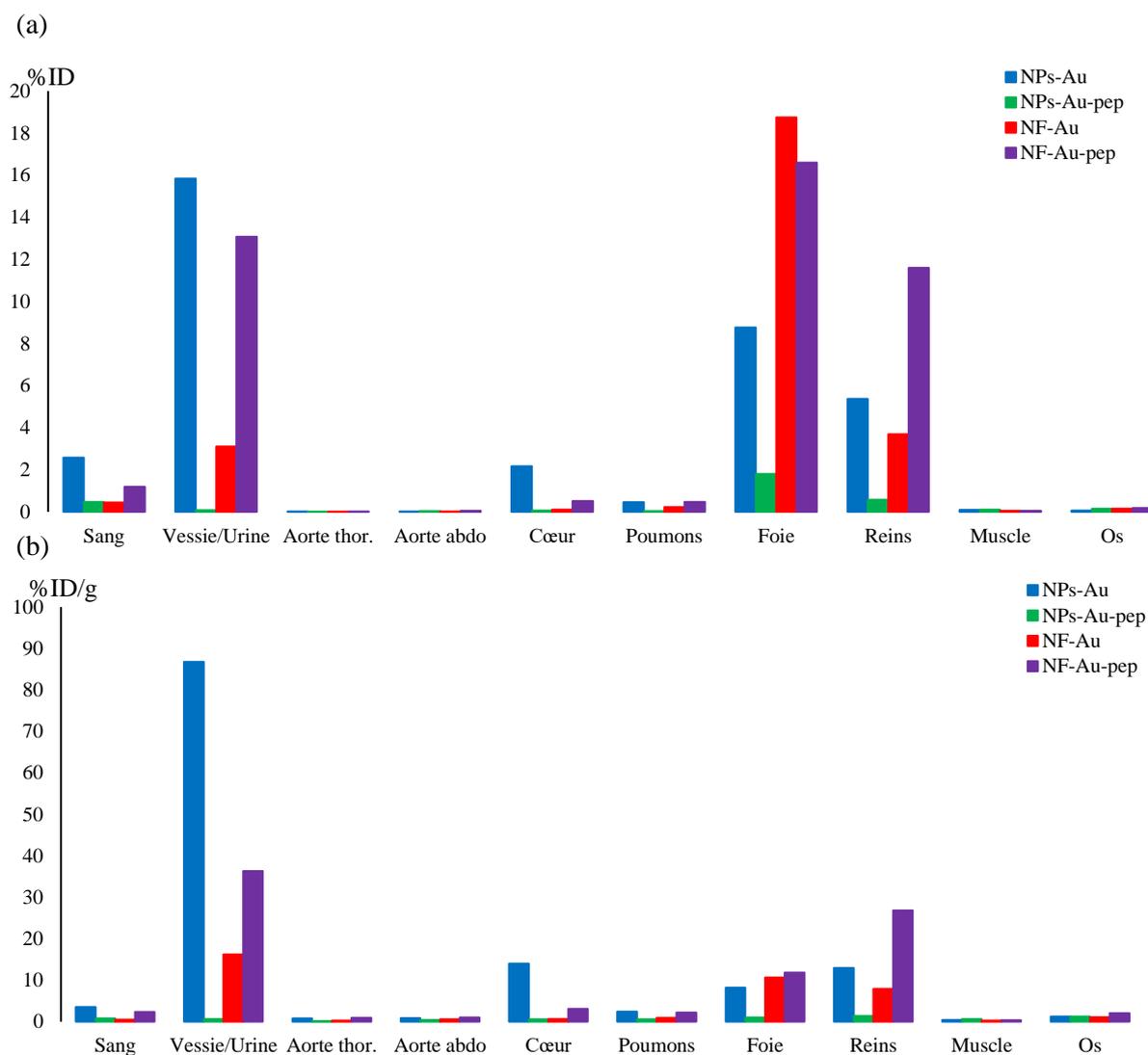


Figure 7-3 : La biodistribution des différents types de nanoparticules 24 h après injection intraveineuse à des souris porteuses de plaques d'athérosclérose par ICP-OES (a) pourcentage moyen de dose d'or injectée (%ID) et (b) pourcentage moyen de dose d'or injectée par gramme de tissu (%ID/g)

La Figure 7-4 montre que les nanoparticules d'or avec et sans peptide sont éliminées rapidement après injection intraveineuse alors que les nanofleurs dorées avec et sans peptide sont éliminées beaucoup plus lentement de l'organisme.

