

Année 2018

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université de Franche-Comté

Spécialité : Chimie

Laboratoire UTINAM

Ecole doctorale Carnot-Pasteur

Présentée et soutenue publiquement le 28 août 2018

Par Monsieur Nasser MOHAMED SAID

**Assemblage contrôlé de nanofleurs de maghémite et
de nanoparticules d'or**

Ou comment associer Hyperthermie magnétique et Radiothérapie

Directeur de thèse : Professeur Stéphane ROUX, Université de Franche-Comté

Co-encadrante : Docteur Rana BAZZI, Université de Franche-Comté

Après avis de : Professeur Sylvie BEGIN Rapporteur

Docteur François LUX Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Professeur Sylvie BEGIN Rapporteur

Docteur François LUX Rapporteur

Professeur Igor CHOURPA Examineur

Docteur Florence GAZEAU Examineur

Professeur Stéphane ROUX Membre

Docteur Rana BAZZI Membre

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Dr. Sylvain Picaud, directeur du laboratoire UTINAM, et Pr. Patrick Fievet, directeur de l'équipe NCM pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire UTINAM et de l'équipe NCM.

J'adresse également mes remerciements à Pr. Sylvie BEGIN et à Dr. François LUX pour avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit. Je remercie également Pr. Igor CHOURPA et Dr. Florence GAZEAU d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse Stéphane ROUX qui m'a ouvert les portes du doctorat et du monde de la recherche. Après avoir effectué un stage de master 2 sous votre direction, et malgré mon parcours, vous avez su croire en moi et dans mes capacités d'adaptation en me confiant un sujet de thèse aussi novateur que passionnant. Votre esprit critique, votre honnêteté, votre enthousiasme et votre rigueur scientifique sont autant de qualités que j'ai appréciées et qui m'ont permis de progresser.

J'exprime également ma profonde gratitude à Dr. Rana BAZZI mon encadrante de thèse. Merci pour vos conseils, pour avoir cru en moi et pour m'avoir assisté à la paillassse.

J'adresse également mes remerciements à Dr. Sandrine DUFORT et à Dr. Géraldine LE DUC pour les implantations de tumeurs, les différentes anesthésies et les injections de particules réalisées sur les petits animaux. Merci d'avoir apporté votre expertise et votre savoir-faire à ce travail en plus de votre bonne humeur. Un grand merci également à Dr. Herwig REQUARDT pour les manip MRT réalisées à l'ESRF.

Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont contribué de loin ou de près à ce travail. Je pense notamment à l'équipe de Florence GAZEAU pour les expériences d'hyperthermie magnétique mais également à l'équipe d'Alexis BROISAT pour leur accueil à la plateforme GAIA de Grenoble afin de réaliser des expériences d'imagerie nucléaire.

Je remercie Anthony EFLIGENIR et Boukary LAM avec qui j'ai partagé le bureau dans la bonne humeur. Un grand merci à Gloria JIMENEZ SANCHEZ ma « binôme » de thèse durant ces trois ans, merci pour ton aide et ta bonne humeur durant les longues sessions à l'ESRF.

J'exprime ma profonde gratitude et des remerciements très particuliers à mon épouse Zeinab MOHAMED IDRIS. Merci pour ton soutien dans les moments difficiles comme dans les meilleurs. Merci pour avoir cru en moi et pour m'avoir soutenu malgré les aléas de la vie.

Je remercie chaleureusement ma mère Fathia ISMAEL AHMED et à mon père Mohamed SAID MOHAMED pour m'avoir encouragé dans ce projet, pour m'avoir épaulé et soutenu malgré la distance. Merci pour votre soutien sans faille car sans vous je ne serai pas là. Je vous suis éternellement reconnaissant.

Résumé

Dans les domaines de l'imagerie médicale et la thérapie, l'utilisation des nanoparticules est spécialement attrayante et prometteuse. Il est possible de concentrer dans une même particule plusieurs fonctions complémentaires comme la détection, le ciblage mais aussi la thérapie. Cette multifonctionnalité présente de nombreux avantages, et favorise le développement de nanoparticules pour une thérapie ciblée et guidée par l'imagerie.

C'est dans ce contexte d'intense activité centrée sur le développement des nanoparticules pour les applications médicales (imagerie et/ou thérapie) que s'est déroulé mon travail de thèse qui s'inscrit dans la continuité des travaux de Christophe Alric et de Pierre Hugounenq. Ils ont développé respectivement des nanoparticules d'or multifonctionnelles (Au@DTDTPA) et des nanofleurs d'oxyde de fer (γ -Fe₂O₃).

Les nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) présentent un effet radiosensibilisant et se comportent comme agent de contraste pour l'IRM (après marquage par Gd³⁺ rendu possible par les propriétés chélatantes de la couche organique DTDTPA) ou comme radiotraceurs après radiomarquage (le DTDTPA forme des complexes stables avec ^{99m}Tc et ¹¹¹In). Le caractère superparamagnétique des nanofleurs d'oxyde de fer confèrent à ces objets la capacité à rehausser le contraste négatif des images et à induire un échauffement sous l'action d'un champ magnétique alternatif de haute fréquence.

L'objectif principal de ma thèse consistait à assembler ces deux types de nanoparticules afin de créer un objet nanométrique combinant les propriétés complémentaires des nanoparticules d'or et des nanofleurs d'oxyde de fer. Dans un premier temps, les conditions optimales de greffage des nanoparticules d'or sur les nanofleurs ont été déterminées. Nous avons montré que de tels agents présentaient après injection intraveineuse une biodistribution adaptée comme le révèlent les images acquises en IRM (grâce aux propriétés magnétiques des nanofleurs) et en TEMP (grâce au radiomarquage de la couche des nanoparticules d'or). En outre ces objets présentent un caractère radiosensibilisant qui est mieux exploité que celui des nanoparticules d'or entrant dans la composition de ces nanofleurs dorées. Associé au pouvoir chauffant des nanofleurs, le pouvoir radiosensibilisant des nanofleurs dorées a conduit à une forte inhibition de la croissance tumorale quand le traitement de rats portant un mélanome combine hyperthermie magnétique et radiothérapie après injection intratumorale des nanofleurs dorées.

En conclusion, le travail réalisé au cours de cette thèse a mis en évidence l'intérêt de combiner les nanoparticules d'or et les nanofleurs d'oxyde de fer pour traiter des tumeurs solides par thérapie guidée par imagerie.

Abstract

In the fields of medical imaging and therapy, the use of nanoparticles is especially attractive and promising. It is possible to concentrate in the same particle several complementary functions such as detection, targeting but also therapy. This multifunctionality has many advantages and promotes the development of nanoparticles for targeted therapy and guided by medical imaging.

It is in this context of intense activity focused on the development of nanoparticles for medical applications (imaging and/or therapy) that my thesis work was carried out which is in continuity with the work of Christophe Alric and Pierre Hugounenq. They developed multifunctional gold nanoparticles (Au@DTDTPA) and iron oxide nanoflowers (γ -Fe₂O₃), respectively.

The gold nanoparticles (Au @ DTDTPA) exhibit a radiosensitizing effect and behave as a contrast agent for MRI (after labeling with Gd³⁺, made possible by the chelating properties of the organic layer DTDTPA) or radiotracers after radiolabelling (DTDTPA forms stable complexes with ^{99m}Tc and ¹¹¹In). The superparamagnetic nature of the iron oxide nanoflowers gives these objects the ability to enhance the negative contrast of the images and to induce heating under the action of an alternating magnetic field of high frequency.

The main objective of my thesis was to assemble these two types of nanoparticles in order to create a nanometric object combining the complementary properties of gold nanoparticles and iron oxide nanoflowers. In a first step, the optimal conditions for grafting gold nanoparticles on the nanoflower were determined. We have shown that, after intravenous injection, these agents exhibit a suitable biodistribution, as revealed by MRI images (thanks to the magnetic properties of nanoflowers) and SPECT (thanks to the radiolabeling of the gold nanoparticle layer). Moreover, these objects have a radiosensitizing character which is better exploited than that of the gold nanoparticles in the golden nanoflowers. Associated with the heating power of nanoflower, the radiosensitizing potential of golden nanoflowers has led to a strong inhibition of tumor growth when the treatment of rats carrying melanoma combines magnetic hyperthermia and radiotherapy after injection of golden nanoflower.

In conclusion, the work carried out during this thesis has highlighted the value of combining gold nanoparticles and iron oxide nanoflowers to treat solid tumors by imaging-guided therapy.

Table des matières

Glossaire	9
Introduction	12
Références	15
Chapitre 1. Les « nanothéranostics » pour le traitement du cancer	19
1.1. Le cancer	19
1.1.1. Généralités	19
1.1.2. Oncologie.....	19
1.1.3. Caractéristiques de l'environnement tumoral.....	22
1.2. Les traitements du cancer	23
1.2.1. La chirurgie	24
1.2.2. La chimiothérapie	24
1.2.3. La radiothérapie	25
1.3. Imagerie médicale	27
1.3.1. L'imagerie X (ou la tomodensitométrie)	27
1.3.2. L'imagerie nucléaire	28
1.3.3. L'imagerie par résonance magnétique	30
1.3.4. L'imagerie multimodale	32
1.4. Les théranostics	33
1.4.1. Les Nanothéranostics	34
1.4.2. Les nanoparticules d'or	39
1.4.3. Les nanofleurs de maghémite.....	44
1.4.4. Nanostructures à base de nanoparticules d'oxyde de fer et de nanoparticules d'or	47
1.5. Plan de thèse	48
Références.....	50
Chapitre 2. Synthèse et Caractérisation de nanostructures hybrides à cœur magnétique décorées par des nanoparticules d'or	63
2.1. Introduction	63
2.2. Synthèse de nanoparticules d'or et d'oxyde de fer	65
2.2.1. Les principales voies de synthèse des nanoparticules d'or	65
2.2.2. Les principales voies de synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer.....	68
2.3. Partie expérimentale	70

2.3.1. Généralités	70
2.3.2. Synthèse des nanofleurs de maghémite	70
2.3.3. Synthèse des nanoparticules Au@DTDTPA.....	73
2.3.4. Assemblage contrôlé des nanofleurs d'oxyde de fer et des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA)	74
2.3.5. Solution injectable.....	78
2.3.6. Complexation de l'ion gadolinium sur les nanofleurs dorées.....	78
2.3.7. Radiomarquage des nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA), des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) et des nanofleurs (NF@dopamine-DTPA)	79
2.4. Caractérisations	79
2.4.1. Spectrophotométrie d'absorption UV-Visible	79
2.4.2. Dosage de l'or, du fer et du gadolinium par ICP-OES	80
2.4.3. Microscopie électronique à transmission.....	80
2.4.4. Mesure du potentiel zêta et du diamètre hydrodynamique.....	80
2.4.5. Contrôle du radiomarquage des nanofleurs dorées, des nanoparticules d'or Au@DTDTPA et des nanofleurs (NF@dopamine-DTPA)	80
2.5. Résultats et discussion.....	80
2.5.1. Nanoparticules d'or (Au@DTDTPA)	80
2.5.2. Nanofleurs de maghémite (γ -Fe ₂ O ₃).....	82
2.5.3. Nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA)	84
2.5.4. Caractéristiques des nanofleurs dorées du protocole 3.	91
2.6. Conclusion partielle	94
Références.....	95
Chapitre 3. Amélioration de l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'or.....	101
3.1. Introduction	101
3.2. Protocole expérimental	102
3.2.1. Imagerie par résonance magnétique (IRM)	102
3.2.2. Imagerie nucléaire (TEMP/CT) et scintigraphie	103
3.2.3. Etude du caractère radiosensibilisant des NF dorées	106
3.3. Résultats et discussions	109
3.3.1. Rétention des nanofleurs dorées dans la tumeur	109
3.3.2. Etude de la croissance tumorale	111

3.3.3. La biodistribution des nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA) après injection intraveineuse	114
3.3.4. Etude comparative de l'effet radiosensibilisant des nanofleurs dorées après injection IV	118
3.4. Conclusion partielle	122
Références.....	123
Chapitre 4. Les Nanofleurs dorées : Agents combinant hyperthermie et radiothérapie	127
4.1. Introduction	127
4.2. Protocoles expérimentaux	128
4.2.1. Evaluation du pouvoir chauffant des NF dorées (<i>in vitro</i>)	128
4.2.2. Combinaison hyperthermie magnétique et radiothérapie	129
4.3. Résultats et discussion.....	131
4.3.1. Evaluation du pouvoir chauffant des NF dorées	131
4.3.2. Le chauffage de tumeurs.....	132
4.3.3. Le contrôle de la croissance tumorale par combinaison de l'hyperthermie magnétique et de la radiothérapie par microfaisceau (MRT)	134
4.4. Conclusion	138
Références.....	139
Conclusion et perspectives	140

Glossaire

Abréviation	Signification
NF-Au@DTDTPA	Nanoparticules d'or greffées sur des nanofleurs de maghémite
NMDEA	<i>N</i> - méthyl-diéthanolamine
DEG	Diéthylène glycol
NF	Nanofleurs de maghémite
AuNPs	Nanoparticules d'or
MET	Microscope électronique à transmission
DLS	Diffusion light scattering (diffusion dynamique de la lumière)
EPR	Effet de rétention et de perméabilité (vascularisation de la tumeur)
IRM	Imagerie par résonance magnétique
CT	Computed tomography (tomodensitométrie X)
TEP	Tomographie par émission de positon
Au	L'atome d'or
DTDTPA	Le dérivé dithiolé de l'acide diéthylènetriamine pentaacétique
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
EDC	<i>N</i> -[3-(diméthylamino)propyl]- <i>N'</i> -éthylcarbodiimide
MRT	Microbeam radiation therapy (Irradiation par microfaisceau)
EBV	Virus Epstein-Barr lié au cancer de l'estomac
HPV	Virus du papillome humain lié au cancer de la prostate (chez l'homme) et du col de l'utérus (chez la femme)
Au@DTDTPA	Nanoparticules d'or enrobées par le ligand DTDTPA

SRE	Système réticulo-endothélial
QDs	Quantum dots
PEG	Polyéthylène glycol
IPA	Imagerie photoacoustique
IT	Injection par voie intratumorale
IV	Injection par voie intraveineuse
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
HM	Hyperthermie magnétique
Dopa	Dopamine
VEGF	Vascular endothelial growth factor (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)
FGF	Fibroblast growth factor (facteur de croissance de fibroblastes)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SLP	Specific loss power (puissance spécifique de chauffe)
PLGA	Poly (lactic-co-glycolic acid) (en français l'acide poly (lactic-co-glycolic)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ICP-OES	Spectrométrie d'émission atomique par excitation à plasma
nm	Nanomètre
keV	Kilo-électronvolt
kg	Kilogramme
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
CCM	Chromatographie sur couche mince
UV	Ultraviolet

Z	Numéro atomique
ρ	Masse volumique
M	Mole par litre
mosmol	Milliosmoles
mT	Millitesla
ESRF	Installation européenne de rayonnement synchrotron (European Synchrotron Radiation Facility)
Gd	Gadolinium
ILS	Increase of lifespan (Augmentation de la durée de vie)
pH	Potentiel hydrogène
¹⁸ F _{FDG}	Fluorodésoxyglucose
D _h	Diamètre hydrodynamique
^{99m} Tc	Technetium
¹¹¹ In	Indium
kHz	Kilohertz
MBq	Mégabecquerel
CGFL	Centre George François Leclerc
MeST	Médiane de survie
VADS	Voies aérodigestives supérieures
DTPA	L'acide diéthylènetriamine pentaacétique
DTPA-BA	L'acide diéthylènetriamine pentaacétique bis-anhydride

Introduction

La lutte contre le cancer est aujourd'hui une préoccupation majeure de santé publique, et le nombre de décès par an se compte par millions dans le monde ¹.

Malgré les efforts de la communauté scientifique et médicale, le nombre de cas de cancers et la mortalité continue d'augmenter. Pourtant des progrès considérables ont été obtenus dans le domaine de l'imagerie médicale et dans celui des traitements. L'imagerie joue un rôle crucial dans la détection des tumeurs, le guidage de la thérapie et dans le suivi de l'évolution de la maladie après le traitement. Une fois le diagnostic établi et les contours de la tumeur identifiés grâce entre autres à l'imagerie, un protocole thérapeutique pourra être élaboré.

Pour l'essentiel, le traitement de tumeurs solides cancéreuses repose sur la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie qui peuvent être mises en œuvre seule ou de manière combinée. Dans la majorité des cas, les patients sont traités en partie par radiothérapie avant ou après résection de la tumeur. La radiothérapie consiste à exploiter le caractère cytotoxique des rayonnements ionisants pour contrôler la croissance tumorale. Malheureusement la composition chimique entre les cellules saines et les cellules cancéreuses est trop semblable pour observer une différence d'absorption du rayonnement ionisant (X ou γ) entre les tissus sains à préserver et la tumeur à traiter. La radiothérapie s'accompagne donc de l'altération indésirable de tissus sains qui peut avoir des conséquences délétères. En outre dans un souci de limiter l'impact néfaste des effets secondaires sur les tissus sains, la dose délivrée est souvent insuffisante pour éradiquer la tumeur. Afin de concentrer les effets toxiques des rayonnements ionisants dans la tumeur, un meilleur contrôle spatiotemporel de la délivrance de la dose est requis. Dans cette perspective, des améliorations significatives ont été obtenues en opérant sur la nature du rayonnement, sur sa balistique et sur son fractionnement ². Parallèlement à ces développements reposant sur l'aspect physique des rayonnements, il a été proposé de modifier la composition chimique des tumeurs pour accroître la différence d'absorption entre la zone tumorale et les tissus sains environnants. En effet, les éléments à numéro atomique élevé sont caractérisés par leur propension à absorber les photons X et γ des rayonnements ionisants. L'accumulation de ces éléments dans la zone à traiter devrait donc générer une forte absorption de laquelle découlera une cascade de phénomènes physiques, chimiques et biologiques conduisant à la destruction de la zone dans laquelle se trouvent les agents radiosensibilisants. Les premiers essais réalisés avec des agents de contraste iodés ($Z_I = 53$) pour l'imagerie X et des agents de contrastes à base de chélates de gadolinium ($Z_{Gd} = 64$) se sont révélés décevants. Ces molécules avaient l'avantage

d'être validées pour une utilisation clinique mais leur faible dimension ne permet pas un bon contrôle de leur biodistribution. Or les travaux consacrés au développement de nanoparticules multifonctionnelles pour des applications médicales ont montré qu'un des atouts des nanoparticules réside dans un meilleur contrôle de la biodistribution ³. De plus, les nanoparticules contrairement aux molécules peuvent contenir malgré leurs faibles dimensions une quantité importante d'éléments à haut Z. Les travaux pionniers de Hainfeld ont mis en évidence le potentiel prometteur des nanoparticules d'or pour la radiothérapie guidée par imagerie ⁴. La forte valeur du numéro atomique de l'élément or ($Z_{Au} = 79$) confère aux nanoparticules d'or un comportement d'agent de contraste pour l'imagerie X et d'agent radiosensibilisant. La combinaison de l'imagerie et de la radiosensibilisation a permis d'améliorer la sélectivité du traitement par radiothérapie en activant le traitement quand les nanoparticules administrées par voie intraveineuse étaient présentes préférentiellement dans la tumeur. En raison de son caractère cytotoxique et sa faible sensibilité, l'imagerie X paraît moins adaptée que l'IRM pour guider la radiothérapie. C'est dans ce contexte que l'équipe NCM a développé des nanoparticules d'or de faibles dimensions ($D_{TEM} = 2-3 \text{ nm}$; $D_h = 6-8 \text{ nm}$) recouvertes de chélates de gadolinium. Ces nanoparticules d'or ont été conçues de manière à ce que leur composition et leur taille permettent :

- (i) un suivi par imagerie X (présence de l'élément or), par IRM (présence de Gd^{3+}), par imagerie nucléaire (après radiomarquage rendu possible par la présence de chélateurs libres à la surface des nanoparticules) ^{5,6} ;
- (ii) un rehaussement des effets de la dose appliquée en radiothérapie (effet radiosensibilisant de l'élément or) ⁷ ;
- (iii) et une élimination par la voie rénale ($D_h < 8 \text{ nm}$) qui est un prérequis incontournable pour une utilisation *in vivo* de nanoparticules non biodégradables. Les expériences sur de petits animaux ont confirmé le potentiel prometteur de ces nanoparticules d'or pour la radiothérapie guidée par imagerie. Cependant, ce potentiel semble sous exploité en raison d'une élimination rénale trop rapide qui réduit le temps de résidence vasculaire et limite par conséquent l'accumulation de ces nanoparticules radiosensibilisantes dans les tumeurs solides.

