



**HAL**  
open science

# Ciblage de cellules tumorales mammaires par des polymères à empreintes moléculaires magnétiques et délivrance contrôlée de médicaments sous champ magnétique alternatif

Maylis Garnier

► **To cite this version:**

Maylis Garnier. Ciblage de cellules tumorales mammaires par des polymères à empreintes moléculaires magnétiques et délivrance contrôlée de médicaments sous champ magnétique alternatif. Biochimie, Biologie Moléculaire. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS253 . tel-04721952

**HAL Id: tel-04721952**

**<https://theses.hal.science/tel-04721952v1>**

Submitted on 4 Oct 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.



THESE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITE

Spécialité : Chimie

Ecole doctorale Chimie Physique et Chimie analytique de Paris Centre

Présentée par  
**Maylis Garnier**

Pour obtenir le grade de  
**Docteur de Sorbonne Université**

Sujet de thèse :

**Ciblage de cellules tumorales mammaires par des polymères à empreintes moléculaires magnétiques et délivrance contrôlée de médicaments sous champ magnétique alternatif**

Thèse soutenue le 11 septembre 2023, devant un jury composé de :

M. Arnaud GAUTIER	Président
M. Yann CORVIS	Rapporteur
Mme Claire MANGENEY	Rapporteur
M. Julien NICOLAS	Examineur
Mme Jutta RIEGER	Invitée
Mme Nébéwia GRIFFETE	Co-directrice de thèse
Mme Michèle SABBAH	Co-directrice de thèse



# Table des matières

Liste des abréviations

Introduction générale

Chapitre 1 : Perspectives thérapeutiques des polymères à empreintes de protéines magnétique

I.	Le cancer du sein .....	17
1.	Epidémiologie et pronostic .....	17
2.	Interaction entre la tumeur et son microenvironnement .....	19
a.	Nature du microenvironnement tumoral mammaire .....	19
b.	Métabolisme des cellules tumorales mammaires .....	21
c.	Communication entre adipocytes et cellules tumorales .....	22
d.	Implication de CD36 dans les processus tumoraux .....	23
3.	Traitements du cancer du sein .....	24
a.	Chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie .....	24
b.	Thérapies ciblées .....	26
c.	Les anticorps conjugués .....	28
II.	Les polymères à empreintes moléculaires .....	31
1.	Historique .....	31
2.	Méthodes de synthèse .....	33
a.	Méthodes de polymérisation .....	33
b.	Méthodes d'initiation .....	34
c.	Choix des monomères .....	35
d.	Choix du solvant .....	35
3.	Les polymères à empreintes de protéines .....	35
a.	Enjeux et limites .....	35
b.	Polymères à empreintes d'épitopes .....	37
c.	Synthèse sur surface solide .....	38
4.	Applications .....	39

a.	Capteurs et dosages sériques .....	39
b.	Imagerie et thérapie .....	41
III.	Stratégies de vectorisation contre le cancer .....	44
1.	Généralités .....	44
2.	Distribution et ciblage.....	47
3.	Libération de la molécule thérapeutique .....	50
IV.	Libération contrôlée par hyperthermie magnétique.....	52
1.	Les nanoparticules magnétiques .....	52
2.	Hyperthermie .....	54
3.	Applications .....	55
a.	Accumulation dans les tissus.....	57
b.	Libération de molécules thérapeutiques par hyperthermie .....	58
c.	Dégradation de protéines .....	59
V.	Des polymères à empreintes de protéines magnétiques : ciblage de tumeurs mammaires agressives .....	59
1.	Des polymères à empreintes de CD36 .....	59
2.	Relargage contrôlé par hyperthermie .....	61
 <b>Chapitre 2 : Optimisation de la synthèse de nanoparticules de polymère fluorescentes</b>		
I.	Nanoparticules de polymère par photopolymérisation via le DCAA.....	67
1.	Principe.....	67
2.	Etude des paramètres expérimentaux .....	69
a.	Influence de la concentration en monomère fluorescent .....	69
b.	Influence de la concentration en monomères .....	73
3.	Interaction avec des cellules cancéreuses du sein.....	75
a.	Cytotoxicité .....	75
b.	Ciblage de la protéine CD36 .....	77
4.	Conclusion.....	81
II.	Photopolymérisation de type II .....	82

1. Principe.....	82
2. Caractérisation.....	83
3. Interactions avec des cellules cancéreuses du sein .....	89
a. Synthèse de polymères à empreintes .....	89
b. Evaluation du ciblage par cytométrie en flux.....	89
c. Microscopie confocale.....	91
d. Cytotoxicité .....	95
4. Conclusion.....	96
III. Conclusion .....	97
VI. Matériel et méthodes .....	97
1. Réactifs .....	97
2. Outils de caractérisations physico-chimiques.....	98
3. Synthèse « influence de la concentration en ArtRhod ».....	98
4. Synthèse « influence de la concentration en monomères » .....	99
5. Synthèses « Reproductibilité ».....	99
6. Méthode d'évaluation de la cytotoxicité .....	99
7. Polymères à empreintes de CD36 amorcés par DCAA.....	100
8. Synthèse photopolymérisation de type II .....	101
9. Synthèse de polymères à empreintes par photopolymérisation de type II .....	102
10. Images de microscopie confocale .....	102
 <b>Chapitre 3 : Synthèse de nanoparticules magnétiques fluores-</b>	
<b>centes</b>	
I. Synthèse de nanoparticules de maghémite.....	107
1. Synthèse.....	107
2. Caractérisation.....	108
II. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques par polymérisation par amorçage RedOx.....	113
1. Fonctionnalisation acide acrylique .....	113
2. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques non-fluorescentes.....	116

3. Incorporation du monomère fluorescent .....	119
4. Conclusion.....	120
III. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques par photopolymérisation de type II.....	121
1. Fonctionnalisation acide acrylique .....	121
2. Fonctionnalisation par une couche de polymère fluorescent .....	122
3. Caractérisation.....	123
4. Propriétés magnétiques .....	129
5. L'importance de la température et de l'agitation .....	134
6. Conclusion.....	136
IV. Conclusion .....	136
 <b>Chapitre 4 : Synthèse de polymères imprimés par synthèse sur surface solide</b>	
I. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques imprimées par synthèse sur surface solide.....	143
1. Principe.....	143
2. Fonctionnalisation des billes de verre.....	145
3. Polymérisation et purification.....	145
4. Caractérisations .....	146
5. Ciblage de la protéine CD36 .....	148
II. Synthèse de nanoparticules de polymère par surface solide .....	150
1. Principe.....	150
2. Polymérisation et purification.....	151
3. Ciblage de la protéine CD36 .....	152
III. Conclusion .....	155
IV. Matériel et méthodes .....	156
1. Réactifs .....	156
2. Caractérisations .....	156
3. Fonctionnalisation des billes de verre.....	156

4. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques.....	157
5. Synthèse de nanoparticules de polymère non magnétiques.....	157

## Conclusion Générale

## Annexes

I. Mesures de taille par DLS .....	165
II. Magnétomètre et mesures d'aimantation.....	168
III. Mesure du pouvoir chauffant .....	170
IV. Culture cellulaire .....	174
V. Cytométrie en flux.....	175
VI. Reproductibilité des synthèses amorcées par le DCAA .....	177

## Références Bibliographiques

## Table des illustrations

# Liste des abréviations

<b>Aac</b>	Acide acrylique
<b>ADC</b>	Antibody Drug Conjugate
<b>AM</b>	Acrylamide
<b>APS</b>	Ammonium persulfate
<b>ArtRhod</b>	Acryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B
<b>ATG</b>	Analyse thermogravimétrique
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>ATRP</b>	Atom transfer radical precipitation polymerization
<b>BIS</b>	N, N'-methylenebisacrylamide
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>BP</b>	Benzophénone
<b>BRCA1/BRCA2</b>	Breast Cancer 1 ou 2
<b>CD36</b>	Cluster de différenciation 36
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phénylindole
<b>DCAA</b>	2-(N,N-diethyldithiocarbamyl)acetic acid
<b>DLS</b>	Dynamic light scattering
<b>DOPE</b>	Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine
<b>DOTAP</b>	1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
<b>EPR</b>	Enhanced Permeability and Retention
<b>ER</b>	Récepteur aux œstrogènes
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>Fn14</b>	Human Fibroblast Growth Factor-Inducible 14
<b>FTIR</b>	Fourier Transform infrared
<b>GFP</b>	Green Fluorescent protein
<b>HER2</b>	Human epithelial growth factor receptor-2
<b>hVEGF</b>	Human vascular endothelial growth factor
<b>IC</b>	Intervalle de confiance
<b>MIP</b>	Polymère à empreinte moléculaire
<b>NIP</b>	Polymère non imprimé
<b>NIPAAm</b>	N-isopropylacrylamide
<b>NM</b>	Non marqué
<b>NP</b>	Nanoparticules
<b>PARP</b>	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
<b>PBS</b>	Tampon phosphate
<b>PD-1</b>	Programmed cell Death protein 1
<b>PDI</b>	Indice de polydispersité
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Peroxisome proliferator activated receptor
<b>PPRE</b>	Peroxisome proliferator response element
<b>PR</b>	Récepteur à la progestérone
<b>RAFT</b>	Reversible addition-fragmentation-chain-transfer
<b>RhB</b>	Rhodamine B
<b>SLP</b>	Specific loss power
<b>SVF</b>	Sérum de veau foetal
<b>TBA<sub>m</sub></b>	N-tert-butylacrylamide
<b>TEM</b>	Microscopie électronique à transmission
<b>TEMED</b>	Tétraméthyléthylènediamine

<b>TEP</b>	Tomographie par émission de positons
<b>TNBC</b>	Triple negative breast cancer
<b>UV</b>	Ultraviolet



# Introduction générale

Les nanoparticules connaissent actuellement un essor important de leur utilisation pour des applications biomédicales. Leurs propriétés en font des objets de choix, tant pour le développement de nouvelles méthodes de diagnostic que pour une utilisation comme vecteurs thérapeutiques. De nombreuses pathologies peuvent bénéficier de l'utilisation de vecteurs pour transporter des molécules thérapeutiques en particulier lorsque la cible thérapeutique est difficile d'accès, pour augmenter l'efficacité d'un médicament ou diminuer les effets secondaires qui lui sont associés. Les stratégies thérapeutiques pour lutter contre le cancer impliquent souvent des molécules présentant une forte toxicité systémique qui doivent être dirigées vers la tumeur, tout en protégeant le reste de l'organisme du patient. En plus du contrôle de la destination du vecteur, la maîtrise du mécanisme de libération de la molécule thérapeutique est essentielle pour obtenir un vecteur efficace.

Le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué et le plus mortel chez la femme. En particulier, les tumeurs dites triples négatives sont de mauvais pronostic en raison du nombre restreint de stratégies thérapeutiques efficaces. Parmi les nouvelles pistes explorées, l'étude de la communication entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, et en particulier le tissu adipeux, a montré que ce dernier sécrète des composés induisant une augmentation des métastases et des résistances aux traitements. Le transporteur d'acides gras CD36 a été associé à ces mécanismes, ce qui en fait une cible intéressante pour contrer ce phénomène et améliorer le pronostic des patientes.

L'objectif de ce projet est de développer de nouveaux vecteurs thérapeutiques capables de cibler la protéine CD36 et d'induire la libération contrôlée d'une molécule thérapeutique dans le but de diminuer le potentiel métastatique des tumeurs et les résistances aux traitements. Pour permettre d'induire la libération d'une molécule, des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer, capables de produire de la chaleur en présence d'un champ magnétique alternatif, ont été choisies pour former le cœur du vecteur. La stratégie permettant de cibler la protéine CD36 consiste quant à elle à former des empreintes dans une matrice de polymère en utilisant la technologie des polymères à empreintes moléculaires.

Ce manuscrit est constitué de quatre chapitres distincts.

Le premier chapitre décrit les perspectives thérapeutiques des polymères à empreintes de protéines magnétiques en se focalisant sur le cancer du sein. L'intérêt thérapeutique mais aussi les limites des polymères à empreintes de protéines y sont discutés, et les caractéristiques d'autres stratégies de vectorisation sont examinées. Enfin, la présentation des nanoparticules de maghémite et de leurs propriétés magnétiques

permet d'introduire les objets synthétisés dans cette étude : les hybrides d'oxyde de fer et de polymère.

Le second chapitre est consacré à la synthèse de nanoparticules de polymère. Il permet de valider le choix des peptides utilisés pour réaliser les empreintes ainsi que le système d'amorçage de la polymérisation. L'absence de toxicité cellulaire est également évaluée sur les nanoparticules de polymère synthétisées.

Le troisième chapitre est consacré à la synthèse des nanoparticules de maghémite et à leur fonctionnalisation dans le but d'obtenir des particules de type cœur-coquille fluorescentes.

Le dernier chapitre permet d'explorer une méthode alternative basée sur l'utilisation de microbilles de verre comme substrat solide permettant d'obtenir des nanoparticules de polymère à empreintes de protéine de haute affinité.

Ce projet de thèse, financé par le programme doctoral Interface pour le Vivant (IPV), a été réalisé dans deux laboratoires de Sorbonne Université : au sein de l'équipe Colloïdes Inorganiques du laboratoire PHENIX, où ont été réalisées l'ensemble des synthèses chimiques et dans l'équipe Biologie et Thérapeutiques du Cancer au Centre de Recherche Saint Antoine, où ont été effectuées les évaluations de ciblage et de toxicité cellulaire.

# Chapitre 1 : Perspectives thérapeutiques des polymères à empreintes de protéines magnétiques

I.	Le cancer du sein .....	17
1.	Epidémiologie et pronostic .....	17
2.	Interaction entre la tumeur et son microenvironnement .....	19
a.	Nature du microenvironnement tumoral mammaire .....	19
b.	Métabolisme des cellules tumorales mammaires.....	21
c.	Communication entre adipocytes et cellules tumorales .....	22
d.	Implication de CD36 dans les processus tumoraux .....	23
3.	Traitements du cancer du sein .....	24
a.	Chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie.....	24
b.	Thérapies ciblées .....	26
c.	Les anticorps conjugués.....	28
II.	Les polymères à empreintes moléculaires .....	31
1.	Historique.....	31
2.	Méthodes de synthèse .....	33
a.	Méthodes de polymérisation.....	33
b.	Méthodes d'initiation.....	34
c.	Choix des monomères.....	35
d.	Choix du solvant .....	35
3.	Les polymères à empreintes de protéines .....	35
a.	Enjeux et limites .....	35
b.	Polymères à empreintes d'épitopes .....	37
c.	Synthèse sur surface solide.....	38
4.	Applications .....	39
a.	Capteurs et dosages sériques .....	39
b.	Imagerie et thérapie .....	41
III.	Stratégies de vectorisation contre le cancer .....	44
1.	Généralités .....	44
2.	Distribution et ciblage.....	47
3.	Libération de la molécule thérapeutique .....	50

IV. Libération contrôlée par hyperthermie magnétique.....	52
1. Les nanoparticules magnétiques .....	52
2. Hyperthermie .....	54
3. Applications .....	55
a. Accumulation dans les tissus.....	57
b. Libération de molécules thérapeutiques par hyperthermie .....	58
c. Dégradation de protéines .....	59
V. Des polymères à empreintes de protéines magnétiques : ciblage de tumeurs mammaires agressives .....	59
1. Des polymères à empreintes de CD36 .....	59
2. Relargage contrôlé par hyperthermie .....	61



## I. Le cancer du sein

### 1. Épidémiologie et pronostic

La transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse, aussi appelée oncogénèse, peut se produire dans n'importe quelle cellule, tissu ou organe. Il existe donc une grande variété de cancers qui résultent de ces altérations pathologiques et leur origine est principalement liée à des prédispositions génétiques et à des facteurs environnementaux. Néanmoins, la progression du cancer, quelle que soit sa nature, est permise par des caractéristiques essentielles à la malignité qui confèrent aux cellules tumorales des capacités biologiques particulières permettant à la tumeur de se développer et d'interagir avec son environnement. Cette liste de caractéristiques a évolué avec les avancées de la recherche sur le cancer et comprend, depuis 2022, 14 de ces « *hallmarks of cancer* » (**Figure 1**). On y retrouve des caractéristiques permettant la prolifération de ces cellules (autosuffisance en facteurs de croissance, insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, différenciation altérée évitant un arrêt de prolifération, capacité à échapper au système immunitaire, immortalité répliquative et capacités d'invasion et métastatiques), les interactions avec leur micro-environnement (angiogenèse, état inflammatoire, cellules sénescentes, impact du microbiome) et leur capacité d'adaptation (instabilité du génome, reprogrammation du métabolisme cellulaire, plasticité phénotypique et reprogrammation épigénétique)<sup>1</sup>.

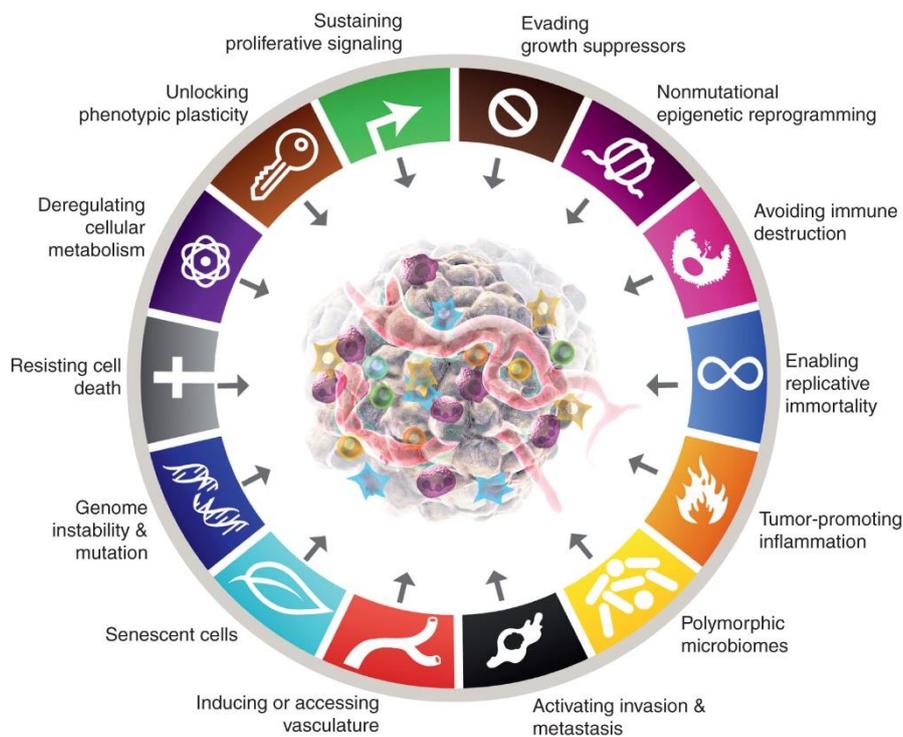


Figure 1 Les 14 "Hallmarks of cancer" identifiés en 2022 par Hanahan.<sup>1</sup>

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes, avec 2.26 millions de nouveaux cas dans le monde en 2020 [IC 95%, 2.24–2.79 millions]<sup>2</sup> et est la cause première de mortalité par cancer chez les femmes. En France, en 2020, 58 083 nouveaux cas ont été diagnostiqués et 14 183 décès ont été enregistrés\* (**Figure 2**). Entre 1990 et 2015, le taux de survie à 5 ans est passé de 79 à 87%. Cette amélioration s'explique à la fois par des avancées thérapeutiques mais aussi par un diagnostic plus précoce grâce à une fréquence accrue des dépistages et à l'amélioration des techniques diagnostiques. Ces données de bon pronostic cachent néanmoins une grande hétérogénéité du taux de survie à 5 ans qui reflète la grande hétérogénéité des cancers du sein.

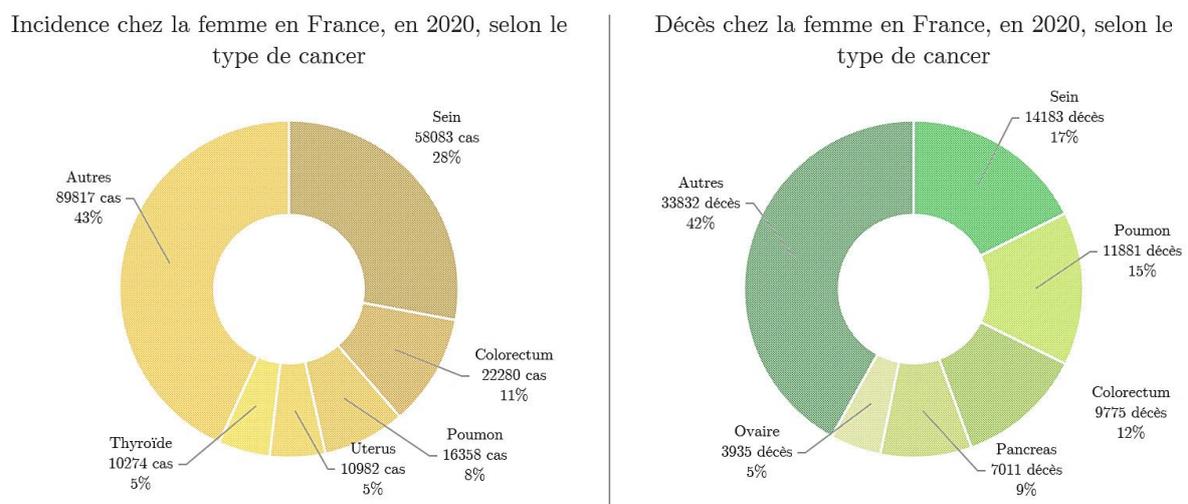


Figure 2 Les cancers chez la femme, en France, en 2020. Données Globocan 2020 de l'International Agency for Research on Cancer.

L'étude de l'expression génique des tumeurs mammaires permet de classer les cancers du sein en 6 types pouvant avoir des origines cellulaires ou des récepteurs différents : Luminal A ou B, positif HER2, *normal breast-like*, *claudine-low* et *basal-like* (**Figure 3**). Dans la majorité des cancers diagnostiqués, on retrouve une surexpression de récepteurs aux œstrogènes (ER), associée aux sous types luminaux. Les tumeurs dites lumineales B ont des capacités prolifératives plus importantes que les tumeurs classées lumineales A et sont donc de moins bon pronostic. Environ 10 à 15% des tumeurs présentent une surexpression du récepteur HER2 (*Human epithelial growth factor receptor-2*) sans surexpression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone (PR). Les tumeurs n'exprimant aucun de ces récepteurs, (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>) sont en général nommées triple négatives (abrégé ici TNBC, pour *triple negative breast cancer*) et associées à un pronostic plutôt défavorable. On retrouve notamment les cancers dits

\* Données Globocan 2020 de l'International Agency for Research on Cancer.

« basal-like » dans cette catégorie. Les sous types « Claudin low » sont des TNBC présentant des marqueurs de cellules souches tumorales.

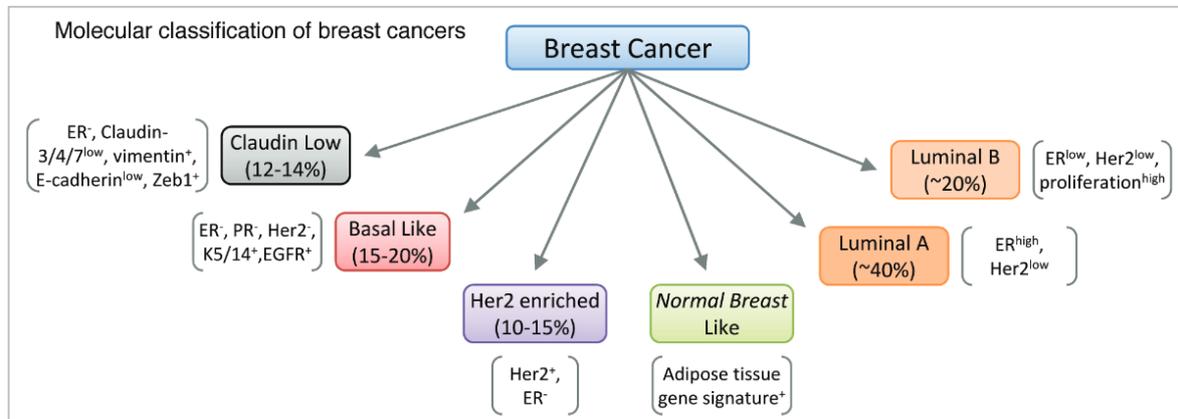


Figure 3 Classification moléculaire des cancers du sein. Schéma issu de <sup>3</sup>.

Au-delà de la classification moléculaire (**Tableau 1**), la prise en compte de critères cliniques et pathologiques (âge, statut ménopausique, stade, type et grade de la tumeur) et de signatures moléculaires (expression génique) permet d'établir un pronostic et parfois de prédire la réponse aux traitements.<sup>4</sup>

Tableau 1 Profil moléculaire et pronostic associés aux tumeurs mammaires lumineales, positives HER2 et triples négatives<sup>5</sup>

Type	Luminal A	Luminal B	Positif HER2	Triple négatif
Récepteur œstrogènes	+++	+	-/+	-
Récepteur progestérone	++	+/-	-/+	-
HER2	-	-	+++	-
Prognostique	Favorable	Intermédiaire	Intermédiaire	Défavorable
Survie à 5ans Stade I	< 99%	<99%	<94%	85%

## 2. Interaction entre la tumeur et son microenvironnement

### a. Nature du microenvironnement tumoral mammaire

Initialement centrées sur la tumeur, les recherches sur le cancer considèrent maintenant la tumeur dans son environnement. En effet, la communication entre les cellules tumorales et leur microenvironnement contribue directement à la croissance

tumorale et au développement des métastases. Cette communication peut par exemple se faire via des facteurs sécrétés dans le milieu extracellulaire (hormones, facteurs de croissance, etc.) pouvant interagir avec des récepteurs spécifiques à la surface de leurs cibles cellulaires. Le microenvironnement varie selon le type de tissu et de l'organe, et inclut toutes les cellules avoisinantes : cellules du système immunitaire, fibroblastes, cellules vasculaires, etc. Ces cellules sont incluses dans la matrice extracellulaire, qui assure la structure du microenvironnement. Cette matrice contient de nombreux éléments formant un gel hydraté (acide hyaluronique, protéoglycanes, collagènes, fibronectines, etc.), prenant elle-même part dans la communication entre éléments du microenvironnement mais également avec les cellules tumorales.<sup>6</sup>

Dans le cancer du sein, le microenvironnement tumoral est complexe. Il est constitué principalement de tissu adipeux, de macrophages, de fibroblastes, d'autres cellules immunitaires ainsi que de cellules endothéliales en assurant la vascularisation (**Figure 4**). Les adipocytes matures gèrent le stockage des lipides et sont donc très volumineux : alors qu'ils représentent entre 20 et 40% des cellules du tissu adipeux, ils y occupent 90% du volume. Dysfonctionnels en cas d'obésité, ils sont également connus pour favoriser le développement du cancer du sein à la fois *in vitro* et *in vivo*.<sup>7,8,9</sup> En effet, les adipocytes peuvent libérer des substrats métaboliques, des adipokines et des cytokines qui favorisent la prolifération, la progression, l'invasion et la migration des cellules du cancer du sein. Les composés émis par les adipocytes peuvent modifier le profil d'expression géniques, induire une inflammation voire inhiber l'apoptose. En outre, les adipocytes sont également liés à la résistance à la chimiothérapie, ce qui se traduit par une mauvaise réponse thérapeutique et à l'observation de stades plus avancés du cancer du sein. Cette communication entre adipocytes et cellules tumorales peut aussi conférer à ces dernières un net avantage d'un point de vue énergétique, les processus tumoraux nécessitant une quantité importante d'énergie.

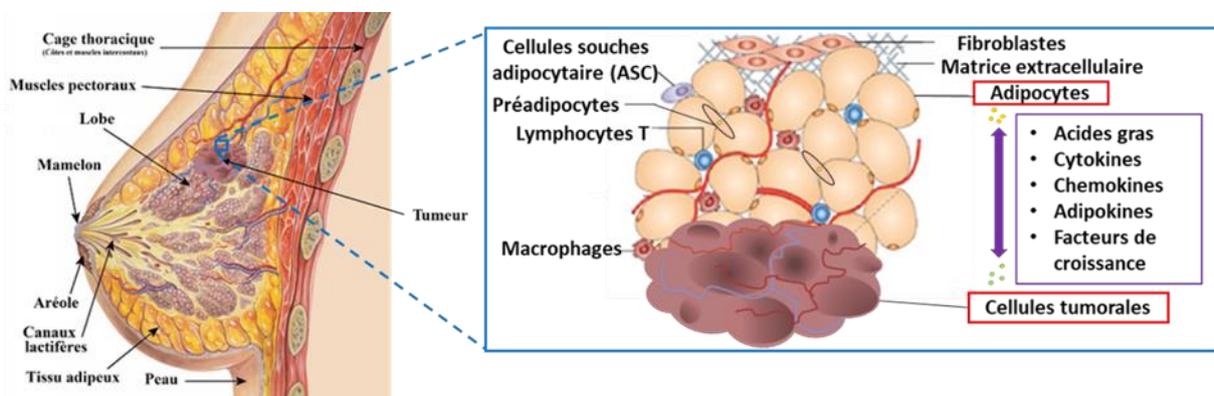


Figure 4 La communication entre adipocytes et cellules tumorales, impliquée dans la prolifération des cellules cancéreuses. Schéma de Patrick J. Lynch adapté par Maurice Zaoui.

## b. Métabolisme des cellules tumorales mammaires

La principale source d'énergie utilisée par les cellules est l'adénosine triphosphate (ATP) qui provient de la dégradation enzymatique des glucides, des protéines et des lipides. Dans les tissus sains, l'ATP provient principalement de la transformation des glucides au niveau des mitochondries : les molécules de glucose, dégradées par glycolyse, forment des molécules de pyruvate dont la dégradation génère des électrons et des protons. Ces éléments sont ensuite utilisables dans la phosphorylation oxydative, permettant la production d'ATP. Pour satisfaire leurs besoins en énergie, les cellules cancéreuses absorbent beaucoup de glucose ce qui permet leur détection par tomographie par émission de positons (TEP) avec un traceur adapté. Les lipides jouent également un rôle important dans le métabolisme de la cellule cancéreuse, tel qu'illustré dans la **Figure 5**. En particulier, les cellules cancéreuses peuvent plus facilement stocker de l'énergie en transformant des glucides en lipides, c'est la lipogenèse *de novo*, mais aussi capter des lipides exogènes et les stocker ou les transformer en énergie par le biais de l'acétyl-coenzyme A et d'un mécanisme de  $\beta$ -oxydation.

Cette modification du métabolisme de la cellule, aussi appelée reprogrammation métabolique permet de maintenir la croissance tumorale et confère à la tumeur des avantages par rapport aux cellules saines.<sup>10</sup> Dans un microenvironnement principalement constitué d'adipocytes et donc riche en « gras », la possibilité de capter des lipides représente un avantage certain en termes de production d'énergie.

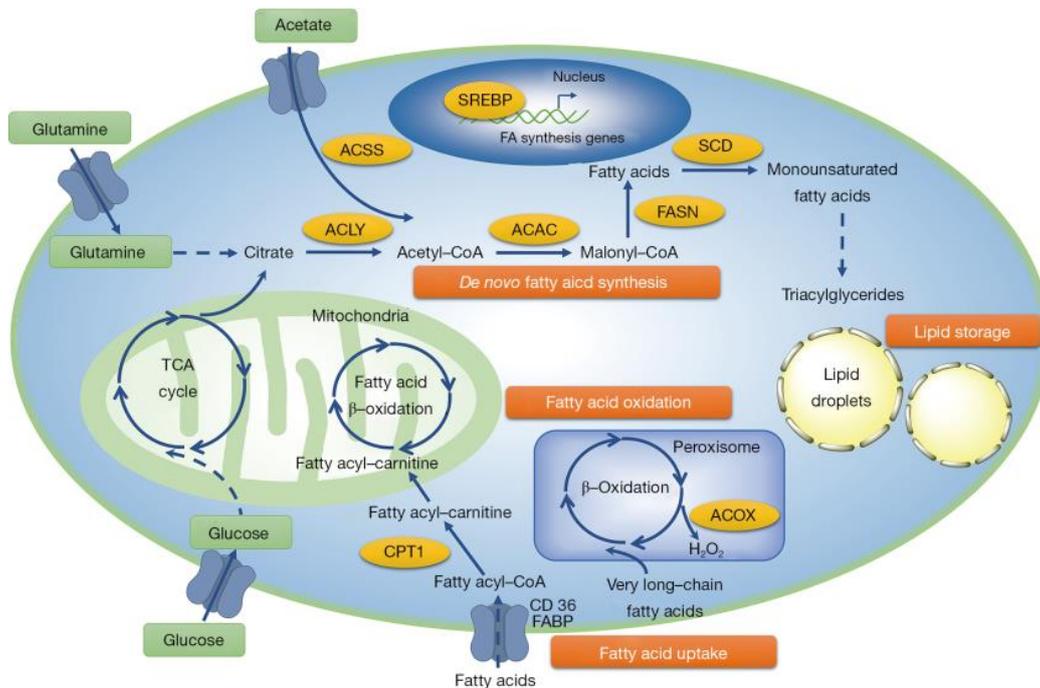


Figure 5 Illustration des méthodes de synthèse et de stockage de l'énergie dans la cellule cancéreuse mammaire. Schéma issu de <sup>11</sup>.

### c. Communication entre adipocytes et cellules tumorales

Les acides gras, de longues chaînes carbonées, insaturées ou non, et présentant à une de leurs extrémités une fonction acide carboxylique, font partie des éléments lipidiques pouvant être captés par les cellules tumorales. Leur internalisation au sein de la cellule est permise par des transporteurs d'acide gras, dont fait partie le cluster de différenciation 36 (CD36)\*. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de 53 kDa composée de 472 acides aminés, exprimée à la surface de nombreuses cellules, dont les cellules tumorales, avec des niveaux d'expression variables et une tendance à l'augmentation durant le processus métastatique de certains cancers.<sup>12</sup> Elle possède deux domaines transmembranaires et une région extracellulaire. Le domaine extracellulaire contient deux cavités hydrophobes pouvant capter des molécules hydrophobes comme les acides gras (**Figure 6**). Elle possède également un domaine permettant la liaison avec la thrombospondine (région 90-120) ce qui lui confère également un rôle dans l'angiogenèse tumorale.<sup>13</sup>

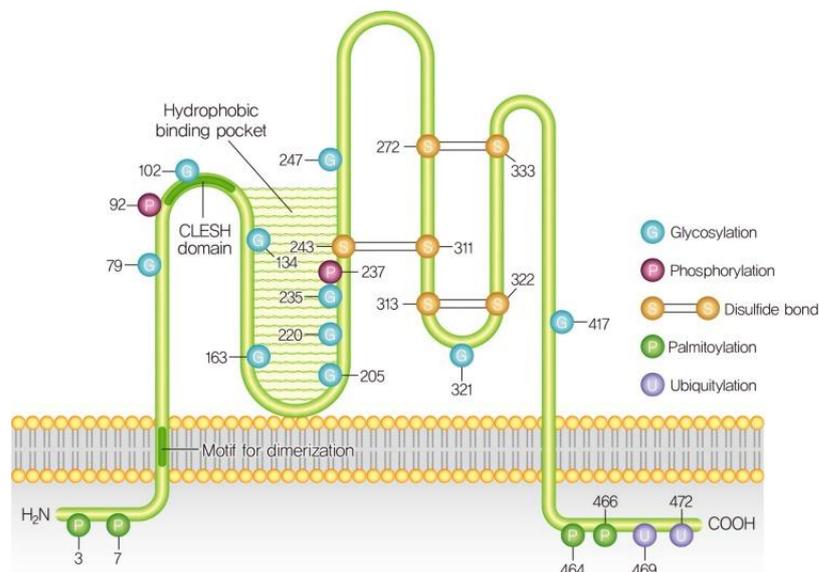


Figure 6 Représentation schématique de la protéine CD36. Schéma issu de <sup>13</sup>.

Plusieurs facteurs de transcription contribuent à la transcription de CD36 comme par exemple l'activation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor*) qui vient se lier à son élément de réponse spécifique (PPRE, pour *peroxisome proliferator response element*) sur le promoteur du gène codant pour la protéine CD36.<sup>14</sup> Cette activation de PPAR $\gamma$  peut être induite indirectement par l'internalisation des acides gras, ce qui conduit donc à une boucle d'autorégulation positive de CD36. L'activation de PPAR $\gamma$  a également d'autres conséquences sur le

\* Aussi appelé fatty acid translocase (FAT) ou scavenger receptor class B type 2 (SR-B2).

développement des cellules cancéreuses.<sup>15</sup> Son inhibition peut donc permettre de limiter la progression de la maladie, tel qu'illustré **Figure 7**.

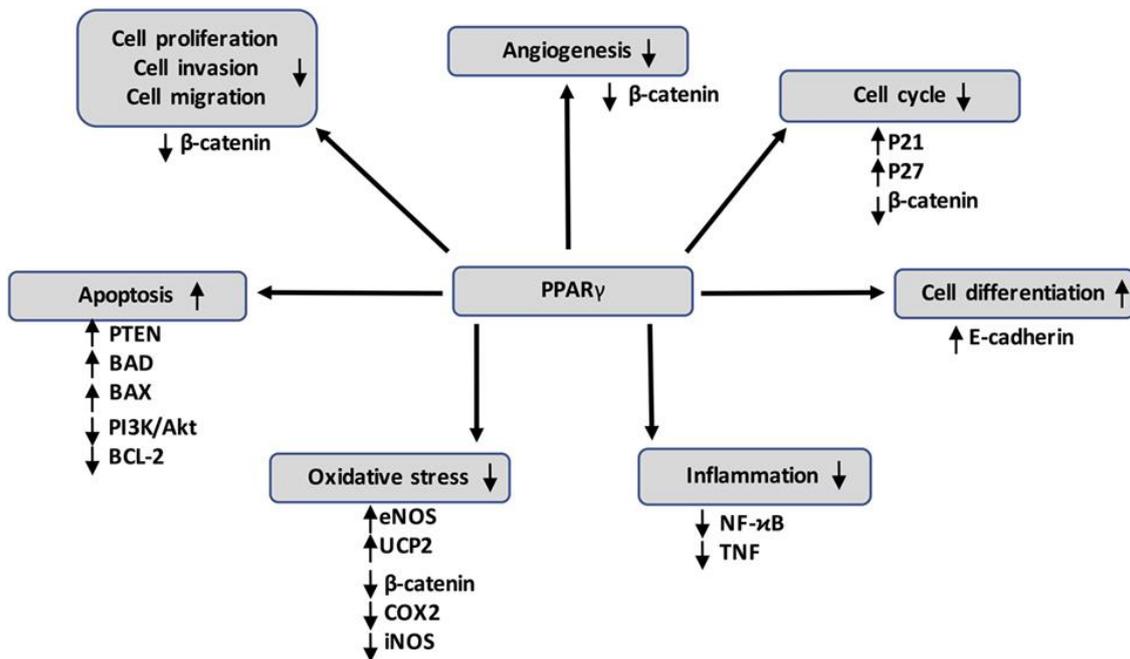


Figure 7 Action de l'inhibition de PPAR $\gamma$  sur différents facteurs et ses conséquences sur l'évolution tumorale. Schéma issu de <sup>15</sup>.

#### d. Implication de CD36 dans les processus tumoraux

Dans le tissu tumoral, CD36 est exprimé par les cellules stromales, immunitaires mais aussi tumorales. Cette protéine est surexprimée pour plusieurs cancers d'origine épithéliale : le cancer de l'ovaire<sup>16</sup>, le cancer gastrique<sup>17</sup> ou le cancer du sein<sup>18</sup>. Durant les dix dernières années, plusieurs études ont rapporté le rôle de CD36 dans l'agressivité du cancer, en particulier dans la prolifération<sup>19,20</sup>, la résistance à la chimiothérapie<sup>21,22</sup> et les processus métastatiques.<sup>16,17,19,20</sup> CD36 permet le transport d'acides gras dans la cellule tumorale et donc un apport d'énergie important pour la prolifération cellulaire. L'inhibition de CD36 a pu montrer une diminution de la taille et du volume des tumeurs dans des modèles du cancer utérin<sup>19</sup> et ovarien.<sup>20</sup> Le rôle de CD36 dans les processus métastatiques a pu être montré dans plusieurs cancers dont le cancer ovarien, où les tumeurs secondaires (métastases) exprimaient plus de CD36 que les tumeurs primaires.<sup>19</sup> Par ailleurs, l'expression de CD36 peut induire une résistance aux thérapies. Ainsi, il semblerait que les cellules du cancer du sein, résistantes à l'inhibiteur de HER2 Lapatinib, surexpriment CD36.<sup>21</sup> Une autre étude sur le traitement hormonal tamoxifen pour les cancers ER+ a montré que les cellules du cancer du sein résistant au traitement surexprimaient aussi CD36.<sup>22</sup> Cette protéine joue donc un rôle important dans l'agressivité des cancers.

Dans les cellules tumorales mammaires, des travaux récents de l'équipe ont montré que les sécrétions adipocytaires du microenvironnement induisent l'expression du récepteur CD36, qui, par conséquent, augmentent l'entrée d'acides gras dans la cellule.<sup>9,8</sup> L'équipe a également pu mettre en évidence que cette surexpression de CD36 induisait la migration, l'invasion et la prolifération de cellules tumorales mammaires (**Figure 8**).<sup>9,8</sup> Ces résultats sont cohérents avec d'autres travaux prouvant l'impact de CD36 et son transport d'acides gras dans les cellules du carcinome oral,<sup>23</sup> du cancer de l'ovaire<sup>20</sup> et du carcinome hépatocellulaire.<sup>24</sup>

L'ensemble de ces éléments font de CD36 un biomarqueur intéressant et une potentielle cible thérapeutique.<sup>25</sup> En particulier, cibler spécifiquement CD36 permettrait d'atteindre préférentiellement les cellules tumorales agressives et les métastases.

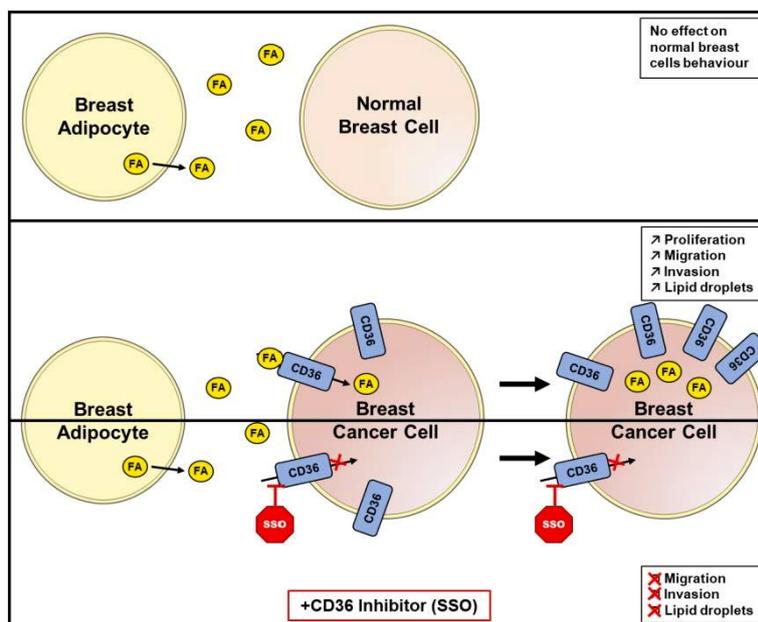


Figure 8 L'inhibition de CD36 empêche la captation d'acide gras et évite la surexpression de CD36. Schéma issu de <sup>9</sup>.

### 3. Traitements du cancer du sein

#### a. Chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie

Les traitements possibles pour un patient atteint d'un cancer sont nombreux mais visent un même objectif : l'élimination de la tumeur, des éventuelles atteintes métastatiques et la prévention des récurrences de la maladie.

Dans un premier temps, l'élimination chirurgicale de la tumeur peut être nécessaire. Pour un cancer du sein, cela passe soit par une mastectomie totale, soit par l'exérèse locale de la tumeur couplée à de la radiothérapie. Lorsque des traitements sont utilisés en amont de la chirurgie, ils sont dits « néoadjuvants », sinon ils sont dits « adjuvants ».<sup>2</sup> Les ganglions lymphatiques proches de la tumeur sont en général les

premiers à être atteints par les cellules cancéreuses. Pour diminuer le risque de récurrence, l'ensemble des ganglions lymphatiques de la zone peut être retiré (curage axillaire) mais cette méthode présente un risque d'effets secondaires tandis que 70% des patientes sont exemptes d'atteintes ganglionnaires. Les approches thérapeutiques récentes utilisent le prélèvement et l'analyse des seuls ganglions dits « sentinelles », très proches de la tumeur, avant de procéder au curage axillaire si l'atteinte ganglionnaire est confirmée et importante, ce qui diminue grandement les effets secondaires éventuels sans augmenter le risque de récurrence pour la patiente.

Avant les années 1980, les premiers essais cliniques de chimiothérapie ont montré que la combinaison de plusieurs molécules pouvait diminuer les risques de rechute et de décès pour les patientes atteintes d'un cancer du sein.<sup>26,27</sup> Les schémas thérapeutiques consistaient alors en une combinaison de cyclophosphamide, méthotrexate, et de 5-fluorouracil (traitement CMF), soit un mélange d'antimétabolites (antagoniste folique et pyrimidique) avec un agent alkylant (empêchant la réplication de l'ADN). Par la suite, l'émergence des anthracyclines (Doxorubicine) puis de poisons du fuseau comme les taxanes (Paclitaxel, Docetaxel) ont permis d'améliorer le pronostic des patientes tout en diminuant la durée des traitements. Des exemples de molécules utilisées en chimiothérapie sont résumés dans le **Tableau 2**.

*Tableau 2 Exemples de molécules utilisées en chimiothérapie et leurs cibles.* <sup>28,29</sup>

Famille	Cibles cellulaires	Exemples de molécules
Anthracyclines Anthracènediones	Topoisomérase II, ADN	Doxorubicine, Epirubicine, Idarubicine, Mitoxantrone
Antimétabolites	Bases puriques et pyrimidiques	5-fluorouracil, Méthotrexate, Pemetrexed, Fludarabine, Capécitabine
Alkylants	ADN	Cyclophosphamide, Ifosfamide, Busulfan
Inhibiteurs de la topoisomérase I	Topoisomérase I, ADN	Irinotécan, Topotécan, Deruxtecane, Exatecan
Poisons du fuseau	Tubuline	Docétaxel, Paclitaxel, Vinorelbine, Vindésine, Vinblastine, Docetaxel
Sels de platine	ADN	Carboplatine, Cisplatine, Oxaliplatine

La radiothérapie est un autre traitement classique des cancers. Elle consiste à exposer la région localisée autour d'une tumeur à des radiations par le biais de faisceaux d'électrons ou de photons afin d'affecter les capacités prolifératives des cellules

cancéreuses et induire une mort cellulaire. La dose délivrée, mesurée en Gray (Gy) et fractionnée, doit être calculée et administrée avec précision pour limiter les effets secondaires et le risque de récurrence. Les cancers du sein sont en général traités par des doses entre 45 et 50 Gy étalées sur une période de 20 à 30 jours.

### b. Thérapies ciblées

Certains traitements sont spécifiques au cancer du sein et leur choix dépend du stade de la tumeur et des différents marqueurs exprimés à la surface des cellules tumorales.

En présence de tumeurs mammaires hormono-dépendantes, présentant une abondance de récepteurs aux œstrogènes, la liaison des œstrogènes à ces récepteurs induit l'activation de gènes favorisant la prolifération et la survie cellulaire. La diminution de la production des œstrogènes, notamment par l'utilisation d'inhibiteur de l'aromatase (letrozole, exemestane, anastrozole), ou la fixation d'un anti-œstrogénique sur ce récepteur (tamoxifène), permet de diminuer le risque de récurrences. Ces traitements, généralement administrés par voie orale sur le long terme (5 à 10 ans) peuvent être couplés à la chimiothérapie avec différentes molécules anticancéreuses (Docetaxel, Doxorubicine, cyclophosphamide, paclitaxel) administrés par voie intraveineuse sur 12 à 20 semaines, seules ou combinées. L'apparition de résistances à l'hormonothérapie conduit à un traitement basé sur la chimiothérapie seule. Les récepteurs à la progestérone ne sont eux pas utilisés comme cible thérapeutique, en particulier car leur expression peut varier en cours de traitement.<sup>30</sup>

En 1986, Axel Ullrich a découvert l'existence de la protéine HER2. L'année suivante, Dennis Slamon a montré la surexpression de l'oncogène HER2/neu chez environ 30% des patientes atteintes de cancer du sein.<sup>31</sup> Cette découverte a conduit dès la fin des années 1990, à l'utilisation d'anticorps monoclonaux humanisés dirigés contre la protéine HER2 ou ses hétérodimères (trastuzumab, pertuzumab) qui ont permis d'améliorer la prise en charge de certaines tumeurs mammaires non-hormonales-dépendantes surexprimant la protéine HER2 et qui étaient jusqu'alors de très mauvais pronostic. Ces anticorps permettent d'agir sur la prolifération et la migration tumorales (**Figure 9**). La dérégulation de la voie HER2 induit une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire, notamment par le biais de la voie « PI3K/AKT/mTor » qui peut être contrée par l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinase comme le lapatinib ou le neratinib.<sup>32,33</sup>

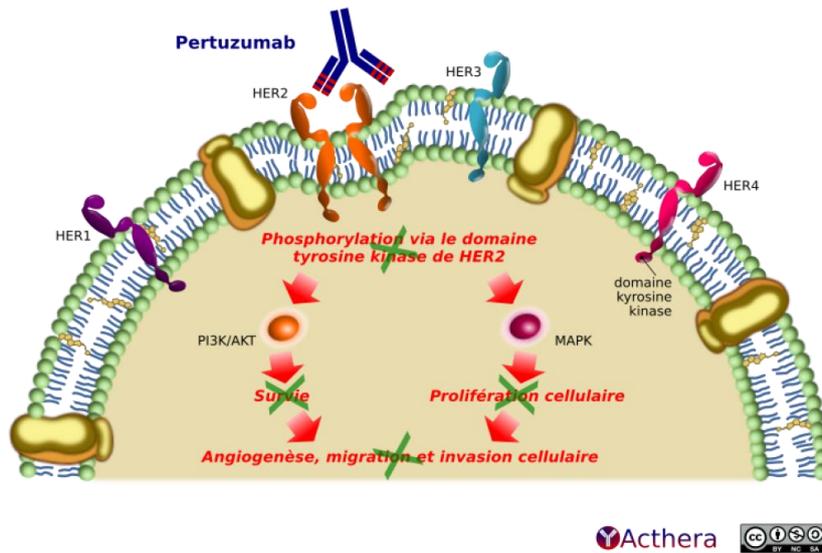


Figure 9 Le récepteur *HER2* et les réactions en cascade associées influençant la différenciation et la migration cellulaire, l'apoptose et l'angiogénèse. Source : Acthera, guide des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique par l'université de Lille.

Les tumeurs dites « triples négatives » (TNBC), donc ne surexprimant aucun récepteur permettant l'usage des thérapies ciblées listées ci-dessus, présentent en réalité une grande diversité moléculaire qui oriente les choix thérapeutiques, bien que les traitements habituels restent la combinaison chirurgie, chimiothérapie et/ou radiothérapie.

Certaines patientes atteintes de cancers mammaires ou ovarien peuvent présenter une mutation des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* (*Breast Cancer 1* ou *2*) induisant des anomalies au niveau d'un des systèmes de réparation de l'ADN. La présence de cette mutation permet de recommander les inhibiteurs de Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) tels que l'olaparib ou le talozaparib, qui, en empêchant la réparation de l'ADN, induisent à terme la mort cellulaire et inhibent la formation de canaux microvasculaires par mimétisme vasculogénique.<sup>34,35</sup>

Dans environ 20% des cas, les cellules tumorales présentent à leur surface un ligand, PD-L1, leur permettant d'échapper au système immunitaire. En effet, les lymphocytes T sont programmés pour éliminer une cible et la détruisent lorsqu'ils la rencontrent. Ils ont cependant un mécanisme de sécurité, le point de contrôle immunitaire, sous la forme d'une protéine, PD-1, pour « *Programmed cell Death protein 1* », qui une fois liée à son ligand, PD-L1, désactive le lymphocyte, évitant ainsi un excès d'activité du système immunitaire. L'élimination des cellules tumorales exprimant PD-L1 par le système immunitaire passe donc par la prévention du couplage PD-1/PD-L1 (**Figure 10**). Pour cela, des anticorps permettant de bloquer l'interaction avec PD-L1 ou PD-1 ont été développés, c'est ce qu'on appelle l'immunothérapie. Trois anticorps

sont actuellement présents sur le marché, les anti PD-1 Nivolumab et Pembrolizumab (approuvé par la FDA pour les TNBC en 2021) et l'anti PD-L1 Avelumab.<sup>36</sup>

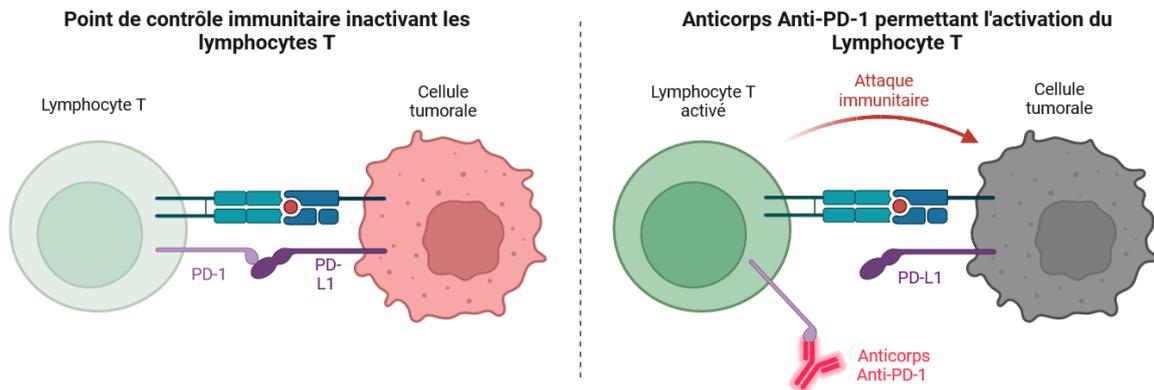


Figure 10 A gauche, la liaison PD-1/PD-L1 bloque le lymphocyte T. A droite, le blocage de PD-1 par un anticorps permet d'éviter le blocage du lymphocyte T et donc de tuer la cellule tumorale. Adapté sur BioRender.

### c. Les anticorps conjugués

Si les tumeurs présentant des récepteurs aux œstrogènes ou HER2 peuvent être traités par des thérapies hormonales ou des anticorps monoclonaux, seules 10 à 15% des tumeurs triples négatives peuvent être traitées avec les inhibiteurs de PARP et 20% avec des anti PD-1/PD-L1. La chimiothérapie reste donc l'option principale pour le traitement des TNBC, bien que les patientes ne répondent pas à ces traitements dans 50% des cas.<sup>37</sup> Il a donc été nécessaire de développer de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement ces cellules cancéreuses : les anticorps conjugués (ADC, pour *antibody drug conjugates*). Le premier ADC commercialisé, le gemtuzumab ozogamicine, aussi connu sous son nom commercial Mylotarg®<sup>®</sup>, a été développé pour le traitement de la leucémie aigüe myéloïde. Commercialisé en 2000, il est formé d'un anticorps anti-CD33 et d'ozogamicine (dérivé de la calichéamicine) reliés par un espaceur hydrazone clivable. Par la suite, de nombreux ADC ont été développés autour des années 2010, tous présentent la même composition : un anticorps humanisé, une molécule thérapeutique et un espaceur, clivable ou non (**Figure 11**).<sup>38</sup>

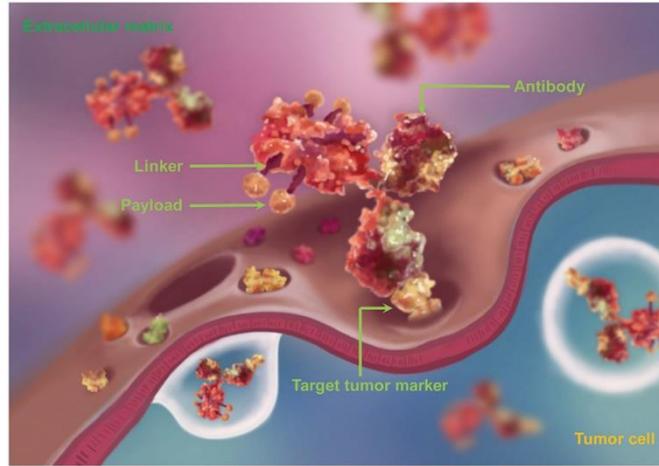


Figure 11 Principe de fonctionnement d'un anticorps conjugué. Après fixation sur sa cible au niveau de la membrane cellulaire, l'ADC est internalisé. Schéma issu de <sup>38</sup>.

Pour le traitement du cancer du sein, les premiers ADC commercialisés ciblaient la protéine HER2 via l'anticorps trastuzumab fonctionnalisé avec l'emtansine (poison du fuseau) ou, plus tard, du deruxtecan (inhibiteur de topoisomérase). Ce n'est qu'en 2021 que le premier ADC pour traiter les tumeurs triples négatives avancées ne répondant pas à la chimiothérapie a été approuvé. Le sacituzumab govitecan (Trodelivy®) est constitué d'un anticorps dirigé contre la protéine Trop2 et fonctionnalisé via un espaceur PEG/carbonate par le métabolite actif de l'irinotecan, SN38, aussi inhibiteur de topoisomérase I. Les ADC autorisés en 2022 sont présentés **Figure 12**.<sup>37,38</sup> Ces ADC ciblent des protéines telles que CD33, CD30, HER2, CD22, CD79, nectine-4, Trop2, etc.

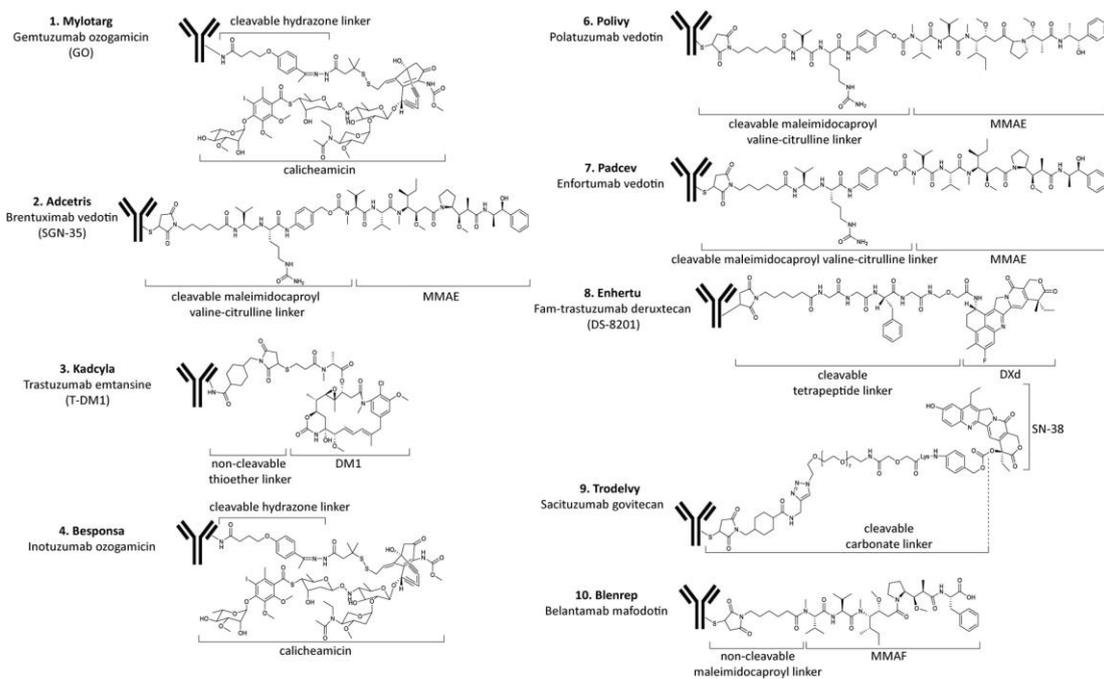


Figure 12 Différents anticorps conjugués utilisés en clinique pour traiter différents cancers : Leucémie aigüe myéloïde (1) ou lymphoblastique (4), lymphome (2 et 6),

*cancer du sein (3, 8 et 9), carcinome urothélial (7) et myélome multiple (10)\*. Schéma issu de <sup>38</sup>.*

Les ADC présentent des propriétés particulièrement intéressantes qui en font de bons vecteurs thérapeutiques grâce à plusieurs précautions prises lors de leur élaboration. Le choix de la cible (antigène) est un aspect crucial du développement de l'ADC : l'antigène doit être présent de façon homogène à la surface des cellules tumorales mais non exprimé, ou de façon minimale, sur les cellules saines. L'anticorps ciblant l'antigène doit avoir une haute affinité pour celui-ci, avoir une immunogénicité faible (anticorps humanisés) permettant un temps de circulation long, tout en permettant une internalisation après couplage. La molécule thérapeutique est en général choisie pour son efficacité et sa toxicité, tout en étant non immunogène. Elle doit, de plus, pouvoir être conjuguée à l'anticorps via un espaceur, clivable ou non. Un espaceur clivable permet la rupture de la liaison anticorps molécule thérapeutique en fonction de l'environnement (pH, présence d'enzymes) mais peut engendrer une libération non spécifique de la molécule, parfois utilisée volontairement pour augmenter l'effet de l'ADC. Un espaceur non-clivable nécessite la dégradation de l'anticorps, ce qui permet d'éviter une action non spécifique de l'ADC mais limite parfois ses effets.<sup>39</sup> Les anticorps conjugués dirigés contre les cancers du sein approuvés ou en cours d'évaluation clinique sont présentés dans le **Tableau 3**.

*Tableau 3 Les anticorps thérapeutiques approuvés ou en cours d'évaluation.<sup>39</sup>*

Anticorps conjugués	Cible	Etat essai clinique
<b>Trastuzumab emtansine (T-DM1)</b>	HER2	Approuvé
<b>Trastuzumab deruxtecan (T-DXd)</b>	HER2	Approuvé
<b>Trastuzumab duocarmazine (SYD985)</b>	HER2	Phase 3
<b>A166</b>	HER2	Phase 1/2
<b>ARX788</b>	HER2	Phase 2
<b>RC48</b>	HER2	Phase 2/3
<b>Sacituzumab Govitecan</b>	TROP-2	Approuvé
<b>Datopotamab deruxtecan (Dato-DXd)</b>	TROP-2	Phase 1

\* Le moxetumomab pasudotox (Lumoxiti) constitué d'un fragment d'un anticorps antiCD22 et de la toxine PE38 a perdu son autorisation de mise sur le marché en Europe en juillet 2021 et n'est pas mentionné dans la figure.

<b>SKB264</b>	TROP-2	Phase 1/2
<b>BAT8003</b>	TROP-2	Phase 1
<b>DAC-002</b>	TROP2	Phase 1
<b>Patritumab deruxtecan (HER2-DXd)</b>	HER3	Phase 2
<b>Ladiratumumab vedotin</b>	LIV-1	Phase 1/2
<b>CAB-ROR-ADC</b>	ROR2	Phase 1/2
<b>SAR408701</b>	CEA-CAM5	Phase 2
<b>SAR566658</b>	CA6	Phase 1

A noter que les autorisations de mise sur le marché d'ADC dirigés contre Trop2 ou HER2 ont déclenché le développement d'ADC similaires par d'autres entreprises utilisant leur propre technologie de fonctionnalisation et de libération.<sup>39</sup>

L'intérêt des anticorps conjugués semble clairement établi pour le traitement des cancers et en particulier des cancers du sein triples négatifs. Toutefois, la production à l'échelle industrielle de ces composés est complexe et coûteuse. L'utilisation d'une alternative synthétique présentant des propriétés de ciblage équivalentes à celles des anticorps traditionnels serait donc prometteuse afin de généraliser ces traitements.

## II. Les polymères à empreintes moléculaires

### 1. Historique

Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, des matériaux capables de cibler préférentiellement une molécule donnée ont été développés. A partir de 1930, des chercheurs tels que Poliakov,<sup>40</sup> Dickey,<sup>41</sup> Colombo<sup>42</sup> ou Anderson<sup>43</sup> visent à accroître la capacité d'adsorption sélective des matériaux à base de silice, et constatent que l'ajout d'une molécule d'intérêt lors de la synthèse sol-gel de ceux-ci conduit parfois à une augmentation de la spécificité du matériau pour cette molécule. A partir des années 70, les techniques de synthèse de ces matériaux ont été améliorées et les « polymères à empreintes moléculaires » ont gagné en visibilité. En effet, à cette époque, Günter Wulff cherche à développer des polymères avec des sites actifs pour obtenir une activité catalytique similaire à une activité enzymatique.<sup>44</sup> Il découvre alors « l'impression moléculaire » à partir de monomères organiques telle qu'on l'utilise aujourd'hui et est rapidement rejoint par d'autres chercheurs (Shea, Necker, etc.). Les publications liées aux polymères à empreintes moléculaires, et en particulier ceux développés pour lutter contre le cancer,

ont alors connu une forte augmentation lors des quarante dernières années (**Figure 13**).

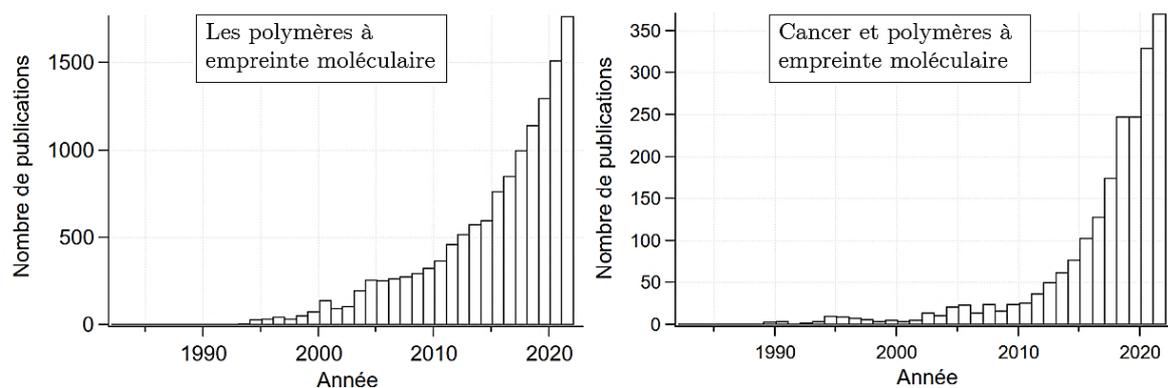


Figure 13 Nombre de publications sur ScienceDirect entre 1982 et 2022 ayant pour mots-clés : (à gauche) "Molecularly imprinted polymers" ou (à droite) ["Cancer cells" OR Tumor] AND "imprinted polymers ».

Le principe de cette technique repose sur la formation de liaisons chimiques entre une cible moléculaire et des monomères. Une fois ces liaisons effectuées, l'activation de la polymérisation génère une structure en trois dimensions autour de la cible et l'extraction de cette dernière, par rupture des liaisons établies initialement, permet la création de cavités hautement spécifiques vis-à-vis de la molécule cible choisie. A l'origine, les liaisons étaient surtout covalentes (et réversibles), ce qui permet d'obtenir une spécificité importante mais qui limite les applications possibles, car toutes les cibles ne peuvent pas se lier de façon covalente à des monomères. Une approche plus récente, développée par le groupe de Mosbach<sup>45</sup> dans les années 1980 utilise des liaisons faibles (hydrogène, électrostatique, Van der Waals, etc). Cette méthode plus simple et efficace permet alors d'utiliser ces polymères à empreintes pour un grand nombre d'applications, principalement analytiques (capteurs, phase solide pour extraction ou chromatographie) (**Figure 14**).

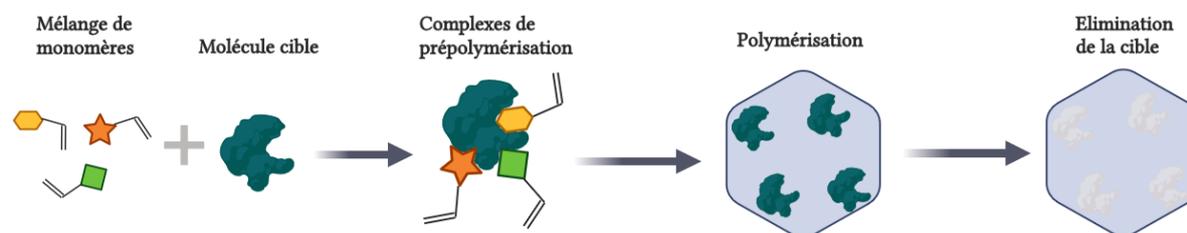


Figure 14 Schéma de principe des polymères à empreintes moléculaires. Les monomères forment des liaisons faibles avec la cible. Après polymérisation, la cible peut être éliminée du polymère pour former des cavités hautement spécifiques de la cible.

## 2. Méthodes de synthèse

### a. Méthodes de polymérisation

Aujourd'hui de nombreuses méthodes de synthèse peuvent être utilisées. Le processus de synthèse est un élément clé déterminant les propriétés des polymères à empreintes moléculaires. Leur mécanisme de formation est séparé entre polymérisation radicalaire et polymérisation sol-gel, la première étant la plus courante.

Parmi les méthodes de polymérisation radicalaire, la polymérisation en bloc ou en masse (*bulk*) est la méthode historiquement utilisée en raison de ses propriétés intéressantes telles que sa rapidité et sa simplicité de mise en œuvre. Le monolithe de polymère synthétisé en bloc doit être broyé et tamisé à la taille appropriée, ce qui est chronophage et nécessite une grande quantité de matrice. De plus, plusieurs sites de liaison de haute affinité sont détruits au cours de ce processus. D'autres techniques de polymérisation telles que la polymérisation en suspension, la polymérisation en émulsion, la polymérisation par germe et la polymérisation par précipitation ont été développées pour surmonter ces inconvénients.<sup>46</sup>

La polymérisation en suspension est également une méthode couramment utilisée pour synthétiser ces polymères. Des gouttelettes du mélange de pré-polymérisation sont mises en suspension dans un solvant (eau, huile, etc.) dans lesquelles elles sont insolubles. Chaque gouttelette peut réagir comme un mini-réacteur pour produire des particules de polymère sphériques de différentes tailles. Il est cependant nécessaire de maîtriser l'agitation pour maintenir cette configuration.<sup>47</sup> La polymérisation en émulsion est un procédé similaire dont le système est cette fois stabilisé par un tensioactif, ce qui limite les variations dues à l'agitation. Les polymères obtenus par polymérisation en émulsion souffrent néanmoins de la présence de tensioactif résiduel pouvant être difficile à éliminer lors des étapes de purification. Malgré cet inconvénient, cette méthode est utilisée pour la réalisation de nombreux polymères à empreintes.<sup>48,49,50,51</sup>

La polymérisation par précipitation permet de produire en une étape des microsphères de taille relativement uniforme avec des empreintes de haute affinité. Au cours de la polymérisation, les chaînes polymères peuvent se développer individuellement dans des solutions diluées, devenir insolubles et sédimenter. La taille et la forme des particules peuvent être contrôlées par des conditions de réaction strictes telles que la polarité du solvant, la température de polymérisation et la vitesse d'agitation. En présence d'une solution diluée de monomères et sous forte agitation, il est possible de synthétiser des particules de plus petite taille que lors d'une polymérisation en suspension. Les inconvénients de cette méthode sont la grande quantité de solvant nécessaire, la longue durée de polymérisation et une plus grande quantité de molécule cible nécessaire.<sup>46</sup>

## b. Méthodes d'initiation

Lors de la polymérisation radicalaire libre (*free radical polymerisation*), la concentration des radicaux générés est élevée, ce qui entraîne une propagation très rapide de la chaîne. Par conséquent, la terminaison prématurée de la chaîne ne peut pas être contrôlée. Les chaînes polymères ainsi formées sont à l'origine de la large distribution de taille des polymères à empreintes produits grâce à des radicaux libres. En outre, si le monomère a une réactivité différente de celle de l'agent réticulant, cela peut entraîner une variation de la distribution et de l'orientation des groupes fonctionnels. Pour pallier à ces inconvénients, les techniques de polymérisation radicalaire contrôlée sont très utilisées dans le domaine des polymères à empreintes moléculaires. On y retrouve notamment des techniques telles que l'ATRP, *atom transfer radical precipitation polymerization*,<sup>52</sup> la polymérisation par un agent RAFT, *reversible addition-fragmentation chain transfer*, qui ont permis d'obtenir des nanoparticules de polymères monodisperses et de taille contrôlée. Les agents RAFT sont les plus utilisés car ils permettent la polymérisation d'une large gamme de monomères, dans des conditions douces ainsi qu'une post-fonctionnalisation assez aisée. Le choix des groupes fonctionnels portés par ces molécules a une forte influence sur leur réactivité,<sup>53</sup> leur choix et leur design sont donc une étape particulièrement importante lors de la synthèse de polymères à empreintes moléculaires. Leur variété est illustrée dans la **Figure 15**.

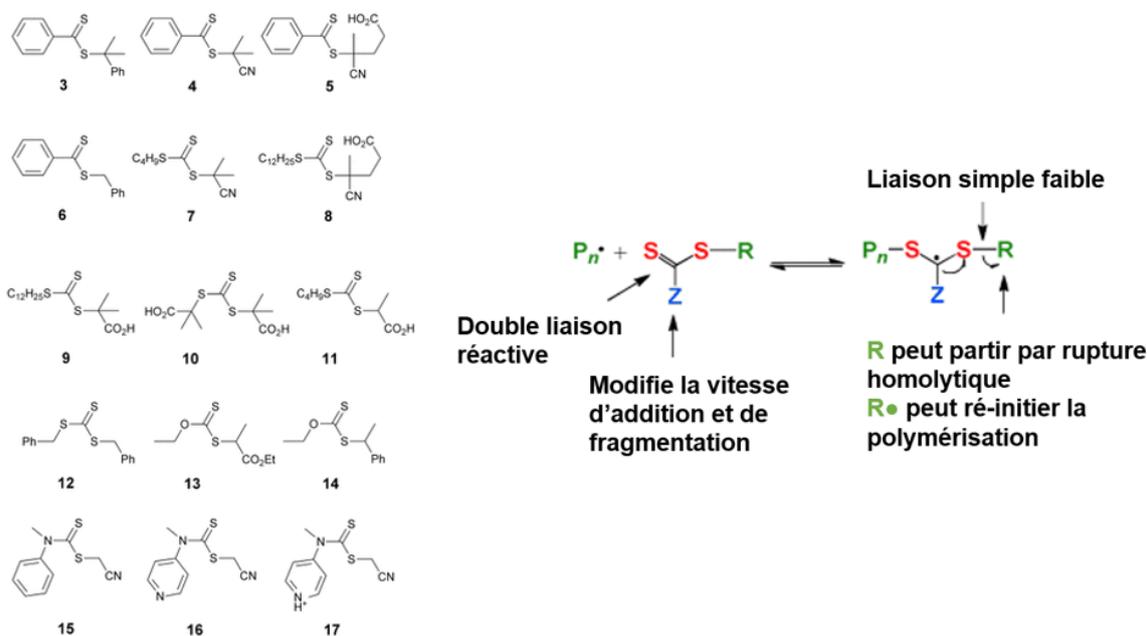


Figure 15 A gauche, exemples d'agents RAFT. A droite, principe de fonctionnement des agents RAFT. Adapté de <sup>54</sup>.

Par rapport aux méthodes conventionnelles, ces méthodes sont des processus thermodynamiquement contrôlés qui peuvent ralentir le taux de croissance de la chaîne

polymère, ce qui donne des polymères plus homogènes avec une distribution étroite des longueurs de chaîne polymère. Toutefois, le prix de ces agents et la lenteur de ces réactions font que leur usage est moins répandu que la polymérisation libre.