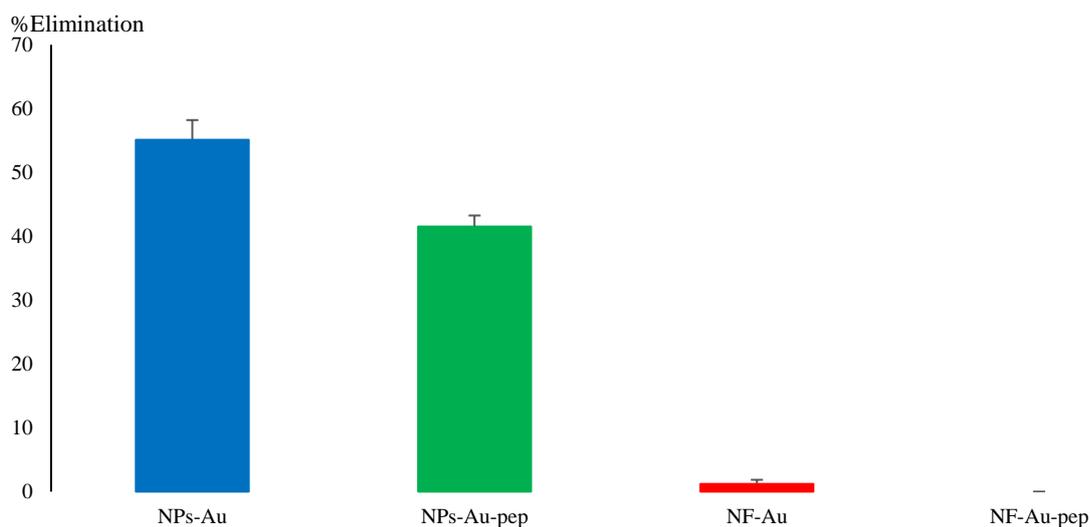


Figure 7-4 : Pourcentages moyens d'élimination des différentes nanoparticules 24 h après injection intraveineuse des suspensions de nanoparticules d'or avec et sans peptide et de nanofleurs dorées avec et sans peptide à des souris porteuses de plaques d'athérosclérose.

Ces résultats de biodistribution et d'élimination sont quasiment identiques à ceux obtenus après injection des mêmes suspensions à des souris saines. Le comportement de ces différentes nanoparticules, dans les deux cas et malgré la présence des plaques d'athérosclérose, est sain car elles ne s'accumulent pas dans les organes autres que ceux impliqués dans l'élimination des nanoparticules.

Malheureusement aucune différence notable n'est observée au niveau de l'aorte entre souris saines et souris porteuses de plaques d'athérosclérose alors qu'il est attendu que les nanoparticules s'accumulent dans les plaques présentes sur les parois de l'aorte des souris ayant suivi un régime très gras. L'absence de différence peut s'expliquer par l'absence de plaques, par le fait que les nanoparticules ne s'accumulent pas dans les plaques ou que le faible volume de ces plaques (en comparaison avec celui des organes) ne permet pas une accumulation suffisante des nanoparticules pour une observation en imagerie et par les différentes analyses *post-mortem*. L'analyse *post-mortem* de la crosse aortique en microscopie optique confirme la présence des plaques d'athérosclérose. Après contact avec l'huile rouge O (Figure 7-5), les plaques devenues rouges sont nettement visibles en microscopie optique. Le comptage γ révèle une co-localisation des plaques et de la radioactivité, quelles que soient les nanoparticules injectées par voie intraveineuse. Les nanoparticules sont donc bien présentes dans les plaques bien qu'il ne soit pas possible de visualiser l'effet de leur présence sur les images d'IRM/TEP. Si la radioactivité est observée dans les plaques quelles que soient les nanoparticules, elle n'est cependant pas aussi forte pour toutes les nanoparticules. Les plaques sont nettement plus radioactives chez les animaux qui ont reçu une injection des nanofleurs dorées avec ou sans peptides. Comme la radioactivité résulte de l'immobilisation des radioéléments dans la couche organique des nanoparticules d'or dont la quantité est la même dans chaque échantillon, la plus forte radioactivité des plaques après injection des nanofleurs dorées reflète une présence plus importante des nanoparticules d'or. Nous pouvons donc conclure que l'accumulation des nanoparticules d'or dans les plaques d'athérosclérose est plus efficace lorsqu'elles sont transportées par les nanofleurs.