Afin de mieux exploiter le caractère radiosensibilisant des nanoparticules d'or recouvertes de chélates de gadolinium, l'équipe NCM explore plusieurs pistes différentes. Parmi celles-ci, le transport des nanoparticules d'or par des particules biodégradables plus larges a semblé constitué une réponse adaptée pour retarder l'élimination rénale que nous avons tenté d'apporter au cours de mes travaux de thèse. Notre choix pour le transporteur biodégradable s'est porté sur les nanofleurs de maghémite qui présentent un caractère biodégradable comme l'a révélé l'étude

conduite par Florence Gazeau en collaboration avec Rana Bazzi ⁸. De plus, le rôle des nanofleurs ne devrait pas être limité au transport des nanoparticules d'or radiosensibilisantes car leurs propriétés magnétiques confèrent aux nanofleurs un comportement d'agent de contraste négatif pour l'IRM et d'agent chauffant pour l'hyperthermie magnétique ^{9,10}.

L'objectif de ce travail de thèse a donc été de réaliser de manière contrôlée des assemblages nanofleurs-nanoparticules d'or et d'évaluer le gain qu'ils pouvaient procurer en termes de résidence vasculaire, d'accumulation tumorale, d'imagerie et de thérapie.

Après avoir montré l'intérêt d'utiliser les nanofleurs comme transporteurs de nanoparticules d'or (chapitre 1), la synthèse et la caractérisation des nanoparticules d'or, des nanofleurs et des nanofleurs fonctionnalisées par des nanoparticules d'or (appelées nanofleurs dorées) seront décrites dans le chapitre 2. L'effet du transport des nanoparticules d'or par les nanofleurs sur l'exploitation du caractère radiosensibilisant sera discuté dans le chapitre 3. Cependant le rôle des nanofleurs ne se limite pas au transport des nanoparticules d'or. Leur fort pouvoir chauffant permet de combiner l'hyperthermie magnétique et la radiosensibilisation. Les résultats des expériences préliminaires combinant hyperthermie magnétique et radiothérapie sont rassemblés dans le chapitre 4.

Références

1. OMS | Cancer - World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>.
2. Bräuer-Krisch, E. *et al.* Effects of pulsed, spatially fractionated, microscopic synchrotron X-ray beams on normal and tumoral brain tissue. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **704**, 160–6 (2010).
3. Kim, T. H., Lee, S. & Chen, X. Nanotheranostics for personalized medicine. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **13**, 257–269 (2013).
4. Hainfeld, J. F. *et al.* Micro-CT enables microlocalisation and quantification of Her2-targeted gold nanoparticles within tumour regions. *Br. J. Radiol.* **84**, 526–533 (2011).
5. Alric, C. *et al.* Gadolinium Chelate Coated Gold Nanoparticles As Contrast Agents for Both X-ray Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5908–5915 (2008).
6. Alric, C. *et al.* The biodistribution of gold nanoparticles designed for renal clearance. *Nanoscale* **5**, 5930–5939 (2013).
7. Miladi, I. *et al.* The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents. *Small* **10**, 1116–1124 (2014).
8. Javed, Y. *et al.* Biodegradation Mechanisms of Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers and Tunable Shield Effect of Gold Coating. *Small* **10**, 3325–3337 (2014).
9. Lartigue, L. *et al.* Cooperative Organization in Iron Oxide Multi-Core Nanoparticles Potentiates Their Efficiency as Heating Mediators and MRI Contrast Agents. *ACS Nano* **6**, 10935–10949 (2012).
10. Hugounenq, P. *et al.* Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers for Highly Efficient Magnetic Hyperthermia. *J. Phys. Chem. C* **116**, 15702–15712 (2012).

Chapitre 1. Les « nanothéranostics » pour le traitement du cancer.....	19
1.1. Le cancer	19
1.1.1. Généralités	19
1.1.2. Oncologie.....	19
1.1.3. Caractéristiques de l'environnement tumoral.....	22
1.2. Les traitements du cancer	23
1.2.1. La chirurgie	24
1.2.2. La chimiothérapie	24
1.2.3. La radiothérapie	25
1.3. Imagerie médicale.....	27
1.3.1. L'imagerie X (ou la tomodensitométrie).....	27
1.3.2. L'imagerie nucléaire	28
1.3.3. L'imagerie par résonance magnétique	30
1.3.4. L'imagerie multimodale	32
1.4. Les théranostics	33
1.4.1. Les Nanothéranostics	34
1.4.2. Les nanoparticules d'or	39
1.4.3. Les nanofleurs de maghémite.....	44
1.4.4. Nanostructures à base de nanoparticules d'oxyde de fer et de nanoparticules d'or	47
1.5. Plan de thèse	48
Références.....	50

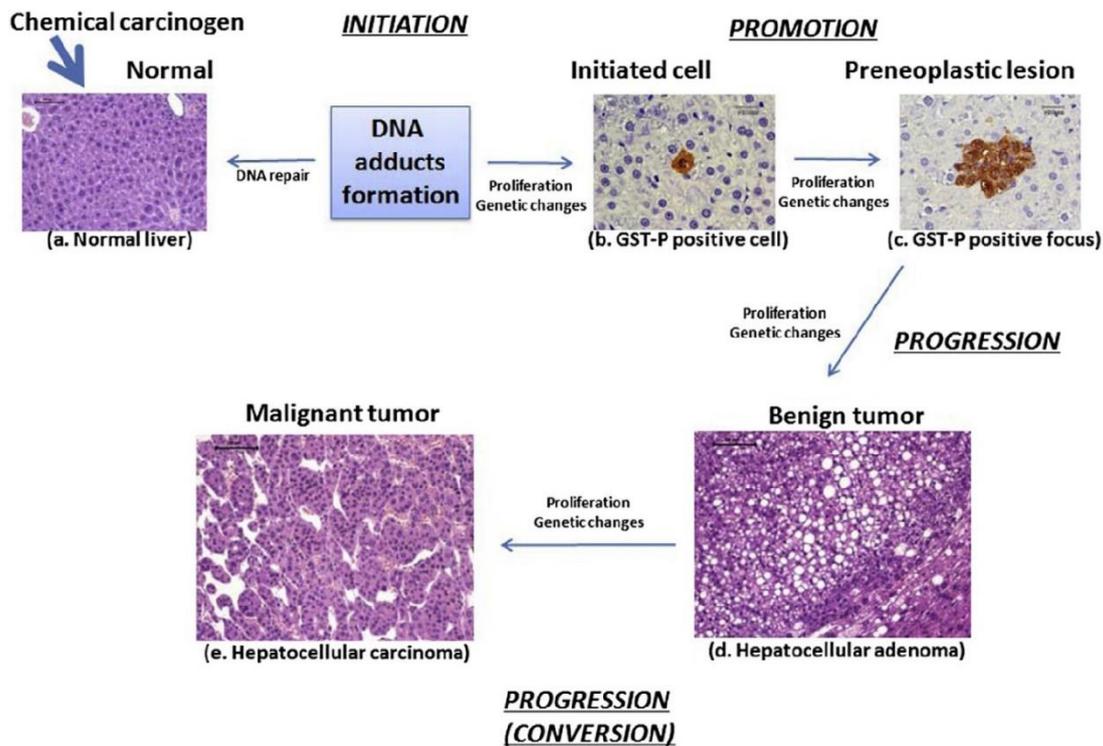


Figure 1. Mécanisme de la carcinogenèse ³.

Initiation

Lorsqu'une cellule saine est exposée à des agents carcinogènes physiques (rayonnements ionisants, UV...), chimiques (tabac, hydrocarbures aromatiques...) et viraux (EBV, HPV...), une altération ponctuelle et définitive de l'ADN (mutation, délétion, translocation) survient : c'est l'altération initiatrice.

Cette altération qui affecte le génome s'accompagne d'aucune modification phénotypique et n'est pas suffisante à elle seule pour transformer la cellule normale en cellule cancéreuse.

Cette mutation peut conférer à la cellule un avantage en termes de prolifération ou de survie, quand cela concerne des gènes majeurs (oncogène, gène de réparation de l'ADN...).

Dans les cancers d'origine génétique, cette mutation est présente d'emblée.

Promotion

Cette étape est liée à l'exposition prolongée à des agents promoteurs, ils n'induisent pas de lésion de l'ADN, mais favorisent la multiplication cellulaire et ainsi l'expression de la mutation initiatrice (facteurs de croissance, cytokines, hormones).

Lors de ces multiplications, les modifications génétiques s'accumulent à chaque division jusqu'à produire la cellule cancéreuse. C'est l'étape de sélection et de prolifération des cellules initiées.

Progression

La prolifération des cellules anormales se poursuit, favorisée par la perte de contrôle du cycle cellulaire, aboutissant à un clone tumoral (accumulation de cellules ayant les mêmes anomalies génétiques).

Au cours des différentes divisions, de nouvelles anomalies génétiques s'accumulent grâce à l'absence de réparation de l'ADN et à l'échappement à l'apoptose ; on parle d'instabilité génomique.

Les anomalies cellulaires résultant du débordement du système de réparation et de sauvegarde du génome engendrent la formation des cellules cancéreuses. Ces dernières se développent de manière anarchique, grossissent jusqu'à atteindre le stade de tumeur et ne ressemblent aucunement aux cellules saines voisines ⁴.

La cellule cancéreuse peut toutefois quitter le nid tumoral en circulant dans l'organisme via le sang ou la lymphe pour former ainsi d'autres tumeurs. Ce phénomène est appelé métastase.

Le développement de la tumeur résulte d'une croissance anormale et anarchique des cellules cancéreuses. L'hypoxie qui est observée dans la zone centrale de la tumeur est à l'origine de la néoangiogenèse ⁵, c'est-à-dire le développement d'un réseau de nouveaux vaisseaux destiné à alimenter en nutriment et oxygène la tumeur.

B. L'angiogenèse : développement d'une tumeur

L'angiogenèse est le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont produits à partir des vaisseaux préexistants. Ce processus est régulé par des mécanismes complexes (équilibre entre substances anti-angiogéniques et pro-angiogéniques endogènes dans l'environnement local) qui prennent en considération le besoin physiologique des cellules ⁶.

L'hypoxie qui survient dès que la taille de l'amas de cellules cancéreuses atteint 1-2 mm³ à la suite de la croissance anarchique des cellules cancéreuses est à l'origine du « switch angiogénique ». Ces dernières commencent à sécréter des facteurs de croissance pro-angiogénique tel que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelial growth factor* VEGF) et le facteur de croissance de fibroblastes (*fibroblast growth factor* FGF). La sécrétion de ces facteurs de croissance fait basculer l'équilibre entre substances pro- et anti-angiogéniques pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales essentielles à la création de nouveaux vaisseaux sanguins. Ces derniers vont assurer l'approvisionnement des tumeurs en oxygène, en nutriments et garantir ainsi leur croissance (Figure 2).

La néo-vascularisation est un processus important et essentiel pour le développement tumoral, mais également pour la formation et la dissémination des métastases dans les organes les plus éloignés. L'expansion métastatique via la vascularisation est la principale cause de décès par le cancer ⁷.

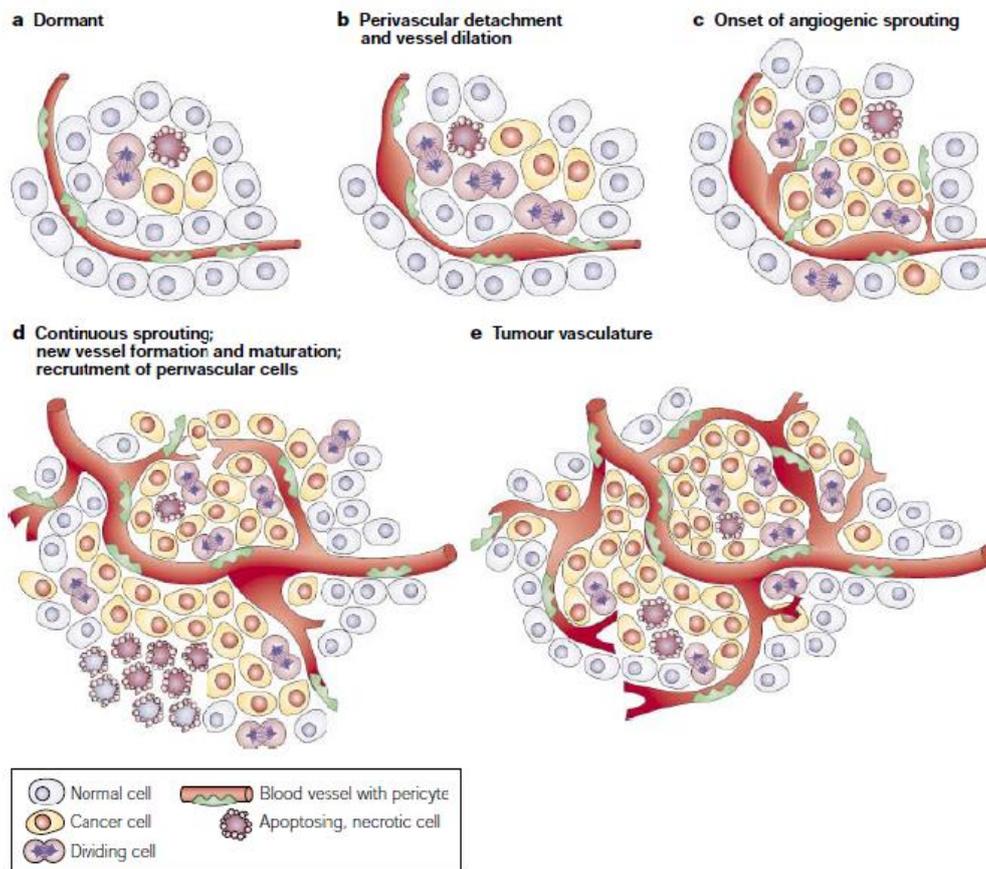


Figure 2. Mécanisme de la vascularisation tumorale ⁸.

1.1.3. Caractéristiques de l'environnement tumoral

La différence de porosité entre les vaisseaux qui irriguent les tumeurs, et ceux qui irriguent les tissus sains et l'absence de drainage lymphatique dans l'environnement tumoral peuvent être exploitées pour accumuler préférentiellement des agents d'imagerie et/ou de thérapie.

Afin de permettre une telle accumulation préférentielle, les agents devront être conçus de façon à être suffisamment larges pour ne pas traverser la paroi des vaisseaux qui irriguent les tissus sains (diamètre de pore inférieur à 3 - 6 nm) et suffisamment petits pour passer à travers les pores des vaisseaux qui irriguent les tumeurs (diamètre de l'ordre de plusieurs centaines de nanomètres).

D'après la littérature consacrée à l'étude de la biodistribution de divers objets à usage médical, la taille adaptée pour cibler préférentiellement une tumeur est comprise entre 2 nm et 150 nm.

Si l'accumulation ne fait pas intervenir d'interaction reposant sur une affinité spécifique entre les agents d'imagerie et/ou de thérapie, le ciblage est dit passif (Figure 3). Cette stratégie est la plus simple à mettre en œuvre.

En revanche, les agents peuvent être fonctionnalisés dans le but de présenter une plus forte affinité avec des molécules présentes à la surface des cellules cancéreuses ou des néovaisseaux qui irriguent les tumeurs.

L'interaction qui s'établira entre les molécules du micro-environnement tumoral et les agents administrés pour l'imagerie médicale et/ou pour la thérapie permettra un allongement de leur durée de séjour dans la tumeur solide. Un ciblage reposant sur une telle interaction est qualifié d'actif (Figure 3).

Comme ces molécules sont en général plus abondantes que dans les tissus sains en raison d'une surexpression caractéristique du développement tumoral, la fonctionnalisation destinée à rendre les agents plus affins conduit en outre à une accumulation plus importante.

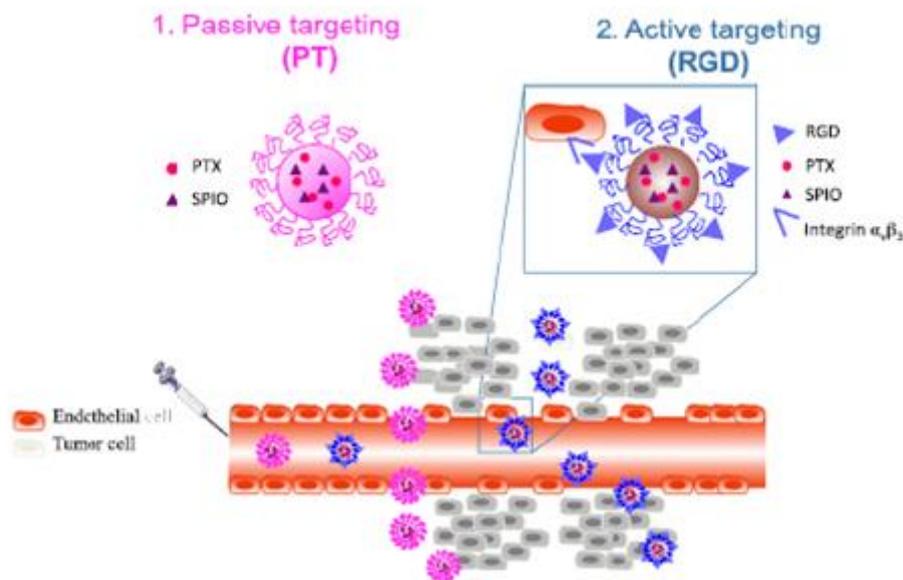


Figure 3. Représentation schématique adaptée du ciblage passif et du ciblage actif ⁹.