### c. Choix des monomères

Le choix du monomère dépend principalement de la cible choisie : les groupes fonctionnels doivent être complémentaires de ceux présents dans la molécule cible. Pour une impression non-covalente, les interactions se font généralement par le biais de liaisons hydrogènes. L'acide méthacrylique est un monomère largement utilisé grâce à ces propriétés de donneur et d'accepteur. L'acide acrylique, l'acrylamide et les vinyl-pyridines sont aussi fréquemment employés. Certains monomères sont choisis en raison de propriétés particulières, par exemple, l'ajout de N-isopropylacrylamide permet de rendre le polymère synthétisé thermosensible, ce qui peut être utile pour affecter la capture et la libération de la cible.

### d. Choix du solvant

Le solvant permet la solubilisation des différents composés mais son choix a également une forte incidence sur la qualité du polymère et de ses empreintes. En effet, les interactions faibles entre le solvant et les monomères permettent la formation de pores qui augmentent la surface accessible du polymère. Toutefois ces interactions peuvent perturber celles entre les monomères et la molécule cible, la polarité du solvant est donc un élément important lors de la préparation de polymères à empreintes. La viscosité du solvant, en limitant les phénomènes de diffusion, a aussi un fort impact sur la qualité des empreintes réalisées.

## 3. Les polymères à empreintes de protéines

### a. Enjeux et limites

Les protéines sont des macromolécules complexes et essentielles à la vie de tous les organismes vivants. Elles sont composées d'une chaîne d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques et leur séquence, codée par le génome, détermine leur structure tridimensionnelle et leur fonction biologique. Les protéines remplissent de nombreuses fonctions nécessaires à la vie au sein des cellules : la catalyse des réactions biochimiques, la régulation de l'expression génétique, le transport de molécules dans et hors de la cellule, la défense immunitaire, la structure cellulaire et le stockage d'énergie. Lorsqu'elles sont localisées sur la membrane cellulaire, elles peuvent aussi participer à la transmission de signaux cellulaires, on parle alors de récepteurs membranaires. Ces derniers sont facilement accessibles et peuvent être utiles pour identifier et cibler spécifiquement une cellule cancéreuse, car ils diffèrent en nombre et en nature de ceux d'une cellule saine.

Il existe vingt-deux acides aminés différents entrant dans la composition des protéines. Les interactions entre les différents acides aminés induisent un repliement de la protéine, formant une structure en trois dimensions. Cette conformation tridimensionnelle est en générale essentielle à l'activité biologique de la protéine. Lorsque celle-ci est altérée, on parle de dénaturation de la protéine. Celle-ci peut survenir dès que l'un de ces paramètres est modifié :

- La température : les protéines ont une plage de températures dans laquelle elles sont stables. Des températures élevées ou basses peuvent entraîner une dénaturation.
- Le pH : le pH peut affecter la charge des résidus d'acides aminés dans la protéine, ce qui peut modifier la structure tridimensionnelle et la stabilité de la protéine.
- La concentration en sels : les sels peuvent affecter les interactions électrostatiques entre les résidus d'acides aminés et altérer la structure de la protéine.
- La présence de dénaturants : certains produits chimiques, tels que l'urée ou la guanidine, peuvent dénaturer les protéines en rompant les liaisons hydrophobes.
- Les interactions avec d'autres protéines ou molécules : les protéines peuvent interagir avec d'autres protéines ou molécules dans la cellule, ce qui peut modifier leur structure et leur stabilité.
- La nature du solvant : les protéines ne sont parfois solubles que dans l'eau.

Le choix de la synthèse utilisée pour fabriquer des polymères à empreintes de protéines est donc très limité à cause de ces paramètres, et les synthèses donnant de meilleurs résultats pour de petites molécules ne peuvent être employées. En effet, les synthèses par activation thermique dont la température dépasse 37°C ou par émulsion avec surfactant sont à proscrire car la structure de la protéine risque d'être modifiée, le risque étant alors que l'empreinte réalisée ne puisse reconnaître la protéine native. Pour les mêmes raisons, le pH et la concentration en sel doivent rester physiologiques. D'autre part, la taille même des protéines limite leur diffusion au sein d'une matrice de polymère et limite donc l'extraction de la protéine après impression. Enfin, réaliser la synthèse dans l'eau peut perturber les liaisons hydrogène entre les monomères et la cible. Malgré ces limitations de nombreux polymères à empreintes de protéines ont pu être synthétisés, comme par exemple des polymères à empreintes de : Troponine T,<sup>55</sup> Myoglobine,<sup>56</sup> Transferrine,<sup>57</sup> Procalcitonine,<sup>58</sup> etc.

Pour s'affranchir des limites liées à la diffusion des protéines dans la matrice de polymère lors de leur élimination, les chercheurs se sont attachés à limiter la « profondeur » des empreintes, c'est-à-dire à limiter l'épaisseur des couches de polymères réalisées.<sup>59</sup> Pour assurer une reconnaissance optimale de protéines, d'autres approches plus sophistiquées ont également été employées, comme la fonctionnalisation

de monomères par des aptamères<sup>60,61</sup> ou l'incorporation de chaînes de polymère dans le mélange de monomères.<sup>62,63</sup>

En plus des limites décrites précédemment, le coût des protéines d'intérêt est souvent élevé, ce qui limite l'intérêt financier des polymères à empreintes de protéines par rapport aux anticorps. Face à cet inconvénient, deux solutions ont été apportées : l'utilisation « d'épitopes », depuis les années 2000 (Alexandre Rachkov & Norihiko Minoura)<sup>64,65</sup> et la fixation de la cible sur une surface solide.

### **b. Polymères à empreintes d'épitopes**

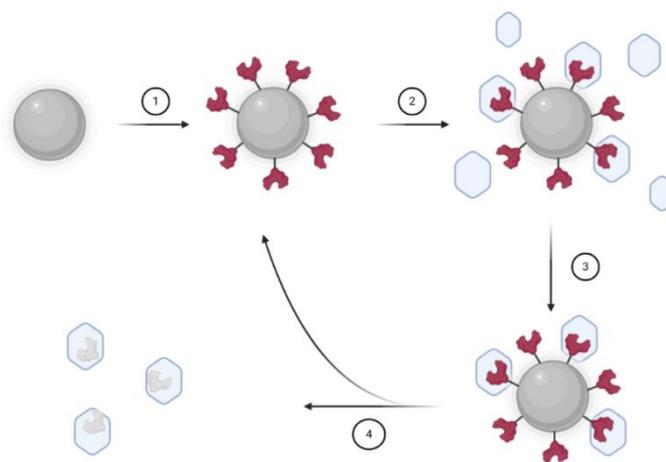
Les épitopes, dans le domaine des anticorps, désignent habituellement la région de la protéine reconnue par un anticorps. Cette région peut contenir plusieurs portions proches spatialement lorsque la protéine est repliée mais éloignée dans la séquence primaire de la protéine. Dans le cadre de la synthèse de polymère à empreintes de protéines, l'utilisation d'épitopes correspond à l'impression d'un fragment de la protéine de quelques acides aminés, au lieu de la protéine entière. Ces fragments sont moins chers, plus faciles à obtenir, plus stables et diffusent mieux dans la matrice de polymère grâce à leur taille réduite (1 à 2kDa contre 20 à plus de 60kDa pour une protéine entière). De plus, lors de l'impression de protéines entières, le grand nombre de sites fonctionnels présents à leur surface pouvant interagir avec les monomères conduit à une hétérogénéité dans la nature des liaisons formées. Ce nombre important de sites de reconnaissance augmente les possibilités d'adsorption non spécifique de protéines compétitrices. L'utilisation d'épitopes lors de la réalisation des empreintes permet donc de diminuer les interactions non spécifiques et d'augmenter l'efficacité des matériaux réalisés.

Toutefois, leur choix est particulièrement délicat. La portion choisie doit être facilement accessible, spécifique à la protéine, capable de se lier aux monomères et soluble dans l'eau. Plusieurs outils sont exploitables pour faciliter le choix de l'épitope tels que les bases de données contenant les structures 3D des protéines (Protein Data Bank du projet wwPDB), permettant de visualiser la structure de la protéine, et l'utilisation d'un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), outil permettant de repérer des homologies de séquence avec d'autres protéines de la base de données.

Une approche systématique serait la fragmentation de la protéine entière, la synthèse de polymères contenant les empreintes de ces fragments isolés et l'évaluation de leur capacité à cibler la protéine entière. Cette méthode étant particulièrement laborieuse, on préfère en général utiliser les régions immunogènes ciblées de façon connue par des anticorps. La détermination exacte de la séquence ciblée, paradoxalement souvent non fournie lors de l'achat d'anticorps commerciaux, peut toutefois s'avérer assez complexe.

### c. Synthèse sur surface solide

La synthèse sur surface solide est une approche complémentaire de l'utilisation d'épitopes qui peut aussi bien être réalisée avec des protéines entières que des épitopes. Développée en 2013 par l'équipe de Piletsky, cette méthode a largement été reprise et améliorée par la suite.<sup>66</sup> La cible est fixée de façon covalente sur une surface solide, en général des billes de verre (50-100 $\mu\text{m}$ ) (**Figure 16-1**). Un mélange de monomère, contenant au moins un monomère thermosensible est utilisé pour former des particules de polymère (**Figure 16-2**). Puis un lavage à froid permet d'éliminer les particules non fixées sur la cible (**Figure 16-3**). Enfin, un lavage à chaud permet de décrocher les nanoparticules de polymères présentant des empreintes de la cible (**Figure 16-4**).



*Figure 16 Synthèse sur billes de verre. (1) Des billes de silice sont fonctionnalisées avec la protéine cible. (2) La polymérisation de monomères adaptés forme des nanoparticules de polymères. (3) Le polymère libre est éliminé. (4) Une élévation de température permet le décrochage des polymères spécifiques et leur récupération.*

Cette méthode est particulièrement intéressante car elle permet d'obtenir des particules de haute affinité (les autres sont éliminés), avec des constantes d'affinité de l'ordre du nanomolaire, et elle offre la possibilité de réutiliser les billes fonctionnalisées<sup>67</sup> voire d'automatiser la synthèse,<sup>68</sup> ce qui est intéressant en vue d'une éventuelle commercialisation. Il est possible de changer la nature du substrat solide pour améliorer le rendement et la reproductibilité de la synthèse, par exemple en la remplaçant par des particules magnétiques de plus petite taille (670 nm)<sup>69</sup> ou par des billes de polymère,<sup>70</sup> qui permettent d'éviter le décrochage de la cible de la surface lors des lavages (hydrolyse de Si-O). Ces deux méthodes, bien que produisant de meilleurs résultats en termes de ciblage que la synthèse sur bille de verre, sont toujours en cours d'amélioration, notamment en raison de contaminations des solutions de polymères à empreintes.<sup>70</sup>

Bien que peu de chercheurs s'y soient intéressés, ces méthodes de synthèse sur surface solide permettent aussi l'optimisation de la composition du mélange de

monomères. En effet, la nature et la proportion des monomères utilisés peuvent avoir un impact important sur la qualité des empreintes réalisées. En 2008, Shea et al, a réalisé une librairie de 13 polymères à empreintes de protéines réalisés par précipitation à partir de différentes proportions d'acrylamide (AM), d'acide acrylique (AAc), de N-(3-aminopropyl) methacrylamide hydrochloride, et de N-tert-butylacrylamide (TBAm), permettant des liaisons hydrogènes, électrostatiques et hydrophobes et de N, N'-methylenebisacrylamide (BIS) en tant que réticulant.<sup>71</sup> Parmi ces 13 polymères, seuls deux avaient une affinité pour la protéine cible. Cependant, la méthode utilisée, longue et laborieuse, ne permet l'évaluation que d'un nombre restreint de monomères et de cibles. L'adaptation de la synthèse bille de verre dans des microplaques 96 puits permet de simplifier cette évaluation. En 2019, l'équipe de Piletsky utilise cette méthode pour optimiser sa synthèse sur billes de verre, qui permet alors, de façon simple, d'évaluer 32 compositions différentes en parallèle, en réalisant des triplicats.<sup>72</sup> Ils ont notamment montré que la variation de la composition du mélange de monomère pouvait avoir un impact lors de l'impression d'épitopes mais pas lors de l'impression de protéines entières. Dans le cadre de l'impression de protéine entières, ils supposent que l'absence d'un type de monomère n'empêche pas les autres monomères de s'organiser autour de la protéine et que le nombre important de sites ainsi que leur disposition en trois dimensions permet encore de générer des polymères à empreintes de protéines de haute affinité.

## 4. Applications

### a. Capteurs et dosages sériques

Les anticorps sont souvent utilisés afin de détecter et doser des protéines, notamment dans des milieux complexes. L'utilisation de polymères à empreintes de protéines en tant qu'agents de détection dans un capteur permet une plus grande flexibilité grâce à leurs caractéristiques : la possibilité de cibler spécifiquement avec une constante d'affinité de l'ordre du nanomolaire, une grande stabilité thermique et chimique permettant leur réutilisation. La méthode de détection couplée à l'emploi de polymères à empreintes de protéines peut générer un signal de différente nature<sup>73</sup> : électrochimique,<sup>74</sup> électroluminescent<sup>75</sup> ou fluorescent<sup>76</sup>. Ce dernier type de signal est le plus répandu du fait de la rapidité de sa réponse et d'une technologie très accessible. Leur limite de quantification varie de  $10^{-11}$  mol/L pour les détecteurs par fluorescence<sup>77</sup> à  $10^{-12}$  mol/L pour les capteurs électroluminescents<sup>78</sup> (**Figure 17**). Ces méthodes reposent sur la mesure d'un signal déclenché par la reconnaissance de la cible par l'empreinte.

Par analogie plus directe avec les anticorps classiques, les polymères à empreinte de protéine sont aussi employés lors de dosages de protéines dans des milieux biologiques complexes, notamment dans des tests ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent

Assay). Les tests ELISA existent sous trois formes. Soit une détection directe : un anticorps couplé à une enzyme générant un signal détectable, va se fixer sur la cible. Soit une détection indirecte : le signal provient d'un anticorps secondaire qui va reconnaître l'anticorps interagissant avec la cible. Enfin, le troisième format de test ELISA est dit sandwich, deux anticorps distincts se lient à la cible dont l'un est fixé à un substrat, et l'autre génère un signal.

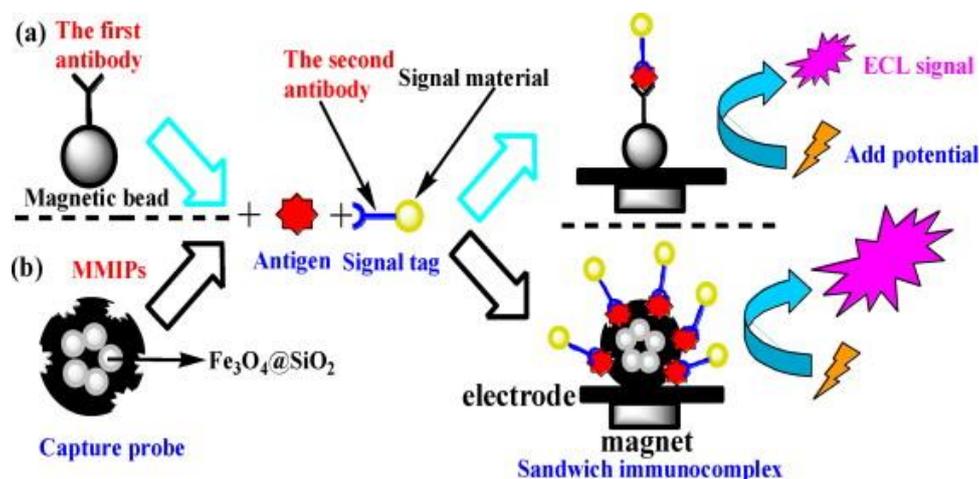


Figure 17 Principe de détection par électrochimiluminescence a) avec des anticorps magnétiques, b) avec des polymères à empreintes de protéines magnétiques. Schéma issu de <sup>78</sup>.

Lors de ces tests ELISA, les anticorps sont donc remplacés par des polymères à empreintes de l'analyte à détecter. Plusieurs protéines ont ainsi pu être détectées : l'alpha foeto-protéine, l'antigène carcinoembryonnaire<sup>79</sup> (**Figure 18**) et la procalcitonine<sup>80</sup> par un test « sandwich », la biotine, la glucosamine, la fumonisine B2 et la peroxydase de raifort par détection enzymatique directe<sup>81</sup>. La limite de détection pour ces tests est en général similaire à celle obtenue avec des anticorps<sup>82</sup> : pour la biotine, 1.2 pM pour les polymères contre 2.5 pM avec anticorps, pour la fumonisine B2: 6.1 pM contre 25 pM et pour la glucosamine, 0.4pM contre 0.3pM.

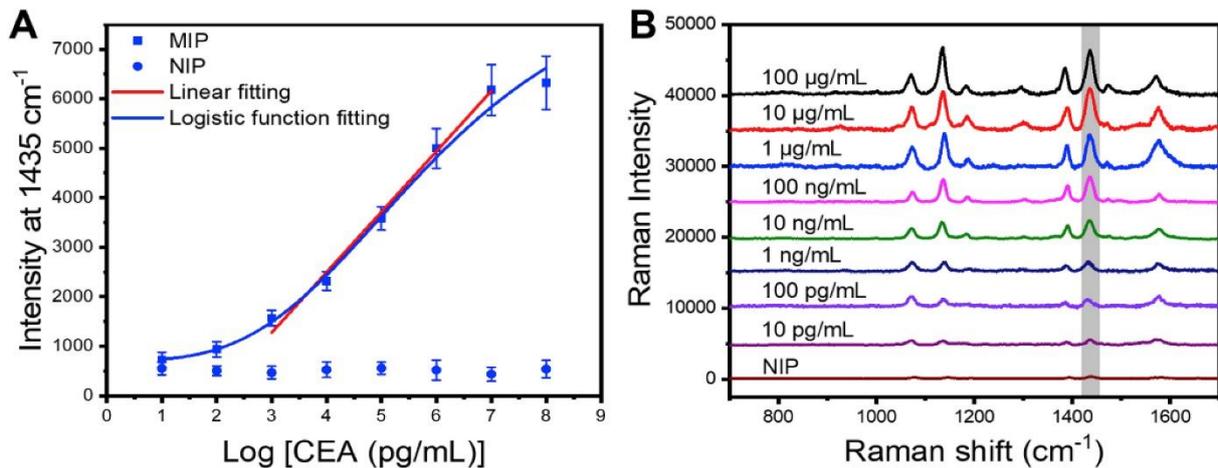


Figure 18 Quantification de l'antigène carcinoembryonnaire par sandwich avec des polymères à empreintes de protéines et détection SERS (surface-enhanced Raman scattering). Figure issue de <sup>79</sup>.

### b. Imagerie et thérapie

Au vu de ces performances, les polymères à empreintes de protéines semblent suffisamment efficaces pour remplacer les anticorps pour des applications thérapeutiques. En particulier, de nombreux polymères ont été développés pour cibler des biomarqueurs présents à la surface de cellules cibles.

Pour ces applications, des paramètres supplémentaires sont à prendre en compte. La taille des nanoparticules à visée thérapeutique est un élément clé vis-à-vis de leur efficacité et de leur innocuité. En effet, des particules de taille inférieure à 30 nm doivent s'agréger pour que leur absorption par des cellules devienne énergétiquement favorable. A contrario, la vitesse d'absorption de particules de taille supérieure à 50 nm est limitée par le temps nécessaire à la membrane pour envelopper la particule. La pénétration d'un grand nombre de particules au sein des cellules est donc optimale entre 30 et 50 nm. Néanmoins, il a été observé que la masse totale de nanoparticules à l'intérieur des cellules est plus importante pour des particules d'une centaine de nanomètres. De plus, des particules de petite taille ont une surface totale de matériau plus importante, ce qui augmente la génération d'espèces réactives de l'oxygène et la toxicité, ce qui peut désavantager les petites particules. A noter que, *in vivo*, les particules de plus de 200 nm sont facilement repérées par le système immunitaire et ont tendance à s'accumuler dans les organes, comme la rate.<sup>83</sup> Ces informations sont récapitulées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 Tableau récapitulatif de l'effet de la taille des nanoparticules. Réalisé à partir des données de <sup>83</sup>.

Taille	Absorption par les cellules	Innocuité	Furtivité
< 30 nm	-	-	+++
30-50 nm	+++	+	++
50-100 nm	+	++	+
> 200 nm	-	+	-

Il faut également prendre en compte l'élimination du matériau, de sa dégradation à son élimination, tous les produits de dégradation devant eux aussi être non-toxiques. Ce type d'étude est rarement réalisé et le caractère biocompatible du matériau est plus souvent assumé que prouvé.<sup>84,85</sup> Il s'agit en général d'études portant sur la toxicité cellulaire : Aeinehvand *et al.* ont montré la non-toxicité du poly(2-hydroxyethyl methacrylate) sur des cellules souches adipocytaires<sup>86</sup> et Canfarotta *et al.* ont montré l'absence de toxicité et d'impact sur le métabolisme cellulaire sur des cellules HaCaT (kératinocytes), MEFs (fibroblastes), HT1080 (fibrosarcome), et des macrophages pour des particules de polymère synthétisées sur surface solide à partir d'acide méthacrylique.<sup>87</sup> Enfin, d'autres études plus avancées ont observé la dégradation de ces objets dans des amas cellulaires<sup>88</sup> ou leur répartition dans les organes et les fluides biologiques chez le rongeur.<sup>89</sup> En particulier, les polymères administrés par voie orale ou intraveineuse sont capables d'atteindre tous les organes sans toxicité apparente et sont ensuite éliminés via les selles et les urines.

Malgré ces contraintes, plusieurs systèmes capables de cibler spécifiquement certaines cellules en fonction de biomarqueurs présents à leur surface ont été développés. L'impression de monosaccharides tels que l'acide sialique, le fucose ou le mannose ont été explorés par plusieurs équipes, ces molécules étant présentes de façon plus importante à la surface des cellules cancéreuses.<sup>90,91,92,93</sup> Wang *et al.* ont notamment observé via microscopie confocale que des polymères fluorescents contenant des empreintes de ces molécules ciblaient de façon significative les cellules de carcinome hépatique HepG-2 et les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 par rapport à des cellules hépatiques et mammaires saines (**Figure 19**).<sup>94</sup>

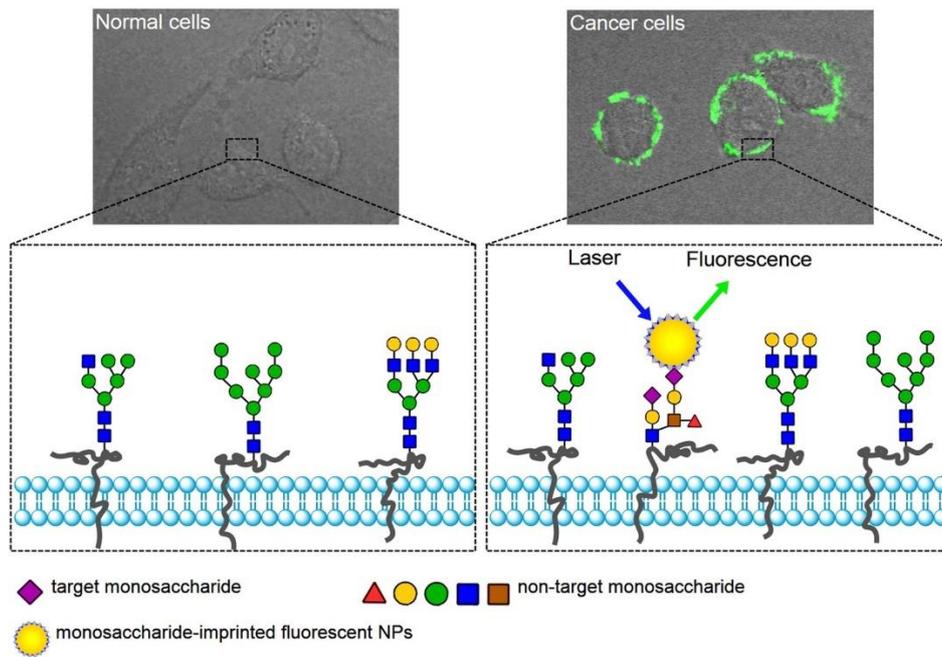


Figure 19 Les polymères à empreintes de monosaccharides ciblent préférentiellement les cellules cancéreuses par rapport à des cellules saines. Figure issue de <sup>94</sup>.

En 2017, l'équipe de Haupt a montré la possibilité d'utiliser des polymères à empreintes moléculaires pour marquer simultanément les acides hyaluroniques et sialiques.<sup>95</sup> Des quantum dots verts et rouges ont été recouverts d'une couche de polymère à empreinte permettant de cibler l'acide hyaluronique et l'acide sialique, respectivement. La combinaison de ces deux matériaux a permis de réaliser des images de microscopie telles que présentées en **Figure 20**.

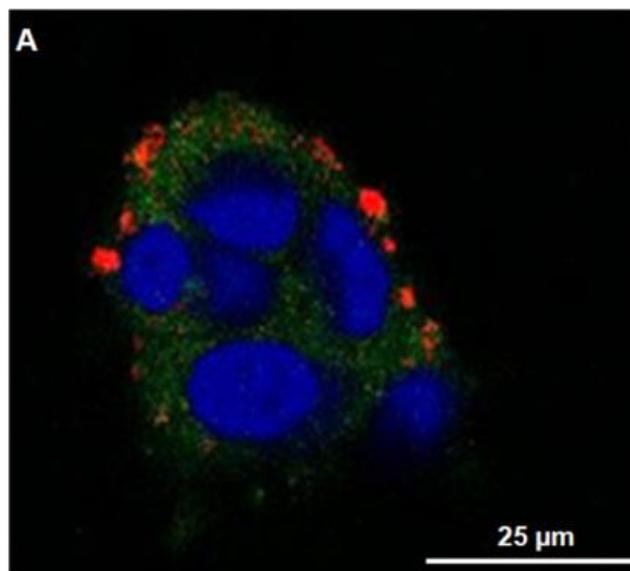


Figure 20 Image de microscopie confocale d'une cellule ciblée simultanément par des polymères à empreintes ciblant l'acide hyaluronique (rouge) et l'acide sialique (vert) et dont le noyau est marqué au DAPI (bleu) Image issue de <sup>95</sup>.

Il est également possible d'utiliser des épitopes pour cibler des protéines membranaires surexprimées à la surface de cellules cancéreuses telles que CD59,<sup>96</sup> HER2,<sup>97</sup> EGFR (*Epidermal growth factor receptor*)<sup>98</sup> ou hVEGF (human vascular endothelial growth factor).<sup>99</sup> Pour ce dernier, Cecchini et al ont même vérifié que leurs polymères à empreinte de VEGF, réalisés par synthèse sur surface solide avec un épitope et fonctionnalisés par des quantum dots fluorescents, étaient capables de cibler *in vivo*, dans un poisson zèbre, la protéine VEGF, responsable de l'angiogenèse tumorale.

Comme pour les ADC, il est possible d'encapsuler des molécules thérapeutiques au sein des polymères à empreintes moléculaires, afin d'assurer une délivrance localisée d'un traitement. Plusieurs modèles ont déjà été réalisés :

- Polymère à empreintes d'EGFR contenant de la Doxorubicine<sup>98</sup>
- Polymère à empreintes d'HER2 contenant de la Doxorubicine<sup>97 100</sup>
- Polymère à empreinte de CD59 contenant de la Doxorubicine<sup>96</sup>
- Polymère à empreintes de Fn14 (Human Fibroblast Growth Factor-Inducible 14) contenant de la Bléomycine<sup>101</sup>

Pour ces matériaux, la libération de la molécule thérapeutique repose principalement sur la diffusion passive de la molécule ou sur la dégradation du polymère dans les endosomes (milieu acide). Au-delà des polymères à empreintes moléculaires, la délivrance contrôlée de molécules thérapeutiques est devenue un enjeu majeur du XXIème siècle.

### III. Stratégies de vectorisation contre le cancer

Alors que la découverte de nouvelles molécules était le cœur de l'activité pharmaceutique, depuis quelques décennies, l'accent est aussi mis sur la formulation des traitements. En effet, après l'administration d'une molécule thérapeutique, que ce soit par voie orale ou intraveineuse, celle-ci est distribuée dans tout l'organisme avant de s'accumuler dans les organes responsables de sa dégradation et de son élimination : le foie, la rate et les reins. Cela complique donc l'arrivée d'une dose suffisante au niveau du site d'action, dès lors que celui-ci est éloigné du site d'administration, ce qui génère parfois des effets secondaires. Depuis les années 2000, on observe une accélération dans le développement de ces nouveaux systèmes de vectorisation très prometteurs.<sup>102</sup>

#### 1. Généralités

L'utilisation de systèmes de taille nanométrique comme vecteurs pour transporter des molécules thérapeutiques permet le développement de traitements plus efficaces et moins toxiques pour le patient. Ces matériaux innovants permettent d'allier protection de la molécule d'une dégradation précoce et contrôle de sa libération dans l'espace et

dans le temps. Parmi eux, les systèmes à base de polymères ou de lipides sont les plus répandus.

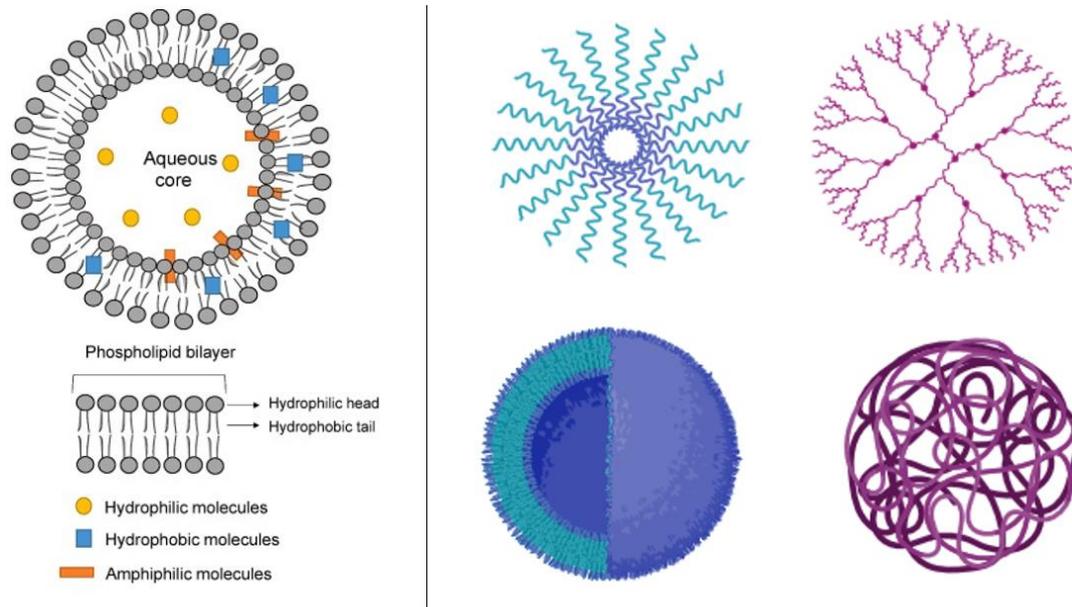


Figure 21 A gauche, structure d'un liposome et localisation des molécules en fonction de leur affinité pour l'eau.<sup>103</sup> A droite, différentes structures polymériques : micelle, dendrimère, polymérosome et particule de polymère.

Un liposome est une vésicule lipidique artificielle dont la membrane est constituée d'une ou plusieurs bicouches de lipides et qui se forme par autoassemblage de molécules amphiphiles (**Figure 21**). Ils peuvent être utilisés pour encapsuler à la fois des molécules hydrophiles ou hydrophobes.<sup>103</sup> À partir de 1995, plusieurs formulations commerciales utilisent des liposomes pour diminuer les effets secondaires et augmenter le temps de circulation de molécules anticancéreuses.<sup>104</sup> Quelques exemples sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 Différentes formulations commerciales de liposomes et leur indication. HSPC (hydrogenated soy phosphatidylcholine); PEG (polyethylene glycol); DSPE (distearoyl-sn-glycero-phosphoethanolamine); DSPC (distearoylphosphatidylcholine); DOPC (dioleoyl-phosphatidylcholine); DPPG (dipalmitoylphosphatidylglycerol); EPC (egg phosphatidylcholine); DOPS (dioleoylphosphatidylserine); POPC (palmitoyloleoylphosphatidylcholine); SM (sphingomyelin); MPEG (methoxy polyethylene glycol);

Nom commercial	Molécule active	Lipides	Indication
Doxil® (1995) <sup>105</sup>	Doxorubicine	HSPC:Cholesterol:PEG 2000-DSPE	Cancer du sein, ovarien, Sarcome de Kaposi
DaunoXome® (1996) <sup>106</sup>	Daunorubicine	DSPC and Cholesterol	Sarcome de Kaposi et SIDA
Depocyte® (1999) <sup>107</sup>	Cytarabine/Ara-C	DOPC, DPPG, Cholesterol and Triolein	Méningite néoplasique

<b>Myocet® (2000)</b> <sup>108</sup>	Doxorubicin	EPC:Cholesterol	Cancer du sein métastatique
<b>Mepact® (2004)</b> <sup>109</sup>	Mifamurtide	DOPS:POPC	Ostéosarcome non métastatique de haut grade
<b>Marqibo® (2012)</b> <sup>110</sup>	Vincristine	SM:Cholesterol	Leucémie lymphoblastique aiguë
<b>Onivyde™ (2015)</b> <sup>111</sup>	Irinotecan	DSPC:MPEG-2000:DSPE	Adénocarcinome du pancréas métastatique

Les nanosystèmes à base de polymère sont quant à eux relativement faciles à synthétiser et le grand choix de monomères sur le marché permet une versatilité dans leur caractéristiques physiques et leur mode de dégradation. En particulier, les polymères biodégradables à base de monomères tels que le lactide, le glycolide, le ε-caprolactone ou encore de chitosan<sup>112</sup> sont plébiscités après avoir démontré leur intérêt dans d'autres domaines (par exemple, des copolymères de poly[lactide-co-glycolide] sont utilisés pour les sutures résorbables). Selon la nature et la structure des polymères et leur mode de formulation, on peut obtenir différents types de nanoparticules : des nanosphères, des nanocapsules (composées d'une coque polymère renfermant un cœur de nature différente), des dendrimères et des micelles polymères.

Chaque composition et morphologie ont leurs avantages et leurs inconvénients. Par exemple, les micelles de polylactide permettent d'encapsuler des molécules peu solubles dans l'eau et sont facilement modifiables mais ont une faible capacité et efficacité d'encapsulation.<sup>112</sup>

La fonctionnalisation de molécules thérapeutiques par des chaînes de polymère peut permettre la formation spontanée de nanoparticules pouvant contenir une quantité importante de molécule thérapeutique,<sup>113</sup> parfois même jusque 50% en masse.<sup>114</sup> Cette fonctionnalisation peut aussi permettre d'envisager d'autres modes d'administration, moins contraignants pour le patient, pour des molécules hautement toxiques. Par exemple, la croissance contrôlée de chaînes d'acrylamide sur une molécule de paclitaxel permet d'obtenir une molécule « prodrogue » pouvant être injectée en sous-cutanée sans nécrose des tissus, diffusant jusque dans la circulation sanguine, présentant un long temps de résidence, et enfin capable, grâce à un lien clivable, de retrouver une forme active dans l'environnement tumoral.<sup>115</sup>

Tous ces matériaux peuvent être identifiés par l'organisme comme « étrangers », ce qui peut conduire à leur élimination précoce. Leur capture par le système immunitaire, qu'ils soient à base de monomères ou de lipides, peut être limitée en augmentant leur furtivité. Pour cela, des chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG) peuvent être greffées à leur surface, c'est par exemple le cas du Doxil<sup>®</sup>, ce qui les rend invisibles pour les macrophages et peut modifier les capacités de chargement des particules.<sup>116,117,118,119</sup>

Ces méthodes doivent cependant être utilisées avec parcimonie, les patients pouvant à terme produire des anticorps dirigés contre les PEG.<sup>120</sup>

## 2. Distribution et ciblage

Lorsqu'ils sont administrés chez un patient, les nanosystèmes décrits précédemment circulent dans la circulation sanguine avant d'être dégradés et éliminés. Ces temps de circulation et de dégradation sont dépendants de la composition et de la morphologie des nanoparticules. Dans le cas de patients atteints de cancer, une activité angiogénique importante peut avoir lieu dans l'environnement de la tumeur solide. Cette activité se traduit par la production importante de nouveaux vaisseaux immatures présentant une porosité supérieure aux vaisseaux sains. Ces pores permettent à des particules (de 20 à 500 nm) de traverser la paroi de ces vaisseaux et donc de pénétrer dans la tumeur. Ce phénomène, appelé effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*), qui permet un ciblage « passif » de la tumeur, ne concerne cependant pas la totalité des tumeurs solides.

La fonctionnalisation des nanoparticules avec un ligand choisi judicieusement peut en revanche permettre un ciblage « actif », spécifique et efficace. Ce ligand peut être un peptide, une protéine, un anticorps ou une petite molécule et il a pour but de permettre une accumulation plus importante au niveau du site actif. Plusieurs approches ont permis un ciblage spécifique à un type de cellule, de tissus ou d'organe. Par exemple, plusieurs méthodes ont été utilisées pour cibler spécifiquement la protéine CD44, surexprimée à la surface de cellules cancéreuses. Szoka *et al*<sup>121</sup> ont développé un liposome encapsulant de la doxorubicine fonctionnalisé avec de l'acide hyaluronique, ligand privilégié de la protéine CD44. Les liposomes ainsi fonctionnalisés présentent une affinité supérieure pour les cellules ayant un haut niveau d'expression de CD44, qui disparaît en présence d'acide hyaluronique libre ou en présence d'un anticorps anti-CD44. Li *et al*<sup>122</sup> ont, eux, choisi une autre approche : fonctionnaliser un liposome contenant de la doxorubicine avec un anticorps anti-CD44. Celle-ci a également été appliquée avec succès par d'autres groupes comme Jaafari *et al*<sup>123</sup> qui ont modifié du Doxil® avec un anti-CD44. Enfin, Fattal *et al*<sup>124</sup> ont fonctionnalisé un liposome avec un aptamère, un oligonucléotide capable de se lier spécifiquement à la protéine choisie, sélectionné pour cibler CD44.

Les mêmes approches peuvent être utilisées à la surface de nanoparticules de polymère : fonctionnalisation avec de l'acide hyaluronique,<sup>125,126</sup> des aptamères<sup>127</sup> ou avec d'autres cibles (EGFR<sup>128</sup>, CD133,<sup>127</sup> HER2<sup>129,130</sup>).

A ces exemples peuvent également être ajoutés les polymères à empreintes de protéines vus précédemment et en particulier ceux encapsulant des molécules

thérapeutiques.<sup>96,98,101</sup> Ils possèdent eux aussi la capacité de se lier à leur cible pour libérer une molécule thérapeutique de façon passive.

Avant de libérer sa charge, le vecteur doit en général pénétrer à l'intérieur de la cellule. Les cellules possèdent une membrane formée d'une bicouche lipidique contenant des protéines et récepteurs qui a pour rôle de protéger l'intégrité de la cellule et de contrôler ses échanges avec l'environnement extérieur. Cette membrane peut être perméable à un certain nombre de composés : ions, biomolécules, et même nanoparticules. Outre la diffusion passive à travers la membrane, il existe plusieurs mécanismes permettant l'entrée à l'intérieur de la cellule et qui sont regroupés sous le nom « d'endocytose ».<sup>131</sup> Les mécanismes d'endocytose peuvent être séparés en deux catégories : la phagocytose, qui correspond à l'internalisation de « particules », et la pinocytose, permettant l'internalisation de liquides et de solutés.

La phagocytose est un mécanisme réservé à certaines cellules telles que les macrophages, neutrophiles et monocytes, qui permet l'internalisation d'objets de taille micrométrique comme les microorganismes et les cellules apoptotiques.

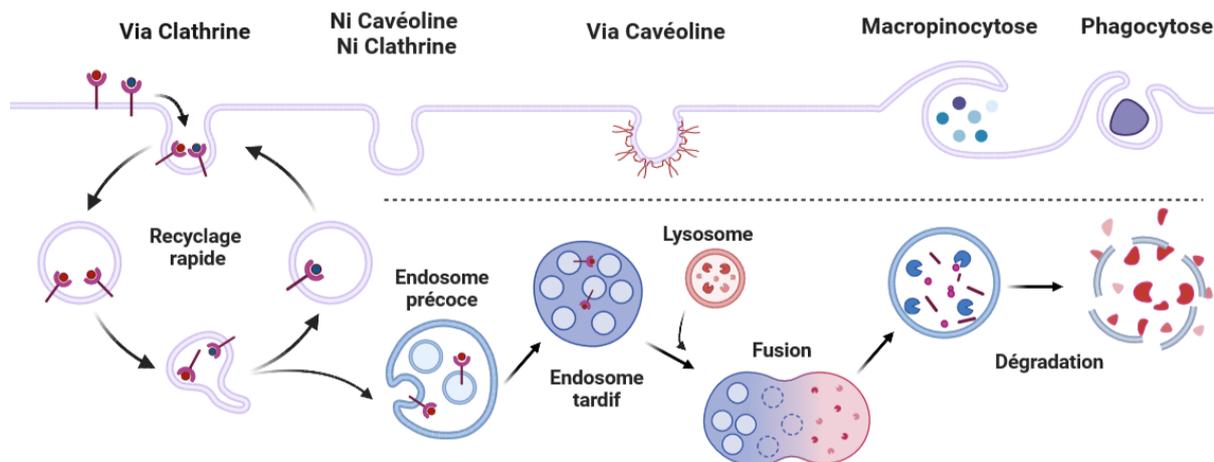


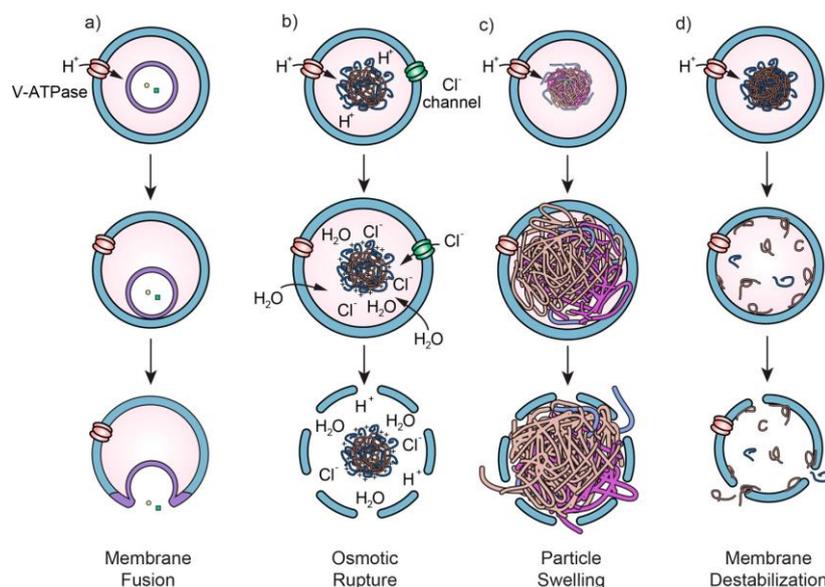
Figure 22 Les différentes voies d'entrée dans la cellule. Le contenu de l'endosome peut être recyclé vers l'extérieur ou vers des compartiments spécifiques de la cellule ou dégradés, notamment après fusion avec un lysosome.

La pinocytose est utilisée par toutes les cellules sous au moins quatre formes : l'endocytose dépendante de la clathrine, l'endocytose dépendante de la cavéoline, l'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline, et la macropinocytose (**Figure 22**).<sup>132</sup> Chaque voie, dédiée à des objets différents, est précisément contrôlée par des mécanismes de signalisation.<sup>133</sup> Les nanoparticules pénètrent alors dans le cytoplasme mais sont emprisonnées dans une vésicule appelée endosome dont le devenir dépend de son contenu. L'endosome peut être recyclé vers la membrane après une légère acidification (pH passant de 7.4 à 6.3) ou mûrir et devenir un endosome tardif. La maturation de ces endosomes et leur éventuelle fusion avec des lysosomes, contenant des

enzymes, conduit à la dégradation du contenu de la vésicule (le pH passe alors à 5.5) avant sa libération.<sup>134</sup> Pour un effet thérapeutique optimal, un échappement de l'endosome avant dégradation peut donc être nécessaire.

Pour les liposomes, l'ajout de dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE) dans le mélange lipidique lors de leur formation permet de les rendre sensibles aux changements de pH afin d'induire leur fusion avec la membrane de l'endosome et la libération de leur contenu dans le cytoplasme. Cette méthode a permis la délivrance dans le cytoplasme d'oligonucléotide après capture de liposomes dans des endosomes.<sup>135</sup> La diminution du pH dans l'endosome induit une déstabilisation du liposome et sa fusion avec la membrane de l'endosome.

De manière générale, il est également possible d'utiliser les propriétés physico-chimiques des particules. Par exemple, une fonctionnalisation de surface par une espèce cationique ou protonable peut lui permettre de jouer le rôle « d'éponge à protons » ce qui conduit à une augmentation de la pression osmotique due à l'entrée de contre-ions assurant la neutralité de l'endosome et à terme à l'éclatement de la membrane endosomale. Les particules peuvent aussi se déformer lors de l'acidification et induire des contraintes mécaniques sur la membrane de l'endosome. Enfin, certains peptides ou polymères peuvent perturber l'intégrité membranaire et former des pores dans la membrane endosomale, permettant la libération d'objets de petite taille, voire sa destruction (**Figure 23**).<sup>136</sup>



*Figure 23 Différents mécanismes d'échappement des endosomes : fusion avec la membrane, rupture osmotique, contrainte mécanique par gonflement de particule et déstabilisation de membrane. Schéma issu de <sup>136</sup>.*

Ces différents mécanismes font partie intégrante du design du vecteur et ne peuvent donc pas concerner tous les systèmes. Il faut également noter que des approches

évitant le passage dans les endosomes ont été développées pour permettre une internalisation directement dans le cytoplasme. Par exemple, certains liposomes peuvent être spécifiquement formulés pour induire leur fusion avec la membrane cellulaire et la libération directe de leur cargo dans le cytoplasme. On parle alors de liposomes fusogènes. Csiszár et al ont par exemple utilisé un mélange de DOPE et de DOTAP(1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane) pour obtenir des liposomes contenant des protéines de différentes tailles. Ils ont notamment montré que la taille de la protéine encapsulée n'influçait pas la formation des liposomes, contrairement à sa charge, et que cette méthode pouvait être utilisée pour le développement de vecteurs permettant d'éviter le passage par les endosomes (**Figure 24**).<sup>137</sup>

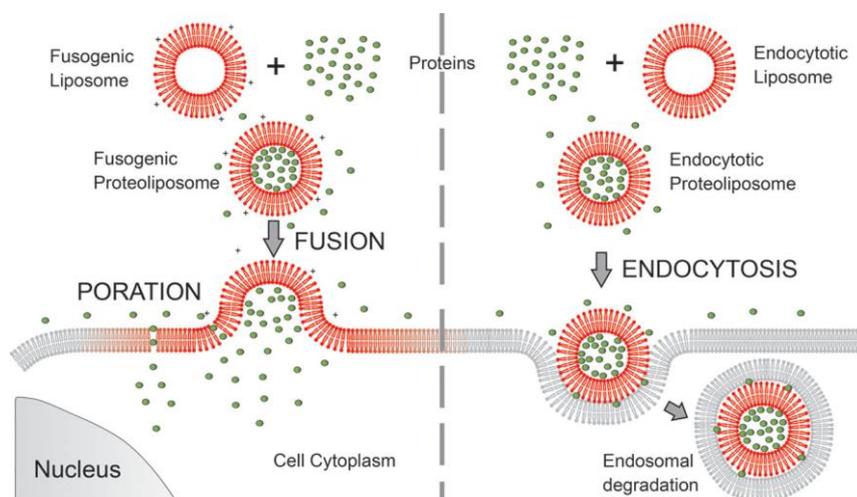


Figure 24 Mécanisme d'entrée des liposomes fusogènes. Schéma issu de <sup>137</sup>.

A noter que pour les ADC, l'internalisation se fait principalement par une endocytose dépendante de la clathrine.<sup>138</sup> L'absence de stratégie d'échappement endosomal, très rare dans les exemples utilisés dans les parties précédentes, n'est pas synonyme d'échec de l'approche thérapeutique.

### 3. Libération de la molécule thérapeutique

Que le ciblage soit passif, par effet EPR, ou actif, via une fonctionnalisation choisie astucieusement, le contrôle de la libération de la molécule active est un élément clé lors de l'élaboration d'un vecteur. En règle générale, la libération de la molécule est due à la diffusion de celle-ci ou à la dégradation de son vecteur. Certains mécanismes propres aux caractéristiques du tissu ciblé ou déclenchés de façon extérieure ont été développés afin d'améliorer le contrôle sur la libération de la molécule thérapeutique et donc son efficacité.

Il est notamment possible d'exploiter les changements de pH pour induire la libération d'une molécule uniquement au sein des cellules ciblées. Il peut s'agir de polymères pouvant gonfler lors de l'acidification ce qui peut permettre à la fois la rupture de

lysosomes ainsi que la sortie de la molécule de la matrice de polymère.<sup>139</sup> L'acidification peut aussi permettre la rupture de liaisons assurant le maintien structural du polymère pour libérer la molécule thérapeutique, comme des liaisons ortho ester (Figure 25).<sup>140</sup>

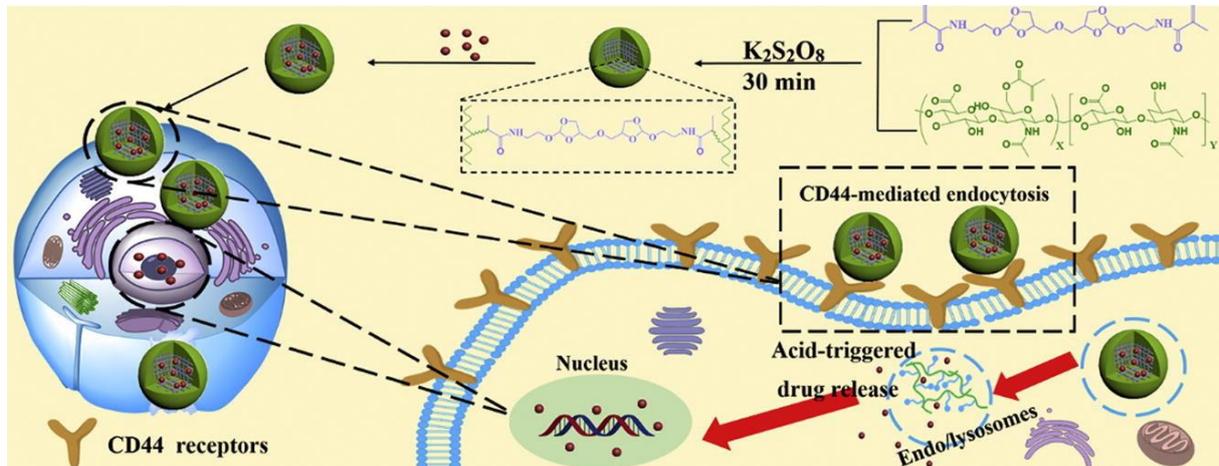


Figure 25 La présence d'acide hyaluronique dans la composition des nanoparticules de polymère permet leur internalisation après fixation sur la protéine CD44. L'acidification des endosomes conduit à la libération de la molécule thérapeutique par rupture de liaisons ortho ester. Schéma issu de <sup>140</sup>.

Dans les tissus présentant de l'inflammation, la température est plus élevée (40 à 45°C contre 37°C habituellement). La synthèse de particules capables de libérer leur cargo uniquement au-delà d'une certaine température peut donc être particulièrement intéressante. Ces particules sont alors stables pendant la circulation et ne libèrent leur cargo que suite au changement de température à l'arrivée dans le tissu ciblé. Ces polymères ont une température de transition caractéristique sous laquelle ils sont gonflés et hydrophiles et au-delà de laquelle ils deviennent hydrophobes et se contractent. Le polymère thermosensible le plus étudié est le poly(N-isopropylacrylamide) dont la température de transition est autour de 30-32°C.<sup>141</sup> Pour des applications thérapeutiques, des polymères ayant une température de transition supérieure à 37°C ont été développés. Pour cela, l'ajout de co-monomères hydrophiles tels que l'acrylamide, N-méthyl-N-vinylacetamide, N-vinylacetamide, ou le N-vinyl-2-pyrrolidinone peut permettre une augmentation de la température de transition. Amighi *et al.* ont par exemple obtenu une température de transition de 39.9°C avec un copolymère poly(N-isopropylacrylamide)-co-acrylamide contenant 11.8% d'acrylamide.<sup>142</sup>

Certaines équipes ont aussi développé des approches plus exotiques. En 2019, Yang *et al.* ont synthétisé un polymère à empreinte d'acide sialique à base de S-nitrosothiol. Après ciblage et internalisation au sein des cellules cancéreuses, la dégradation par du glutathion présent dans la cellule induit une forte libération de monoxyde d'azote NO. Or si le monoxyde d'azote intervient dans le métabolisme naturel de la cellule à faibles

concentrations, une libération d'une quantité importante de NO génère du stress oxydatif et induit à terme la mort cellulaire. Ainsi, un léger relargage est bénin pour les cellules tandis que l'accumulation dans les cellules cancéreuses présentant une grande quantité d'acide sialique à leur surface finit par inhiber la croissance tumorale chez le rat et la souris(Figure 26).<sup>91</sup>

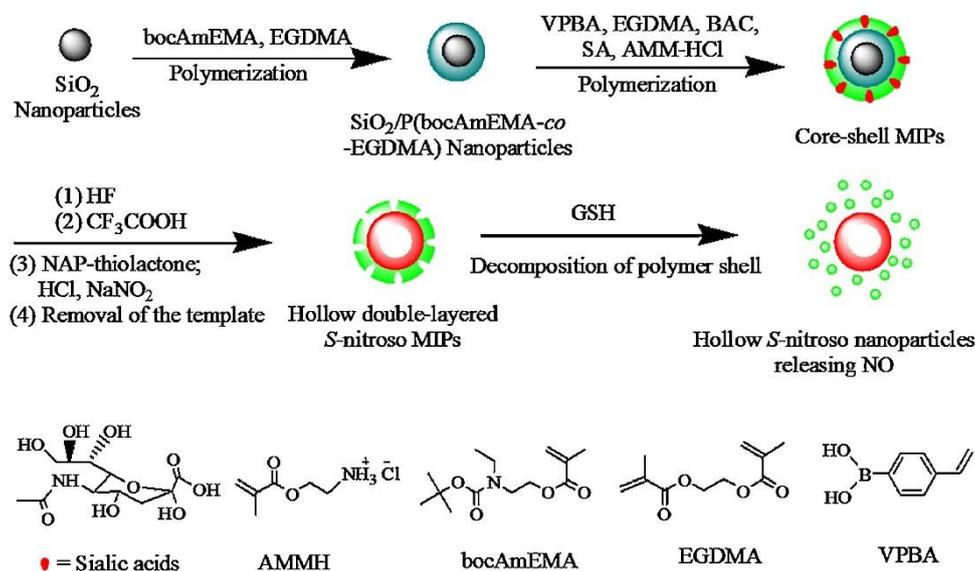


Figure 26 Synthèse de nanoparticules à empreinte d'acide sialique dont la dégradation en présence de glutathion permet la libération de NO et l'inhibition de la croissance cellulaire. Figure issue de <sup>91</sup>.

## IV. Libération contrôlée par hyperthermie magnétique

Si la libération de la molécule thérapeutique peut être conditionnée par des paramètres environnementaux (pH, température, poids moléculaire), il est aussi possible de la déclencher via un signal extérieur au patient. Une telle propriété peut par exemple être obtenue en introduisant dans le vecteur une composante inorganique réagissant à un tel signal. Dans le cadre de ce projet, la composante inorganique est représentée par des nanoparticules d'oxyde de fer présentant des propriétés magnétiques particulières.

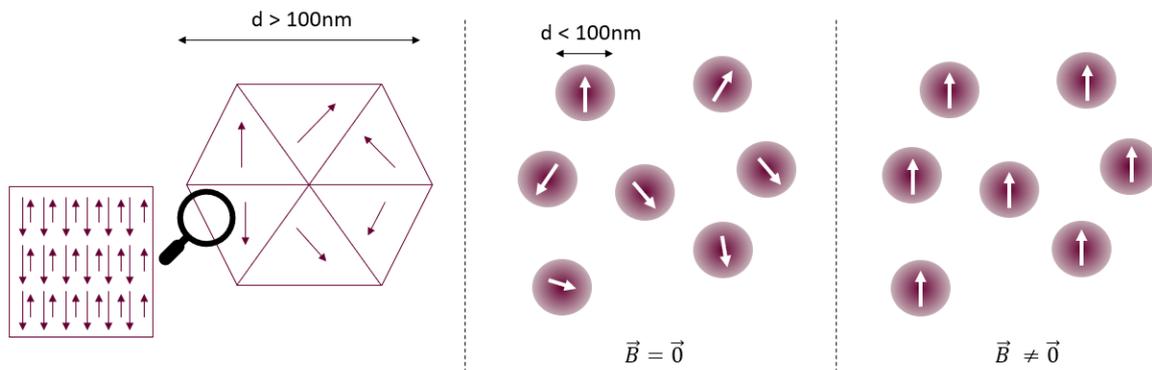
L'hyperthermie magnétique est la transformation d'une énergie électromagnétique en énergie thermique par des nanoparticules magnétiques suite à l'application d'un champ magnétique alternatif, oscillant à haute fréquence. Cette capacité est directement liée à la nature de ces nanoparticules.

### 1. Les nanoparticules magnétiques

Les oxydes de fer, composés d'atomes de fer et d'oxygène, sont connus pour leurs propriétés magnétiques. Ils se divisent en plusieurs catégories en fonction de l'état d'oxydation des atomes de fer : les oxydes ferreux FeO (II), les oxydes mixtes de fer, comme la magnétite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (II, III) et les oxydes ferriques Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (III). La maghémite,

qui correspond à la phase gamma de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , est ferrimagnétique, c'est-à-dire que les moments magnétiques portés par les atomes qui la composent sont orientés de façon antiparallèle et n'ont pas tous la même amplitude.<sup>143</sup> En pratique, ces moments s'organisent en domaines magnétiques, appelés domaines de Weiss, dans lesquels les moments sont orientés suivant un même axe.

Le passage à des particules de quelques dizaines de nanomètres permet l'obtention d'objets mono-domaines, l'aimantation de la particule peut alors être considérée comme un seul moment magnétique « géant » (**Figure 27**). Une suspension colloïdale de ces particules en l'absence de champ magnétique extérieur présente une aimantation nulle car l'orientation des moments magnétiques des particules est aléatoire et isotrope (l'énergie d'interaction dipolaire est faible devant l'énergie thermique du système) et la somme des moments magnétiques des particules est donc nulle. Lorsqu'un champ magnétique extérieur est appliqué, le moment magnétique des particules s'oriente progressivement selon la direction du champ et la suspension présente un moment magnétique non nul. On parle alors de superparamagnétisme.



*Figure 27 La maghémite est ferrimagnétique. Au sein d'un même domaine, les spins sont parallèles. Lorsque la taille des particules est inférieure à la taille du domaine, les particules ont un seul moment magnétique "géant". En présence d'un champ magnétique, les moments de ces particules s'alignent. Les tailles sont données pour des particules de maghémite.*

Cependant, le moment magnétique présente en réalité deux orientations stables, parallèles et antiparallèles au champ magnétique. Le passage d'un état à l'autre par une rotation à  $180^\circ$  de l'aimantation de la particule est conditionné au franchissement d'une barrière énergétique et a une probabilité non nulle de se produire. Le temps moyen entre deux retournements spontanés de spin, aussi appelé temps de relaxation de Néel  $\tau_N$ , s'exprime en fonction de  $\tau_0$  (compris entre  $10^{-10}$  et  $10^{-9}$  s), le temps d'essai,

$k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température en Kelvin,  $K$  l'anisotropie magnéto-cristalline d'une particule et  $V$  son volume\* :

$$\tau_N = \tau_0 e^{\left(\frac{KV}{k_B T}\right)}$$

A noter que  $KV$  peut être interprété comme l'énergie de la barrière associée au retournement de l'aimantation. Ainsi, plus l'anisotropie magnétique de la particule (liée à son volume et à sa composition) est importante, plus le temps entre deux retournements est important et donc moins cet événement est probable sur le temps de la mesure. Sur des temps de mesure supérieurs au temps de relaxation de Néel, le moment de la particule alterne entre ses deux états stables et le moment résultant est donc nul. Sur des temps de mesure plus courts, on peut observer l'alternance des états stables.<sup>144</sup> L'anisotropie magnétique, classiquement considérée comme volumique, peut également prendre son origine à la surface des particules, comme c'est le cas des particules de maghémite. Il convient alors de considérer  $K_s S$  plutôt que  $KV$ .<sup>145</sup>

Lorsque l'anisotropie magnétique augmente, la rotation du moment magnétique est nécessairement associée à la rotation de la particule. En effet le moment magnétique devient colinéaire à l'axe principal d'anisotropie de la nanoparticule, appelé axe de facile aimantation. La dissipation d'énergie s'effectue donc par une rotation de la particule et non plus seulement de son moment magnétique, que l'on nomme relaxation brownienne.<sup>146</sup> Ce temps de relaxation s'écrit lui en fonction de la viscosité  $\eta$  du fluide contenant les particules, de leur volume hydrodynamique  $V_H$ , de la constante de Boltzmann  $k_B$ , et de la température en Kelvin  $T$  :

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T}$$

En pratique, l'alignement a lieu suivant une combinaison de ces deux mécanismes. Pour les particules de petites tailles ou de faible anisotropie la relaxation est en général plutôt une relaxation de Néel.<sup>147</sup> C'est particulièrement le cas des nanoparticules de maghémite utilisées au cours de cette thèse.

## 2. Hyperthermie

La mesure de l'aimantation d'un échantillon en fonction du champ magnétique appliqué permet de tracer des courbes d'aimantation. Lorsque les particules sont dans un régime superparamagnétique, l'aimantation atteint un plateau au-delà d'une certaine valeur de champ (tous les spins sont alignés avec le champ), on parle d'aimantation à saturation. Lorsque le champ est continu ou oscille plus lentement que le temps

---

\* Avec l'approximation que les particules sont idéales, suffisamment éloignées les unes des autres et ont un volume suffisant.

de relaxation, il n'y a pas d'aimantation rémanente lorsque celui-ci devient nul (**Figure 28**). Il est possible de faire apparaître cette anisotropie en diminuant la température en dessous de la température de blocage. Un cycle d'hystérèse peut alors être mis en évidence.

En présence d'un champ magnétique alternatif oscillant à haute fréquence, la période des oscillations étant plus faible que le temps de relaxation, le système accumule de l'énergie qui est libérée sous forme thermique. Sur les courbes d'aimantation, cela se traduit par l'apparition d'un cycle d'hystérésis (**Figure 28**) dont l'aire est proportionnelle à l'énergie volumique dissipée sous forme de chaleur.

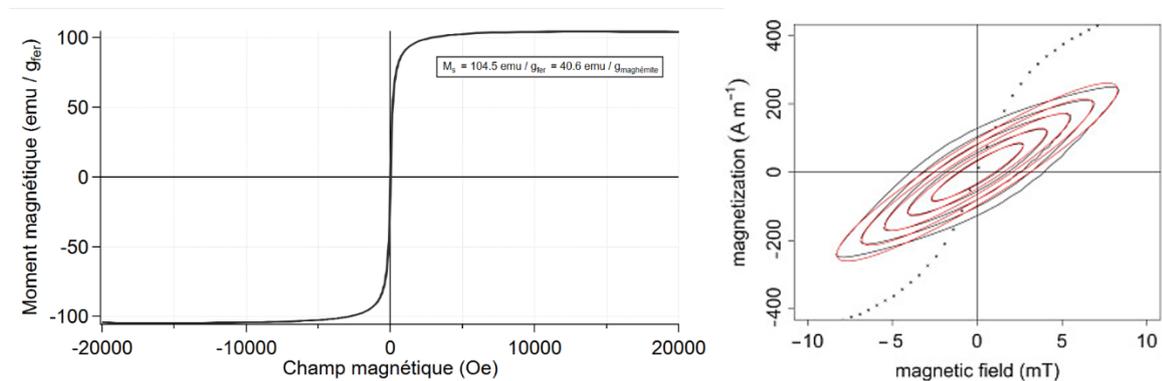


Figure 28 A gauche, courbe d'aimantation de nanoparticules de maghémite réalisée sur un magnétomètre à échantillon vibrant. A droite, mesure d'hystérèse dynamique pour des nanoparticules de maghémite de 20 nm dans l'eau à 333 kHz.<sup>148</sup>

Le pouvoir chauffant de la particule dépend alors de la fréquence et de l'amplitude du champ magnétique utilisé ainsi que des propriétés physiques des nanoparticules, c'est-à-dire de leur taille et de leur composition. Cette dernière permet de piloter leur anisotropie, conduisant alors à une relaxation prépondérante de Néel ou de Brown, comme cela a été présenté dans le paragraphe précédent.

### 3. Applications

L'application d'un champ magnétique alternatif de fréquence et d'amplitude adaptées, en général quelques centaines de kHz et quelques dizaines de millitesla,<sup>143</sup> permet un échauffement local jusqu'à plusieurs dizaines de degrés Celsius. Par exemple, Múzquiz-Ramos *et al.* ont obtenu une élévation de température de 17°C avec des particules de maghémite de 10 nm en appliquant un champ de 12.8 mT oscillant à une fréquence de 362 kHz.<sup>149</sup> De telles élévations de température sont suffisantes pour provoquer une mort cellulaire. Depuis les expériences de Brezovich en 1988,<sup>150</sup> il est généralement considéré que la tolérance du patient pour ce type de traitement dépend du produit champ magnétique par la fréquence. La limite souvent proposée correspond à dix fois le critère de Brezovich,<sup>151,152</sup> soit  $5 \times 10^9 \text{ A} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Cette limite est cependant

encore débattue,<sup>152</sup> et nécessite de prendre en compte d'autres critères comme la durée et la taille de la zone d'exposition ou encore la gravité de la pathologie.

Les premières applications de l'hyperthermie magnétique en médecine ont visé à la fragilisation ou à l'élimination de cellules tumorales. Les particules NanoTherm®<sup>®</sup>, ainsi que l'appareil permettant de générer un champ magnétique alternatif (**Figure 29**), de l'entreprise MagForce AG\* ont été évaluées lors d'essais cliniques pour les patients atteints de cancer de la prostate. Lors de la phase prospective, l'essai clinique a montré la possibilité d'induire localement une élévation de température et à terme une amélioration de l'état clinique des patients.<sup>153</sup> Ce système est également en cours d'évaluation contre le cancer du pancréas et les glioblastomes aux Etats-Unis et en Allemagne. A noter que les doses de fer utilisées sont importantes (de l'ordre de 1g) et que les injections sont intra-tumorales.



Figure 29 Patient dans un appareil permettant d'appliquer un champ magnétique alternatif (MFH300F, MagForce GmbH, Berlin).<sup>154</sup>

D'autres applications peuvent néanmoins être envisagées grâce aux propriétés magnétiques des particules superparamagnétiques. Initialement utilisées en tant qu'agent de contraste en imagerie (IRM) à partir de 1996, notamment dans les formulations commerciales Feridex®<sup>†</sup> et Resovist®<sup>®</sup>, elles peuvent être utilisées en tant que vecteur pour des applications thérapeutiques. Les particules superparamagnétiques peuvent être facilement imagées *in vivo*, peuvent chauffer sous l'application d'un champ magnétique alternatif et peuvent être déplacées par un aimant. Ces propriétés ont conduit

\* Depuis octobre 2022, la société fait face à des problèmes financiers et a été déclarée comme insolvable. Cette situation ne semble pas corrélée à des résultats cliniques.

† Retirées du marché depuis 2009

à une grande variété de stratégies thérapeutiques dans le développement de nanovecteurs magnétiques.

### a. Accumulation dans les tissus

Il est possible d'utiliser les propriétés magnétiques d'une suspension de nanoparticules superparamagnétiques pour concentrer une molécule thérapeutique dans une zone d'intérêt. Une étude pilote sur le lapin a montré que l'accumulation dans une tumeur avec un aimant après injection des particules dans l'artère irriguant la tumeur était possible. Les nanoparticules utilisées, fonctionnalisées avec de la mitoxantrone, un agent de chimiothérapie apparenté aux anthracyclines, ont permis une réduction de la taille des tumeurs ainsi que des vaisseaux sanguins les irriguant.<sup>155</sup>

Des approches similaires ont été menées en combinant des nanoparticules magnétiques avec des polymères à empreinte moléculaire. Ainsi, Asadi et al ont développé un polymère magnétique à empreinte d'olanzapine à base de fructose.<sup>156</sup> Un aimant a permis l'accumulation des nanoparticules dans le cerveau et la dégradation du fructose dans celui-ci a permis la libération de l'olanzapine (**Figure 30**). L'utilisation d'empreintes moléculaires permet ici d'éviter un relargage prématuré de la molécule. La même équipe a également développé un polymère magnétique à base d'acide tannique contenant une molécule anticancéreuse, le 5-fluorouracile, et ont utilisé un aimant pour induite une accumulation des particules dans le foie.<sup>157</sup>

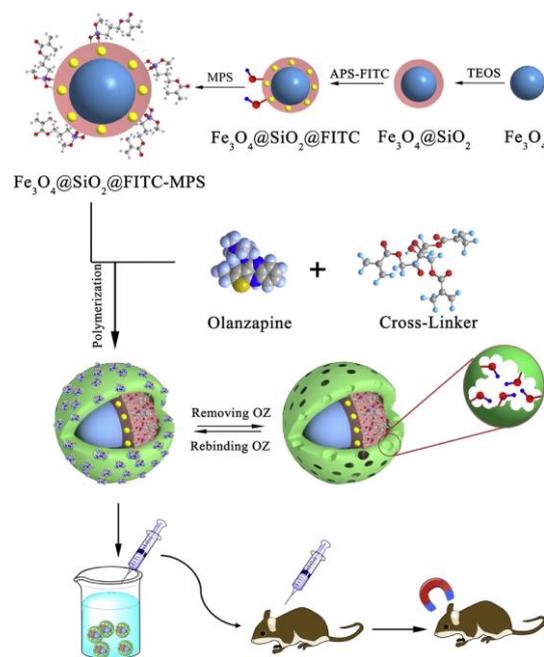


Figure 30 Synthèse de polymères magnétiques encapsulant de l'olanzapine et accumulation magnétique dans le cerveau de souris. Figure issue de <sup>156</sup>.

Pour ce type d'applications, un champ magnétique puissant doit être employé, un flux sanguin important pouvant limiter l'accumulation magnétique.<sup>158</sup>

### b. Libération de molécules thérapeutiques par hyperthermie

La combinaison du pouvoir chauffant de nanoparticules superparamagnétiques avec un vecteur thermosensible permet le contrôle de la libération de molécules thérapeutiques. Purushotham *et al.* ont choisi de combiner des nanoparticules de maghémite avec du polyNIPAM et de charger ces particules hybrides avec de la doxorubicine.<sup>159</sup> L'application d'un champ magnétique alternatif a permis un relargage contrôlé de la molécule thérapeutique. Une approche similaire a également été employée par Zhang *et al.*<sup>160</sup> Il est également possible d'utiliser un liposome thermosensible pour obtenir une libération contrôlée de molécule thérapeutique sous champ magnétique alternatif.<sup>161</sup>

Cependant, l'utilisation d'un polymère thermosensible n'est pas obligatoire. En effet, l'élévation de température sous champ magnétique alternatif peut permettre d'augmenter la diffusion des molécules au sein de la matrice de polymère et de rompre des liaisons faibles entre la molécule et le polymère. Ainsi, plusieurs systèmes permettant le relargage contrôlé de doxorubicine sous champ magnétique alternatif ont été développés au laboratoire<sup>162,163</sup> et par d'autres équipes.<sup>164</sup> Ces matériaux ont été développés à partir de polymères non-thermosensibles à base d'acrylamide ou d'acide méthacrylique et l'application d'un champ magnétique alternatif permet une libération active de la doxorubicine.

Il a notamment été montré que l'application d'un champ magnétique alternatif 335kHz à 9mT, générant un échauffement macroscopique permettant d'atteindre une température de 37°C, induisait une libération plus importante de doxorubicine que le passage de l'échantillon dans un bain à 37°C (**Figure 31**).

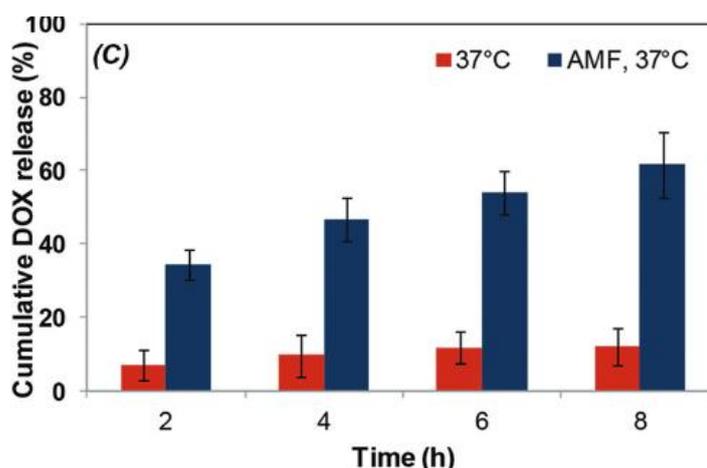


Figure 31 Libération de doxorubicine à 37°C, avec et sans champ magnétique alternatif. La doxorubicine a été intégrée au polymère en utilisant la technique des polymères à empreinte moléculaire. Le champ magnétique alternatif a été appliqué à 335kHz à 9mT. Figure issue de <sup>162</sup>.

### c. Dégradation de protéines

L'échauffement induit par des nanoparticules magnétiques en présence d'un champ magnétique alternatif peut également être utilisé pour dégrader des composés cellulaires et notamment des composés sensibles aux élévations de température comme les protéines. Lors de sa thèse au laboratoire PHENIX (2016-2019), Charlotte Boitard a développé des polymères magnétiques à empreintes de GFP (*Green Fluorescent Protein*) capable d'adsorber spécifiquement et de façon stable cette protéine et a pu observer la dégradation de la protéine après application d'un champ magnétique alternatif via la perte de sa fluorescence.<sup>165</sup> Dans un second temps, elle a pu observer la capacité de ces matériaux à se fixer sur des cellules modifiées pour exprimer de la GFP membranaire et la perte de fluorescence après application d'un champ magnétique alternatif en présence de polymères magnétiques à empreintes de GFP.<sup>166</sup>

## V. Des polymères à empreintes de protéines magnétiques : ciblage de tumeurs mammaires agressives

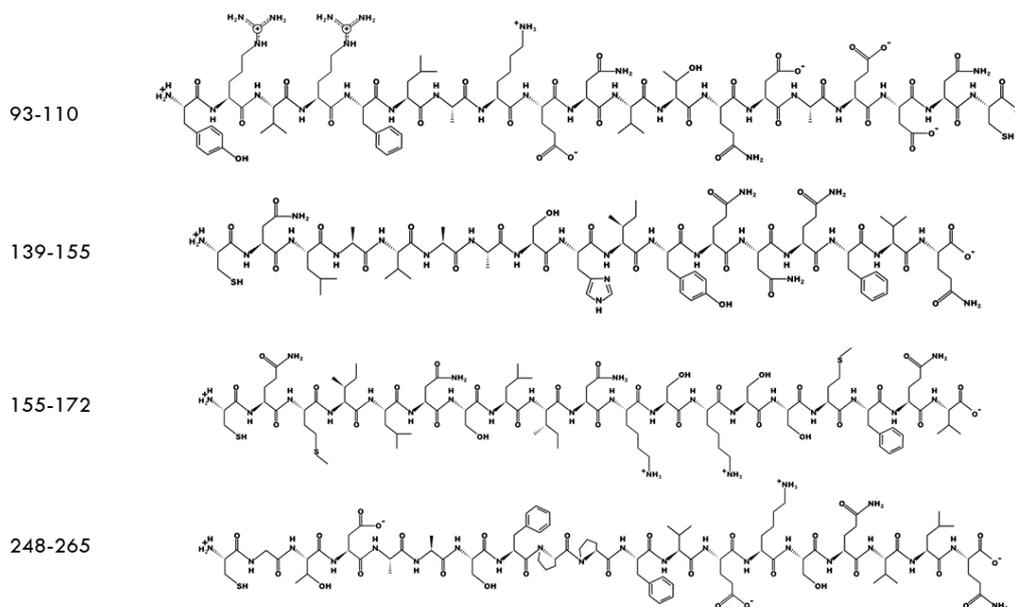
### 1. Des polymères à empreintes de CD36

L'arrivée sur le marché des anticorps conjugués avec une molécule thérapeutique illustre la nécessité de trouver de nouvelles thérapies ciblées permettant de traiter efficacement et avec moins d'effets secondaires les tumeurs mammaires et en particulier les TNBC.