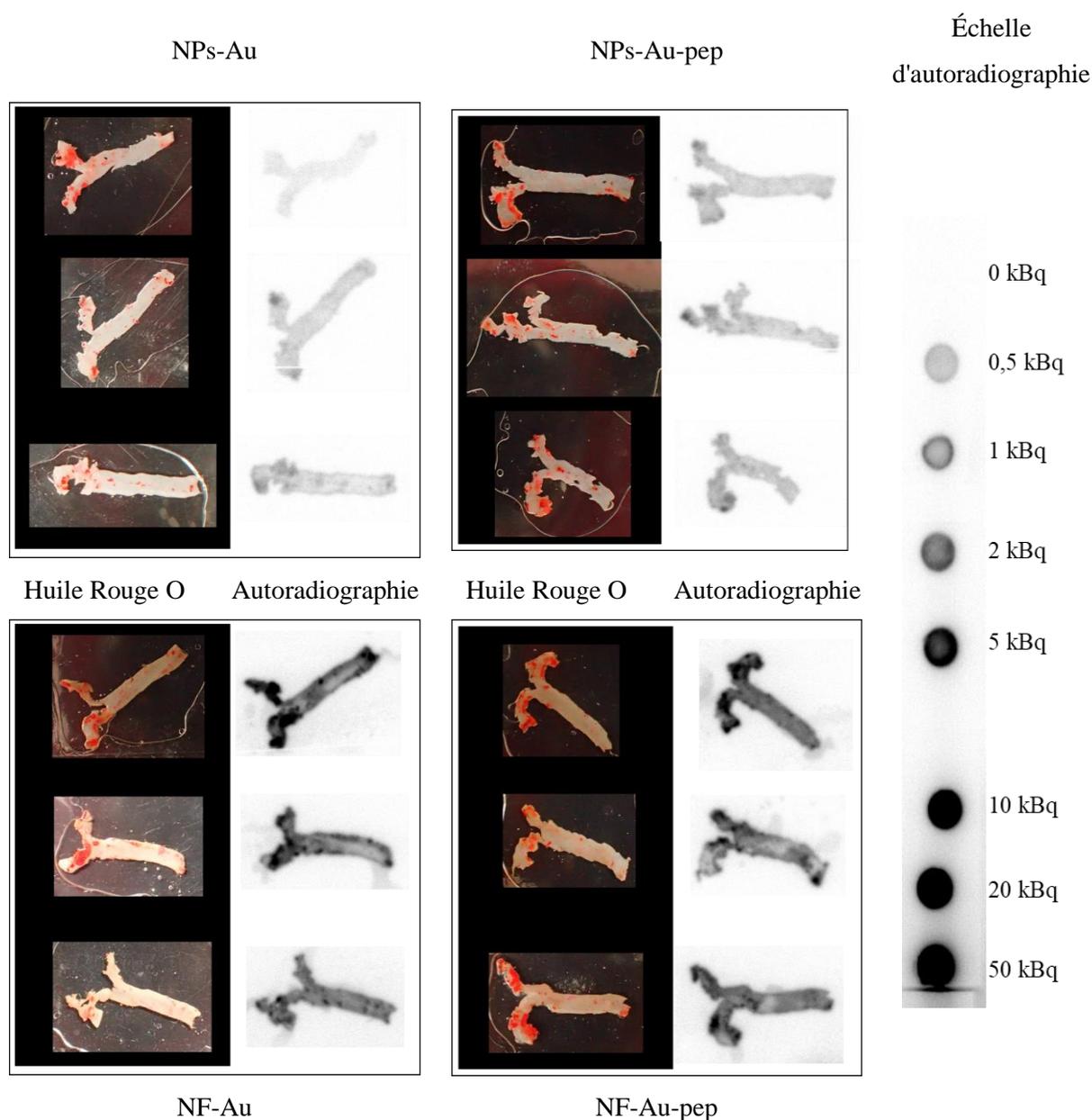


Figure 7-5 : Microscopie optique et autoradiographie de la crosse aortique des souris porteuse de plaques d'athérosclérose

Cependant, l'influence du peptide semble négligeable pour l'accumulation des nanoparticules dans les plaques car la radioactivité des plaques ne semble pas différente après injection des nanoparticules d'or ou de nanofleurs dorées avec et sans peptide.