1.2. Les traitements du cancer

De nos jours, trois différentes stratégies thérapeutiques sont principalement mises en œuvre seules ou le plus souvent en combinaison. Il s'agit de :

- la chirurgie ;
- la chimiothérapie ;
- la radiothérapie.

1.2.1. La chirurgie

L'intervention chirurgicale constitue généralement la première étape du traitement après le diagnostic d'un cancer.

Selon la taille, la localisation et la nature de la tumeur, deux techniques chirurgicales sont souvent employées afin de traiter le cancer :

- La mastectomie ;
- La tumorectomie.

La mastectomie est une ablation complète de la tumeur comme dans le cas du cancer du sein. Ce traitement radical qui permet d'ôter tout le tissu afin de limiter les récurrences est souvent utilisé dans les cas où ce dernier ne présente aucun danger au patient.

L'autre technique qui est la tumorectomie, souvent pratiquée lors des traitements de tumeurs de petites tailles consiste à enlever une partie de l'organe où la tumeur a été localisée. Ce traitement est conservateur et privilégie un aspect plus esthétique comme les tumeurs sont très petites¹⁰.

Cependant, l'intervention chirurgicale présente certains inconvénients, comme des infections au niveau du site opératoire, des douleurs après une opération, mais aussi des complications liées à l'anesthésie. De plus, elle se limite aux tumeurs accessibles tels que par exemple, le cancer du sein ou encore celui de la prostate.

D'autres traitements tels que la chimiothérapie et/ou la radiothérapie sont utilisées conjointement à la chirurgie pour augmenter les chances de guérison.

1.2.2. La chimiothérapie

Généralités :

La chimiothérapie repose sur des molécules qui entraînent un arrêt du cycle cellulaire (effet cytostatique) et/ou une mort cellulaire (effet cytotoxique) principalement par apoptose.

Ces molécules sont souvent utilisées en association pour avoir un effet additif ou synergique et éviter l'apparition de résistances tumorales. En revanche, il est plus judicieux d'éviter l'association des chimiothérapies ayant des effets secondaires semblables pour limiter le risque de toxicité grave.

Les molécules sont administrées par voie intraveineuse le plus souvent. Le traitement par chimiothérapie doit être précoce, réalisé en traitement intensif (court) à la dose maximale tolérée, adapté à la surface corporelle et à la fonction rénale.

Les types d'utilisation de la chimiothérapie :

La chimiothérapie peut être utilisée à différents moments de la prise en charge d'un cancer :

- **En néoadjuvant** : avant le traitement chirurgical pour :

- Réduire la masse tumorale et permettre une chirurgie plus conservatrice ou plus complète ;
- Agir précocement sur les micro-métastases et éviter la survenue de métastases ultérieures.
- **En adjuvant** : après la chirurgie pour diminuer les rechutes, agir sur les micro-métastases et augmenter la survie

La chimiothérapie peut être à visée :

- Curative : en général associée à d'autres traitements (chirurgie, radiothérapie) ;
- Palliative : dans le but d'allonger la survie, d'améliorer la qualité de vie et les symptômes, mais elle ne permettra pas une guérison.

Le traitement par chimiothérapie présente également des inconvénients comme des troubles digestifs, ou encore une toxicité biologique (rénale ou hépatique).

La chimiothérapie est souvent utilisée comme traitement concomitant, adjuvant ou néoadjuvant à la radiothérapie pour augmenter son efficacité.

1.2.3. La radiothérapie

Depuis la découverte des rayons X à la fin du 19^{ème} siècle, la radiothérapie est un des piliers historiques du traitement des cancers, avec la chirurgie et la chimiothérapie. Plus de 60% des patients atteints d'un cancer sont traités par irradiation au cours de leur maladie ¹¹.

L'approche la plus courante de la radiothérapie repose sur l'envoi de rayonnements ionisants de hautes énergies (X, gamma), délivrés par des accélérateurs et orientés vers l'emplacement de la tumeur.

Ensuite, ces radiations ionisantes suite au dépôt d'énergie lors de la traversée du faisceau entraînent une altération sur des molécules biologiques soit par un effet direct soit par un effet indirect.

Les effets indirects sont issus de l'ionisation dans l'eau, composant principal des tissus et des organes du corps humain.

L'ionisation de l'eau crée des radicaux libres qui ont des propriétés soit oxydantes (HO·), soit réductrices (H·), et des électrons aqueux (e⁻_{aq}). Ces derniers ont une durée de vie très courte (10⁻⁵ s) car ils sont extrêmement réactifs.

Ces radicaux peuvent donner lieu à différentes réactions de recombinaison pour produire du dihydrogène (H₂) ou du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui à leur tour vont agir sur des biomolécules contenues dans les cellules et induire des effets délétères sur le fonctionnement de ces cellules.

Les effets directs sont dus à l'interaction direct du rayonnement ionisant avec les biomolécules constituant la cellule. Après interaction du rayonnement ionisant avec la

matière, des électrons ou des photons qui constituent le rayonnement secondaire interagissent à leur tour avec les constituants des cellules se trouvant à proximité. Ces interactions provoquent l'apparition d'espèces réactives et instables qui entraînent des lésions des biomolécules (Figure 4).

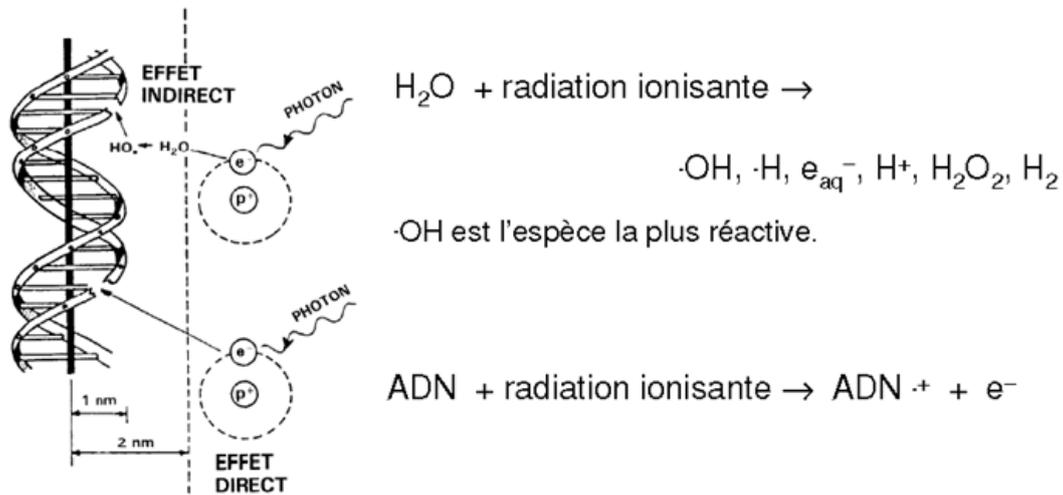


Figure 4. Représentation schématique adaptée des effets du rayonnement sur les cellules ¹².

L'ADN est la cible privilégiée de ces atteintes moléculaires. Après irradiation, soit les lésions d'ADN et les lésions cellulaires sont réparées, soit elles sont trop importantes et entraînent la mort cellulaire par apoptose.

Toutefois la radiothérapie classique actuellement utilisée dans les cliniques manque de sélectivité pour traiter efficacement les tumeurs radiorésistantes telles que les gliomes.

Pour pallier le manque de sélectivité de la radiothérapie, l'utilisation de composés contenant des agents à numéro atomique élevé a été proposée. Comme les agents à haut Z sont connus pour leurs capacités à absorber fortement les rayonnements ionisants. Leur présence dans la tumeur permet de déposer une plus forte dose dans la zone à traiter et garantit alors une meilleure préservation des tissus sains situés près de la tumeur en raison d'une plus forte absorption du faisceau incident. En outre, le supplément d'absorption par les éléments à haut Z induit une augmentation de la production de radicaux libres qui en altérant les biomolécules renforce l'action délétère de la radiothérapie sur les cellules cancéreuses. Il existe des nombreux exemples dans la littérature, notamment les travaux d'Hainfield ¹³, qui ont montré le potentiel des nanoparticules d'or à améliorer la sélectivité de la radiothérapie. La propension de l'or à absorber les rayons X confère également aux nanoparticules d'or un comportement d'agents de contraste pour la tomodensitométrie X (imagerie X).

Quelle que soit la stratégie thérapeutique mise en œuvre, le suivi à chaque étape du traitement constitue un facteur primordial pour améliorer l'efficacité des soins et le confort du patient. L'imagerie médicale est donc un outil indispensable dans la lutte contre le cancer.

1.3. Imagerie médicale

L'imagerie médicale présente un atout majeur dans la lutte contre le cancer. En effet, avant tout traitement thérapeutique, la détection et la visualisation de la tumeur sont cruciales pour le diagnostic, le choix et la mise en œuvre du traitement.

Ensuite, une fois que le traitement a été administré au patient, le médecin établit un suivi en faisant différentes analyses et éventuellement de l'imagerie pour évaluer le comportement des tissus après le traitement.

L'imagerie médicale joue également un rôle essentiel dans les études précliniques. La mise au point d'un agent thérapeutique nécessite un suivi par imagerie pour localiser l'agent après administration. Afin d'exploiter au mieux le potentiel des différentes modalités d'imagerie médicale, il est important de connaître leurs avantages et inconvénients. Nous nous intéresserons particulièrement à l'imagerie X, l'imagerie nucléaire et l'imagerie par résonance magnétique car elles sont très utilisées dans la lutte contre le cancer.

1.3.1. L'imagerie X (ou la tomодensitométrie)

L'imagerie par rayons X (ou communément appelée tomодensitométrie) est le premier mode d'imagerie utilisé pour la détection des tumeurs en clinique. Cette dernière est encore largement utilisée de nos jours pour visualiser les tumeurs.

Principe de la tomодensitométrie

La tomодensitométrie X est basée sur la différence d'atténuation des rayons X en fonction de la densité des tissus ¹⁴.

Une source de rayons X tourne autour du patient, et du côté opposé est placé un détecteur qui reçoit les photons transmis par le corps du patient. Ainsi des projections multiples de photons sont recueillies sous forme de données numériques, qui sont reconstruites sous forme d'image.

En effet, l'imagerie X fournit des clichés anatomiques du corps entier en trois dimensions dotés d'une résolution spatiale et temporelle élevée.

Cependant, les principales limitations du scanner X concernent l'exposition élevée aux rayonnements ionisants qui limite le nombre d'examens en raison des effets néfastes provoqués par les rayons X sur le corps ¹⁵.

De plus, le contraste des tissus mous et la sensibilité restent faibles. L'utilisation d'agents à haut Z permet de rehausser le contraste des tissus mous car les éléments à Z élevés sont caractérisés par leur capacité à fortement absorber les rayons X. Ainsi, il devient plus aisé de différencier sur les clichés les tissus sains et les tissus tumoraux.

En raison de leur numéro atomique élevé ($Z_I = 53$), les molécules contenant plusieurs atomes d'iode ¹⁶ sont couramment utilisées en clinique comme agents de contraste pour l'imagerie X. Cependant ces derniers sont éliminés très rapidement par voie rénale, ce qui limite le temps d'imagerie.

L'imagerie X est souvent utilisée en combinaison avec d'autres types d'imageries telles que l'imagerie nucléaire.

1.3.2. L'imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire repose sur la détection de photons γ ou de positons β^+ émis directement ou indirectement par la désintégration nucléaire d'un isotope radioactif. Elle nécessite donc l'injection d'isotopes radioactifs aux patients dans le but d'explorer l'organisme pour déceler une pathologie particulière, ou réaliser un suivi thérapeutique. Le choix de l'isotope radioactif utilisé est déterminé d'une part, par son mode de désintégration qui permet une détection externe du rayonnement émis, mais également par sa période.

Il existe 2 types d'imagerie nucléaire à savoir la TEMP (appelée tomographie par émission mono-photonique) utilisant des émetteurs de photons γ et la TEP (appelée tomographie par émission de positons) qui quant à elle fait appel à des émetteurs de positons β^+ .

La tomographie par émission mono-photonique (TEMP)

La tomographie par émission mono-photonique (TEMP ou SPECT en anglais) est une technique d'imagerie médicale qui mesure la distribution tridimensionnelle d'un agent radiopharmaceutique au sein de l'organisme.

La TEMP permet d'imager le corps entier des patients. Les agents radiopharmaceutiques sont essentiellement des radionucléides émetteurs de photons γ qui sont injectés dans l'organisme via des vecteurs pour suivre leur biodistribution dans le temps et à l'aide de γ -caméras.

Les avantages de la TEMP réside dans son excellente sensibilité et une quantification précise de la radioactivité dans les organes d'intérêt. Toutefois, malgré une excellente sensibilité, la TEMP est handicapée par une faible résolution spatiale qui rend difficile la localisation des tumeurs. Cependant, ce handicap peut être réduit en couplant la TEMP à un scanner X pour améliorer la résolution spatiale. L'autre paramètre qui handicape la TEMP est son caractère ionisant, bien que les concentrations en radioéléments employées soient extrêmement faibles.

La tomographie par émission de positons

La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie médicale qui mesure la distribution tridimensionnelle d'une molécule marquée par un émetteur de positons.

Les émetteurs de positons sont caractérisés par un excès de charge positive dans leurs noyaux. Ils se désintègrent vers un état stable, par une transformation d'un proton en un neutron qui conduit à l'émission d'un positon. Celui-ci est de masse égale à celle d'un électron mais de charge opposée. Une fois émis, le positon parcourt quelques millimètres dans les tissus, au cours desquels il perd toute son énergie cinétique. Quand le positon est au repos, il interagit avec un électron du milieu, suivant une

réaction d'annihilation au cours de laquelle la masse des deux particules se transforme en deux photons gamma de 511 keV, émis dans des directions diamétralement opposées (Figure 5).

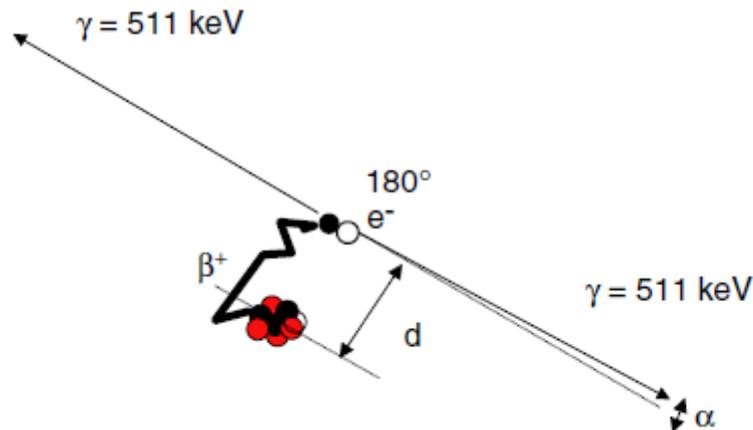


Figure 5 : Emission d'un positon et réaction d'annihilation ¹⁷.

Le principe de base de la TEP consiste à détecter les deux photons de 511 keV pour déterminer le lieu de la réaction d'annihilation. L'information mesurée correspond au lieu d'annihilation et non à celui de l'émission du positon (β^+). La distance entre ces deux lieux (d) est appelée libre parcours moyen du positon. Déterminé par l'énergie d'émission du positon, le libre parcours moyen a des conséquences néfastes sur la résolution spatiale.

Une autre limite intrinsèque, en termes de résolution spatiale en TEP, provient de la colinéarité des deux photons de 511 keV, résultant de l'annihilation d'un positon qui n'a pas intégralement perdu son énergie cinétique. Ce défaut de colinéarité peut-être de l'ordre de 0,5°.

La combinaison de ces deux phénomènes constitue une limite intrinsèque en termes de résolution spatiale, propre à la détection en coïncidence.

L'obtention d'une image en TEP s'effectue en deux étapes :

- La mesure des projections de l'objet, en utilisant le principe de la détection en coïncidence ;
- La reconstruction tomographique, qui permet l'obtention de la distribution tridimensionnelle du traceur.

L'acquisition est réalisée par un ensemble de deux détecteurs répartis autour du patient. Ces détecteurs sont composés d'un circuit électronique complexe permettant de déterminer la projection du lieu d'annihilation. Par la suite les images sont obtenues par reconstruction tomographique sur des stations informatiques puissantes équipées d'une application logicielle permettant l'analyse et la quantification d'image.

La TEP possède une excellente sensibilité comparée aux techniques de scintigraphie mais son handicap reste toutefois sa faible résolution spatiale.

Un des radiotraceurs les plus utilisés est le ^{18}F qui a une durée de vie de 120 minutes. Il est en général administré sous la forme de ^{18}F FDG (fluorodésoxyglucose) qui résulte d'une modification de la molécule de glucose. Le ^{18}F FDG reste actuellement la molécule la plus largement employée dans les centres cliniques pratiquant la TEP.

D'autres radioéléments sont également utilisés :

Isotopes	^{11}C	^{13}N	^{15}O	^{18}F	^{68}Ga	^{76}Br	^{64}Cu
Période des radioéléments (min)	20,4	10,0	2,1	109,8	67,71	972	762

Tableau 1. Période de quelques radioéléments.

La tomодensitométrie et l'imagerie nucléaire ont comme point commun l'utilisation de rayonnement ionisant qui rend la mise en œuvre assez compliquée comparée à l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

1.3.3. L'imagerie par résonance magnétique

L'IRM est une technique de diagnostic médical qui repose sur le principe de la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui permet de suivre la réponse des protons lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique. Du fait de leur forte teneur en eau, les tissus mous de l'organisme sont riches en protons.

Comme pour tout noyau portant une charge, cette charge tourne autour de celui-ci et engendre un dipôle magnétique appelé moment magnétique. En l'absence de champ magnétique extérieur, les moments magnétiques nucléaires μ sont orientés aléatoirement. En présence d'un champ magnétique intense et uniforme B_0 , les moments magnétiques nucléaires s'alignent avec ce champ et acquièrent une aimantation M_0 proportionnelle à la densité de protons. Les moments magnétiques tournent autour de l'axe du champ à une vitesse caractérisée par une fréquence F_0 , appelée fréquence de Larmor. Ensuite l'application d'un rayonnement électromagnétique semblable à celui utilisé en radio (radiofréquence) se traduit par un basculement de l'aimantation M_0 par rapport à sa valeur initiale qui acquiert une composante transversale (aimantation transversale) et une composante longitudinale (aimantation longitudinale) (Figure 6).