La protéine CD36, surexprimée à la surface de certaines cellules tumorales mammaires, est une bonne cible thérapeutique. En effet sa surexpression est un marqueur d'agressivité associé à une augmentation du potentiel métastatique de la tumeur et à d'éventuelles résistances aux traitements conventionnels.

Les polymères à empreintes de protéines sont présentés dans la littérature comme une alternative aux anticorps. Dans l'optique de réaliser des nanoparticules de polymère capables de cibler spécifiquement la protéine CD36, l'utilisation d'épitopes est une alternative plus économique et présentant moins de contraintes au niveau de la synthèse des polymères. Plusieurs portions de la protéine ont été identifiées pour être évaluées. La portion correspondant aux acides aminés 93 à 110 (YRVRFLAKENVVTQDAEDNC, se trouve dans le domaine CLESH et est vraisemblablement facilement accessible. La portion 139-155 (CNLAVAASHIYQNQFVQ) est située au fond de la cavité permettant l'internalisation des acides gras, elle est la cible d'un anticorps commercial dirigé contre CD36. Les portions 155-172 (CQMILNSLINKSKSSMFQV) et 248-265 (CGTDAASFPPFVEKSQVLQ) ont

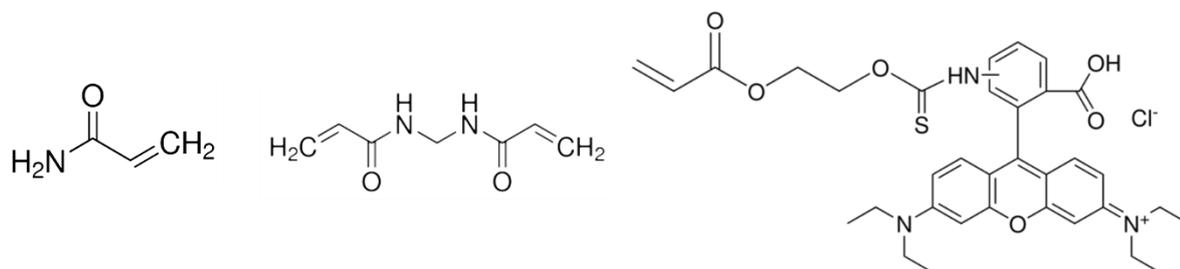
également été évaluées (**Figure 32**). Leur position sur une représentation schématique de la protéine CD36 peut être observée **Figure 6** à la page 22.



*Figure 32* Présentation des quatre épitopes utilisés.

Enfin, une fois l'efficacité d'une méthode de synthèse démontrée, il suffira de remplacer l'épitope de CD36 par fragment d'une autre protéine pour pouvoir atteindre d'autres cibles. Le passage d'une cible à l'autre est donc sensiblement plus simple que dans le cas d'anticorps conjugués, pour lesquels le développement repart quasiment de zéro pour tout changement de cible thérapeutique.

Sauf mention contraire, les nanoparticules de polymères de ce manuscrit sont réalisées à partir d'acrylamide (AM) et de *N,N'*-méthylènebisacrylamide (BIS) et peuvent être rendues fluorescentes via l'ajout d'un monomère fluorescent, l'acryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B (ArtRhod) (**Figure 33**)



*Figure 33* L'acrylamide (AM), le *N,N'*-méthylènebisacrylamide (BIS) et l'acryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B (ArtRhod).

## 2. Relargage contrôlé par hyperthermie

La réalisation d'un vecteur thérapeutique efficace passe aussi par le contrôle de la libération de la molécule thérapeutique. Nous avons vu précédemment que de nombreuses méthodes étaient possibles pour obtenir ce contrôle. Le système étudié ici sera basé sur l'incorporation de nanoparticules de maghémite ainsi que de molécules thérapeutiques au sein d'un polymère à empreinte de CD36. Cette option devrait permettre, après ciblage via les empreintes de CD36, une libération contrôlée de molécules thérapeutiques dans la tumeur conditionnée à l'application d'un champ magnétique alternatif. Le schéma de principe des nanomatériaux développés est présenté dans la **Figure 34**.

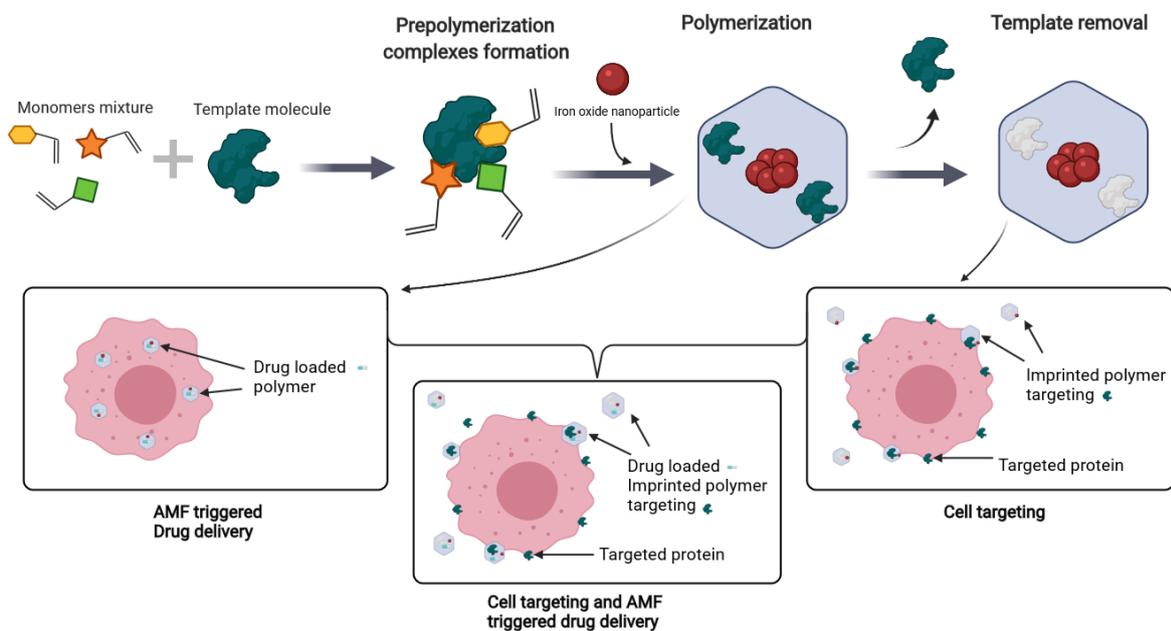


Figure 34 Schéma de principe des nanomatériaux.

Enfin, les matériaux devront répondre à un cahier des charges précis permettant leur utilisation à des fins thérapeutiques :

- Innocuité
- Taille inférieure à 200 nm
- Ciblage efficace et spécifique
- Chauffage après application d'un champ magnétique alternatif
- Stabilité colloïdale
- Dégradation et élimination efficace et non toxique

Chacun de ces paramètres est essentiel pour une éventuelle utilisation clinique, les matériaux synthétisés seront donc évalués selon ces critères.



Chapitre 2 : Optimisation de la synthèse  
de nanoparticules de polymère  
fluorescentes pour le ciblage de cellules  
cancéreuses du sein



I.	Nanoparticules de polymère par photopolymérisation via le DCAA.....	67
1.	Principe.....	67
2.	Etude des paramètres expérimentaux .....	69
a.	Influence de la concentration en monomère fluorescent .....	69
b.	Influence de la concentration en monomères .....	73
3.	Interaction avec des cellules cancéreuses du sein.....	75
a.	Cytotoxicité .....	75
b.	Ciblage de la protéine CD36 .....	77
4.	Conclusion.....	81
II.	Photopolymérisation de type II .....	82
1.	Principe.....	82
2.	Caractérisation.....	83
3.	Interactions avec des cellules cancéreuses du sein .....	89
a.	Synthèse de polymères à empreintes .....	89
b.	Evaluation du ciblage par cytométrie en flux.....	89
c.	Microscopie confocale.....	91
d.	Cytotoxicité .....	95
4.	Conclusion.....	96
III.	Conclusion .....	97
VI.	Matériel et méthodes .....	97
1.	Réactifs .....	97
2.	Outils de caractérisations physico-chimiques.....	98
3.	Synthèse « influence de la concentration en ArtRhod ».....	98
4.	Synthèse « influence de la concentration en monomères » .....	99
5.	Synthèses « Reproductibilité » .....	99
6.	Méthode d'évaluation de la cytotoxicité .....	99
7.	Polymères à empreintes de CD36 amorcés par DCAA.....	100
8.	Synthèse photopolymérisation de type II .....	101
9.	Synthèse de polymères à empreintes par photopolymérisation de type II .....	102

10. Images de microscopie confocale ..... 102

Ce chapitre porte sur la synthèse de nanoparticules de polyacrylamide non-magnétiques. L'objectif est de déterminer une voie de synthèse de nanoparticules de polymère stables, fluorescentes et non cytotoxiques, qui soit reproductible. En vue de l'intégration des particules magnétiques, plusieurs systèmes d'amorçage ont été évalués. Des études préliminaires ont été réalisées sur ces matériaux afin d'évaluer leur capacité à cibler la protéine CD36 et leur innocuité.

## I. Nanoparticules de polymère par photopolymérisation via le DCAA

### 1. Principe

Les polymères à empreintes moléculaires sont en général synthétisés par une méthode de polymérisation en chaîne. Dans une polymérisation en chaîne, par opposition à une polymérisation par étape, où tous les monomères peuvent réagir entre eux, les monomères ne peuvent réagir qu'avec un centre actif, à l'extrémité d'une chaîne en croissance. Selon la nature du centre actif, la polymérisation en chaîne peut alors être radicalaire, cationique, anionique, par coordination ou par ouverture de cycle. Cette méthode repose sur la formation de centres actifs (amorçage), sur la croissance d'une chaîne formée par des monomères à partir du centre actif (propagation), sur l'éventuel transfert du centre actif sur d'autres chaînes et sur l'arrêt de la croissance de la chaîne à la rencontre de deux centres actifs (terminaison). Il existe plusieurs types d'amorceurs radicalaires :

- Les amorceurs thermiques comme les peroxydes organiques ou les composés azoïques. La rupture homolytique d'une liaison sous l'effet de la chaleur permet la formation de radicaux.
- Les amorceurs redox pour lesquels une réaction redox génère des radicaux.
- Les amorceurs photochimiques : sous l'effet d'une irradiation, la molécule se fragmente et génère des radicaux.

Un amorçage photochimique à plusieurs avantages pour la synthèse de polymères à empreintes de protéines : il peut avoir lieu à température ambiante et il est contrôlé spatialement et temporellement via l'activation de l'irradiation.

Les méthodes de polymérisation en chaîne traditionnelles produisent en général des chaînes de polymère hétérogènes. Plusieurs méthodes ont donc été développées afin de mieux contrôler la polymérisation. Ces méthodes ont en commun la présence d'un équilibre entre deux types de chaînes en croissance : actives et dormantes. Les premières ont un centre actif à leur extrémité et peuvent donc recruter des monomères tandis que les secondes sont temporairement inactives. Deux modes de polymérisation contrôlée

sont possibles : la chimie covalente réversible, pour laquelle l'espèce dormante se scinde en deux espèces actives (c'est le cas de ATRP et de la NMP\*) ou la chimie covalente dynamique, pour laquelle l'espèce active réagit avec une espèce dormante et inverse leur rôle, c'est notamment le cas de la polymérisation RAFT, pour Reversible Addition Fragmentation Transfer, développée par Rizzardo, Moad, et Thang en 1998.<sup>167</sup>

Un agent dit inifert agit à la fois en tant qu'initiateur, agent de transfert et agent de terminaison. Comme pour une polymérisation RAFT, les monomères s'insèrent dans l'agent inifert et on retrouve aux extrémités des chaînes formées des fragments de l'agent.

L'objectif étant à terme de fonctionnaliser des nanoparticules magnétiques avec une couche de polymère, un agent inifert photopolymérisable, hydrosoluble et pouvant facilement être adsorbé sur des nanoparticules magnétiques est donc une voie intéressante. La synthèse de l'agent utilisé dans cette partie, le DCAA (2-(N,N-diethyldithiocarbamyl)acetic acid) a été réalisée par Carlo Gonzato (UMR 7025, UTC) d'après un protocole de Sunayama *et al.*<sup>168</sup> à partir diethyldithiocarbamate trihydrate de sodium et de chloroacetate de sodium (**Figure 35**).

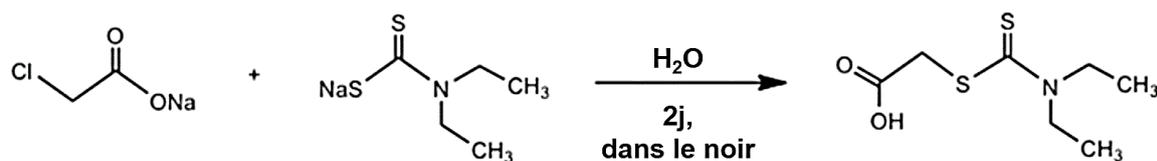


Figure 35 Voie de synthèse du 2-(N,N-diethyldithiocarbamyl)acetic acid.

Pour la synthèse de polymères à empreintes moléculaires, il est possible, quelle que soit la méthode de polymérisation, de réaliser un « bloc » de polymère à empreinte et de le broyer pour obtenir des nanoparticules, mais cette technique produit des particules très polydisperses et inhomogènes en termes de répartition d'empreintes. On préfère donc la synthèse directe de nanoparticules. Une méthode simple permettant d'éviter l'ajout de molécules supplémentaires comme des tensioactifs est de travailler avec des solutions diluées de monomère. Cette dilution permet de diminuer la probabilité de rencontre entre monomères et site actif et donc de se limiter à des particules de petite taille.

Des expériences préliminaires indiquaient plusieurs tendances : plus la solution est concentrée en monomères, ici l'acrylamide (AM) et le N,N'-méthylènebis(acrylamide) (BIS), plus la polymérisation est rapide et conduit à de grosses particules, voire à du

\* ATRP : Polymérisation radicalaire par transfert d'atome, NMP : nitroxide mediated polymerisation

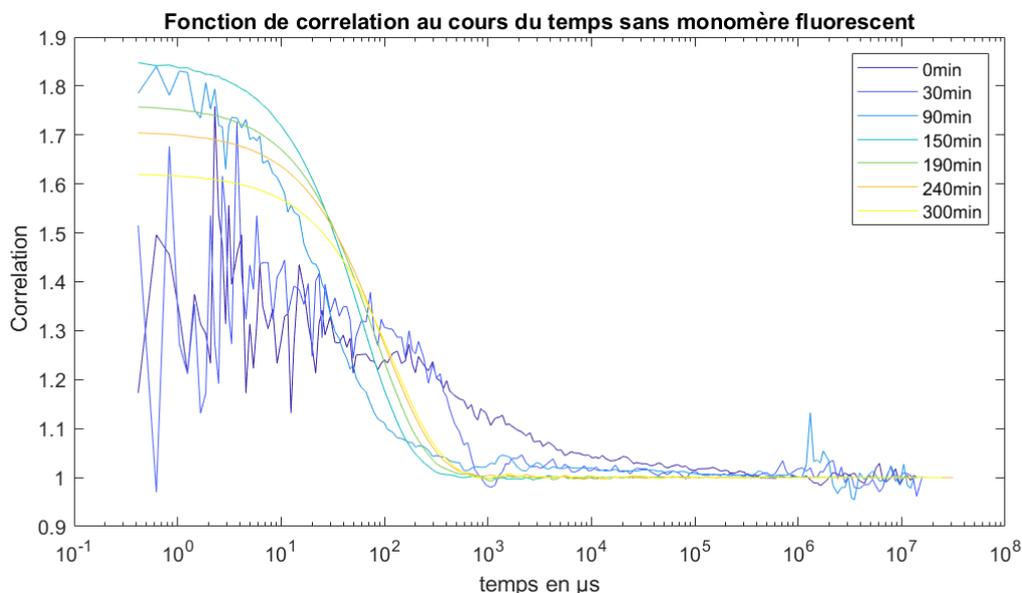
gel, et plus la concentration en monomère fluorescent est importante moins la synthèse est reproductible. Ces paramètres ont donc été étudiés de façon plus approfondie.

## 2. Etude des paramètres expérimentaux

### a. Influence de la concentration en monomère fluorescent

Afin d'étudier l'influence de la concentration en monomère fluorescent sur le rendement, quatre synthèses ont été réalisées en parallèle avec pour base une même solution de monomères et différentes concentrations en acryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B (668 g/mol, abrégé ArtRhod, présentée **Figure 33**) : 0, 0.85, 2.8 et 8.5  $\mu\text{g/mL}$ .

Pendant les 5h de photopolymérisation, la taille des particules est mesurée à intervalles réguliers en modélisant la fonction de corrélation obtenue sur l'appareil Vasco kin Size analyser. L'évolution de cette fonction permet de constater que les particules commencent à être détectées à partir de 90 minutes et que leur taille continue d'augmenter jusqu'à l'arrêt de la polymérisation (Figure 36). La fonction de corrélation se décale vers des temps plus longs. Pour plus d'informations sur cette méthode de mesure et sa pertinence, le lecteur est invité à se référer à l'Annexe « **Mesures de taille par DLS** » à la page 165.



*Figure 36 Evolution de la fonction de corrélation lors d'une synthèse en l'absence de monomère fluorescent, sous irradiation UV à 365 nm. La fonction de corrélation commence à prendre forme à partir de 90min et se décale progressivement vers les temps longs indiquant une augmentation du diamètre hydrodynamique des particules.*

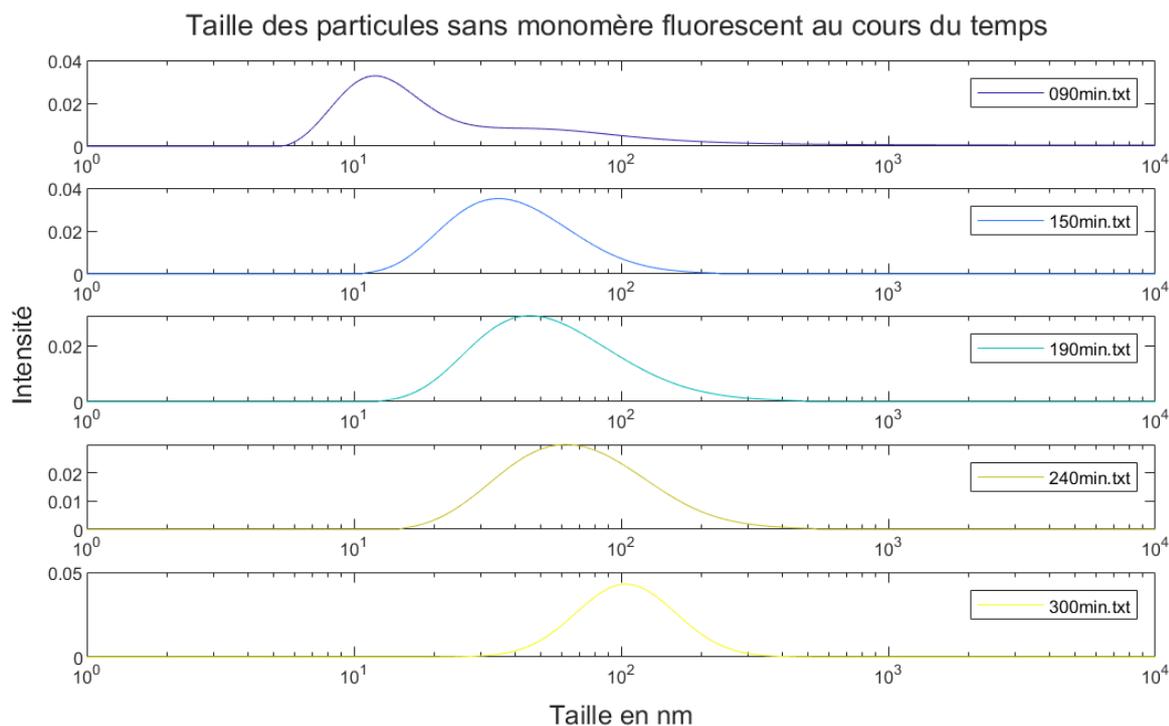


Figure 37 Evolution de la taille des nanoparticules, en l'absence de monomère fluorescent, au cours de la polymérisation. Modélisé à partir des fonctions de corrélation et représenté en Intensité (%).

Cette méthode de suivi peut donc fournir une indication de la cinétique de la formation des nanoparticules de polymère et permet de donner une estimation de la taille des nanoparticules au cours du temps (**Figure 37**). Pour le flacon contenant la plus grande quantité d'ArtRhod, 0.28 $\mu$ mol soit une concentration de 8.5  $\mu$ g/mL, aucune mesure de taille n'a été permise, la fonction de corrélation mesurée par l'appareil restant trop bruitée. La présence de monomère fluorescent dans le mélange réactionnel semble affecter la cinétique de croissance des nanoparticules comme illustré dans la **Figure 38**. Les mesures de diamètre hydrodynamique n'ayant pas pu être réalisées pour l'échantillon contenant 8.5  $\mu$ g/mL d'ArtRhod, celui-ci n'est pas présent sur la **Figure 38**. Plus la quantité d'ArtRhod est importante, plus la polymérisation est lente et les particules formées de petite taille.

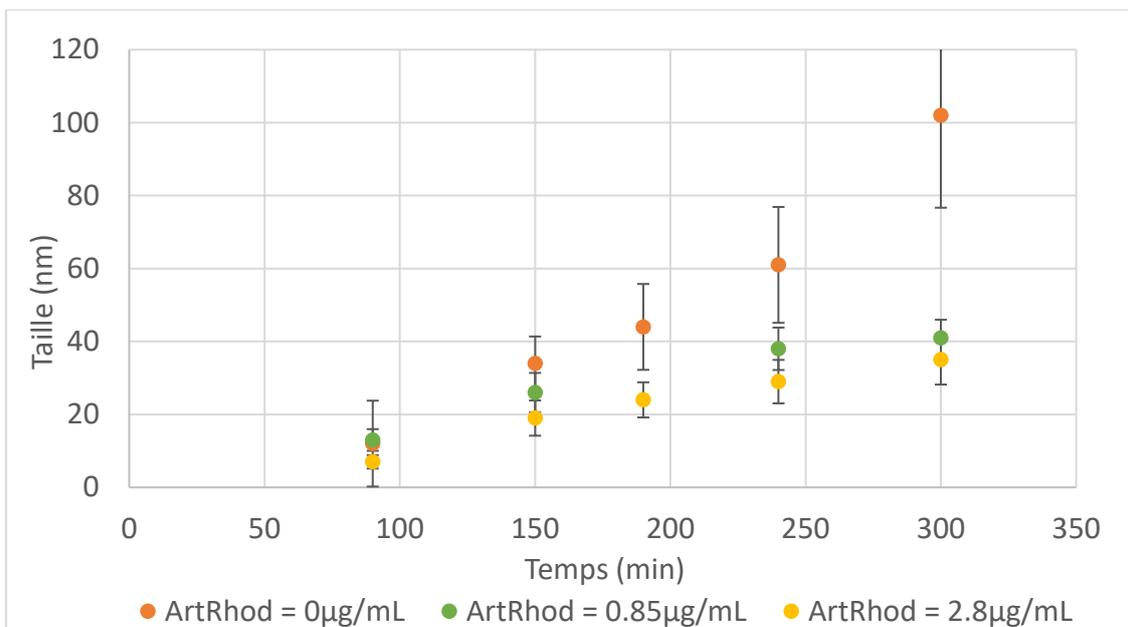


Figure 38 Evolution de la taille des nanoparticules de polyacrylamide en fonction de la concentration en monomère fluorescent. Pour chaque point temporel, six mesures ont été réalisées sur un même échantillon sur une acquisition de 2 minutes et la fonction de corrélation a été modélisée pour obtenir une estimation du diamètre hydrodynamique moyen.

A l'issue de la polymérisation, l'échantillon est purifié par dialyse et une masse connue est séchée pour déterminer le rendement. Celui-ci est tracé en fonction de la concentration massique en monomère rhodamine utilisée (**Figure 39**).

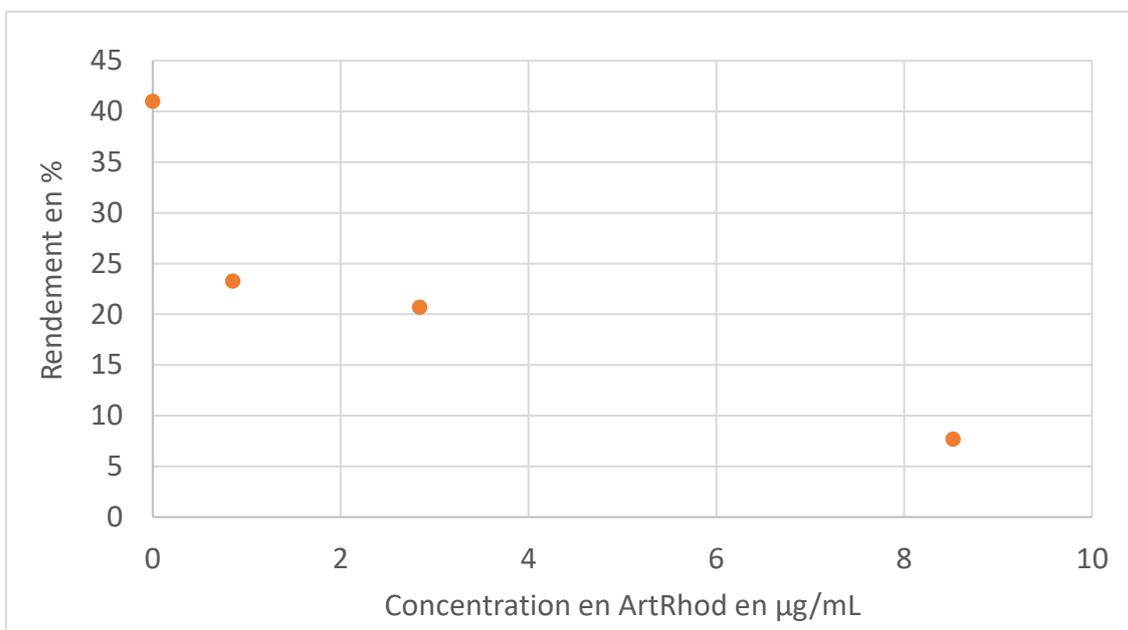


Figure 39 Influence de la concentration en monomère fluorescent sur le rendement de la synthèse. Plus la concentration en ArtRhod est importante, plus la quantité de polymère formée est faible.

Plus la concentration en ArtRhod est importante, plus la quantité de polymère formée est faible. Au vu de ces résultats, il est possible qu'une quantité trop importante de monomère rhodamine B affecte la polymérisation. En effet, comme illustré par la **Figure 40**, le monomère rhodamine B absorbe légèrement les UV, en particulier autour de 365 nm. Il est donc possible qu'une partie du rayonnement UV soit absorbé par l'ArtRhod, conduisant à une diminution du nombre de sites actifs.

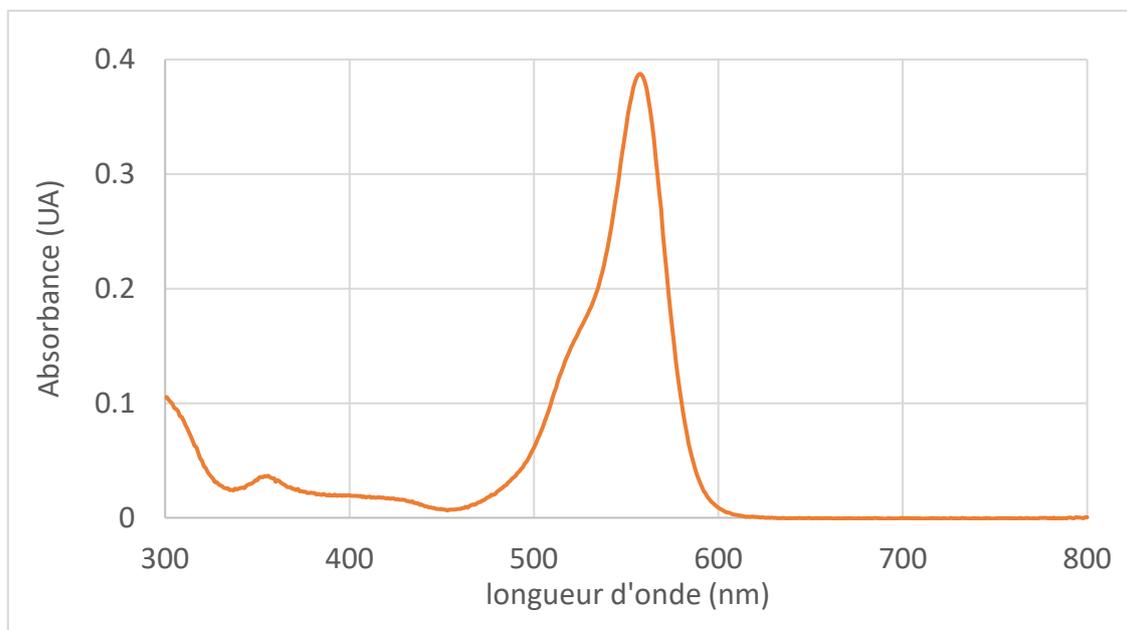


Figure 40 Absorbance d'une solution de monomère Rhodamine B à 5 µg/mL.

L'analyse en spectroscopie FTIR des échantillons avec et sans monomère Rhodamine B (**Figure 41**) présente des similarités avec d'autres spectres FTIR de poly(acrylamide) présents dans la littérature.<sup>169,170</sup> On retrouve en particulier des bandes caractéristiques\* des elongations des liaisons N-H, C-H et C=O, respectivement, de 3400 à 3500 cm<sup>-1</sup>, de 2840 à 3000 cm<sup>-1</sup> et à 1690 cm<sup>-1</sup>. La seule différence visible entre les spectres se situe vers 950 cm<sup>-1</sup>, et est difficilement attribuable avec certitude. Il s'agit peut-être de la vibration d'elongation de la liaison C=S du monomère rhodamine B.

---

\* La double bande autour de 2350 cm<sup>-1</sup> est due à un défaut sur la purge de l'appareil et correspond au CO<sub>2</sub> de l'air.

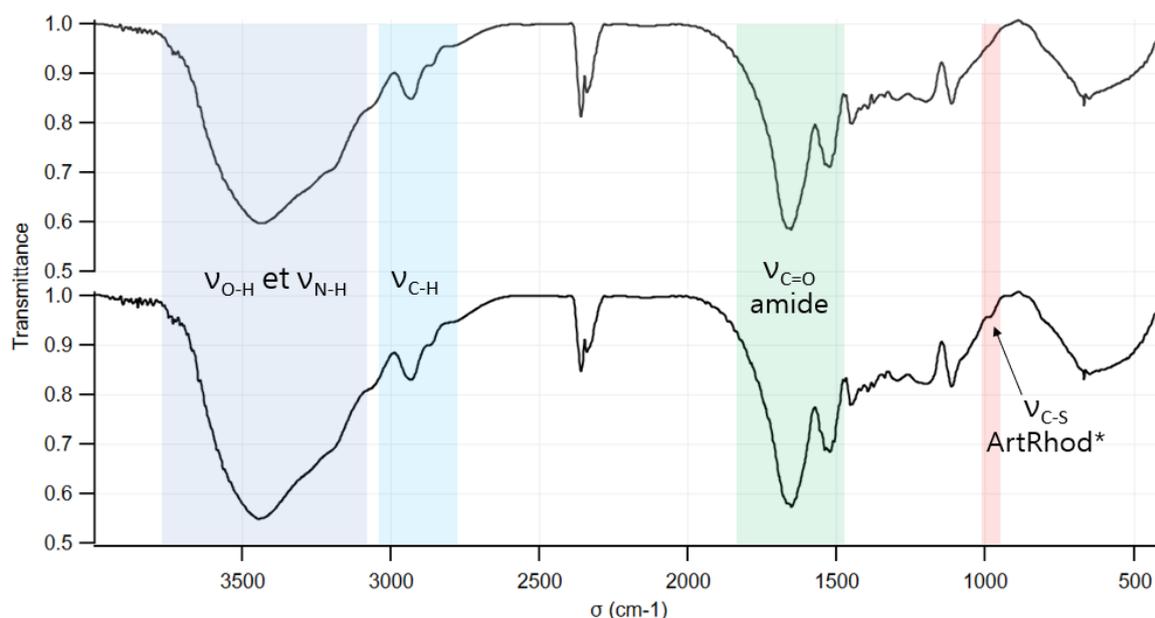


Figure 41 Spectre FTIR sans monomère fluorescent (haut) et avec  $0.85 \mu\text{g/mL}$  (bas).  
\*Attribué avec <sup>171</sup>.

### b. Influence de la concentration en monomères

Afin de vérifier l'hypothèse que l'augmentation de la concentration en monomères induit une augmentation de la taille des nanoparticules et du rendement, une série d'expériences a été réalisée. L'impact de la concentration en monomères est évalué en l'absence de monomère fluorescent, étant établi que sa concentration influence la polymérisation. Les ratios [monomères : amorceur] et [monomère : réticulant] sont maintenus constants : seul le volume total varie, les échantillons sont donc nommés « Concentré » et « Dilué » dans cette partie et correspondent à des concentrations en monomère (total) de 0.3 M et 0.16 M, respectivement. Deux synthèses sont donc réalisées en parallèle à partir d'une même solution mère. L'aspect des échantillons après 5h de polymérisation est présenté dans la **Figure 42**.



Figure 42 Echantillons après 5h de polymérisation : 21 est l'échantillon concentré et 22 l'échantillon dilué.

Moins de 30 minutes après le début de la polymérisation, l'échantillon concentré est déjà trouble ce qui indique la présence précoce d'une quantité importante de polymère, contrairement à la solution diluée qui reste limpide. Le suivi cinétique à l'aide de l'appareil de DLS *in situ* Vasko Kin confirme que plus la solution de monomères est concentrée plus la réaction est rapide (**Figure 43**) et plus la taille des particules est importante.

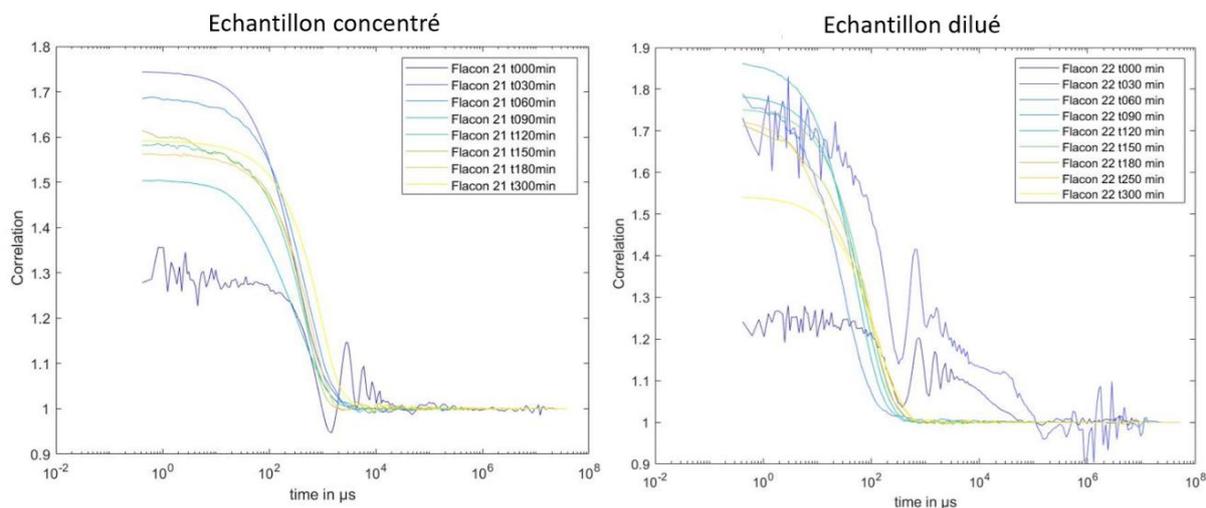


Figure 43 Comparaison de l'évolution temporelle de la fonction de corrélation en cours de synthèse en fonction de la concentration en monomères (26.5 mg/mL à gauche et 14.1 mg/mL à droite)

Plus la solution est concentrée en monomères, plus la polymérisation est rapide et les particules synthétisées sont grosses (**Figure 44**). La concentration en polymère après purification par dialyse confirme également ces premières observations : pour l'échantillon « concentré » on retrouve une masse sèche de polymère de 17.8 mg/mL (soit un rendement de 67 %) tandis que pour l'échantillon « dilué » on trouve une concentration de 1.2 mg/mL (soit un rendement de 8.2 %).

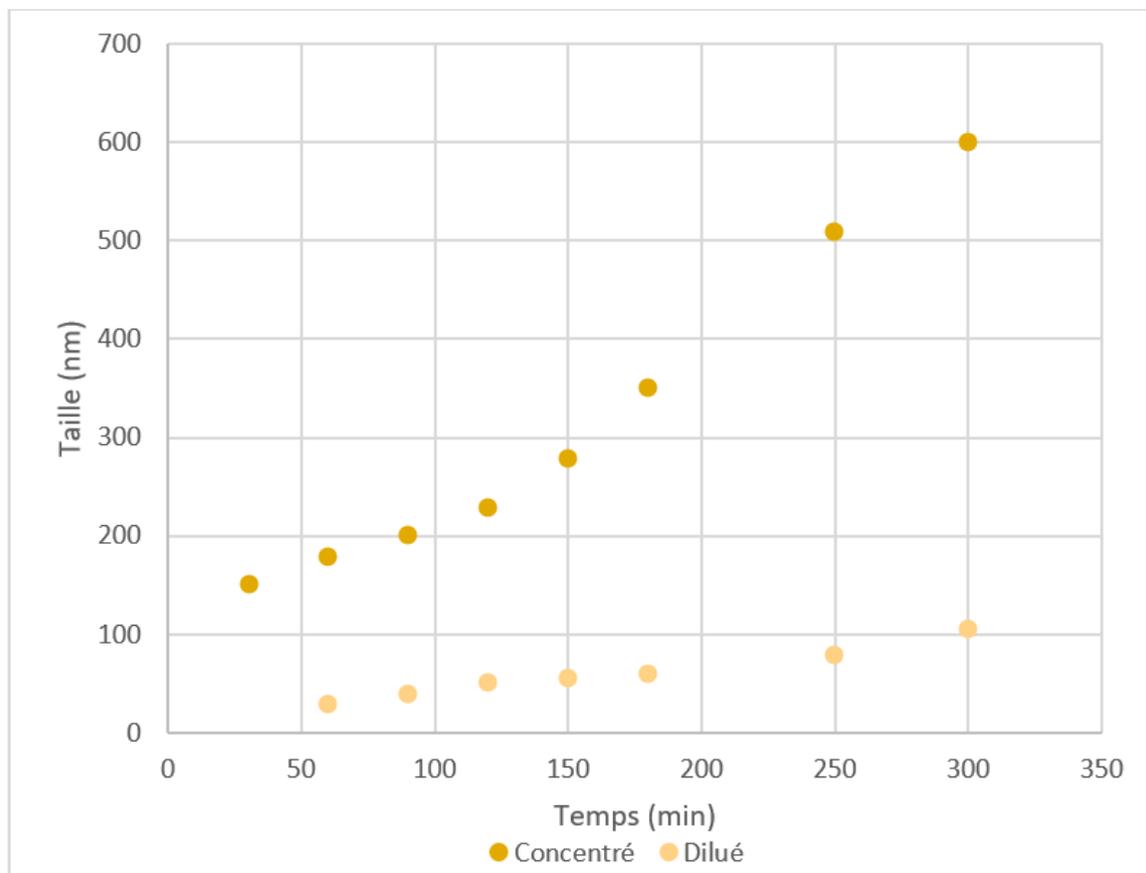


Figure 44 Evolution de la taille des particules en fonction du temps et de la concentration en monomères\*.

### 3. Interaction avec des cellules cancéreuses du sein

#### a. Cytotoxicité

Parmi les échantillons synthétisés, un échantillon composé de nanoparticules stables, fluorescentes et de taille inférieure à 100nm a été sélectionné pour évaluer la cytotoxicité des nanoparticules de polyacrylamide sur deux lignées cellulaires tumorales mammaires. Comme précédemment, il a été synthétisé à partir de d'AM, de BIS, de DCAA et d'une quantité d'ArtRhod permettant la synthèse de nanoparticules fluorescentes. L'aspect de l'échantillon ainsi que la distribution en taille des particules après dialyse est présentée **Figure 45**.

\* En raison de la turbidité de la solution, l'estimation de la taille des nanoparticules est moins fiable. Non représentée ici en raison d'un nombre faible de mesures, les incertitudes sur les mesures de taille sont cependant assez importantes. La mesure ne sert donc ici qu'à relever une tendance, déjà exprimée de façon plus fiable mais moins parlante à travers l'évolution des fonctions de corrélation.

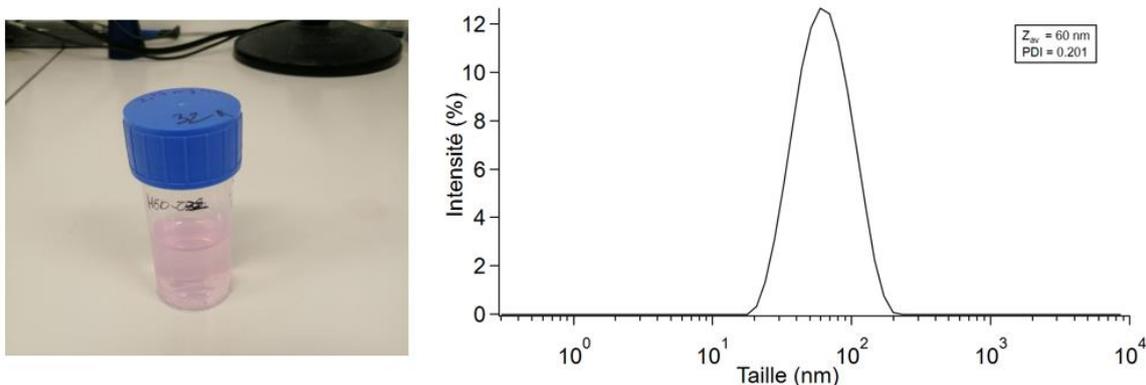


Figure 45 Aspect de l'échantillon et taille mesurée par DLS. Les particules sont de petites tailles avec une faible polydispersité ( $PDI = 0.201$ ).

Afin d'assurer la stérilité de l'échantillon en vue de l'évaluation de la cytotoxicité du matériau, celui-ci est placé dans une membrane de dialyse et placé une nuit dans une solution de méthanol et d'acide acétique (avec un ratio volumique de 9:1) puis dans de l'eau distillée. Le contenu de la membrane est alors stérile car la taille des pores ne permet pas l'entrée des microorganismes. La membrane est ensuite ouverte sous une hotte à flux laminaire avec des précautions permettant de maintenir la stérilité de l'échantillon. L'absence de contamination est vérifiée en plaçant un peu d'échantillon dans une boîte de Pétri avec du milieu de culture dans un incubateur à 37°C pendant 72h.

Pour évaluer la toxicité de nanoparticules de polyacrylamide, celles-ci ont été incubées avec des cellules cancéreuses mammaires SUM159 et MCF-7. La cytotoxicité est ensuite évaluée au bout de 24h, 48h et 72h à l'aide d'un kit Celltiter-Glo®<sup>®</sup>, réactif permettant d'évaluer l'activité métabolique des cellules par mesure de la quantité d'ATP intracellulaire par bioluminescence. Cette mesure est ensuite rapportée à celle des cellules non traitées pour obtenir un pourcentage de viabilité. On parle de cytotoxicité en dessous de 80% de viabilité cellulaire.

D'après les résultats sur les cellules MCF-7 (**Figure 46**) et SUM159 (**Figure 47**), les nanoparticules de polyacrylamide non-imprimées ne sont pas cytotoxiques. On observe une légère baisse de viabilité au-delà de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  à partir de 48h d'exposition. Il s'agit néanmoins de doses assez importantes, à titre de comparaison, les polymères à empreintes de protéines sont en général utilisés à des doses inférieures à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  lors de l'évaluation du ciblage cellulaire.

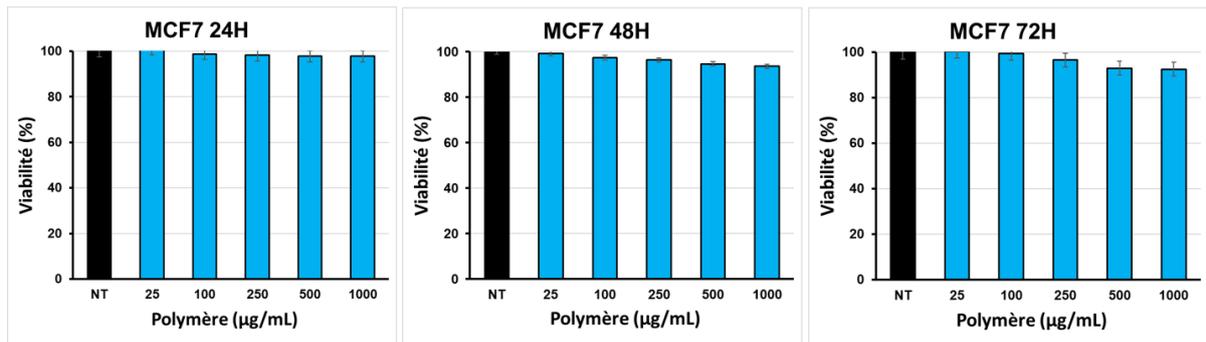


Figure 46 Viabilité des cellules MCF-7 après 24h, 48h et 72h de traitement avec des nanoparticules de polyacrylamide.

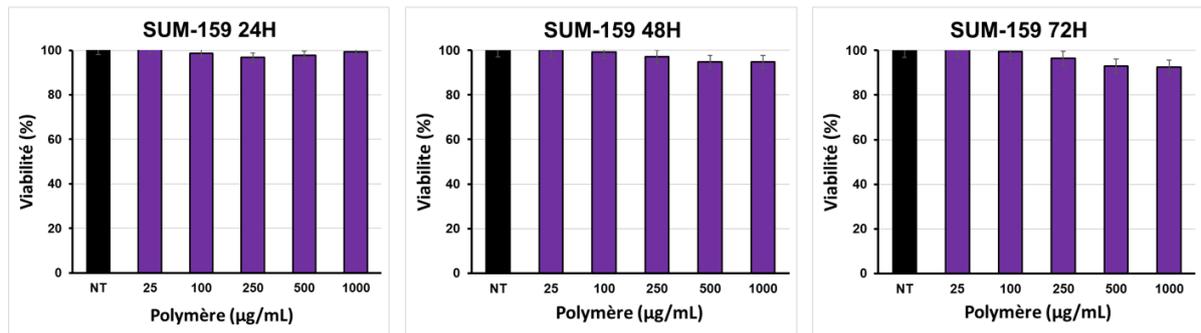


Figure 47 Viabilité des cellules SUM159 après 24h, 48h et 72h de traitement avec des nanoparticules de polyacrylamide

### b. Ciblage de la protéine CD36

Afin d'évaluer la capacité à cibler des cellules cancéreuses mammaires via leur surexpression de la protéine CD36, plusieurs synthèses ont été réalisées en intégrant différents peptides dont les séquences sont présentes dans la protéine CD36. Celles-ci seront abrégées par les numéros des acides aminés dans la protéine : 93-110 pour YRVRFLAKENVTQDAEDNC, 139-155 pour CNLAVAASHIYQNQFVQ, 155-172 CQMILNSLINKSKSSMFQV et 248-265 pour CGTDAASFPPFVEKSQVLQ. Leur localisation sur une représentation simplifiée de la protéine est présentée **Figure 48**.

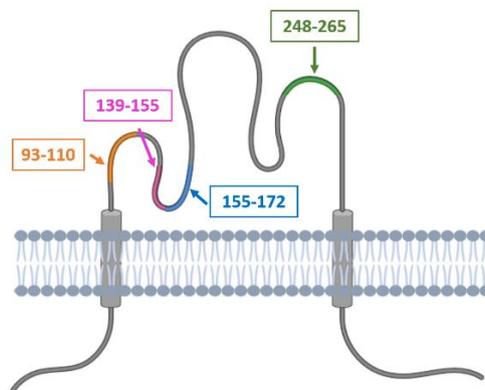
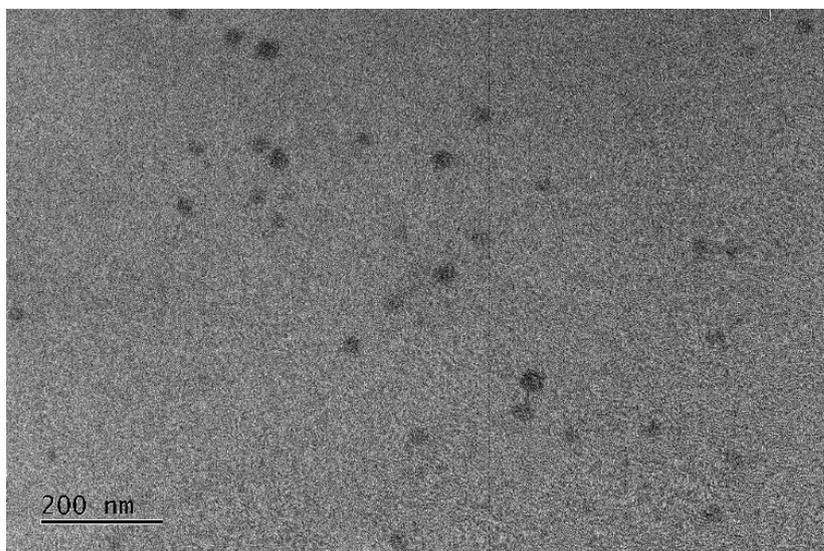


Figure 48 Représentation de la protéine CD36 et position des différents épitopes utilisés.

La synthèse est identique à celle utilisée précédemment pour l'évaluation de la cytotoxicité à l'exception de l'ajout de 300  $\mu\text{g}$  de peptide (300  $\mu\text{L}$  d'une solution à 1mg/mL dans du tampon phosphate à pH 7.4) ou de 300 $\mu\text{L}$  de tampon phosphate à pH 7.4 pour l'échantillon non imprimé noté NIP). Un échantillon a également été réalisé à partir de 600  $\mu\text{g}$  du peptide 93-110, noté 93-110 (2). Avant amorçage de la polymérisation, les monomères et le peptide sont mélangés pendant 2h sur un agitateur orbitaire (240 rpm) pour permettre la formation de complexes de pré-polymérisation. Après la polymérisation, des bains de dialyse Eau/Méthanol/acide acétique puis d'eau distillée permettent d'éliminer les peptides et de former les empreintes.

Malgré le faible contraste entre le film de carbone des grilles et le polymère, il est possible d'observer la morphologie des particules formées par microscopie électronique à transmission (**Figure 49**). Dans le cas de l'échantillon MIP 93-110, on observe notamment des particules sphériques de diamètre compris entre 20 et 45 nm.



*Figure 49* Image de microscopie électronique en transmission du MIP 93-110. Les particules sont sphériques et de taille homogène comprise entre 20 et 45nm.

Les particules formées sont de petite taille ( $< 100$  nm) et fluorescentes (**Figure 50**). Bien que non strictement identiques, les échantillons sont suffisamment similaires pour être comparés entre eux en termes de ciblage cellulaire (**Tableau 6**).

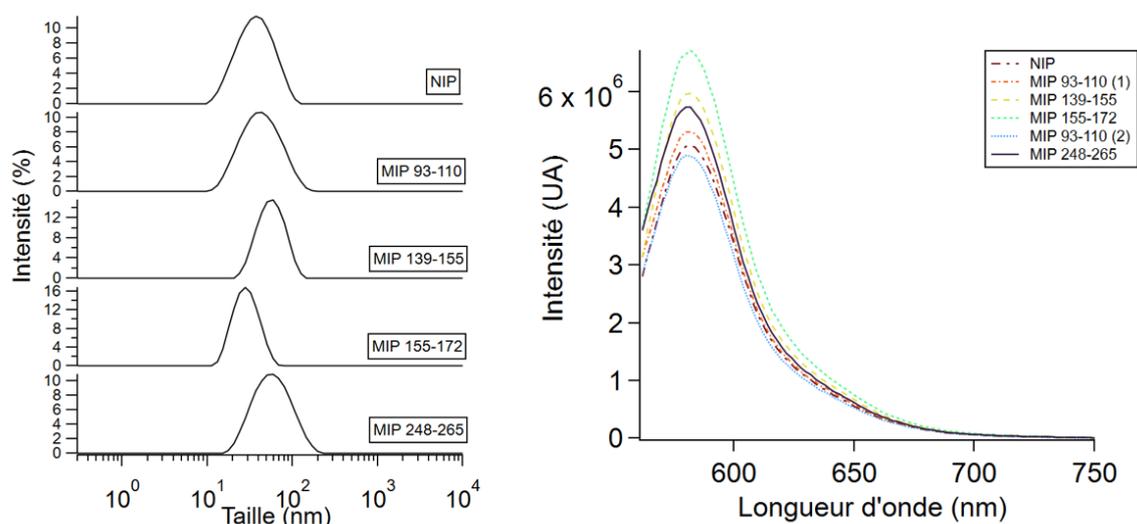


Figure 50 A gauche, taille mesurée par DLS. A droite, mesure de fluorescence des particules avec une longueur d'onde d'excitation de 545nm de solutions à 10%v/v des échantillons réalisés à partir de différents épitopes. Ces mesures sont cohérentes avec la concentration massique des différents échantillons.

Tableau 6 Propriétés des échantillons synthétisés.

Echantillon	NIP	MIP 93-110	MIP 139-155	MIP 155-172	MIP 248-255	MIP 93-110 (2)
Concentration (mg/mL)	2.24	2.31	3.35	3.61	3.15	2.1
Taille Z average (nm)	32 nm	37 nm	55 nm	40 nm	60 nm	ND

Afin d'évaluer la qualité des empreintes formées dans des polymères à empreintes moléculaires, on réalise habituellement des isothermes d'adsorption visant à évaluer la quantité maximale de peptide pouvant être réadsorbée après incubation. Deux problèmes majeurs se posent néanmoins pour cette série d'échantillons : les peptides n'ont pas assez de cycles aromatiques pour être détectés par absorbance dans l'UV et les matériaux ne peuvent pas être collectés par centrifugation (trop petits et densité trop proche de l'eau). C'est donc directement leur capacité à cibler des cellules surexprimant la protéine CD36 qui a été évaluée sur 4 lignées cellulaires présentant différents niveaux d'expression de la protéine. Pour obtenir des lignées présentant une forte expression de CD36 de façon stable, des cellules SUM159 et MCF-7 ont été transfectées avec un plasmide codant pour la protéine CD36. Après sélection, des clones présentant une forte expression de la protéine CD36 ont été obtenus et seront notés

SUM159 CL1 et MCF-7 CL6. Les cellules non modifiées sont notées SUM159 WT et MCF-7 WT.

Pour chaque lignée, on compare, comme présenté Figure 51, le marquage avec un anticorps antiCD36-APC sur des lignées cellulaires présentant des niveaux d'expression de la protéine CD36 différents (**Figure 51**, b et e) avec le marquage par un polymère à empreinte de CD36 fluorescent (**Figure 51**, f et c, pour le MIP 139-155). Le marquage est visible dans les cadrans supérieurs droits représentant un niveau de fluorescence supérieur à celui de l'auto-fluorescence des cellules dans ce canal mesuré sur des cellules non marquées. L'incubation a été réalisée à 4°C afin de limiter un marquage non-spécifique dû à des phénomènes d'endocytose.

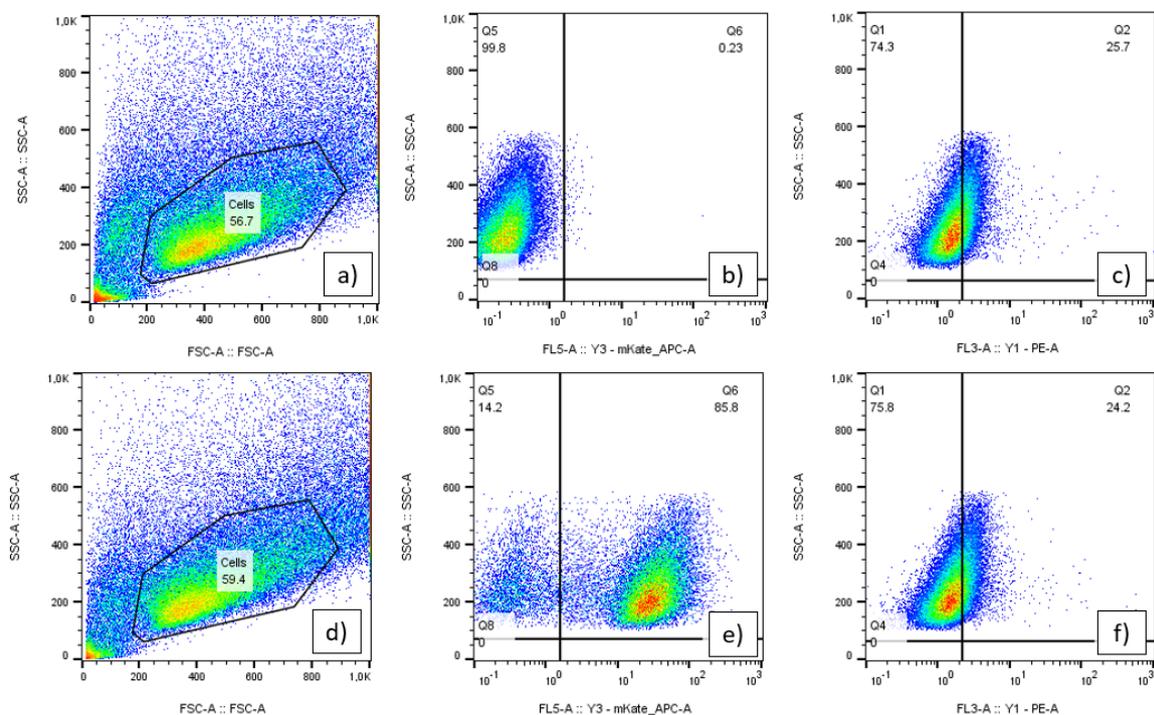


Figure 51 a) et d), représentation des cellules MCF-7 WT et CL6 en fonction de leur taille (FSC-A) et de leur granulosité (SSC-A). b) et e), marquage des cellules MFC-7 WT et CL6 par un anticorps antiCD36 fluorescent, c) et f) marquage des cellules MFC-7 WT et CL6 par une solution à 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de MIP 139-155. 500 000 cellules ont été incubées en suspension dans une solution de PBS contenant 1% de sérum de veau fœtal ainsi que 40  $\mu\text{g}$  de polymère ou 7 ng d'un anticorps antiCD36 fluorescent pendant une heure à 4°C.

Les résultats de ciblage sont résumés **Figure 52** pour plus de lisibilité. En particulier, ils ne semblent pas indiquer de ciblage spécifique des cellules surexprimant la protéine CD36. En effet, le marquage avec un anticorps antiCD36 fluorescent indique que les cellules SUM159 CL1 et les cellules MCF-7 CL6 expriment la protéine à 97 et 86% respectivement, tandis que les cellules MCF-7 WT n'expriment pas du tout la

protéine. Or, aucun marquage avec un polymère imprimé ne correspond à ces profils. Seul le MIP 139-155 marque de façon significative les cellules mais cela indépendamment du niveau d'expression de la protéine à la surface des cellules.

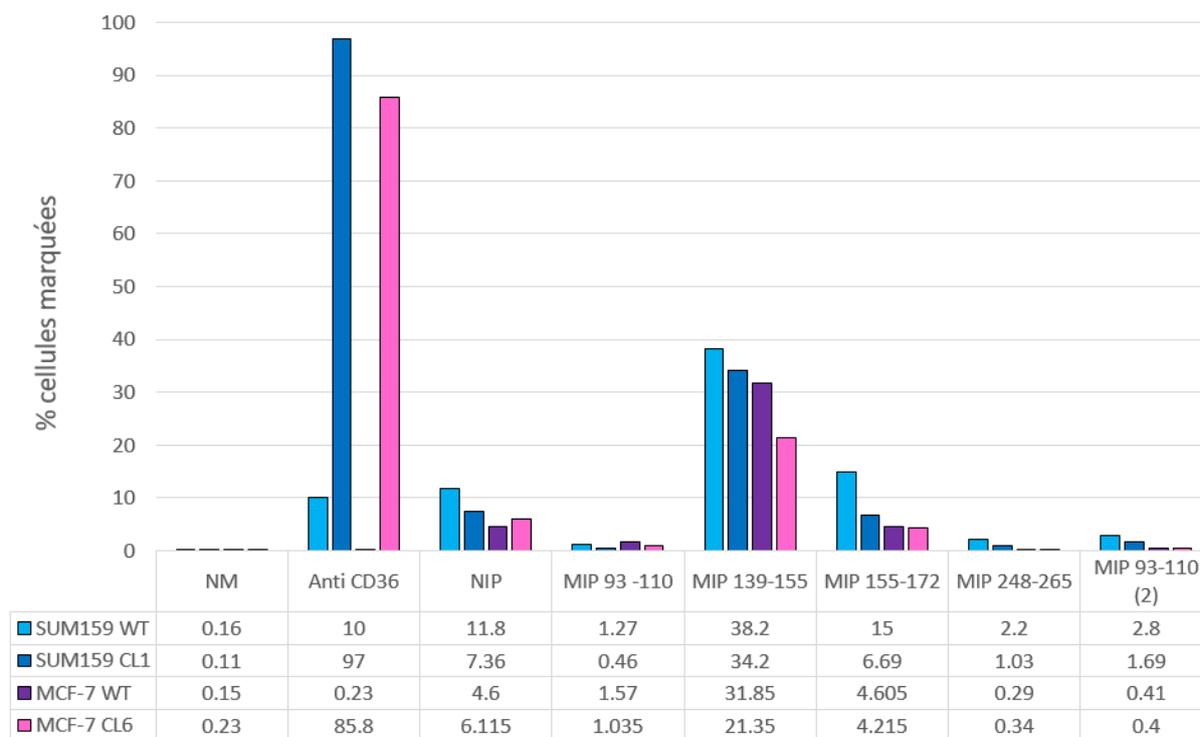


Figure 52 Pourcentage\* de cellules marquées en fonction de la lignée cellulaire et du matériau utilisé. Aucun échantillon ne semble cibler spécifiquement les cellules surexprimant la protéine CD36. NM : cellules non marquées, NIP : polymère non imprimé.

D'autres conditions expérimentales ont été explorées, telles que des concentrations allant de 40 µg/mL à 500 µg/mL, une incubation à température ambiante au lieu de 4°C ou encore une incubation sur des cellules adhérant à une plaque. Aucune de ces conditions n'a présenté de résultats concordant avec l'expression de CD36 ce qui indique un manque de spécificité du ciblage.

#### 4. Conclusion

La polymérisation de solutions de monomères composées d'acrylamide et de N,N'-Méthylènebisacrylamide dans des conditions diluées permet l'obtention de nanoparticules de polyacrylamide de petite taille (< 100 nm), stables, pouvant être rendues fluorescentes par ajout d'une quantité adaptée d'acryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B. Dans ces conditions, les particules synthétisées sont non cytotoxiques. Ces

\* Moyenne sur deux points d'une même expérience. Il n'y a pas de barres d'erreur car même si ces résultats ont été confirmés par d'autres mesures, celles-ci ont été réalisées dans des conditions légèrement différentes et n'ont donc pas été utilisées pour consolider ces résultats.

synthèses présentent néanmoins des problèmes de reproductibilité, mis en évidence en Annexe « Reproductibilité des synthèses amorcées par le DCAA ».

Cependant, outre des problèmes de reproductibilité et de fiabilité de la synthèse, celle-ci n'a pas permis la production de nanoparticules capables de cibler spécifiquement les cellules surexprimant la protéine CD36. Plusieurs explications sont possibles :

- Les peptides choisis ne correspondent pas à des régions facilement accessibles de la protéine CD36
- Les monomères choisis ne permettent pas de réaliser suffisamment d'interactions faibles avec les peptides pour réaliser des empreintes suffisamment spécifiques
- Les particules étant de petite taille, la fluorescence par particule est trop faible pour obtenir une détection optimale du ciblage par cytométrie en flux.

## II. Photopolymérisation de type II

### 1. Principe

Selon le mécanisme de génération des radicaux, les photoamorceurs sont classés entre types I et II. Lors de l'irradiation, les photoamorceurs de type I subissent un clivage, alors que le photo-amorçage de type II permet le transfert d'un atome d'hydrogène entre une molécule donneuse et un photosensibilisateur dans son état d'excitation triplet pour former des radicaux qui amorcent la polymérisation. Une large gamme de longueurs d'onde (de 300 nm à 1000 nm) peut être utilisée pour l'excitation du photosensibilisateur. L'utilisation du photo-amorçage pour la synthèse de polymères bénéficie des caractéristiques inhérentes de la photopolymérisation telles que le contrôle spatial et temporel par simple allumage et extinction de la source lumineuse. De plus, les photopolymérisations nécessitent moins d'énergie par rapport aux polymérisations initiées thermiquement puisqu'elles peuvent être réalisées à température ambiante. La photopolymérisation de type II a déjà été utilisée pour la synthèse d'hydrogels à l'aide d'un photoamorceur monocomposant (un thioxanthone fonctionnalisé avec un acide carboxylique).<sup>172</sup> Ultérieurement, l'utilisation d'un donneur d'hydrogène présentant une fonction acétylène dans un système de photoamorçage de type II a permis la fonctionnalisation in situ des particules, permettant leur modification par la réaction de cycloaddition alcyne-azoture catalysée par le cuivre(I).<sup>173</sup>

Le système présenté dans cette partie a été développé pour pallier aux difficultés liées à l'intégration du monomère fluorescent Rhodamine ainsi qu'aux problèmes de reproductibilité liés à l'utilisation du DCAA. Le photoamorçage de type II est utilisé pour la synthèse d'hydrogel en remplaçant l'initiateur par un système d'initiation bimoléculaire Rhodamine B-Benzophénone en tant que donneur d'hydrogène et

photosensibilisateur, respectivement. Le mécanisme supposé de cette réaction est qu'après irradiation à 365 nm, la benzophénone (BP) est excitée à son état triplet, et récupère un hydrogène en alpha de l'amine tertiaire de la Rhodamine B (RhB) (**Figure 53**). Cela génère des radicaux au voisinage de l'amine tertiaire qui permettent d'amorcer la polymérisation (**Figure 54**). La Rhodamine B est ainsi liée de manière covalente au réseau de polymère. Cette étude a fait l'objet d'une publication.<sup>174</sup>

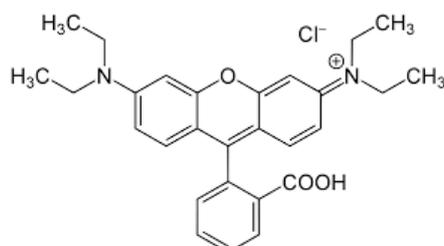


Figure 53 Rhodamine B.

Une étude préliminaire réalisée précédemment a montré qu'il était possible de former des gels en utilisant cette méthode de polymérisation. Il a donc ensuite fallu déterminer si cette méthode était adaptée à la synthèse de nanoparticules de polymère fluorescentes en utilisant des solutions de monomères dilués comme dans la partie précédente.

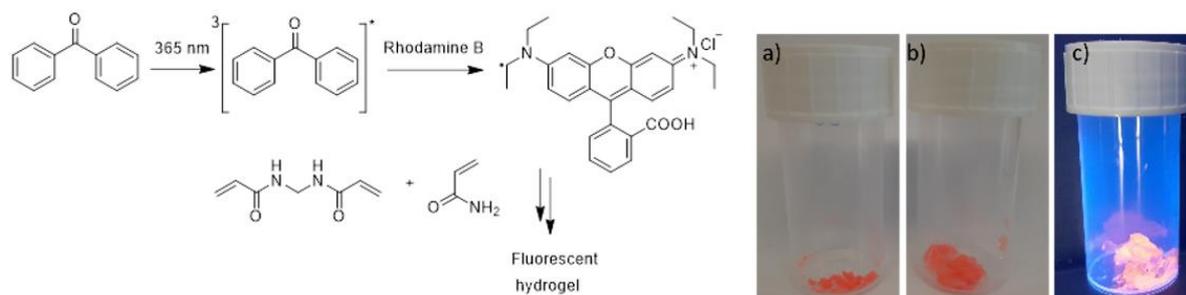


Figure 54 Principe de la synthèse d'hydrogel par photopolymérisation de type II. A droite, hydrogels réalisés avec cette méthode, séchés(a), réhydratés (b) et qui fluorescent sous lampe UV(c)

Lors de la synthèse d'hydrogel, la concentration en monomères est fixée à 0.578 mM avec un ratio (Monomère : BP : RhB) de (100 : 3 : 0.5) et la polymérisation dure 24h. Pour appliquer cette méthode à la synthèse de nanoparticules, nous avons conservé le ratio molaire (Benzophénone : Rhodamine B) de (6:1) en gardant des concentrations en monomères proches de celles utilisées en I (0.2mM au total). En conservant ce ratio, 4 synthèses avec des quantités molaires de rhodamine B ( $M=479,01$  g/mol) différentes : 0,43  $\mu\text{mol}$ , 0.86  $\mu\text{mol}$ , 1.73  $\mu\text{mol}$  et 3.46  $\mu\text{mol}$  ont été réalisées. Ces échantillons seront appelés en fonction de leur ratio molaire [monomère : Rhodamine B], soit respectivement : [100 : 0.075], [100 : 0.15], [100 : 0.3] et [100 : 0.6].

## 2. Caractérisation

Après 6h d'irradiation UV à 365nm, seul l'échantillon réalisé avec 3.46  $\mu\text{mol}$  de Rhodamine B est trouble et présente des particules détectables par mesure de DLS *in situ*. Comme la taille des particules est proche de 200nm pour cet échantillon, la polymérisation est arrêtée. Pour les autres échantillons, restant limpides et ne montrant pas de particules lors de mesure de DLS, la polymérisation est poursuivie jusqu'à un temps total de 24h. Après 24h de polymérisation, seul l'échantillon synthétisé avec 1.73 $\mu\text{mol}$  de Rhodamine B est trouble et présente du polymère, sous forme de particules de grande taille. Dès l'arrêt de la polymérisation, les échantillons sont dialysés, dans un mélange eau/éthanol (50/50), pour faciliter l'élimination de la benzophénone puis dans l'eau (**Figure 55**).



Figure 55 Photographie des échantillons [100 : 0.3] (gauche) et [100 : 0.6] (droite) après dialyse, les échantillons sont troubles mais stables.

Avec un ratio [Monomères : Benzophénone] de [100 : 0.3], on obtient de grosses particules avec deux populations : une vers 200nm et une vers 1000nm. Les particules sont probablement instables et hétérogènes, les réplicats de mesure n'étant pas identiques (**Figure 56**).

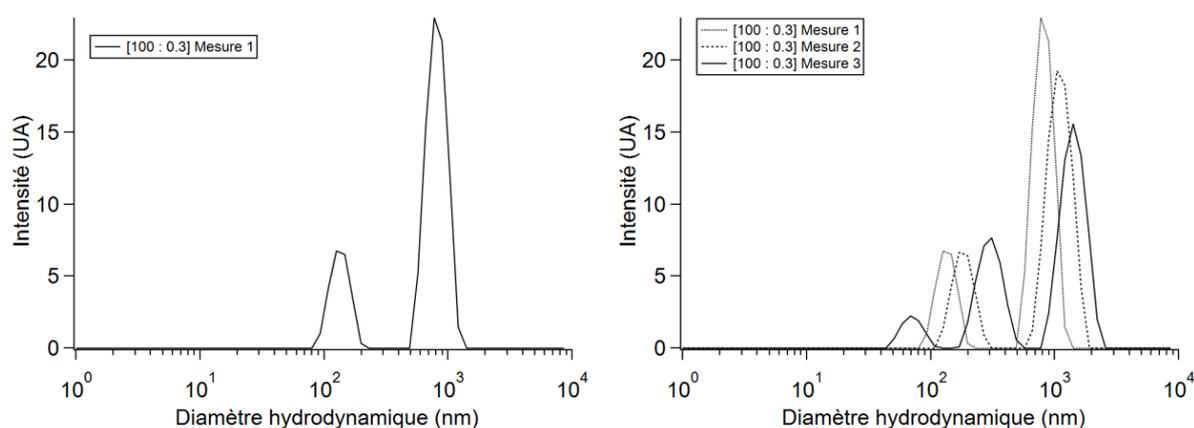


Figure 56 Mesure du diamètre hydrodynamique de l'échantillon [100:0.3]. A gauche, la première mesure permet de constater la polydispersité de l'échantillon. A droite, la comparaison de 3 mesures successives illustre l'hétérogénéité voire l'instabilité colloïdale au cours du temps de l'échantillon.

Avec un ratio de [100 : 0.6], on obtient une distribution monodisperse de particules, centrée sur 200nm. Ces particules sont beaucoup plus monodisperses (PDI = 0.22) et stables, plusieurs mesures successives donnant des mesures similaires (**Figure 57**).

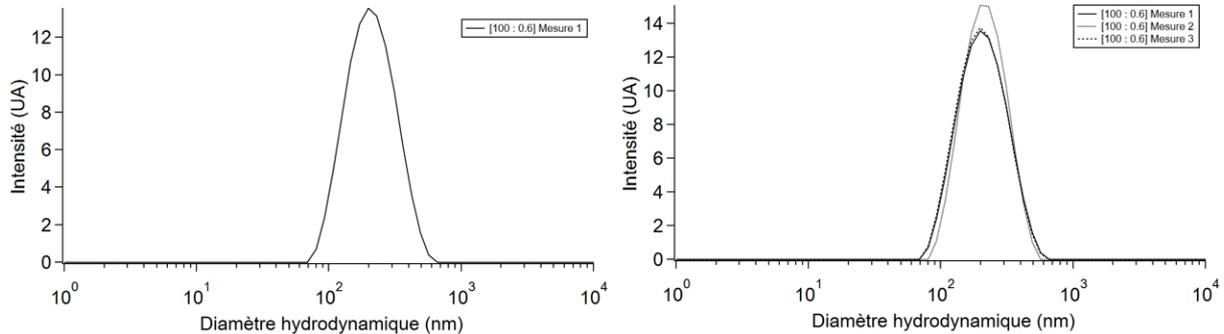


Figure 57 Mesure du diamètre hydrodynamique de l'échantillon [100:0.6]. A gauche, la première mesure permet de constater le caractère monodisperse de l'échantillon. La taille moyenne des nanoparticules est 197 nm. A droite, la comparaison de 3 mesures successives illustre la stabilité colloïdale de l'échantillon.