8. Conclusion

Dans ce chapitre, des nanoparticules d'or recouvertes par une couche organique mixte ont été synthétisées. Ces nanoparticules présentent des caractéristiques physico-chimiques similaires à celles des nanoparticules Au@TADOTAGA. Ces nanoparticules d'or sont efficacement greffées sur les nanofleurs d'oxyde de fer grâce à leur fonction amine libre de la couche organique. La post-fonctionnalisation des nanoparticules d'or et des nanofleurs dorées par des peptides ciblant VCAM-1 a également été réalisée.

Ces différentes nanoparticules radiomarquées ont été suivies simultanément par IRM/TEP : elles présentent un comportement sain. En effet, elles circulent librement sans opsonisation ni accumulation indésirable dans les organes à l'exception de ceux impliqués dans l'élimination.

Le mode d'élimination varie entre les nanoparticules d'or et les nanofleurs dorées la raison d'une différence de leur diamètre hydrodynamique. Pour les nanoparticules d'or l'élimination rénale reste majoritaire, alors que pour les nanofleurs dorées l'élimination par voie hépatobiliaire est favorisée. D'autre part, l'élimination des nanofleurs est plus lente que l'élimination des nanoparticules d'or.

L'influence du peptide sur la biodistribution est négligeable. Il est difficile de mettre en évidence une différence de ciblage des plaques d'athérosclérose entre les nanoparticules sans et avec peptide. Seule une plus faible élimination des nanoparticules est observée lorsqu'elles sont fonctionnalisées par les peptides. En revanche, l'accumulation des nanoparticules d'or dans les plaques est bien plus importante lorsque les nanoparticules d'or sont transportées par les nanofleurs qui remplissent donc parfaitement leur rôle.

9. Références

- [1] C. Alric *et al.*, « Gadolinium chelate coated gold nanoparticles as contrast agents for both X-ray computed tomography and magnetic resonance imaging », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, n° 18, p. 5908-5915, 2008.
- [2] C. Alric *et al.*, « The biodistribution of gold nanoparticles designed for renal clearance », *Nanoscale*, vol. 5, n° 13, p. 5930-5939, 2013.
- [3] I. Miladi *et al.*, « The *in vivo* radiosensitizing effect of gold nanoparticles based MRI contrast agents », *Small*, vol. 10, n° 6, p. 1116-1124, 2014.
- [4] G. Laurent *et al.*, « Minor changes in the macrocyclic ligands but major consequences on the efficiency of gold nanoparticles designed for radiosensitization », *Nanoscale*, vol. 8, n° 23, p. 12054-12065, 2016.
- [5] K. T. Butterworth *et al.*, « Preclinical evaluation of gold-DTDTPA nanoparticles as theranostic agents in prostate cancer radiotherapy », *Nanomed.*, vol. 11, n° 16, p. 2035-2047, 2016.
- [6] C. Alric *et al.*, « Gold nanoparticles designed for combining dual modality imaging and radiotherapy », *Gold Bull.*, vol. 41, n° 2, p. 90-97, 2008.
- [7] L. Lartigue *et al.*, « Cooperative organization in iron oxide multi-core nanoparticles potentiates their efficiency as heating mediators and MRI contrast agents », *ACS Nano*, vol. 6, n° 12, p. 10935-10949, 2012.
- [8] P. Hugounenq *et al.*, « Iron oxide monocrystalline nanoflowers for highly efficient magnetic hyperthermia », *J. Phys. Chem. C*, vol. 116, n° 29, p. 15702-15712, 2012.
- [9] C. Corot, P. Robert, J.-M. Idée, et M. Port, « Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 58, n° 14, p. 1471-1504, 2006.
- [10] Y. Javed *et al.*, « Biodegradation mechanisms of iron oxide monocrystalline nanoflowers and tunable shield effect of gold coating », *Small*, vol. 10, n° 16, p. 3325-3337, 2014.
- [11] F. Bouraleh Hoch, « Nanosondes multimodales pour l'imagerie simultanée IRM / TEP », These de doctorat, Bourgogne Franche-Comté, 2020. Consulté le: 29 avril 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2020UBFCD032>
- [12] P.-J. Debouttière *et al.*, « Design of gold nanoparticles for magnetic resonance imaging », *Adv. Funct. Mater.*, vol. 16, n° 18, p. 2330-2339, 2006.
- [13] S. Roux *et al.*, « Synthesis, characterization of dihydrolipoic acid capped gold nanoparticles, and functionalization by the electroluminescent luminol », *Langmuir*, vol. 21, n° 6, p. 2526-2536, 2005.