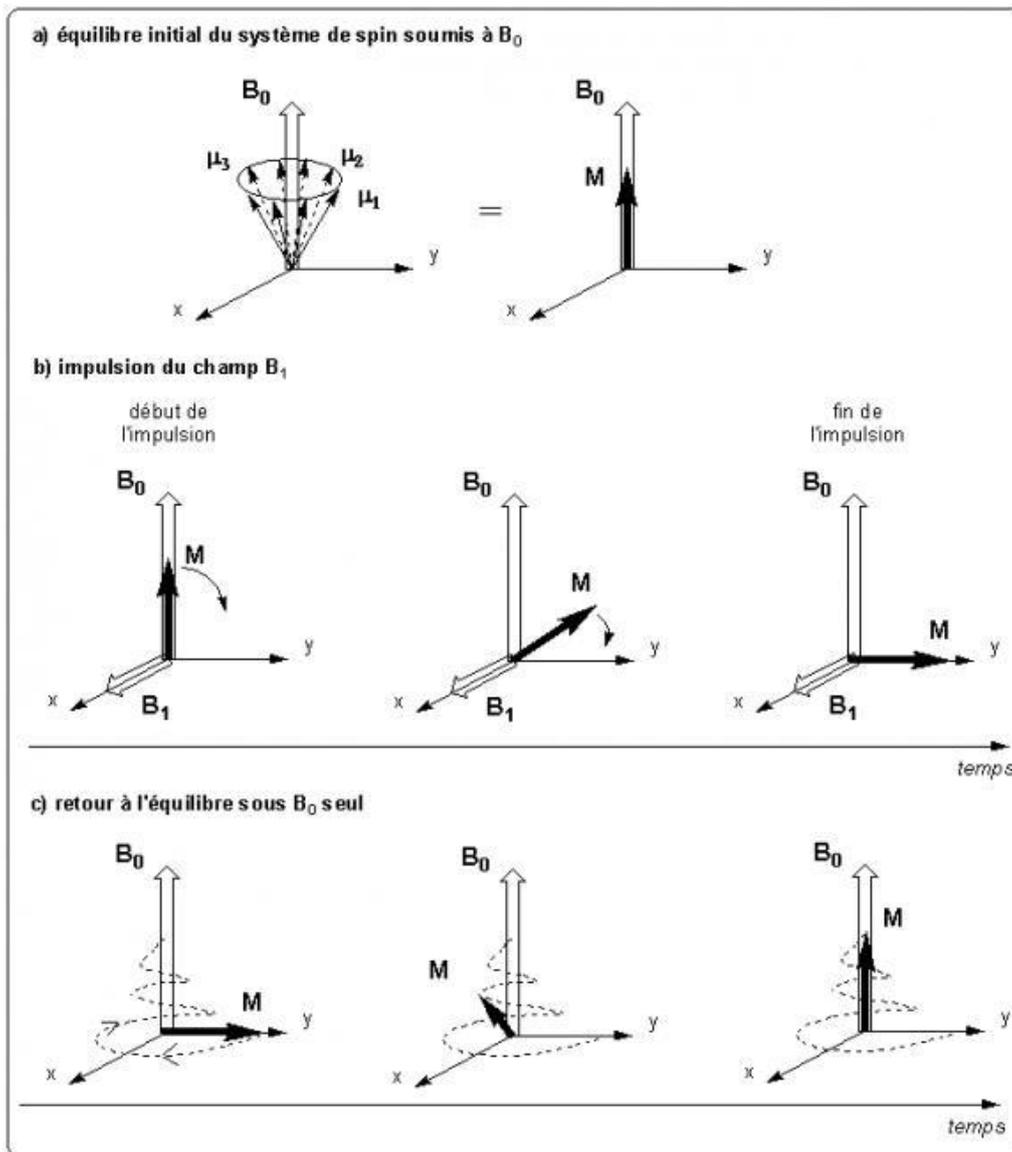


Figure 6. Représentation schématique de l'aimantation M_0 et de ses composantes longitudinales et transversales après l'application d'un champ magnétique B_0 et d'un champ radiofréquence B_1 ¹⁸.

A la fin de l'excitation, l'aimantation nucléaire retourne à sa position d'équilibre parallèle à B_0 . Ce retour à l'équilibre, appelé « relaxation », n'est pas instantané. Son évolution au cours du temps est caractérisée par deux temps T_1 et T_2 . Le temps de relaxation longitudinale (T_1) correspond à la repousse de l'aimantation longitudinale, alors que le temps de relaxation transversale (T_2), appelé aussi temps de relaxation spin-spin correspond à la décroissance de l'aimantation transversale¹⁹. Les temps de relaxation T_1 et T_2 dépendent de la viscosité du milieu, de la masse et de la taille des molécules constituant le tissu. Cependant, la faible différence de composition en eau entre les tissus sains et tumoraux rend très difficile le diagnostic précoce de tumeur. Pour améliorer la détection de tumeur, l'utilisation d'agents de contraste permet d'agir sur les temps de relaxation T_1 et T_2 . Les agents de contraste à base d'ion gadolinium permettent un rehaussement de contraste en agissant sur le temps de relaxation

longitudinale (effet T₁, contraste positif) alors que les agents particuliers à base d'oxyde de fer induisent un assombrissement du contraste (effet T₂, contraste négatif). L'autre inconvénient de l'IRM est son temps d'acquisition extrêmement long qui rend difficile l'étude de la biodistribution d'un corps entier.

Chacune des techniques d'imagerie médicale décrites dans ce chapitre présente des avantages et des inconvénients. Afin de minimiser les inconvénients, la tendance actuelle qui se dessine dans le domaine de l'imagerie médicale consiste à associer au moins deux techniques d'imagerie médicale complémentaires.

1.3.4. L'imagerie multimodale

L'imagerie multimodale permet de combiner deux ou plusieurs techniques d'imagerie complémentaires dans un seul imageur afin de garantir une plus grande fiabilité dans l'interprétation des images. L'association TEP/CT ou TEMP/CT est probablement la combinaison la plus ancienne puisqu'il existe depuis la fin du 20^{ème} siècle (1998) des appareils développés par Siemens Médical pour les applications cliniques^{20,21}. L'acquisition simultanée d'images par tomodensitométrie et par TEMP ou TEP a rendu l'interprétation des images TEMP ou TEP plus fiable en permettant une localisation plus précise des sources radioactives. La combinaison de l'IRM avec la TEP ou la TEMP permettra alors d'allier la bonne résolution de l'IRM avec l'excellente sensibilité de la TEP ou de la TEMP tout en minimisant les défauts de chacune de ces modalités d'imagerie. Cette association devrait conduire à une interprétation plus fiable des données d'imagerie. Par exemple, l'IRM possède une bonne résolution spatiale, mais présente une faible sensibilité contrairement aux techniques d'imagerie nucléaire telles que la TEP et la TEMP qui sont caractérisées par une bonne sensibilité, mais présentent une faible résolution spatiale. Cependant, la mise en œuvre d'imagerie multimodale combinant IRM/TEP ou IRM/TEMP bien que prometteur est ralentie par la difficulté de combiner dans un même imageur l'aimant de l'IRM et l'électronique sensible de la TEP ou TEMP. Actuellement seulement deux appareillages combinant IRM et TEP sont commercialement disponibles²²⁻²⁵.

1.3.5. Thérapie guidée par imagerie

Les systèmes de thérapie conventionnelles pour certaines maladies, telles que le cancer ou les maladies métaboliques présentent des limitations importantes car le traitement le plus approprié peut-être différent pour chaque patient et l'état de la maladie est en constante évolution.

Par conséquent, la médecine subit actuellement un changement de paradigme vers un modèle de traitement personnalisé. Cependant, étant donné que la compréhension de la relation entre les génotypes et la pharmacocinétique des médicaments est limitée²⁶, il est nécessaire de développer des stratégies complémentaires pour adapter le traitement à chaque patient. Le suivi par imagerie des agents thérapeutiques dont l'activité peut être commandée à distance constitue une voie intéressante à explorer car il permettra de déterminer le moment optimal pour déclencher le traitement.

Dans ce contexte, le concept de thérapie guidée par imagerie ouvre de nouvelles perspectives. La mise en œuvre de tels agents serait très intéressante surtout pour les thérapies commandées à distance. Le contrôle à distance permet de déclencher l'effet thérapeutique grâce à un stimulus extérieur au moment le plus opportun qui correspond au moment où l'agent thérapeutique est à la fois présent en quantité importante dans la tumeur et quasiment absent dans les tissus sains environnants.

La personnalisation du traitement qu'offre la thérapie guidée par imagerie reposera donc sur le développement d'agents qui combinent une activité thérapeutique commandée à distance et au moins une modalité d'imagerie.

Cependant, la mise en œuvre d'agents combinant thérapie et imagerie semble inenvisageable avec des molécules pour diverses raisons :

- Une biodistribution inadaptée : en raison de leur taille très réduite, les molécules parviennent à passer à travers les parois de vaisseaux qui irriguent les tissus sains malgré le très faible espace entre deux cellules. Elles diffusent donc dans l'ensemble de l'organisme, ce qui rend le ciblage des tumeurs solides plus difficile ;
- Une élimination trop rapide : les molécules sont éliminées très rapidement de l'organisme, ce qui nécessite d'agir très vite après injection ;
- Une multifonctionnalisation difficile : il est difficile d'introduire dans une même molécule suffisamment de fonctions pour la thérapie commandée à distance et pour l'imagerie.

Les limitations des molécules expliquent pourquoi une intense activité de recherche s'est développée autour des applications médicales des nanoparticules multifonctionnelles. Par un contrôle de la taille, de la forme et de la composition les nanoparticules présentent un potentiel prometteur pour combiner à la fois imagerie, thérapie et une biodistribution adaptée.

1.4. Les théranostics

Le terme « théranostic » a été inventé en 2002 par Funkhouser ²⁷, et est défini comme un agent qui combine les capacités de thérapie et de diagnostic.

Très évocateur, ce mot-valise peut néanmoins induire une confusion car il donne l'impression que l'utilisation de ces théranostics permet de mettre en place le traitement dans la foulée du diagnostic réalisé grâce à ces agents combinant imagerie et thérapie. Or un tel scénario n'est pas réaliste car le temps qui s'écoule entre le diagnostic, qui demande souvent à être confirmé, et la mise en œuvre d'un traitement est souvent trop long (en raison d'examen complémentaires à effectuer et de la discussion au sein de l'équipe médicale pour définir la meilleure stratégie) pour exploiter le potentiel thérapeutique des théranostics après les avoir administrés pour le diagnostic. En revanche, la combinaison de modalités d'imagerie et d'une activité thérapeutique commandée à distance par un stimulus physique ou *in situ* par une variation des conditions chimiques ou biochimiques est extrêmement attrayante dans

le cadre de la thérapie guidée par imagerie. Cette dernière permet d'activer l'effet thérapeutique des théranostics au moment le plus opportun déterminé à partir des données collectées par le suivi des agents en imagerie. Ainsi, la thérapie guidée par imagerie peut s'adapter à chaque situation en améliorant la sélectivité du traitement et garantir une meilleure personnalisation du traitement.

De plus, comme nous l'avions suggéré au paragraphe précédent, l'utilisation d'agents particuliers est la mieux adaptée pour combiner imagerie et thérapie et donc pour préparer des agents théranostiques.

1.4.1. Les Nanothéranostics

1.4.1.1. Concept

Avec le développement des nanoparticules, cette possibilité de combiner différentes fonctions permet au terme « théranostics » de prendre tout son sens car les agents développés permettront de combiner imagerie et thérapie, et pour distinguer des molécules on adjoint le préfixe « Nano ». En effet, comme nous avons explicité dans le paragraphe (1.3.5), les molécules ne sont pas les mieux adaptées pour la thérapie guidée par imagerie.

Pour développer un agent « nanothéranostique », il faut tenir compte de plusieurs paramètres. Les agents conçus pour combiner imagerie et activité thérapeutique contrôlée à distance, devront s'accumuler préférentiellement dans la tumeur par effet EPR, c'est-à-dire en s'appuyant sur la différence de physiologie entre la tumeur et les tissus sains qui a été évoquée dans le paragraphe 1.1.3.

Les objets développés à cet effet, seront assez volumineux pour ne pas diffuser dans les tissus sains, permettant ainsi de circonscrire l'effet thérapeutique dans la zone à traiter.

Après administration, ces objets nanométriques devront permettre une biodistribution adaptée avec un ciblage des tumeurs solides mais aussi une élimination moins rapide comparé aux molécules. De plus, une multifonctionnalisation adéquate de ces nano-objets permettra d'introduire de fonctions pour la thérapie contrôlée à distance et pour l'imagerie afin de cibler plus efficacement les tissus tumoraux.

En raison de ces caractéristiques physico-chimiques, les nanoparticules sont des candidates prometteuses pour remplir le rôle d'agent « nanothéranostique ».

1.4.1.2. Les nanoparticules

1.4.1.2.1. Définition

Les nanoparticules sont, d'après la circulaire de la directive européenne, définies comme tout objet possédant au moins une dimension dans une gamme comprise entre 1 à 100 nm ²⁸. À ces échelles, les matériaux présentent des propriétés inattendues et différentes de celles des matériaux de même composition mais de taille micro- ou macroscopique : il convient de considérer les nanoparticules comme de nouveaux composés chimiques dont les caractéristiques et les toxicités sont différentes. Ces

dernières existent sous différentes formes : sphère, cube, bâtonnet, aiguille, étoile, haltère, fleurs, etc ²⁹.

Les nanoparticules sont caractérisées par des propriétés uniques qui ne sont pas observées dans les matériaux massifs de même composition. En particulier, les nanoparticules présentent un rapport surface/volume élevé qui s'accompagne d'une énergie de surface élevée. En outre, elles se distinguent par des comportements mécaniques, thermiques, électriques, magnétiques et optiques uniques. Ces propriétés rendent les nanoparticules aptes pour une large gamme d'applications, allant de l'électronique à la récupération et au stockage d'énergie, des communications à la médecine en passant par les biotechnologies ³⁰⁻³². Leur réactivité chimique et la capacité de dispersion dans divers solvants peuvent être réglées en modifiant la composition chimique de leur surface, mais leur activité thérapeutique en particulier la délivrance de principes actifs peut être induite par des changements de paramètres physico-chimiques environnementaux (variation de pH, variation de concentration....) ^{33,34}.

Cependant, l'utilisation des nanoparticules comme agents nanothérapeutiques présente quelques contraintes.

1.4.1.2.2. Les contraintes de l'utilisation des nanoparticules

Les agents particuliers sont généralement administrés par voie intravasculaire, pour atteindre les organes et les tumeurs profondes. Néanmoins, plusieurs critères sont pris en compte pour la conception des nano-objets destinés à des applications *in vivo*.

En premier lieu, la stabilité en milieu physiologique est un facteur important pour toute utilisation de nanoparticules dans le domaine biomédical. En effet, en milieu biologique, les conditions d'osmolarité à respecter à savoir une concentration élevée ($300 \text{ mosmol.L}^{-1}$) à pH physiologique (7,4), peuvent induire une déstabilisation indésirable du colloïde. Bien que la stabilité colloïdale soit un paramètre essentiel, elle ne garantit pas une utilisation efficace des agents thérapeutiques. Leur efficacité dépendra également de leur biodistribution et de leur élimination après le traitement.

Biodistribution et élimination

Les facteurs physiologiques et physico-chimiques influencent la biodistribution ainsi que l'élimination des agents nanothérapeutiques. En effet, après injection, les nanoparticules s'accumulent préférentiellement dans les tumeurs en raison de la porosité des vaisseaux sanguins comme expliqué dans le paragraphe 1.1.3.

Cependant une fois introduits dans l'organisme, les agents nanothérapeutiques s'exposent souvent au phénomène d'opsonisation conduisant à la captation de ces derniers par le système réticulo-endothélial (SRE), notamment les macrophages et les lymphocytes se situant dans le foie et la rate.

La capture hépatique et splénique induite par l'opsonisation constitue un obstacle majeur à l'accumulation suffisante d'agents thérapeutiques dans les tumeurs solides car ce phénomène, en se manifestant très rapidement, réduit considérablement la

quantité d'espèces circulant dans le sang. Il apparait donc crucial d'éviter l'adsorption des opsonines à la surface des nanoparticules. Parmi les différentes stratégies, le greffage de PEG (la PEGylation) est une voie intéressante qui permet d'empêcher l'adsorption des opsonines^{35,36}. La PEGylation améliore le temps de circulation et rend les agents plus hydrophiles pour éviter la capture par le SRE (système réticulo-endothélial). De manière générale, la charge de surface influence la biodistribution des nanoparticules. Une charge neutre ou négative permet d'éviter l'opsonisation des agents thérapeutiques, avec une meilleure circulation dans le sang³⁷. Par contre, une surface fonctionnalisée positivement favorise la captation par le système réticulo-endothélial (SRE)³⁸.

Dans les cas les plus favorables garantis par une taille, une forme et une composition chimique de surface adaptée, l'accumulation dans les tumeurs se limite à une faible proportion d'agents théranostiques injectés³⁹. Il reste donc dans l'organisme la majeure partie de la dose injectée qu'il faut intégralement éliminer pour éviter les interférences au cours de futurs examens en imagerie ou de traitement ultérieurs et pour limiter les effets toxiques à long terme qui sont pour le moment mal connus. Il est donc essentiel d'intégrer dès la conception du nanothéranostic les conditions favorisant l'élimination rénale. Cette voie d'élimination est largement préférée à l'élimination par voie hépatobiliaire, en raison de la captation des nanomatériaux par les hépatocytes dont le mécanisme entraîne une dégradation des nanoparticules pouvant s'avérer toxique³⁷. Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules est un facteur important à prendre en considération dans la mise en œuvre des agents nanothéranostiques. En effet, pour un diamètre hydrodynamique inférieur à 6 nm les nanoparticules sont éliminées par voie rénale, alors qu'elles sont captées par les hépatocytes lorsque le diamètre est supérieur à 10 nm⁴⁰.

Néanmoins, ces différents paramètres ont été adaptés pour de nombreux nanomatériaux développés à des fins biomédicales.

1.4.1.2.3. Un aperçu des nanoparticules multifonctionnelles conçues pour les applications biomédicales

Depuis une vingtaine d'années, un grand nombre de nanoparticules multifonctionnelles ont été développées pour des applications biomédicales en raison des intérêts et avantages qui ont été évoqués dans la partie « nanothéranostics ».

Parmi celles qui ont été décrites dans la littérature, nous présenterons quelques exemples de nanomatériaux inorganiques comme les semi-conducteurs (les quantum dots), les nanoparticules à base de lanthanides, les nanoparticules plasmoniques (les nanoparticules d'or) et les nanoparticules magnétiques.