La réalisation de clichés de microscopie électronique en transmission confirme ces éléments et fournit plus d'informations sur la morphologie des polymères formés. En particulier, tandis que l'on observe plutôt des particules sphériques de taille moyenne pour l'échantillon préparé avec le ratio [100 : 0.6] (**Figure 58**), on retrouve principalement des structures poreuses « en éponge » de grande taille pour l'échantillon [100 : 0.3] (**Figure 59**).

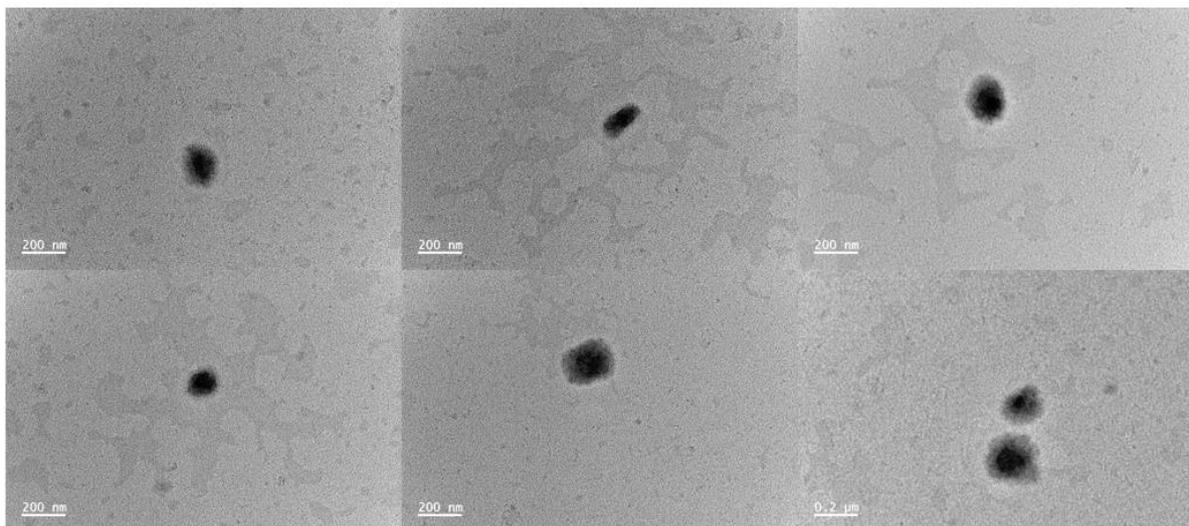


Figure 58 Images de microscopie électronique sur l'échantillon [100:0.6]. Plusieurs images sont représentées pour compenser le manque de particules par champ bien qu'elles soient représentatives de l'ensemble de la grille.

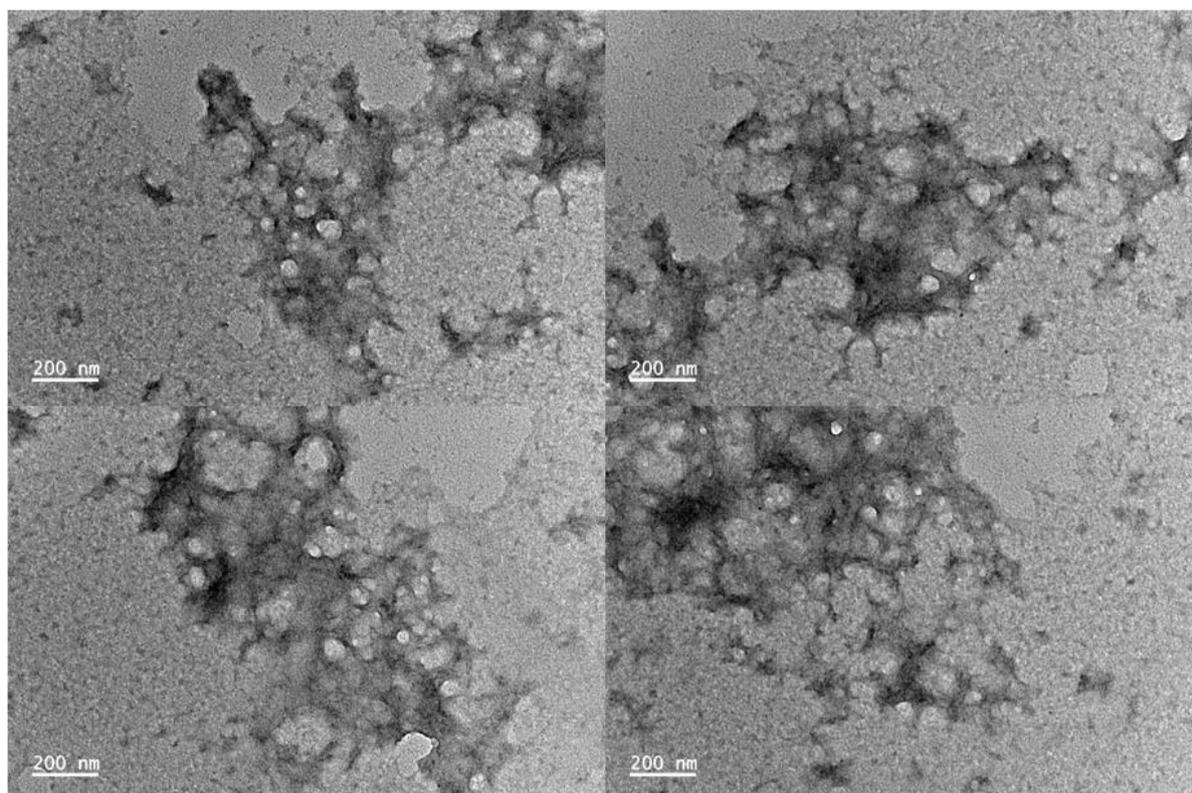


Figure 59 Images de microscopie électronique sur l'échantillon [100:0.3]. Ces structures sont représentatives des polymères sur l'ensemble de la grille.

Une partie des échantillons a été séchée afin de déterminer leur concentration en polymère et le rendement de la polymérisation. Malgré l'aspect des échantillons, c'est l'échantillon préparé avec un ratio [monomères : RhB] de [100 : 0.6] avec un temps de polymérisation court qui contient le plus de polymère (**Tableau 7**).

Tableau 7 Récapitulatif des concentrations et rendements pour les échantillons présentant du polymère.

Ratio [monomère : Benzophénone]	Concentration (mg/mL)	Rendement (%)
[100 : 0.3]	<b>4,2</b>	<b>22</b>
[100 : 0.6]	<b>7,7</b>	<b>41</b>

Les échantillons synthétisés par cette méthode sont fluorescents (**Figure 60**). Outre l'incorporation covalente de Rhodamine B dans les chaînes de polymère, cette fluorescence peut aussi être due à la présence de rhodamine B piégée dans la matrice de polymère.

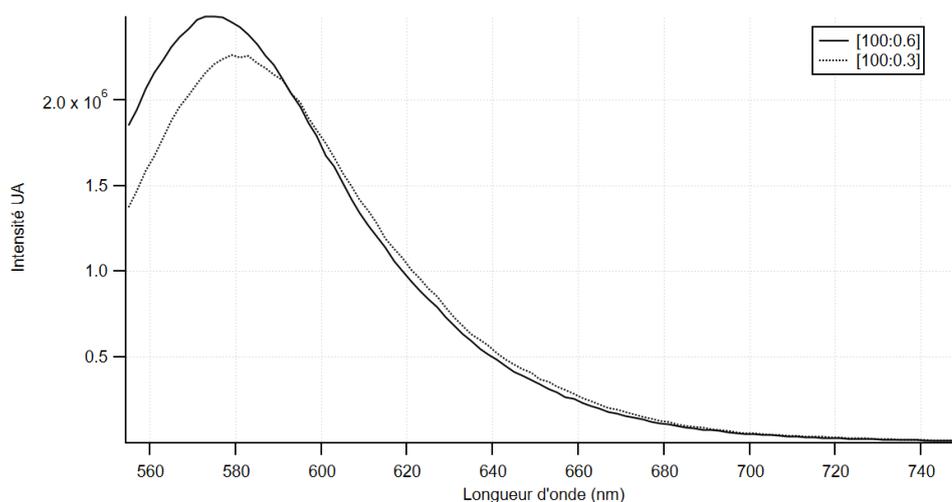


Figure 60 Spectres de fluorescence des échantillons avec une longueur d'onde d'excitation de 545 nm à 1 mg/mL.

L'intégration de la Rhodamine B dans les chaînes de polymère a néanmoins été vérifiée en préparant un polymère non réticulé\* (avec l'acrylamide pour seul monomère). Cet échantillon a été purifié par précipitation dans l'acétone puis re-suspension dans un faible volume d'eau jusqu'à ce que l'acétone reste limpide. Les chaînes ainsi formées ont ensuite été séchées à l'étuve et un solide rose vif a été obtenu (**Figure 61**). Ce solide peut ensuite être solubilisé dans l'eau (**Figure 61**).



Figure 61 Le flacon de gauche correspond au solide obtenu après séchage du polymère non réticulé. Celui de droite est une solution obtenue après dilution d'un fragment de solide (~1 mg) dans de l'eau distillée. Le fragment se disperse facilement dans l'eau donnant une solution légèrement rosée.

La rhodamine B n'est cependant pas nécessaire à l'obtention de polymère. En effet, si l'irradiation sous UV des monomères seuls ou en présence de rhodamine ne

\* Echantillon réalisé par Cem Tugrul Bicak, non présent dans les données de l'article publié.

permet pas la formation de polymère, il est possible d'obtenir des particules de polymère en ajoutant uniquement de la benzophénone au mélange de monomères. Bien que la cinétique soit plus lente (24h), des particules d'environ 200nm sont également obtenues dans des conditions similaires à [100 : 0.6]. Les alcools et les éther-oxides pouvant jouer le rôle de donneur d'hydrogène dans les photopolymérisations de type II, ce résultat n'est cependant pas particulièrement surprenant.

La composition des nanoparticules de polymère reste très similaire à celle obtenue dans la partie **I-2-a** comme en atteste la spectroscopie infrarouge présentée **Figure 62**. Comme précédemment, on retrouve des bandes caractéristiques\* des élongations des liaisons N-H, C-H et C=O, respectivement, de 3400 à 3500  $\text{cm}^{-1}$ , de 2840 à 3000  $\text{cm}^{-1}$  et à 1690  $\text{cm}^{-1}$ . La seule différence notable avec les spectres présentés en Figure 41 est la présence d'un pic entre 3200 et 3400  $\text{cm}^{-1}$  éventuellement attribuable à une vibration d'élongation de la liaison O-H de la fonction acide carboxylique de la RhB.

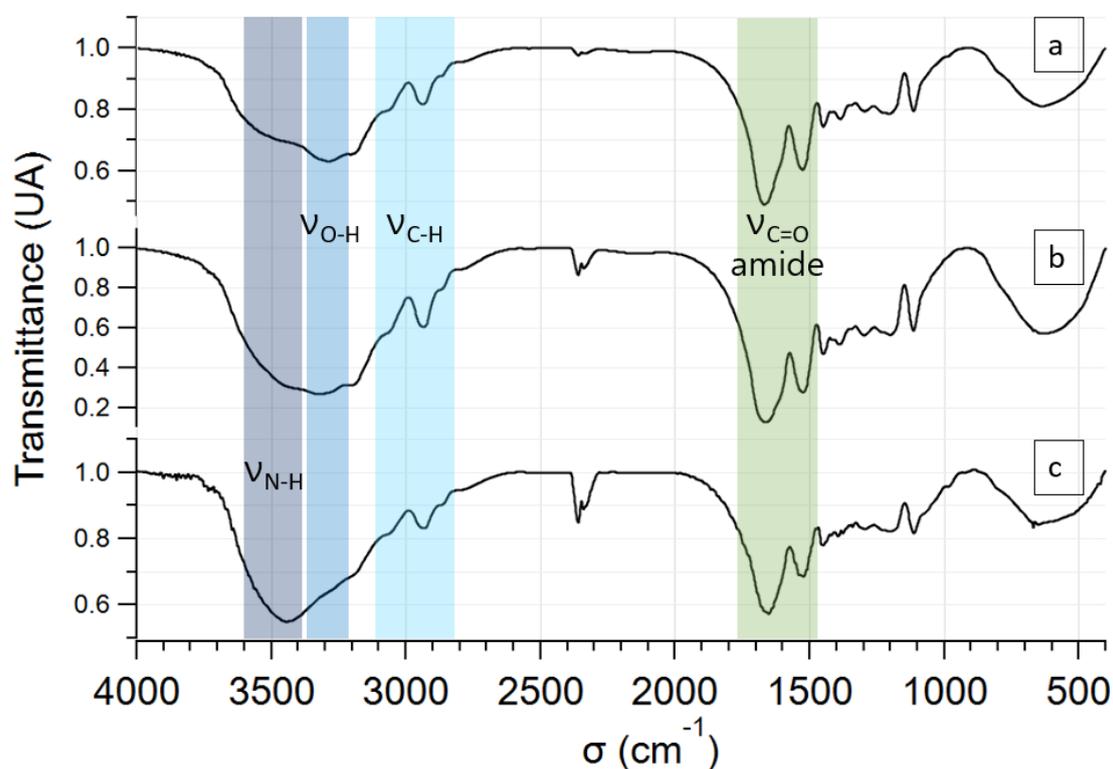


Figure 62 Spectres FTIR des échantillons (a), [100 : 0.3], (b) [100 : 0.6] et (c) polymère amorcé par le DCAA en présence de 0.85  $\mu\text{g/mL}$  d'ArtRhod. Un pic présent dans (a) et (b) entre 3300 et 3400  $\text{cm}^{-1}$  et absent de (c) est attribué à une vibration d'élongation de la liaison O-H de la fonction acide carboxylique de la RhB.

\* La double bande autour de 2350  $\text{cm}^{-1}$  est due à un défaut sur la purge de l'appareil et correspond au  $\text{CO}_2$  de l'air.

### 3. Interactions avec des cellules cancéreuses du sein

#### a. Synthèse de polymères à empreintes

Afin d'évaluer la capacité des échantillons, synthétisés par photopolymérisation de type II, à cibler des cellules cancéreuses mammaires via leur surexpression de la protéine CD36, plusieurs synthèses ont été réalisées en intégrant, comme dans la partie précédente, les peptides 93-110, 139-155, 155-172 et 248-265.

Les échantillons ont été produits en deux séries de synthèse. Dans la première on retrouve les échantillons [93-110] et [248-265]. Dans la seconde on retrouve [139-155], [155-172] et un réplica identique de [93-110] noté « [93-110] (2) ». Les caractéristiques des échantillons synthétisés sont résumées dans le **Tableau 8**.

*Tableau 8 Récapitulatif des caractéristiques des échantillons synthétisés.*

Echantillon	[93-110]	[139-155]	[155-172]	[248-265]	[93-110] (2)
Diamètre hydrodynamique	77 nm	92 nm	100 nm	108 nm	65 nm
Concentration (mg/mL)	8.1	9.5	13.0	11.5	7.8

#### b. Evaluation du ciblage par cytométrie en flux

La capacité à cibler des cellules surexprimant la protéine CD36 a été évaluée sur 2 lignées cellulaires : les cellules SUM159 WT et les cellules SUM159 CL1

Pour chaque lignée, on compare le marquage avec un anticorps anti-CD36 avec le marquage par un polymère à empreinte de CD36 fluorescent. Un exemple des données obtenues est présenté **Figure 63** pour l'échantillon « [93-110] (2) » sur les cellules SUM159 CL1.

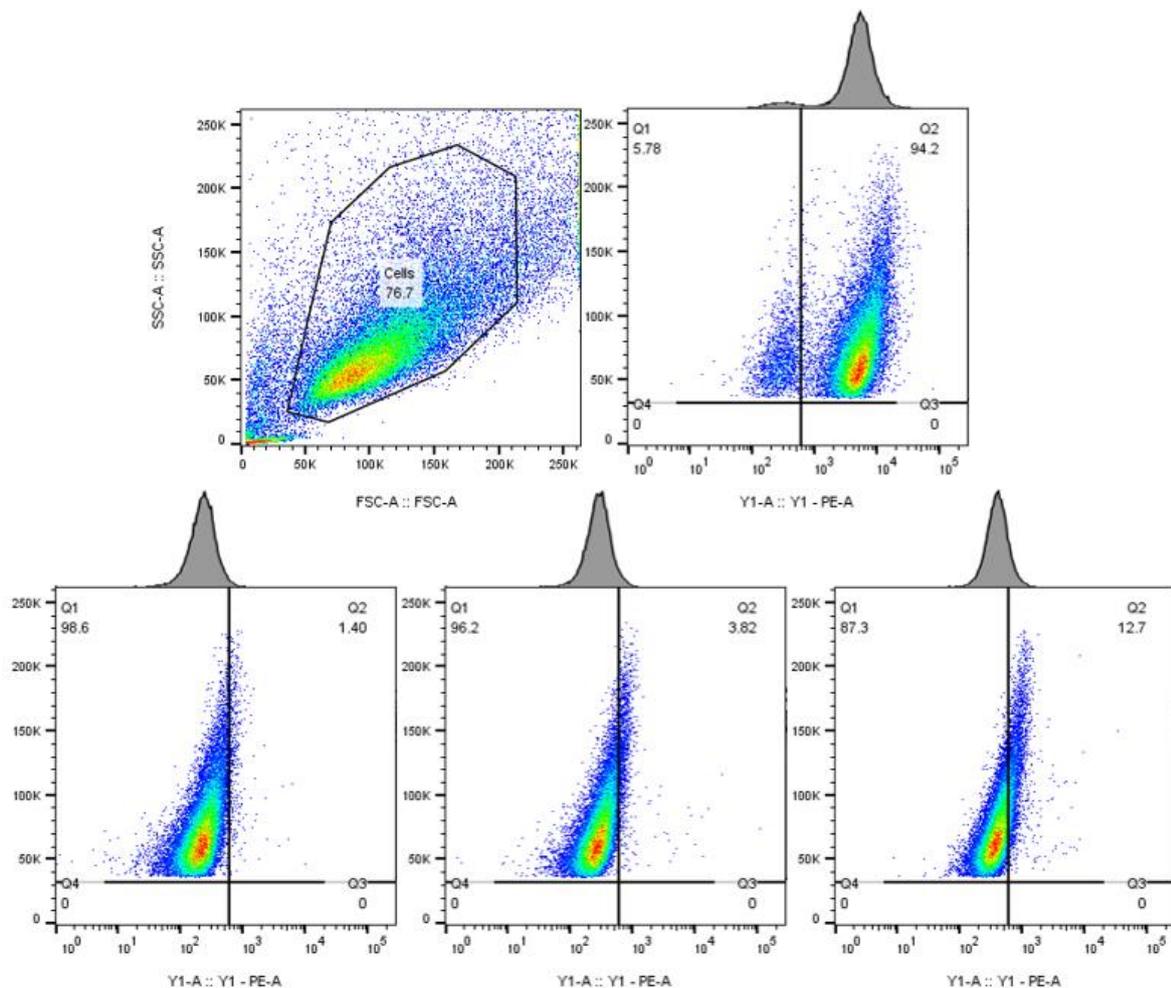


Figure 63 En haut, à gauche, représentation des cellules SUM159 CL1 en fonction de leur taille (FSC-A) et de leur granulosité (SSC-A), à droite, marquage avec un anti-CD36 fluorescent, représentation en fonction de la granulosité et de la fluorescence. En bas, marquage des cellules SUM159 CL1 par une solution à 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL et 1 mg/mL de MIP 93-110(2) dans du PBS contenant 1% de sérum de veau fœtal, pendant 1h à 4°C.

Le marquage est visible dans les cadrans supérieurs droits représentant un niveau de fluorescence supérieur à celui de l'auto-fluorescence des cellules dans ce canal mesuré sur des cellules non marquées. La même expérience a été reproduite sur l'ensemble des échantillons produits en plusieurs expériences de cytométrie distinctes. Un résumé des résultats de ciblage obtenus pour des concentrations de 1mg/mL est présenté **Figure 64**.

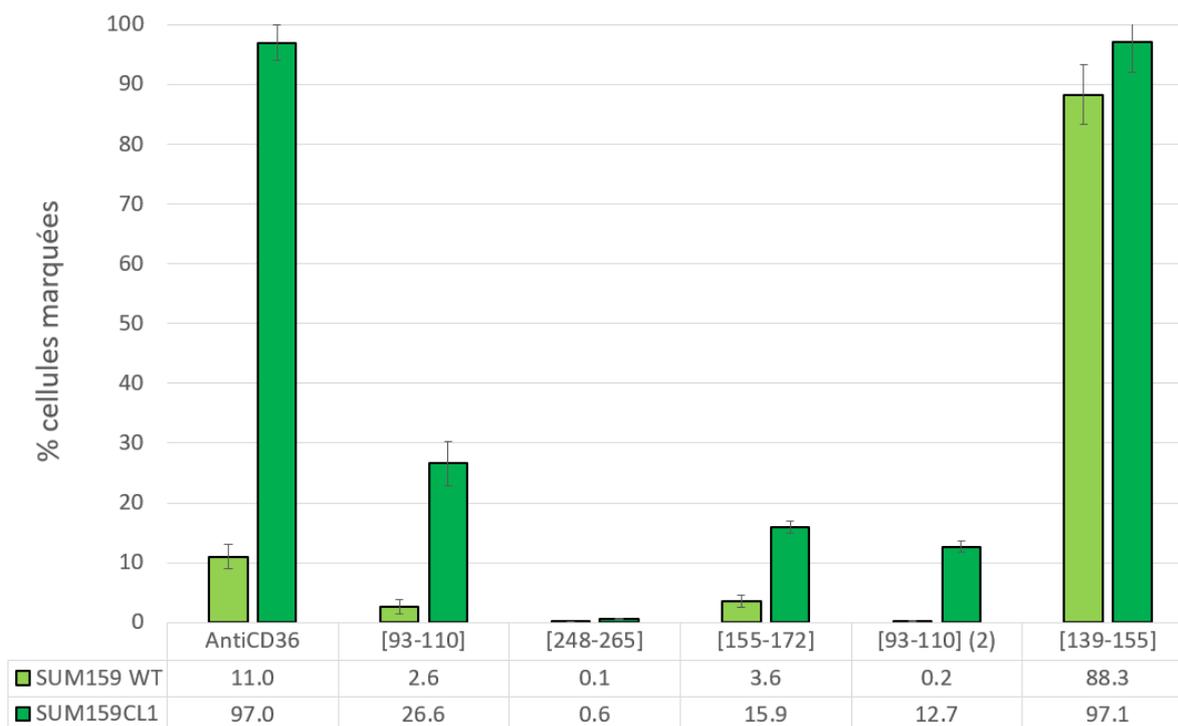


Figure 64 Synthèse des capacités de ciblage des différents matériaux synthétisés à une concentration de 1 mg/mL.

Les matériaux préparés à partir des peptides 93-110 et 155-172 ciblent préférentiellement les cellules présentant une forte expression de la protéine CD36. De manière similaire à ce qui a été observé à partir de polymères amorcés par du DCAA, l'échantillon [139-155] semble cibler fortement les cellules de façon indépendante de l'expression de la protéine CD36.

### c. Microscopie confocale

Afin de visualiser le ciblage des cellules surexprimant la protéine CD36 par des polymères à empreintes de protéines synthétisés par photopolymérisation de type II, et en particulier par les échantillons [93-110](2)\* et [155-172], ces derniers ont été incubés sur des cellules SUM159 WT et CL1 et observés en microscopie confocale. Comme pour la réalisation d'images d'immunofluorescence classiques, les marquages sont réalisés sur des cellules fixées. Ce choix permet d'éviter l'observation d'une internalisation dans les cellules qui serait due à des phénomènes d'endocytose.

Le marquage avec un anticorps anti-CD36 nous renseigne sur l'expression de la protéine (**Figure 65**). Pour les cellules SUM159 WT, en moyenne 1 cellule sur 10 est marquée par l'anticorps anti-CD36 tandis que pour les cellules SUM159 CL1 l'ensemble des cellules sont fluorescentes. On remarque la présence d'ilots de fluorescence qui peut

\* [93-110] ayant été utilisé en totalité pour réaliser d'autres tests, notamment des isothermes d'adsorption, non concluants pour des raisons de limite de détection.

s'expliquer par une disposition en « raft » de la protéine avec des zones de forte concentration de la protéine.

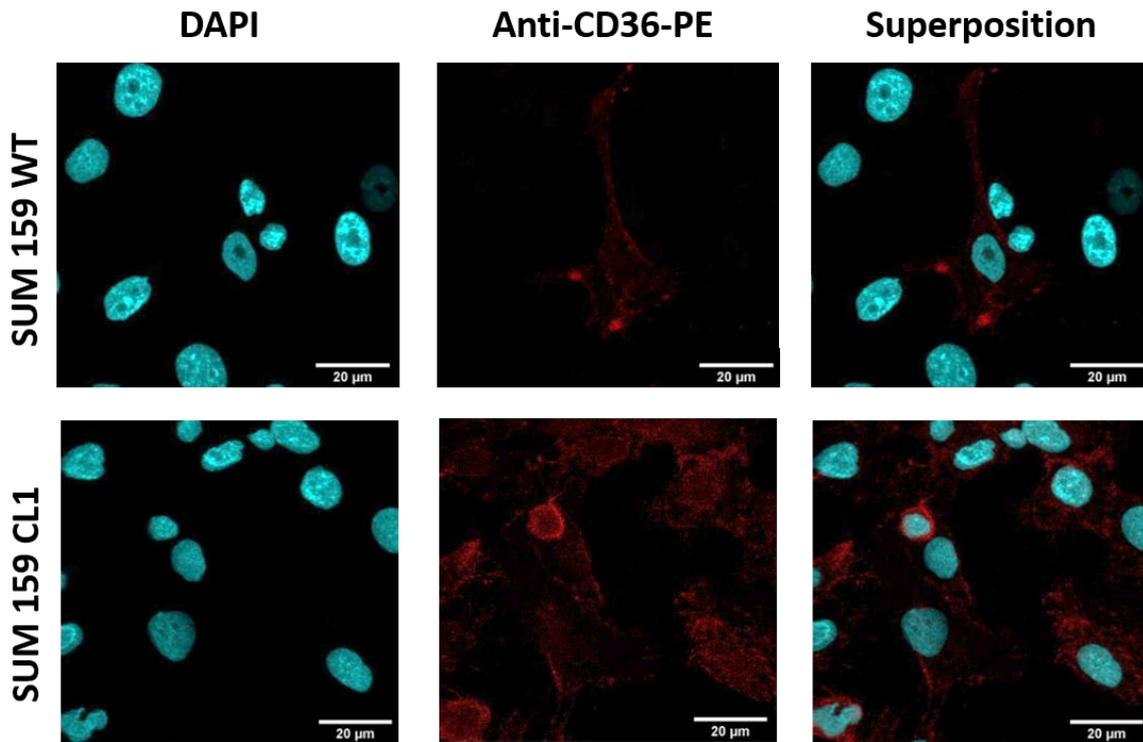


Figure 65 Images de microscopie confocale obtenues par marquage avec un anticorps anti-CD36, après projection sur 10 images centrales (en « Average ») sur chaque stack, dans le canal du DAPI, du PE, et une superposition des deux, pour les cellules SUM159 WT et CL1. Pour les cellules SUM159 WT, en moyenne 1 cellule sur 10 est marquée par l'anticorps anti-CD36 tandis que pour les cellules SUM159 CL1 l'ensemble des cellules sont fluorescentes.

Les images obtenues après marquage avec des polymères à empreinte de 93-110 montrent un fort ciblage des cellules. Ce marquage n'est cependant pas similaire à celui obtenu avec l'anticorps. En effet, que ce soit sur les images présentées Figure 66 ou Figure 67, l'ensemble des cellules SUM159 WT est marqué, ce qui indique un fort signal non spécifique. Sur les images de la **Figure 66**, il semble que la fluorescence soit plus importante sur les cellules SUM159 CL1, mais cette impression peut être due à un nombre plus important de cellules dans le champ.

Il est même possible de trouver une paire d'images pour lesquelles l'échantillon [93-110] (2) semble avoir une préférence pour les cellules SUM159 WT (**Figure 67**). En présence d'un signal non spécifique aussi fort, il semble difficile de conclure sur les capacités de ciblage de l'échantillon à partir de ces images, bien qu'il soit possible de trouver des images conformes aux résultats obtenus en cytométrie en flux.

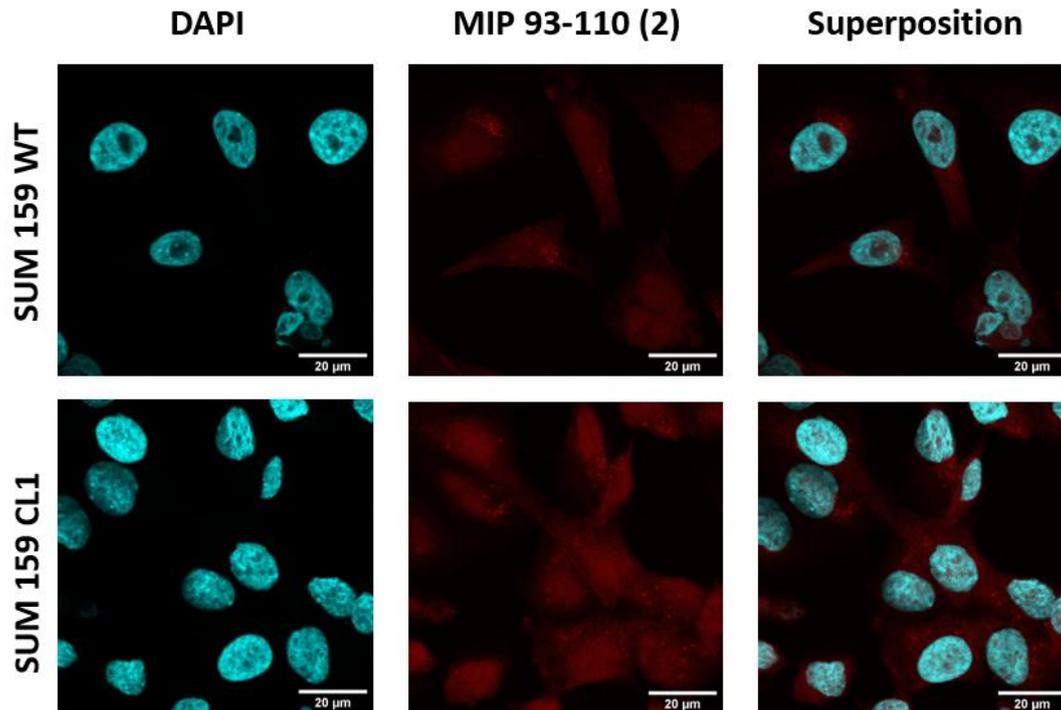


Figure 66 Images de microscopie confocale obtenues avec l'échantillon 93-110(2) après projection sur 10 images centrales (en « Average ») sur chaque stack, dans le canal du DAPI, du PE, et une superposition des deux, pour les cellules SUM159 WT et CL1. Contrairement au marquage anticorps, toutes les cellules SUM 159 WT sont marquées.

Des résultats similaires ont été obtenus avec l'échantillon [155-172] : toutes les cellules sont fluorescentes, y compris les cellules SUM159 WT alors que celles-ci n'expriment pas toutes la protéine ciblée (**Figure 68**).

Bien qu'il soit intéressant de pouvoir observer le ciblage par microscopie confocale, les résultats obtenus ici ne sont pas concordant avec ce qui a été obtenu en cytométrie en flux.

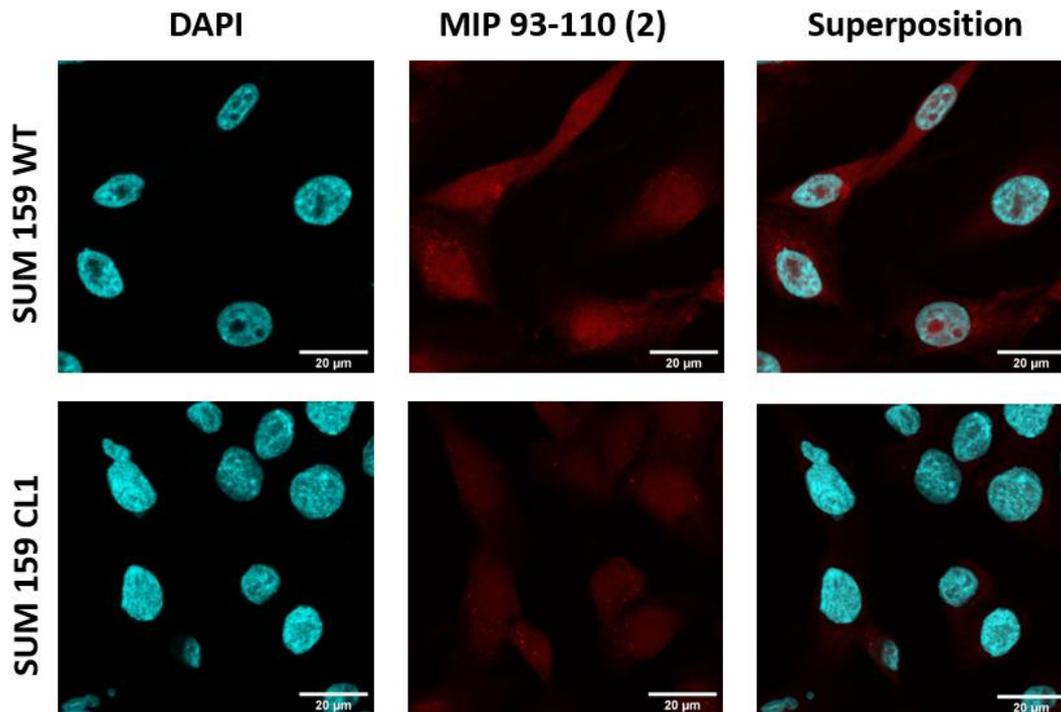


Figure 67 Images de microscopie confocale obtenues avec l'échantillon 93-110(2) après projection sur 10 images centrales (en « Average ») sur chaque stack, dans le canal du DAPI, du PE, et une superposition des deux, pour les cellules SUM159 WT et CL1. Contrairement au marquage anticorps, toutes les cellules SUM 159 WT sont marquées. Sur ces nouvelles prises de vue, l'intensité de fluorescence semble plus importante sur les cellules SUM 159 WT que sur les cellules SUM 159 CL1.

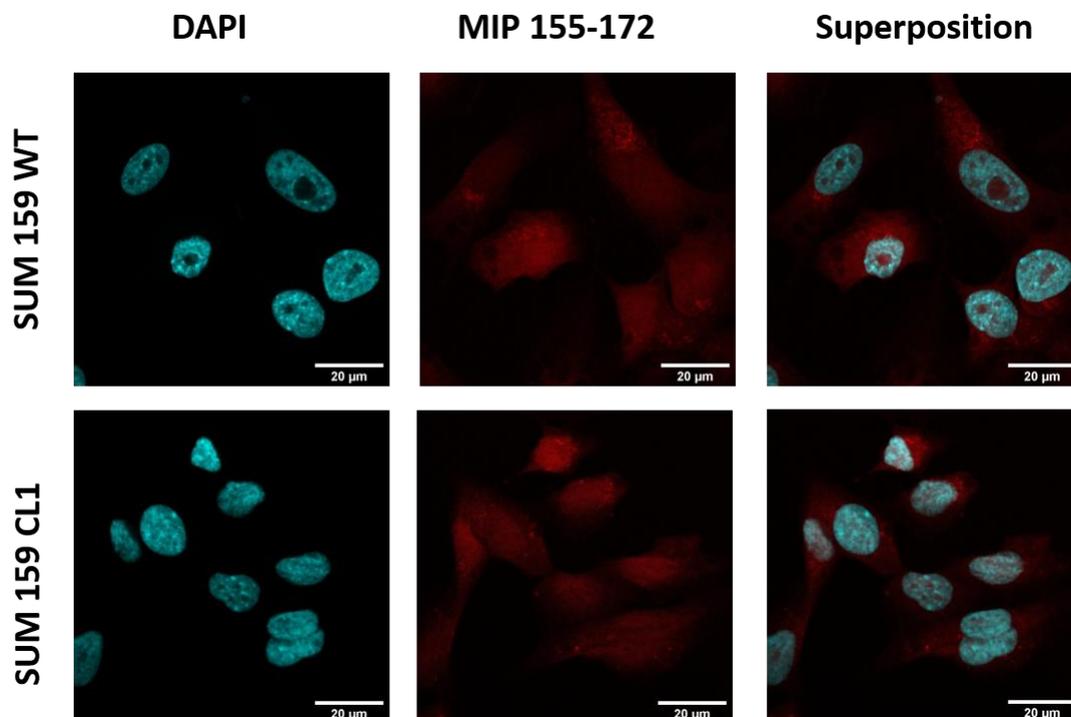


Figure 68 Images de microscopie confocale obtenues avec l'échantillon 139-155 après projection sur 10 images centrales (en « Average ») sur chaque stack, dans le canal du

DAPI, du PE, et une superposition des deux, pour les cellules SUM159 WT et CL1. Contrairement au marquage anticorps, toutes les cellules SUM 159 WT sont marquées.

#### d. Cytotoxicité

Comme dans la partie précédente, les membranes de dialyse ont été ouverte sous une hotte à flux laminaire avec des précautions permettant de maintenir la stérilité de l'échantillon. L'absence de contamination est vérifiée en plaçant un peu d'échantillon dans une boîte de Pétri avec du milieu de culture dans un incubateur à 37°C pendant 72h.

Pour évaluer la toxicité de nanoparticules de polyacrylamide à empreinte de CD36, des cellules cancéreuses mammaires MCF-7, SUM159 WT et CL1 et une lignée cellulaire mammaires à phénotype épithélial, mimant un tissu sain, HMEC, sont incubées avec des solutions de polymère allant de 0.5 à 2 mg/mL.

On retrouve des résultats similaires quel que soit le peptide utilisé pour la préparation de l'empreinte : jusqu'à 2mg/mL et sur l'ensemble des lignées étudiées, l'impact du matériau sur la viabilité cellulaire reste faible. Les résultats pour le matériau à empreinte du peptide 93-110 sont présentés **Figure 69**, **Figure 70**, **Figure 71** pour les cellules MCF-7, SUM 159 WT et SUM 159 CL1, respectivement. En particulier, aucune différence significative n'est observée en fonction du niveau d'expression de la protéine CD36 ou des capacités des matériaux à cibler celle-ci.\*

A noter que comparativement à l'expérience présentée en partie **I-3-a**, l'évaluation de la viabilité a été réalisée à des concentrations plus importantes.

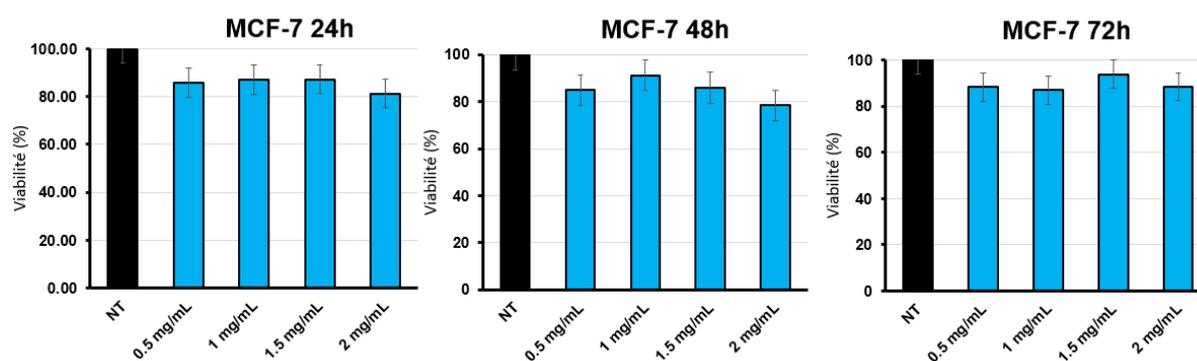


Figure 69 Viabilité des cellules MCF-7, n'exprimant pas CD36, après 24h, 48h et 72h de traitement avec des nanoparticules de polyacrylamide à empreinte de CD36 (93-110).

\* Pour rappel, ces cellules expriment la protéine CD36 avec différents niveaux : MCF-7 à 0%, SUM 159 WT à 10% et SUM 159 CL1 à 97%.

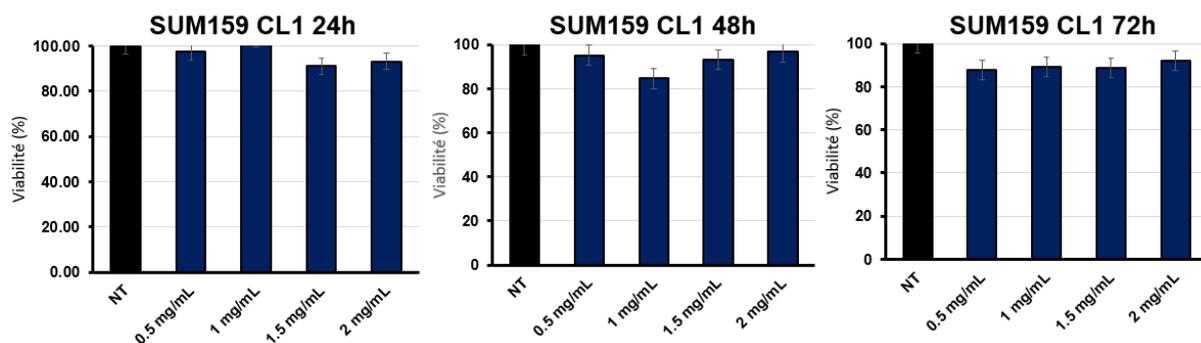


Figure 70 Viabilité des cellules SUM159 CL1, surexprimant la protéine CD36, après 24h, 48h et 72h de traitement avec des nanoparticules de polyacrylamide à empreinte de CD36 (93-110).

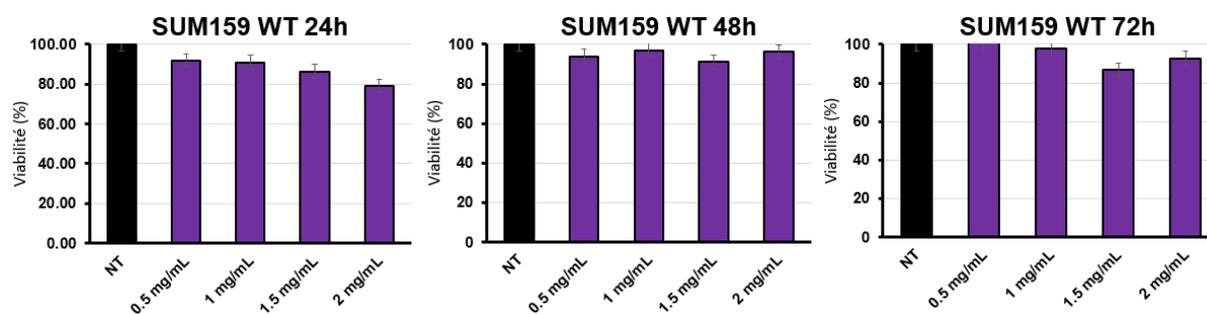


Figure 71 Viabilité des cellules SUM159 WT après 24h, 48h et 72h de traitement avec des nanoparticules de polyacrylamide à empreinte de CD36 (93-110).

La toxicité a également été évaluée sur une lignée cellulaire mammaire à phénotype épithélial, mimant un tissu sain. Aucun excès de toxicité significatif n'a été observé par rapport aux lignées cancéreuses mammaires (**Figure 72**).

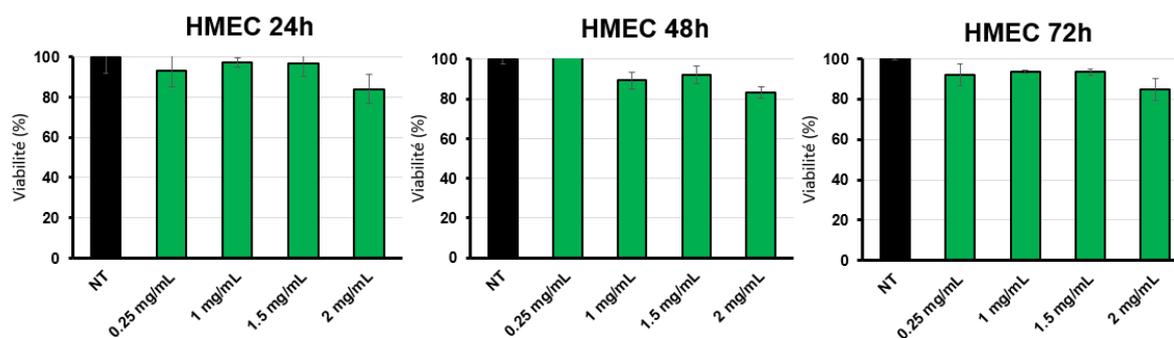


Figure 72 Viabilité des cellules HMEC, n'exprimant pas la protéine CD36, après 24h, 48h et 72h de traitement avec des nanoparticules de polyacrylamide à empreinte de CD36 (93-110).

#### 4. Conclusion

L'utilisation du couple Benzophénone/Rhodamine B pour amorcer la polymérisation a permis l'obtention de nanoparticules de polymère fluorescentes. Les polymères réalisés par cette méthode ne sont pas cytotoxiques, y compris à des concentrations

allant jusque 2mg/mL. Il est possible d'utiliser cette synthèse pour réaliser des polymères à empreinte de peptide capable de cibler les cellules exprimant la protéine CD36. Il faut cependant noter la quantité importante d'échantillon devant être utilisée pour obtenir ces résultats ce qui pourrait indiquer un faible nombre d'empreintes par gramme de polymère. De plus, les conditions utilisées pour réaliser les images de microscopie confocale ne permettent pas de visualiser ce résultat.

### III. Conclusion

L'initiation par l'agent RAFT photopolymérisable, bien que particulièrement pratique pour la fonctionnalisation ultérieure des particules magnétiques, semble présenter des limites avant même leur intégration. La synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques via fonctionnalisation par du DCAA a fait l'objet d'une publication, réalisés dans des conditions légèrement différentes et surtout en l'absence de monomères fluorescents.

L'utilisation du couple Benzophenone/Rhodamine B pour amorcer la polymérisation a permis l'obtention de nanoparticules de polymère fluorescentes. Il semble que les matériaux réalisés à partir de l'épitope 139-155 ciblent les cellules indépendamment de leur expression de CD36 tandis que l'incorporation des peptides [93-110] et [155-172] permet de produire des polymères à empreintes de protéines capables de cibler les cellules surexprimant la protéine CD36, ce qui exclut l'hypothèse de peptides non reconnaissables ou ne pouvant être imprimés par l'acrylamide.

Quelle que soit la méthode choisie, les polymères à base d'acrylamide ne sont pas cytotoxiques. Ces expériences ne permettent pas d'assurer l'innocuité du matériau pour de futurs patients, mais il s'agit de premières étapes encourageantes pour la suite du développement des matériaux.

## VI. Matériel et méthodes

### 1. Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés pour les synthèses présentées dans ce chapitre sont les suivants :

Rhodamine B (RhB, Sigma-Aldrich, 99 %), benzophenone (BP, Rhone Poulenc, 99%), acrylamide (AM, Sigma-Aldrich, 99 %), N,N-méthylènebis(acrylamide) (BIS Sigma-Aldrich, 99%), éthanol technique (96 %, EtOH, VWR) acetone, (VWR). Acryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B (Polyscience), méthanol, (MeOH, 99 % VWR), acide acétique glacial (99 %, AcOH, Carlo Elba), bromure de potassium (KBr, Sigma-Aldrich, 99%). Membrane de dialyse Spectrapore (SpectrumLabs) 12-14 kDa.

## 2. Outils de caractérisations physico-chimiques

Les outils utilisés pour effectuer les mesures de diamètres hydrodynamiques sont présentés en Annexe « **Mesures de taille par DLS** » page 165.

Les spectres FTIR sont obtenus à partir de pastilles réalisées en broyant finement quelques milligrammes d'échantillon séché à l'étuve pendant une semaine, avec du bromure de potassium séché à l'étuve et en compressant la poudre obtenue (pression équivalente à 10 tonnes pendant 30 secondes). Les spectres sont acquis avec un Tensor27 commercialisé Brucker dans la région 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

Les spectres de fluorescence sont obtenus en analysant le 300  $\mu\text{L}$  de solution dans des plaques noires 96 puits sur un lecteur de plaques spectramax I3x en mode spectre avec une longueur d'onde d'excitation de 545nm.

Les images de microscopie électronique ont été réalisés sur un microscope électronique à transmission Jeol1011 équipé d'une camera Gatan (Orius) à partir d'une goutte d'échantillon diluée déposé sur des grilles de cuivre recouvertes de carbone (300 mesh) et séchée à l'air libre.

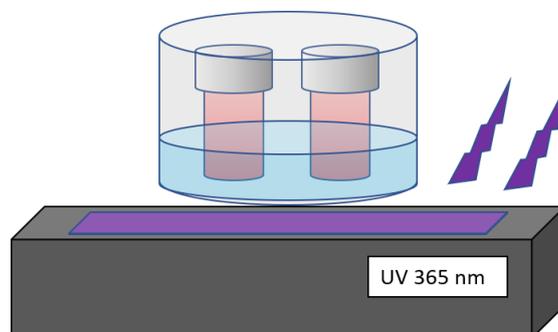
## 3. Synthèse « influence de la concentration en ArtRhod »

Afin d'étudier l'influence de la concentration en monomère fluorescent (acryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B, 668 g/mol, abrégé ArtRhod) sur le rendement de la synthèse, quatre synthèses ont été réalisées en parallèle avec pour base une même solution de monomères réalisée à partir de solutions mères. Ainsi, pour chaque synthèse on retrouve 1.87 mmol d'AM (133 mg), 0.43mmol de BIS (66 mg) et 1.14 $\mu\text{mol}$  de DCAA (300  $\mu\text{g}$ ) et une quantité d'ArtRhod comprise entre 0 et 0.28 $\mu\text{mol}$  (Tableau 9) dans un volume total de 22,3mL d'eau distillée.

*Tableau 9 Résumé des conditions expérimentales permettant de déterminer l'influence de la concentration en monomère fluorescent.*

Echantillon	AM	BIS	ArtRhod	Volume total
1	1.87 mmol	0.43 mmol	0	22,3 mL
2	1.87 mmol	0.43 mmol	0.028 $\mu\text{mol}$	22,3 mL
3	1.87 mmol	0.43 mmol	0.093 $\mu\text{mol}$	22,3 mL
4	1.87 mmol	0.43 mmol	0.28 $\mu\text{mol}$	22,3 mL

Après 30min de mélange, les solutions sont dégazées 30min sous azote avant d'être placées au-dessus d'une lampe UV (VL-215.L 2x15 W – 365 nm tube UV, Fischer) permettant une irradiation à 365 nm pendant 5h, dans un cristallisoir avec un volume d'eau fixé permettant de limiter l'élévation de température à 27°C (**Figure 73**).



*Figure 73 Montage expérimental. Le cristallisoir contenant l'eau permettant de limiter l'échauffement est maintenu par des éleveurs à une distance fixe de la lampe. La lampe émet des UV à une longueur d'onde de 365nm, en direction des flacons.*

Après polymérisation, les particules sont dialysées pendant 3 jours dans l'eau distillée (soit 9 bains de 500 mL) et un volume connu est séché. La masse de polymère après séchage permet de remonter à la concentration en polymère dans chaque échantillon et ainsi d'obtenir une évaluation du rendement de la polymérisation.

#### **4. Synthèse « influence de la concentration en monomères »**

Pour chaque synthèse, 200 mg d'AM (2.81 mmol), 100 mg de BIS (0.65 mmol) et 300 µg de DCAA (1.14 µmol) sont dissout dans 11.3 mL (condition « concentrée ») ou 21.3 mL (condition « diluée ») d'eau distillée. La polymérisation et la purification sont réalisées comme décrit dans la partie précédente.

#### **5. Synthèses « Reproductibilité »**

Pour chaque synthèse, 200 mg d'AM (2.81 mmol), 100 mg de BIS (0.65 mmol) et 300 µg de DCAA (1.14 µmol), dans 14 mL d'eau distillée. Chacun des flacons est ensuite purgé de l'air qu'il contient sous azote pendant 30 minutes avant d'être placé au-dessus de la lampe dans un bain d'eau. Les positions des flacons et ses bouchons jupe utilisés sont repérés pour chaque expérience. Les solutions concentrées permettant une polymérisation plus courte, la polymérisation est arrêtée après 2h.

#### **6. Méthode d'évaluation de la cytotoxicité**

Pour cette synthèse, 200 mg d'acrylamide (2.81 mmol), de 100 mg de N,N'-Méthylènebisacrylamide (0.65 mmol), de 300 µg de DCAA (1.14 µmol) et de 300 µg de ArtRhod (0.46 µmol) sont dissouts dans un volume de 20 mL d'eau distillée. Après 30

minutes de dégazage sous azote, la solution est placée sur la lampe dans un bain d'eau pour 5h. L'échantillon est purifié puis stérilisé en le plaçant dans une membrane de dialyse et placé une nuit dans une solution de méthanol et d'acide acétique (avec un ratio volumique de 9:1) puis dans de l'eau distillée pour trois jours avec changement du bain de dialyse (500 mL) deux fois par jour pour éliminer le méthanol. Le contenu de la membrane est alors stérile car la taille des pores ne permet pas l'entrée des microorganismes. La membrane est ensuite ouverte sous une hotte à flux laminaire avec des précautions permettant de maintenir la stérilité de l'échantillon. L'absence de contamination est vérifiée en plaçant un peu d'échantillon dans une boîte de Pétri avec du milieu de culture dans un incubateur à 37°C pendant 72h.

Des cellules MCF-7 et SUM159, cultivées conformément au protocole décrit page 174, sont déposées dans des plaques de culture cellulaire 96 puits à raison de 7000 cellules par puits. Après 24h dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules ont adhéré au fond des puits et sont traitées avec différentes concentrations de matériau (100 µL de 25 µg/mL à 1000 µg/mL dans un milieu de culture adapté à chaque lignée cellulaire) pour 24h, 48h ou 72h. Après ce temps d'incubation, 100 µL de réactif (Cell-Titer 2.0, Promega) est ajouté dans chaque puits. La plaque est agitée pendant 5 minutes à température ambiante. Après 10 minutes de repos, la bioluminescence est mesurée sur un lecteur de plaques.

## 7. Polymères à empreintes de CD36 amorcés par DCAA

Les polymères à empreinte de CD36 sont préparés à partir de 200 mg d'acrylamide (2.81 mmol), de 100 mg de N,N'-Méthylènebisacrylamide (0.65 mmol), de 300 µg de DCAA (1.14 µmol) et de 300 µg de ArtRhod (0.46 µmol) et 300 µg de peptide (300 µL d'une solution à 1mg/mL dans du tampon phosphate à pH 7.4) ou de 300 µL de tampon phosphate à pH 7.4 pour l'échantillon non imprimé noté NIP), dans un volume de 20 mL d'eau distillée. Un échantillon a également été réalisé à partir de 600 µg du peptide 93-110, noté 93-110 (2). Avant amorçage de la polymérisation, les monomères et le peptide sont mélangés pendant 2h sur un agitateur orbitalaire (240 rpm) avant d'être dégazés 30 minutes sous flux d'azote.

Après 5h de polymérisation sur la lampe UV, des bains de dialyse eau/méthanol/acide acétique (50%/45%/5%) puis d'eau distillée permettent d'éliminer les peptides et de former les empreintes

Pour vérifier les capacités de ciblage des échantillons, 500 000 cellules sont placées dans un Eppendorf dans une solution de PBS contenant 1% de sérum de veau foetal ainsi que 40 µg de polymère ou 5 µL d'un anticorps antiCD36 fluorescent. Après 1h d'incubation dans le noir à 4°C, les cellules sont lavées et analysées sur un cytomètre en flux (voir Annexe « **Cytométrie en flux** » page 175).

## 8. Synthèse photopolymérisation de type II

Les compositions des 4 synthèses sont résumées dans le **Tableau 10**.

*Tableau 10 Récapitulatif de la composition de échantillons.*

Echantillon	[100 : 0.075]	[100 : 0.15]	[100 : 0.3]	[100 : 0.6]
AM (mmol)	2,81	2,81	2,81	2,81
BIS (mmol)	0,65	0,65	0,65	0,65
Rhodamine B ( $\mu\text{mol}$ )	0,43	0.86	1.73	3.46
Benzophenone ( $\mu\text{mol}$ )	2.595	5.19	10.38	20.76
Volume total (mL)	16	16	16	16
%EtOH*	5%	5%	5%	5%

Comme précédemment, les solutions ainsi réalisées sont purgées sous  $\text{N}_2$  afin d'éliminer un maximum d' $\text{O}_2$  avant d'amorcer la polymérisation dans la configuration illustrée **Figure 74**. L'agitation des flacons doit permettre une meilleure homogénéité et la position horizontale permet une plus grande surface d'irradiation. Après 6h d'irradiation pour [100 :0.6] et 24h pour les autres échantillons, ceux-ci sont dialysés dans un mélange eau éthanol puis dans l'eau.

---

\* La benzophénone est faiblement soluble dans l'eau, elle est préalablement dissoute dans l'éthanol.



Figure 74 Configuration pour la photopolymérisation de type II.

## 9. Synthèse de polymères à empreintes par photopolymérisation de type II

Pour ces synthèses, 2.81 mmol d'AM (200 mg), 0.65 mmol de BIS (100 mg) et 3.86  $\mu$ mol de Rhodamine B et 400  $\mu$ g de peptide sont dispersés dans 14.6 mL d'eau distillée et agités pendant 24h avant d'ajouter 20  $\mu$ mol de benzophénone. Après 5h de polymérisation, des bains de dialyse eau/méthanol/acide acétique (50/45/5) puis d'eau distillée permettent d'éliminer les peptides et de former les empreintes.

Pour chaque mesure, 500 000 cellules sont placées dans un Eppendorf dans une solution à 1 mg/mL de matériau dans du PBS contenant 1% de sérum de veau fœtal. Après 1h d'incubation dans le noir à 4°C, les cellules sont lavées par centrifugation et analysées par cytométrie en flux.

## 10. Images de microscopie confocale

Des cellules SUM159 WT et SUM159 CL1 sont cultivées sur des lamelles dans des boîtes de petri (P60, 6 lamelles et 1,5 millions de cellules par boîte). Après 24h, les lamelles utilisées dans la suite sont choisies pour leur homogénéité et l'absence de cellules sous la lamelle et sont fixées par une solution de paraformaldéhyde à 4% dans du PBS. Les lamelles sont ensuite « bloquées » dans une solution de Glycine à 20mM dans du PBS, ce qui permet de diminuer les interactions non spécifiques, avant d'être incubés avec un anticorps anti-CD36 fluorescent (PE) ou avec 400  $\mu$ L d'une solution de polymères à 1 mg/mL dans du PBS à 1% de sérum pendant 1h30 à 37°C. Les lamelles sont ensuite lavées 3 fois par du tampon phosphate. Les noyaux sont ensuite marqués en incubant les lamelles 15 min dans 500 $\mu$ L d'une solution de DAPI (1mg/mL diluée au 3000<sup>ème</sup>). Les lamelles sont ensuite lavées 2 fois dans du tampon phosphate contenant 0.1% de Tween 20 puis avec du tampon phosphate. Les lamelles sont ensuite montées sur des lames et conservées à l'abri de la lumière jusqu'à leur acquisition.

Les images ont été acquises sur un microscope Olympus fluoview fv3000 avec un objectif x60 à immersion (huile). Elles ont ensuite été retraitées sur le logiciel Image J (projection « average » de 10 images par stack, centrées, et fusion des canaux rouge et bleu).



# Chapitre 3 : Synthèse de nanoparticules magnétiques fluorescentes

I. Synthèse de nanoparticules de maghémite.....	107
1. Synthèse.....	107
2. Caractérisation.....	108
II. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques par polymérisation par amorçage RedOx.....	113
1. Fonctionnalisation acide acrylique .....	113
2. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques non-fluorescentes.....	116
3. Incorporation du monomère fluorescent .....	119
4. Conclusion.....	120
III. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques par photopolymérisation de type II.....	121
1. Fonctionnalisation acide acrylique .....	121
2. Fonctionnalisation par une couche de polymère fluorescent.....	122
3. Caractérisation.....	123
4. Propriétés magnétiques .....	129
5. L'importance de la température et de l'agitation .....	134
6. Conclusion.....	136
IV. Conclusion .....	136

L'objectif de ce chapitre est de décrire la préparation de nanoparticules hybrides, c'est-à-dire composées d'un cœur d'oxyde de fer et d'une couche de polymère. Ces nanoparticules doivent être de petite taille, fluorescentes, stables et présenter les propriétés magnétiques nécessaires à la poursuite du projet. En considérant les problèmes de reproductibilité liés à l'utilisation du DCAA en photopolymérisation, plusieurs autres voies ont été explorées. Dans ce chapitre, la synthèse des nanoparticules de maghémite sera détaillée et deux voies de synthèse, une polymérisation avec un amorçage utilisant des composés oxydoréducteur (polymérisation RedOx) et une polymérisation par amorçage UV (photopolymérisation de type II) ayant permis l'obtention de particules dites « cœur-coquille » seront décrites. Outre les caractérisations classiques, le pouvoir chauffant des nanoparticules en présence d'un champ magnétique alternatif a été évalué. Les données présentées en partie III ont fait l'objet d'une publication.<sup>175</sup>

## I. Synthèse de nanoparticules de maghémite

### 1. Synthèse

De nombreuses voies de synthèse conduisent à des nanoparticules d'oxyde de fer capables de chauffer en présence d'un champ magnétique alternatif. Une voie de synthèse permettant d'obtenir une grande quantité de nanoparticules dans des conditions douces et à faible coût a été choisie. Il s'agit d'une méthode dite par coprécipitation de sels de Fer II et III ayant été développée au laboratoire par René Massart dans les années 80 et ayant ensuite été largement étudiée et utilisée dans l'équipe Colloïdes Inorganiques du laboratoire PHENIX (**Figure 75**).<sup>176,177,178</sup> L'inconvénient de cette synthèse est la grande polydispersité des particules synthétisées de cette façon (taille comprise entre 2 et 16 nm). Il est donc nécessaire de trier les particules formées.

La première étape de cette synthèse permet de produire des nanoparticules de magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en co-précipitant des solutions acides de chlorure ferreux et ferrique, contenant des ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  dans des proportions stœchiométriques, par passage en milieu basique via un ajout d'ammoniac. Après 30 minutes d'agitation, le précipité est récupéré par décantation magnétique et lavé à l'eau distillée.

La deuxième étape de cette synthèse consiste à disperser les nanoparticules dans un milieu acide à partir d'acide nitrique  $\text{HNO}_3$  avant d'oxyder les nanoparticules de magnétite formées précédemment en maghémite. Cette opération s'effectue en incorporant une solution de nitrate ferrique  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  à ébullition sur le précipité et en chauffant sous agitation pendant 30 minutes. Les particules sont ensuite lavées par décantation magnétique dans une solution d'acide nitrique puis dans l'acétone, dans l'éther, avant d'être à nouveau dispersées dans de l'eau distillée.

A l'issue de cette étape, on récupère des particules cationiques en milieu acide et très polydisperses. L'étape suivante consiste donc à trier ces particules afin de récupérer plusieurs fractions de plus faible polydispersité contenant des particules de tailles différentes. La stabilité colloïdale du ferrofluide étant assurée par la répulsion entre les particules due à leur charge, l'ajout d'une solution concentrée d'acide nitrique permet de déstabiliser les plus grosses particules en écrantant cette répulsion. Après décantation magnétique, ces grosses particules contenues dans le culot sont redispersées et l'opération est répétée. Les particules de plus grande taille présentant un meilleur pouvoir chauffant, nous avons choisi de travailler avec les particules issues du second précipité, qui sont les plus grosses.

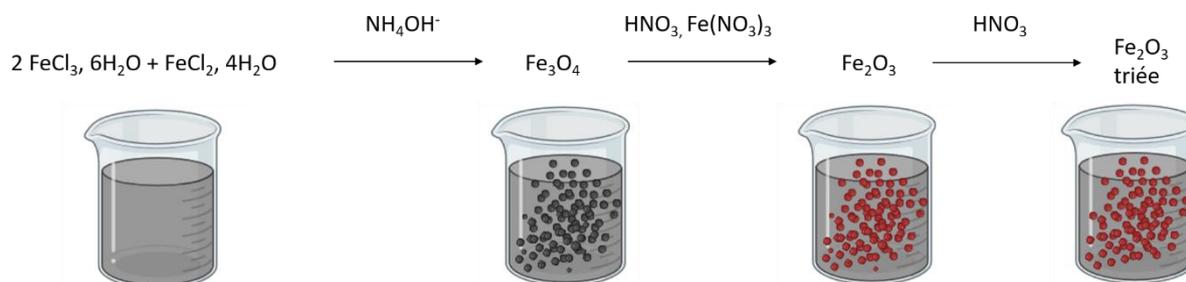


Figure 75 Représentation schématique de la synthèse de nanoparticules de maghémite par coprécipitation d'ions fer en milieu basique et oxydation. L'ajout d'acide nitrique permet de précipiter les nanoparticules pour ne récupérer que les plus grosses.

## 2. Caractérisation

La concentration en fer du ferrofluide sélectionné pour la suite est déterminée par absorption atomique des ions fer après dégradation à l'acide chlorhydrique concentré d'un volume connu précisément d'échantillon. Cette concentration en fer est de 50.6 mg/mL soit 0.907 M.

La réalisation de clichés de microscopie électronique permet d'évaluer la taille des nanoparticules formées ainsi que leur polydispersité (**Figure 76**). Les nanoparticules synthétisées ont un diamètre moyen de 14 nanomètres

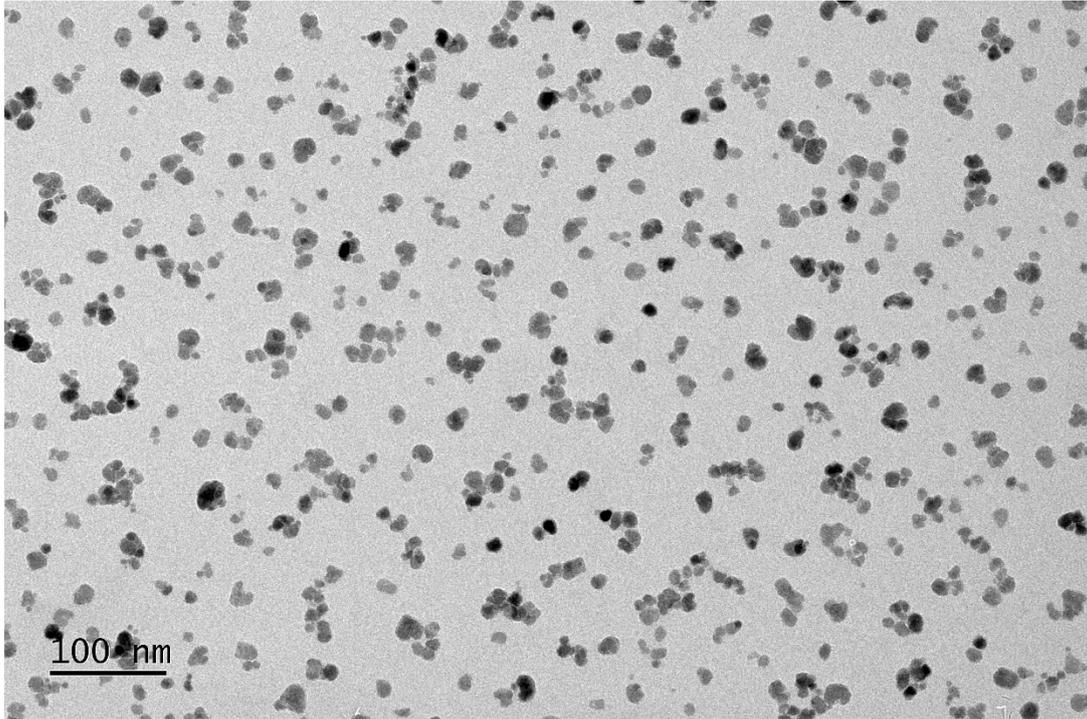


Figure 76 Image de microscopie électronique des nanoparticules de maghémite triées.

Malgré un tri en taille, les nanoparticules restent assez polydisperses (**Figure 77**). Ce résultat n'est pas surprenant au vu de la voie de synthèse choisie, qui privilégie la quantité de nanoparticules produites à leur homogénéité.

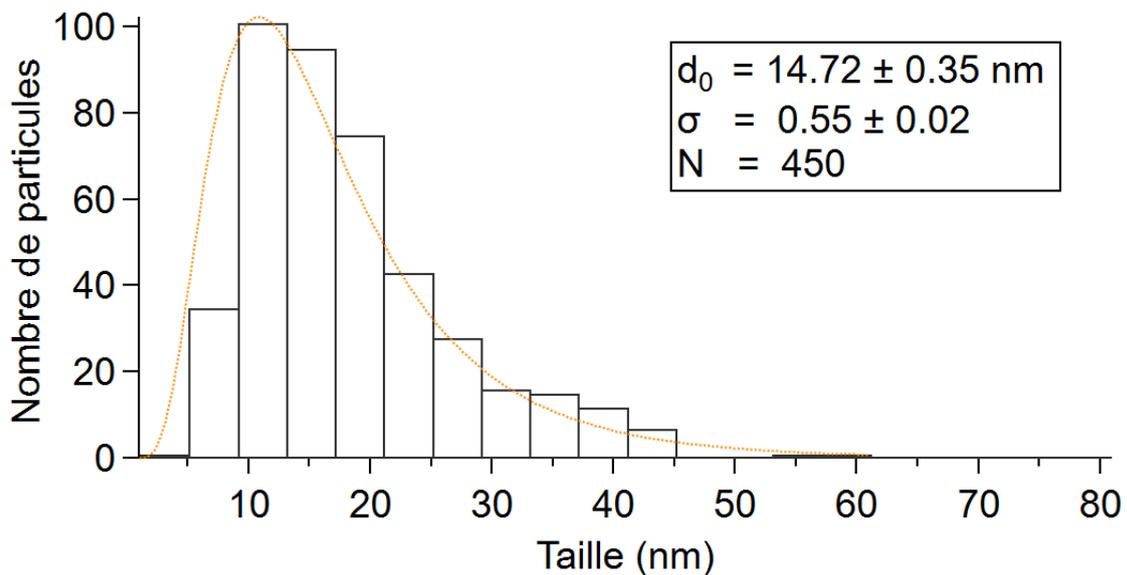


Figure 77 Distribution en taille obtenue après mesure du diamètre de 450 particules sur les images de microscopie électronique.

L'analyse du spectre FTIR des nanoparticules de maghémite nues révèle la présence d'eau adsorbée avec la présence d'une large bande vers  $3400\text{ cm}^{-1}$  et une autre à  $1630\text{ cm}^{-1}$ . Vers  $1390\text{ cm}^{-1}$  on retrouve une bande caractéristique attestant de la

présence résiduelle d'ions nitrate. Enfin la double bande présentant des maximums à 632 et 583  $\text{cm}^{-1}$  est caractéristique des modes de vibration de la liaison Fe-O (**Figure 78**).

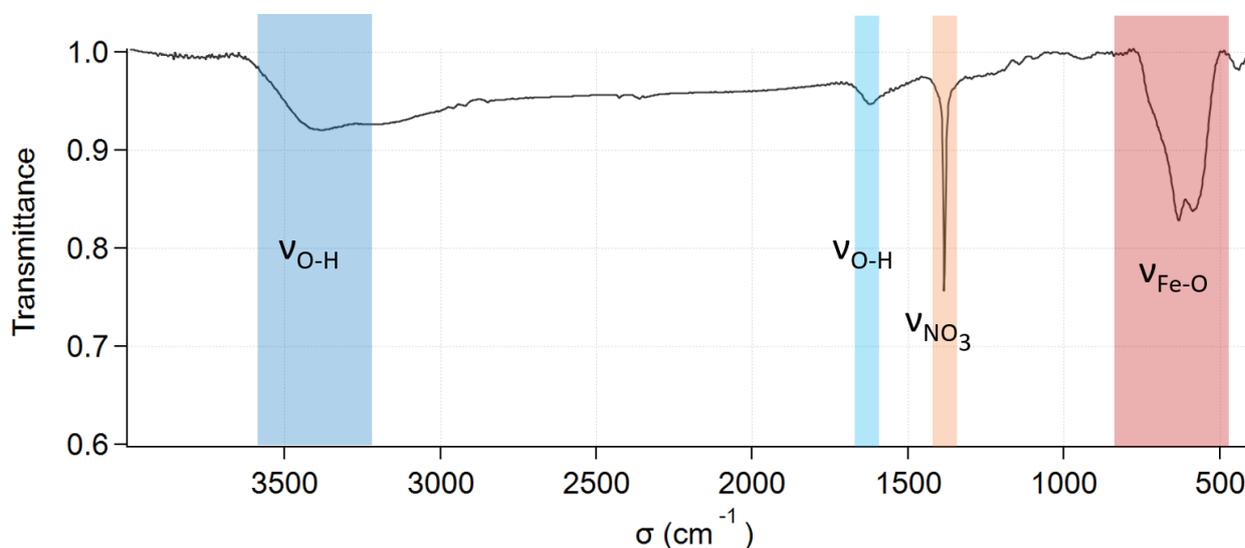


Figure 78 Spectre FTIR des nanoparticules de maghémite stabilisées par l'acide nitrique.

L'analyse thermogravimétrique des particules confirme la présence d'eau adsorbée sur les nanoparticules (**Figure 79**). Après 300°C, la masse de l'échantillon n'évolue plus, indiquant une absence de dégradation au-delà de cette température.

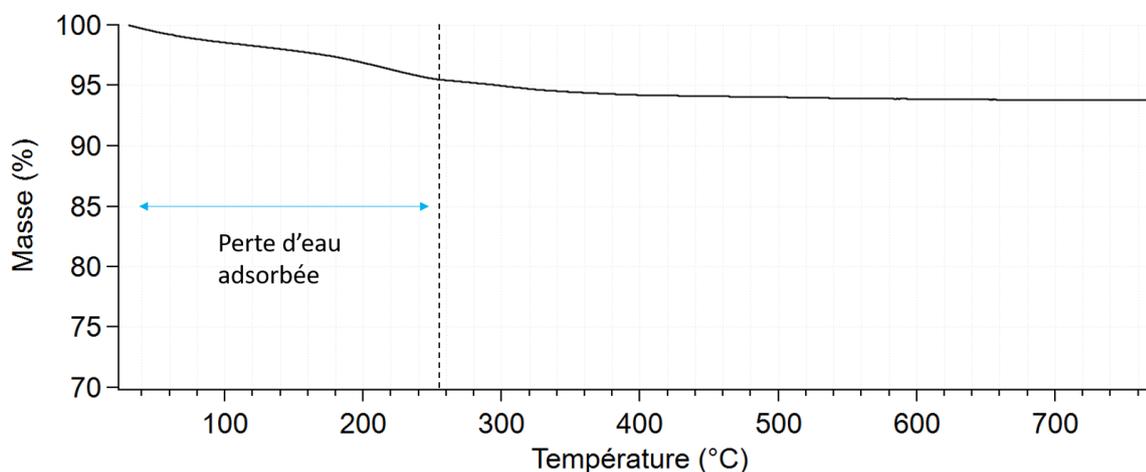


Figure 79 Analyse thermogravimétrique des nanoparticules de maghémite.

La réalisation de courbes d'aimantation sur un magnétomètre en mode échantillon vibrant permet de confirmer que ces nanoparticules sont superparamagnétiques avec un champ coercitif nul. La valeur d'aimantation à saturation  $M_s$  est de 104.5  $\text{emu/g}_{\text{fer}}$ , soit 40.6  $\text{emu/g}_{\text{maghémite}}$  (**Figure 80**).