- [14] Z. Li, R. Jin, C. A. Mirkin, et R. L. Letsinger, « Multiple thiol-anchor capped DNA–gold nanoparticle conjugates », *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, n° 7, p. 1558-1562, 2002.
- [15] B. Garcia *et al.*, « Sulfur K-edge XANES study of dihydrolipoic acid capped gold nanoparticles: dihydrolipoic acid is bound by both sulfur ends », *Chem. Commun.*, n° 3, p. 369-371, 2005.
- [16] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin, et C. Kiely, « Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles », *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, n° 16, p. 1655-1656, 1995.
- [17] R. S. B. Rana, « Assemblage contrôlé des nanofleurs d'oxyde de fer et des nanoparticules d'or: ou comment associer Hyperthermie et Radiothérapie », Bourgogne Franche-Comté, 2018.
- [18] W. Haiss, N. T. Thanh, J. Aveyard, et D. G. Fernig, « Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV– Vis spectra », *Anal. Chem.*, vol. 79, n° 11, p. 4215-4221, 2007.
- [19] S. Link et M. A. El-Sayed, « Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles », *J. Phys. Chem. B*, vol. 103, n° 21, p. 4212-4217, 1999.

Conclusion et perspectives

Comme l'ont déjà montré des travaux antérieurs, les nanoparticules d'or présentent des propriétés prometteuses en tant qu'agent pour la thérapie guidée par l'image. Les nanoparticules d'or, Au@TADOTAGA et Au@TADOTA, ont un cœur d'or ($d = 2,3$ nm) entouré d'une couche organique de chélateurs macrocycliques. Cette couche organique joue un rôle essentiel dans la taille et la stabilité colloïdale des nanoparticules. Cette couche permet également de complexer des ions d'intérêt pour l'imagerie médicale. La combinaison de ces deux éléments (l'or pour son pouvoir radiosensibilisant et le chélateur pour l'immobilisation d'ions d'intérêt pour l'imagerie) permet d'obtenir des nano-objets pour une thérapie guidée par imagerie. Ce pouvoir est sous-exploité en raison d'une élimination rénale qui bien qu'indispensable pour les nanoparticules non biodégradables est trop rapide.

L'objectif principal de cette thèse était d'améliorer l'exploitation des propriétés d'imagerie et thérapeutiques de ces nanoparticules d'or. En d'autres termes, il s'agissait de modifier la biodistribution des nanoparticules d'or et de retarder leur élimination rénale. Pour pouvoir modifier leur comportement, plusieurs stratégies ont été étudiées dans le cadre de cette thèse.

La première stratégie a consisté à introduire des chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG) dans la couche organique adsorbée sur les nanoparticules d'or. Contrairement aux stratégies de PEGylation communément mises en œuvre, nous n'avons pas procédé par post-fonctionnalisation des nanoparticules d'or. Nous avons intégré l'étape de PEGylation lors de la confection des chélateurs macrocycliques réalisée par l'équipe de Pr Franck Denat (ICMUB, Dijon). Cette stratégie présente au moins trois avantages par rapport au greffage des chaînes de PEG sur les nanoparticules d'or :

1. le protocole de synthèse des nanoparticules d'or avec les chélateurs PEGylés reste le même que celui développé avec succès à partir des chélateurs non PEGylés. Les perturbations et éventuelles déstabilisations sont évitées car il n'y a pas d'étape supplémentaire à prévoir contrairement à la stratégie de PEGylation par post-fonctionnalisation.
2. un meilleur contrôle de la surface des nanoparticules d'or est garanti car tous les chélateurs portent une chaîne de PEG. Un tel résultat est difficile à atteindre par une voie de PEGylation classique car cela suppose un rendement de greffage de 100% difficilement atteignable.
3. la préservation des propriétés chélatantes des chélateurs macrocycliques car les fonctions impliquées dans la formation des complexes avec les ions gadolinium ou des radioéléments ne sont pas altérées alors qu'elles le seraient dans le cas d'une post-fonctionnalisation par des chaînes de PEG.