Les quantum dots

Les quantum dots (QDs) sont des nanomatériaux inorganiques semi-conducteurs. Ces derniers sont constitués de quelques centaines à quelques milliers d'atomes métalliques formant un nanocristal⁴¹⁻⁴³. Leurs propriétés électroniques et optiques sont uniques, car non présentes dans les molécules constitutives de base, ni dans les

cristaux massifs. Pour un type de semi-conducteur donné, les quantum dots (QD) se caractérisent par une émission de fluorescence lors d'excitation par une source lumineuse. L'écart d'énergie entre le niveau quantifié le plus élevé de la bande de valence, et le niveau quantifié inoccupé le plus bas de la bande de conduction dépend de la taille du quantum dot. La longueur d'onde d'émission de fluorescence est directement liée à la taille qui peut être contrôlée lors de la fabrication.

Les avantages des QDs par rapport aux marqueurs fluorescents organiques (rhodamine, cyanine, protéines fluorescente verte (GFP)..) sont nombreux :

- Grande brillance (meilleur rapport signal/bruit) ;
- Très grande résistance au photoblanchiment (pas de perte d'émission de fluorescence malgré une excitation prolongée) permettant une observation sur une plus longue durée ;
- Imagerie multicolore sans chevauchement.

En raison de ces propriétés optiques intéressantes, les QDs pourraient être utilisés comme sondes optiques pour les applications biomédicales. En effet, plusieurs exemples ont été cités dans la littérature comme les semi-conducteurs à base de CdSe ou CdTe, qui présentent de bonnes propriétés d'émission. Cependant, la plupart des QDs étudiés sont excités dans le domaine de l'ultraviolet ou du visible, qui induit une faible pénétration de la lumière dans les tissus biologiques en raison d'une forte autofluorescence, ce qui limite leur utilisation dans l'imagerie optique des tissus profonds.

Bien que les quantum dots (QDs) possèdent des propriétés optiques très intéressantes pour l'imagerie, ils présentent des effets toxiques une fois qu'ils sont injectés dans l'organisme comme cela a été décrit dans la littérature. Ces constatations limitent donc l'utilisation des QDs comme agents nanothérapeutiques ⁴⁴⁻⁴⁷.

Il existe d'autres matériaux fluorescents comme les nanoparticules à base de lanthanides qui présentent des aspects intéressants pour l'imagerie médicale.

Les nanoparticules à base de lanthanides

Les 15 éléments de terres rares du lanthane ($Z = 58$) au lutétium ($Z = 71$) sont appelés lanthanides (notés L_n). Tous les éléments de ce groupe ont des propriétés chimiques proches, ce qui rend leur séparation et caractérisation assez difficiles. Leur découverte s'étend sur plus d'un siècle (Ce, 1803 ; Lu, 1907, artificiel Pm, 1947), et l'identification a été principalement réalisée par spectroscopie.

La plupart des lanthanides ont entre autres un degré d'oxydation trivalent (L_n^{3+}), en particulier en solution aqueuse avec une configuration électronique de type $[Xe] 4f^n$ avec n allant de 0 pour le lanthane (La) à 14 pour le lutétium (Lu). Ces derniers ont une chimie de coordination très intéressante. Comme les électrons de valence $4f$ sont protégés des interactions externes par les sous couches $5s$ et $5p$, les lanthanides se comportent comme des acides durs en raison de leurs petites tailles associées à des fortes charges positives selon le principe de Pearson ^{48,49}. Ces derniers interagissent

avec le milieu extérieur par des interactions électrostatiques ce qui privilégie des affinités avec des atomes donneurs comme l'oxygène ou l'azote. En outre, les lanthanides présentent des propriétés optiques exploitables dans le domaine biomédical notamment dans l'imagerie de luminescence ^{50,51}.

En raison de toutes ces propriétés très intéressantes, plusieurs recherches ont été conduites afin de profiter des propriétés optiques des lanthanides (Ln^{3+}) en les intégrant dans des matrices à l'échelle nanométrique. Plusieurs stratégies ont été développées dans la littérature pour mettre en œuvre des nanomatériaux intégrant des lanthanides. Une première stratégie consiste à doper des nanocristaux par des ions lanthanides. Comme la plupart des ions lanthanides sont luminescents, le dopage d'une matrice cristalline transparente, comme l'oxyde ou le fluorure de gadolinium ou d'yttrium, rend les nanoparticules fluorescentes. Contrairement aux fluorophores organiques, les ions lanthanides présentent une fluorescence stable avec des pics d'émission très fins. Ces caractéristiques garantissent un suivi sur une longue durée et un marquage multicolore sans chevauchement. Malheureusement l'exploitation de ces propriétés intéressantes est rendue difficile par le fait que cette fluorescence nécessite une excitation des ions lanthanides dans l'UV : cette difficulté peut être contournée par le phénomène d'addition de photons communément désigné par le terme anglais « d'up-conversion ». Ce phénomène d'up conversion des photons a été découvert par Bloembergen en 1959, ensuite repris par Auzel en 1966 ⁵². Contrairement aux processus de luminescence classique qui sont généralement définis par une seule excitation pour un seul état excité, le processus d'up-conversion repose sur l'accumulation de photons de faible énergie grâce à des états excités multiples et métastables. Néanmoins certaines conditions sont requises pour l'existence de l'UC (up-conversion) des photons :

- Des états excités de longues durées de vie ;
- Un arrangement en échelle de niveaux d'énergie similaires.

Grâce au phénomène d'up-conversion, il est possible de produire de la lumière dans une gamme de longueurs d'onde correspondant au visible et proche infrarouge à la suite d'une excitation dans le proche infrarouge. Comme le proche infrarouge correspond à la gamme de longueurs d'onde la mieux adaptée pour l'imagerie de fluorescence *in vivo* en raison d'une plus grande transparence des tissus biologiques, les nanoparticules dopées par différents ions lanthanides choisis pour leur capacité à produire le phénomène d'up-conversion peuvent se comporter comme d'efficaces fluorophores pour l'imagerie de fluorescence *in vivo*. De nombreux travaux ont montré que des nanoparticules de NaYF_4 dopées par $\text{Yb}^{3+} / \text{Er}^{3+}$ et $\text{Yb}^{3+} / \text{Tm}^{3+}$ peuvent être suivies après injection sur des souris ou des rats par imagerie de fluorescence dans le domaine proche infrarouge ⁵³⁻⁵⁵. L'intérêt de ce type de nanoparticule est renforcé lorsque l'yttrium est remplacé par le gadolinium (NaGdF_3 , GdF_3 ,...). En effet les ions Gd^{3+} , en raison de leur caractère paramagnétique, exercent une influence sur le contraste positif des images IRM. La combinaison du phénomène d'up-conversion (par dopage par $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$...) et du paramagnétisme des ions Gd^{3+} permet

le suivi de ces nanoparticules par l'imagerie de fluorescence (excellente sensibilité) et l'IRM (très bonne résolution) ^{56,57}.

Une deuxième stratégie consiste à recouvrir les nanoparticules par des complexes de lanthanides ou à encapsuler ces derniers dans des particules creuses et/ou des polymères. Ces complexes sont en général obtenus à partir de chélateurs linéaires (DTPA) ou macrocycliques (DOTA) constitués d'atomes d'oxygènes et d'azote qui présentent une forte affinité pour les acides durs que sont les ions lanthanides. Les complexes ainsi obtenus sont cinétiquement et thermodynamiquement stables ⁵⁸. Notamment les travaux menés par Lewis et ses collaborateurs ont conduit à l'élaboration de nanoparticules d'or (AuNPs) complexées par de l'euprotium pour des méthodes de détection par fluorescence ⁵⁹. Afin d'améliorer le rendement de fluorescence des ions lanthanides luminescents et d'augmenter la longueur d'onde d'excitation, ces complexes sont souvent modifiés par des molécules qui jouent le rôle d'antenne ⁶⁰⁻⁶³.

Bien que le développement des nanoparticules à base de lanthanides est très intéressant en imagerie de luminescence, leur essor pour des applications biomédicales reste cependant plus modeste que celui des nanoparticules d'or et des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques. Comme ce type de nanoparticules seront au centre de mes travaux de thèse, des chapitres leur seront spécialement dédiés.

1.4.2. Les nanoparticules d'or

1.4.2.1. Généralités

Dans l'histoire de l'humanité, l'or a toujours eu une position très particulière en raison de son éclat et de sa durabilité. Il a été choisi pour être au cœur du système monétaire. L'intérêt pour l'or a été renforcé depuis par la maîtrise de la synthèse des nanoparticules d'or dont les propriétés ouvrent la voie à de nombreuses applications en biodétection colorimétrique, en imagerie *in vivo* et en thérapie. Les nanoparticules d'or connaissent un véritable engouement depuis le milieu des années 90 et sont au centre d'une grande partie des travaux rapportés notamment dans le domaine des applications biomédicales.

Le potentiel en imagerie et thérapie des nanoparticules d'or dans le cadre du traitement des tumeurs solides cancéreuses provient de leurs propriétés physico-chimiques avantageuses.

De nombreuses études ont établi le comportement sain et la biocompatibilité de l'or à la fois *in vitro* et *in vivo* ⁶⁴⁻⁶⁸, ce qui suggère une administration saine de ce dernier avec peu d'effets secondaires locaux ou systémiques ⁶⁸.

Deuxièmement, les nanoparticules d'or peuvent être facilement modélées avec une variété de formes et de tailles, et possèdent une chimie de surface facilement contrôlable permettant une fonctionnalisation par diverses molécules biologiquement

utiles pour éviter la détection immunitaire et améliorer la stabilité, le ciblage de tumeurs, et le passage de la barrière hémato-encéphalique ^{69,70}.

Le contrôle de la taille, de la forme et de la chimie de surface est crucial car le phénomène de résonance plasmon en dépend. En jouant sur ces paramètres, il est possible de moduler les propriétés optiques des nanoparticules d'or et donc de les adapter aux applications visées en biodétection, imagerie et thérapie.

Les propriétés optiques modulables des nanoparticules d'or (AuNPs) offrent un potentiel très prometteur comme agent de contraste notamment pour l'imagerie photoacoustique et pour la thérapie photothermique.

1.4.2.2. Les applications biomédicales reposant sur l'imagerie photoacoustique et la thérapie photothermique

L'utilisation de nanoparticules d'or à des fins thérapeutiques est décrite dans la littérature notamment dans les applications biomédicales reposant sur la thérapie photothermique guidée par l'imagerie photoacoustique.

L'imagerie photoacoustique (IPA) est une modalité d'imagerie émergente qui fournit des images tridimensionnelles en temps réel, avec des profondeurs cliniquement pertinentes, une résolution spatiale relativement élevée et utilisant des rayonnements non ionisants ⁷¹⁻⁷⁶.

Pour générer une image, une série d'impulsions laser nanoseconde traverse les tissus biologiques d'intérêt. Chaque impulsion induit une élévation de température localisée dans un court intervalle de temps. En raison de l'échauffement périodique qu'elle produit la série d'impulsions laser génère des ondes acoustiques captées par des transducteurs à ultrasons qui convertissent les données en image ^{77,78}. Malgré une bonne résolution spatiale, il est difficile d'imager les tumeurs profondes car les absorbeurs endogènes tel que l'hémoglobine interfèrent. Afin d'améliorer le contraste pour un meilleur suivi en imagerie photoacoustique, le développement d'agents exogènes est donc nécessaire.

Etant donné que les signaux de l'imagerie photoacoustique sont principalement déterminés par la génération de chaleur après l'absorption de la lumière, des agents avec une forte absorption dans la région spectrale du proche infrarouge (NIR) seront adéquats pour améliorer le contraste. Dès lors, de nombreux nanomatériaux incluant des nanoparticules métallique, et en particulier les nanoparticules d'or dont la taille et la forme ont été adaptées pour absorber le rayonnement proche infrarouge ont été développées dans le but d'améliorer la profondeur de pénétration et donc le signal^{79,80}. D'autre part, l'échauffement généré à la suite de l'absorption du rayonnement proche infrarouge par les nanostructures à base d'or peut être exploité pour la thérapie photothermique ⁸¹. La thérapie photothermique repose sur la conversion de l'énergie du rayonnement proche infrarouge en chaleur. Lorsque la température dépasse 42°C,

les cellules meurent. Pour atteindre des températures suffisamment élevées dans la zone à traiter, une accumulation suffisante des nanoparticules d'or conçues pour absorber le rayonnement proche infrarouge et l'utilisation laser continu sont requises.

L'utilisation de nanoparticules d'or permet de combiner la thérapie photothermique à l'imagerie photoacoustique pour un meilleur traitement de tumeur. Malgré le potentiel d'une telle combinaison, révélé par de nombreux travaux cités dans la littérature ⁸²⁻⁸⁴, leur utilisation en clinique pose question. En effet, l'efficacité de l'IPA et de la thérapie photothermique repose sur des nanostructures en or dont les formes souvent complexes sont associées à des tailles trop importantes pour garantir une élimination par voie rénale qui est considérée comme un prérequis pour l'utilisation *in vivo* d'objets non biodégradables.

Contrairement à l'imagerie photoacoustique et à la thérapie photothermique, l'influence de la taille et de la forme des nanoparticules d'or développées pour être employées comme agents de contraste pour l'imagerie X et comme agent radiosensibilisant pour la radiothérapie est moins prépondérante. Il est donc possible de développer pour ces applications reposant sur l'absorption de rayonnements ionisant des nanoparticules d'or dont la taille est compatible avec l'élimination rénale.

1.4.2.3. Radiosensibilisation et imagerie X

La forte valeur du numéro atomique de l'élément or ($Z_{Au}=79$) confère aux nanoparticules la capacité d'absorber le rayonnement ionisant, et se présentent donc comme des agents de contraste pour l'imagerie X et comme agent radiosensibilisant pour la radiothérapie (voir paragraphe 1.3.1 et 1.2.3)

Dans la gamme d'énergie utilisée par l'imagerie X clinique, l'élément Au présente un coefficient d'absorption d'énergie par unité de masse beaucoup plus élevé que celui de l'iode (Figure 7).

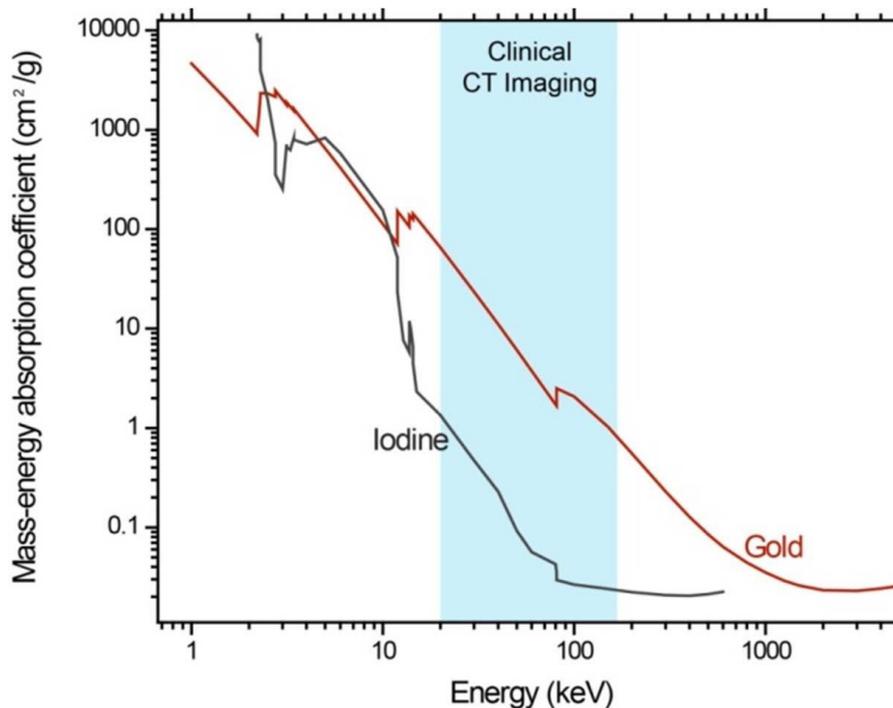


Figure 7. Coefficient d'absorption de l'or et de l'iode en fonction de l'énergie du rayonnement incident ⁸⁵.

Il en résulte que pour une même masse, l'or entraîne une atténuation 2,7 fois plus importante que l'iode. Cette différence devrait se traduire par un meilleur contraste en imagerie X avec une faible dose de radiation.

D'après les travaux de Kim et de ses collaborateurs, le coefficient d'absorption obtenu après modification de la surface des nanoparticules d'or par le PEG (polyéthylène glycol) est 5,7 fois plus élevé que dans le cas des agents de contraste à base d'iode utilisés couramment en clinique pour l'imagerie X ⁸⁶.

Cependant, les nanoparticules d'or développées par Kim et ses collègues bien qu'elles aient un coefficient d'absorption élevé après fonctionnalisation par le PEG qui permet également un temps de circulation long des particules pour un suivi en imagerie assez conséquent, ces dernières en raison de leur taille de 30 nm ne peuvent pas être éliminées par voie rénale. Leur utilisation clinique pose donc question.

Dans ce contexte, des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) combinant imagerie X, IRM, imagerie nucléaire et radiosensibilisation ont été développées dans notre laboratoire^{87,88}. Ces particules ont un diamètre hydrodynamique de 7-8 nm, permettant ainsi une élimination par voie rénale. Chaque cœur d'or qui confère aux nanoparticules d'or (Au@DTDTPA), en vertu du Z élevé de l'or, un comportement d'agent de contraste pour l'imagerie X et d'agent radiosensibilisant pour la radiothérapie est recouvert par une couche organique de chélateurs linéaires dithiolés (DTDTPA). Le dérivé dithiolé de l'acide diéthylènetriamine pentaacétique (DTDTPA) a été conçu pour jouer quatre rôles essentiels :

- Assurer le contrôle de la croissance des nanoparticules d'or par adsorption du DTDTPA (grâce aux fonctions thiol) sur les germes en croissance ;
- Garantir une excellente stabilité colloïdale en milieu physiologique (force ionique élevée, pH =7,4 et présence de protéines) grâce au fort caractère hydrophile et à la charge négative de surface ;
- Permettre l'immobilisation par complexation d'ions d'intérêts pour l'imagerie (l'ion gadolinium (Gd^{3+}) pour l'IRM ^{89,90}, l'indium ($^{111}In^{3+}$) et le technétium ($^{99m}Tc^{4+}$) pour la TEMP ⁹¹ et l'ion galium ($^{68}Ga^{3+}$) pour la TEP) ;
- Faciliter la post-fonctionnalisation par des fluorophores pour l'imagerie de fluorescence, ou par des molécules pour le ciblage actif.

La combinaison de modalités d'imagerie (X, IRM, TEMP et TEP) permise par les nanoparticules d'or Au@DTDTPA a fourni des informations cruciales sur leur comportement après injection intraveineuse qui ont été corroborées par l'analyse chimique post-mortem des nanoparticules d'or. Ces dernières circulent librement sans accumulation indésirable dans les tissus sains et sont essentiellement éliminées par voie rénale. Lorsque ces nanoparticules sont administrées par voie intraveineuse à des rats porteurs d'une tumeur cérébrale (gliosarcome 9L dans l'hémisphère droit du cerveau), une accumulation est observée dans la zone tumorale. Elle a été exploitée pour améliorer la survie des rats porteurs de gliosarcome 9L par radiothérapie entre 5 à 10 min après injection intraveineuse de nanoparticules d'or Au@DTDTPA ^{87,88,91}.