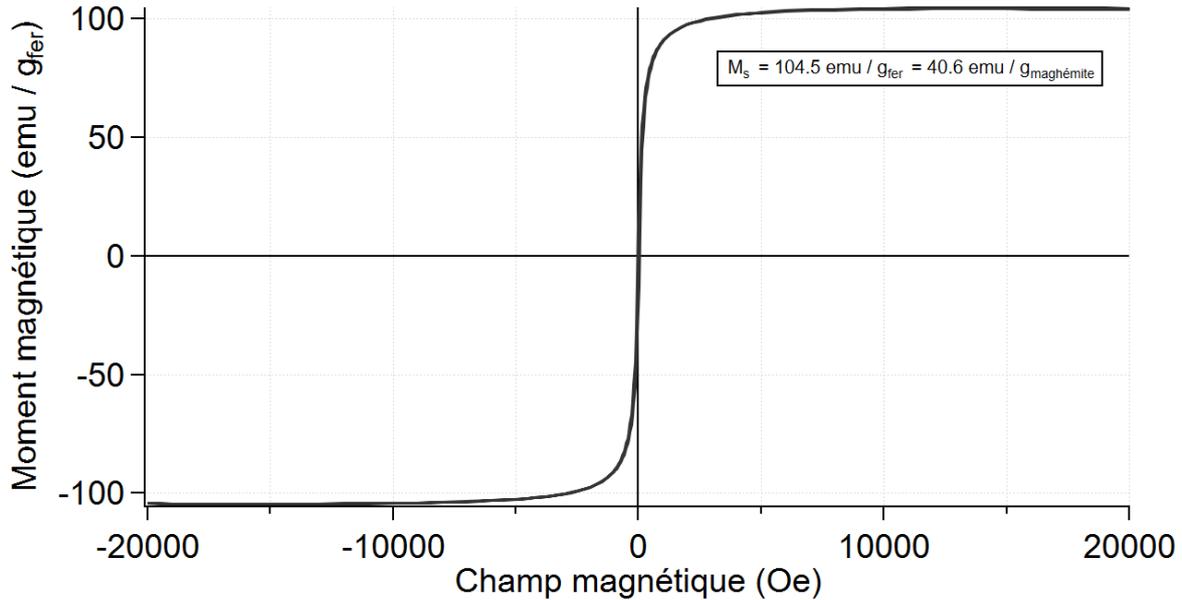


Figure 80 Courbe d'aimantation des nanoparticules de maghémite après correction de la composante diamagnétique et du champ résiduel de la bobine supraconductrice.

Ces nanoparticules sont également capables de dissiper de la puissance sous forme de chaleur lorsqu'un champ magnétique alternatif est appliqué. Plusieurs valeurs de fréquence et de champ magnétique ont été évaluées (voir l'Annexe « **Mesure du pouvoir chauffant** » page 170) et l'échauffement maximal sur l'appareil utilisé a été obtenu à une fréquence de 776 kHz et de 300 Gauss.

Le pouvoir chauffant des nanoparticules, noté SLP, pour *specific loss power*, en W/g, peut être évalué en mesurant l'élévation de température au cours du temps. Dans l'objectif de comparer qualitativement des échantillons, une méthode simple mais efficace a été développée. Elle consiste, en partant d'un échantillon à une température donnée, à appliquer le champ magnétique alternatif jusqu'à atteindre une température fixée. Pendant l'application du champ magnétique alternatif la température varie linéairement avec une pente proportionnelle au pouvoir chauffant. En effectuant l'approximation que le système, constitué de l'échantillon, est adiabatique, d'après les lois de la thermodynamique on peut écrire l'équation (1). En conditions diluées, on approxime la capacité thermique massique de l'échantillon par celle de l'eau notée  $C_{eau}$ .

$$SLP \approx \frac{m_{\text{échantillon}} C_{\text{eau}} \Delta T}{m_{\text{maghémite}} \Delta t} \quad (\text{en } W/g_{\text{maghémite}}) \quad (1)$$

Pour obtenir une valeur de SLP la plus pertinente possible, l'approximation linéaire est réalisée sur 3 cycles d'application du champ magnétique alternatif (**Figure 81**).

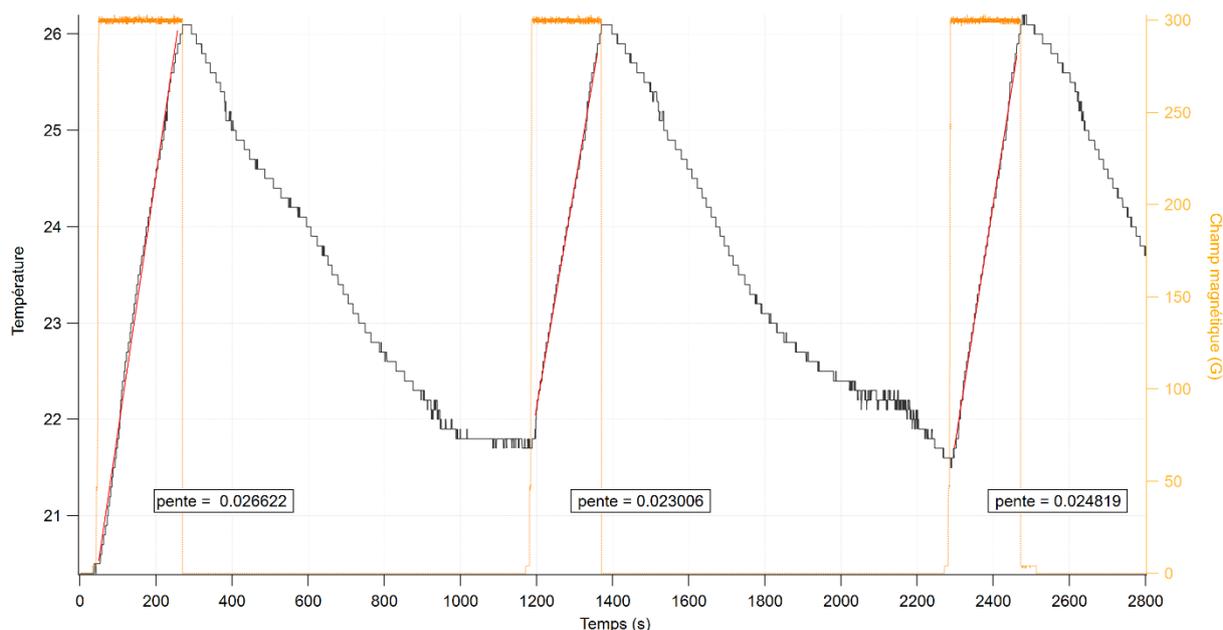


Figure 81 Un champ magnétique alternatif, indiqué par la courbe jaune, est appliqué sur 3 périodes, jusqu'à ce qu'une température de 26°C soit atteinte. Entre chaque application du champ, le système est refroidi. Une modélisation linéaire (en rouge) est effectuée sur la phase de chauffage pour chacun des cycles (pente en C°/s).

Après soustraction de la pente obtenue pour un échantillon d'eau distillée sans particules magnétiques, correspondant au chauffage du système par la bobine, on obtient une SLP de  $547 \pm 47 \text{ W/g}_{\text{fer}}$  soit  $214 \pm 17 \text{ W/g}_{\text{imaghémite}}$ .

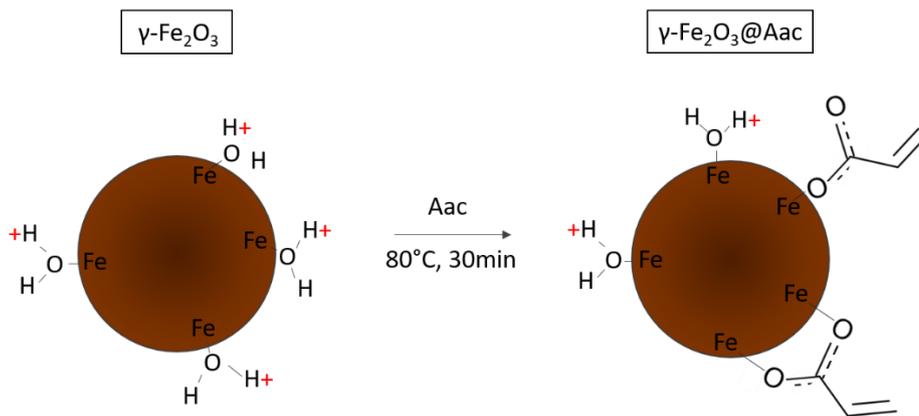
Cette valeur dépend de la taille des nanoparticules, de la valeur du champ magnétique et de la fréquence utilisée, de l'appareil utilisé et du mode de calcul, il est donc difficile de la comparer à des valeurs issues de la littérature.

Les valeurs de champ magnétique et de fréquence utilisés ici ne permettent pas de vérifier le critère d'acceptabilité biologique discuté dans le Chapitre 1 en partie **IV** ( $H \cdot f < 5 \cdot 10^9 \text{ A.m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Ces valeurs ont été choisies car elles permettent d'obtenir des courbes de meilleure qualité qui permettront, par la suite, de comparer plusieurs échantillons entre eux de façon plus précise. Un échauffement macroscopique a néanmoins pu être obtenu avec une fréquence de 147Khz et un champ magnétique de 300G, dont le produit vaut  $3.5 \cdot 10^9 \text{ A.m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , ce qui suggère que ces conditions permettent à minima un échauffement local et pourraient être utilisés pour le relargage de molécules thérapeutiques *in vivo*.

## II. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques par polymérisation par amorçage RedOx

### 1. Fonctionnalisation acide acrylique

Au laboratoire, une fonctionnalisation couramment utilisée est celle du citrate, qui permet une stabilisation des nanoparticules aux pH physiologiques en les rendant chargées. Pour une fonctionnalisation optimale du citrate, un ratio molaire citrate/Fer de 0.13 ainsi qu'un chauffage à plus de 80°C pendant une trentaine de minutes sont nécessaires. Afin d'obtenir des particules présentant une fonction vinyle à leur surface, un protocole similaire a été utilisé pour faciliter l'adsorption de molécules d'acide acrylique (Aac), via leur fonction acide carboxylique, à la surface des nanoparticules. En effet, les atomes de fer à la surface des nanoparticules présentent des lacunes électroniques leur permettant de complexer des molécules comme l'eau ou des acides carboxyliques (**Figure 82**).



*Figure 82 Principe de la fonctionnalisation par l'acide acrylique. Plusieurs modes d'adsorptions sont possibles, la configuration réelle des molécules d'Aac à la surface des nanoparticules est inconnue.*

On remarque néanmoins que théoriquement, plus les particules présenteront d'Aac à leur surface, moins elles seront chargées et donc moins elles seront stables d'un point de vue colloïdal. Il est donc essentiel de trouver la bonne quantité d'Aac pour obtenir le meilleur couplage polymère/maghémite tout en maintenant une bonne stabilité colloïdale.

Plusieurs conditions ont donc été étudiées et sont résumées dans le **Tableau 11**.

Tableau 11 Ratios molaire acide acrylique / Fer utilisés.

Nom	Aac 0.5%	Aac 2%	Aac 5%
Ratio molaire Aac/Fe	0.13	0.52	1.3

Le volume d'acide acrylique correspondant aux conditions choisies est ajouté aux nanoparticules magnétiques et après sonication, les solutions sont chauffées. Au bout de quelques minutes, l'échantillon contenant 5%v/v d'acide acrylique devient marron clair (la solution se trouble). A l'issue des lavages, l'échantillon contenant 5%v/v d'acide acrylique reprend son aspect initial. Il est possible qu'une trop grande quantité d'acide acrylique ait déstabilisée les nanoparticules et que l'adsorption soit réversible.

Des particules nues, notées Aac 0% ont également subi les étapes de chauffage et de lavage et permettent d'évaluer l'impact de la fonctionnalisation. La taille des nanoparticules après fonctionnalisation ainsi que leur potentiel Zeta sont mesurés sur un Zetasizer Malvern. Dans la **Figure 83**, le diamètre hydrodynamique des particules varie peu en fonction de la quantité d'Aac utilisée et il n'y a pas de phénomène d'agré- gation des particules.

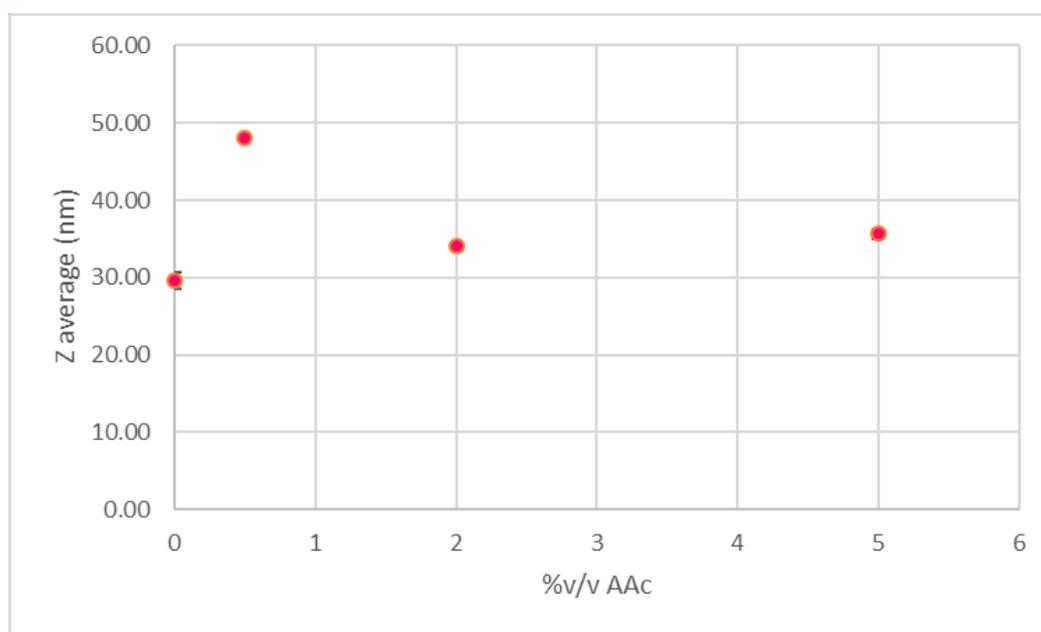


Figure 83 Mesure par DLS du Z-average en fonction de la quantité d'acide acrylique utilisée pour la fonctionnalisation.

En revanche, des résultats contredisant l'hypothèse que l'Aac contribue à diminuer la charge de surface des particules ont été obtenus en zétamétrie (**Figure 84**). Ces différences peuvent être dues à une modification du contenu de la couche de solvation en contre-ions. La zétamétrie est également reconnue pour sa faible fiabilité.

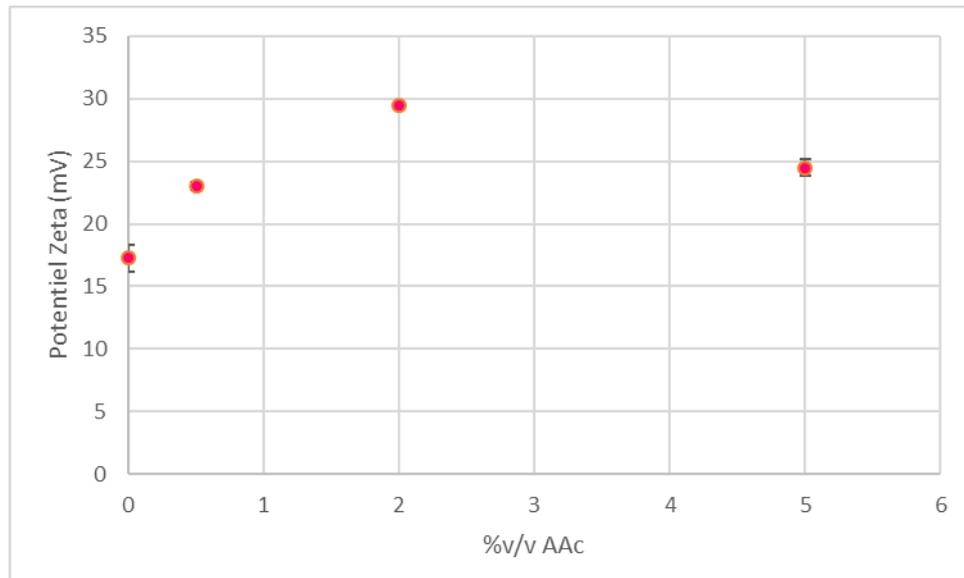


Figure 84 Variation du potentiel Zeta en fonction de la quantité d'acide acrylique utilisée pour la fonctionnalisation.

La confirmation d'une fonctionnalisation effective est apportée par l'analyse des spectres FTIR des nanoparticules (**Figure 85**) avec l'apparition de bandes associées aux liaisons C-H vers  $2900\text{ cm}^{-1}$  et un renforcement de la bande vers  $1650\text{ cm}^{-1}$  pouvant cette fois être associée aux vibrations d'élongation des liaisons C-O.

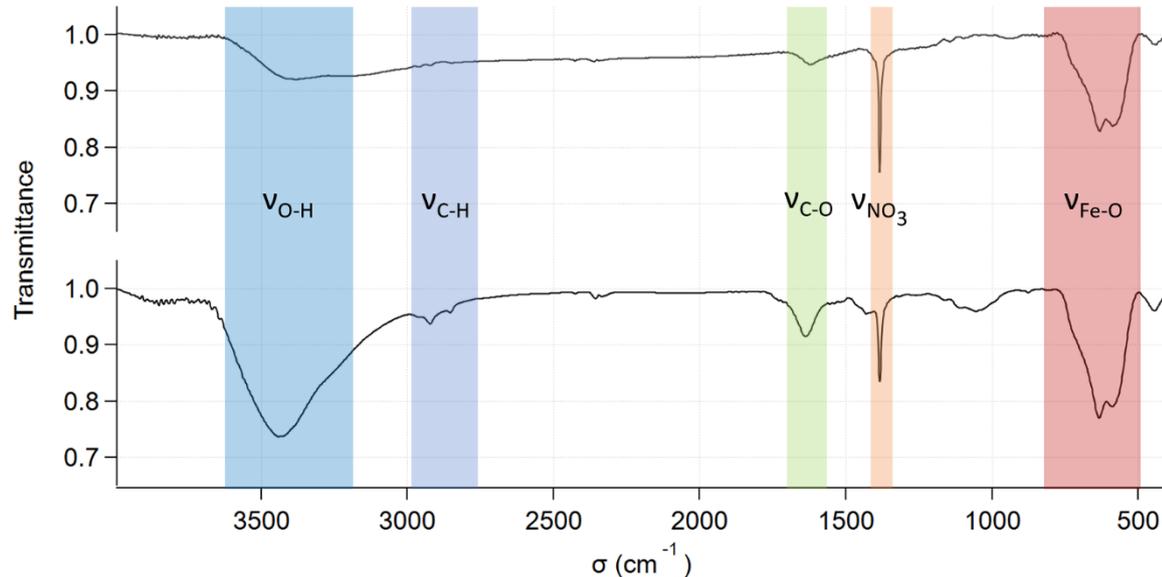


Figure 85 Spectre FTIR des nanoparticules nues (en haut) et de particules fonctionnalisées avec 5% d'acide acrylique.

Il est important de noter que comme les nanoparticules nues, les particules fonctionnalisées sont stables lorsque le pH est inférieur à 6 (**Figure 86**).

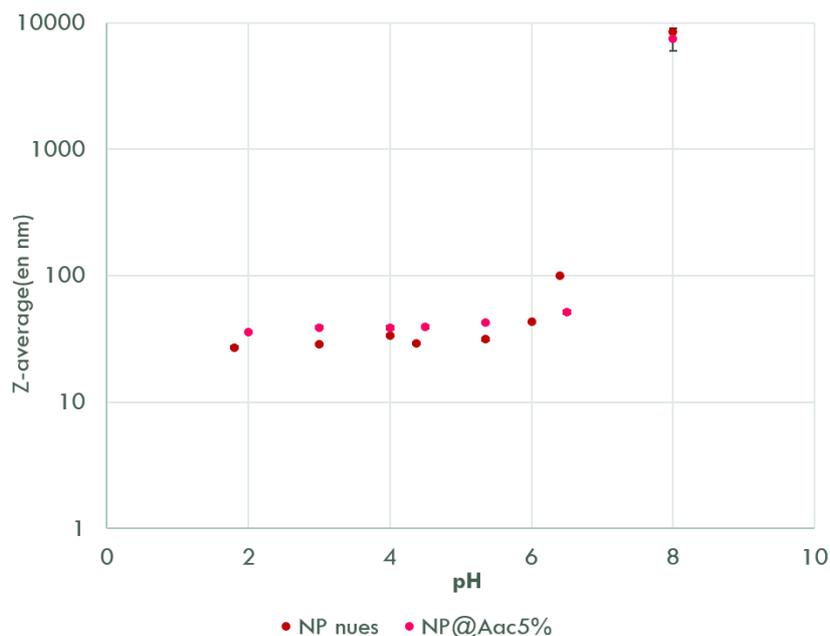


Figure 86 Mesure du diamètre hydrodynamique des particules en fonction du pH, avec et sans fonctionnalisation avec l'Aac.

## 2. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques non-fluorescentes

Afin d'évaluer la possibilité de synthétiser des nanoparticules de type cœur-coquille en conditions diluées, nous avons dans un premier temps choisi un système persulfate d'ammonium (APS)/tétraméthyléthylènediamine (TEMED) pour sa simplicité de mise en œuvre. Les radicaux libres sont produits par la décomposition de l'APS et la réaction de polymérisation est catalysée par la présence de TEMED. Une proposition de mécanisme d'amorçage et de propagation pour ce système dans le cas de la polymérisation d'acrylamide est présentée **Figure 87**.

L'activation de la polymérisation en présence d'une forte concentration de monomères forme des gels. Le mélange AM/BIS amorcé par APS/ TEMED est d'ailleurs très utilisé par les biologistes puisqu'il permet de réaliser des gels utilisables pour séparer des protéines par électrophorèse. Ici l'utilisation d'une solution diluée de monomères permet d'éviter l'obtention des gels et la présence d'une fonction vinyle à la surface des nanoparticules de maghémite permet la croissance de chaînes de polymère directement sur les particules.

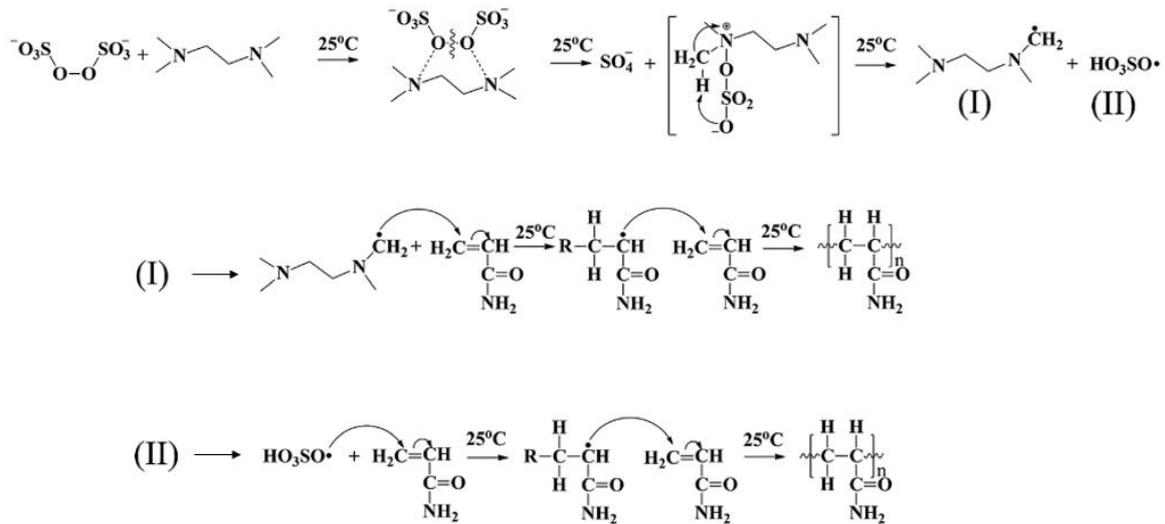


Figure 87 Proposition de mécanisme d'initiation RedOx avec ammonium persulfate et TEMED pour la polymérisation d'acrylamide, adapté de <sup>179</sup>.

La polymérisation a été effectuée à partir de nanoparticules préparées précédemment à partir de 0%, 0.5%, 2% et 5%v/v d'acide acrylique. Pour cela, les nanoparticules ont été soniquées avant d'être dispersées dans de l'eau distillée contenant de l'AM et du BIS. Puis les solutions ont été purgées sous azote avant l'ajout du TEMED et de l'APS. Après une heure de polymérisation, les échantillons sont mis en dialyse pour être purifiés. L'aspect des échantillons est présenté Figure 88.

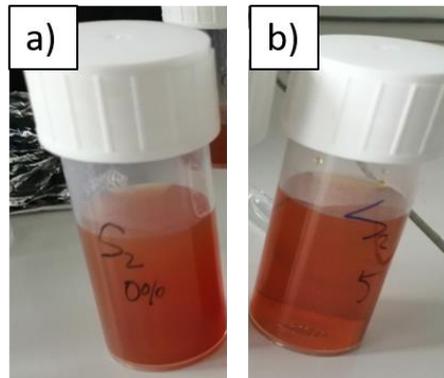


Figure 88 Aspect des échantillons après polymérisation et dialyse, obtenus à partir de particules nues (a) et fonctionnalisées avec 5% d'Aac (b).

La distribution du diamètre hydrodynamique des nanoparticules de polymère est présentée **Figure 89**. Les échantillons préparés avec des nanoparticules de maghémite pas ou peu fonctionnalisées (0.5%) contiennent des particules de grande taille et une forte dispersion en taille.

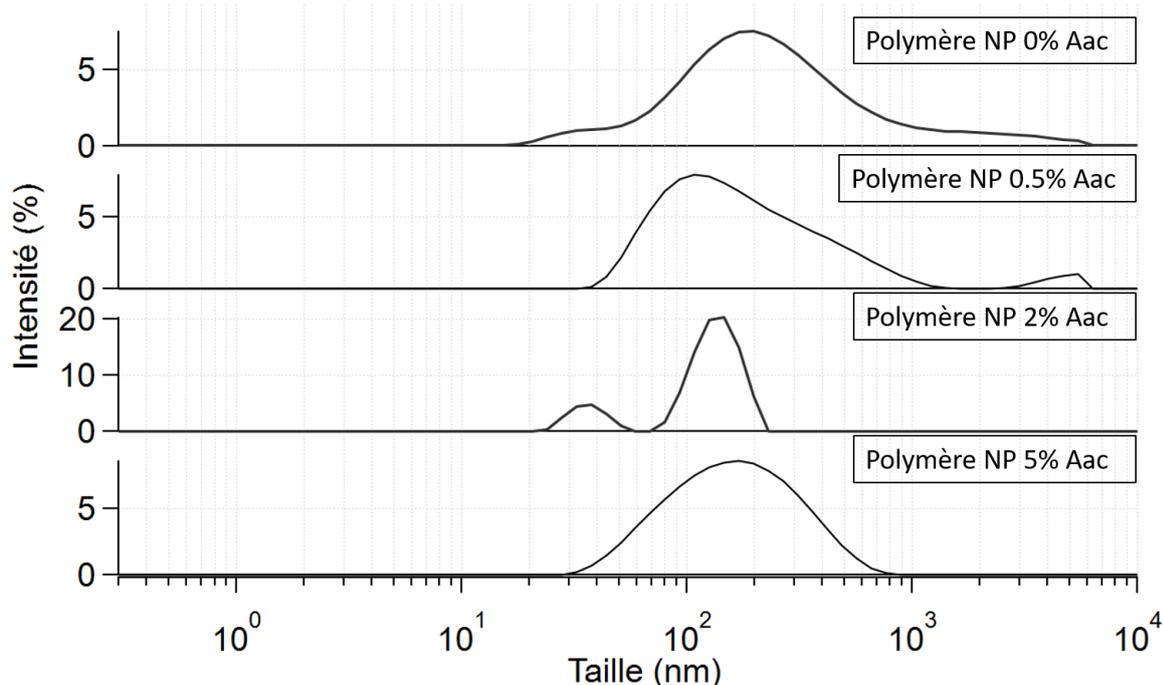


Figure 89 Distribution en taille des nanoparticules hybrides obtenues à partir de nanoparticules fonctionnalisées avec différentes quantités d'acide acrylique (%v/v).

Les polymères magnétiques préparés à partir de nanoparticules fonctionnalisées avec 2% ou 5% d'acide acrylique présentent des morphologies de type cœur-coquille comme illustré en **Figure 90**.

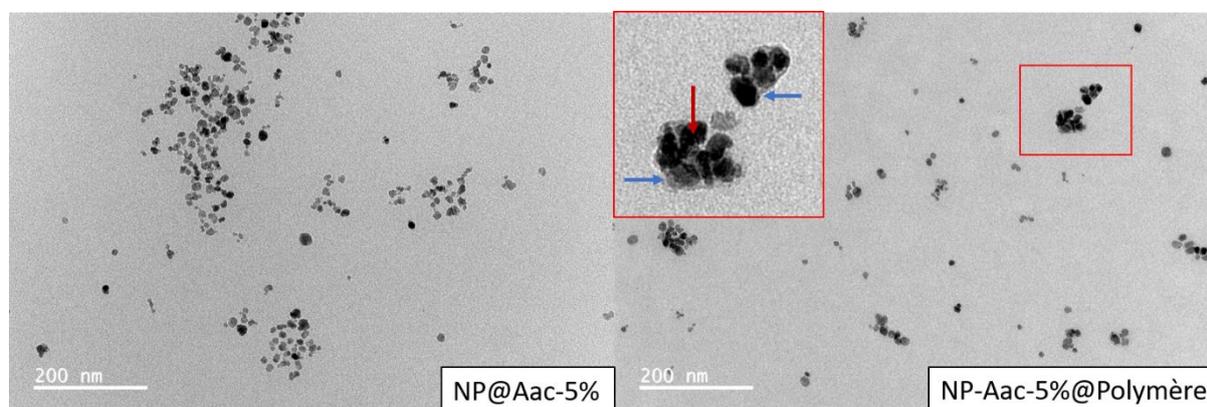


Figure 90 Images de microscopie électronique. À gauche, les nanoparticules de maghémite fonctionnalisées à partir de 5%v/v d'Aac. À droite, ces nanoparticules après polymérisation. Les flèches bleues pointent la couche de polymère et les marrons les nanoparticules de maghémite.

En l'absence de préfonctionnalisation avec l'Aac, les nanoparticules ne présentent pas de polymère ou sont au contraire agrégées en grand nombre dans une particule de polymère (**Figure 91**).

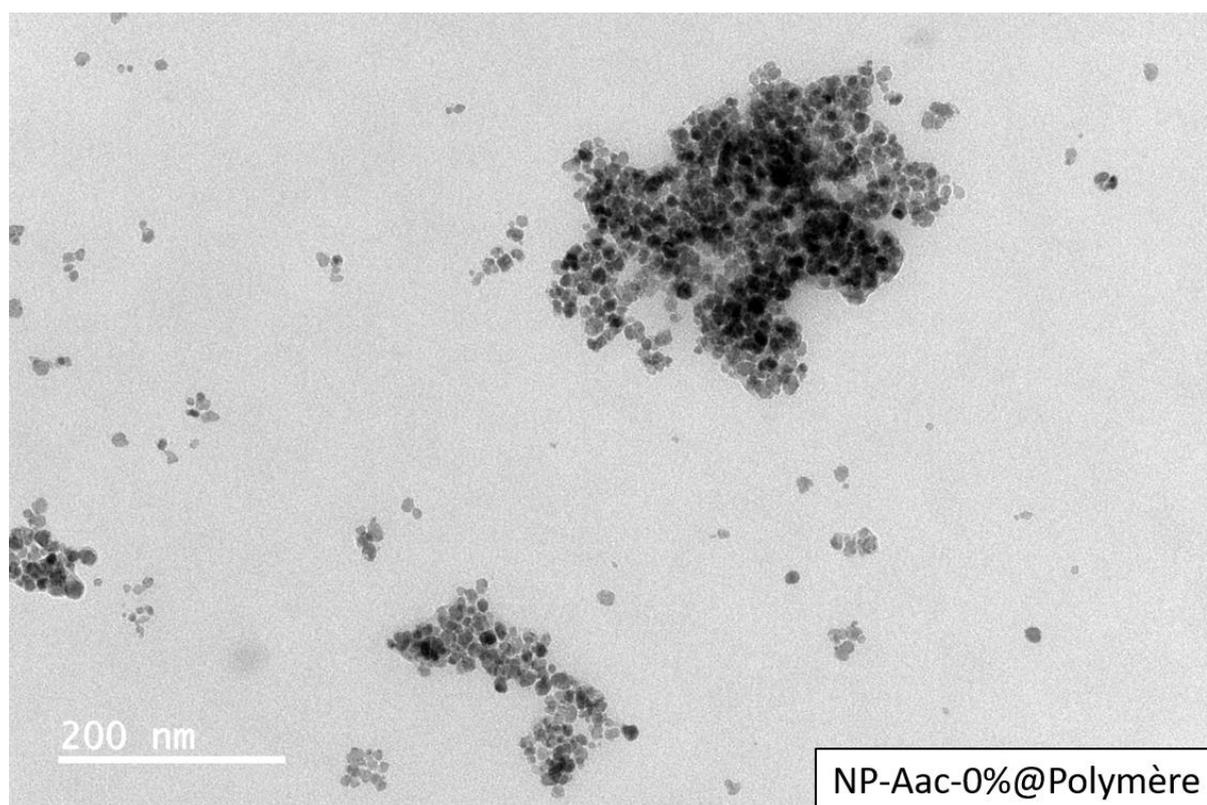


Figure 91 Images de microscopie électronique des nanoparticules obtenues après polymérisation en l'absence de fonctionnalisation par l'acide acrylique.

### 3. Incorporation du monomère fluorescent

Dans le but d'obtenir des nanoparticules magnétiques stables et les plus fluorescentes possibles, la synthèse précédente a été reprise avec une gamme de monomère ArtRhod avec l'ajout dans le mélange réactionnel de 0.023  $\mu\text{mol}$ , 0.56  $\mu\text{mol}$ , 1.15  $\mu\text{mol}$ , 2.3  $\mu\text{mol}$  ou 5.75  $\mu\text{mol}$  d'acryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B (**Figure 92**).

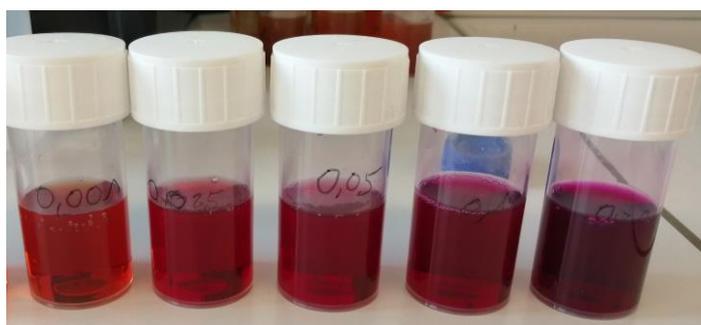


Figure 92 Mélanges réactionnels avant ajout d'APS et de TEMED. De gauche à droite : 0.023  $\mu\text{mol}$ , 0.56  $\mu\text{mol}$ , 1.15  $\mu\text{mol}$ , 2.3  $\mu\text{mol}$  ou 5.75  $\mu\text{mol}$  d'acryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B.

Après dégazage sous azote et ajout de l'APS et du TEMED, une grande quantité de polymère se forme. Il s'agit de particules de grande taille qui s'agrègent

immédiatement (**Figure 93**), y compris lorsque la concentration en ArtRhod est si faible que sa fluorescence est à peine détectable.



*Figure 93 Aspect des échantillons après amorçage de la polymérisation. De gauche à droite : 0.023  $\mu\text{mol}$ , 0.56  $\mu\text{mol}$ , 1.15  $\mu\text{mol}$ , 2.3  $\mu\text{mol}$  ou 5.75  $\mu\text{mol}$  d'acryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B.*

Les particules ainsi formées ont néanmoins bien intégré les nanoparticules de maghémite comme en atteste la **Figure 94**.



*Figure 94 Aspect des particules en présence d'un aimant. Les particules formées de cette façon sont de taille macroscopique mais les particules magnétiques sont bien intégrées dans la matrice de polymère ce qui les rend très magnétiques.*

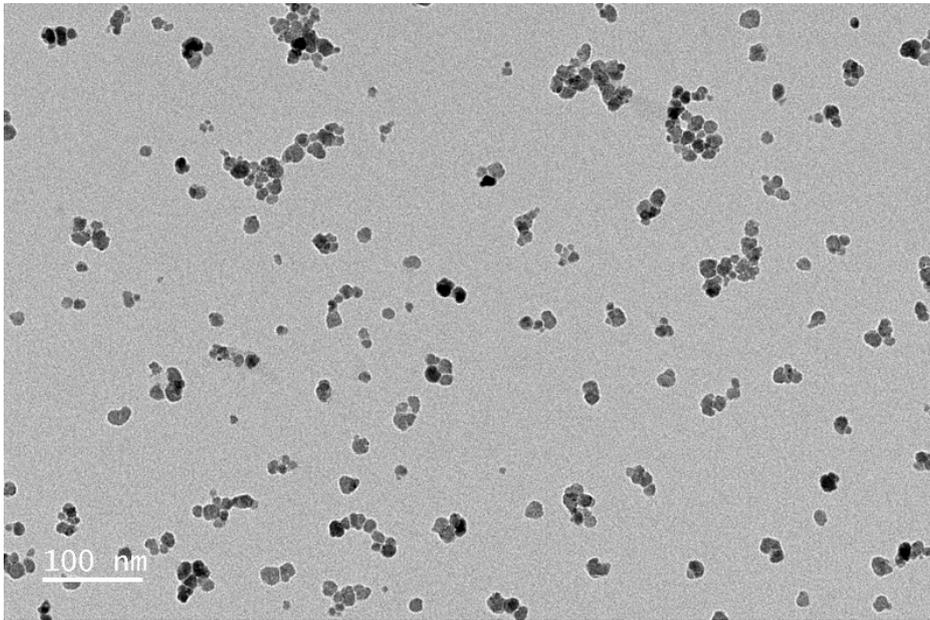
#### 4. Conclusion

Il est possible de réaliser des nanoparticules de type cœur-coquille à partir de nanoparticules de maghémite fonctionnalisées par de l'acide acrylique. Cependant, l'ajout du monomère ArtRhod, y compris dans des proportions très faibles, ne permet plus d'obtenir ces particules. D'autres essais ont été réalisés en diminuant la quantité de monomères utilisés ou en intégrant un monomère chargé, le (N-3-aminopropyl)méthacrylamide), sans que cela ne diminue la taille des agrégats formés. Il est possible que ce phénomène soit dû à l'hydrophobicité du monomère rhodamine, la faible stabilité des nanoparticules en milieu faiblement acide ou plus probablement une combinaison des deux.

### III. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques par photopolymérisation de type II

#### 1. Fonctionnalisation acide acrylique

Comme pour la synthèse de nanoparticules hybrides par amorçage RedOx, les nanoparticules sont fonctionnalisées avec de l'acide acrylique. Au vu des résultats précédents, c'est un ratio molaire Aac/Fer de 0.78 qui a été choisi. Une image de microscopie électronique des nanoparticules fonctionnalisées est présentée **Figure 95**. Le diamètre de 210 particules a été mesuré sur ces images, la distribution de ces diamètres est présentée **Figure 96**.



*Figure 95 Image TEM des particules de maghémite fonctionnalisées avec de l'acide acrylique (3%).*

La présence de l'acide acrylique n'est pas visible sur les images de microscopie électronique. L'augmentation du diamètre hydrodynamique moyen au niveau de la distribution des nanoparticules est très probablement dû aux lavages, qui jouent le rôle d'un second tri : les plus petites particules ont été éliminées lors des lavages ce qui conduit à une augmentation du diamètre moyen et à une diminution de la polydispersité.

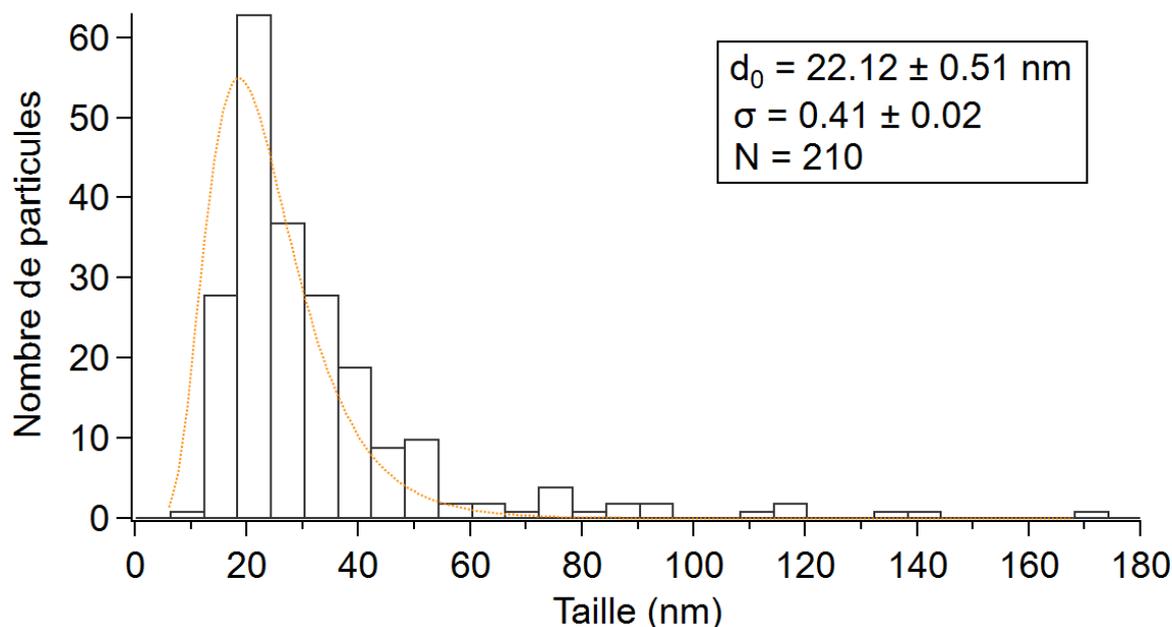


Figure 96 Distribution en taille obtenue par comptage de 210 nanoparticules de maghémite fonctionnalisées avec l'acide acrylique. Les particules ont un diamètre moyen de 22 nm et une polydispersité de 0.41.

## 2. Fonctionnalisation par une couche de polymère fluorescent

Dans le chapitre précédent, il a été montré qu'il était possible de synthétiser des nanoparticules de polymère par photopolymérisation de type II en utilisant le couple Rhodamine B/ Benzophénone pour l'amorçage. La partie précédente a permis d'illustrer la possibilité de réaliser des particules de type cœur-coquille en fonctionnalisant les nanoparticules de maghémite avec de l'acide acrylique mais que l'intégration du monomère fluorescent ne permettait pas d'obtenir des nanoparticules de petite taille. Dans cette partie, la combinaison de ces deux approches sera donc explorée en mettant l'accent sur l'influence de la concentration en monomères sur les propriétés des particules synthétisées. Les échantillons seront donc identifiés par leur ratio molaire [Fer : monomères] obtenu à partir du dosage du Fer dans les nanoparticules de maghémite fonctionnalisées par l'acide acrylique et de la quantité molaire totale des monomères utilisés : [1 :48], [1.72] et [1 :96].

Le mélange réactionnel est donc composé de nanoparticules de maghémite fonctionnalisées avec de l'acide acrylique, d'acrylamide, de BIS, de benzophénone et de rhodamine B. Les flacons sont placés horizontalement sur les rouleaux d'un agitateur orbitalaire (200 rpm) et irradiés par des UV à 365 nm pendant 3h (**Figure 97**). L'évolution de la taille des nanoparticules est évaluée qualitativement à l'aide de l'appareil de DLS *in situ* Vasco Kin.

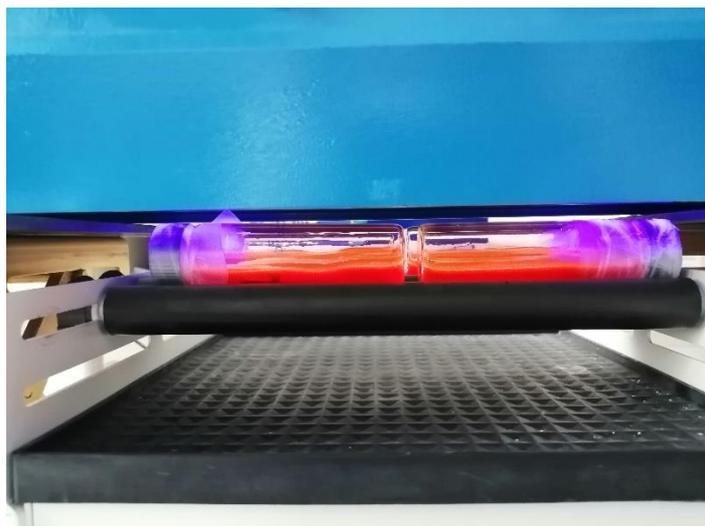


Figure 97 Configuration expérimentale lors de l'étape de polymérisation

Les échantillons ainsi obtenus sont dialysés dans de l'eau distillée pour éliminer les réactifs en excès avant d'être caractérisés. Les échantillons avant polymérisation, après polymérisation et après dialyse sont présentés **Figure 98**.

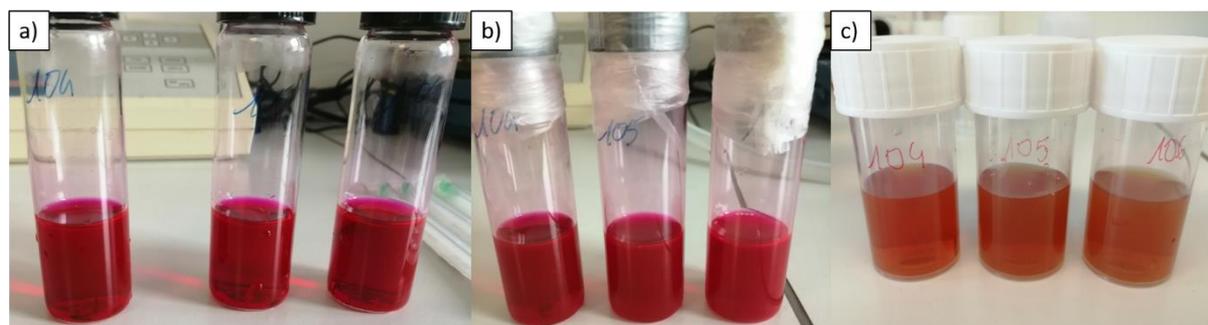


Figure 98 a) de gauche à droite, [1:48],[1:72] et [1:96], avant polymérisation, (b) après polymérisation, (c) après dialyse.

### 3. Caractérisation

Le suivi de l'évolution des données de corrélation en cours de synthèse indique une évolution rapide des particules sur l'ensemble des échantillons suivie d'une absence d'évolution au-delà de 80 minutes de polymérisation (**Figure 99**).

La taille des nanoparticules augmente, mais cette caractérisation ne permet pas de déterminer si cela est dû à une couche de polymère ou à une agrégation des nanoparticules magnétiques. L'évolution en taille obtenue pour l'échantillon [1 : 96] est présentée **Figure 100** à titre indicatif. En effet les mesures de taille par DLS sont sensibles à la température, et la température exacte à l'intérieur du flacon n'est pas connue car il n'est pas possible d'y mettre la sonde de température. Ces mesures peuvent donc être utilisées pour refléter l'évolution du diamètre hydrodynamique des nanoparticules mais pas pour déterminer leur taille absolue.

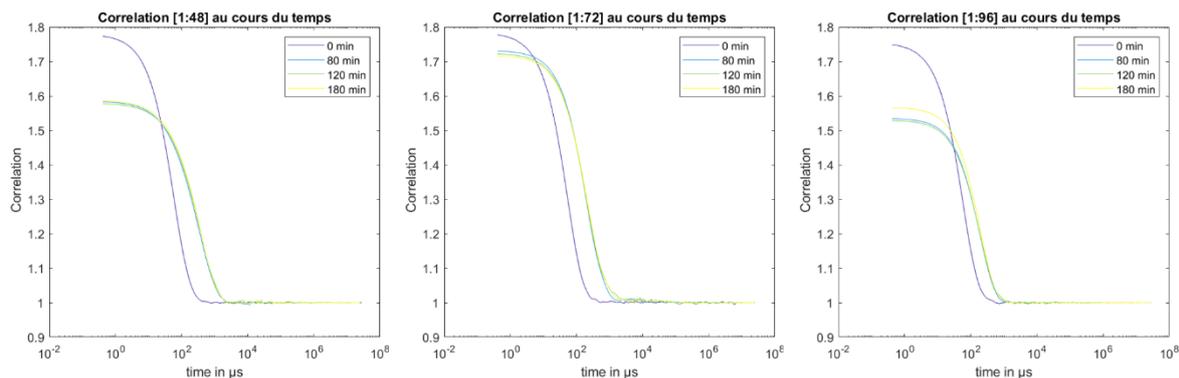


Figure 99 Evolution de la fonction de corrélation au cours du temps réactionnels pour les échantillons [1 :48], [1.72] et [1 :96].

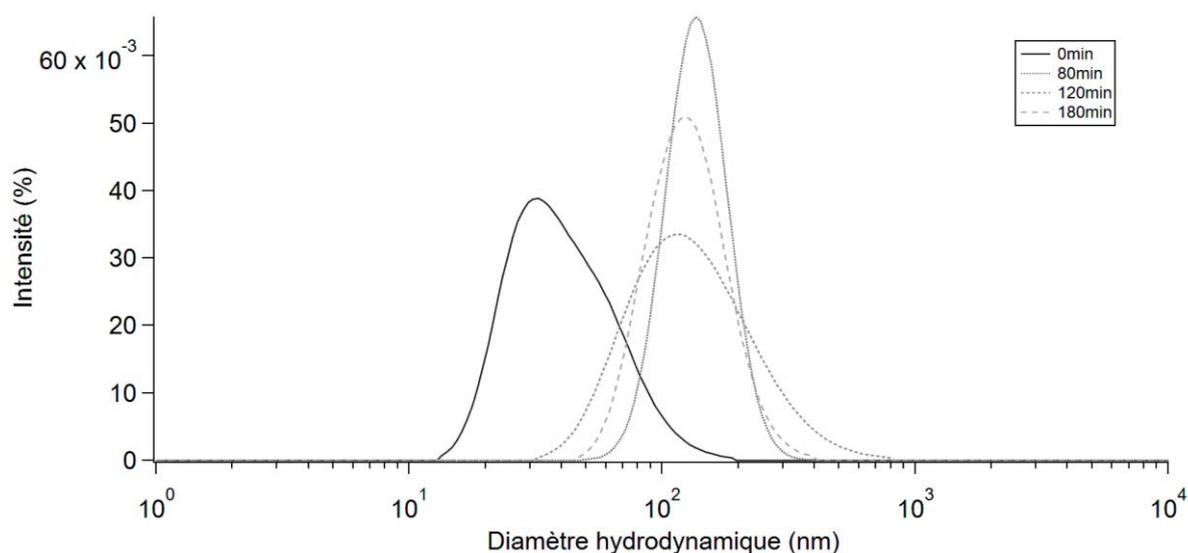


Figure 100 Evolution du diamètre hydrodynamique des nanoparticules modélisée à partir des fonctions de corrélation mesurées.

La présence de polymère est en revanche attestée pas la spectroscopie infrarouge après purification de l'échantillon en Figure 101. On retrouve en particulier des bandes caractéristiques des élongations des liaisons N-H, C-H et C=O, respectivement, de 3400 à 3500  $\text{cm}^{-1}$ , de 2840 à 3000  $\text{cm}^{-1}$  et à 1690  $\text{cm}^{-1}$  déjà observées dans la **Figure 41** au Chapitre 2, page 73.

La réalisation de clichés de microscopie électronique permet de visualiser la présence de polymère à la surface des nanoparticules. Pour l'échantillon [1 :48], la couche de polymère est fine et elle est parfois difficile à observer, en particulier en raison du faible contraste entre le polymère et le carbone de la grille (**Figure 102**). Par rapport aux particules fonctionnalisées à l'Aac, le diamètre moyen des particules ainsi que la polydispersité semblent avoir augmenté : on retrouve un nombre plus important de particules groupées.

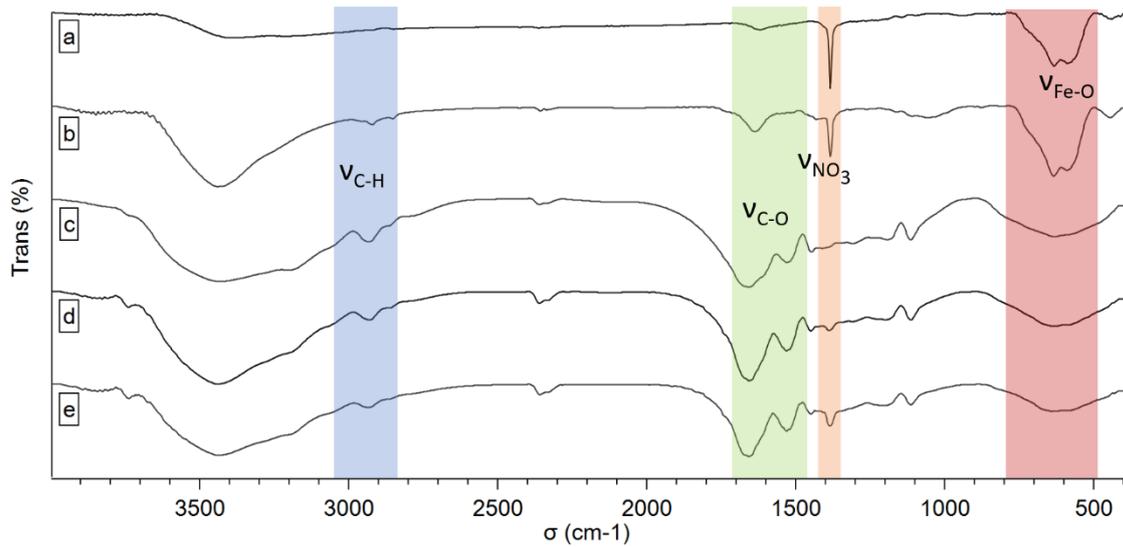


Figure 101 Spectre FTIR (a) nanoparticules de maghémite, (b) nanoparticules de maghémite fonctionnalisées avec l'acide acrylique, (c), (d) et (e), respectivement, les échantillons [1 : 48], [1 : 72] et [1 : 96].

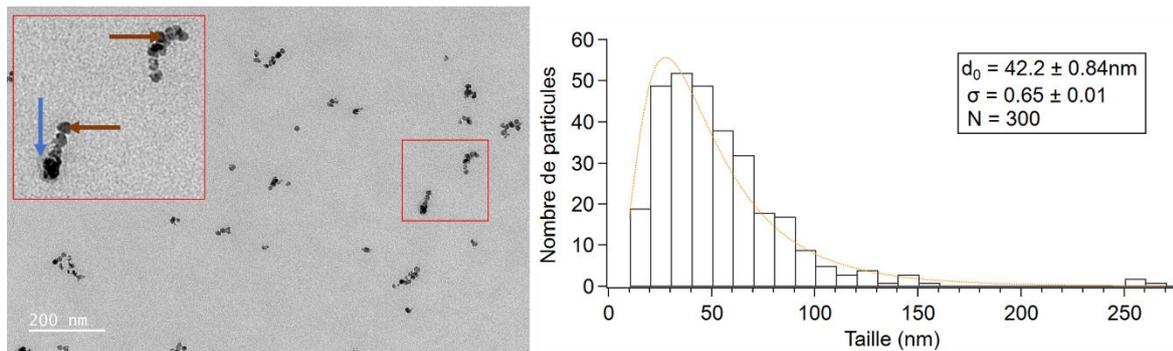


Figure 102 Image TEM représentative de l'échantillon [1 : 48] et histogramme illustrant la répartition en taille des nanoparticules obtenue par comptage sur 300 particules. Les particules ont un diamètre moyen de 42 nm et une polydispersité de 0.65. Les flèches de couleur marron pointent les nanoparticules de maghémite, les flèches bleues le polymère visible.

Pour les échantillons [1 : 72] et [1 : 96], la couche de polymère semble plus facile à discerner et est donc vraisemblablement plus épaisse (**Figure 103** et **Figure 104**). Les particules ainsi formées sont de taille plus importante mais cela est plutôt dû à un nombre plus important de nanoparticules de maghémite par particule hybride.

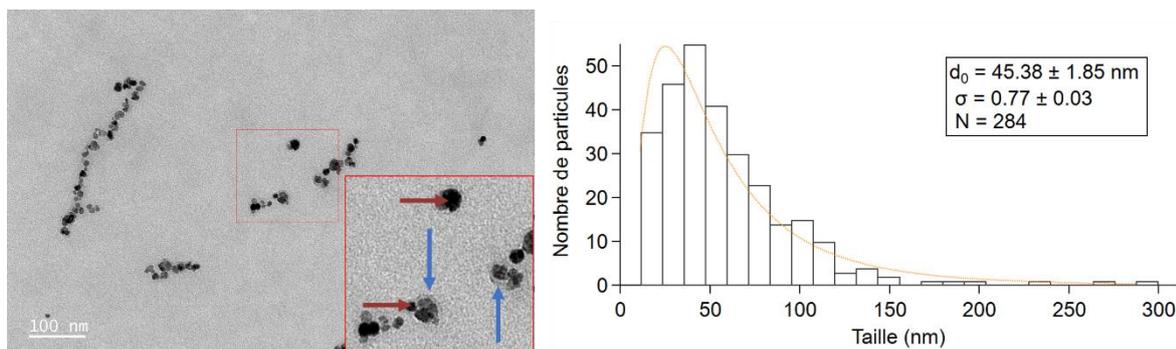


Figure 103 Image TEM représentative de l'échantillon [1 : 72] et histogramme illustrant la répartition en taille des nanoparticules obtenue par comptage sur 284 particules. Les particules ont un diamètre moyen de 45 nm et une polydispersité de 0.77. Les flèches de couleur marron pointent les nanoparticules de maghémite, les flèches bleues le polymère visible.

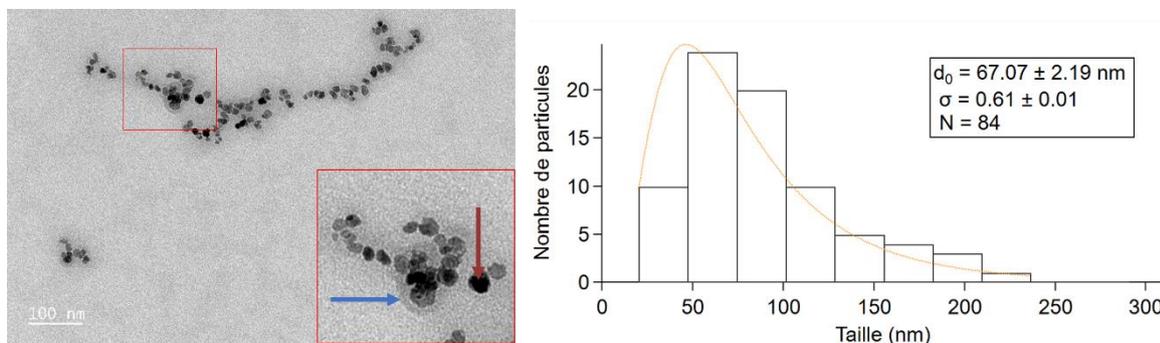


Figure 104 Image TEM représentative de l'échantillon "106" et histogramme illustrant la répartition en taille des nanoparticules obtenue par comptage sur 84 particules seulement, les images ne contenant qu'un faible nombre d'objets. Les particules ont un diamètre moyen de 67 nm et une polydispersité de 0.61. Les flèches de couleur marron pointent les nanoparticules de maghémite, les flèches bleues le polymère visible.

Toutefois, contrairement à la tendance indiquée par les images de microscopie électronique, une concentration plus importante en monomères ne permet pas de produire une plus grande quantité de polymère. Un premier élément en faveur de ce résultat est la concentration massique des échantillons obtenue en séchant un volume connu d'échantillon ainsi que le rendement de la polymérisation obtenu à partir de cette valeur (**Tableau 12**).

Tableau 12 Concentration et rendement de polymérisation des échantillons [1 : 48], [1 : 72] et [1 : 96].

Echantillon	[1 : 48]	[1 : 72]	[1 : 96]
Concentration (mg/mL)	9.2	3.5	2.2
Rendement (%) <sup>*</sup>	74%	19%	8.8%

Plus le mélange réactionnel est concentré en monomères, moins le rendement de la polymérisation est important et plus la quantité de polymère formée est faible. Ce résultat contre-intuitif est confirmé par l'analyse thermogravimétrique des nanoparticules (**Figure 105**).

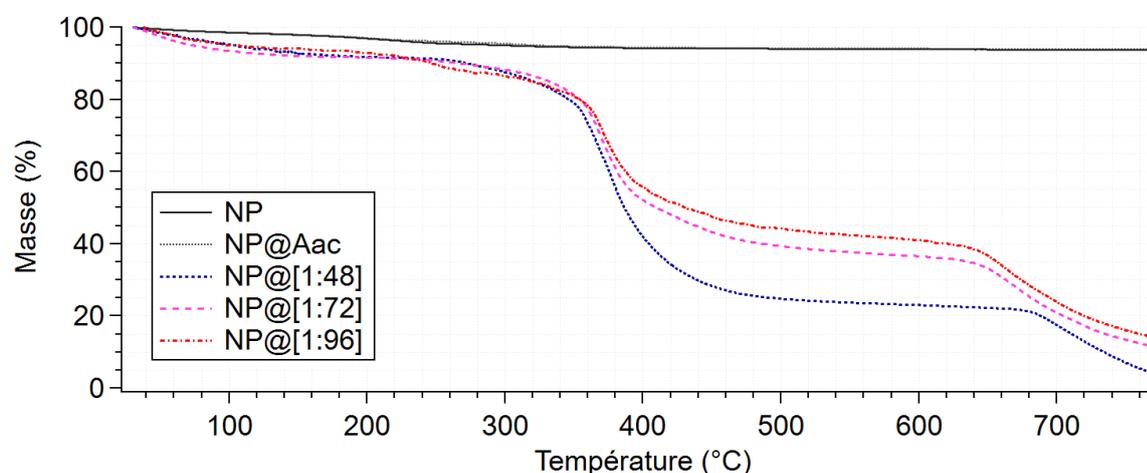


Figure 105 Analyse thermogravimétrique des nanoparticules de maghémite (NP), fonctionnalisées par l'Aac (NP@Aac) et des échantillons [1 : 48], [1 : 72] et [1 : 96].

L'échantillon présentant la perte de masse la plus importante est [1 : 48], il contient donc une fraction massique plus faible de particules magnétiques. Pour une masse sèche donnée, cela signifie donc que l'échantillon [1 : 48] est celui qui contient la plus grande quantité de polymère. On retrouve donc la tendance observée au niveau de la concentration des échantillons et des rendements. Une hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène vis-à-vis des images de microscopie électronique est que la surface de plusieurs nanoparticules isolées est plus importante que la surface d'un agrégat de ces mêmes particules. Il est donc possible que la couche de polymère soit plus épaisse sur [1 : 96] mais que, par particule, la masse de polymère soit plus importante pour l'échantillon [1 : 48].

\* Estimation obtenue en comparant la concentration massique obtenue, déduite de la masse de nanoparticules magnétiques introduites, par rapport à la concentration massique en monomères introduite.

Cette différence se retrouve lorsque la fluorescence de ces échantillons est analysée : [1 : 48] est plus fluorescent que [1 : 72] qui est lui-même plus fluorescent que [1 : 96] lorsqu'un même volume d'échantillon est examiné (**Figure 106**).

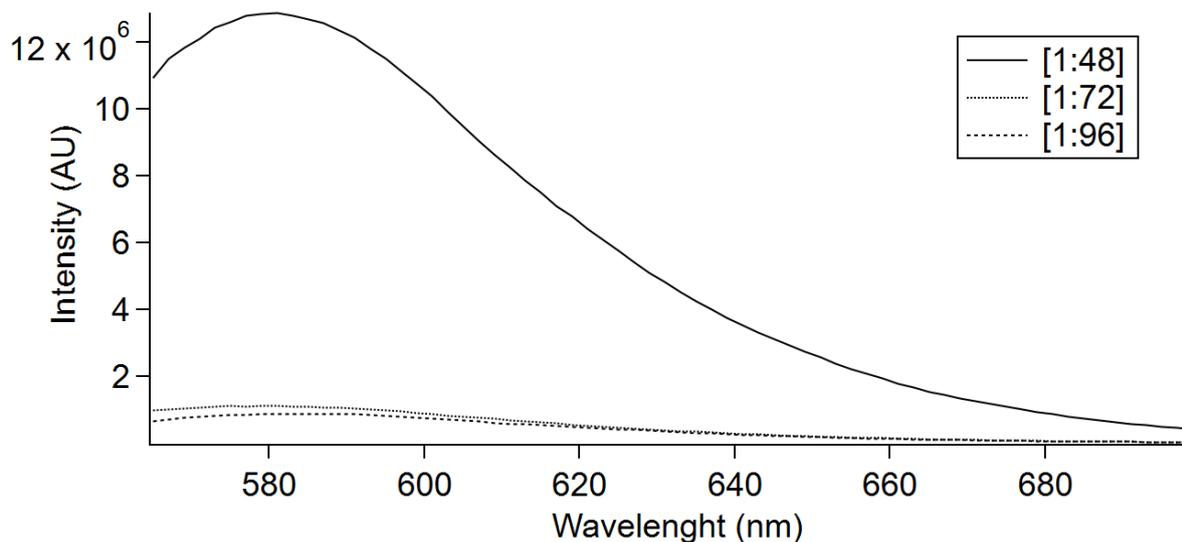


Figure 106 Spectres de fluorescence obtenus pour un même volume d'échantillon brut après excitation à 545 nm.

Lorsque cette fluorescence est normalisée par la concentration en polymère, l'échantillon [1 : 48] reste 4 fois plus fluorescent que les deux autres échantillons (**Figure 107**). Au premier abord contre-intuitif, ce résultat est facilement explicable si l'on considère que la quantité de Rhodamine B par rapport à la quantité de monomère est nettement supérieure pour l'échantillon [1 : 48] que pour [1 : 96].

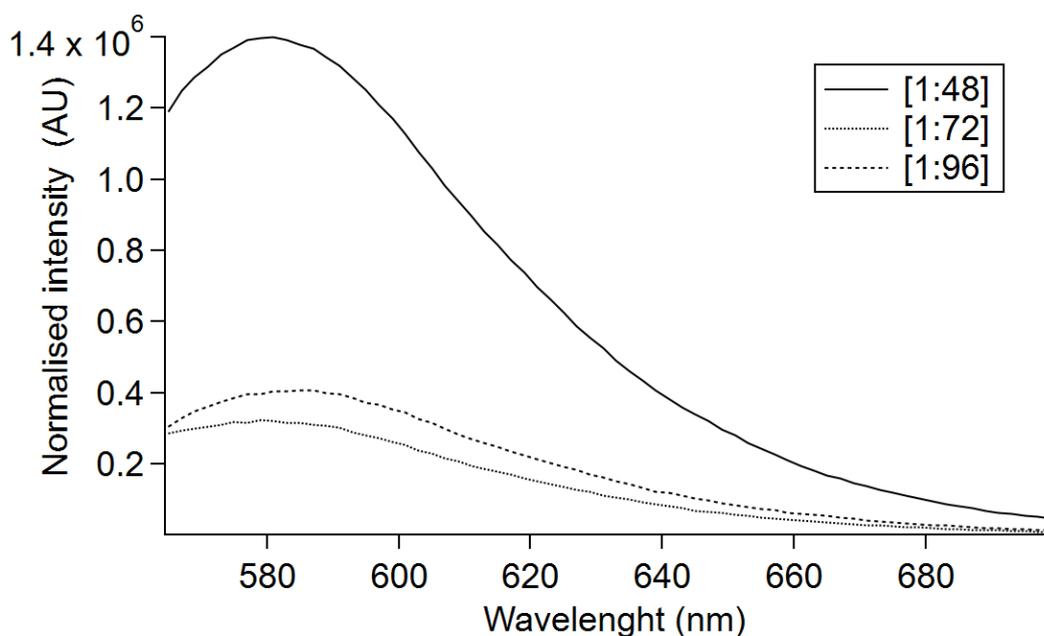


Figure 107 Spectres de fluorescence obtenus après normalisation par la concentration massique en polymère après excitation à 545 nm.

#### 4. Propriétés magnétiques

Bien que les limites optiques ne permettent pas d'observer ces nanoparticules à l'aide d'un microscope optique, celui-ci peut être utilisé pour vérifier le couplage des particules magnétiques avec le polymère. En effet, en présence d'un champ magnétique, les particules magnétiques se déplacent parallèlement au champ, dans la direction où celui-ci est le plus fort. De plus, grâce à l'intégration de Rhodamine B dans le polymère, celui-ci est fluorescent. Pour vérifier qualitativement l'existence d'un couplage entre fluorescence et propriétés magnétiques, une goutte de solution de particules magnétiques fluorescentes a été déposée sur une lame de microscope et un aimant permanent NdFeB a été placé à proximité du front de la goutte, hors du champ du microscope. Bien que la concentration en particules ainsi que l'intensité du champ magnétique ne permettent pas de déplacer la goutte, la fluorescence au bord de la goutte augmente au cours du temps, traduisant une accumulation de particules à la fois magnétiques et fluorescentes.

L'accumulation de la fluorescence au niveau du front de la goutte est présentée Figure 108 pour [1 : 48], **Figure 109** pour [1 : 72] et **Figure 110** pour [1 : 96].

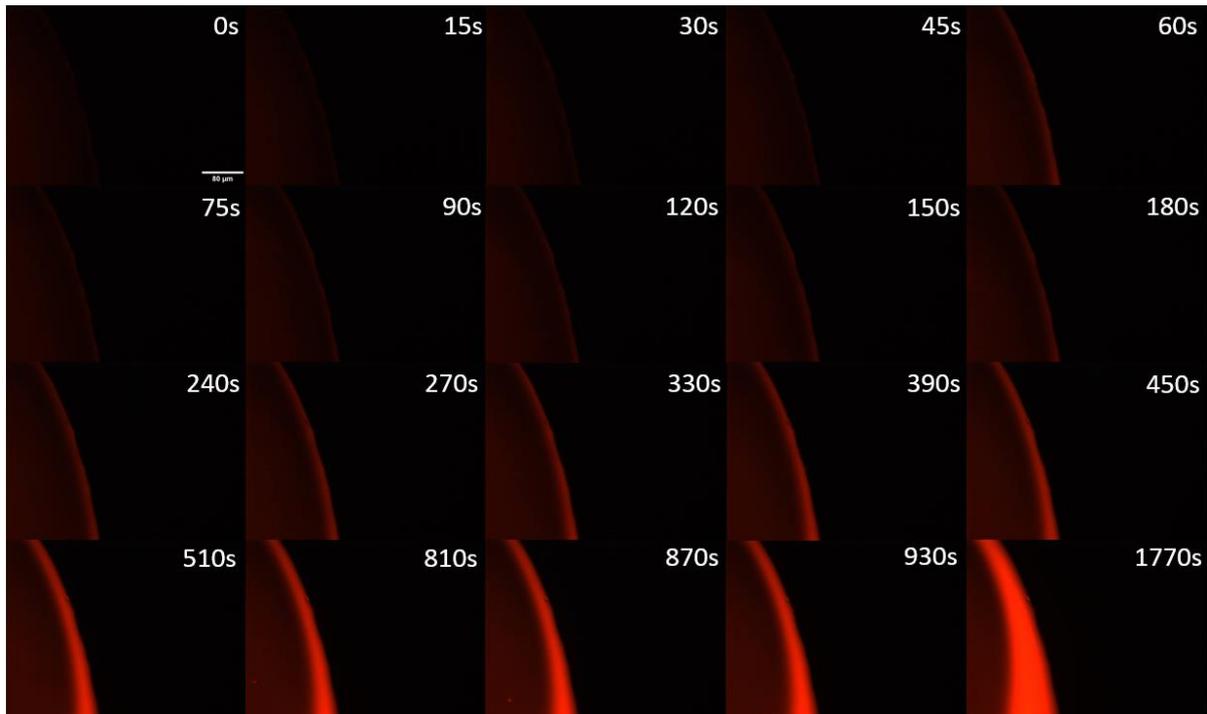


Figure 108 Evolution de la fluorescence au niveau du front d'une goutte d'échantillon [1 : 48] en cours du temps en présence d'un aimant permanent, hors du champ en bas à droite. La barre d'échelle correspond à 20  $\mu\text{m}$ .

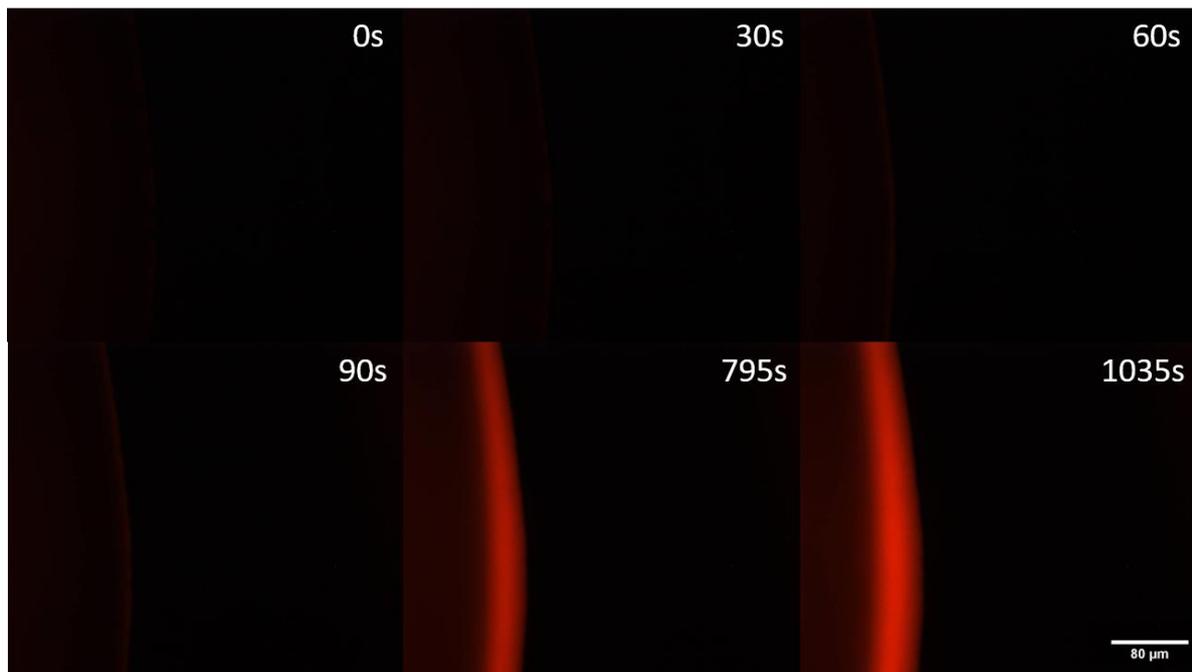


Figure 109 Evolution de la fluorescence au niveau du front d'une goutte d'échantillon [1 : 72] en cours du temps en présence d'un aimant permanent, hors du champ à droite. La barre d'échelle correspond à 20  $\mu\text{m}$ .

La distance entre le front de la goutte et l'aimant n'étant ni contrôlée ni connue précisément, il n'est possible d'interpréter ces images autrement que qualitativement, en tant que confirmation du couplage entre fluorescence et propriétés magnétiques et donc de la fonctionnalisation des nanoparticules de maghémite par du polymère fluorescent.