Dans un premier temps, deux séries de nanoparticules d'or ont été synthétisées : Au@TAPEG_nDOTA et Au@TAPEG_nDOTAGA avec $n = 0$ (les nanoparticules de référence), 4 et 11 (n : unité répétitive du motif

PEG). La caractérisation de ces deux séries montre des propriétés physico-chimiques similaires avec cependant une différence dans la distribution en taille dans la série Au@TAPEG_nDOTA.

Ensuite, la biodistribution des nanoparticules de la série Au@TAPEG_nDOTAGA après injection intraveineuse chez des souris saines a été suivie par imagerie médicale (IRM, imagerie nucléaire), comptage γ et dosage chimique de l'or. Les deux types de nanoparticules PEGylées (n = 4 et 11) présentent, comme pour les nanoparticules de référence (Au@TADOTAGA, n = 0), un comportement sain chez la souris mais une biodistribution différente en raison de la présence de PEG dans leur couche organique. Le mode d'élimination passe d'une élimination principalement rénale pour les nanoparticules sans PEG à une élimination hépatobiliaire pour les nanoparticules avec des chaînes de PEG dans leur couche organique. De plus, la longueur de la chaîne PEG influence la cinétique d'élimination des nanoparticules. Les nanoparticules dont la chaîne PEG est la plus longue circulent plus longtemps que celles dont la chaîne est la plus courte.

Enfin, le potentiel des nanoparticules Au@TAPEG_nDOTAGA pour la radiothérapie a été étudié sur des embryons de poulet. La présence de PEG dans la couche organique permet de mieux exploiter l'effet radiosensibilisant et l'effet anti-métastatique des nanoparticules d'or lorsque le délai entre l'administration des nanoparticules et l'irradiation est de 24 heures alors que pour les nanoparticules non PEGylées les meilleurs résultats sont obtenus lorsque le traitement est initié une heure après leur administration. Cela indique que la présence des chaînes de PEG garantit une meilleure rétention dans les tumeurs et rend donc les nanoparticules d'or radiosensibilisantes mieux adaptées pour une application clinique.

La deuxième stratégie reposait sur le greffage de nanoparticules d'or à la surface de nanotransporteurs d'oxyde de fer (maghémite) biodégradables. Des nanoparticules d'or recouvertes d'une couche organique mixte Au@(TADOTAGA)_{2x}(TA[NODAGA-lys-NH₂])_x ont été synthétisées et greffées sur les nanofleurs. Et dans une dernière étape, un peptide de ciblage a été immobilisé à la surface des nanoparticules d'or (libres ou supportées) via une réaction de chimie clic bioorthogonale entre un groupement tétrazine lié à la fonction amine primaire disponible dans la couche mixte organique recouvrant les nanoparticules d'or et un dérivé du bicyclononyne porté par le peptide. Les caractérisations physico-chimiques des nanoparticules d'or avec et sans peptide montrent une similarité avec les nanoparticules Au@TADOTAGA qui sont la référence dans notre équipe.

De plus, les caractérisations des nanofleurs d'or avec et sans peptide montrent une ressemblance entre elles. Le diamètre hydrodynamique de ces nanofleurs est beaucoup plus grand que celui de l'or et le greffage de l'or à la surface des nanofleurs leur confère une stabilité colloïdale et une charge de surface négative. Toutes ces propriétés nous ont permis de réaliser des tests *in vivo*.

Une étude de biodistribution sur des souris saines et des souris atteintes d'athérosclérose a été réalisée dans le but de montrer l'intérêt de greffer les nanoparticules d'or sur les nanofleurs. Les nanoparticules d'or avec et sans peptide et les nanofleurs dorées avec et sans peptide ont été radiomarquées pour un suivi en imagerie simultanée IRM/TEP. L'étude montre que le greffage des nanoparticules d'or sur les nanofleurs a modifié

leur voie d'élimination, qui passe de la voie rénale à la voie hépatobiliaire. De plus, l'élimination des nanofleurs est plus lente, ce qui était l'objectif de cette thèse. D'autre part, l'accumulation des nanoparticules d'or est plus importante au niveau des plaques d'athérome lorsqu'elles sont immobilisées à la surface des nanofleurs de maghémite. Cependant, les différences de biodistribution et d'élimination sont difficiles à percevoir entre les nanostructures avec et sans peptide.