Cependant le potentiel de ces agents nanothéranostiques (Au@DTDTPA) est sous-exploité en raison d'une élimination rénale trop rapide. Comme l'élimination rénale des nanoparticules d'or (non biodégradables) est incontournable, il n'est pas opportun de l'empêcher. En revanche, les stratégies permettant de retarder cette élimination devrait aboutir à un rapport de concentration de nanoparticules d'or dans la tumeur et dans les tissus sains environnants plus favorable. Il est attendu de cette optimisation de la biodistribution une meilleure efficacité thérapeutique (c'est-à-dire une meilleure exploitation de l'effet radiosensibilisant). Deux stratégies pour exploiter pleinement le potentiel des nanoparticules d'or Au@DTDTPA sont en cours d'étude dans l'équipe NCM. La première consiste à fonctionnaliser ces nanoparticules par des molécules possédant une forte affinité pour des récepteurs surexprimés dans l'environnement tumoral. Les travaux de thèse de Gloria Jimenez Sanchez ⁹² ont montré que le greffage du pentapeptide cyclique comportant le motif RGD avait un effet bénéfique sur l'amélioration de la survie des rats porteurs de gliosarcome après traitement combinant injection intraveineuse de nanoparticules d'or et radiothérapie. Cependant l'amélioration reste modeste probablement parce que ces nanoparticules demeurent très sensibles à l'élimination rénale du fait de leur taille réduite.

La deuxième stratégie explorée par l'équipe NCM repose sur l'utilisation de transporteurs biodégradables suffisamment larges pour retarder l'élimination rénale. Deux voies différentes sont étudiées, la première consiste à encapsuler les nanoparticules d'or dans un polymère biodégradable (PLGA), alors que la seconde qui constitue l'essentiel de ce travail de thèse vise à accrocher les nanoparticules d'or

Au@DTDTPA sur des nanofleurs de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ oxyde de fer superparamagnétiques). La taille du transporteur permettrait d'augmenter le temps de circulation et de mieux retenir les nanoparticules d'or Au@DTDTPA dans la tumeur afin de maximiser leur potentiel. Après biodégradation du transporteur, les nanoparticules d'or devraient être éliminées par voie rénale sans accumulation indésirable.

1.4.3. Les nanofleurs de maghémite

1.4.3.1. Les nanoparticules d'oxyde de fer et leurs propriétés magnétiques

Il existe dans la nature plusieurs types d'oxyde de fer tels que l'hématite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) et la magnétite (Fe_3O_4). Ces composés peuvent également être préparés au laboratoire par différentes méthodes de synthèse comme la coprécipitation, la voie polyol et la décomposition thermique de complexes de fer (chapitre 2).

Les différents types d'oxyde de fer se caractérisent par des structures cristallographiques différentes. L'hématite et la maghémite qui ont la même formule chimique (Fe_2O_3) possèdent des structures cristallines différentes.

L'hématite est constituée d'une structure hexagonale de type corindon ⁹³. Elle est paramagnétique à une température supérieure à sa température de Curie (956 K). A température ambiante, elle est faiblement ferromagnétique et subit une transition de phase à 260 K (température de Morin) vers un état antiferromagnétique ⁹⁴. Les moments magnétiques de l'hématite sont organisés en deux groupes, au sein d'un même groupe les moments sont parallèles entre eux mais dans les deux groupes les moments se couplent antiparallèlement et dans ce cas l'aimantation résultante est nulle.

La magnétite de formule (Fe_3O_4) et son produit d'oxydation, la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), ont la même structure dite spinelle inverse. La magnétite présente une maille constituée d'ions oxygène (O^{2-}) et d'ions métalliques (Fe^{2+} et Fe^{3+}) qui forment un empilement cubique à face centrée. Ces ions sont repartis selon des sites tétraédriques et octaédriques partiellement occupées. La seule différence qui s'opère lors de l'oxydation c'est l'apparition de sites lacunaires cationiques où tous les ions métalliques sont dans un état trivalent (Fe^{3+}) ⁹⁵.

La magnétite est ferromagnétique car tous les moments sont parallèles, alors que la maghémite est dite ferrimagnétique en raison de sites lacunaires et donc la valeur des moments magnétiques n'est pas la même pour chaque sous réseau.

Cependant, les propriétés magnétiques des nanoparticules sont différentes des matériaux à l'état massif du fait de leurs dimensions. Dans les matériaux massifs, la matière est divisée en domaines magnétiques séparés par des parois magnétiques. Dans le cas des nanoparticules de petite taille la formation de domaine coûte de l'énergie et l'état monodomaine superparamagnétique devient l'état le plus stable. En l'absence de champ magnétique, les moments magnétiques des nanoparticules sont

orientés aléatoirement et l'aimantation globale des nanoparticules est nulle. En revanche lorsqu'on applique un champ magnétique H , les moments magnétiques de chaque particule s'orientent dans la même direction que le champ appliqué et la solution ferrofluide acquiert une aimantation non nulle. Dès que l'on arrête d'appliquer le champ magnétique, les moments magnétiques de ces particules s'orientent de nouveau aléatoirement.

En raison de leurs propriétés magnétiques, les nanoparticules de magnétite et de maghémite sont utilisées dans diverses applications (supports d'enregistrement magnétiques ⁹⁶, biodétection ⁹⁷ etc...). De plus, les nanoparticules de magnétite et de maghémite présentent un comportement d'agent de contraste négatif pour l'IRM ^{19,98} et une capacité de chauffage qui peut être exploitée pour l'hyperthermie magnétique^{99,100}.

1.4.3.2. Nanoparticules d'oxyde de fer : agent de contraste en IRM

Les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent être utilisées comme agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Grâce à leurs propriétés superparamagnétiques, elles agissent sur le temps de relaxation transversale des protons (T_2) pour induire un assombrissement du contraste de l'image (effet T_2) ^{95,101}.

Les nanoparticules à base d'oxyde de fer (magnétite ou maghémite) sont stables en milieu biologique par modification de leur surface par des molécules organiques (dopamine ¹⁰², acides carboxyliques ¹⁰³...) ou par des polymères (PEG ¹⁰⁴, PLGA ¹⁰⁵...). Leur utilisation comme agent de contraste en IRM est particulièrement avantageuse. En effet, le fer est un élément que contient naturellement notre organisme. L'injection intraveineuse de nanoparticules d'oxyde de fer ne présente aucune toxicité car celles-ci sont métabolisées par l'organisme et l'excédent est éliminé par voie rénale ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

De plus, les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent être utilisées comme agent de contraste T_1 en les complexant par des chélates de gadolinium ¹⁰⁹ ou en réduisant leur taille (pour des particules inférieures à 5 nm le moment magnétique est modifié) ^{110,111}.

Mise à part leur utilisation comme agent de contraste en IRM, les nanoparticules de magnétite et de maghémite présentent une capacité de chauffage pendant l'application d'un champ magnétique alternatif de haute fréquence qui peut être exploitée en hyperthermie magnétique. Les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent être utilisées comme agents nanotheranostiques car leur capacité à localiser les tumeurs solides par IRM devrait permettre de déclencher le traitement thérapeutique par hyperthermie magnétique au moment le plus opportun (accumulation préférentielle dans la tumeur)¹¹².

1.4.3.3. L'application des nanoparticules d'oxyde de fer en hyperthermie magnétique

L'hyperthermie désigne les traitements reposant sur une élévation de température circonscrite à la zone à traiter. Les cellules sont détruites lorsque la température excède 42°C. Le développement des nanoparticules pour les applications médicales a mis en

avant deux méthodes pour produire un échauffement cytotoxique localisé. Il s'agit de la thérapie photothermique (1.4.2.2) et de l'hyperthermie magnétique. La thérapie photothermique repose sur l'absorption de l'énergie d'un rayon proche infrarouge par des nanoparticules plasmoniques alors que l'hyperthermie magnétique résulte de l'exposition de nanoparticules magnétiques à un champ magnétique alternatif de haute fréquence.

L'élévation de la température peut conduire à l'apoptose (la mort cellulaire) suite à une altération du métabolisme des protéines des cellules cancéreuses. Les travaux pionniers de Jordan ont mis en évidence la grande efficacité d'une suspension de nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer pour absorber l'énergie d'un champ magnétique oscillant et la convertir en chaleur ¹¹³. Bien que très intéressante, l'utilisation de l'hyperthermie magnétique est toutefois limitée par la difficulté d'obtenir une augmentation appropriée de la température. Par conséquent, un objectif de longue date a été d'optimiser les capacités de chauffage intrinsèques des nanoparticules tout en évitant l'utilisation de champs magnétiques de très haute fréquence ou d'amplitude élevée pour le confort du patient. Depuis ces travaux, de nombreuses recherches ont porté sur le développement des nanoparticules à base de ferrite dans le but d'améliorer leur pouvoir chauffant. On peut citer quelques exemples de la littérature portant sur le développement de nanoparticules à base de ferrite et de cobalt de petite taille (5 - 16,5 nm), caractérisées par une bonne stabilité colloïdale et un pouvoir chauffant extrêmement élevé. Toutefois, l'utilisation *in vivo* de ces particules pose question à cause de la toxicité du cobalt ^{114,115}. Les travaux de l'équipe d'Alphandéry ont également mené à l'obtention d'un pouvoir chauffant très élevé en exploitant des particules d'oxyde de fer produites par des bactéries ¹¹⁶. Ces travaux montrent donc qu'il est possible de produire des nanoparticules d'oxyde de fer caractérisées par un fort pouvoir chauffant.

C'est dans ce contexte que les travaux de Rana Bazzi et de Florence Gazeau ¹¹⁷ ont conduit à la production de nanofleurs de maghémite superparamagnétiques originales dotées d'un pouvoir chauffant extrêmement élevé (Figure 8).

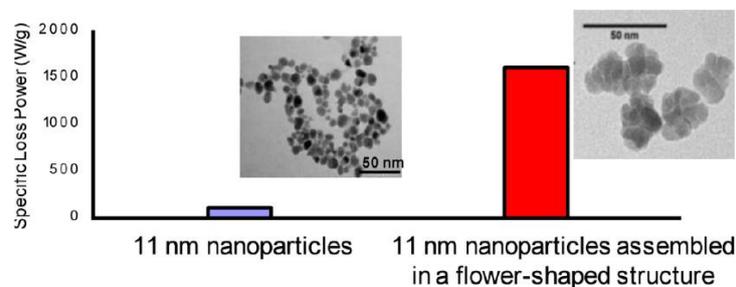


Figure 8. Puissance spécifique de chauffe (SLP) enregistrée pour des nanoparticules sphériques (11 nm) et de nanofleurs de maghémite (28 nm) après l'application d'un champ magnétique alternatif (21,5 KA/m d'amplitude à une fréquence de 700 kHz) ¹¹⁷.

Ces particules sont constituées de grains monocristallins de 11 nm en taille qui s'assemblent de manière contrôlée pour former une structure en forme de fleur dont la taille dépend de nombreux paramètres expérimentaux. Après l'application d'un champ magnétique alternatif de haute fréquence, la puissance spécifique de chauffe (désignée par l'acronyme SLP) obtenue pour ces nanofleurs atteint des valeurs très élevées (1200 W/g) par rapport au pouvoir chauffant des nanoparticules d'oxyde de fer décrites dans la littérature (Figure 9).

Comme le caractère superparamagnétique des nanofleurs leur confère un comportement d'agent de contraste négatif pour l'IRM, les nanofleurs rassemblent les caractéristiques fondamentales des agents théranostiques puisqu'elles combinent imagerie médicale (IRM) et thérapie (hyperthermie magnétique) ¹¹⁸.

1.4.4. Nanostructures à base de nanoparticules d'oxyde de fer et de nanoparticules d'or

1.4.4.1. Généralités

Les nanoparticules d'or et les nanoparticules d'oxyde de fer ont tous deux des propriétés extrêmement intéressantes et complémentaires comme cela a été évoqué précédemment. De nombreux travaux portant sur l'assemblage des nanoparticules d'or et des nanoparticules d'oxyde de fer ont été décrits dans la littérature ¹¹⁹. Nous pouvons, par exemple, citer les travaux de Yong Hu qui en associant des nanoparticules d'or et des nanoparticules d'oxyde de fer a montré qu'il était possible de détecter des tumeurs par différentes techniques d'imagerie médicale (l'IRM, la tomodensitométrie X et l'imagerie photoacoustique) avant de traiter les tumeurs par photothermie ¹²⁰.

1.4.4.2 Nanostructures hybrides combinant nanoparticules d'or Au@DTDTPA et nanofleurs de maghémite

En raison de leur taille, de leur caractère biodégradable et de leur potentiel théranostique ^{117,118}, les nanofleurs de maghémite nous apparaissent comme les candidates les plus prometteuses pour servir de transporteur des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) afin de mieux exploiter leur potentiel radiosensibilisant en retardant leur élimination rénale ⁹¹. En outre, l'association des nanoparticules d'or Au@DTDTPA et des nanofleurs de maghémite est très avantageuse car elle devrait permettre de mieux traiter les tumeurs en combinant l'hyperthermie magnétique et la radiothérapie.

L'objectif de cette thèse consiste donc à assembler les nanoparticules d'or et les nanofleurs de maghémite et de vérifier si cette stratégie est bénéfique pour le traitement de tumeurs solides (Figure 9).

L'originalité de mes travaux de thèse repose sur la combinaison de deux types d'agents théranostiques : les nanoparticules d'or Au@DTDTPA qui ont fait leur preuve comme agent de contraste en IRM et comme agent radiosensibilisant en radiothérapie et les nanofleurs de maghémite qui sont caractérisées à la fois par un pouvoir chauffant

extrêmement élevé, une capacité à rehausser le contraste négatif en IRM et leur caractère biodégradable.

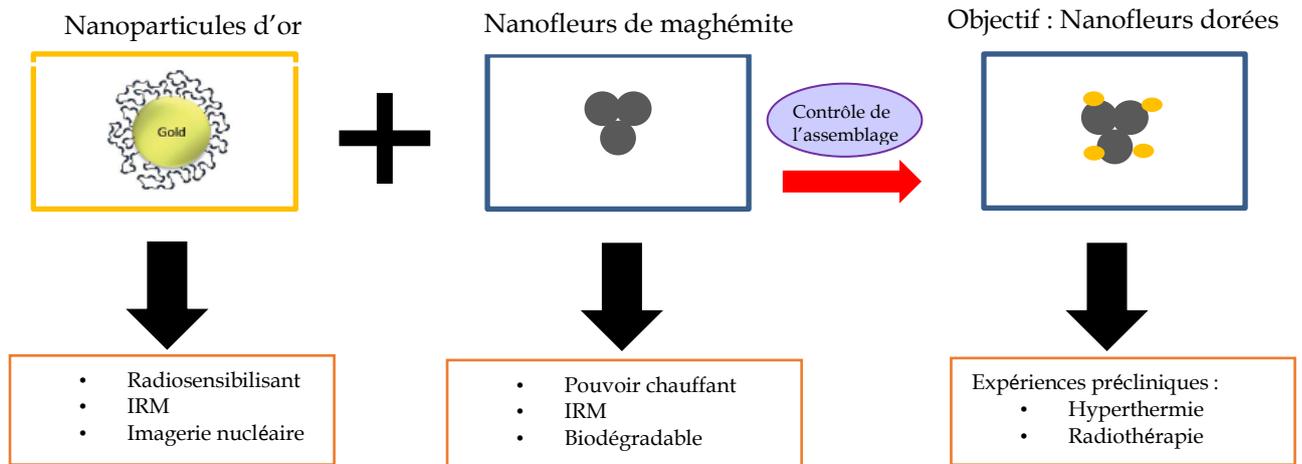


Figure 9. Schéma représentatif des principaux objectifs de la thèse : assemblage entre nanoparticules d'or et nanofleurs, étude de la biodistribution par imagerie médicale (IRM et imagerie nucléaire) et évaluation de l'activité thérapeutique dans le cadre d'expériences précliniques visant à combiner hyperthermie magnétique et radiothérapie après administration de nanofleurs dorées.

A partir de la synthèse développée par Rana Bazzi et Pierre Hugounenq¹¹⁷, des nanofleurs dorées ont été développées par Claire Wilhelm¹²¹ et ses collaborateurs concomitamment à mes travaux de thèse mais en empruntant une voie différente qui a fourni des structures différentes de celles que nous visions. En effet, les particules développées par Claire Wilhelm et ses collègues sont composées de nanofleurs de maghémite sur lesquelles ont été greffés des amas de particules d'or qui ne sont pas recouvertes de ligands. Le devenir de ces nanoparticules d'or après biodégradation des nanofleurs est très incertain. En l'absence de fonctionnalisation, une accumulation indésirable de ces nanoparticules d'or dans les tissus riches en macrophages est très probable. Dans le cadre de mes travaux de thèse, les nanofleurs dorées seront élaborées à partir de nanoparticules d'or recouvertes par le ligand DTDTPA qui assure une biodistribution adaptée (accumulation préférentielle dans la tumeur, élimination par voie rénale) comme nous l'avons montré dans nos travaux antérieurs^{87,88,91}.

1.5. Plan de thèse

Ce travail s'inscrit dans la continuité des travaux de Christophe Alric et de Pierre Hugounenq qui ont conduit respectivement à l'élaboration de nanoparticules d'or multifonctionnelles (Au@DTDTPA) et de nanofleurs de maghémite superparamagnétiques ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) originales.

Le but de mes travaux de thèse comme décrit précédemment consiste à assembler les nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) et les nanofleurs de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) pour en faire des objets originaux combinant les capacités théranostiques de chacun des deux types de nanoparticules.

La première étape consiste à synthétiser, assembler et caractériser le nanohybride (NF-Au@DTDTPA) avant de tester sa stabilité en milieu physiologique pour une utilisation *in vivo*. La capacité des nanofleurs dorées à se comporter comme agent de contraste en IRM mais aussi comme radiotraceur en imagerie nucléaire (TEMP et scintigraphie) après complexation du gadolinium (Gd^{3+}) et de radioéléments (^{111}In , ^{99m}Tc) a également été étudiée.

L'autre volet de cette thèse, a été ensuite d'étudier l'efficacité des nanofleurs dorées en tant qu'agent radiosensibilisant en radiothérapie en raison de la présence des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA), mais aussi en tant qu'agent chauffant en hyperthermie magnétique grâce aux nanofleurs de maghémite ($\gamma-Fe_2O_3$) utilisées comme transporteur des nanoparticules d'or.