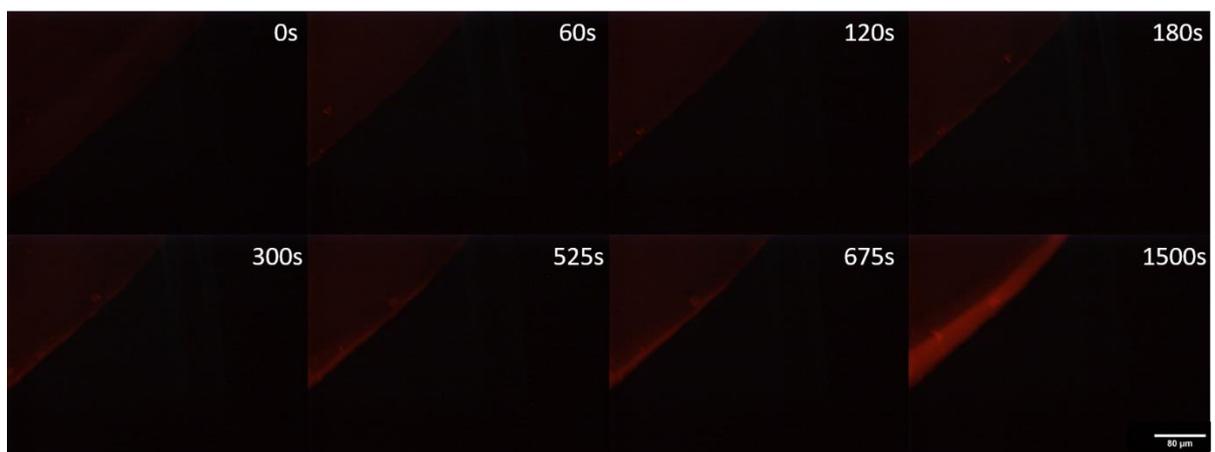


Figure 110 Evolution de la fluorescence au niveau du front d'une goutte d'échantillon [1 : 96] en cours du temps en présence d'un aimant permanent, hors du champ en bas. La barre d'échelle correspond à 20  $\mu\text{m}$ .

Sur les images de l'échantillon [1 : 96] (**Figure 110**) on peut également observer la présence d'agrégats de grande taille se déplaçant en direction de l'aimant.

La réalisation de courbes d'aimantation permet de vérifier que les nanoparticules conservent leur superparamagnétisme. On retrouve une valeur d'aimantation à saturation  $M_s$  en  $\text{emu/g}_{\text{fer}}$  proche de celle déterminée en **I** ( $40.6 \text{ emu/g}_{\text{maghémite}}$ ) pour l'ensemble des échantillons :  $39.0 \text{ emu/g}_{\text{maghémite}}$  pour [1 : 48],  $38.8 \text{ emu/g}_{\text{maghémite}}$  pour [1 : 72] et  $38.9 \text{ emu/g}_{\text{maghémite}}$  pour [1 : 96] (**Figure 111**).

Lors de la mesure de l'échantillon [1 : 72], une microgouttelette d'échantillon est remontée dans l'Eppendorf sous l'effet des vibrations engendrant une perte de masse à l'origine de la différence d'aimantation entre les deux portions de courbe.

Il est très probable que la différence d'aimantation entre les particules nues et les particules fonctionnalisées soit due à une incertitude sur la concentration en fer des nanoparticules nues. En effet, celle-ci est connue précisément pour la solution de nanoparticules de maghémite mais elle a été diluée précisément pour être proche de la concentration en fer de [1 : 48]. Elle n'a pas été dosée à nouveau à cette concentration. Cette dernière est donc une estimation à partir de la dilution effectuée dont l'incertitude est plus importante que pour les échantillons dosés.

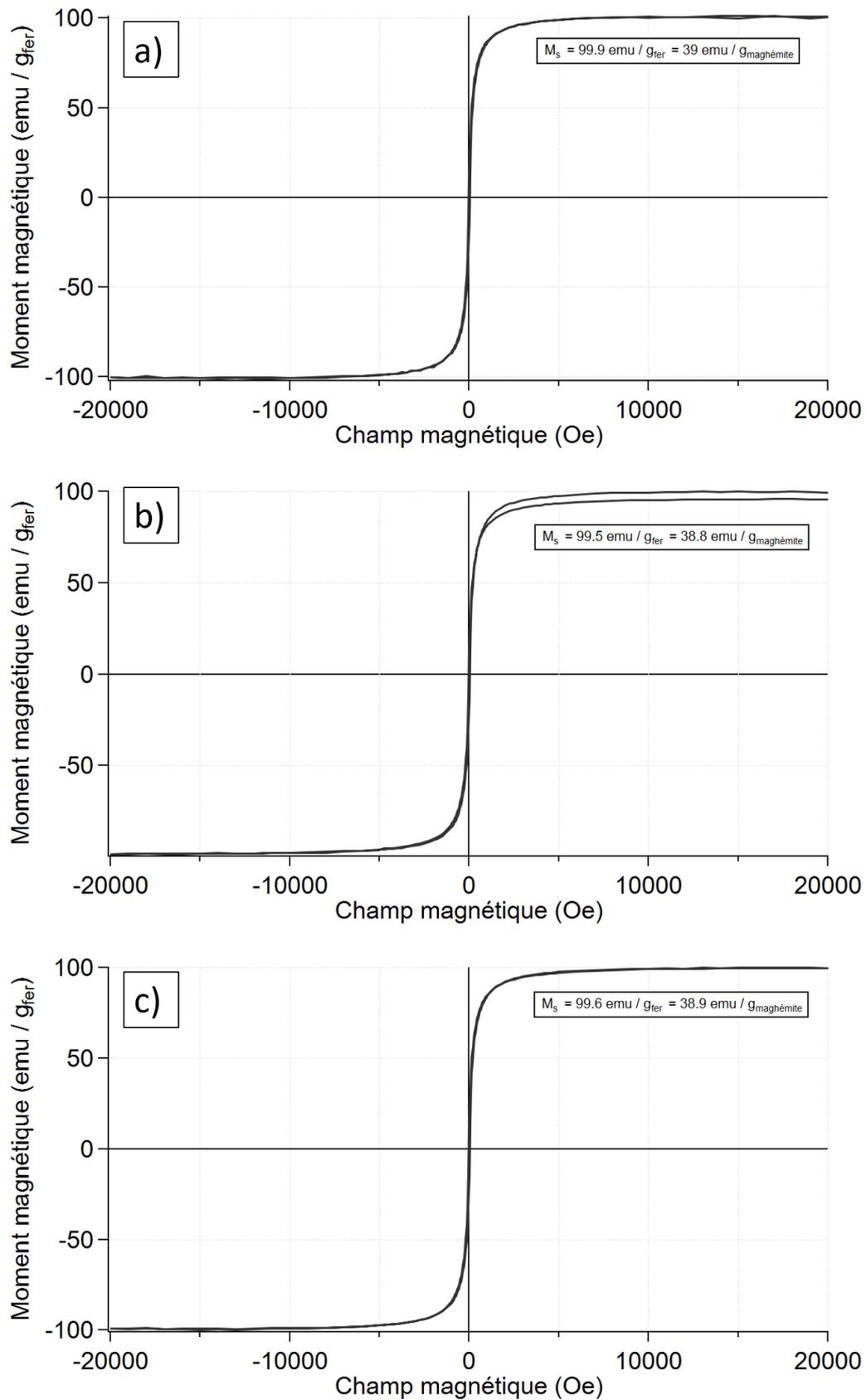


Figure 111 Courbe d'aimantation des nanoparticules après correction de la composante diamagnétique et du champ résiduel de la bobine supraconductrice. a) [1 :48], b) [1 :72] et c) [1 :96].

Comme pour les nanoparticules de maghémite nues, il est également possible de déterminer le pouvoir chauffant des échantillons [1 : 48],[1 : 72] et [1 : 96] en présence d'un champ magnétique alternatif de 300 Gauss oscillant à 776kHz à l'aide des courbes d'hyperthermie magnétique (**Figure 112**).

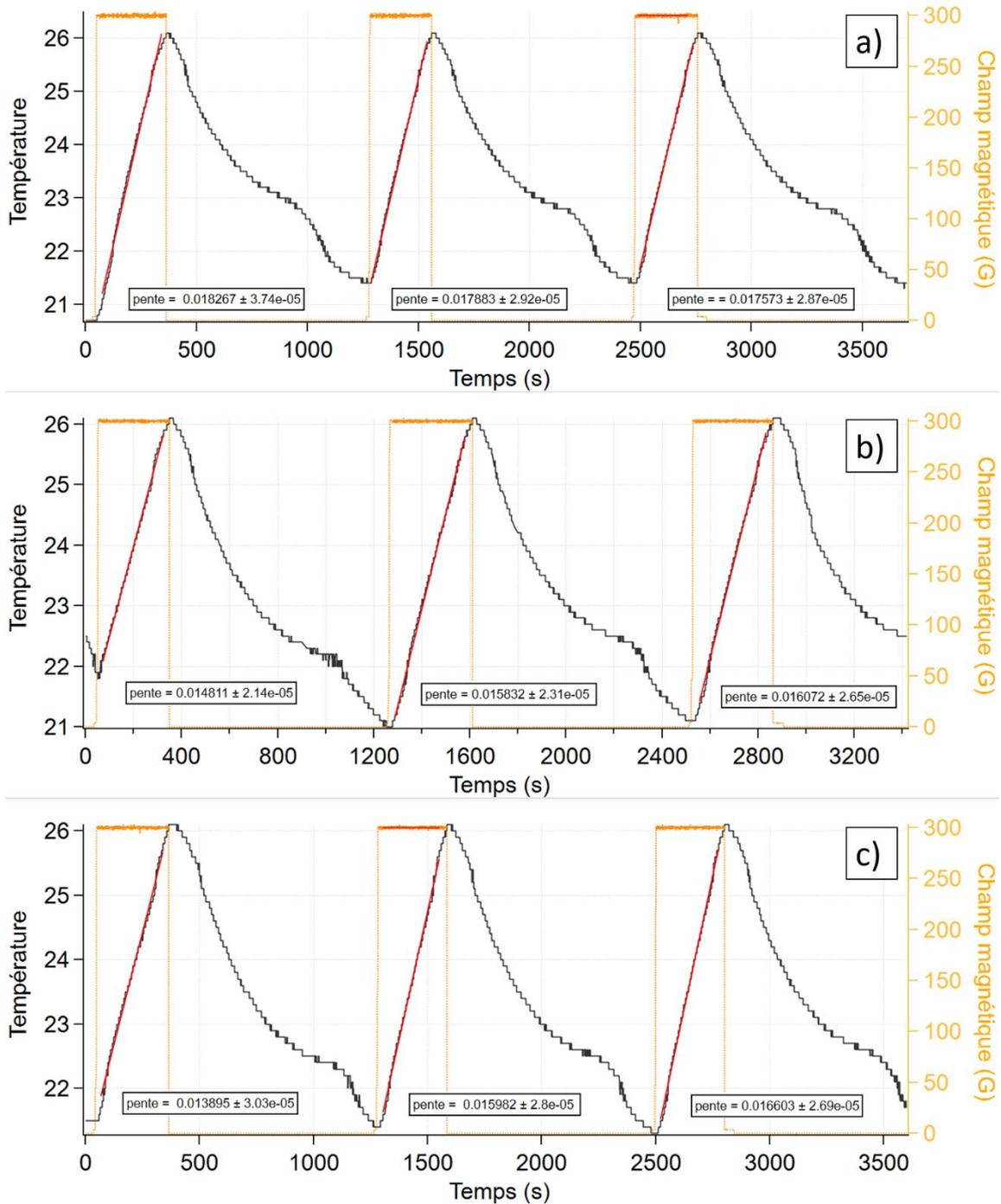


Figure 112 Un champ magnétique alternatif, indiqué par la courbe jaune, est appliqué sur 3 périodes, jusqu'à ce qu'une température de 26°C soit atteinte. Entre chaque application du champ, le système est refroidi. Une modélisation linéaire est effectuée sur la phase de chauffage pour chacun des cycles de l'échantillon. a) [1 :48], b) [1 :72] et c) [1 :96] (pentes en C°/s).

Pour une quantité de nanoparticules magnétiques équivalentes, il semble que le pouvoir chauffant des nanoparticules ait été diminué par la fonctionnalisation (**Figure 113**). Cela peut s'expliquer par une agrégation des nanoparticules dans la matrice de polymère mais aussi par d'éventuelle variation dans le transfert de l'énergie thermique vers l'eau à travers la couche de polymère. La possibilité d'obtenir une élévation macroscopique de température est néanmoins très encourageante puisque l'objectif du projet est à terme d'utiliser une élévation locale de température pour obtenir la libération d'une molécule thérapeutique.

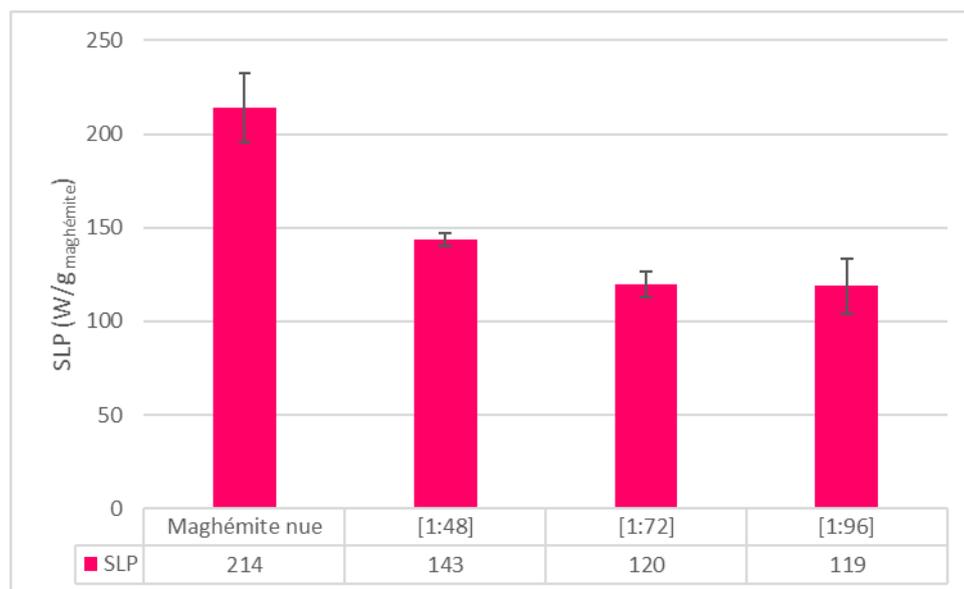


Figure 113 Récapitulatif des valeurs de SLP pour les particules nues et les particules fonctionnalisées. En  $W/g_{maghémite}$ .

## 5. L'importance de la température et de l'agitation

La synthèse présentée ici a été réalisée dans une pièce à une température de 25°C dans des flacons disposés horizontalement sur un agitateur orbitalaire (**Figure 97**). Lors de la polymérisation, la température sous la lampe augmente jusqu'à se stabiliser au bout de 30 minutes entre 30 et 34°C. La modification de ces paramètres induit directement des différences dans la morphologie des particules synthétisées.

La réalisation de la synthèse dans une pièce plus fraîche (15°C) en conservant les autres paramètres expérimentaux conduit à des rendements très bas : [1:48] : 1.6%, [1:72] : 17.1% and [1:96]: 2.7% par rapport à ceux obtenus précédemment. Les spectres de fluorescence obtenus pour ces échantillons indiquent la même tendance (**Figure 114**). Ces résultats peuvent indiquer une forte dépendance en température de la cinétique de la réaction.

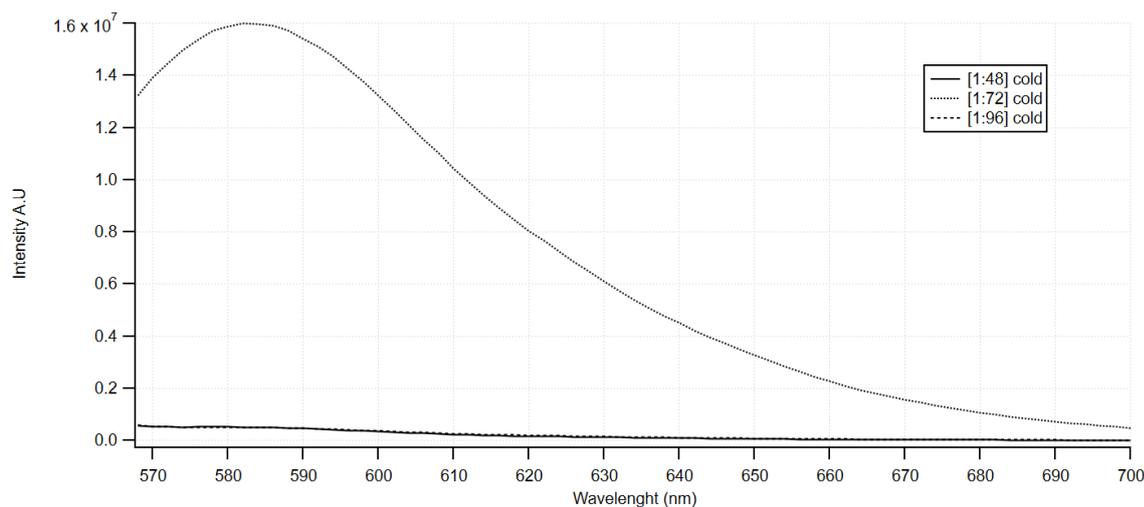


Figure 114 Spectre de fluorescence obtenu avec une longueur d'onde d'excitation de 545nm après polymérisation dans une pièce à 15°C.

Un autre paramètre clé de cette synthèse est la méthode et la vitesse d'agitation. En effet, les agitateurs à rouleau (*roller stirrer*), qui permettent une simple rotation des flacons suivant leur axe vertical, ont pour réputation de permettre la synthèse de nanoparticules avec une plus faible polydispersité. Comme précédemment, la synthèse a donc été reproduite à l'identique sur ce type d'agitateur, en utilisant la vitesse de rotation la plus basse, avec une irradiation UV par le dessus et une distance entre la lampe et les flacons de 5 cm. Après une heure de polymérisation, de gros agrégats de polymère sont visibles dans les flacons (**Figure 115**)



Figure 115 Aspect des échantillons après 1h de polymérisation sur le « roller stirrer » à basse vitesse.

En répétant cette synthèse en augmentant la vitesse d'agitation du roller, des solutions plus homogènes ont pu être obtenues. Cependant, leur observation au microscope électronique à transmission met en évidence la présence de grands films de polymère contenant des particules magnétiques (**Figure 116**)

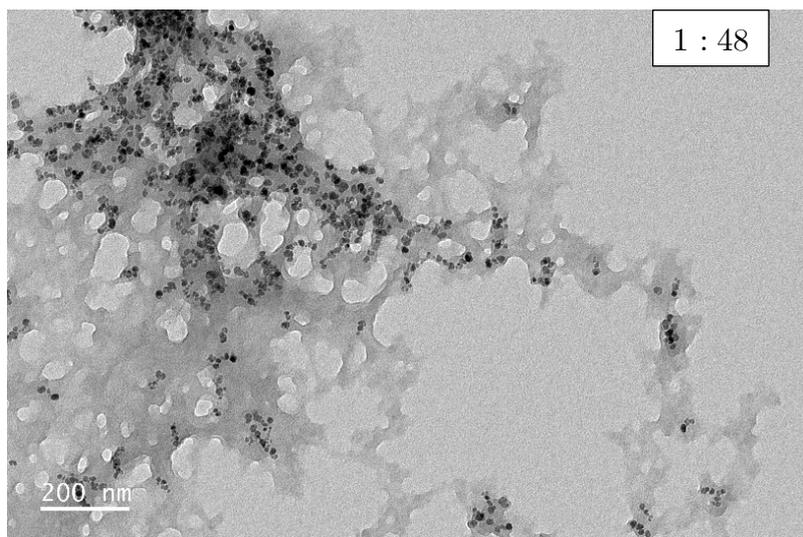


Figure 116 Image de microscopie d'un échantillon d'apparence homogène, préparé avec un ratio molaire [fer : monomères] de [1 :48] sur le roller stirrer à vitesse moyenne.

## 6. Conclusion

Cette synthèse a été imaginée de sorte à ne changer qu'un seul paramètre : la concentration en monomère. Toutefois, en maintenant la concentration en rhodamine B et en benzophenone constante entre les différents échantillons, cela modifie les ratios monomères/Rhodamine B et monomères/benzophénone. Il est donc finalement difficile de déterminer si les différences observées sont dues à la baisse de ces ratios, à l'augmentation de la concentration en monomères ou à une combinaison de ces deux paramètres. Bien que cette synthèse semble sensible à de nombreux paramètres pouvant la rendre complexe à reproduire, elle a permis l'obtention de nanoparticules de type cœur-coquille, fluorescentes, de petite taille, stables, y compris sur une période de plusieurs mois. Ces échantillons ont conservé les propriétés magnétiques des nanoparticules de maghémite et sont ainsi capables de générer de la chaleur sur commande, lorsqu'un champ magnétique alternatif est appliqué.

## IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons vu qu'une fonctionnalisation des nanoparticules de maghémite par de l'acide acrylique pouvait permettre d'améliorer la morphologie des hydrides obtenus et de former des particules cœur-coquille. L'intégration d'un monomère fluorescent est une étape critique pouvant menacer la stabilité colloïdale des nanoparticules.

Une photopolymérisation de type II amorcée par le couple Rhodamine B / Benzophénone peut être utilisée pour réaliser des nanoparticules de polymère magnétiques et fluorescentes. En particulier, ces nanoparticules sont capables de produire un

échauffement local qui pourra leur permettre de libérer les molécules thérapeutiques encapsulées en leur sein

Les essais de réalisation d'empreintes de protéine dans ces échantillons se sont toutefois heurtés à des problèmes de stabilité colloïdale. En effet, les peptides sont en solution dans du tampon phosphate à pH 7.4, et l'ajout d'un volume aussi faible que 300  $\mu\text{L}$  dans le mélange réactionnel décrit précédemment suffit à faire précipiter les nanoparticules magnétiques.

## V. Matériel et méthode

### 1. Réactifs

En addition des réactifs listés page 97, les réactifs suivants ont été utilisés.

Ammonium persulfate (APS, Sigma-Aldrich, 99%), N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine (TEMED, Sigma-Aldrich, 99%), Chlorure ferrique (VWR), chlorure ferreux (VWR), nitrate ferrique (VWR), éther diéthylique (VWR), acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ , 52.5%, VWR), acide chlorhydrique (HCl, Sigma Aldrich, 37%) ammoniaque ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , 22.5%, Calo Erba), acide acrylique (Aac, 99%, Sigma Aldrich).

### 2. Outils de caractérisation

En addition des techniques listées page 98, les techniques suivantes ont été utilisées dans ce chapitre.

La distribution en taille des nanoparticules a été obtenue en mesurant la taille des nanoparticules à l'aide du logiciel imageJ. L'histogramme de la distribution en taille a ensuite été tracé sur le logiciel Igor et modélisé par une loi LogNormal.

Les mesures de potentiel Zeta ont été réalisées sur un ZetaSiser Red Ultra de Malvern Instruments dans des cellules Zeta à capillaire replié DTS1070. Les solutions ont été dilués dans de l'eau à pH 2 ( $\text{HNO}_3$ ).

Les analyses thermogravimétriques ont été réalisées sur des échantillons séchés à l'étuve à  $70^\circ\text{C}$  pendant une semaine. Une masse d'environ 10mg a été déposée dans un pan en platine. L'analyse a été réalisée dans un TGA 550 du constructeur Texas Instrument, sous un flux d'azote de 50mL/min avec une rampe de température de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ .

La concentration en fer des échantillons a été déterminée par spectroscopie d'adsorption atomique. Les échantillons ont été dégradés dans de l'HCl à 35% et ont été dilués avec précision dans de l' $\text{HNO}_3$  à 2%. La concentration en fer est obtenue sur un appareil Analyst100 de PerkinElmer après étalonnage.

Les images de microscopie optique utilisées pour montrer le couplage entre fluorescence et propriétés magnétiques ont été réalisées sur un microscope Axiovert 200 de la

marque Zeiss, équipé d'une lampe à vapeur de mercure, de filtres de fluorescence et d'une caméra Manta Allied Vision.

Les courbes d'aimantation ont été obtenues en analysant 20 $\mu$ L d'échantillon dans un eppendorf dans un magnétomètre SQUID MPMS 5S du constructeur Quantum Design en mode échantillon vibrant (VSM) en faisant varier le champ magnétique de 0 à 20 000 Oe, de 20 000 à -20 000 Oe et enfin de -20 000 à 0 Oe. Le champ résiduel dans la bobine supraconductrice est de 25 Oe. Les courbes d'aimantation brutes ont été corrigées en éliminant ce champ résiduel ainsi que la composante diamagnétique due à l'eau et à l'Eppendorf.

La détermination du pouvoir chauffant des nanoparticules a été réalisé sur un dispositif de génération de champ magnétique alternatif D5 series Automated Driver fabriqué par l'entreprise Nanoscale Biomagnetics. La bobine utilisée est la bobine CAL1\_0924 qui permet d'obtenir un champ magnétique de 580 Gauss maximum à 147kHz et de 300 Gauss à 776 kHz. Le refroidissement du système est assuré par un circuit hydraulique régulé par un « chiller » entre 17 et 22°C. Au cœur de la bobine, le champ est suffisamment homogène pour que la variation au sein du volume de l'échantillon soit inférieure à 5%. La température au sein de l'échantillon est mesurée à l'aide d'une fibre optique. La série d'expérience ayant conduit au choix d'une fréquence de 776kHz et d'un champ magnétique de 300 Gauss est présentée en Annexe « Mesure du pouvoir chauffant » page 170.

### 3. Synthèse de nanoparticules de maghémite

La synthèse présentée ici permet d'obtenir une grande quantité de nanoparticules (500mL de solution à environ 130g/L de maghémite).

Dans un bécher de 1L, 180g de FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O sont dissouts dans 500mL d'eau distillée et 100mL d'HCl 37%. Cette solution est ensuite ajoutée, dans un bécher de 5L, à 715mL de FeCl<sub>3</sub> et 3L d'eau. La solution est colorée mais limpide. Le mélange est agité à 800 tours/min et 1L de NH<sub>3</sub> concentré (22.5%) est ajouté très rapidement. La solution devient opaque d'un couleur noir goudron. Après 30min d'agitation, la solution est placée sur un aimant et après 10 minutes le surnageant est aspiré. Le précipité est ensuite lavé sur aimant par 1L d'eau distillée.

Les nanoparticules sont ensuite transférées en milieu acide en ajoutant 360 mL de HNO<sub>3</sub> concentré (52.5%) puis lavées sur aimant après 30 minutes d'agitation. Pour oxyder les nanoparticules de magnétite en maghémite, une solution de 800 mL d'eau distillée contenant 323 g de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> est portée à ébullition avant d'être ajoutée au précipité. Après 30 minutes de chauffage sous agitation, les particules sont décantées sur un aimant. Le surnageant incolore, est aspiré, et le précipité, marron, est lavé par

une solution constituée de 360mL de  $\text{HNO}_3$  concentré et 2L d'eau distillée. Les particules sont ensuite lavées 3 fois avec 1L d'acétone et 2 fois avec 500mL d'éther. Les particules sont enfin dispersées dans 1L d'eau distillée et les résidus d'éther sont évaporés.

Pour trier les nanoparticules, celles-ci sont déstabilisées en ajoutant 25 mL de  $\text{HNO}_3$  concentré. Après 10minutes de décantation sur un aimant, le surnageant et le culot sont séparés. Comme l'objectif est d'obtenir de grosses particules, c'est le culot qui est conservé. Celui est à nouveau dispersé dans 500 mL d'eau distillée et décanté sur aimant après ajout de 9 mL d' $\text{HNO}_3$  concentré. Le culot récupéré est alors lavé 3 fois par 500mL d'acétone, 2 fois par 200mL d'éther avant d'être redispersé dans 500 mL d'eau distillée. Cet échantillon sera appelé nanoparticules de maghémite dans la suite.

#### **4. Optimisation fonctionnalisation acide acrylique**

Pour réaliser les échantillons « 0.5%Aac », « 2%Aac » et « 5%Aac », un volume de 25 $\mu\text{L}$ , 100 $\mu\text{L}$  ou 250 $\mu\text{L}$ , respectivement, a été ajouté à 5mL de solution de nanoparticules de maghémite (0.907M de fer). Après 10 minutes de sonication, les solutions sont chauffées à 80°C pendant 40 minutes. Au bout de quelques minutes, l'échantillon contenant 5%v/v d'acide acrylique devient marron clair (la solution se trouble). Après refroidissement, les échantillons sont lavés 3 fois par 5mL d'acétone et par 5mL d'éther avant d'être à nouveau dispersés dans de l'eau à pH 3 ( $\text{HNO}_3$ ).

#### **5. Synthèse polymères magnétiques redox**

La polymérisation a été effectuée à partir de 2.2mg de nanoparticules préparées précédemment à partir de 0%, 0.5%, 2% et 5% d'acide acrylique. Les nanoparticules ont été soniquées avant d'être dispersées dans 15mL d'eau distillée contenant 1.85mmol d'AM (132mg) et 0.32mmol de BIS (66mg). Puis les solutions ont été purgées sous azote pendant 15 minutes avant l'ajout de 27 $\mu\text{L}$  de TEMED et 13.5mg d'APS. Après une heure de polymérisation, les échantillons sont mis en dialyse dans des membrane 12-14kDa pour être purifiés (5 bains successifs de 300mL d'eau distillée).

#### **6. Fonctionnalisation acide acrylique pour photopolymérisation de type II**

150  $\mu\text{L}$  d'Aac sont ajoutés à 5 mL de suspension de nanoparticules magnétiques (4.53 mmol de fer). Le mélange est placé dans un bain à ultrasons pendant 15 minutes afin d'assurer une bonne dispersion des nanoparticules avant d'être chauffé à 80°C pendant 40 minutes. Après refroidissement, les particules sont lavées avec 3 fois 5mL d'acétone, et 5mL d'éther puis sont redispersées dans de l'eau à pH 2 ( $\text{HNO}_3$ ).

## 7. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétique par photopolymérisation de type II

Les échantillons sont identifiés par leur ratio molaire [Fer : monomères] obtenu à partir du dosage du Fer dans les nanoparticules de maghémite fonctionnalisées par l'acide acrylique et de la quantité molaire totale des monomères utilisés : [1 :48], [1.72] et [1 :96]. La composition de leur mélange réactionnel est détaillée dans le **Tableau 13**.

*Tableau 13 Composition des mélanges réactionnels pour les échantillons [1 :48], [1.72] et [1 :96]*

Echantillon	[1 :48]	[1 :72]	[1 :96]
AM (mmol)	1.85	2.775	3.7
BIS (mmol)	0.32	0.48	0.64
Total monomères (mmol)	2.17	3.225	4.34
Fer ( $\mu\text{mol}$ )	45	45	45
Rhodamine B ( $\mu\text{mol}$ )	4.1	4.1	4.1
Benzophénone( $\mu\text{mol}$ )	22	22	22
Volume total (mL)	14.6	14.6	14.6

Dans chaque flacon, les monomères et la rhodamine B ont été mélangés avant d'ajouter les nanoparticules de maghémite fonctionnalisées après qu'elles aient été préalablement soniquées pendant 15 minutes. Puis la benzophénone, en solution dans l'éthanol, est ajoutée lentement au mélange qui est ensuite soniqué pendant 10 minutes. Pour obtenir un mélange limpide il est important que les deux solutions soient à une température d'au moins 20°C. Après 15 minutes de dégazage, les flacons sont placés horizontalement sur les rouleaux d'un agitateur orbitalaire réglé à 200 tours/min et irradiés par des UV à 365 nm pendant 3h.

# Chapitre 4 : Synthèse de nanoparticules imprimées sur surface solide

I. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques imprimées par synthèse sur surface solide.....	143
1. Principe.....	143
2. Fonctionnalisation des billes de verre.....	145
3. Polymérisation et purification.....	145
4. Caractérisations .....	146
5. Ciblage de la protéine CD36 .....	148
II. Synthèse de nanoparticules de polymère par surface solide .....	150
1. Principe.....	150
2. Polymérisation et purification.....	151
3. Ciblage de la protéine CD36 .....	152
III. Conclusion .....	155
IV. Matériel et méthodes .....	156
1. Réactifs .....	156
2. Caractérisations .....	156
3. Fonctionnalisation des billes de verre.....	156
4. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques.....	157
5. Synthèse de nanoparticules de polymère non magnétiques.....	157

L'objectif de ce chapitre est de décrire une autre méthode permettant la synthèse de nanoparticules de polymère à empreintes de protéines et en particulier d'augmenter la spécificité des échantillons. Cette méthode consiste à fixer les peptides sur des billes de verre de taille micrométrique servant de substrat et à réaliser les empreintes de polymère en utilisant un mélange de monomères spécialement développé pour cette utilisation. Comme discuté dans le Chapitre 1, cette méthode est utilisée depuis de nombreuses années par l'équipe de Sergey Piletsky et le protocole utilisé dans ce chapitre a donc été adapté à partir de ses travaux.<sup>66,67,68,70,81,82,99,180,181</sup>

La première partie de ce chapitre traite de nanoparticules magnétiques à empreinte de protéine réalisées par synthèse sur surface solide. Cette synthèse ayant été réalisée au début de ce projet de thèse, elle ne bénéficie pas des améliorations apportées lors des expériences présentées dans les chapitres précédents. En effet, il s'agit d'une des premières pistes explorées pour réaliser des polymères à empreintes magnétiques : elle combine l'utilisation d'un support solide et de nanoparticules magnétiques fonctionnalisées avec du DCAA. La seconde partie de ce chapitre porte sur des nanoparticules de polymère préparées par synthèse sur surface solide. La synthèse de ces nanoparticules a été effectuée par Abdel Hussein, stagiaire de Master 2 au laboratoire PHENIX. Cette synthèse a permis de montrer qu'un peptide non imprimable avec une méthode classique pouvait être imprimé avec succès en changeant de méthode d'impression et de monomères.

## **I. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques imprimées par synthèse sur surface solide**

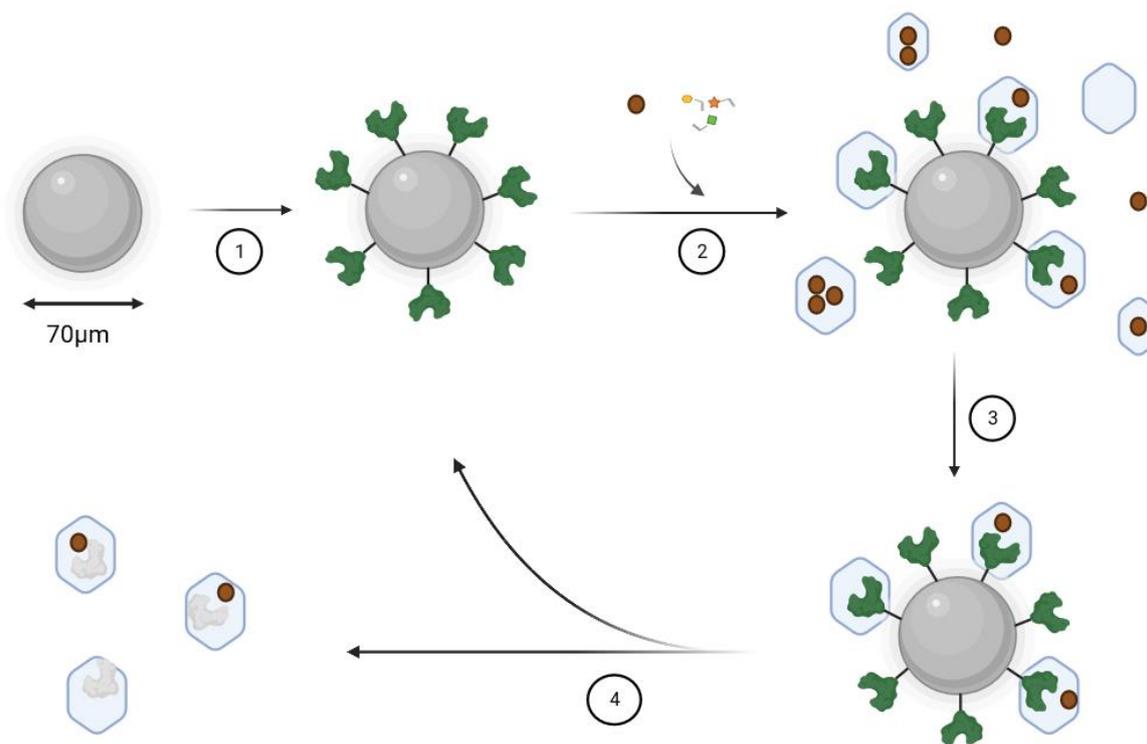
### **1. Principe**

La synthèse de nanoparticules de polymère imprimées sur surface solide repose sur la fixation de la molécule cible, le peptide, sur des billes de verre. Un mélange de monomères présentant une forte affinité pour les protéines et optimisé pour cette application est utilisé pour former des nanoparticules de polymère. Des nanoparticules de polymère sont liées à la cible, fixée sur les billes de verre, tandis que d'autres sont libres en solution. L'élimination de ces nanoparticules libres permet de séparer ces particules de faible affinité des nanoparticules de haute affinité, fixées sur les billes. Enfin, la présence de NIPAM dans le mélange de monomères permet d'obtenir des nanoparticules de polymère thermosensibles, une élévation de température conduit donc au décrochage des nanoparticules de polymère de haute affinité.

Le tri des nanoparticules par rapport à leur affinité ainsi que la localisation des empreintes, par principe localisées en surface des nanoparticules devraient permettre

d'obtenir des nanoparticules capables de cibler efficacement la protéine CD36, y compris à faible concentration.

Si l'utilisation d'une synthèse sur surface solide est très répandue pour préparer des nanoparticules de polymère, elle n'avait, en revanche, jamais été utilisée pour préparer des nanoparticules de polymère magnétiques à empreintes de protéine. Le principal frein à cette utilisation serait une éventuelle affinité des nanoparticules de maghémite pour la silice composant les billes de verre, ce qui rendrait difficile la séparation entre les nanoparticules et les billes. L'autre point important de cette modification est la nécessité de l'intégration des nanoparticules de maghémite dans la matrice de polymère. Nous avons vu au chapitre 3 que leur fonctionnalisation par de l'acide acrylique permettait la formation de nanoparticules de type cœur-coquille. L'approche présentée dans ce chapitre utilise cependant l'agent iniferter photopolymérisable DCAA, comme prévu initialement dans le projet, avant l'observation des problèmes de reproductibilité qui lui sont associés. Le principe de cette synthèse, en présence de nanoparticules de maghémite fonctionnalisées avec le DCAA, est présenté **Figure 117**.



*Figure 117 Synthèse sur billes de verre adaptée. (1) Des billes de silice sont fonctionnalisées avec la protéine cible. (2) La polymérisation de monomères adaptés en présence de nanoparticules de maghémite fonctionnalisées par le DCAA forme des nanoparticules de polymère magnétiques. (3) Le polymère libre est éliminé. (4) Une élévation de température permet le décrochage des polymères spécifiques et leur récupération.*

Le mélange de monomères est composé de N-isopropylacrylamide, permettant d'obtenir un polymère thermosensible, du N, N'méthylènebisacrylamide, jouant le rôle

de réticulant, du N-ter-butylacrylamide, du N-(3-aminopropyl) methacrylamide permettant des interactions électrostatiques et de l'acide acrylique (**Figure 118**).

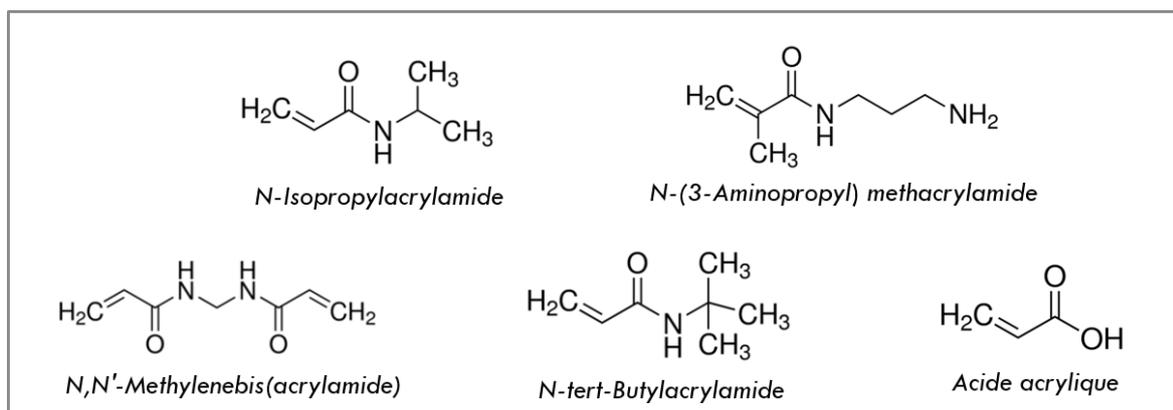


Figure 118 Formule chimique des monomères utilisés.

## 2. Fonctionnalisation des billes de verre

La première étape de cette synthèse consiste à fonctionnaliser des billes de verre de 75 $\mu$ m avec le peptide cible. Pour cela, les billes doivent être lavées à la soude pour être activées avant d'être silanisées avec du 3-aminopropyltriméthoxyxilane. Cette silanisation permet d'obtenir des billes de verre présentant une amine primaire à leur surface qui ouvre plusieurs voies permettant de greffer le peptide. Comme le peptide présente une cystéine terminale, et donc une fonction SH, l'étape suivante consiste à ajouter du succinimidyl iodoacetate pouvant se greffer sur l'amine primaire puis réagir avec la fonction SH du peptide pour le greffer aux billes de façon covalente (**Figure 119**).

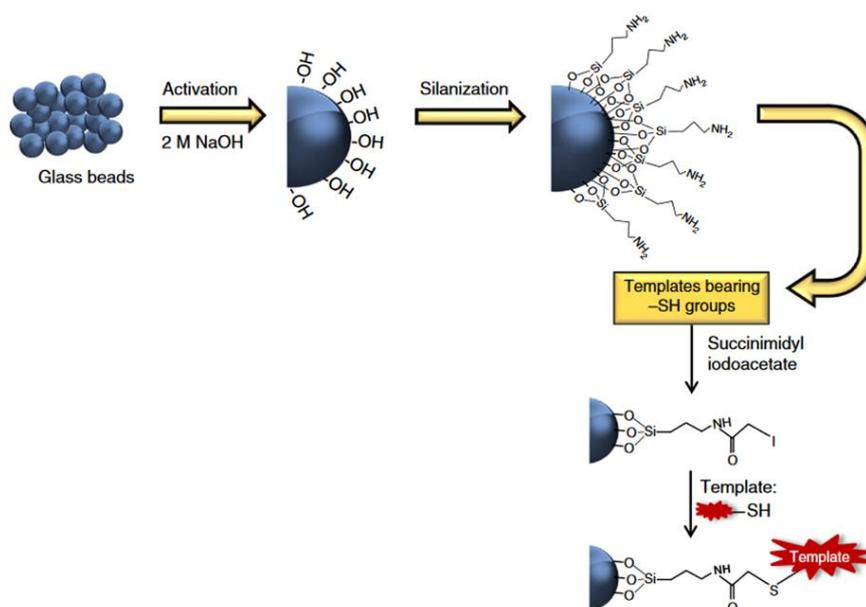


Figure 119 Principe de la fonctionnalisation des billes de verre, adapté de <sup>181</sup>.

## 3. Polymérisation et purification

Les billes de verre sont fonctionnalisées avec le peptide 93-110. Du DCAA est adsorbé sur les nanoparticules de maghémite qui sont ensuite intégrées à une solution de monomères contenant du N-isoprpylacrylamide, du N, N'méthylènebisacrylamide, du N-ter-butylacrylamide, du N-(3-aminopropyl), de l'acide acrylique et de l'ArtRhod. La solution de monomères contenant les nanoparticules est ensuite ajoutée aux billes de verre avant d'être dégazée sous azote et placée sur la lampe UV. Après 5h de polymérisation, les nanoparticules magnétiques semblent toujours stables en solution tandis que la couleur des billes de verre est passée de blanche à marron (Figure 120-a et b). Après des lavages à l'eau distillée froide, les particules de haute affinité sont extraites par chauffage à 45°C. Une quantité importante de nanoparticules magnétiques est extraite, les billes s'éclaircissent, sans toutefois reprendre leur couleur d'origine (**Figure 120-c**).

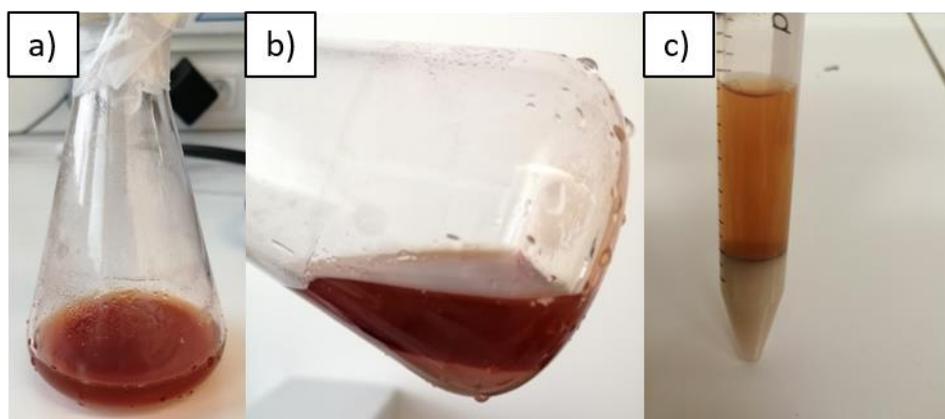
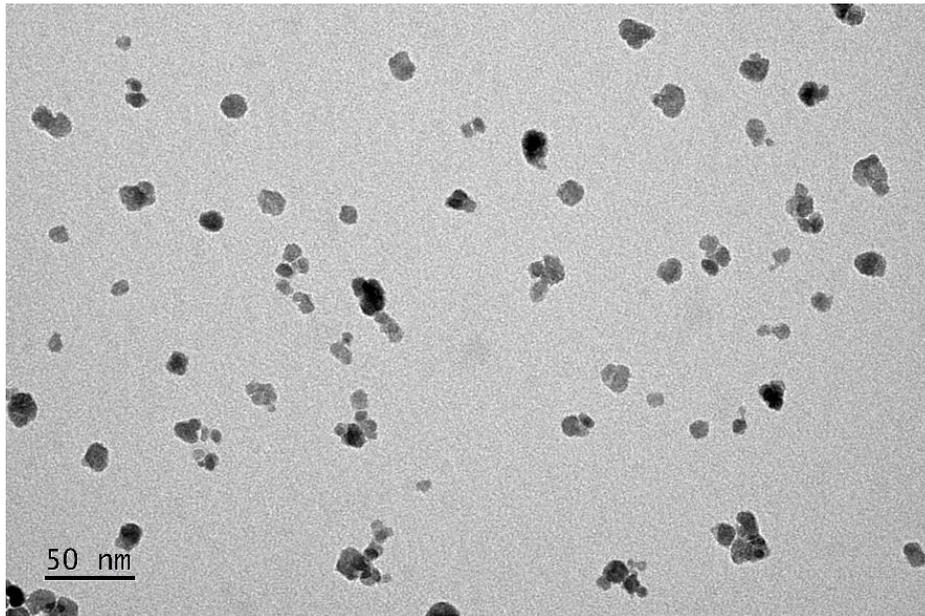


Figure 120 Photos des échantillons. (a) et (b) les billes de verre en solution après polymérisation, (c) Séparation entre les polymères à empreinte magnétiques et les billes de verre après chauffage.

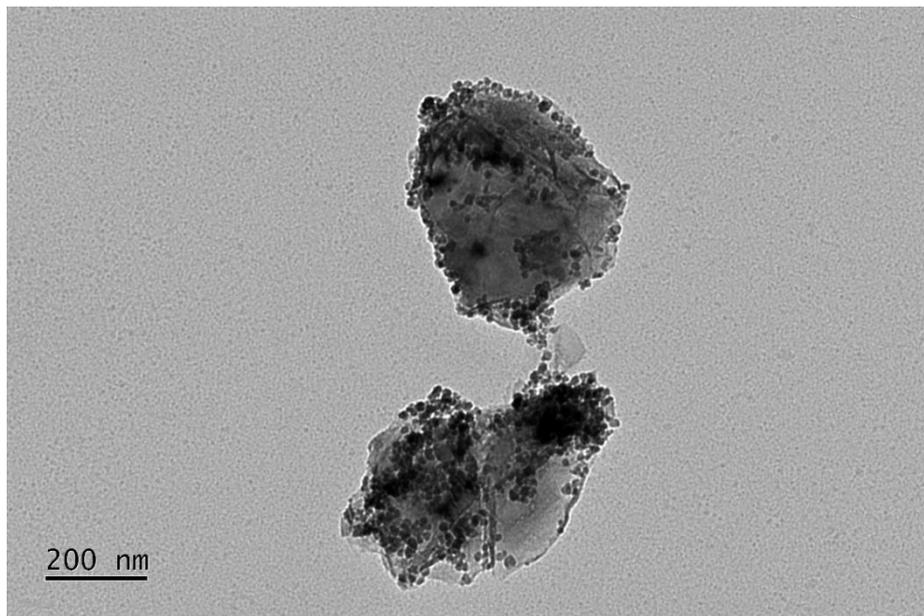
#### 4. Caractérisations

Contrairement à d'autres agents iniferters photopolymérisables, le DCAA est hydro-soluble. Sa fonctionnalisation sur les nanoparticules de maghémite (**Figure 121**) n'affecte pas leur stabilité, elles ne s'agrègent pas.

La visualisation des nanoparticules de haute affinité récupérées à l'issue de la polymérisation par microscopie électronique montre des nanoparticules de grande taille (plus de 200nm) présentant une quantité importante de polymère enveloppant des nanoparticules de maghémite (**Figure 122**). Cette morphologie est assez éloignée des particules cœur-coquille obtenues au chapitre 3, avec des particules de plus de 300nm, est peu adaptée pour des applications *in vivo*.



*Figure 121 Image de microscopie électronique des nanoparticules de maghémite fonctionnalisées par le DCAA.*



*Figure 122 Image de microscopie électronique d'un polymère à empreintes magnétique réalisé sur surface solide.*

Comme précédemment, les nanoparticules synthétisées sont également fluorescentes (**Figure 123**).

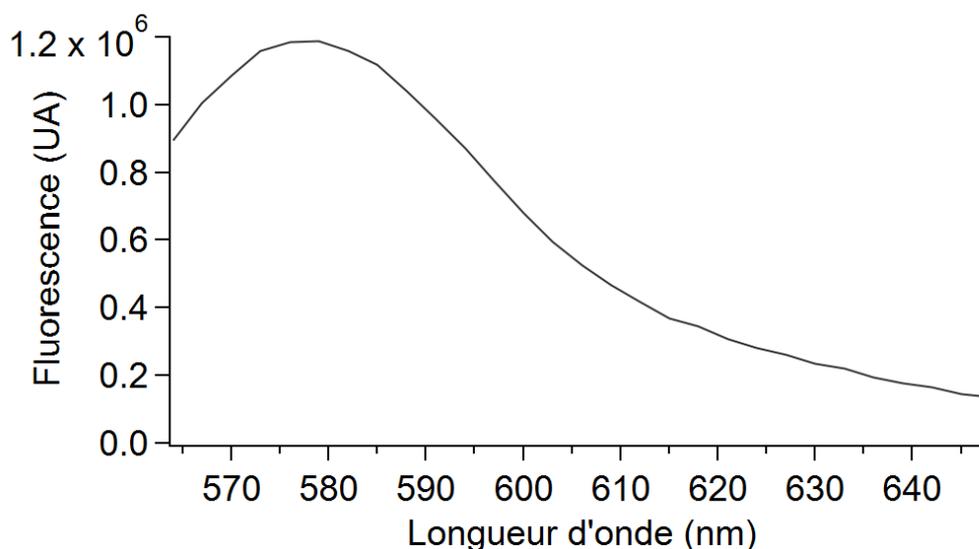


Figure 123 Spectre de fluorescence de l'échantillon brut à une longueur d'onde d'excitation de 540 nm.

## 5. Ciblage de la protéine CD36

Si les caractéristiques physiques des nanoparticules et en particulier leur taille et leur morphologie ne sont pas optimales pour les applications visées par ce projet, leur capacité à cibler spécifiquement la protéine CD36 a été évaluée par cytométrie en flux sur des cellules SUM 159 et des cellules SUM159 modifiées pour surexprimer la protéine CD36, les cellules SUM159 CL1.

Comme une quantité faible de solution de particules de haute affinité a été récupérée, celle-ci n'a pas été séchée. Les concentrations utilisées sont donc les concentrations en fer déterminée par absorption atomique : 0.16 mM, 0.32 mM et 0.65 mM. Dès la plus faible dose, l'ensemble des cellules est marqué, indépendamment de l'expression de CD36 déterminée par marquage avec un anticorps anti-CD36 fluorescent (**Figure 124**). Il existe cependant une différence importante au niveau de l'intensité de fluorescence des cellules : sur les cellules SUM159 CL1 qui expriment fortement la protéine CD36, une partie des cellules est marquée plus intensément que les autres. Ce phénomène est particulièrement visible à 0.16 mM en comparant les cellules SUM159 WT avec les cellules SUM159 CL1 (**Figure 124-e et f**).

Cet échantillon présente un fort ciblage non spécifique. Il est possible que ce phénomène soit dû à la morphologie des particules qui sont de diamètre important et contiennent de nombreuses particules de maghémite ce qui augmente leur densité. Or les cellules sont lavées par centrifugation à 1000 tour/minute et dans ces conditions les particules forment un culot au fond de l'ependorf, ce qui les « colle » sur les cellules.

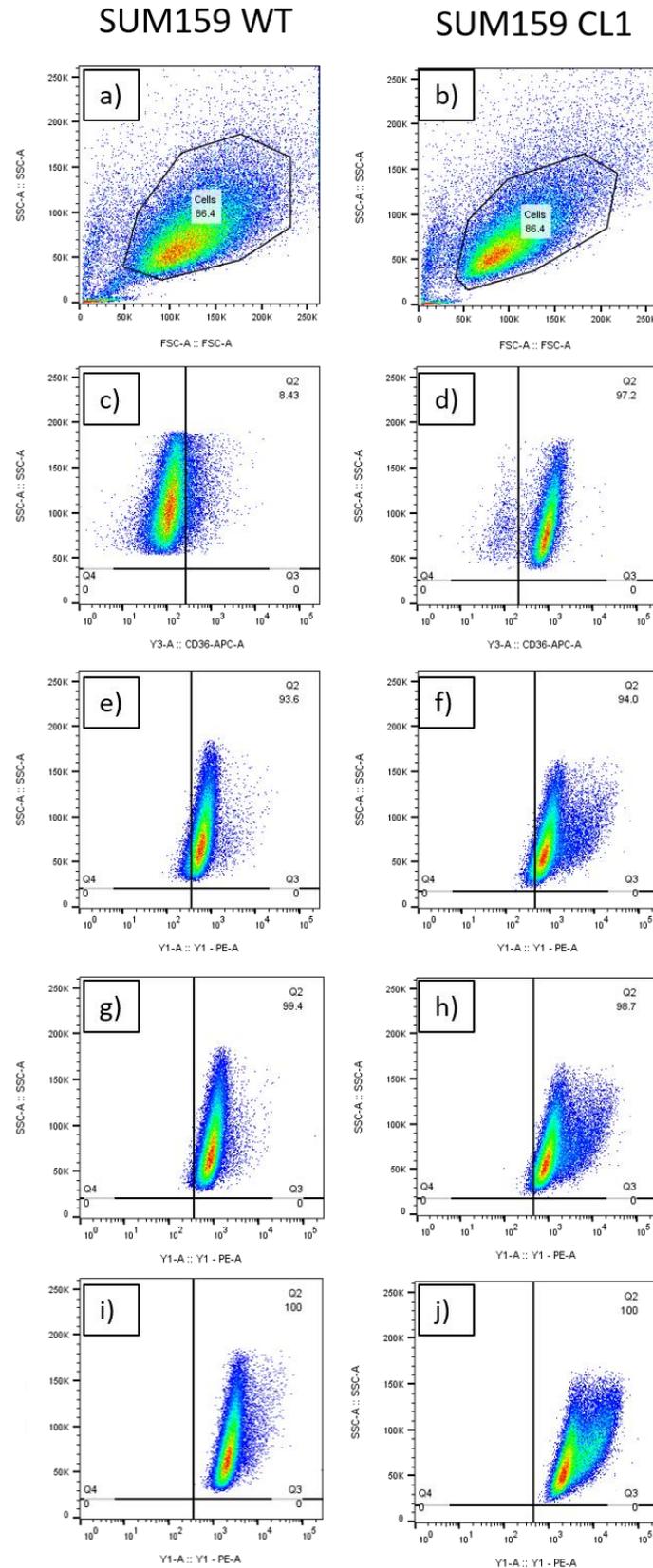


Figure 124 Cytométrie en flux sur des cellules SUM159 WT (gauche) et SUM159 CL1 (droite). (a) et (b), représentation des cellules SUM159 WT et CL1 en fonction de leur taille (FSC-A) et de leur granulosité (SSC-A). (c) et (d), marquage par 5  $\mu$ g d'un anticorps anti-CD36-APC. Marquage par un MIP à empreinte de 93-110 magnétique

à une concentration en fer de : (e) et (f) 0.16 mM, (g) et (h) 0.32 mM, (i) et (j), 0.65 mM.

## II. Synthèse de nanoparticules de polymère par surface solide

### 1. Principe

Il est possible que, lorsque des monomères permettant d'autres types d'interactions soient utilisés, des peptides n'ayant pas pu être imprimés à partir d'acrylamide puissent permettre de synthétiser des nanoparticules capables de cibler CD36.

Dans cette partie, les billes de verre seront fonctionnalisées avec le peptide 248-265 afin d'évaluer si la réalisation d'empreintes de ce peptide (dont l'impression à partir des méthodes décrites au Chapitre 2 n'avait pas permis d'obtenir un ciblage cellulaire), en utilisant une synthèse sur surface solide avec des monomères permettant d'autres interactions que des liaisons hydrogènes, permet d'obtenir des polymères capables de cibler spécifiquement la protéine CD36. Son principe est présenté **Figure 125**. Pour permettre une comparaison objective, le protocole appliqué ici suit strictement ce qui est décrit dans la littérature. La polymérisation est donc amorcée par le couple oxydo-réducteur APS/TEMED, en l'absence de nanoparticules magnétiques.

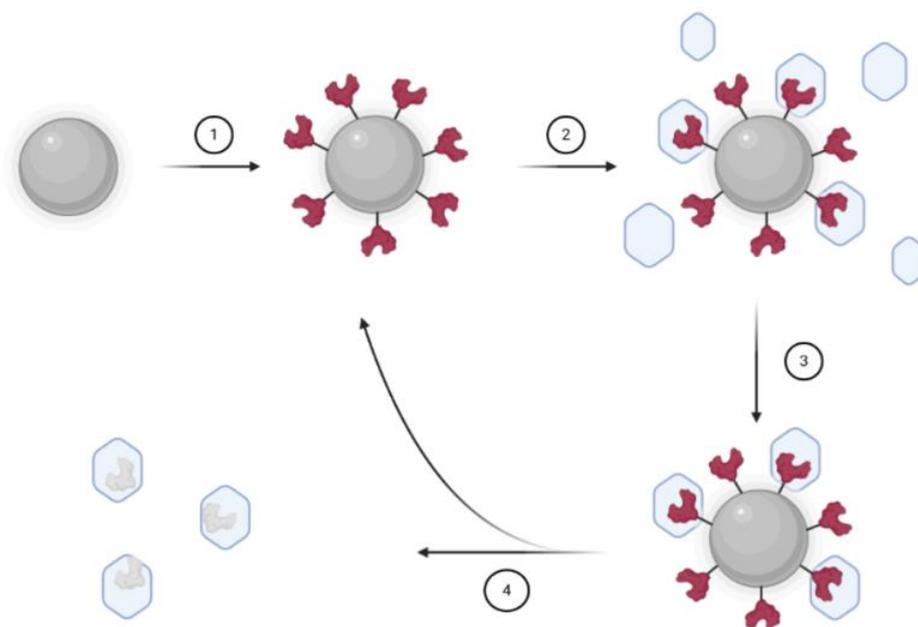


Figure 125 Synthèse sur billes de verre. (1) Des billes de silice sont fonctionnalisées avec la protéine cible. (2) La polymérisation de monomères adaptés forme des nanoparticules de polymères. (3) Le polymère libre est éliminé. (4) Une élévation de température permet le décrochage des polymères spécifiques et leur récupération.

## 2. Polymérisation et purification

Des billes fonctionnalisées avec le peptide 248-265, en suivant la même méthode que précédemment, sont placées dans une solution de monomère contenant du N-isoprpylacrilamide, du N, N'méthylènebisacrylamide, du N-ter-butylacrylamide, du N-(3-aminopropyl), de l'acide acrylique et de l'ArtRhod. Après dégazage de la solution sous flux d'azote, la polymérisation est amorcée par le couple oxydoréducteur APS/TEMED. Au bout d'une heure, les billes (**Figure 126-a**) sont récupérées et lavées à l'eau distillée froide pour éliminer les nanoparticules de polymère de faible affinité et les monomères n'ayant pas réagi. La fluorescence des deux premières solutions de lavage est présentée **Figure 127**. Au fur et à mesure des lavages, la solution devient incolore. Les billes sont ensuite lavées avec de l'eau distillée préalablement chauffée à 60°C afin de collecter les nanoparticules de haute affinité. La fluorescence de cette solution, contenant 0.2 mg/mL de polymère, est plus importante que celle des solutions de lavage à froid ce qui indique bien que des nanoparticules fluorescentes se sont séparées des billes de verre (**Figure 127**).

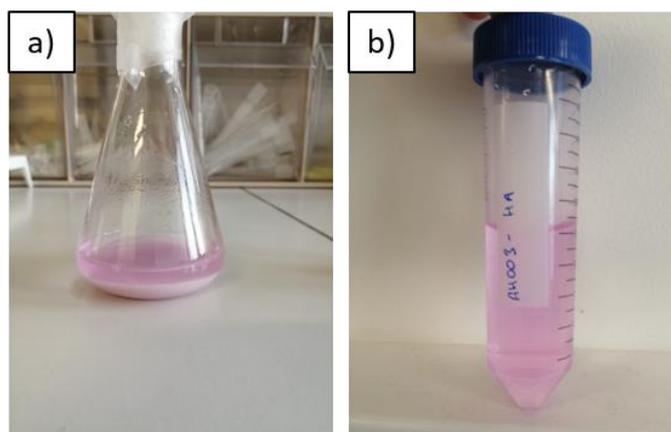


Figure 126 a) Des billes de verre après polymérisation, (b) Un polymère à empreinte de 248-265.

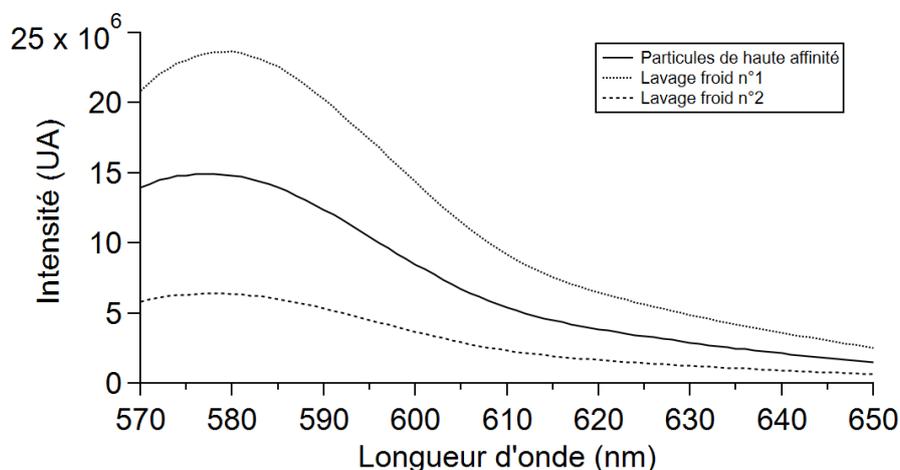


Figure 127 Fluorescence des particules de haute affinité et des premiers lavages à froid.

Les nanoparticules obtenues à l'issue des lavages sont fluorescentes et stables avec un diamètre hydrodynamique proche de 100 nm. Les mesures de taille par DLS indiquent néanmoins la présence d'agrégats de taille plus importante (**Figure 128-a**).

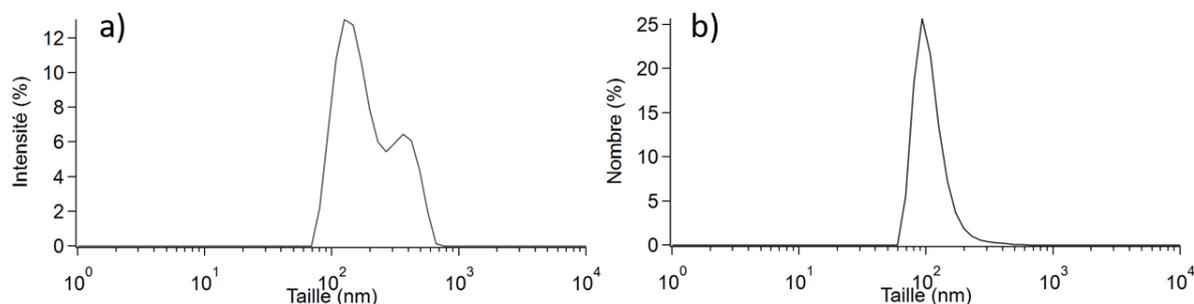


Figure 128 Mesure du diamètre hydrodynamique des particules par DLS. a) Représentation en intensité, b) représentation en nombre.

Une représentation en nombre de cette mesure indique cependant que ces éléments sont minoritaires et que la majorité des nanoparticules a une taille proche de 100nm (**Figure 128-b**). Les clichés de microscopie électronique de l'échantillon montrent des nanoparticules d'une centaine de nanomètre, de morphologie non homogène (**Figure 129**).

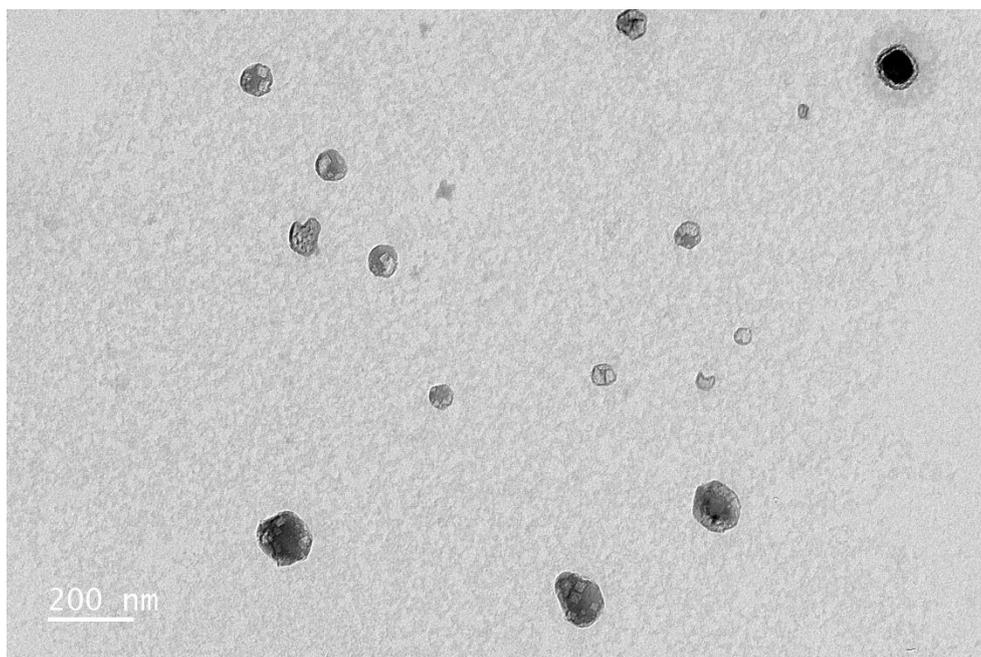
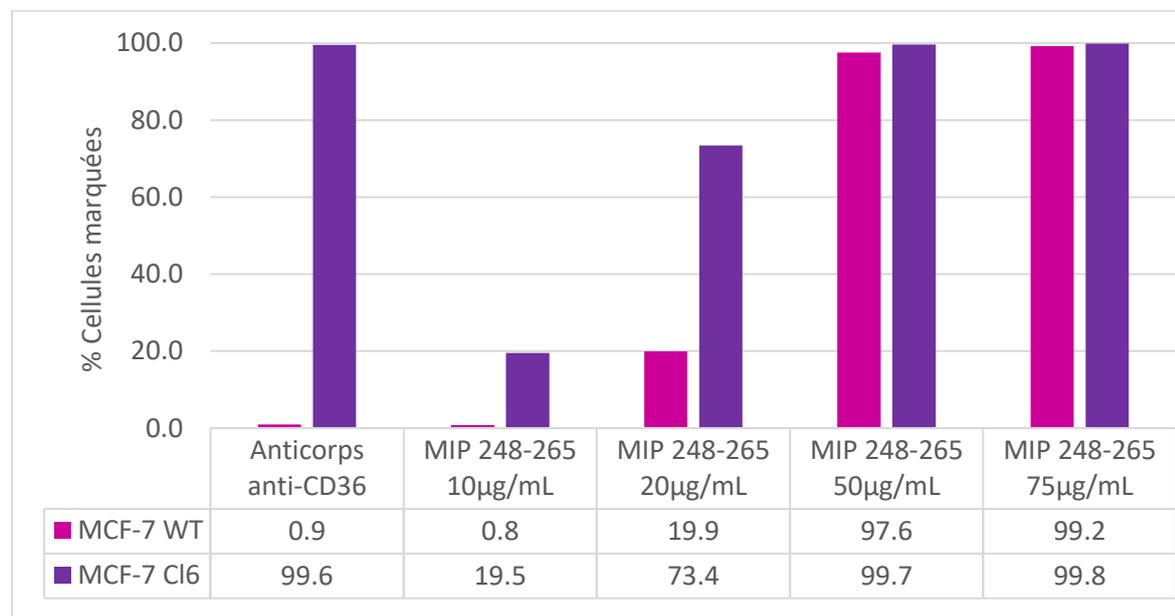


Figure 129 Image de microscopie électronique de l'échantillon.

### 3. Ciblage de la protéine CD36

Pour évaluer la capacité de ces nanoparticules à cibler spécifiquement la protéine CD36, celles-ci ont été incubées avec des cellules MCF-7 WT et des cellules MCF-7 modifiées pour surexprimer la protéine CD36, les cellules MCF-7 CL6. Le marquage a

été évalué par cytométrie en flux et est comparé à celui obtenu à partir d'un anticorps anti-CD36 fluorescent (**Figure 130**).



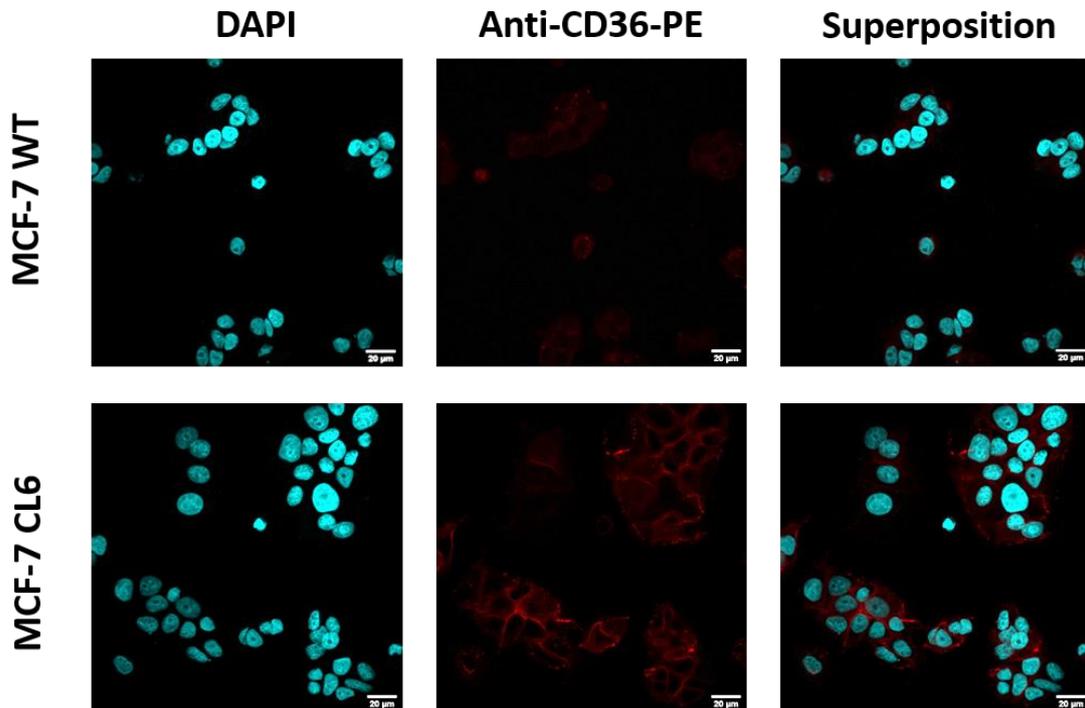
*Figure 130* Pourcentage de cellules MCF-7 WT ou CL6 marquées par un anticorps anti-CD36 ou par MIP de 248-265 à 10, 20, 50 et 75 µg/mL dans du PBS à 1% de sérum.

A faible dose, les cellules avec une forte expression de la protéine CD36 semblent être ciblées préférentiellement par les polymères à empreinte de 248-265 fluorescents. A partir de 50 µg/mL, toutes les cellules sont cependant marquées de façon non spécifique. Par comparaison avec les expériences réalisées au Chapitre 2 page 89, où aucun marquage n'était visible pour cet épitope, y compris à une concentration de 1mg/mL en polymères à empreinte de 248-265, il est possible d'obtenir un marquage à des concentrations très faibles. Il est donc possible que ce mélange de monomères soit plus compatible que l'acrylamide pour réaliser des empreintes de ce peptide.

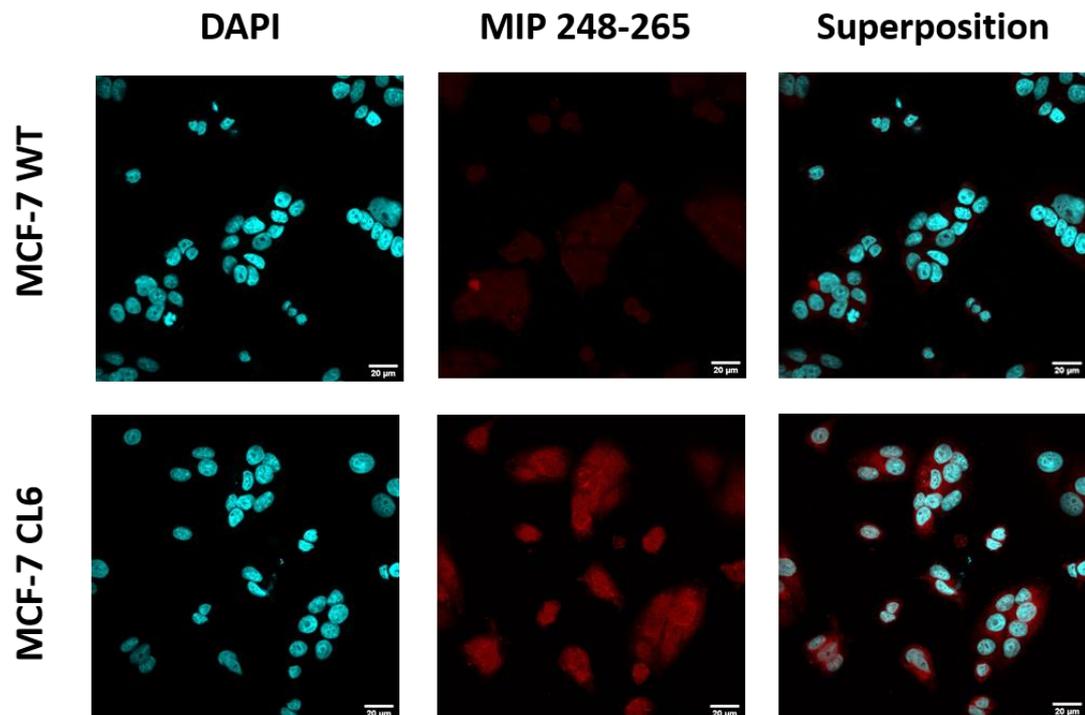
Des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées afin de visualiser le ciblage des cellules surexprimant la protéine CD36 par des polymères à empreinte de CD36 (248-265), comme pour la réalisation d'images d'immunofluorescence classiques. Les marquages sont réalisés sur des cellules fixées dans le but d'éviter l'observation d'une internalisation dans les cellules qui serait due à des phénomènes d'endocytose.