Finalement, les deux stratégies, la PEGylation des nanoparticules et l'utilisation de nanotransporteurs d'oxyde de fer, ont permis d'atteindre le principal objectif qui consistait à retarder l'élimination rénale des nanoparticules d'or afin d'exploiter leurs propriétés d'imagerie et de thérapie. Mais ce travail soulève de nouvelles questions qui méritent toute notre attention.

Pour la première stratégie, plusieurs pistes d'étude peuvent être proposées :

- la détermination des grandeurs caractéristiques de pharmacocinétique des nanoparticules d'or PEGylées pour mieux appréhender l'effet de la chaîne de PEG sur le temps de résidence vasculaire, la rétention dans les tumeurs et leur élimination ;
- la production d'une nouvelle génération de la série Au@TAPEG_nDOTAGA avec des longueurs de chaîne plus importantes (n=23, 40, etc.) ;
- l'évaluation de l'effet de la PEGylation sur le pouvoir radiosensibilisant des nanoparticules d'or administrées par injection intraveineuse à des rongeurs porteurs de tumeurs.

Dans le cas du transport des nanoparticules d'or par des nanofleurs (deuxième stratégie), plusieurs suggestions peuvent être envisagées comme :

- la caractérisation plus approfondie du greffage de peptides à la surface de nanoparticules d'or libres ou supportées ;
- l'évaluation des propriétés radiosensibilisantes des nanoparticules d'or et des nanofleurs dorées sur d'autres types de maladies (cancer) ;
- l'étude de la pharmacocinétique de ces nano-objets.

Titre : Stratégies pour une meilleure exploitation des propriétés d'imagerie et de thérapie des nanoparticules d'or

Mots clés : Nanoparticules d'or, biodistribution, imagerie médicale, radiothérapie, athérosclérose

Résumé : Les nanoparticules d'or recouvertes de chélateurs ont un potentiel prometteur pour la radiothérapie guidée par imagerie par résonance magnétique (IRM) et pour l'imagerie IRM/TEP simultanée. Cependant, ce potentiel n'est pas pleinement exploité en raison d'une clairance rénale trop rapide.

Nous avons donc testé différentes stratégies pour la retarder : (1) PEGylation des chélateurs utilisés pour la synthèse des nanoparticules d'or. L'étude de biodistribution a montré que la longueur de la chaîne PEG influence le comportement *in vivo* et l'effet antimétastatique des nanoparticules d'or PEGylées.

(2) L'utilisation de nanofleurs d'oxyde de fer comme transporteurs biodégradables. Nous avons déduit des données d'imagerie que les nanoparticules d'or sont moins rapidement éliminées de l'organisme lorsqu'elles sont greffées sur des nanofleurs. De plus, nous avons observé que les nanoparticules d'or ciblent mieux les plaques d'athérosclérose lorsque les nanofleurs les portent.

Title: Strategies for a better exploitation of the imaging and therapeutic properties of gold nanoparticles

Keywords: Gold nanoparticles, biodistribution, medical imaging, radiotherapy, atherosclerosis

Abstract: Chelator-coated gold nanoparticles have promising potential for magnetic resonance imaging (MRI)-guided radiotherapy and for monitoring the biodistribution of these radiosensitizing nanoparticles by simultaneous PET/MRI imaging. However, this potential is not fully exploited due to a too rapid renal clearance. We, therefore, tested various strategies to postpone renal clearance: (1) PEGylation with different chain lengths of chelators used to synthesize gold nanoparticles. The biodistribution study showed that the length of the PEG chain influences the *in vivo* behavior and the antimetastatic effect of PEGylated gold nanoparticles.

(2) The use of biodegradable iron oxide nanoflowers as nanocarriers. We deduced from the imaging data that gold nanoparticles are less rapidly eliminated from the organism when grafted to nanoflowers. Moreover, we observed that gold nanoparticles target atherosclerotic plaques better when nanoflowers carry them. indispensable pour les nanoparticules non biodégradables