Les résultats de ces travaux de thèse seront présentés dans trois chapitres. Le chapitre 2 décrit la synthèse et la caractérisation des nanofleurs dorées. Le chapitre 3 présente l'étude de la biodistribution et l'évaluation de l'effet radiosensibilisant des nanoparticules hybrides (gliosarcome 9L et mélanome A375 sc) et, pour finir, le chapitre 4 présente l'évaluation des nanofleurs dorées comme agent nanotheranostique combinant l'hyperthermie magnétique à la radiothérapie pour le traitement des tumeurs solides (mélanome A375 sc).

Références

1. Les chiffres clés du cancer en France. *Ligue contre le cancer* Available at: /article/6397_les-chiffres-cles-des-cancers.
2. Benjamin SARTRE & Guillaume BAUDIN. *Cancérologie Onco-Hématologie*.
3. Tanaka, T., Shimizu, M., Kochi, T. & Moriwaki, H. Chemical-induced Carcinogenesis. *J. Exp. Clin. Med.* **5**, 203–209 (2013).
4. Sonnenschein, C. & Soto, A. M. Theories of carcinogenesis: An emerging perspective. *Semin. Cancer Biol.* **18**, 372–377 (2008).
5. Bergers, G. & Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 401–410 (2003).
6. Dimberg, A. & Sund, M. Cancer Angiogenesis and Vasculogenesis A2 - McManus, Linda M. in *Pathobiology of Human Disease* (ed. Mitchell, R. N.) 403–411 (Academic Press, 2014).
7. Mehlen, P. & Puisieux, A. Metastasis: a question of life or death. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 449–458 (2006).
8. Bergers, G. & Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 401–410 (2003).
9. Schleich, N. *et al.* Comparison of active, passive and magnetic targeting to tumors of multifunctional paclitaxel/SPIO-loaded nanoparticles for tumor imaging and therapy. *J. Controlled Release* **194**, 82–91 (2014).
10. Clere, N. Les traitements du cancer du sein. *Actual. Pharm.* **55**, 20–25 (2016).
11. Jaffray, D. A. Image-guided radiotherapy: from current concept to future perspectives. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **9**, 688–699 (2012).
12. Tubiana, M. *Radiobiologie. Radiothérapie et radioprotection. Bases fondamentales.* (Hermann, 2008).
13. Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N. & Smilowitz, H. M. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys. Med. Biol.* **49**, N309-315 (2004).

14. Schueler, B. A. Clinical applications of basic x-ray physics principles. *Radiogr. Rev. Publ. Radiol. Soc. N. Am. Inc* **18**, 731–744; quiz 729 (1998).
15. Li, D.-Z., Chen, H.-D., Bi, F. & Wang, Z.-X. Progress of Multimodal Molecular Imaging Technology in Diagnosis of Tumor. *Chin. J. Anal. Chem.* **10**, 1609–1618 (2016).
16. Elrod, D. B., Partha, R., Danila, D., Casscells, S. W. & Conyers, J. L. An iodinated liposomal computed tomographic contrast agent prepared from a diiodophosphatidylcholine lipid. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **5**, 42–45 (2009).
17. de Dreuille, O., Maszelin, P., Foehrenbach, H., Bonardel, G. & Gaillard, J.-F. Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP). *EMC - Radiol.* **1**, 2–35 (2004).
18. IRM principe physique.
19. Shen, Z., Wu, A. & Chen, X. Iron Oxide Nanoparticle Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Mol. Pharm.* **14**, 1352–1364 (2017).
20. Ell, P. J. The contribution of PET/CT to improved patient management. *Br. J. Radiol.* **79**, 32–36 (2006).
21. Tsukamoto, E. & Ochi, S. PET/CT today: System and its impact on cancer diagnosis. *Ann. Nucl. Med.* **20**, 255 (2006).
22. Delso, G. *et al.* Performance Measurements of the Siemens mMR Integrated Whole-Body PET/MR Scanner. *J. Nucl. Med.* **52**, 1914–1922 (2011).
23. Quick, H. H. Integrated PET/MR. *J. Magn. Reson. Imaging* **39**, 243–258 (2014).
24. Grant, A. M. *et al.* NEMA NU 2-2012 performance studies for the SiPM-based ToF-PET component of the GE SIGNA PET/MR system. *Med. Phys.* **43**, 2334–2343 (2016).
25. Levin, C. S. *et al.* Design Features and Mutual Compatibility Studies of the Time-of-Flight PET Capable GE SIGNA PET/MR System. *IEEE Trans. Med. Imaging* **35**, 1907–1914 (2016).
26. Shah, R. R. & Shah, D. R. Personalized medicine: is it a pharmacogenetic mirage *Br. J. Clin. Pharmacol.* **74**, 698–721 (2012).

27. Funkhouser, J. Reintroducing pharma: Theranostic revolution. *Curr. Drug Discovery* 2. (2002).
28. *Directive européenne*.
29. Chen, G., Roy, I., Yang, C. & Prasad, P. N. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chem. Rev.* **116**, 2826–2885 (2016).
30. Introduction to Nanomedicine and Nanobioengineering. *Wiley.com* Available at: <https://www.wiley.com/en-us/Introduction+to+Nanomedicine+and+Nanobioengineering-p-9781118093436>.
31. Introduction to Biophotonics. *Wiley.com* Available at: <https://www.wiley.com/en-us/Introduction+to+Biophotonics-p-9780471287704>.
32. Nanophotonics. *Wiley.com* Available at: <https://www.wiley.com/en-us/Nanophotonics-p-9780471649885>.
33. Kievit, F. M. & Zhang, M. Surface engineering of iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy. *Acc. Chem. Res.* **44**, 853–862 (2011).
34. Nam, J. *et al.* Surface engineering of inorganic nanoparticles for imaging and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 622–648 (2013).
35. Otsuka, H., Nagasaki, Y. & Kataoka, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 403–419 (2003).
36. Faure, A.-C. *et al.* Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* **5**, 2565–2575 (2009).
37. Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K. & Farokhzad, O. C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* **5**, 505–515 (2008).
38. Dobrovolskaia, M. A., Aggarwal, P., Hall, J. B. & McNeil, S. E. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol. Pharm.* **5**, 487–495 (2008).

39. Wilhelm, S. *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater.* **1**, 16014 (2016).
40. Longmire, M., Choyke, P. L. & Kobayashi, H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomed.* **3**, 703–717 (2008).
41. Marchal, F. *et al.* [Quantum dots in oncological surgery: the future for surgical margin status]. *Bull. Cancer (Paris)* **95**, 1149–1153 (2008).
42. Ehman, R. L. *et al.* Blueprint for Imaging in Biomedical Research. *Radiology* **244**, 12–27 (2007).
43. Smith, A. M., Duan, H., Mohs, A. M. & Nie, S. Bioconjugated Quantum Dots for In Vivo Molecular and Cellular Imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1226–1240 (2008).
44. Senevirathna, W. *et al.* CdSe quantum dots induce superoxide stress in engineered biosensor bacteria. *Nanotoxicology* **3**, 98–108 (2009).
45. Kirchner, C. *et al.* Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett.* **5**, 331–338 (2005).
46. Przybytkowski, E., Behrendt, M., Dubois, D. & Maysinger, D. Nanoparticles can induce changes in the intracellular metabolism of lipids without compromising cellular viability. *FEBS J.* **276**, 6204–6217 (2009).
47. Austin M. Derfus, Warren C. W. Chan, and & Bhatia, S. N. Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. (2003).
48. Pearson, R. G. Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles. *J. Chem. Educ.* **45**, 581 (1968).
49. Pearson, R. G. Hard and soft acids and bases, HSAB, part II: Underlying theories. *J. Chem. Educ.* **45**, 643 (1968).
50. Hemmilä, I. & Laitala, V. Progress in lanthanides as luminescent probes. *J. Fluoresc.* **15**, 529–542 (2005).

51. Faulkner, S., Pope, S. J. A. & Burton-Pye, B. P. Lanthanide complexes for luminescence imaging applications. *Appl. Spectrosc. Rev.* **40**, 1–31 (2005).
52. Auzel, F. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences B Physics. 819–821 (1966).
53. Han, S., Deng, R., Xie, X. & Liu, X. Enhancing luminescence in lanthanide-doped upconversion nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **53**, 11702–11715 (2014).
54. Liu, Q., Feng, W., Yang, T., Yi, T. & Li, F. Upconversion luminescence imaging of cells and small animals. *Nat. Protoc.* **8**, 2033–2044 (2013).
55. Zhou, L. *et al.* Single-band upconversion nanoprobe for multiplexed simultaneous *in situ* molecular mapping of cancer biomarkers. *Nat. Commun.* **6**, 6938 (2015).
56. Andolina, C. M., Klemm, P. J., Floyd, W. C., Fréchet, J. M. J. & Raymond, K. N. Analysis of Lanthanide Complex Dendrimer Conjugates for Bimodal NIR and MRI Imaging. *Macromolecules* **45**, 8982–8990 (2012).
57. Xu, W. *et al.* Mixed lanthanide oxide nanoparticles as dual imaging agent in biomedicine. *Sci. Rep.* **3**, 3210 (2013).
58. Zhao, J., Yang, H., Li, J., Wang, Y. & Wang, X. Fabrication of pH-responsive PLGA(UCNPs/DOX) nanocapsules with upconversion luminescence for drug delivery. *Sci. Rep.* **7**, 18014 (2017).
59. Lewis, D. J., Day, T. M., MacPherson, J. V. & Pikramenou, Z. Luminescent nanobeads: attachment of surface reactive Eu (III) complexes to gold nanoparticles. *Chem. Commun.* 1433–1435 (2006).
60. Zairov, R. *et al.* High performance magneto-fluorescent nanoparticles assembled from terbium and gadolinium 1,3-diketones. *Sci. Rep.* **7**, 40486 (2017).
61. Li, Q.-F. *et al.* Hybrid luminescence materials assembled by [Ln(DPA)₃]³⁻ and mesoporous host through ion-pairing interactions with high quantum efficiencies and long lifetimes. *Sci. Rep.* **5**, 8385 (2015).

62. Li, Y. *et al.* Coordination assembly and characterization of europium(III) complexes covalently bonded to SBA-15 directly functionalized by modified polymer. *RSC Adv.* **3**, 14057–14065 (2013).
63. Xu, X. Y. & Yan, B. Novel photofunctional hybrid materials (alumina and titania) functionalized with both MOF and lanthanide complexes through coordination bonds. *RSC Adv.* **4**, 38761–38768 (2014).
64. Khlebtsov, N. & Dykman, L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 1647–1671 (2011).
65. Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J. & Wyatt, M. D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* **1**, 325–327 (2005).
66. Lasagna-Reeves, C. *et al.* Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 649–655 (2010).
67. Coulter, J. A. *et al.* Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 2673–2685 (2012).
68. Shukla, R. *et al.* Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **21**, 10644–10654 (2005).
69. Jain, S., Hirst, D. G. & O'Sullivan, J. M. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br. J. Radiol.* **85**, 101–113 (2012).
70. Praetorius, N. P. & Mandal, T. K. Engineered nanoparticles in cancer therapy. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **1**, 37–51 (2007).
71. Wang, X. *et al.* Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain. *Nat. Biotechnol.* **21**, 803–806 (2003).
72. Zhang, H. F., Maslov, K., Stoica, G. & Wang, L. V. Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* **24**, 848–851 (2006).

73. Ntziachristos, V., Ripoll, J., Wang, L. V. & Weissleder, R. Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nat. Biotechnol.* **23**, 313–320 (2005).
74. Wang, L. V. & Hu, S. Photoacoustic Tomography: In Vivo Imaging from Organelles to Organs. *Science* **335**, 1458–1462 (2012).
75. Zackrisson, S., Ven, S. M. W. Y. van de & Gambhir, S. S. Light In and Sound Out: Emerging Translational Strategies for Photoacoustic Imaging. *Cancer Res.* **74**, 979–1004 (2014).
76. Ntziachristos, V. & Razansky, D. Molecular Imaging by Means of Multispectral Optoacoustic Tomography (MSOT). *Chem. Rev.* **110**, 2783–2794 (2010).
77. Zhang, Y., Hong, H. & Cai, W. Photoacoustic imaging. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2011**, (2011).
78. Li, C. & Wang, L. V. Photoacoustic tomography and sensing in biomedicine. *Phys. Med. Biol.* **54**, R59–97 (2009).
79. Jokerst, J. V., Thangaraj, M., Kempen, P. J., Sinclair, R. & Gambhir, S. S. Photoacoustic Imaging of Mesenchymal Stem Cells in Living Mice via Silica-Coated Gold Nanorods. *ACS Nano* **6**, 5920–5930 (2012).
80. Rouleau, L. *et al.* VCAM-1-targeting gold nanoshell probe for photoacoustic imaging of atherosclerotic plaque in mice. *Contrast Media Mol. Imaging* **8**, 27–39 (2013).
81. Abadeer, N. S. & Murphy, C. J. Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **120**, 4691–4716 (2016).
82. Yi, D. K. *et al.* Matrix metalloproteinase sensitive gold nanorod for simultaneous bioimaging and photothermal therapy of cancer. *Bioconjug. Chem.* **21**, 2173–2177 (2010).
83. Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W. & El-Sayed, M. A. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2115–2120 (2006).
84. Niidome, T. *et al.* PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **114**, 343–347 (2006).

85. Dorsey, J. F. *et al.* Gold nanoparticles in radiation research: potential applications for imaging and radiosensitization. *Transl. Cancer Res.* **2**, 280–291 (2013).
86. Kim, D., Park, S., Lee, J. H., Jeong, Y. Y. & Jon, S. Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 7661–7665 (2007).
87. Alric, C. *et al.* Gadolinium Chelate Coated Gold Nanoparticles As Contrast Agents for Both X-ray Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5908–5915 (2008).
88. Miladi, I. *et al.* The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents. *Small* **10**, 1116–1124 (2014).
89. Debouttière, P.-J. *et al.* Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. *Adv. Funct. Mater.* **16**, 2330–2339 (2006).
90. Arifin, D. R. *et al.* Trimodal Gadolinium-Gold Microcapsules Containing Pancreatic Islet Cells Restore Normoglycemia in Diabetic Mice and Can Be Tracked by Using US, CT, and Positive-Contrast MR Imaging. *Radiology* **260**, 790–798 (2011).
91. Alric, C. *et al.* The biodistribution of gold nanoparticles designed for renal clearance. *Nanoscale* **5**, 5930–5939 (2013).
92. Sanchez, G. J. Nanoparticules multifonctionnelles pour un meilleur ciblage de la thérapie guidée par imagerie. <http://www.theses.fr> Available at: <http://www.theses.fr/s112391>.
93. Catalano, J. G., Park, C., Zhang, Z. & Fenter, P. Termination and Water Adsorption at the α -Al₂O₃ (012)–Aqueous Solution Interface. *Langmuir* **22**, 4668–4673 (2006).
94. Teja, A. S. & Koh, P.-Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **55**, 22–45 (2009).
95. Laurent, S. *et al.* Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **108**, 2064–2110 (2008).

96. Sun, null, Murray, null, Weller, null, Folks, null & Moser, null. Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices. *Science* **287**, 1989–1992 (2000).
97. Miller, M. M., Prinz, G. A., Cheng, S.-F. & Bounnak, S. Detection of a micron-sized magnetic sphere using a ring-shaped anisotropic magnetoresistance-based sensor: A model for a magnetoresistance-based biosensor. *Appl. Phys. Lett.* **81**, 2211–2213 (2002).
98. Lee, N. *et al.* Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magneto-responsive Therapy. *Chem. Rev.* **115**, 10637–10689 (2015).
99. Ansari, M. O., Ahmad, M. F., Shadab, G. G. H. A. & Siddique, H. R. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles based cancer theranostics: A double edge sword to fight against cancer. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **45**, 177–183 (2018).
100. Toraya-Brown, S. *et al.* Phagocytes mediate targeting of iron oxide nanoparticles to tumors for cancer therapy. *Integr. Biol.* **5**, 159–171 (2012).
101. Mahmoudi, M. *et al.* Magnetic Resonance Imaging Tracking of Stem Cells in Vivo Using Iron Oxide Nanoparticles as a Tool for the Advancement of Clinical Regenerative Medicine. *Chem. Rev.* **111**, 253–280 (2011).
102. Wang, W. *et al.* Design of a Multi-Dopamine-Modified Polymer Ligand Optimally Suited for Interfacing Magnetic Nanoparticles with Biological Systems. *Langmuir* **30**, 6197–6208 (2014).
103. Karagoz, B. *et al.* An Efficient and Highly Versatile Synthetic Route to Prepare Iron Oxide Nanoparticles/Nanocomposites with Tunable Morphologies. *Langmuir* **30**, 10493–10502 (2014).
104. Pösel, E. *et al.* Relaxivity optimization of a PEGylated iron-oxide-based negative magnetic resonance contrast agent for T₂-weighted spin-echo imaging. *ACS Nano* **6**, 1619–1624 (2012).

105. Zhang, X. *et al.* Iron Oxide Nanoparticles Induce Autophagosome Accumulation through Multiple Mechanisms: Lysosome Impairment, Mitochondrial Damage, and ER Stress. *Mol. Pharm.* **13**, 2578–2587 (2016).
106. Shen, Z. *et al.* A novel Trojan-horse targeting strategy to reduce the non-specific uptake of nanocarriers by non-cancerous cells. *Biomaterials* **70**, 1–11 (2015).
107. Ma, X. *et al.* Exploring a new SPION-based MRI contrast agent with excellent water-dispersibility, high specificity to cancer cells and strong MR imaging efficacy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **126**, 44–49 (2015).
108. Zhou, Z. *et al.* Engineered Iron-Oxide-Based Nanoparticles as Enhanced T1 Contrast Agents for Efficient Tumor Imaging. *ACS Nano* **7**, 3287–3296 (2013).
109. Santra, S. *et al.* Gadolinium-Encapsulating Iron Oxide Nanoprobe as Activatable NMR/MRI Contrast Agent. *ACS Nano* **6**, 7281–7294 (2012).
110. Iqbal, M. Z. *et al.* Silica-coated super-paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONPs): a new type contrast agent of T1 magnetic resonance imaging (MRI). *J. Mater. Chem. B* **3**, 5172–5181 (2015).
111. Zeng, L., Ren, W., Zheng, J., Cui, P. & Wu, A. Ultrasmall water-soluble metal-iron oxide nanoparticles as T1-weighted contrast agents for magnetic resonance imaging. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 2631–2636 (2012).
112. Mahmoudi, M., Sahraian, M. A., Shokrgozar, M. A. & Laurent, S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *ACS Chem. Neurosci.* **2**, 118–140 (2011).
113. Jordan, A. *et al.* Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia. *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group* **9**, 51–68 (1993).
114. Fortin, J.-P. *et al.* Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2628–2635 (2007).