Le marquage avec un anticorps anti-CD36 nous renseigne sur l'expression de la protéine sur les cellules MCF-7 WT et CL6. Si conformément à ce qui est attendu le marquage est très faible sur les cellules MCF-7 WT, il est en revanche observable sur les cellules MCF-7 CL6 (**Figure 131**). Les cellules ont été marquées avec une solution à 40 µg/mL de nanoparticules de polymères à empreinte de CD36 (248-265). On retrouve un marquage nettement plus intense sur les cellules présentant une plus forte

expression de la protéine CD36 (**Figure 132**). Ce résultat confirme ce qui a été obtenu en cytométrie en flux.



*Figure 131 Images de microscopie confocale de cellules MCF-7 et MCF-7 CL6 après incubation avec un anticorps anti-CD36 fluorescent, après projection sur 10 images centrales (en « Average ») sur chaque stack, dans le canal du DAPI, du PE, et une superposition des deux.*



*Figure 132 Images de microscopie confocale de cellules MCF-7 et MCF-7 CL6 après incubation avec des nanoparticules à empreinte de 248-265 à une concentration de 40*

*$\mu\text{g/mL}$  dans du tampon phosphate à 1% de sérum. L'incubation a duré une nuit à  $4^\circ\text{C}$ , sur des cellules préalablement fixées. Images obtenues après projection sur 10 images centrales (en « Average ») sur chaque stack, dans le canal du DAPI, du PE, et une superposition des deux.*

### III. Conclusion

L'utilisation d'une surface solide sur laquelle sont greffés les peptides permet une sélection des nanoparticules présentant une haute affinité pour le peptide. Conformément à ce qui est observé dans la littérature, cette méthode permet de réaliser des polymères à empreintes de protéines.

La synthèse sur surface solide de polymères imprimés magnétiques présentée ici a été réalisée comme étude préliminaire et utilise le peptide 93-110 pour démontrer la faisabilité de la méthode. Lors d'essais pour évaluer d'autres peptides ainsi que l'intégration de Doxorubicine, des problèmes de séparation entre les billes et les nanoparticules de polymère ont été observés. Ils ont par la suite été attribués aux défauts de reproductibilité associés à l'utilisation du DCAA et ont motivé l'étude présentée au Chapitre 2.

La morphologie des nanoparticules en présence de maghémite, et en particulier leur taille, pourrait être améliorée en utilisant les optimisations étudiées dans les chapitres précédents : en les fonctionnalisant par de l'acide acrylique et en utilisant une autre méthode de polymérisation. Une limite se pose néanmoins quant à l'utilisation de cette méthode dans le cadre de ce projet de thèse. Le chauffage nécessaire à la séparation entre les billes et le polymère est incompatible avec l'encapsulation d'une molécule thérapeutique. En effet, l'objectif est d'effectuer une libération par chauffage par hyperthermie. En chauffant pour récupérer les nanoparticules, la molécule thérapeutique risque donc de s'échapper prématurément de la matrice de polymère. Pour contourner ce problème, il est possible de réaliser une seconde couche non thermosensible, avant de séparer les nanoparticules de polymère des billes de verre, contenant la molécule thérapeutique et les nanoparticules magnétiques.

Enfin, ce chapitre illustre l'importance du choix des monomères lorsque l'objectif est de réaliser des polymères à empreinte de protéine. Alors que les polymères réalisés à partir d'acrylamide en présence du peptide 248-265 par photopolymérisation de type II n'avaient pas montré d'affinité particulière pour les cellules surexprimant la protéine CD36, l'utilisation de ce peptide via une synthèse sur surface solide et en particulier en présence d'autres monomères, permettant d'autres types d'interactions, a permis d'obtenir des matériaux capables de cibler cette protéine.

## IV. Matériel et méthodes

### 1. Réactifs

En addition des réactifs utilisés dans les chapitres 2 et 3, les réactifs suivants ont été utilisés.

Hydroxyde de sodium (NaOH, Sigma), 3-aminopropyltriméthoxyxilane (APTMS, Sigma), succinimidyl iodoacetate (SIA, Sigma), toluène anhydre (99,9%, sigma), acétonitrile anhydre (ACN, 99.8%, Sigma), epitopes (Genecust), N-isoprpylacrilamide (NIPAm, Sigma), N, N'méthylènebisacrylamide (BIS, Sigma), N-ter-butylacrylamide (TBAm, Sigma), N-(3-aminopropyl) méthacrylamide (NAMPA, Sigma), acide acrylique (Aac, 99% Sigma).

Billes de verre (58200-U, Supelco, 75µm acid washed), cartouches SPE (fritté 20µm, Sigma),

### 2. Caractérisations

Les caractérisations employées dans ce chapitre sont identiques à celles présentés au Chapitre 2 page 98 et au Chapitre 3 page 137.

### 3. Fonctionnalisation des billes de verre

Pour que les billes présentent une fonction amine à leur surface, la première étape consiste à porter 60 g de billes de verre à ébullition dans 48 mL de NaOH à 4M pendant 15min. Les billes sont lavées à l'eau distillée jusque neutralisation du pH puis à l'acétone. Elles sont ensuite séchées dans une étuve à 80°C. Les billes de verre sont ensuite placées sous atmosphère d'azote et incubées une nuit dans 24mL d'APTMS à 3% v/v dans du toluène anhydre. Les billes sont lavées 8 fois par 25mL d'acétone puis par 25mL de méthanol, avant d'être séchées sous azote. A l'issue de cette étape, les billes présentent des fonctions amines : elles deviennent violettes en présence de ninhydrine. Les billes sont utilisées sous 1 mois et stockées à température ambiante.

Pour fonctionnaliser les billes avec un peptide présentant une cystéine terminale, les billes sont incubées dans 30mL de solution à 0.2 mg/mL de SIA dans l'acétonitrile anhydre préparée juste avant réaction, pendant 2h à température ambiante dans le noir. Les billes sont lavées à l'eau distillée avant d'être incubées avec le peptide à 0.2 mg/mL dans 30 mL de tampon PBS à pH 7.4 pendant une nuit, à température ambiante dans le noir. Les billes sont rincées à l'eau distillée, séchées et conservées à -18°C sous azote. Elles sont en général utilisées immédiatement.

#### 4. Synthèse de nanoparticules de polymère magnétiques

Les nanoparticules de maghémite synthétisées et caractérisées au chapitre 3 ont été fonctionnalisées avec le DCAA présenté au Chapitre 2. Pour cela, 2.4 mg de DCAA, 1.6 mL de suspension de nanoparticules de maghémite à 0.907 M sont mélangés dans de l'eau distillée pour obtenir un volume total de 8.5mL. Après 1h sous agitation orbitale à 320 tours/min, la solution est prête à être utilisée.

Une solution de monomères a été préparée en mélangeant 39 mg de NIPAM, 33 mg de TBAm 4 mg de BIS, 5.8mg de NAMPA, 2.2  $\mu$ L d'Aac et 0.66 mg d'ArtRhod dans 40mL d'eau distillée. Pour réaliser les nanoparticules de polymère magnétiques, 5g de billes de verre fonctionnalisées avec le peptide 93-110 ont été placées dans un erlenmeyer de 50mL. La large surface du fond de ce récipient permet que les billes forment une couche fine. Cette couche de billes est recouverte de 7.5 mL de solution de monomères et de 3 mL de solution de nanoparticules magnétiques avant d'être dégazé sous flux d'azote pendant 15 minutes. L'erlenmeyer est ensuite placé sur la lampe UV dans un bain d'eau pendant 5h. Toutes les 30 minutes, la solution est mélangée manuellement pendant une dizaine de secondes par de légers mouvements de rotation.

Le surnageant de la synthèse est éliminé et les billes sont transférées dans un flacon de 15mL pour lavées par de l'eau distillée à 4°C (8 fois 7 mL, jusqu'à ce que la solution de lavage soit limpide). Le flacon est ensuite placé dans un agitateur chauffant réglé sur 45°C et les billes sont recouvertes d'eau distillée préalablement chauffée à 45°C. Après 30minutes, le surnageant est récupéré. L'opération est répétée 3 fois et les surnageants obtenus sont regroupés.

#### 5. Synthèse de nanoparticules de polymère non magnétiques

Une solution de monomères a été préparée en mélangeant 39 mg de NIPAM, 33 mg de TBAm 4 mg de BIS, 5.8mg de NAMPA, 2.2  $\mu$ L d'Aac et 2mg d'ArtRhod dans 100 mL d'eau distillée. Dans un erlenmeyer, 20 g de billes de verre fonctionnalisées et 33 mL de solution de monomère sont dégazés. La polymérisation est amorcée en ajoutant 10mg d'APS dans 100  $\mu$ L d'eau distillée et 10  $\mu$ L de TEMED au mélange. Après une heure de polymérisation, les billes sont transférées dans une cartouche SPE équipée d'un fritté de 20  $\mu$ m et lavées sous vide par 200 mL (10x20 mL) d'eau distillée froide. Les billes sont ensuite placées dans 15mL d'eau à 60°C pendant 30min avant de récupérer la solution contenant les particules de haute affinité. Cette opération est répétée 3 fois, ce qui permet d'obtenir 45 mL d'échantillon.



# Conclusion Générale



Lors de ces travaux de thèse de nouvelles voies de synthèse ont été développées dans le but d'obtenir des nanoparticules stables et fluorescentes, présentant des propriétés magnétiques leur conférant des propriétés d'hyperthermie en présence d'un champ magnétique alternatif et capables de cibler spécifiquement des cellules cancéreuses mammaires particulièrement agressives.

L'utilisation d'une surface solide, des billes de verre, comme substrat pour la réalisation de nanoparticules de polymère à empreintes d'épitopes a montré des premiers résultats encourageants décrits dans le Chapitre 4, conformément à ce qui est décrit dans la littérature. L'intégration de nanoparticules magnétiques dans cette synthèse a permis d'obtenir des nanoparticules de polymère magnétiques capables de cibler spécifiquement la protéine CD36. Cette voie de synthèse reposait en revanche sur un amorceur photopolymérisable qui, bien que théoriquement pratique pour réaliser une couche de polymère à la surface de nanoparticules, s'est avéré peu fiable en termes de reproductibilité. Les caractéristiques physiques des nanoparticules synthétisées, et en particulier leur taille, supérieure à 200nm, les rendent de plus en plus compatibles avec des applications *in vivo* qui requièrent des particules de plus petite taille.

Ces difficultés ont conduit au développement d'une nouvelle voie de polymérisation : l'utilisation du couple Rhodamine B/Benzophénone pour réaliser des nanoparticules de polymère fluorescentes via une photopolymérisation de type II. L'intégration d'épitopes de la protéine CD36 a permis de synthétiser des polymères capables de cibler préférentiellement les cellules surexprimant la protéine CD36. En plus d'être stables, de taille inférieure à 100nm et fluorescentes, ces nanoparticules de polyacrylamide sont également non-cytotoxiques.

L'utilisation de ce système d'amorçage en présence de nanoparticules de maghémite superparamagnétiques fonctionnalisées avec de l'acide acrylique a conduit à la réalisation de nanoparticules de type cœur-coquille présentant une fine couche de polyacrylamide fluorescent. Au-delà du couplage entre fluorescence et propriétés magnétiques, ces nanoparticules, stables et de taille idéale pour des applications *in vivo*, ont démontré leur capacité à libérer de l'énergie sous forme de chaleur en présence d'un champ magnétique alternatif. La mesure de cet échauffement macroscopique semble indiquer que l'échauffement local dans la couche de polymère devrait être suffisant pour induire la libération d'une molécule thérapeutique, conformément à ce qui a été observé précédemment au laboratoire. La réalisation d'empreintes de protéines à la surface de ces nanoparticules hybrides a cependant été compromise par la perte de la stabilité colloïdale des particules de maghémite fonctionnalisées par l'acide acrylique en présence du peptide. Cette perte de stabilité peut être due au peptide lui-même ou à son solvant, un tampon phosphate dont les sels peuvent déstabiliser les nanoparticules

de maghémite. Le choix de la voie de synthèse et en particulier des monomères utilisés est un élément clé dans l'élaboration d'un polymère imprimé capable de cibler efficacement une protéine. Ainsi, si pour les peptides 93-110 et 155-172, les liaisons hydrogènes établies via l'acrylamide sont suffisantes pour réaliser des empreintes de bonne qualité, ce n'est pas le cas du peptide 248-265, pour lequel des interactions électrostatiques ou hydrophobes ont été nécessaires. Le choix de la séquence peptidique de la cible est également critique et l'absence d'homologie de séquence dans les bases de données protéiques n'est pas un critère de garantie absolue puisque les polymères à empreinte de 139-155 ciblaient les cellules indépendamment de leur expression de CD36.

Les perspectives d'amélioration des méthodes utilisées dans ces travaux de thèse sont nombreuses.

Tout d'abord, la stabilité colloïdale des nanoparticules de maghémite et la qualité de leur fonctionnalisation de surface sont deux éléments clés qui permettront de mener à bien ce projet. Plusieurs pistes sont envisageables, la plus simple, qui est aussi la plus fréquemment utilisée dans la littérature est la formation d'une couche de silice à la surface des nanoparticules de maghémite, par exemple par condensation d'un alkoxysilane à leur surface. Cette méthode permet d'intégrer facilement un fluorophore, une fonction vinyle ou encore des composés chargés permettant d'améliorer la stabilité des nanoparticules. Elle a toutefois l'inconvénient d'introduire une couche supplémentaire donc l'innocuité n'est pas garantie. Une autre piste est d'utiliser des vinyle phosphonate pour fonctionnaliser les nanoparticules de maghémite pour les rendre polymérisables. En effet les phosphonates présentent une affinité plus importante que les carbonates pour les oxydes de fer. La stabilité des nanoparticules lors de la polymérisation reste cependant un élément clé à considérer lors de l'élaboration de telles synthèses.

L'utilisation d'une surface solide est avantageuse pour une future industrialisation puisqu'elle peut permettre à la fois l'automatisation de la synthèse tout en réduisant les coûts de synthèse en cas de réutilisation de la surface. Cette synthèse est cependant incompatible en l'état avec l'incorporation d'une molécule thérapeutique dont la libération serait contrôlée par hyperthermie. En effet, la récupération des particules de haute affinité se fait par chauffage des nanoparticules thermosensibles, une encapsulation dans ce type de polymère conduirait donc à une libération prématurée avant même la fin de la synthèse. Une alternative serait d'encapsuler la molécule thérapeutique ainsi que les nanoparticules magnétiques dans une seconde couche non thermosensible. La réalisation de cette deuxième couche alors que les polymères à empreinte sont encore sur le substrat permettrait de ne pas affecter l'empreinte réalisée tout en évitant une libération précoce de la molécule thérapeutique.

Une fois le système de ciblage et de relargage optimisé obtenu il sera alors possible d'étudier le devenir de ces objets *in vivo* et notamment de déterminer leurs modes de dégradation et d'élimination. L'étude de l'effet de ces nanoparticules sur les

capacités de migration et d'invasion des cellules tumorales mammaires sera ensuite nécessaire, tout comme leur capacité à réduire la taille de tumeurs mammaires triple négatives chez la souris. La présence des nanoparticules de maghémite facilitera le passage à des modèles *in vivo*, leurs propriétés magnétiques les rendant facilement détectables par imagerie à résonance magnétique. Cette première étape permettra alors d'envisager la transposition de ce système de ciblage et de relargage contrôlé chez les patientes atteintes d'un cancer du sein. Il sera alors nécessaire de choisir avec soin la molécule thérapeutique utilisée. Il serait notamment intéressant d'utiliser une molécule agissant directement sur les mécanismes favorisant les processus métastatiques et les résistances aux traitements, comme par exemple en empêchant l'activation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . Un tel système représentera alors une alternative intéressante pour les patientes présentant des tumeurs triples négatives agressives et ne répondant pas aux stratégies thérapeutiques classiques.

*Tableau 14* Tableau récapitulatif des résultats obtenus à partir des différentes synthèses.

Synthèse	Ciblage	Taille	Reproductibilité	Propriétés magnétiques
Polymères magnétiques à empreinte de CD36 sur surface solide	Oui	>200nm	Insuffisante	Non mesurées
Polymères à empreinte de CD36 par photopolymérisation de type II	Oui	<100nm	Bonne	Sans particules magnétiques
Nanoparticules hybrides par photopolymérisation de type II	Sans empreintes	<70 nm	Moyenne	Excellentes

# Annexes

## I. Mesures de taille par DLS

La technique de Diffusion dynamique de la Lumière (DLS), *Dynamic Light Scattering* en anglais, est une méthode non destructive de mesure de la distribution en taille de molécules et de particules dans la région submicronique. Cette méthode permet de remonter au coefficient de diffusion des éléments étudiés et donc à leur taille. Pour cela, un faisceau laser traverse une suspension de molécules ou de particules et le mouvement brownien de celles-ci engendre une fluctuation de l'intensité lumineuse diffusée. C'est l'analyse de ces fluctuations qui permet d'obtenir la vitesse du mouvement brownien des particules et donc de remonter à leur taille via la relation de Stokes-Einstein. Cette taille inclut cependant la couche de solvatation autour de la particule, on parle alors de diamètre hydrodynamique.

Dans ce manuscrit, deux appareils ont été utilisés :

- Un Vasco KIN Particle Size analyser, développé par Cordouan, et qui permet de faire des mesures de DLS *in situ*, directement à l'intérieur des flacons de polymérisation (**Figure 133-a**)
- Un Zetasizer Ultra Red, développé par Malvern Panalytical, utilisé pour effectuer des mesures de potentiel Zeta ainsi que des mesures de diamètre hydrodynamique sur les échantillons purifiés, pour des mesures précises du diamètre (**Figure 133-b**).

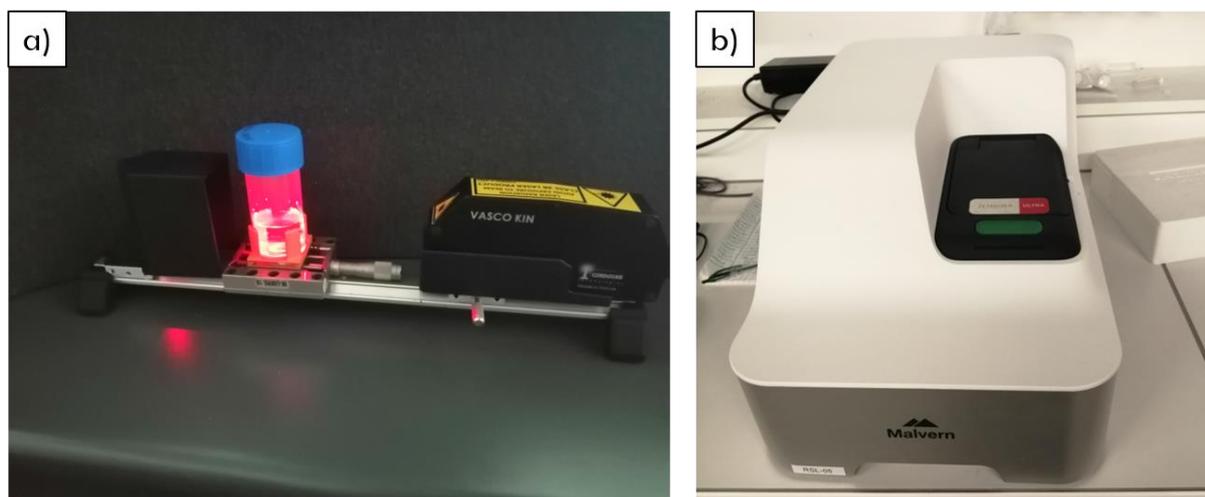


Figure 133 A gauche, appareil Vasco KIN Particle Size analyser, développé par Cordouan, et qui permet de faire des mesures de DLS *in situ*. A droite, un Zetasizer Ultra Red, de Malvern Panalytical.

Le principe de fonctionnement d'un appareil permettant de faire des mesures de DLS est présenté **Figure 134**.

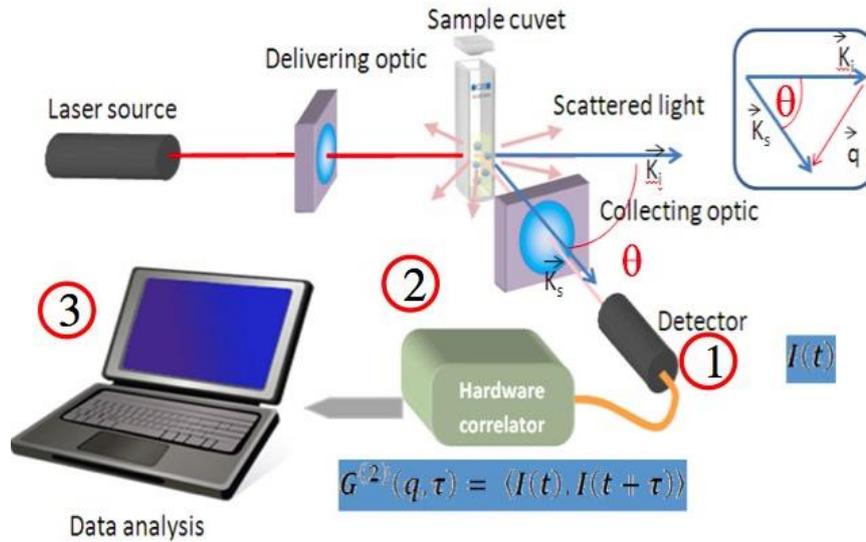


Figure 134 Schéma de principe d'une mesure par DLS. Par Cordouan Tech.

La comparaison entre l'intensité mesurée à un instant  $t$  et un instant  $t + \tau$  permet d'évaluer sa variation au cours du temps. En particulier, les petites particules ont un mouvement brownien rapide, l'intensité lumineuse mesurée varie rapidement. Comme le signal varie rapidement, le coefficient de corrélation, mesuré par l'équation (1), tend rapidement vers son minimum. Par opposition, les grosses particules se déplacent lentement, l'intensité mesurée varie lentement et le coefficient de corrélation tend plus lentement vers son minimum (**Figure 135**).

$$G(\tau) = \langle I(t).I(t + \tau) \rangle = A[1 + B e^{-2\Gamma\tau}] \quad (1)^*$$

$$\text{Avec, } \Gamma = Dq^2$$

$$D_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (2)$$

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin(\vartheta/2) \quad (3)$$

La modélisation de l'évolution du coefficient de diffusion au cours du temps avec les paramètres  $\eta$ , la viscosité du solvant,  $T$ , la température,  $k$ , la constante de Boltzmann,  $n$ , l'indice de réfraction de l'objet,  $\vartheta$ , l'angle de la mesure et  $\lambda_0$ , la longueur d'onde du laser, permet de remonter à  $D_h$ , le diamètre hydrodynamique de l'objet. L'équation de Stokes Einstein telle qu'écrite dans l'expression (2) suppose que les objets étudiés ont une géométrie sphérique.

\* Pour une distribution monodisperse, sinon, pour un échantillon polydisperse, on a

$$G(\tau) = A[1 + B g_1(\tau)^2] \text{ avec } g_1(\tau) = \sum e^{-2\Gamma\tau}$$

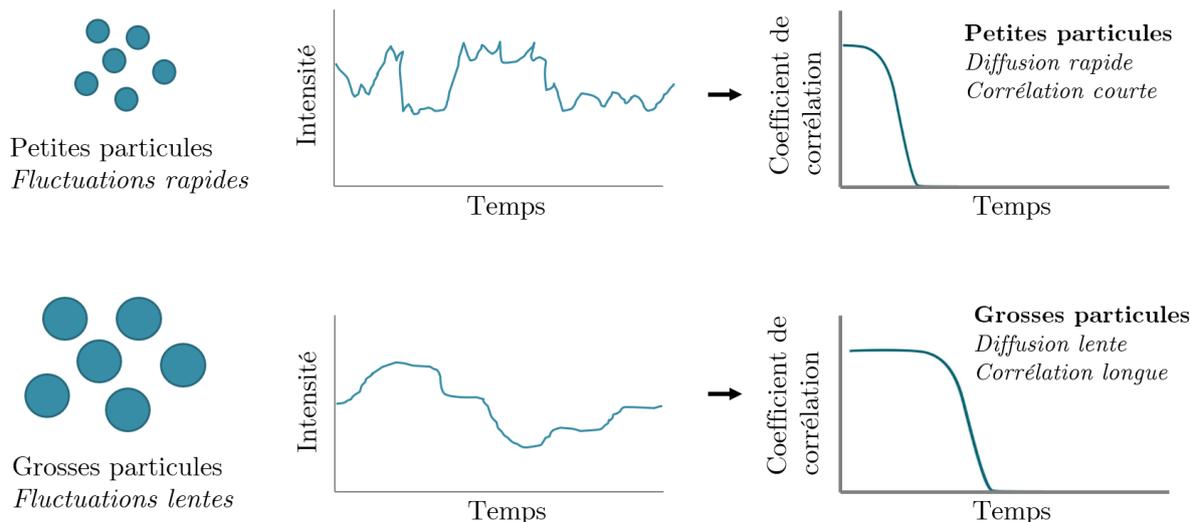


Figure 135 Les petites particules ont un mouvement brownien rapide, l'intensité lumineuse mesurée varie rapidement. Comme le signal varie rapidement, le coefficient de corrélation tend rapidement vers son minimum. Par opposition, les grosses particules bougent lentement, l'intensité mesurée varie lentement et le coefficient de corrélation tend plus lentement vers son minimum.

Pour remonter précisément au diamètre hydrodynamique de particules en solution, il est donc nécessaire de connaître la température et la viscosité du solvant ainsi que l'indice de réfraction des particules. C'est pour cela que lors des mesures *in situ*, ce sont en général les fonctions de corrélation qui sont utilisées dans ce manuscrit pour observer l'évolution du diamètre hydrodynamique, car sa valeur exacte ne peut être qu'approximée : la sonde de température de l'appareil Vasco Kin n'est pas dans l'échantillon et la présence de monomères rend difficile l'évaluation de la viscosité lors de la synthèse. Les mesures de diamètre hydrodynamique sont donc présentées à titre indicatif, elles ne doivent pas être traitées comme des valeurs absolues mais comme une approximation.

Après la purification de l'échantillon, l'eau est le solvant des nanoparticules, l'indice de réfraction est assimilé à celui du latex (ou maghémite) et l'échantillon est placé dans une cuvette et sa température s'équilibre à 25°C avant la mesure dans l'appareil Zetasizer Ultra Red. Il est donc possible de déterminer le diamètre hydrodynamique avec plus de précision sur cet appareil une fois la polymérisation achevée.

## II. Magnétomètre et mesures d'aimantation

Dans un matériau, tout électron non-apparié engendre un petit moment magnétique. Les interactions entre les moments magnétiques d'un échantillon déterminent son aimantation.

Les mesures d'aimantation présentées dans ce manuscrit ont été réalisées avec l'aide précieuse de David Hrabovsky sur un MPMS<sup>3</sup> fabriqué par Quantum Design (**Figure 136**). Il s'agit d'un magnétomètre SQUID, *Superconducting QUantum Interference Device*, permettant une sensibilité de  $10^{-8}$  emu. L'appareil a été utilisé en mode échantillon vibrant (VSM, *Vibrating Sample Mode*). Pendant ce type de mesure, l'échantillon se déplace verticalement à travers un gradiomètre composé de boucles supraconductrices. Ce mouvement produit alors un très faible courant électrique proportionnel au flux magnétique, dont l'intensité dépend de l'aimantation de l'échantillon.

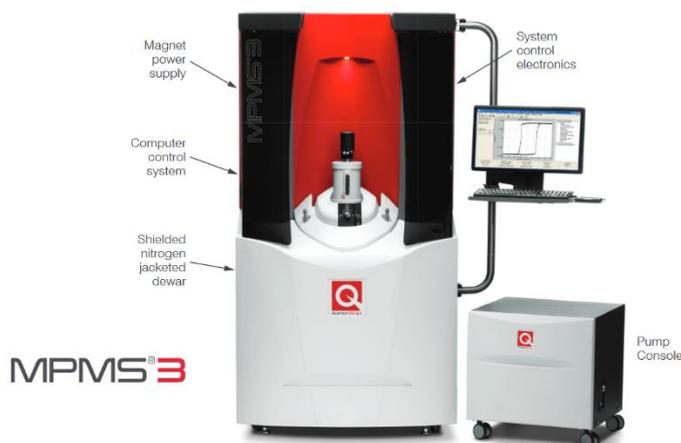


Figure 136 Magnétomètre SQUID MPMS3.

Pour effectuer les mesures présentées, un volume de  $20\mu\text{L}$  d'échantillon est placé dans un eppendorf qui est inséré dans une paille pour être fixé au porte-échantillon. La position de l'échantillon dans la paille est ajustée grossièrement pour être dans la zone de mesure de l'appareil. Cette position est ensuite ajustée finement via une mesure en mode DC avec transport classique. Une fois la position de l'échantillon centrée, l'appareil est paramétré pour faire varier le champ magnétique de 0 à 20 000 Oe, de 20 000 à -20 000 Oe et enfin de -20 000 à 0 Oe, ce qui permet d'obtenir des courbes d'aimantation brutes.

Ces données brutes ont ensuite été traitées pour éliminer composante diamagnétique due à l'eau, à la paille et à l'eppendorf et le champ résiduel de la bobine supraconductrice.

La composante diamagnétique se manifeste par une pente non nulle à haut champ. Pour corriger cette composante, la pente est mesurée au-delà de 10 000 Oe et extraite sur l'ensemble de la mesure (Figure 137).

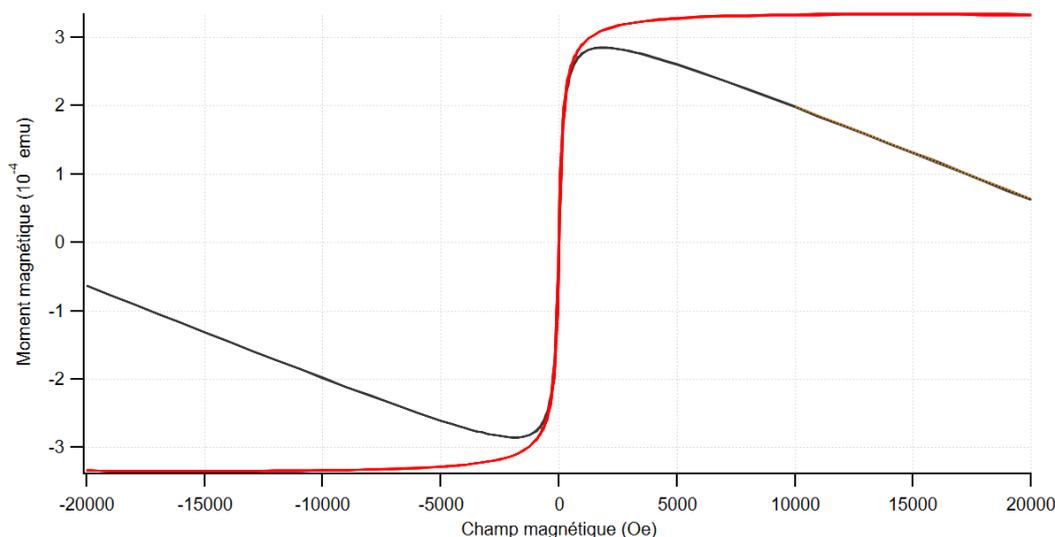


Figure 137 En noir, les données brutes obtenues pour les nanoparticules de maghémite nues, en rouge, la courbe obtenue après correction.

Lorsque l'on observe l'aimantation à bas champ, entre -1000 et 1000 Oe, on peut remarquer que l'aimantation devient nulle avant que le champ n'atteigne 0 ce qui n'est pas physique (Figure 138).

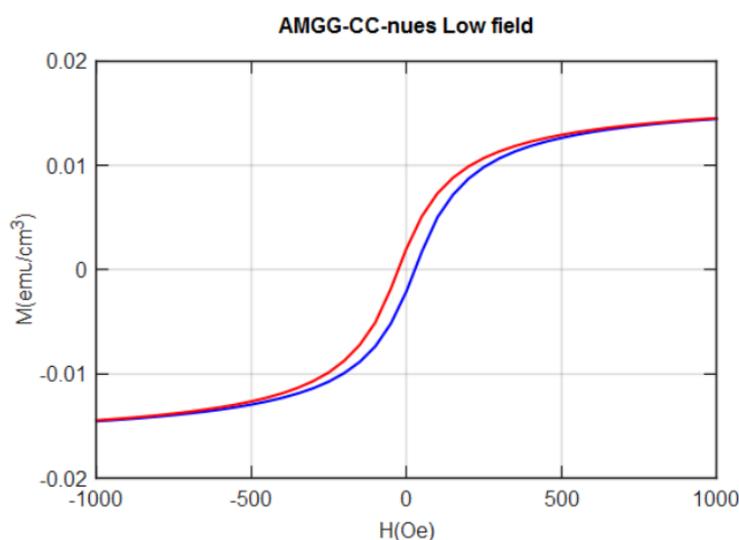


Figure 138 En rouge la courbe sur laquelle le champ est croissant, en bleu, le champ est décroissant. On remarque que l'aimantation est nulle avant que le champ n'atteigne 0 ce qui n'est pas physique.

Le champ résiduel de la bobine supraconductrice est de 25 Oe. Lorsque l'on soustrait cette composante de champ résiduel, l'hystérèse apparente disparaît et on

retrouve une courbe d'aimantation conforme à ce qui est attendu pour des nanoparticules superparamagnétiques (**Figure 139**).

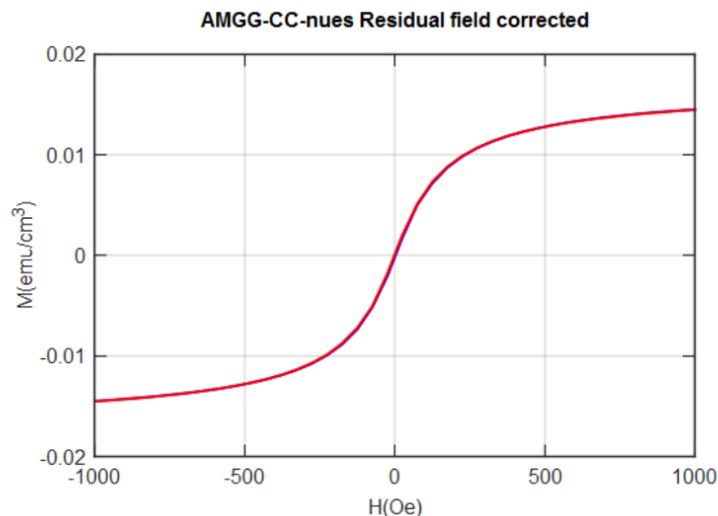


Figure 139 Courbe d'aimantation corrigée du champ résiduel de la bobine supraconductrice.

Les courbes sont enfin normalisées par la masse de fer contenue dans les échantillons mesurés, ce qui permet d'obtenir la valeur de l'aimantation à saturation.

Pour information : 20 000 Oersted = 2 Tesla =  $1.6 \cdot 10^6$  A/m = 20 000 Gauss

### III. Mesure du pouvoir chauffant

La mesure du pouvoir chauffant des nanoparticules repose sur la pseudo-adiabaticité du système, c'est-à-dire que le temps de la mesure et donc de l'échauffement thermique est court par rapport au temps caractéristiques associé aux transferts thermiques. En application des principes de la thermodynamique, on peut écrire :

$$SLP \approx \frac{m_{\text{echantillon}} C_{\text{eau}} \Delta T}{m_{\text{maghémite}} \Delta t} \quad (\text{en } W/g_{\text{maghémite}})$$

Le champ magnétique alternatif est généré par a un dispositif de génération de champ magnétique alternatif D5 series Automated Driver fabriqué par l'entreprise Nanoscale Biomagnetics (**Figure 140**). La bobine utilisée est la bobine CAL1\_0924 qui permet d'obtenir un champ magnétique de 580 Gauss maximum à 147 kHz et de 300 Gauss à 776kHz. Le refroidissement du système est assuré par un circuit hydraulique régulé par un « chiller » entre 17 et 22°C. Au cœur de la bobine, le champ est suffisamment homogène pour que la variation au sein du volume de l'échantillon soit inférieure à 5%.



Figure 140 dispositif de génération de champ magnétique alternatif D5 series Automated Driver fabriqué par l'entreprise Nanoscale Biomagnetics.

La température au sein de l'échantillon est mesurée à l'aide d'une fibre optique qui est placée de sorte à être au centre de l'échantillon.

Comme les échantillons fonctionnalisés avec du polymère sont faiblement concentrés à l'issue de leur synthèse et que les reconcentrer risque de les agréger et donc d'affecter la mesure, les conditions de la mesure ont été optimisés pour cette concentration (0.16 mg/mL de fer). De plus cette optimisation a été réalisée vis-à-vis d'une mesure d'échauffement macroscopique et il est possible que des conditions plus douces soient suffisantes pour produire un échauffement local et induire une libération de la molécule thérapeutique.

Une première constatation, cohérente avec les aspects théoriques discutés dans le chapitre 1 est que lorsque la fréquence du champ magnétique alternatif augmente, l'échauffement mesuré est plus important. Ainsi pour un champ magnétique de 300 Gauss, on a la pente<sub>147kHz</sub> < pente<sub>307kHz</sub> < pente<sub>776kHz</sub> (**Figure 141**).

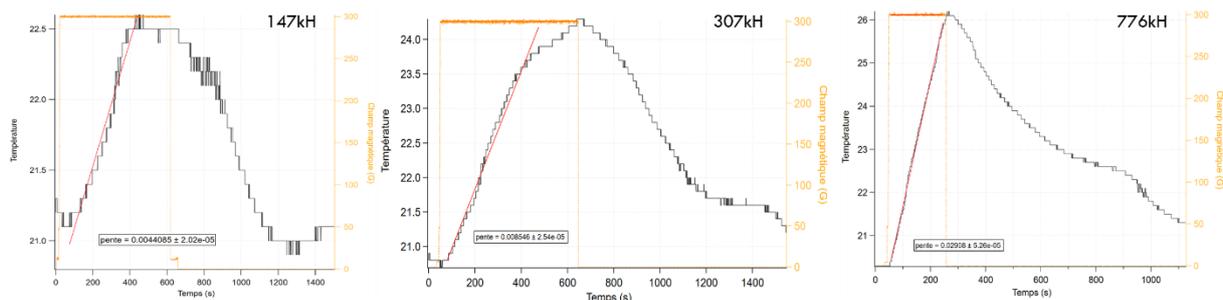


Figure 141 Mesures de l'échauffement par calorimétrie sous un champ de 300 Gauss, à des fréquences de 147kHz, 307kHz ou 776kHz. Le champ magnétique est matérialisé en jaune sur la figure.

Il faut cependant noter qu'à 147 kHz et à 307 kHz, l'hypothèse de pseudo-adiabaticité n'est pas respectée : on observe un ralentissement de l'élévation de température avant l'arrêt du champ magnétique alternatif qui suggère l'existence de transferts thermiques non négligeables à l'échelle du temps de la mesure.

L'augmentation de l'intensité du champ magnétique aux valeurs maximales permises par l'appareil aux fréquences 147 kHz et 307 kHz, respectivement 580 et 400 Gauss, permet d'obtenir un échauffement plus important que celui obtenu à 300 Gauss (**Figure 142**). On peut à nouveau observer la présence de transferts thermiques non négligeables.

Enfin, deux autres fréquences ont été utilisées avec la valeur maximale de champ magnétique permise par l'appareil : 389 kHz et 400 Gauss et 636 kHz et 328 Gauss (**Figure 143**). On constate que plus la fréquence et l'intensité du champ sont importantes, plus l'échauffement mesuré est important. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le **Tableau 15**.

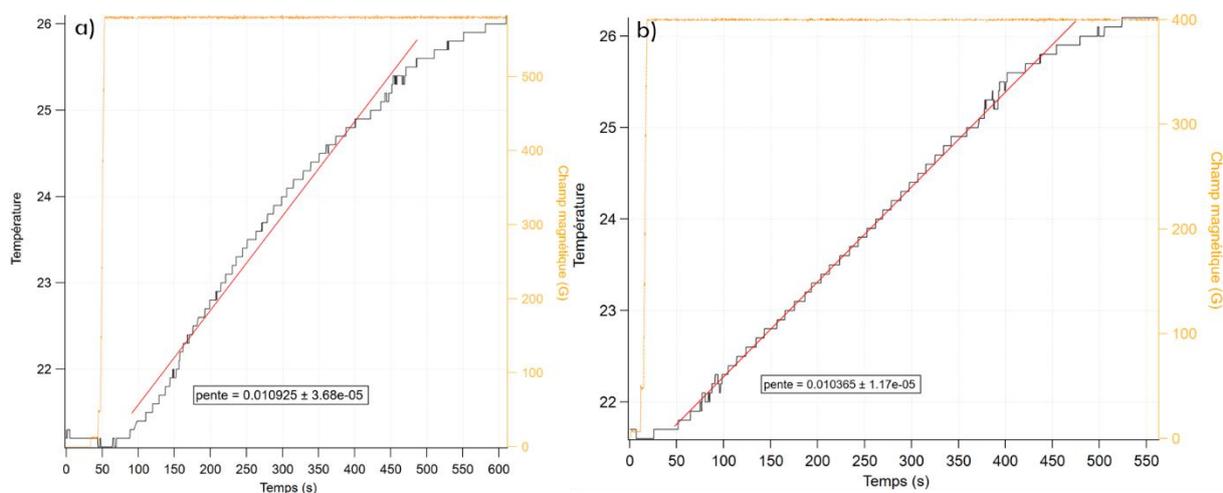


Figure 142 Mesures de l'échauffement par calorimétrie sous un champ de (a) 147kHz et 580 Gauss, (b) 307 kHz et 400 Gauss. Le champ magnétique est matérialisé en jaune sur la figure.

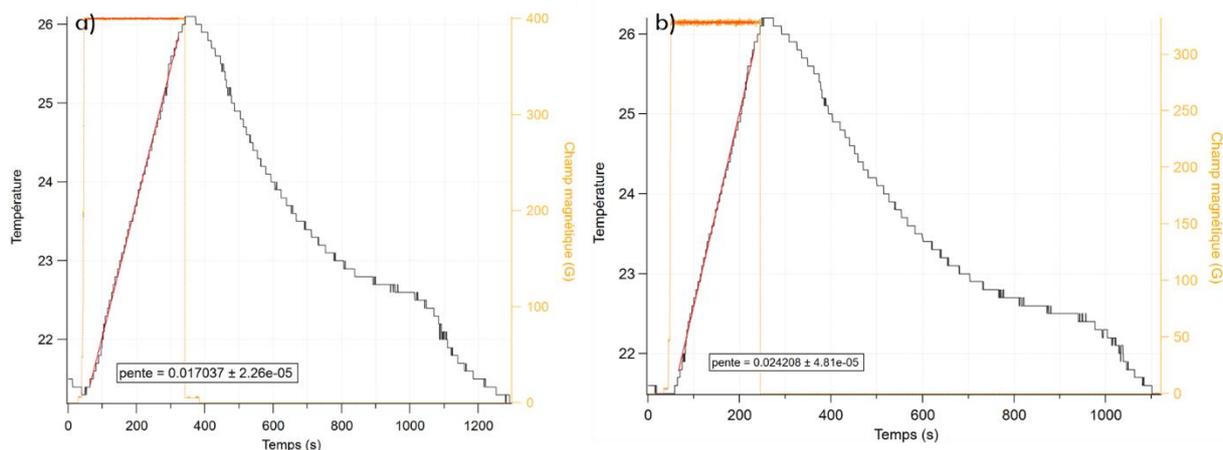


Figure 143 Mesures de l'échauffement par calorimétrie sous un champ de (a) 389 kHz et 400 Gauss, (b) 636 kHz et 328 Gauss. Le champ magnétique est matérialisé en jaune sur la figure.

Tableau 15 Récapitulatif des résultats obtenus en fonction des champs et fréquences utilisés.

Champ	Fréquence	Pente (°C/s)	Transfert thermique
300G	147 kHz	$4.4 \cdot 10^{-3}$	Oui
300G	307 kHz	$6.5 \cdot 10^{-3}$	Oui
<b>300G</b>	<b>776 kHz</b>	<b><math>2.9 \cdot 10^{-2}</math></b>	<b>Non</b>
580 G	147 kHz	$1.1 \cdot 10^{-2}$	Oui
400 G	307 kHz	$1.0 \cdot 10^{-2}$	Oui
400 G	389 kHz	$1.7 \cdot 10^{-2}$	Non
328 G	636 kHz	$2.4 \cdot 10^{-2}$	Non

Parmi les conditions testées, seules 3 ne présentent pas d'atténuation de l'échauffements due à des transferts thermiques et permettent une mesure précise : 636 kHz et 328 Gauss, 389 kHz et 400 Gauss et 776 kHz et 300 Gauss. Comme aucune de ces mesures ne respecte le critère d'acceptabilité  $H \cdot f < 5 \cdot 10^9 \text{ A.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ , les conditions choisies sont celles permettant l'échauffements le plus important, 776 kHz et 300 Gauss, qui permettront de comparer entre eux plusieurs échantillons avec le plus de précision.

## IV. Culture cellulaire

L'ensemble de la culture cellulaire et des expériences associées présentées dans ce manuscrit a été réalisé au sein de l'équipe biologie et thérapeutique du cancer au Centre de Recherche de l'hôpital Saint Antoine.

Plusieurs modèles ont été étudiés dans ce manuscrit :

- Les cellules SUM159 WT et leur clone, les cellules SUM159 CL1, obtenues après transfection par un plasmide codant pour le cDNA de la protéine CD36 permettant ainsi une expression de la protéine de façon stable.
- Les cellules MCF-7 WT et leur clone, les cellules MCF-7 CL6, obtenues après transfection par un plasmide codant pour le cDNA de la protéine CD36 permettant ainsi une expression de la protéine de façon stable.

Les cellules SUM 159 sont des cellules mésenchymateuses « triples négatives » ayant un faible niveau d'expression de la protéine CD36. Les clones CD36<sup>+</sup> de cette lignée ont été préparés par Mehdi Morel pendant ses travaux de thèse. Il a notamment montré à partir de ces clones que cette surexpression augmentait les capacités de prolifération et d'invasion de ces cellules.

Les cellules MCF-7 sont des cellules cancéreuses mammaires de type luminal A de phénotype épithélial qui n'expriment pas la protéine CD36. Les clones de cette lignée ont été préparés par Lila Louadj.

Les cellules SUM159 sont cultivées dans du milieu Ham's F12 supplémenté par 5% de sérum de veau foetal désactivé thermiquement, 10 mM d'HEPES, 1 µg/mL d'hydrocorticone, 5 µg/mL d'insuline humaine et 50 U/mL de pénicilline-streptomycine.

Les cellules MCF-7 sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté par 10% de sérum de veau foetal et 50 U/mL de pénicilline-streptomycine.

Ces cellules étant adhérentes, elles sont cultivées dans des flasques de culture cellulaire, en général d'une surface de 75 cm<sup>2</sup>. Les cellules sont « passées » deux fois par semaine, c'est-à-dire que les cellules sont décollées de leur flasque par de la trypsine et que seule une fraction des cellules estensemencée dans une nouvelle flasque (par exemple 1/3 pour les cellules SUM159). Au-delà de dix passages, une nouvelle fiole de cellules, stockées à l'azote dans du sérum contenant 10% de DMSO, est décongelée.

## V. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une méthode très répandue permettant de mesurer des paramètres physiques mais aussi biologiques de cellules en suspension. Elle permet d'obtenir la taille des cellules, leur granulosité (qui dépend de leur composition interne) mais aussi la mesure de leur fluorescence pouvant donner accès aux protéines exprimées à la surface des cellules ou à leur viabilité lorsqu'un marqueur approprié est utilisé.

A l'intérieur de l'appareil, un système fluide permet d'individualiser les cellules et de les aligner avant de leur faire traverser un faisceau laser. La détection de la lumière diffusée par les cellules lors de leur passage permet alors d'évaluer leur taille (diffusion axiale), leur granulosité (diffusion orthogonale), correspondant à la présence d'hétérogénéités d'indices de réfraction dans la cellule, et leur éventuelle fluorescence. Le nombre de fluorophores détectables par un cytomètre en flux dépend des lasers, filtres et détecteurs dont il est équipé ainsi que de la qualité du système optique le composant.

Les mesures de cytométrie en flux présentées dans ce manuscrit ont été réalisées sur un appareil MACSQuant VYB développé par Milenyi Biotec (**Figure 144**).



*Figure 144* Appareil MACSQuant VYB développé par Milenyi Biotec.

Cet appareil est équipé de 3 lasers : un 405 nm de 40 mW, un 488 nm de 50 mW et un 561 nm de 100 mW. Ce dernier est idéal pour observer la rhodamine B. Dans ce manuscrit, en plus des détecteurs FSC et SSC à (561 nm +/- 4 nm), le détecteur Y1 a été utilisé pour mesurer la fluorescence des cellules associée à de la rhodamine B (586 nm +/- 15 nm) et le détecteur V1 (452 nm +/- 45 nm) a été utilisé pour s'assurer de la viabilité des cellules.

Après l'incubation avec les polymères, les cellules sont lavées au PBS et sont stockés à 4°C ou dans la glace avant la mesure (2h maximum). Juste avant la mesure sur l'appareil 1% de solution de DAPI à 25 µg/mL (un colorant de l'ADN) est ajoutée afin de discriminer les cellules mortes. Les données de cytométrie en flux sont ensuite exportées pour être analysées sur le logiciel Flowjo.

La première étape de l'analyse est de sélectionner les cellules en choisissant la population majoritaire représentative de l'échantillon. Le paramètre FSC représente la taille des cellules tandis que le paramètre SSC représente leur granulosité. Les données peuvent être représentées via l'aire du signal (A) ou sa hauteur (H). Les doublets de cellules sont éliminés en traçant SSC-H en fonction de SSC-A : si l'aire du signal n'est pas proportionnelle à sa hauteur (donc suivant une droite) alors il s'agit d'un doublet de cellule à éliminer. Ensuite, il faut sélectionner les cellules vivantes : ce sont celles qui ne présentent pas de fluorescence DAPI (canal V1, CFP Vioblue).

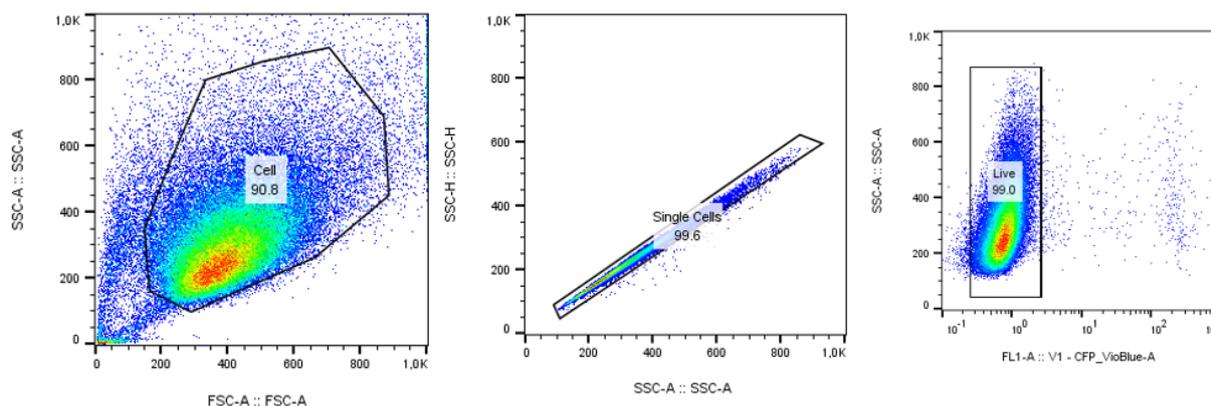


Figure 145 A gauche les cellules brutes représentées en FSC-A/SSC-A et les cellules sélectionnées. Au milieu, la représentation en SSC-A/SSC-H permettant d'éliminer les doublets de cellules. A droite, sélection des cellules vivantes, non marquées par le DAPI.

On peut enfin définir le seuil d'auto fluorescence des cellules sélectionnées dans le canal choisi pour visualiser la fluorescence : 0,1 % des cellules non-marquées peuvent présenter de l'auto fluorescence, on fixe donc le seuil de fluorescence (**Figure 146**). Au-delà de la valeur de fluorescence déterminée, on admet que les cellules sont marquées par le fluorophore, ici les matériaux (canal Y1, PE).

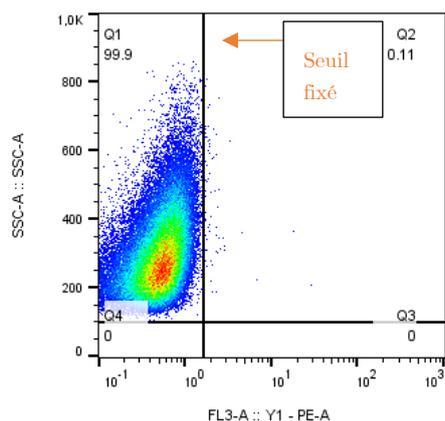


Figure 146 Fixation du seuil de fluorescence sur le Canal Y1, PE, permettant d'observer la rhodamine.

On peut ensuite appliquer ces réglages, effectués sur des cellules non marquées, à l'ensemble des échantillons et observer le pourcentage de cellules marquées par les matériaux.

## VI. Reproductibilité des synthèses amorcées par le DCAA

Lors de la poursuite des études décrites au Chapitre 2, qui portaient notamment sur l'impact de la concentration en DCAA, il a été mis en évidence que des réplicats contrôle d'expériences précédentes pouvaient donner des polymères avec des rendements très différents, voire parfois, rien. Une série d'expériences a donc été réalisée afin de déterminer les éventuelles causes de ces disparités.

Une première hypothèse était qu'une légère variation dans la position des flacons pouvait engendrer une variation importante de l'intensité lumineuse reçue et donc une variation de la cinétique de la polymérisation induisant des variations de taille et de rendement. Dans cette partie, le contenu des flacons est identique et provient d'une même solution. La position des flacons ainsi que leur aspect après 2h de polymérisation sont présentés en **Figure 147**.

Si le contenu des flacons 1, 2 et 4, polymérisés à des positions en apparence équivalentes semblent confirmer l'hypothèse, le contenu du flacon 5 semble très différent alors qu'il est dans une position équivalente à 1, 2 et 4. Le flacon 3 montre que sa position, située entre les deux tubes émettant les UV, reçoit une intensité lumineuse plus faible que les positions situées à la verticale de l'un des deux tubes. On retrouve ces disparités visuelles dans les mesures de DLS *in situ*, avec des fonctions de corrélation similaires pour les flacons 1, 2 et 4, très différentes de celles obtenues pour les flacons 3 et 5.

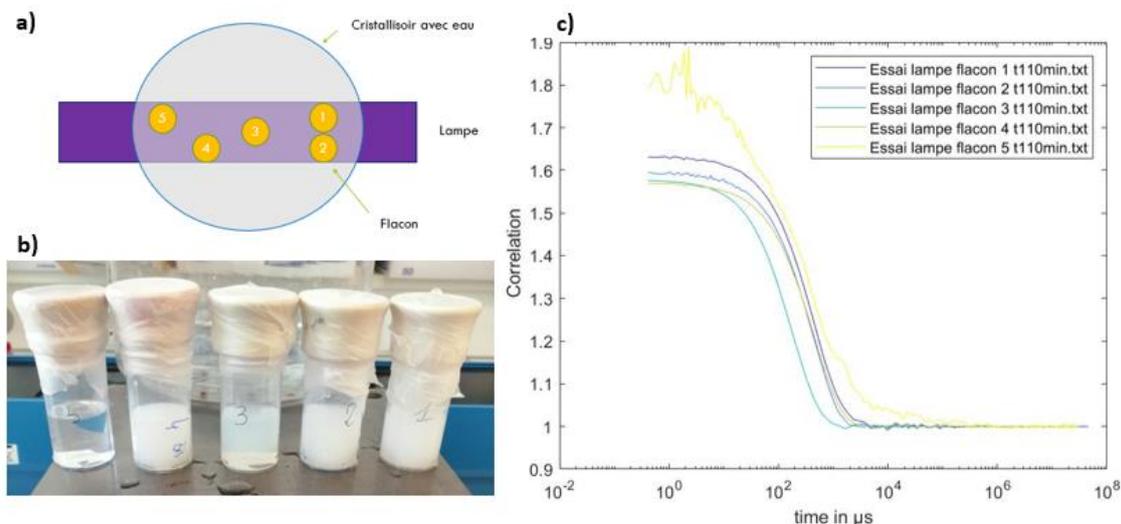


Figure 147 a) position des flacons vue du dessus, b) Aspect des flacons après 110 minutes de polymérisation, c) Fonctions de corrélation obtenues in situ après 110 minutes de polymérisation.

Afin de préciser l'origine des variations observées, en particulier pour le flacon 5, deux nouvelles séries d'expériences identiques ont été réalisées. L'objectif était de déterminer si les disparités observées avaient une cause identifiable. Pour cela, 6 flacons, contenant le même mélange que précédemment, ont été répartis en deux rangées de 3 flacons, chacune positionnée au-dessus d'un des tubes de la lampe. Pour chaque échantillon, sa position, son flacon et son bouchon sont spécifiquement identifiés. L'expérience est ensuite répétée en mélangeant flacons, bouchons et position, afin de pouvoir isoler une éventuelle cause commune affectant la polymérisation. Les positions des flacons, ainsi que leur aspect à l'issue des deux expériences sont présentés **Figure 148**.

A l'issue de la première expérience, le flacon 2 ne contient pas de polymère, les flacons 4 et 5 en contiennent peu et les flacons 1, 3 et 6 contiennent des solutions équivalentes en polymère. A l'issue de la seconde expérience, tous les flacons contiennent des particules de polymère de tailles équivalentes ( $200 \pm 40$  nm) avec des concentrations équivalentes en polymère. En particulier, en croisant les informations entre les deux expériences, les variations ne sont dues ni à un défaut d'étanchéité systématique des bouchons, ni à des irrégularités de transparence des flacons, ni à la position choisie. Une hypothèse non vérifiée ici serait la sensibilité de cette synthèse à la présence d'oxygène combinée à des irrégularités de flux lors de la purge sous azote. Cette purge ayant lieu à partir du réseau d'azote de Sorbonne Université et non d'une bouteille d'azote.

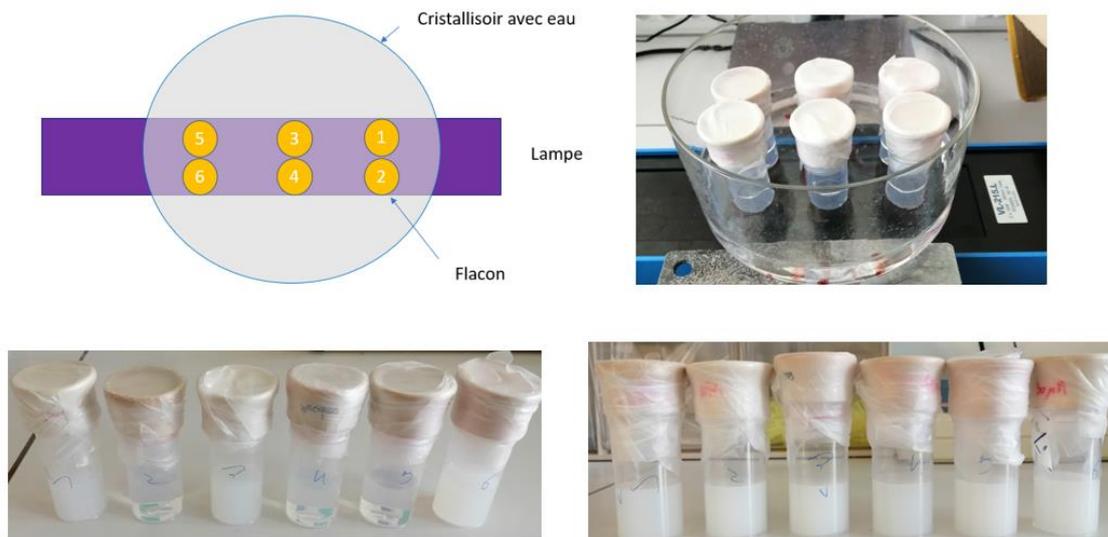


Figure 148 En haut, la position des différents flacons et leur configuration vis-à-vis de la lampe. En bas, l'aspect des flacons à l'issue de la première expérience (à gauche) et de la seconde expérience (à droite). Le volume contenu dans les flacons semble différent pour certains, cela est dû à une chute des flacons après la polymérisation et donc à la présence de solution au niveau des bouchons, non visible sur la photo.

## Bibliographie

- (1) Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* 2022, *12* (1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- (2) Lukaszewicz, S.; Czezelewski, M.; Forma, A.; Baj, J.; Sitarz, R.; Stanislawek, A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers* 2021, *13* (17), 4287. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>.
- (3) Malhotra, G. K.; Zhao, X.; Band, H.; Band, V. Histological, Molecular and Functional Subtypes of Breast Cancers. *Cancer Biology & Therapy* 2010, *10* (10), 955–960. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.10.13879>.
- (4) Joyon, N.; Penault-Llorca, F.; Lacroix-Triki, M. Classification et signatures moléculaires des cancers du sein en 2017. *Oncologie* 2017, *19* (3–4), 64–70. <https://doi.org/10.1007/s10269-017-2700-6>.
- (5) Sonnenblick, A.; Fumagalli, D.; Sotiriou, C.; Piccart, M. Is the Differentiation into Molecular Subtypes of Breast Cancer Important for Staging, Local and Systemic Therapy, and Follow Up? *Cancer Treatment Reviews* 2014, *40* (9), 1089–1095. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.07.005>.
- (6) Li, J. J.; Tsang, J. Y.; Tse, G. M. Tumor Microenvironment in Breast Cancer—Updates on Therapeutic Implications and Pathologic Assessment. *Cancers* 2021, *13* (16), 4233. <https://doi.org/10.3390/cancers13164233>.
- (7) Rybinska, I.; Agresti, R.; Trapani, A.; Tagliabue, E.; Triulzi, T. Adipocytes in Breast Cancer, the Thick and the Thin. *Cells* 2020, *9* (3), 560. <https://doi.org/10.3390/cells9030560>.
- (8) Zaoui, M.; Morel, M.; Louadj, L.; Ferrand, N.; Lamazière, A.; Uzan, C.; Canlorbe, G.; Atlan, M.; Sabbah, M. Adipocytes Secretome from Normal and Tumor Breast Favor Breast Cancer Invasion by Metabolic Reprogramming. *Clin Transl Oncol* 2022, *25* (5), 1389–1401. <https://doi.org/10.1007/s12094-022-03035-y>.
- (9) Zaoui, M.; Morel, M.; Ferrand, N.; Fellahi, S.; Bastard, J.-P.; Lamazière, A.; Larsen, A. K.; Béréziat, V.; Atlan, M.; Sabbah, M. Breast-Associated Adipocytes Secretome Induce Fatty Acid Uptake and Invasiveness in Breast Cancer Cells via CD36 Independently of Body Mass Index, Menopausal Status and Mammary Density. *Cancers* 2019, *11* (12), 2012. <https://doi.org/10.3390/cancers11122012>.
- (10) Liu, Y.; Zhou, Q.; Song, S.; Tang, S. Integrating Metabolic Reprogramming and Metabolic Imaging to Predict Breast Cancer Therapeutic Responses. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2021, *32* (10), 762–775. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.07.001>.
- (11) Zhao, J.; Xie, F.; Yang, Y.; Wang, S. Reprogramming of Fatty Acid Metabolism in Breast Cancer: A Narrative Review. *Translational Breast Cancer Research* 2021, *2* (1). <https://doi.org/10.21037/tbcr-20-53>.

- (12) Pascual, G.; Avgustinova, A.; Mejetta, S.; Martín, M.; Castellanos, A.; Attolini, C. S.-O.; Berenguer, A.; Prats, N.; Toll, A.; Hueto, J. A.; Bescós, C.; Di Croce, L.; Benitah, S. A. Targeting Metastasis-Initiating Cells through the Fatty Acid Receptor CD36. *Nature* 2017, *541* (7635), 41–45. <https://doi.org/10.1038/nature20791>.
- (13) Moon, J. S.; Karunakaran, U.; Suma, E.; Chung, S. M.; Won, K. C. KoreaMed Synapse. *Diabetes Metab J* 2020, *44* (2), 222–233. <https://doi.org/10.4093/dmj.2020.0053>.
- (14) Tontonoz, P.; Nagy, L.; Alvarez, J. G. A.; Thomazy, V. A.; Evans, R. M. PPAR $\gamma$  Promotes Monocyte/Macrophage Differentiation and Uptake of Oxidized LDL. *Cell* 1998, *93* (2), 241–252. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81575-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81575-5).
- (15) Vallée, A.; Lecarpentier, Y. Crosstalk Between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma and the Canonical WNT/ $\beta$ -Catenin Pathway in Chronic Inflammation and Oxidative Stress During Carcinogenesis. *Frontiers in Immunology* 2018, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00745>.
- (16) Ladanyi, A.; Mukherjee, A.; Kenny, H. A.; Johnson, A.; Mitra, A. K.; Sundaresan, S.; Nieman, K. M.; Pascual, G.; Benitah, S. A.; Montag, A.; Yamada, S. D.; Abumrad, N. A.; Lengyel, E. Adipocyte-Induced CD36 Expression Drives Ovarian Cancer Progression and Metastasis. *Oncogene* 2018, *37* (17), 2285–2301. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0093-z>.
- (17) Pan, J.; Fan, Z.; Wang, Z.; Dai, Q.; Xiang, Z.; Yuan, F.; Yan, M.; Zhu, Z.; Liu, B.; Li, C. CD36 Mediates Palmitate Acid-Induced Metastasis of Gastric Cancer via AKT/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin Pathway. *J Exp Clin Cancer Res* 2019, *38* (1), 52. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1049-7>.
- (18) Wang, Y. Y.; Attané, C.; Milhas, D.; Dirat, B.; Dauvillier, S.; Guerard, A.; Gilhodes, J.; Lazar, I.; Alet, N.; Laurent, V.; Le Gonidec, S.; Biard, D.; Hervé, C.; Bost, F.; Ren, G. S.; Bono, F.; Escourrou, G.; Prentki, M.; Nieto, L.; Valet, P.; Muller, C. Mammary Adipocytes Stimulate Breast Cancer Invasion through Metabolic Remodeling of Tumor Cells. *JCI Insight* 2017, *2* (4). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.87489>.
- (19) Yang, P.; Su, C.; Luo, X.; Zeng, H.; Zhao, L.; Wei, L.; Zhang, X.; Varghese, Z.; Moorhead, J. F.; Chen, Y.; Ruan, X. Z. Dietary Oleic Acid-Induced CD36 Promotes Cervical Cancer Cell Growth and Metastasis via up-Regulation Src/ERK Pathway. *Cancer Letters* 2018, *438*, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.09.006>.
- (20) Ladanyi, A.; Mukherjee, A.; Kenny, H. A.; Johnson, A.; Mitra, A. K.; Sundaresan, S.; Nieman, K. M.; Pascual, G.; Benitah, S. A.; Montag, A.; Yamada, S. D.; Abumrad, N. A.; Lengyel, E. Adipocyte-Induced CD36 Expression Drives Ovarian Cancer Progression and Metastasis. *Oncogene* 2018, *37* (17), 2285–2301. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0093-z>.
- (21) Feng, W. W.; Wilkins, O.; Bang, S.; Ung, M.; Li, J.; An, J.; Del Genio, C.; Canfield, K.; DiRenzo, J.; Wells, W.; Gaur, A.; Robey, R. B.; Guo, J. Y.; Powles,

- R. L.; Sotiriou, C.; Pusztai, L.; Febbraio, M.; Cheng, C.; Kinlaw, W. B.; Kurokawa, M. CD36-Mediated Metabolic Rewiring of Breast Cancer Cells Promotes Resistance to HER2-Targeted Therapies. *Cell Reports* 2019, 29 (11), 3405-3420.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.008>.
- (22) Liang, Y.; Han, H.; Liu, L.; Duan, Y.; Yang, X.; Ma, C.; Zhu, Y.; Han, J.; Li, X.; Chen, Y. CD36 Plays a Critical Role in Proliferation, Migration and Tamoxifen-Inhibited Growth of ER-Positive Breast Cancer Cells. *Oncogenesis* 2018, 7 (12), 98. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0107-x>.
- (23) Pascual, G.; Avgustinova, A.; Mejetta, S.; Martín, M.; Castellanos, A.; Attolini, C. S.-O.; Berenguer, A.; Prats, N.; Toll, A.; Huetto, J. A.; Bescós, C.; Di Croce, L.; Benitah, S. A. Targeting Metastasis-Initiating Cells through the Fatty Acid Receptor CD36. *Nature* 2017, 541 (7635), 41–45. <https://doi.org/10.1038/nature20791>.
- (24) Nath, A.; Li, I.; Roberts, L. R.; Chan, C. Elevated Free Fatty Acid Uptake via CD36 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep* 2015, 5 (1), 14752. <https://doi.org/10.1038/srep14752>.
- (25) Ruan, C.; Meng, Y.; Song, H. CD36: An Emerging Therapeutic Target for Cancer and Its Molecular Mechanisms. *J Cancer Res Clin Oncol* 2022, 148 (7), 1551–1558. <https://doi.org/10.1007/s00432-022-03957-8>.
- (26) Polychemotherapy for Early Breast Cancer: An Overview of the Randomised Trials. *The Lancet* 1998, 352 (9132), 930–942. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)03301-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)03301-7).
- (27) Frénel, J.-S.; Campone, M. Chimiothérapie des cancers du sein non métastatiques : état des lieux en 2010. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 2010, 39 (8, Supplement), F79–F84. <https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2010.10.005>.
- (28) Batta, A.; Kalra, B. S.; Khirasaria, R. Trends in FDA Drug Approvals over Last 2 Decades: An Observational Study. *J Family Med Prim Care* 2020, 9 (1), 105–114. [https://doi.org/10.4103/jfmprc.jfmprc\\_578\\_19](https://doi.org/10.4103/jfmprc.jfmprc_578_19).
- (29) Liston, D. R.; Davis, M. Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for Nonclinical Studies. *Clinical Cancer Research* 2017, 23 (14), 3489–3498. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3083>.
- (30) Horwitz, K. B.; Sartorius, C. A. Progesterone and Progesterone Receptors in Breast Cancer: Past, Present, Future. *J Mol Endocrinol* 2020, 65 (1), T49–T63. <https://doi.org/10.1530/JME-20-0104>.
- (31) Slamon, D. J.; Clark, G. M.; Wong, S. G.; Levin, W. J.; Ullrich, A.; McGuire, W. L. Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/Neu Oncogene. *Science* 1987, 235 (4785), 177–182. <https://doi.org/10.1126/science.3798106>.
- (32) Loibl, S.; Gianni, L. HER2-Positive Breast Cancer. *The Lancet* 2017, 389 (10087), 2415–2429. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32417-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32417-5).

- (33) Ahmed, S.; Sami, A.; Xiang, J. HER2-Directed Therapy: Current Treatment Options for HER2-Positive Breast Cancer. *Breast Cancer* 2015, *22* (2), 101–116. <https://doi.org/10.1007/s12282-015-0587-x>.
- (34) Dalenc, F.; Sarradin, V.; Nicolai, V.; Franchet, C.; Ung, M. PARPi, immunothérapies et anticorps monoclonaux conjugués dans les cancers du sein triple-négatifs. *Bulletin du Cancer* 2021, *108* (1), 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2020.11.007>.
- (35) Chivot, J.; Ferrand, N.; Fert, A.; Van Dreden, P.; Morichon, R.; Sabbah, M. PARP Inhibitor Inhibits the Vasculogenic Mimicry through a NF-KB-PTX3 Axis Signaling in Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, *23* (24), 16171. <https://doi.org/10.3390/ijms232416171>.
- (36) Cortés, J.; André, F.; Gonçalves, A.; Kümmel, S.; Martín, M.; Schmid, P.; Schuetz, F.; Swain, S. M.; Easton, V.; Pollex, E.; Deurloo, R.; Dent, R. IMPassion132 Phase III Trial: Atezolizumab and Chemotherapy in Early Relapsing Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Future Oncology* 2019, *15* (17), 1951–1961. <https://doi.org/10.2217/fon-2019-0059>.
- (37) Jabbarzadeh Kaboli, P.; Shabani, S.; Sharma, S.; Partovi Nasr, M.; Yamaguchi, H.; Hung, M.-C. Shedding Light on Triple-Negative Breast Cancer with Trop2-Targeted Antibody-Drug Conjugates. *Am J Cancer Res* 2022, *12* (4), 1671–1685.
- (38) Jin, Y.; Schladetsch, M. A.; Huang, X.; Balunas, M. J.; Wiemer, A. J. Stepping Forward in Antibody-Drug Conjugate Development. *Pharmacology & Therapeutics* 2022, *229*, 107917. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107917>.
- (39) Marmé, F. Antibody-Drug Conjugates for Breast Cancer. *Oncol Res Treat* 2022, *45* (1–2), 26–36. <https://doi.org/10.1159/000521499>.
- (40) Polyakov, M.; Kuleshina, L.; Neimark, I. On the Dependence of Silica Gel Adsorption Properties on the Character of Its Porosity. *Russ J Phys Chem* 1937, *10*, 100–106.
- (41) Dickey, F. H. Specific Adsorption. *J. Phys. Chem.* 1955, *59* (8), 695–707. <https://doi.org/10.1021/j150530a006>.
- (42) Curti, R.; Colombo, U. Active Sites in Stereoselective Adsorbents as Models of Drug Receptors and Enzyme Active Sites. *Chim. Ind.* 1951, *23*, 103.
- (43) Beckett, A. H.; Anderson, P. A Method for the Determination of the Configuration of Organic Molecules Using ‘Stereo-Selective Adsorbents.’ *Nature* 1957, *179* (4569), 1074–1075. <https://doi.org/10.1038/1791074a0>.
- (44) Wulff, G. Fourty Years of Molecular Imprinting in Synthetic Polymers: Origin, Features and Perspectives. *Microchim Acta* 2013, *180* (15), 1359–1370. <https://doi.org/10.1007/s00604-013-0992-9>.

- (45) Arshady, R.; Mosbach, K. Synthesis of Substrate-Selective Polymers by Host-Guest Polymerization. *Die Makromolekulare Chemie* 1981, *182* (2), 687–692. <https://doi.org/10.1002/macp.1981.021820240>.
- (46) Mostafa, A. M.; Barton, S. J.; Wren, S. P.; Barker, J. Review on Molecularly Imprinted Polymers with a Focus on Their Application to the Analysis of Protein Biomarkers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2021, *144*, 116431. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116431>.
- (47) Dowding, P. J.; Vincent, B. Suspension Polymerisation to Form Polymer Beads. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2000, *161* (2), 259–269. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(99\)00375-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(99)00375-1).
- (48) Zhang, H.; Dramou, P.; He, H.; Tan, S.; Pham-Huy, C.; Pan, H. Molecularly Imprinted Stationary Phase Prepared by Reverse Micro-Emulsion Polymerization for Selective Recognition of Gatifloxacin in Aqueous Media. *Journal of Chromatographic Science* 2012, *50* (6), 499–508. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms028>.
- (49) Zhao, G.; Liu, J.; Liu, M.; Han, X.; Peng, Y.; Tian, X.; Liu, J.; Zhang, S. Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer via Emulsion Polymerization for Application in Solanesol Separation. *Applied Sciences* 2020, *10* (8), 2868. <https://doi.org/10.3390/app10082868>.
- (50) Chen, H.; Son, S.; Zhang, F.; Yan, J.; Li, Y.; Ding, H.; Ding, L. Rapid Preparation of Molecularly Imprinted Polymers by Microwave-Assisted Emulsion Polymerization for the Extraction of Florfenicol in Milk. *Journal of Chromatography B* 2015, *983–984*, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.01.003>.
- (51) Hang, H.; Li, C.; Pan, J.; Li, L.; Dai, J.; Dai, X.; Yu, P.; Feng, Y. Selective Separation of Lambda-cyhalothrin by Porous/Magnetic Molecularly Imprinted Polymers Prepared by Pickering Emulsion Polymerization. *Journal of Separation Science* 2013, *36* (19), 3285–3294. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300494>.
- (52) Ramakers, G.; Wackers, G.; Trouillet, V.; Welle, A.; Wagner, P.; Junkers, T. Laser-Grafted Molecularly Imprinted Polymers for the Detection of Histamine from Organocatalyzed Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* 2019, *52* (6), 2304–2313. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b02339>.
- (53) Destarac, M. On the Critical Role of RAFT Agent Design in Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerization. *Polymer Reviews* 2011, *51* (2), 163–187. <https://doi.org/10.1080/15583724.2011.568130>.
- (54) Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. RAFT Polymerization and Some of Its Applications. *Chemistry – An Asian Journal* 2013, *8* (8), 1634–1644. <https://doi.org/10.1002/asia.201300262>.
- (55) Artificial Antibodies for Troponin T by Its Imprinting on the Surface of Multi-walled Carbon Nanotubes: Its Use as Sensory Surfaces. *Biosensors and Bioelectronics* 2011, *28* (1), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.026>.

- (56) Moreira, F. T. C.; Sharma, S.; Dutra, R. A. F.; Noronha, J. P. C.; Cass, A. E. G.; Sales, M. G. F. Detection of Cardiac Biomarker Proteins Using a Disposable Based on a Molecularly Imprinted Polymer Grafted onto Graphite. *Microchim Acta* 2015, *182* (5), 975–983. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1409-0>.
- (57) Lv, Y.; Qin, Y.; Svec, F.; Tan, T. Molecularly Imprinted Plasmonic Nanosensor for Selective SERS Detection of Protein Biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics* 2016, *80*, 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.092>.
- (58) Sener, G.; Ozgur, E.; Rad, A. Y.; Uzun, L.; Say, R.; Denizli, A. Rapid Real-Time Detection of Procalcitonin Using a Microcontact Imprinted Surface Plasmon Resonance Biosensor. *Analyst* 2013, *138* (21), 6422–6428. <https://doi.org/10.1039/C3AN00958K>.
- (59) Dabrowski, M.; Lach, P.; Cieplak, M.; Kutner, W. Nanostructured Molecularly Imprinted Polymers for Protein Chemosensing. *Biosensors and Bioelectronics* 2018, *102*, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.045>.
- (60) Bai, W.; Gariano, N. A.; Spivak, D. A. Macromolecular Amplification of Binding Response in Superaptamer Hydrogels. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, *135* (18), 6977–6984. <https://doi.org/10.1021/ja400576p>.
- (61) Bai, W.; Spivak, D. A. A Double-Imprinted Diffraction-Grating Sensor Based on a Virus-Responsive Super-Aptamer Hydrogel Derived from an Impure Extract. *Angewandte Chemie International Edition* 2014, *53* (8), 2095–2098. <https://doi.org/10.1002/anie.201309462>.
- (62) Guo, M.-J.; Zhao, Z.; Fan, Y.-G.; Wang, C.-H.; Shi, L.-Q.; Xia, J.-J.; Long, Y.; Mi, H.-F. Protein-Imprinted Polymer with Immobilized Assistant Recognition Polymer Chains. *Biomaterials* 2006, *27* (24), 4381–4387. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.04.002>.
- (63) Liu, D.; Yang, Q.; Jin, S.; Song, Y.; Gao, J.; Wang, Y.; Mi, H. Core–Shell Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles with Assistant Recognition Polymer Chains for Effective Recognition and Enrichment of Natural Low-Abundance Protein. *Acta Biomaterialia* 2014, *10* (2), 769–775. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.007>.
- (64) Rachkov, A.; Minoura, N. Towards Molecularly Imprinted Polymers Selective to Peptides and Proteins. The Epitope Approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 2001, *1544* (1), 255–266. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00226-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00226-0).
- (65) Rachkov, A.; Minoura, N. Recognition of Oxytocin and Oxytocin-Related Peptides in Aqueous Media Using a Molecularly Imprinted Polymer Synthesized by the Epitope Approach. *Journal of Chromatography A* 2000, *889* (1), 111–118. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00568-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00568-9).
- (66) Poma, A.; Guerreiro, A.; Whitcombe, M. J.; Piletska, E. V.; Turner, A. P. F.; Piletsky, S. A. Solid-Phase Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer

- Nanoparticles with a Reusable Template—“Plastic Antibodies.” *Advanced Functional Materials* 2013, 23 (22), 2821–2827. <https://doi.org/10.1002/adfm.201202397>.
- (67) Cáceres, C.; Moczko, E.; Basozabal, I.; Guerreiro, A.; Piletsky, S. Molecularly Imprinted Nanoparticles (NanoMIPs) Selective for Proteins: Optimization of a Protocol for Solid-Phase Synthesis Using Automatic Chemical Reactor. *Polymers* 2021, 13 (3), 314. <https://doi.org/10.3390/polym13030314>.
- (68) Poma, A.; Guerreiro, A.; Caygill, S.; Moczko, E.; Piletsky, S. Automatic Reactor for Solid-Phase Synthesis of Molecularly Imprinted Polymeric Nanoparticles (MIP NPs) in Water. *RSC Adv.* 2014, 4 (8), 4203–4206. <https://doi.org/10.1039/C3RA46838K>.
- (69) Ashley, J.; Feng, X.; Halder, A.; Zhou, T.; Sun, Y. Dispersive Solid-Phase Imprinting of Proteins for the Production of Plastic Antibodies. *Chemical communications* 2018. <https://doi.org/10.1039/c8cc00343b>.
- (70) Abbott, B.; Bedwell, T. S.; Grillo, F.; Piletsky, S.; Whitcombe, M. J.; Piletska, E.; Garcia-Cruz, A.; Cowen, T.; Piletsky, S. A. Use of Polymeric Solid Phase in Synthesis of MIP Nanoparticles for Biotin. *Reactive and Functional Polymers* 2022, 170, 105109. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105109>.
- (71) Hoshino, Y.; Kodama, T.; Okahata, Y.; Shea, K. J. Peptide Imprinted Polymer Nanoparticles: A Plastic Antibody. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130 (46), 15242–15243. <https://doi.org/10.1021/ja8062875>.
- (72) S. Bedwell, T.; Anjum, N.; Ma, Y.; Czulak, J.; Poma, A.; Piletska, E.; J. Whitcombe, M.; A. Piletsky, S. New Protocol for Optimisation of Polymer Composition for Imprinting of Peptides and Proteins. *RSC Advances* 2019, 9 (48), 27849–27855. <https://doi.org/10.1039/C9RA05009D>.
- (73) Yarman, A.; Kurbanoglu, S.; Zebger, I.; Scheller, F. W. Simple and Robust: The Claims of Protein Sensing by Molecularly Imprinted Polymers. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2021, 330, 129369. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129369>.
- (74) Whitcombe, M. J.; Chianella, I.; Larcombe, L.; Piletsky, S. A.; Noble, J.; Porter, R.; Horgan, A. The Rational Development of Molecularly Imprinted Polymer-Based Sensors for Protein Detection. *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40 (3), 1547–1571. <https://doi.org/10.1039/C0CS00049C>.
- (75) Ma, X.; Jiang, Z.; Li, J. An Electrochemiluminescence Sensor of Magnetic Glycosyl-Imprinted Microspheres Based on Multi-Probe Signal Amplification for CD44v6 Determination. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2021, 333, 129562. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129562>.
- (76) Ansari, S.; Masoum, S. Recent Advances and Future Trends on Molecularly Imprinted Polymer-Based Fluorescence Sensors with Luminescent Carbon Dots. *Talanta* 2021, 223, 121411. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121411>.

- (77) Piloto, A. M.; Ribeiro, D. S. M.; Rodrigues, S. S. M.; Santos, C.; Santos, J. L. M.; Sales, M. G. F. Plastic Antibodies Tailored on Quantum Dots for an Optical Detection of Myoglobin down to the Femtomolar Range. *Sci Rep* 2018, 8 (1), 4944. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23271-z>.
- (78) Zhou, J.; Gan, N.; Hu, F.; Li, T.; Zhou, H.; Li, X.; Zheng, L. A Single Antibody Sandwich Electrochemiluminescence Immunosensor Based on Protein Magnetic Molecularly Imprinted Polymers Mimicking Capture Probes. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2013, 186, 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.06.021>.
- (79) Zhou, L.; Wang, Y.; Xing, R.; Chen, J.; Liu, J.; Li, W.; Liu, Z. Orthogonal Dual Molecularly Imprinted Polymer-Based Plasmonic Immunosandwich Assay: A Double Characteristic Recognition Strategy for Specific Detection of Glycoproteins. *Biosens Bioelectron* 2019, 145, 111729. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111729>.
- (80) Battaglia, F.; Bonelli, F.; Sgorbini, M.; Intorre, L.; Minunni, M.; Scarano, S.; Meucci, V. Molecularly Imprinted Polymers as Effective Capturing Receptors in a Pseudo-ELISA Immunoassay for Procalcitonin Detection in Veterinary Species. *Analytical Methods* 2023, 15 (1), 27–35. <https://doi.org/10.1039/D2AY01175A>.
- (81) Cáceres, C.; Canfarotta, F.; Chianella, I.; Pereira, E.; Moczko, E.; Esen, C.; Guerreiro, A.; Piletska, E.; Whitcombe, M. J.; Piletsky, S. A. Does Size Matter? Study of Performance of Pseudo-ELISAs Based on Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles Prepared for Analytes of Different Sizes. *Analyst* 2016, 141 (4), 1405–1412. <https://doi.org/10.1039/C5AN02018B>.
- (82) Smolinska-Kempisty, K.; Guerreiro, A.; Canfarotta, F.; Cáceres, C.; Whitcombe, M. J.; Piletsky, S. A Comparison of the Performance of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Small Molecule Targets and Antibodies in the ELISA Format. *Sci Rep* 2016, 6 (1), 37638. <https://doi.org/10.1038/srep37638>.
- (83) Cowen, T.; Karim, K.; Piletsky, S. A. Solubility and Size of Polymer Nanoparticles. *Polym. Chem.* 2018, 9 (36), 4566–4573. <https://doi.org/10.1039/C8PY00829A>.
- (84) Chen, G.; Qiu, J.; Fang, X.; Xu, J.; Cai, S.; Chen, Q.; Liu, Y.; Zhu, F.; Ouyang, G. Boronate Affinity–Molecularly Imprinted Biocompatible Probe: An Alternative for Specific Glucose Monitoring. *Chemistry – An Asian Journal* 2016, 11 (16), 2240–2245. <https://doi.org/10.1002/asia.201600797>.
- (85) Rahmati, E.; Rafiee, Z. A Biocompatible High Surface Area ZnO-Based Molecularly Imprinted Polymer for the Determination of Meloxicam in Water Media and Plasma. *New J. Chem.* 2019, 43 (22), 8492–8501. <https://doi.org/10.1039/C9NJ01386E>.
- (86) Aeinehvand, R.; Zahedi, P.; Kashani-Rahimi, S.; Fallah-Darrehchi, M.; Shamsi, M. Synthesis of Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate)-Based Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles Containing Timolol Maleate: Morphological, Thermal, and

- Drug Release along with Cell Biocompatibility Studies. *Polymers for Advanced Technologies* 2017, 28 (7), 828–841. <https://doi.org/10.1002/pat.3986>.
- (87) Canfarotta, F.; Waters, A.; Sadler, R.; McGill, P.; Guerreiro, A.; Papkovsky, D.; Haupt, K.; Piletsky, S. Biocompatibility and Internalization of Molecularly Imprinted Nanoparticles. *Nano Res.* 2016, 9 (11), 3463–3477. <https://doi.org/10.1007/s12274-016-1222-7>.
- (88) Boitard, C.; Curcio, A.; Rollet, A.-L.; Wilhelm, C.; Ménager, C.; Griffete, N. Biological Fate of Magnetic Protein-Specific Molecularly Imprinted Polymers: Toxicity and Degradation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2019, 11 (39), 35556–35565. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b11717>.
- (89) Kassem, S.; Piletsky, S. S.; Yesilkaya, H.; Gazioglu, O.; Habtom, M.; Canfarotta, F.; Piletska, E.; Spivey, A. C.; Aboagye, E. O.; Piletsky, S. A. Assessing the In Vivo Biocompatibility of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles. *Polymers* 2022, 14 (21), 4582. <https://doi.org/10.3390/polym14214582>.
- (90) Liu, R.; Cui, Q.; Wang, C.; Wang, X.; Yang, Y.; Li, L. Preparation of Sialic Acid-Imprinted Fluorescent Conjugated Nanoparticles and Their Application for Targeted Cancer Cell Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9 (3), 3006–3015. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b14320>.
- (91) Liu, T.; Qiao, Z.; Wang, J.; Zhang, P.; Zhang, Z.; Guo, D.-S.; Yang, X. Molecular Imprinted S-Nitrosothiols Nanoparticles for Nitric Oxide Control Release as Cancer Target Chemotherapy. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.078>.
- (92) Yin, D.; Wang, S.; He, Y.; Liu, J.; Zhou, M.; Ouyang, J.; Liu, B.; Chen, H.-Y.; Liu, Z. Surface-Enhanced Raman Scattering Imaging of Cancer Cells and Tissues via Sialic Acid-Imprinted Nanotags. *Chem. Commun.* 2015, 51 (100), 17696–17699. <https://doi.org/10.1039/C5CC05174F>.
- (93) Zhang, W.; Kang, J.; Li, P.; Liu, L.; Wang, H.; Tang, B. Two-Photon Fluorescence Imaging of Sialylated Glycans in Vivo Based on a Sialic Acid Imprinted Conjugated Polymer Nanoprobe. *Chem. Commun.* 2016, 52 (97), 13991–13994. <https://doi.org/10.1039/C6CC08211D>.
- (94) Wang, S.; Yin, D.; Wang, W.; Shen, X.; Zhu, J.-J.; Chen, H.-Y.; Liu, Z. Targeting and Imaging of Cancer Cells via Monosaccharide-Imprinted Fluorescent Nanoparticles. *Scientific Reports* 2016, 6 (1), 22757. <https://doi.org/10.1038/srep22757>.
- (95) Panagiotopoulou, M.; Kunath, S.; Medina-Rangel, P. X.; Haupt, K.; Bui, B. T. S. Fluorescent Molecularly Imprinted Polymers as Plastic Antibodies for Selective Labeling and Imaging of Hyaluronan and Sialic Acid on Fixed and Living Cells. *Biosensors & bioelectronics* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.080>.
- (96) Peng, H.; Qin, Y.-T.; He, X.-W.; Li, W.-Y.; Zhang, Y.-K. Epitope Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Chemo-/Photodynamic Synergistic Cancer

- Therapy Guided by Targeted Fluorescence Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2020, 12 (11), 13360–13370. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c00468>.
- (97) Hashemi-Moghaddam, H.; Zavareh, S.; Karimpour, S.; Madanchi, H. Evaluation of Molecularly Imprinted Polymer Based on HER2 Epitope for Targeted Drug Delivery in Ovarian Cancer Mouse Model. *Reactive and Functional Polymers* 2017, 121, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.10.025>.
- (98) Canfarotta, F.; Lezina, L.; Guerreiro, A.; Czulak, J.; Petukhov, A.; Daks, A.; Smolinska-Kempisty, K.; Poma, A.; Piletsky, S.; Barlev, N. A. Specific Drug Delivery to Cancer Cells with Double-Imprinted Nanoparticles against Epidermal Growth Factor Receptor. *Nano Lett.* 2018, 18 (8), 4641–4646. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b03206>.
- (99) Cecchini, A.; Raffa, V.; Canfarotta, F.; Signore, G.; Piletsky, S.; MacDonald, M. P.; Cuschieri, A. In Vivo Recognition of Human Vascular Endothelial Growth Factor by Molecularly Imprinted Polymers. *Nano Lett.* 2017, 17 (4), 2307–2312. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b05052>.
- (100) Wang, H.-Y.; Cao, P.-P.; He, Z.-Y.; He, X.-W.; Li, W.-Y.; Li, Y.-H.; Zhang, Y.-K. Targeted Imaging and Targeted Therapy of Breast Cancer Cells via Fluorescent Double Template-Imprinted Polymer Coated Silicon Nanoparticles by an Epitope Approach. *Nanoscale* 2019, 11 (36), 17018–17030. <https://doi.org/10.1039/C9NR04655K>.
- (101) Jia, C.; Zhang, M.; Zhang, Y.; Ma, Z.-B.; Xiao, N.-N.; He, X.-W.; Li, W.-Y.; Zhang, Y.-K. Preparation of Dual-Template Epitope Imprinted Polymers for Targeted Fluorescence Imaging and Targeted Drug Delivery to Pancreatic Cancer BxPC-3 Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2019, 11 (35), 32431–32440. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b11533>.
- (102) Park, H.; Otte, A.; Park, K. Evolution of Drug Delivery Systems: From 1950 to 2020 and Beyond. *Journal of Controlled Release* 2022, 342, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.030>.
- (103) Guimarães, D.; Cavaco-Paulo, A.; Nogueira, E. Design of Liposomes as Drug Delivery System for Therapeutic Applications. *International Journal of Pharmaceutics* 2021, 601, 120571. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120571>.
- (104) Bulbake, U.; Doppalapudi, S.; Kommineni, N.; Khan, W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* 2017, 9 (2), 12. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>.
- (105) Barenholz, Y. (Chezy). Doxil® — The First FDA-Approved Nano-Drug: Lessons Learned. *Journal of Controlled Release* 2012, 160 (2), 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
- (106) Forssen, E. A. The Design and Development of DaunoXome® for Solid Tumor Targeting in Vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997, 24 (2), 133–150. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00453-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00453-X).

- (107) Domínguez, A. R.; Hidalgo, D. O.; Garrido, R. V.; Sánchez, E. T. Liposomal Cytarabine (DepoCyte®) for the Treatment of Neoplastic Meningitis. *Clin Transl Oncol* 2005, 7 (6), 232–238. <https://doi.org/10.1007/BF02710168>.
- (108) Batist, G.; Barton, J.; Chaikin, P.; Swenson, C.; Welles, L. Myocet (Liposome-Encapsulated Doxorubicin Citrate): A New Approach in Breast Cancer Therapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2002, 3 (12), 1739–1751. <https://doi.org/10.1517/14656566.3.12.1739>.
- (109) Venkatakrisnan, K.; Liu, Y.; Noe, D.; Mertz, J.; Bargfrede, M.; Marbury, T.; Farbakhsh, K.; Oliva, C.; Milton, A. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Liposomal Mifamurtide in Adult Volunteers with Mild or Moderate Renal Impairment. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2014, 77 (6), 986–997. <https://doi.org/10.1111/bcp.12260>.
- (110) Silverman, J. A.; Deitcher, S. R. Marqibo® (Vincristine Sulfate Liposome Injection) Improves the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Vincristine. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013, 71 (3), 555–564. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-2042-4>.
- (111) Zhang, H. Onivyde for the Therapy of Multiple Solid Tumors. *Oncotargets and Therapy* 2016, 9, 3001–3007. <https://doi.org/10.2147/OTT.S105587>.
- (112) Su, S.; Kang, P. M. Systemic Review of Biodegradable Nanomaterials in Nanomedicine. *Nanomaterials (Basel)* 2020, 10 (4), 656. <https://doi.org/10.3390/nano10040656>.
- (113) Kotelevets, L.; Chastre, E.; Caron, J.; Mougín, J.; Bastian, G.; Pineau, A.; Walker, F.; Lehy, T.; Desmaële, D.; Couvreur, P. A Squalene-Based Nanomedicine for Oral Treatment of Colon Cancer. *Cancer Research* 2017, 77 (11), 2964–2975. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1741>.
- (114) Dormont, F.; Brusini, R.; Cailleau, C.; Reynaud, F.; Peramo, A.; Gendron, A.; Mougín, J.; Gaudin, F.; Varna, M.; Couvreur, P. Squalene-Based Multidrug Nanoparticles for Improved Mitigation of Uncontrolled Inflammation in Rodents. *Science Advances* 2020, 6 (23), eaaz5466. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz5466>.
- (115) Bordat, A.; Boissenot, T.; Ibrahim, N.; Ferrere, M.; Levêque, M.; Potiron, L.; Denis, S.; Garcia-Argote, S.; Carvalho, O.; Abadie, J.; Cailleau, C.; Pieters, G.; Tsapis, N.; Nicolas, J. A Polymer Prodrug Strategy to Switch from Intravenous to Subcutaneous Cancer Therapy for Irritant/Vesicant Drugs. *J. Am. Chem. Soc.* 2022, 144 (41), 18844–18860. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c04944>.
- (116) Zhang, K.; Tang, X.; Zhang, J.; Lu, W.; Lin, X.; Zhang, Y.; Tian, B.; Yang, H.; He, H. PEG–PLGA Copolymers: Their Structure and Structure-Influenced Drug Delivery Applications. *Journal of Controlled Release* 2014, 183, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.026>.

- (117) Otsuka, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. PEGylated Nanoparticles for Biological and Pharmaceutical Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003, *55* (3), 403–419. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00226-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00226-0).
- (118) Cho, H.; Gao, J.; Kwon, G. S. PEG-b-PLA Micelles and PLGA-b-PEG-b-PLGA Sol–Gels for Drug Delivery. *Journal of Controlled Release* 2016, *240*, 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.015>.
- (119) Haley, B.; Frenkel, E. Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2008, *26* (1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2007.03.015>.
- (120) Hong, L.; Wang, Z.; Wei, X.; Shi, J.; Li, C. Antibodies against Polyethylene Glycol in Human Blood: A Literature Review. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2020, *102*, 106678. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2020.106678>.
- (121) Eliaz, R. E.; Szoka, F. C., Jr. Liposome-Encapsulated Doxorubicin Targeted to CD44: A Strategy to Kill CD44-Overexpressing Tumor Cells1. *Cancer Research* 2001, *61* (6), 2592–2601.
- (122) Wang, L.; Su, W.; Liu, Z.; Zhou, M.; Chen, S.; Chen, Y.; Lu, D.; Liu, Y.; Fan, Y.; Zheng, Y.; Han, Z.; Kong, D.; Wu, J. C.; Xiang, R.; Li, Z. CD44 Antibody-Targeted Liposomal Nanoparticles for Molecular Imaging and Therapy of Hepatocellular Carcinoma. *Biomaterials* 2012, *33* (20), 5107–5114. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.067>.
- (123) Arabi, L.; Badiie, A.; Mosaffa, F.; Jaafari, M. R. Targeting CD44 Expressing Cancer Cells with Anti-CD44 Monoclonal Antibody Improves Cellular Uptake and Antitumor Efficacy of Liposomal Doxorubicin. *Journal of Controlled Release* 2015, *220*, 275–286. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.044>.
- (124) Alshaer, W.; Hillaireau, H.; Vergnaud, J.; Ismail, S.; Fattal, E. Functionalizing Liposomes with Anti-CD44 Aptamer for Selective Targeting of Cancer Cells. *Bioconjugate Chem.* 2015, *26* (7), 1307–1313. <https://doi.org/10.1021/bc5004313>.
- (125) Sun, H.; Benjaminsen, R. V.; Almdal, K.; Andresen, T. L. Hyaluronic Acid Immobilized Polyacrylamide Nanoparticle Sensors for CD44 Receptor Targeting and PH Measurement in Cells. *Bioconjugate Chem.* 2012, *23* (11), 2247–2255. <https://doi.org/10.1021/bc300349n>.
- (126) d’Amora, M.; Camisasca, A.; Boarino, A.; Arpicco, S.; Giordani, S. Supramolecular Functionalization of Carbon Nano-Onions with Hyaluronic Acid-Phospholipid Conjugates for Selective Targeting of Cancer Cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2020, *188*, 110779. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110779>.
- (127) Grover, R.; Drall, S.; Poonia, N.; Kumar Jain, G.; Aggarwal, G.; Lather, V.; Kesharwani, P.; Pandita, D.; Goyal, R. K. CD44 and CD133 Aptamer Directed Nanocarriers for Cancer Stem Cells Targeting. *European Polymer Journal* 2023, *183*, 111770. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111770>.

- (128) Darabi, F.; Saidijam, M.; Nouri, F.; Mahjub, R.; Soleimani, M. Anti-CD44 and EGFR Dual-Targeted Solid Lipid Nanoparticles for Delivery of Doxorubicin to Triple-Negative Breast Cancer Cell Line: Preparation, Statistical Optimization, and *In Vitro* Characterization. *BioMed Research International* 2022, 2022, e6253978. <https://doi.org/10.1155/2022/6253978>.
- (129) Sakhi, M.; Khan, A.; Iqbal, Z.; Khan, I.; Raza, A.; Ullah, A.; Nasir, F.; Khan, S. A. Design and Characterization of Paclitaxel-Loaded Polymeric Nanoparticles Decorated With Trastuzumab for the Effective Treatment of Breast Cancer. *Front Pharmacol* 2022, 13, 855294. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.855294>.
- (130) Kumar Mehata, A.; Bharti, S.; Singh, P.; Viswanadh, M. K.; Kumari, L.; Agrawal, P.; Singh, S.; Koch, B.; Muthu, M. S. Trastuzumab Decorated TPGS-g-Chitosan Nanoparticles for Targeted Breast Cancer Therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2019, 173, 366–377. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.007>.
- (131) Exploration and Insights into the Cellular Internalization and Intracellular Fate of Amphiphilic Polymeric Nanocarriers. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2021, 11 (4), 903–924. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.019>.
- (132) Mellman, I. ENDOCYTOSIS AND MOLECULAR SORTING. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996, 12 (1), 575–625. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.575>.
- (133) Conner, S. D.; Schmid, S. L. Regulated Portals of Entry into the Cell. *Nature* 2003, 422 (6927), 37–44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>.
- (134) Selby, L. I.; Cortez-Jugo, C. M.; Such, G. K.; Johnston, A. P. R. Nanoescapology: Progress toward Understanding the Endosomal Escape of Polymeric Nanoparticles. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2017, 9 (5), e1452. <https://doi.org/10.1002/wnan.1452>.
- (135) Fattal, E.; Couvreur, P.; Dubernet, C. “Smart” Delivery of Antisense Oligonucleotides by Anionic PH-Sensitive Liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004, 56 (7), 931–946. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.037>.
- (136) Smith, S. A.; Selby, L. I.; Johnston, A. P. R.; Such, G. K. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjugate Chem.* 2019, 30 (2), 263–272. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00732>.
- (137) Kube, S.; Hersch, N.; Naumovska, E.; Gensch, T.; Hendriks, J.; Franzen, A.; Landvogt, L.; Siebrasse, J.-P.; Kubitscheck, U.; Hoffmann, B.; Merkel, R.; Csiszár, A. Fusogenic Liposomes as Nanocarriers for the Delivery of Intracellular Proteins. *Langmuir* 2017, 33 (4), 1051–1059. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04304>.
- (138) Hammood, M.; Craig, A. W.; Leyton, J. V. Impact of Endocytosis Mechanisms for the Receptors Targeted by the Currently Approved Antibody-Drug Conjugates (ADCs)—A Necessity for Future ADC Research and Development. *Pharmaceuticals* 2021, 14 (7), 674. <https://doi.org/10.3390/ph14070674>.

- (139) Brannigan, R. P.; Khutoryanskiy, V. V. Synthesis and Evaluation of Mucoadhesive Acryloyl-Quaternized PDMAEMA Nanogels for Ocular Drug Delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2017, *155*, 538–543. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.050>.
- (140) Yang, G.; Fu, S.; Yao, W.; Wang, X.; Zha, Q.; Tang, R. Hyaluronic Acid Nanogels Prepared via Ortho Ester Linkages Show PH-Triggered Behavior, Enhanced Penetration and Antitumor Efficacy in 3-D Tumor Spheroids. *Journal of Colloid and Interface Science* 2017, *504*, 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.05.033>.
- (141) Constantin, M.; Bucatariu, S.; Ascenzi, P.; Simionescu, B. C.; Fundueanu, G. Poly(NIPAAm-Co- $\beta$ -Cyclodextrin) Microgels with Drug Hosting and Temperature-Dependent Delivery Properties. *Reactive and Functional Polymers* 2014, *84*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.07.024>.
- (142) Eeckman, F.; Moës, A. J.; Amighi, K. Synthesis and Characterization of Thermosensitive Copolymers for Oral Controlled Drug Delivery. *European Polymer Journal* 2004, *40* (4), 873–881. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2003.11.010>.
- (143) Shokrollahi, H. A Review of the Magnetic Properties, Synthesis Methods and Applications of Maghemite. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2017, *426*, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.11.033>.
- (144) Dutz, S.; Hergt, R. Magnetic Nanoparticle Heating and Heat Transfer on a Microscale: Basic Principles, Realities and Physical Limitations of Hyperthermia for Tumour Therapy. *International Journal of Hyperthermia* 2013, *29* (8), 790–800. <https://doi.org/10.3109/02656736.2013.822993>.
- (145) Gazeau, F.; Bacri, J. C.; Gendron, F.; Perzynski, R.; Raikher, Yu. L.; Stepanov, V. I.; Dubois, E. Magnetic Resonance of Ferrite Nanoparticles: Evidence of Surface Effects. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 1998, *186* (1), 175–187. [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(98\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(98)00080-8).
- (146) Ota, S.; Kitaguchi, R.; Takeda, R.; Yamada, T.; Takemura, Y. Rotation of Magnetization Derived from Brownian Relaxation in Magnetic Fluids of Different Viscosity Evaluated by Dynamic Hysteresis Measurements over a Wide Frequency Range. *Nanomaterials (Basel)* 2016, *6* (9), 170. <https://doi.org/10.3390/nano6090170>.
- (147) Colombo, M.; Carregal-Romero, S.; Casula, M. F.; Gutiérrez, L.; Morales, M. P.; Böhm, I. B.; Heverhagen, J. T.; Prospero, D.; Parak, W. J. Biological Applications of Magnetic Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 2012, *41* (11), 4306–4334. <https://doi.org/10.1039/C2CS15337H>.
- (148) Guibert, C.; Fresnais, J.; Peyre, V.; Dupuis, V. Magnetic Fluid Hyperthermia Probed by Both Calorimetric and Dynamic Hysteresis Measurements. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2017, *421*, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.08.015>.

- (149) Múzquiz-Ramos, E. M.; Guerrero-Chávez, V.; Macías-Martínez, B. I.; López-Badillo, C. M.; García-Cerda, L. A. Synthesis and Characterization of Maghemite Nanoparticles for Hyperthermia Applications. *Ceramics International* 2015, *41* (1, Part A), 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.08.083>.
- (150) Brezovich, I. A.; Meredith, R. F. Practical Aspects of Ferromagnetic Thermoseed Hyperthermia. *Radiol Clin North Am* 1989, *27* (3), 589–602.
- (151) Hergt, R.; Dutz, S. Magnetic Particle Hyperthermia—Biophysical Limitations of a Visionary Tumour Therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2007, *311* (1), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.10.1156>.
- (152) Mertz, D.; Sandre, O.; Bégin-Colin, S. Drug Releasing Nanoplatfoms Activated by Alternating Magnetic Fields. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2017, *1861* (6), 1617–1641. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.02.025>.
- (153) Johannsen, M.; Gneveckow, U.; Taymoorian, K.; Thiesen, B.; Waldöfner, N.; Scholz, R.; Jung, K.; Jordan, A.; Wust, P.; Loening, S. A. Morbidity and Quality of Life during Thermotherapy Using Magnetic Nanoparticles in Locally Recurrent Prostate Cancer: Results of a Prospective Phase I Trial. *International Journal of Hyperthermia* 2007, *23* (3), 315–323. <https://doi.org/10.1080/02656730601175479>.
- (154) Gneveckow, U.; Eckelt, L.; Feussner, A.; Waldöfner, N.; Scholz, R.; Deger, S.; Wust, P.; Loening, S.; Jordan, A. Clinical Hyperthermia of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Presentation of a New Interstitial Technique. *International journal of hyperthermia: the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2005, *21*, 637–647. <https://doi.org/10.1080/02656730500158360>.
- (155) Jurgons, R.; Seliger, C.; Hilpert, A.; Trahms, L.; Odenbach, S.; Alexiou, C. Drug Loaded Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy. *J. Phys.: Condens. Matter* 2006, *18* (38), S2893. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/38/S24>.
- (156) Asadi, E.; Abdouss, M.; Leblanc, R. M.; Ezzati, N.; Wilson, J. N.; Kordestani, D. Synthesis, Characterization and in Vivo Drug Delivery Study of a Biodegradable Nano-Structured Molecularly Imprinted Polymer Based on Cross-Linker of Fructose. *Polymer* 2016, *97*, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.05.031>.
- (157) Asadi, E.; Abdouss, M.; Leblanc, R. M.; Ezzati, N.; Wilson, J. N.; Azodi-Deilami, S. In Vitro/in Vivo Study of Novel Anti-Cancer, Biodegradable Cross-Linked Tannic Acid for Fabrication of 5-Fluorouracil-Targeting Drug Delivery Nano-Device Based on a Molecular Imprinted Polymer. *RSC Adv.* 2016, *6* (43), 37308–37318. <https://doi.org/10.1039/C6RA03704F>.
- (158) Takeda, S.; Mishima, F.; Fujimoto, S.; Izumi, Y.; Nishijima, S. Development of Magnetically Targeted Drug Delivery System Using Superconducting Magnet. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2007, *311* (1), 367–371. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.10.1195>.

- (159) Purushotham, S.; Chang, P. E. J.; Rumpel, H.; Kee, I. H. C.; Ng, R. T. H.; Chow, P. K. H.; Tan, C. K.; Ramanujan, R. V. Thermoresponsive Core–Shell Magnetic Nanoparticles for Combined Modalities of Cancer Therapy. *Nanotechnology* 2009, *20* (30), 305101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/30/305101>.
- (160) Zhang, J.; Misra, R. D. K. Magnetic Drug-Targeting Carrier Encapsulated with Thermosensitive Smart Polymer: Core–Shell Nanoparticle Carrier and Drug Release Response. *Acta Biomaterialia* 2007, *3* (6), 838–850. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.05.011>.
- (161) Viroonchatapan, E.; Sato, H.; Ueno, M.; Adachi, I.; Tazawa, K.; Horikoshi, I. Release of 5-Fluorouracil from Thermosensitive Magnetoliposomes Induced by an Electromagnetic Field. *Journal of Controlled Release* 1997, *46* (3), 263–271. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(96\)01606-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(96)01606-9).
- (162) Griffete, N.; Fresnais, J.; Espinosa, A.; Wilhelm, C.; Bée, A.; Ménager, C. Design of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Controlled Release of Doxorubicin under an Alternative Magnetic Field in Athermal Conditions. *Nanoscale* 2015, *7* (45), 18891–18896. <https://doi.org/10.1039/C5NR06133D>.
- (163) Nerantzaki, M.; Michel, A.; Petit, L.; Garnier, M.; Ménager, C.; Griffete, N. Biotinylated Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Cancer Cell Targeting and Controlled Drug Delivery. *Chem. Commun.* 2022, *58* (37), 5642–5645. <https://doi.org/10.1039/D2CC00740A>.
- (164) Kazemi, S.; Sarabi, A. A.; Abdouss, M. Synthesis and Characterization of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Controlled Release of Letrozole. *Korean J. Chem. Eng.* 2016, *33* (11), 3289–3297. <https://doi.org/10.1007/s11814-016-0171-x>.
- (165) Boitard, C.; Michel, A.; Ménager, C.; Griffete, N. Protein Denaturation Through the Use of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles. *Molecules* 2021, *26* (13), 3980. <https://doi.org/10.3390/molecules26133980>.
- (166) Boitard, C. Polymères à empreintes de protéines couplés à des nanoparticules magnétiques : de la synthèse aux applications en nanomédecine. Chimie analytique, Sorbonne Université, 2019.
- (167) Chiefari, J.; Chong, Y. K. (Bill); Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process. *Macromolecules* 1998, *31* (16), 5559–5562. <https://doi.org/10.1021/ma9804951>.
- (168) Sunayama, H.; Ooya, T.; Takeuchi, T. Fluorescent Protein Recognition Polymer Thin Films Capable of Selective Signal Transduction of Target Binding Events Prepared by Molecular Imprinting with a Post-Imprinting Treatment. *Biosensors and Bioelectronics* 2010, *26* (2), 458–462. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.091>.

- (169) Dumitrescu, A. M.; Lisa, G.; Iordan, A.; Tudorache, F.; Petrila, I.; Palamaru, M. N.; Mihailescu, C.; Leontie, L.; Munteanu, C. Ni Ferrite Highly Organized as Humidity Sensors. *Materials Chemistry and Physics* 2015, 156. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.02.044>.
- (170) Feng, L.; Zheng, H.; Gao, B.; Zhang, S.; Zhao, C.; Zhou, Y.; Xu, B. Fabricating an Anionic Polyacrylamide (APAM) with an Anionic Block Structure for High Turbidity Water Separation and Purification. *RSC Adv.* 2017, 7 (46), 28918–28930. <https://doi.org/10.1039/C7RA05151D>.
- (171) Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, 3. ed., repr. as paperback.; Wiley: Chichester, 2010.
- (172) Karaca, N.; Temel, G.; Karaca Balta, D.; Aydin, M.; Arsu, N. Preparation of Hydrogels by Photopolymerization of Acrylates in the Presence of Type I and One-Component Type II Photoinitiators. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2010, 209 (1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2009.09.017>.
- (173) Bicak, T. C.; Garnier, M.; Sabbah, M.; Griffete, N. One-Step Synthesis of Fluorescent Poly(Divinylbenzene) Particles Without Fluorescent Monomers. *Macromolecular Rapid Communications* n/a (n/a), 2200966. <https://doi.org/10.1002/marc.202200966>.
- (174) Bicak, T. C.; Garnier, M.; Sabbah, M.; Griffete, N. Photoinduced Synthesis of Fluorescent Hydrogels without Fluorescent Monomers. *Chem. Commun.* 2022, 58 (69), 9614–9617. <https://doi.org/10.1039/D2CC02888C>.
- (175) Garnier, M.; Bicak, T.; Sabbah, M.; Griffete, N. Fluorescent Core-Shell Magnetic Nanoparticles by Type II Photoinitiated Polymerisation. *Chem. Commun.* 2023. <https://doi.org/10.1039/D3CC01892J>.
- (176) Bee, A.; Massart, R.; Neveu, S. Synthesis of Very Fine Maghemite Particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 1995, 149 (1), 6–9. [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(95\)00317-7](https://doi.org/10.1016/0304-8853(95)00317-7).
- (177) Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Transactions on Magnetics* 1981, 17 (2), 1247–1248. <https://doi.org/10.1109/TMAG.1981.1061188>.
- (178) Massart, R.; Dubois, E.; Cabuil, V.; Hasmonay, E. Preparation and Properties of Monodisperse Magnetic Fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 1995, 149 (1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(95\)00316-9](https://doi.org/10.1016/0304-8853(95)00316-9).
- (179) Huang, C.; Li, Y.; Duan, L.; Wang, L.; Ren, X.; Gao, G. Enhancing the Self-Recovery and Mechanical Property of Hydrogels by Macromolecular Microspheres with Thermal and Redox Initiation Systems. *RSC Adv.* 2017, 7 (26), 16015–16021. <https://doi.org/10.1039/C7RA00317J>.
- (180) E. Ekpenyong-Akiba, A.; Canfarotta, F.; H, B. A.; Poblocka, M.; Casulleras, M.; Castilla-Vallmanya, L.; Kocsis-Fodor, G.; E. Kelly, M.; Janus, J.; Althubiti, M.;

- Piletska, E.; Piletsky, S.; Macip, S. Detecting and Targeting Senescent Cells Using Molecularly Imprinted Nanoparticles. *Nanoscale Horizons* 2019, *4* (3), 757–768. <https://doi.org/10.1039/C8NH00473K>.
- (181) Canfarotta, F.; Poma, A.; Guerreiro, A.; Piletsky, S. Solid-Phase Synthesis of Molecularly Imprinted Nanoparticles. *Nat Protoc* 2016, *11* (3), 443–455. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.030>.

## Table des illustrations

<i>Figure 1</i> Les 14 "Hallmarks of cancer" identifiés en 2022 par Hanahan. <sup>1</sup>	17
<i>Figure 2</i> Les cancers chez la femme, en France, en 2020. Données Globocan 2020 de l'International Agency for Research on Cancer.	18
<i>Figure 3</i> Classification moléculaire des cancers du sein. Schéma issu de <sup>3</sup> .	19
<i>Figure 4</i> La communication entre adipocytes et cellules tumorales, impliquée dans la prolifération des cellules cancéreuses. Schéma de Patrick J. Lynch adapté par Maurice Zaoui.	20
<i>Figure 5</i> Illustration des méthodes de synthèse et de stockage de l'énergie dans la cellule cancéreuse mammaire. Schéma issu de <sup>11</sup> .	21
<i>Figure 6</i> Représentation schématique de la protéine CD36. Schéma issu de <sup>13</sup> .	22
<i>Figure 7</i> Action de l'inhibition de PPAR $\gamma$ sur différents facteurs et ses conséquences sur l'évolution tumorale. Schéma issu de <sup>15</sup> .	23
<i>Figure 8</i> L'inhibition de CD36 empêche la captation d'acide gras et évite la surexpression de CD36. Schéma issu de <sup>9</sup> .	24
<i>Figure 9</i> Le récepteur HER2 et les réactions en cascade associées influençant la différenciation et la migration cellulaire, l'apoptose et l'angiogenèse. Source : Acthera, guide des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique par l'université de Lille.	27
<i>Figure 10</i> A gauche, la liaison PD-1/PD-L1 bloque le lymphocyte T. A droite, le blocage de PD-1 par un anticorps permet d'éviter le blocage du lymphocyte T et donc de tuer la cellule tumorale. Adapté sur BioRender.	28
<i>Figure 11</i> Principe de fonctionnement d'un anticorps conjugué. Après fixation sur sa cible au niveau de la membrane cellulaire, l'ADC est internalisé. Schéma issu de <sup>38</sup> .	29
<i>Figure 12</i> Différents anticorps conjugués utilisés en clinique pour traiter différents cancers : Leucémie aiguë myéloïde (1) ou lymphoblastique (4), lymphome (2 et 6), cancer du sein (3, 8 et 9), carcinome urothélial (7) et myélome multiple (10). Schéma issu de <sup>38</sup> .	29
<i>Figure 13</i> Nombre de publications sur ScienceDirect entre 1982 et 2022 ayant pour mots-clés : (à gauche) "Molecularly imprinted polymers" ou (à droite) ["Cancer cells" OR Tumor] AND "imprinted polymers ».	32
<i>Figure 14</i> Schéma de principe des polymères à empreintes moléculaires. Les monomères forment des liaisons faibles avec la cible. Après polymérisation, la cible peut être éliminée du polymère pour former des cavités hautement spécifiques de la cible.	32
<i>Figure 15</i> A gauche, exemples d'agents RAFT. A droite, principe de fonctionnement des agents RAFT. Adapté de <sup>54</sup> .	34
<i>Figure 16</i> Synthèse sur billes de verre. (1) Des billes de silice sont fonctionnalisées avec la protéine cible. (2) La polymérisation de monomères adaptés forme des nanoparticules de polymères. (3) Le polymère libre est éliminé. (4) Une élévation de température permet le décrochage des polymères spécifiques et leur récupération.	38
<i>Figure 17</i> Principe de détection par électrochimiluminescence a) avec des anticorps magnétiques, b) avec des polymères à empreintes de protéines magnétiques. Schéma issu de <sup>78</sup> .	40
<i>Figure 18</i> Quantification de l'antigène carcinoembryonnaire par sandwich avec des polymères à empreintes de protéines et détection SERS (surface-enhanced Raman scattering). Figure issue de <sup>79</sup> .	41
<i>Figure 19</i> Les polymères à empreintes de monosaccharides ciblent préférentiellement les cellules cancéreuses par rapport à des cellules saines. Figure issue de <sup>94</sup> .	43
<i>Figure 20</i> Image de microscopie confocale d'une cellule ciblée simultanément par des polymères à empreintes ciblant l'acide hyaluronique (rouge) et l'acide sialique (vert) et dont le noyau est marqué au DAPI (bleu) Image issue de <sup>95</sup> .	43
<i>Figure 21</i> A gauche, structure d'un liposome et localisation des molécules en fonction de leur affinité pour l'eau. <sup>103</sup> A droite, différentes structures polymériques : micelle, dendrimère, polymérosome et particule de polymère.	45

Figure 22 Les différentes voies d'entrée dans la cellule. Le contenu de l'endosome peut être recyclé vers l'extérieur ou vers des compartiments spécifiques de la cellule ou dégradés, notamment après fusion avec un lysosome.	48
Figure 23 Différents mécanismes d'échappement des endosomes : fusion avec la membrane, rupture osmotique, contrainte mécanique par gonflement de particule et déstabilisation de membrane. Schéma issu de <sup>136</sup> .	49
Figure 24 Mécanisme d'entrée des liposomes fusogènes. Schéma issu de <sup>137</sup> .	50
Figure 25 La présence d'acide hyaluronique dans la composition des nanoparticules de polymère permet leur internalisation après fixation sur la protéine CD44. L'acidification des endosomes conduit à la libération de la molécule thérapeutique par rupture de liaisons ortho ester. Schéma issu de <sup>140</sup> .	51
Figure 26 Synthèse de nanoparticules à empreinte d'acide sialique dont la dégradation en présence de glutathion permet la libération de NO et l'inhibition de la croissance cellulaire. Figure issue de <sup>91</sup> .	52
Figure 27 La maghémite est ferrimagnétique. Au sein d'un même domaine, les spins sont parallèles. Lorsque la taille des particules est inférieure à la taille du domaine, les particules ont un seul moment magnétique "géant". En présence d'un champ magnétique, les moments de ces particules s'alignent. Les tailles sont données pour des particules de maghémite.	53
Figure 28 A gauche, courbe d'aimantation de nanoparticules de maghémite réalisée sur un magnétomètre à échantillon vibrant. A droite, mesure d'hystérèse dynamique pour des nanoparticules de maghémite de 20nm dans l'eau à 333kHz. <sup>148</sup>	55
Figure 29 Patient dans un appareil permettant d'appliquer un champ magnétique alternatif (MFH300F, MagForce GmbH, Berlin). <sup>154</sup>	56
Figure 30 Synthèse de polymères magnétiques encapsulant de l'olanzapine et accumulation magnétique dans le cerveau de souris. Figure issue de <sup>156</sup> .	57
Figure 31 Libération de doxorubicine à 37°C, avec et sans champ magnétique alternatif. La doxorubicine a été intégrée au polymère en utilisant la technique des polymères à empreinte moléculaire. Le champ magnétique alternatif a été appliqué à 335kHz à 9mT. Figure issue de <sup>162</sup> .	58
Figure 32 Présentation des quatre épitopes utilisés.	60
Figure 33 L'acrylamide (AM), le N,N'-méthylènebisacrylamide (BIS) et l'acryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B (ArtRhod).	60
Figure 34 Schéma de principe des nanomatériaux.	61
Figure 35 Voie de synthèse du 2-(N,N-diethyldithiocarbamyl)acetic acid.	68
Figure 36 Evolution de la fonction de corrélation lors d'une synthèse en l'absence de monomère fluorescent, sous irradiation UV à 365nm. La fonction de corrélation commence à prendre forme à partir de 90min et se décale progressivement vers les temps longs indiquant une augmentation du diamètre hydrodynamique des particules.	69
Figure 37 Evolution de la taille des nanoparticules, en l'absence de monomère fluorescent, au cours de la polymérisation. Modélisé à partir des fonctions de corrélation et représenté en Intensité (%).	70
Figure 38 Evolution de la taille des nanoparticules de polyacrylamide en fonction de la concentration en monomère fluorescent. Pour chaque point temporel, six mesures ont été réalisées sur un même échantillon sur une acquisition de 2 minutes et la fonction de corrélation a été modélisé pour obtenir une estimation du diamètre hydrodynamique moyen.	71
Figure 39 Influence de la concentration en monomère fluorescent sur le rendement de la synthèse. Plus la concentration en ArtRhod est importante, plus la quantité de polymère formée est faible.	71
Figure 40 Absorbance d'une solution de monomère Rhodamine B à 5 µg/mL.	72
Figure 41 Spectre FTIR sans monomère fluorescent (haut) et avec 0.85 µg/mL (bas). *Attribué avec <sup>171</sup> .	73
Figure 42 Echantillons après 5h de polymérisation : 21 est l'échantillon concentré et 22 l'échantillon dilué.	73
Figure 43 Comparaison de l'évolution temporelle de la fonction de corrélation en cours de synthèse en fonction de la concentration en monomères (26.5 mg/mL à gauche et 14.1 mg/mL à droite)	74
Figure 44 Evolution de la taille des particules en fonction du temps et de la concentration en monomères.	75
Figure 45 Aspect de l'échantillon et taille mesurée par DLS. Les particules sont de petites tailles avec une faible polydispersité (PDI = 0.201).	76

Figure 46 Viabilité des cellules MCF-7 après 24h, 48h et 72h de traitement avec des nanoparticules de polyacrylamide.	77
Figure 47 Viabilité des cellules SUM159 après 24h, 48h et 72h de traitement avec des nanoparticules de polyacrylamide	77
Figure 48 Représentation de la protéine CD36 et position des différents épitopes utilisés.	77
Figure 49 Image de microscopie électronique en transmission du MIP 93-110. Les particules sont sphériques et de taille homogène comprise entre 20 et 45nm.	78
Figure 50 A gauche, taille mesurée par DLS. A droite, mesure de fluorescence des particules avec une longueur d'onde d'excitation de 545nm de solutions à 10%v/v des échantillons réalisés à partir de différents épitopes. Ces mesures sont cohérentes avec la concentration massique des différents échantillons.	79
Figure 51 a) et d), représentation des cellules MCF-7 WT et CL6 en fonction de leur taille (FSC-A) et de leur granulosité (SSC-A). b) et e), marquage des cellules MFC-7 WT et CL6 par un anticorps antiCD36 fluorescent, c) et f) marquage des cellules MFC-7 WT et CL6 par une solution à 200µg/mL de MIP 139-155. 500 000 cellules ont été incubées en suspension dans une solution de PBS contenant 1% de sérum de veau fœtal ainsi que 40µg de polymère ou 7 ng d'un anticorps antiCD36 fluorescent pendant une heure à 4°C.	80
Figure 52 Pourcentage de cellules marquées en fonction de la lignée cellulaire et du matériau utilisé. Aucun échantillon ne semble cibler spécifiquement les cellules surexprimant la protéine CD36. NM : cellules non marquées, NIP : polymère non imprimé.	81
Figure 53 Rhodamine B.	83
Figure 54 Principe de la synthèse d'hydrogel par photopolymérisation de type II. A droite, hydrogels réalisés avec cette méthode, séchés(a), réhydratés (b) et qui fluorescent sous lampe UV(c)	83
Figure 55 Photographie des échantillons [100 :0.3] (gauche) et [100 :0.6] (droite) après dialyse, les échantillons sont troubles mais stables.	84
Figure 56 Mesure du diamètre hydrodynamique de l'échantillon [100:0.3]. A gauche, la première mesure permet de constater la polydispersité de l'échantillon. A droite, la comparaison de 3 mesures successives illustre l'hétérogénéité voire l'instabilité colloïdale au cours du temps de l'échantillon.	84
Figure 57 Mesure du diamètre hydrodynamique de l'échantillon [100:0.6]. A gauche, la première mesure permet de constater le caractère monodisperse de l'échantillon. La taille moyenne des nanoparticules est 197 nm. A droite, la comparaison de 3 mesures successives illustre la stabilité colloïdale de l'échantillon.	85
Figure 58 Images de microscopie électronique sur l'échantillon [100:0.6]. Plusieurs images sont représentées pour compenser le manque de particules par champ bien qu'elles soient représentatives de l'ensemble de la grille. Une goutte d'échantillon dilué a	85
Figure 59 Images de microscopie électronique sur l'échantillon [100:0.3]. Ces structures sont représentatives des polymères sur l'ensemble de la grille.	86
Figure 60 Spectres de fluorescence des échantillons avec une longueur d'onde d'excitation de 545 nm à 1 mg/mL.	87
Figure 61 Le flacon de gauche correspond au solide obtenu après séchage du polymère non réticulé. Celui de droite est une solution obtenue après dilution d'un fragment de solide (~1 mg) dans de l'eau distillée. Le fragment se disperse facilement dans l'eau donnant une solution légèrement rosée.	87
Figure 62 Spectres FTIR des échantillons (a), [100 : 0.3], (b) [100 : 0.6] et (c) polymère amorcé par le DCAA en présence de 0.85 µg/mL d'ArtRhod. Un pic présent dans (a) et (b) entre 3300 et 3400 cm <sup>-1</sup> et absent de (c) est attribué à une vibration d'élongation de la liaison O-H de la fonction acide carboxylique de la RhB.	88
Figure 63 En haut, à gauche, représentation des cellules SUM159 CL1 en fonction de leur taille (FSC-A) et de leur granulosité (SSC-A), à droite, marquage avec un anti-CD36 fluorescent, représentation en fonction de la granulosité et de la fluorescence. En bas, marquage des cellules SUM159 CL1 par une solution à 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL et 1 mg/mL de MIP 93-110(2) dans du PBS contenant 1% de sérum de veau fœtal, pendant 1h à 4°C.	90
Figure 64 Synthèse des capacités de ciblage des différents matériaux synthétisés à une concentration de 1 mg/mL.	91
Figure 65 Images de microscopie confocale obtenues par marquage avec un anticorps anti-CD36, après projection sur 10 images centrales (en « Average ») sur chaque stack, dans le canal du DAPI, du PE, et une	

<i>superposition des deux, pour les cellules SUM159 WT et CL1. Pour les cellules SUM159 WT, en moyenne 1 cellule sur 10 est marquée par l'anticorps anti-CD36 tandis que pour les cellules SUM159 CL1 l'ensemble des cellules sont fluorescentes.</i>	92
<i>Figure 66 Images de microscopie confocale obtenues avec l'échantillon 93-110(2) après projection sur 10 images centrales (en « Average ») sur chaque stack, dans le canal du DAPI, du PE, et une superposition des deux, pour les cellules SUM159 WT et CL1. Contrairement au marquage anticorps, toutes les cellules SUM 159 WT sont marquées.</i>	93
<i>Figure 67 Images de microscopie confocale obtenues avec l'échantillon 93-110(2) après projection sur 10 images centrales (en « Average ») sur chaque stack, dans le canal du DAPI, du PE, et une superposition des deux, pour les cellules SUM159 WT et CL1. Contrairement au marquage anticorps, toutes les cellules SUM 159 WT sont marquées. Sur ces nouvelles prises de vue, l'intensité de fluorescence semble plus importante sur les cellules SUM 159 WT que sur les cellules SUM 159 CL1.</i>	94
<i>Figure 68 Images de microscopie confocale obtenues avec l'échantillon 139-155 après projection sur 10 images centrales (en « Average ») sur chaque stack, dans le canal du DAPI, du PE, et une superposition des deux, pour les cellules SUM159 WT et CL1. Contrairement au marquage anticorps, toutes les cellules SUM 159 WT sont marquées.</i>	94
<i>Figure 69 Viabilité des cellules MCF-7, n'exprimant pas CD36, après 24h, 48h et 72h de traitement avec des nanoparticules de polyacrylamide à empreinte de CD36 (93-110).</i>	95
<i>Figure 70 Viabilité des cellules SUM159 CL1, surexprimant la protéine CD36, après 24h, 48h et 72h de traitement avec des nanoparticules de polyacrylamide à empreinte de CD36 (93-110).</i>	96
<i>Figure 71 Viabilité des cellules SUM159 WT après 24h, 48h et 72h de traitement avec des nanoparticules de polyacrylamide à empreinte de CD36 (93-110).</i>	96
<i>Figure 72 Viabilité des cellules HMEC, n'exprimant pas la protéine CD36, après 24h, 48h et 72h de traitement avec des nanoparticules de polyacrylamide à empreinte de CD36 (93-110).</i>	96
<i>Figure 73 Montage expérimental. Le cristalliseur contenant l'eau permettant de limiter l'échauffement est maintenu par des élévateurs à une distance fixe de la lampe. La lampe émet des UV à une longueur d'onde de 365nm, en direction des flacons.</i>	99
<i>Figure 74 Configuration pour la photopolymérisation de type II.</i>	102
<i>Figure 75 Représentation schématique de la synthèse de nanoparticules de maghémite par coprécipitation d'ions fer en milieu basique et oxydation. L'ajout d'acide nitrique permet de précipiter les nanoparticules pour ne récupérer que les plus grosses.</i>	108
<i>Figure 76 Image de microscopie électronique des nanoparticules de maghémite triées.</i>	109
<i>Figure 77 Distribution en taille obtenue après mesure du diamètre de 450 particules sur les images de microscopie électronique.</i>	109
<i>Figure 78 Spectre FTIR des nanoparticules de maghémite stabilisées par l'acide nitrique.</i>	110
<i>Figure 79 Analyse thermogravimétrique des nanoparticules de maghémite.</i>	110
<i>Figure 80 Courbe d'aimantation des nanoparticules de maghémite après correction de la composante diamagnétique et du champ résiduel de la bobine supraconductrice.</i>	111
<i>Figure 81 Un champ magnétique alternatif, indiqué par la courbe jaune, est appliqué sur 3 périodes, jusqu'à ce qu'une température de 26°C soit atteinte. Entre chaque application du champ, le système est refroidi. Une modélisation linéaire (en rouge) est effectuée sur la phase de chauffage pour chacun des cycles (pente en C°/s).</i>	112
<i>Figure 82 Principe de la fonctionnalisation par l'acide acrylique. Plusieurs modes d'adsorptions sont possibles, la configuration réelle des molécules d'Aac à la surface des nanoparticules est inconnue.</i>	113
<i>Figure 83 Mesure par DLS du Z-average en fonction de la quantité d'acide acrylique utilisée pour la fonctionnalisation.</i>	114
<i>Figure 84 Variation du potentiel Zeta en fonction de la quantité d'acide acrylique utilisée pour la fonctionnalisation.</i>	115
<i>Figure 85 Spectre FTIR des nanoparticules nues (en haut) et de particules fonctionnalisées avec 5% d'acide acrylique.</i>	115

<i>Figure 86</i> Mesure du diamètre hydrodynamique des particules en fonction du pH, avec et sans fonctionnalisation avec l'Aac. _____	116
<i>Figure 87</i> Proposition de mécanisme d'initiation RedOx avec ammonium persulfate et TEMED pour la polymérisation d'acrylamide, adapté de <sup>179</sup> . _____	117
<i>Figure 88</i> Aspect des échantillons après polymérisation et dialyse, obtenus à partir de particules nues (a) et fonctionnalisées avec 5% d'Aac (b). _____	117
<i>Figure 89</i> Distribution en taille des nanoparticules hybrides obtenues à partir de nanoparticules fonctionnalisées avec différentes quantités d'acide acrylique (%v/v). _____	118
<i>Figure 90</i> Images de microscopie électronique. A gauche, les nanoparticules de maghémite fonctionnalisées à partir de 5%v/v d'Aac. A droite, ces nanoparticules après polymérisation. Les flèches bleues pointent la couche de polymère et les marrons les nanoparticules de maghémite. _____	118
<i>Figure 91</i> Images de microscopie électronique des nanoparticules obtenues après polymérisation en l'absence de fonctionnalisation par l'acide acrylique. _____	119
<i>Figure 92</i> Mélanges réactionnels avant ajout d'APS et de TEMED. De gauche à droite : 0.023 $\mu$ mol, 0.5 $\mu$ mol, 1.15 $\mu$ mol, 2.3 $\mu$ mol ou 5.75 $\mu$ mol d'acryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B. _____	119
<i>Figure 93</i> Aspect des échantillons après amorçage de la polymérisation. De gauche à droite : 0.023 $\mu$ mol, 0.56 $\mu$ mol, 1.15 $\mu$ mol, 2.3 $\mu$ mol ou 5.75 $\mu$ mol d'acryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B. _____	120
<i>Figure 94</i> Aspect des particules en présence d'un aimant. Les particules formées de cette façon sont de taille macroscopique mais les particules magnétiques sont bien intégrées dans la matrice de polymère ce qui les rend très magnétiques. _____	120
<i>Figure 95</i> Image TEM des particules de maghémite fonctionnalisées avec de l'acide acrylique (3%). _____	121
<i>Figure 96</i> Distribution en taille obtenue par comptage de 210 nanoparticules de maghémite fonctionnalisées avec l'acide acrylique. Les particules ont un diamètre moyen de 22 nm et une polydispersité de 0.41. _____	122
<i>Figure 97</i> Configuration expérimentale lors de l'étape de polymérisation _____	123
<i>Figure 98</i> a) de gauche à droite, [1:48],[1:72] et [1:96], avant polymérisation, (b) après polymérisation, (c) après dialyse. _____	123
<i>Figure 99</i> Evolution de la fonction de corrélation au cours du temps réactionnels pour les échantillons [1 :48], [1.72] et [1 :96]. _____	124
<i>Figure 100</i> Evolution du diamètre hydrodynamique des nanoparticules modélisée à partir des fonctions de corrélation mesurées. _____	124
<i>Figure 101</i> Spectre FTIR (a) nanoparticules de maghémite, (b) nanoparticules de maghémite fonctionnalisées avec l'acide acrylique, (c), (d) et (e), respectivement, les échantillons [1 : 48], [1 : 72] et [1 : 96]. _____	125
<i>Figure 102</i> Image TEM représentative de l'échantillon [1 : 48] et histogramme illustrant la répartition en taille des nanoparticules obtenue par comptage sur 300 particules. Les particules ont un diamètre moyen de 42 nm et une polydispersité de 0.65. Les flèches de couleur marron pointent les nanoparticules de maghémite, les flèches bleues le polymère visible. _____	125
<i>Figure 103</i> Image TEM représentative de l'échantillon [1 :72] et histogramme illustrant la répartition en taille des nanoparticules obtenue par comptage sur 284 particules. Les particules ont un diamètre moyen de 45 nm et une polydispersité de 0.77. Les flèches de couleur marron pointent les nanoparticules de maghémite, les flèches bleues le polymère visible. _____	126
<i>Figure 104</i> Image TEM représentative de l'échantillon "106" et histogramme illustrant la répartition en taille des nanoparticules obtenue par comptage sur 84 particules seulement, les images ne contenant qu'un faible nombre d'objets. Les particules ont un diamètre moyen de 67 nm et une polydispersité de 0.61. Les flèches de couleur marron pointent les nanoparticules de maghémite, les flèches bleues le polymère visible. _____	126
<i>Figure 105</i> Analyse thermogravimétrique des nanoparticules de maghémite (NP), fonctionnalisées par l'Aac (NP@Aac) et des échantillons [1 : 48], [1 : 72] et [1 : 96]. _____	127
<i>Figure 106</i> Spectres de fluorescence obtenus pour un même volume d'échantillon brut après excitation à 545 nm. _____	128
<i>Figure 107</i> Spectres de fluorescence obtenus après normalisation par la concentration massique en polymère après excitation à 545 nm. _____	128

Figure 108 Evolution de la fluorescence au niveau du front d'une goutte d'échantillon [1 : 48] en cours du temps en présence d'un aimant permanent, hors du champ en bas à droite. La barre d'échelle correspond à 20 $\mu\text{m}$ .	129
Figure 109 Evolution de la fluorescence au niveau du front d'une goutte d'échantillon [1 : 72] en cours du temps en présence d'un aimant permanent, hors du champ à droite. La barre d'échelle correspond à 20 $\mu\text{m}$ .	130
Figure 110 Evolution de la fluorescence au niveau du front d'une goutte d'échantillon [1 : 96] en cours du temps en présence d'un aimant permanent, hors du champ en bas. La barre d'échelle correspond à 20 $\mu\text{m}$ .	130
Figure 111 Courbe d'aimantation des nanoparticules après correction de la composante diamagnétique et du champ résiduel de la bobine supraconductrice. a) [1 :48], b) [1 :72] et c) [1 :96].	132
Figure 112 Un champ magnétique alternatif, indiqué par la courbe jaune, est appliqué sur 3 périodes, jusqu'à ce qu'une température de 26°C soit atteinte. Entre chaque application du champ, le système est refroidi. Une modélisation linéaire est effectuée sur la phase de chauffage pour chacun des cycles de l'échantillon. a) [1 :48], b) [1 :72] et c) [1 :96] (pentes en C°/s).	133
Figure 113 Récapitulatif des valeurs de SLP pour les particules nues et les particules fonctionnalisées. En W/g maghémite.	134
Figure 114 Spectre de fluorescence obtenu avec une longueur d'onde d'excitation de 545nm après polymérisation dans une pièce à 15°C.	135
Figure 115 Aspect des échantillons après 1h de polymérisation sur le « roller stirrer » à basse vitesse.	135
Figure 116 Image de microscopie d'un échantillon d'apparence homogène, préparé avec un ratio molaire [fer : monomères] de [1 :48] sur le roller stirrer à vitesse moyenne.	136
Figure 117 Synthèse sur billes de verre adaptée. (1) Des billes de silice sont fonctionnalisées avec la protéine cible. (2) La polymérisation de monomères adaptés en présence de nanoparticules de maghémite fonctionnalisées par le DCAA forme des nanoparticules de polymère magnétiques. (3) Le polymère libre est éliminé. (4) Une élévation de température permet le décrochage des polymères spécifiques et leur récupération.	144
Figure 118 Formule chimique des monomères utilisés.	145
Figure 119 Principe de la fonctionnalisation des billes de verre, adapté de <sup>181</sup> .	145
Figure 120 Photos des échantillons. (a) et (b) les billes de verre en solution après polymérisation, (c) Séparation entre les polymères à empreinte magnétiques et les billes de verre après chauffage.	146
Figure 121 Image de microscopie électronique des nanoparticules de maghémite fonctionnalisées par le DCAA.	147
Figure 122 Image de microscopie électronique d'un polymère à empreintes magnétique réalisé sur surface solide.	147
Figure 123 Spectre de fluorescence de l'échantillon brut à une longueur d'onde d'excitation de 540 nm.	148
Figure 124 Cytométrie en flux sur des cellules SUM159 WT (gauche) et SUM159 CL1 (droite). (a) et (b), représentation des cellules SUM159 WT et CL1 en fonction de leur taille (FSC-A) et de leur granulosité (SSC-A). (c) et (d), marquage par 5 $\mu\text{g}$ d'un anticorps anti-CD36-APC. Marquage par un MIP à empreinte de 93-110 magnétique à une concentration en fer de : (e) et (f) 0.16mM, (g) et (h) 0.32mM, (i) et (j), 0.65mM.	149
Figure 125 Synthèse sur billes de verre. (1) Des billes de silice sont fonctionnalisées avec la protéine cible. (2) La polymérisation de monomères adaptés forme des nanoparticules de polymères. (3) Le polymère libre est éliminé. (4) Une élévation de température permet le décrochage des polymères spécifiques et leur récupération.	150
Figure 126 a) Des billes de verre après polymérisation, (b) Un polymère à empreinte de 248-265.	151
Figure 127 Fluorescence des particules de haute affinité et des premiers lavages à froid.	151
Figure 128 Mesure du diamètre hydrodynamique des particules par DLS. a) Représentation en intensité, b) représentation en nombre.	152
Figure 129 Image de microscopie électronique de l'échantillon.	152
Figure 130 Pourcentage de cellules MCF-7 WT ou CL6 marquées par un anticorps anti-CD36 ou par MIP de 248-265 à 10, 20, 50 et 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du PBS à 1% de sérum.	153

<i>Figure 131 Images de microscopie confocale de cellules MCF-7 et MCF-7 CL6 après incubation avec un anticorps anti-CD36 fluorescent, après projection sur 10 images centrales (en « Average ») sur chaque stack, dans le canal du DAPI, du PE, et une superposition des deux.</i>	154
<i>Figure 132 Images de microscopie confocale de cellules MCF-7 et MCF-7 CL6 après incubation avec des nanoparticules à empreinte de 248-265 à une concentration de 40 µg/mL dans du tampon phosphate à 1% de sérum. L'incubation a duré une nuit à 4°C, sur des cellules préalablement fixées. Images obtenues après projection sur 10 images centrales (en « Average ») sur chaque stack, dans le canal du DAPI, du PE, et une superposition des deux.</i>	154
<i>Figure 133 A gauche, appareil Vasco KIN Particle Size analyser, développé par Cordouan, et qui permet de faire des mesures de DLS in situ. A droite, un Zetasizer Ultra Red, de Malvern Panalytical.</i>	165
<i>Figure 134 Schéma de principe d'une mesure par DLS. Par Cordouan Tech.</i>	166
<i>Figure 135 Les petites particules ont un mouvement brownien rapide, l'intensité lumineuse mesurée varie rapidement. Comme le signal varie rapidement, le coefficient de corrélation tend rapidement vers son minimum. Par opposition, les grosses particules bougent lentement, l'intensité mesurée varie lentement et le coefficient de corrélation tend plus lentement vers son minimum.</i>	167
<i>Figure 136 Magnétomètre SQUID MPMS3.</i>	168
<i>Figure 137 En noir, les données brutes obtenues pour les nanoparticules de maghémite nues, en rouge, la courbe obtenue après correction.</i>	169
<i>Figure 138 En rouge la courbe sur laquelle le champ est croissant, en bleu, le champ est décroissant. On remarque que l'aimantation est nulle avant que le champ n'atteigne 0 ce qui n'est pas physique.</i>	169
<i>Figure 139 Courbe d'aimantation corrigée du champ résiduel de la bobine supraconductrice.</i>	170
<i>Figure 140 dispositif de génération de champ magnétique alternatif D5 series Automated Driver fabriqué par l'entreprise Nanoscale Biomagnetics.</i>	171
<i>Figure 141 Mesures de l'échauffement par calorimétrie sous un champ de 300 Gauss, à des fréquences de 147kHz, 307kHz ou 776kHz. Le champ magnétique est matérialisé en jaune sur la figure.</i>	172
<i>Figure 142 Mesures de l'échauffement par calorimétrie sous un champ de (a) 147kHz et 580 Gauss, (b) 307 kHz et 400 Gauss. Le champ magnétique est matérialisé en jaune sur la figure.</i>	172
<i>Figure 143 Mesures de l'échauffement par calorimétrie sous un champ de (a) 389 kHz et 400 Gauss, (b) 636 kHz et 328 Gauss. Le champ magnétique est matérialisé en jaune sur la figure.</i>	173
<i>Figure 144 Appareil MACSQuant VYB développé par Milenyi Biotec.</i>	175
<i>Figure 145 A gauche les cellules brutes représentées en FSC-A/SSC-A et les cellules sélectionnées. Au milieu, la représentation en SSC-A/SSC-H permettant d'éliminer les doublets de cellules. A droite, sélection des cellules vivantes, non marquées par le DAPI.</i>	176
<i>Figure 146 Fixation du seuil de fluorescence sur le Canal Y1, PE, permettant d'observer la rhodamine.</i>	177
<i>Figure 147 a) position des flacons vue du dessus, b) Aspect des flacons après 110 minutes de polymérisation, c) Fonctions de corrélation obtenues in situ après 110 minutes de polymérisation.</i>	178
<i>Figure 148 En haut, la position des différents flacons et leur configuration vis-à-vis de la lampe. En bas, l'aspect des flacons à l'issue de la première expérience (à gauche) et de la seconde expérience (à droite). Le volume contenu dans les flacons semble différent pour certains, cela est dû à une chute des flacons après la polymérisation et donc à la présence de solution au niveau des bouchons, non visible sur la photo.</i>	179

## Abstract

The use of nanoparticles for biomedical applications is currently increasing. Their properties make them perfect objects, both for the development of new diagnostic methods and as therapeutic vectors. Numerous pathologies can benefit from the use of vectors to transport therapeutic molecules, particularly when their target is difficult to access, to increase the efficacy of a drug or to reduce its associated side effects. Therapeutic strategies to fight cancer often involve molecules with high systemic toxicity that needs to be directed to the tumor, in order to protect the rest of the patient's body. In addition to controlling the vector's destination, mastery of the therapeutic molecule's delivery mechanism is essential to obtain an effective vector. Breast cancer is the most frequently diagnosed and lethal cancer in women. In particular, so-called triple-negative tumors have a poor prognosis due to the limited number of effective therapeutic strategies. Among the new strategies explored, the study of communication between tumor cells and their microenvironment, and in particular adipose tissue, has shown that the latter secretes compounds that induce increased metastasis and resistance to treatment. The fatty acid transporter CD36 has been associated with these mechanisms, making it an interesting target for countering this phenomenon and improving patient prognosis. The aim of this project is to develop new therapeutic vectors capable of targeting the CD36 protein and inducing the controlled release of a therapeutic molecule, with the aim of reducing the metastatic potential of tumors and treatment resistance. To induce the release of the therapeutic molecule, superparamagnetic iron oxide nanoparticles, capable of generating heat in the presence of an alternating magnetic field, were chosen as the core of the vector. The strategy for targeting the CD36 protein is to form imprints in a polymer matrix using molecularly imprinted polymer technology.

## Résumé

Les nanoparticules connaissent actuellement un essor important de leur utilisation pour des applications biomédicales. Leurs propriétés en font des objets de choix, tant pour le développement de nouvelles méthodes de diagnostic que pour une utilisation comme vecteurs thérapeutiques. De nombreuses pathologies peuvent bénéficier de l'utilisation de vecteurs pour transporter des molécules thérapeutiques en particulier lorsque la cible thérapeutique est difficile d'accès, pour augmenter l'efficacité d'un médicament ou diminuer les effets secondaires qui lui sont associés. Les stratégies thérapeutiques pour lutter contre le cancer impliquent souvent des molécules présentant une forte toxicité systémique qu'il est donc nécessaire de diriger spécifiquement vers la tumeur, tout en protégeant le reste de l'organisme du patient. Au-delà du contrôle de la destination du vecteur, la maîtrise du mécanisme de libération de la molécule thérapeutique est essentielle pour obtenir un vecteur efficace. Le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué et le plus mortel chez la femme. En particulier, les tumeurs dites triples négatives sont de mauvais pronostic en raison du nombre restreint de stratégies thérapeutiques efficaces. Parmi les nouvelles pistes explorées, l'étude de la communication entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, et en particulier le tissu adipeux, a montré que ce dernier sécrète des composés induisant une augmentation des métastases et des résistances aux traitements. Le transporteur d'acides gras CD36 a été associé à ces mécanismes, ce qui en fait une cible intéressante pour contrer ce phénomène et améliorer le pronostic des patientes.

L'objectif de ce projet est de développer de nouveaux vecteurs thérapeutiques capables de cibler la protéine CD36 et d'induire la libération contrôlée d'une molécule thérapeutique dans le but de diminuer le potentiel métastatique des tumeurs et les résistances aux traitements. Pour permettre d'induire la libération d'une molécule, des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer, capables de produire de la chaleur en présence d'un champ magnétique alternatif, ont été choisies pour former le cœur du vecteur. La stratégie permettant de cibler la protéine CD36 consiste quant à elle à former des empreintes dans une matrice de polymère en utilisant la technologie des polymères à empreintes moléculaires.