115. Ahmad, F. & Zhou, Y. Pitfalls and Challenges in Nanotoxicology: A Case of Cobalt Ferrite (CoFe₂O₄) Nanocomposites. *Chem. Res. Toxicol.* **30**, 492–507 (2017).
116. Alphandéry, E., Faure, S., Seksek, O., Guyot, F. & Chebbi, I. Chains of Magnetosomes Extracted from AMB-1 Magnetotactic Bacteria for Application in Alternative Magnetic Field Cancer Therapy. *ACS Nano* **5**, 6279–6296 (2011).
117. Hugounenq, P. *et al.* Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers for Highly Efficient Magnetic Hyperthermia. *J. Phys. Chem. C* **116**, 15702–15712 (2012).
118. Lartigue, L. *et al.* Cooperative Organization in Iron Oxide Multi-Core Nanoparticles Potentiates Their Efficiency as Heating Mediators and MRI Contrast Agents. *ACS Nano* **6**, 10935–10949 (2012).
119. Salihov, S. V. *et al.* Recent advances in the synthesis of Fe₃O₄@Au core/shell nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **394**, 173–178 (2015).
120. Hu, Y. *et al.* Multifunctional Fe₃O₄@Au core/shell nanostars: a unique platform for multimode imaging and photothermal therapy of tumors. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
121. Espinosa, A. *et al.* Can magneto-plasmonic nanohybrids efficiently combine photothermia with magnetic hyperthermia *Nanoscale* **7**, 18872–18877 (2015).

Chapitre 2. Synthèse et Caractérisation de nanostructures hybrides à cœur magnétique décorées par des nanoparticules d'or	63
2.1. Introduction	63
2.2. Synthèse de nanoparticules d'or et d'oxyde de fer	65
2.2.1. Les principales voies de synthèse des nanoparticules d'or	65
2.2.2. Les principales voies de synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer.....	68
2.3. Partie expérimentale.....	70
2.3.1. Généralités	70
2.3.2. Synthèse des nanofleurs de maghémite	70
2.3.3. Synthèse des nanoparticules Au@DTDTPA.....	73
2.3.4. Assemblage contrôlé des nanofleurs d'oxyde de fer et des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA)	74
2.3.5. Solution injectable.....	78
2.3.6. Complexation de l'ion gadolinium sur les nanofleurs dorées.....	78
2.3.7. Radiomarquage des nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA), des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) et des nanofleurs (NF@dopamine-DTPA)	79
2.4. Caractérisations	79
2.4.1. Spectrophotométrie d'absorption UV-Visible	79
2.4.2. Dosage de l'or, du fer et du gadolinium par ICP-OES	80
2.4.3. Microscopie électronique à transmission.....	80
2.4.4. Mesure du potentiel zêta et du diamètre hydrodynamique.....	80
2.4.5. Contrôle du radiomarquage des nanofleurs dorées, des nanoparticules d'or Au@DTDTPA et des nanofleurs (NF@dopamine-DTPA)	80
2.5. Résultats et discussion.....	80
2.5.1. Nanoparticules d'or (Au@DTDTPA)	80
2.5.2. Nanofleurs de maghémite (γ -Fe ₂ O ₃).....	82
2.5.3. Nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA)	84
2.5.4. Caractéristiques des nanofleurs dorées du protocole 3.	91
2.6. Conclusion partielle	94
Références.....	95

Chapitre 2. Synthèse et Caractérisation de nanostructures hybrides à cœur magnétique décorées par des nanoparticules d'or

2.1. Introduction

La biodistribution est un facteur important à prendre en compte pour développer des nanoparticules thérapeutiques. Ces dernières sont confrontées aux différentes barrières biologiques qui protègent l'organisme de l'accumulation indésirable de corps étrangers ¹. Afin d'adresser convenablement les agents thérapeutiques, différentes stratégies ont été développées dans le but d'élaborer des nanomatériaux stables dont la biodistribution peut être finement contrôlée après injection intravasculaire ^{2,3}.

Lors de la conception de nanoparticules à activité thérapeutique contrôlée à distance, il est important de garder à l'esprit que l'efficacité thérapeutique n'est exploitable que si elle s'accompagne d'un comportement sain des nanoparticules. En effet, un traitement efficace de tumeurs solides cancéreuses ne se réduit pas à leur éradication mais requiert simultanément la préservation des tissus sains environnants. Afin de limiter les effets secondaires indésirables, les nanoparticules doivent être conçues pour à la fois circuler librement sans accumulation dans les tissus sains, s'accumuler préférentiellement dans la zone tumorale et être éliminées par la voie rénale qui constitue le mode d'élimination le mieux adapté pour les nanoparticules non biodégradables. Le respect d'un tel cahier des charges nécessite de contrôler la taille, la forme et la composition des nanoparticules qui jouent un rôle déterminant dans leur comportement après administration.

C'est dans ce contexte que l'équipe NCM a développé des nanoparticules d'or radiosensibilisantes Au@DTDTPA pour la radiothérapie guidée par imagerie. Ces nanoparticules d'or sont constituées d'un cœur d'or de taille contrôlée et réduite (2,4 nm) enrobée d'une couche organique constituée de chélateurs linéaires (DTDTPA). Cette couche organique joue plusieurs rôles essentiels. En s'adsorbant à la surface des germes au cours de la synthèse, ces chélateurs dithiolés assurent le contrôle de la croissance des nanoparticules d'or. Leur adsorption est garantie par la forte affinité entre les atomes d'or à la surface des particules et les atomes de soufre du DTDTPA. L'analyse par XPS et la titration colorimétrique couplés à l'analyse thermogravimétrique ont montré qu'une partie des molécules de DTDTPA étaient immobilisées à la surface par une de leurs deux fonctions thiols alors que la deuxième fonction thiol était impliquée dans la formation d'un pont disulfure avec une fonction thiol d'une autre molécule de DTDTPA. Au final la couche organique DTDTPA présente une structure multicouche qui a l'avantage d'immobiliser un plus grand nombre de DTDTPA que dans le cas de la formation d'une monocouche. Le caractère fortement hydrophile du DTDTPA et la présence de charges sur une large gamme de pH qui confère aux nanoparticules un potentiel zêta fortement négatif pour $\text{pH} \geq 4$

sont à l'origine de l'excellente stabilité colloïdale de ces nanoparticules Au@DTDTPA dans l'eau et les milieux biologiques (force ionique élevée (300 mosmol) et pH 7,4). Les molécules de DTDTPA ont été développées parce qu'elles présentent la capacité de former des complexes stables avec les ions Gd^{3+} et certains ions radioactifs (^{111}In et ^{99m}Tc). Cette caractéristique constitue un atout dans l'utilisation *in vivo* de ces nanoparticules car leur biodistribution peut être suivi par IRM ^{4,5} ou par imagerie nucléaire ⁶. Enfin les fonctions acide carboxylique de la couche organique peuvent servir de site d'ancrage pour la post-fonctionnalisation de ces nanoparticules.

Au final les nanoparticules Au@DTDTPA (Gd), après marquage avec Gd, se sont révélées comme des agents prometteurs pour la radiothérapie guidée par IRM grâce à l'effet radiosensibilisant de l'élément or (concentré dans les nanoparticules) et au caractère paramagnétique des chélates de gadolinium qui génèrent un comportement d'agent de contraste positif en IRM. Il a été montré que le traitement par radiothérapie en s'appuyant sur les données collectées par IRM conduisait à une meilleure survie des rats porteurs de gliosarcome 9L dans l'hémisphère droit de leur cerveau (tumeur agressive dans un organe radiosensible) lorsque l'irradiation était effectuée 5-10 minutes après l'injection intraveineuse.

Cependant, le potentiel de ces particules est sous-exploité en raison d'une élimination rénale trop rapide.

Dans ce contexte, une stratégie a été proposée permettant de coupler les nanoparticules d'or à un transporteur tel que les nanofleurs de maghémite. Ces dernières seront assez larges pour améliorer leur circulation dans le sang et assurer une accumulation et une rétention dans la tumeur. De plus ce transporteur présente un comportement sain c'est-à-dire une biocompatibilité et une biodégradabilité en milieu physiologique comme il a été montré dans les travaux de Florence Gazeau en collaboration avec Rana Bazzi ^{7,8}.

L'élaboration d'une telle nanostructure permet de combiner le potentiel de chacun de ces particules pour améliorer le traitement thérapeutique.

En effet, les nanofleurs de maghémite ont un pouvoir chauffant très élevé quand ils sont soumis à un champ magnétique alternatif de haute fréquence et cette propriété peut être exploitée en hyperthermie magnétique. Les nanoparticules d'or ont quant-à-elles un potentiel radiosensibilisant utilisé en radiothérapie.

L'assemblage de ces nanoparticules permettrait de combiner l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'or au pouvoir chauffant des nanofleurs et ouvrirait la voie à la combinaison de l'hyperthermie magnétique et de la radiothérapie.

Ce deuxième chapitre rassemble les protocoles mis en œuvre et les résultats obtenus dans le cadre de l'assemblage des nanoparticules d'or Au@DTDTPA et des nanofleurs de maghémite.

2.2. Synthèse de nanoparticules d'or et d'oxyde de fer

2.2.1. Les principales voies de synthèse des nanoparticules d'or

Michael Faraday fut le premier à étudier scientifiquement la formation des colloïdes d'or. La méthode qu'il utilisa était basée sur la réduction d'ions AuCl_4^- par un agent phosphoré. Depuis ces travaux, de nombreuses méthodes de synthèse de nanoparticules d'or (AuNPs) utilisant différents types de réducteurs et conduisant à des tailles et des morphologies différentes ont été décrites. Cette réduction aisée d' Au (III) ou Au (I) sous forme de sels en Au (0) par différents types de réducteurs est due au fait que l'or est le plus électronégatif des métaux de transition. Les différentes méthodes de synthèse de colloïdes d'or sont basées sur le contrôle de la réduction de l' Au (III) en Au (0). Ces méthodes utilisent généralement l'acide tétrachloroaurique (HAuCl_4) mais varient considérablement dans la nature du réducteur, l'ordre d'addition des réactifs, les paramètres physiques (concentration, température et vitesse d'agitation). Ces variations exercent une forte influence sur la taille finale des nanoparticules. Le diamètre final est déterminé par le nombre de noyaux icosaédraux formés au début de la réaction.

L'utilisation d'un réducteur rapide (phosphore blanc, acide tannique) permet d'obtenir un grand nombre de noyaux en consommant beaucoup de sel d'or (HAuCl_4). De ce fait la quantité d'or disponible pour la croissance des nanoparticules est limitée. Les nanoparticules d'or sont composées d'un noyau d'or pur (0) entouré d'ions AuCl_2^- adsorbés en surface. Ce sont ces ions qui confèrent la charge négative aux colloïdes et protègent de l'agrégation par répulsion électrostatique. Toutes les synthèses de colloïdes d'or sont sensibles à l'anion (chlorure>bromure>iodure) qui comprime la double couche ionique et réduit donc la portée des répulsions électrostatiques. La déstabilisation du système aboutit à une agrégation qui s'accompagne d'un changement de couleur de la solution et éventuellement d'une sédimentation des nanoparticules d'or.

Dans la majorité des articles publiés, les nanoparticules d'or sont produites à partir du sel d'or HAuCl_4 . D'autres précurseurs ont été employés ($\text{AuP}(\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2)_3$) mais leur utilisation est moins aisée. En revanche l'effet de la nature du réducteur ($\text{NaSCN}+\text{K}_2\text{CO}_3$, phosphore blanc, acide ascorbique+ K_2CO_3 , PPh_3 , NaBH_4 , citrate de sodium) sur la synthèse des nanoparticules d'or a été abondamment étudiée. Parmi ces méthodes, nombreuses sont celles qui ont mené à des nanoparticules instables ou des protocoles complexes qui ont limité leurs développements et leurs applications. La méthode de Brust développée en 1994 marque un véritable tournant dans la synthèse de nanoparticules d'or avec l'obtention de nanoparticules stables et redispersables par un protocole simple de mise en œuvre. De telle sorte que, l'essentiel des articles publiés depuis sur les nanoparticules d'or sont consacrés à des nanoparticules d'or élaborées par cette méthode. Parmi les autres synthèses développées et utilisées de nos jours, la synthèse par réduction d' HAuCl_4 en présence de citrate de sodium rencontre également un certain succès en raison de ses spécificités d'élaboration qui lui apportent pour certaines applications un avantage sur la méthode de Brust. Pour ces raisons, une description plus approfondie de ces deux méthodes sera développée dans les paragraphes suivants (2.2.1.1 et 2.2.1.2).

2.2.1.1. Synthèse par voie citrate

Parmi les méthodes conventionnelles de synthèse, si l'on excepte la réduction en présence de NaBH_4 , la plus répandue est la réduction d'un dérivé d'or au degré d'oxydation III (HAuCl_4) par le citrate de sodium dans l'eau⁹. Ce procédé, mis au point par Turkevich en 1951, permet l'obtention d'AuNPs d'environ 20 nm. Le citrate et le produit de son oxydation (le dicarboxylate d'acétone) agissant comme des agents protecteurs, cette méthode ne recourt donc à aucun autre stabilisant pour assurer la stabilité colloïdale.

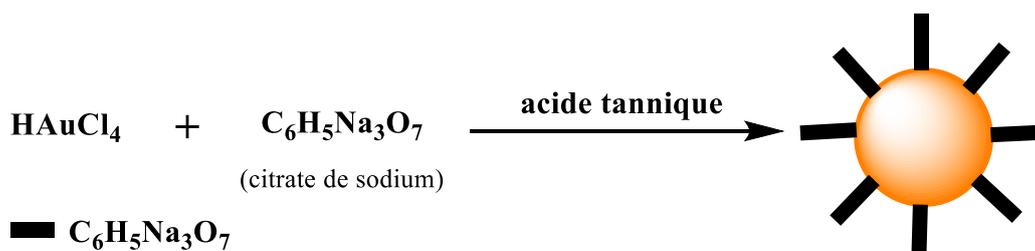


Figure 1. Synthèse de nanoparticules d'or par la voie citrate/acide tannique.

Frens reprendra en 1973 ce procédé et fera varier la taille de 16 à 147 nm en modifiant le rapport or/citrate de sodium¹⁰. Ce procédé est aujourd'hui très souvent utilisé pour la préparation de matériaux AuNP-ligand exigeant une quantité contrôlée de ligands en surface. De plus récentes recherches dirigées par J.W.Slot¹¹ ont permis l'accès à des nanoparticules d'or (AuNPs) de taille inférieure à 10 nm en ajoutant de l'acide tannique (macromolécule) en plus du citrate de sodium lors de la synthèse des nanoparticules d'or (Figure 1). Le diamètre final de la particule est inversement proportionnel à la quantité d'acide tannique utilisée. Cette méthode permet donc la préparation de solutions monodisperses de nanoparticules de taille très variable par simple modification du rapport acide tannique (réducteur rapide) / citrate de sodium (réducteur lent).

Cependant, les ions citrates possèdent des liaisons trop faibles avec l'or pour permettre l'isolement des nanoparticules d'or (AuNPs) en tant que matériau solide. Cependant, l'addition de phosphanes et de thiols, qui possèdent une affinité plus forte pour l'or, ont permis l'accès à des AuNPs isolables sous forme solide et redispersables dans les solvants appropriés comme le permet également la méthode de Brust, mais avec l'obtention de nanoparticules d'or de très petites dimensions et à forte concentration.

2.2.1.2. Synthèse de Brust

La littérature présente un grand nombre de synthèses dérivées de celle de Brust. Par cette méthode, il est possible de synthétiser des nanoparticules d'or fonctionnalisées par un type de dérivés thiolés. La synthèse de ces nanoparticules consiste en une réduction de Au(III) provenant de HAuCl_4 par un réducteur puissant (NaBH_4) en présence de molécules organiques comportant au moins une fonction thiol (Figure 2). La taille des nanoparticules dépend du rapport molaire Au/ NaBH_4 et Au/RSH.

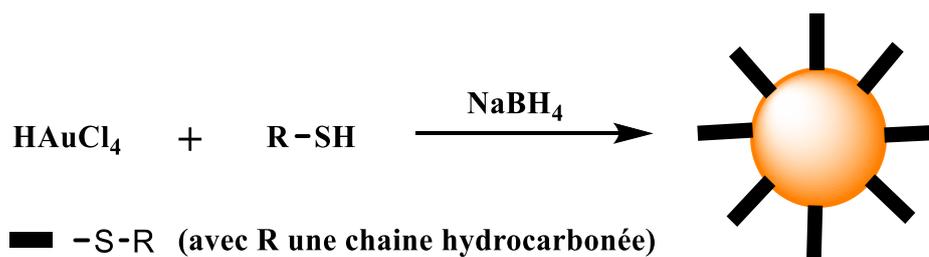


Figure 2. Synthèse de nanoparticules d'or selon les méthodes proposées par Brust.

Dans la synthèse de Brust, les thiols restent le type de stabilisant le plus employé pour les nanoparticules d'or du fait de la plus grande force de la liaison Au-S. La stabilisation des nanoparticules d'or (AuNPs) par des thiols fut pour la première fois publiée en 1993 par Mulvaney et Giersig qui démontraient la possibilité d'utiliser des thiols avec des chaînes carbonées de différentes longueurs¹². Les thiols sont liés de façon covalente par réaction avec la surface métallique.

Le dérivé thiolé joue alors un double rôle :

- Il assure une bonne homogénéité de taille de nanoparticules en jouant thermodynamiquement sur la croissance des particules ;
- Il assure la dispersion en jouant le rôle d'espaceur entre les nanoparticules métalliques, empêchant ainsi les risques d'agglomération et de frittage.

Le dérivé thiolé permet donc d'assurer un contrôle de la taille des nanoparticules. Les nanoparticules formées auront alors les caractéristiques suivantes :

- Elles seront totalement recouvertes par un unique dérivé thiolé ;
- La taille est imposée par les rapports molaires Au/NaBH₄ et Au/RSH ;
- Leur dispersion dans un solvant donné dépendra de la nature des thiols adsorbés ;
- Elles sont isolables sous forme de poudre rendant ainsi leur caractérisation plus aisée.

Cependant, il existe deux méthodes de synthèse de Brust, l'une étant biphasique et l'autre monophasique.

a. Synthèse de Brust par la méthode biphasique

La synthèse biphasique de Brust est une synthèse qui se déroule dans un milieu composé de deux phases non miscibles (eau/toluène ou chloroforme)¹³. Une phase aqueuse contenant la solution d'HAuCl₄, 3H₂O et une phase organique contenant en plus des molécules thiolées le bromure de tétraoctylammonium (TOAB) qui va former

un complexe avec l'or pour le transférer dans la phase organique. Le diamètre de particules d'or dépend de la quantité de NaBH_4 ajouté. Ainsi cette voie permet de synthétiser des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des ligands thiolés hydrophobes. Les nanoparticules résultant de cette synthèse ne sont en général pas stables dans les milieux aqueux.

b. Synthèse de Brust par la méthode monophasique

La synthèse monophasique de Brust est une synthèse qui a lieu dans une seule phase (en général une solution d'eau et de méthanol)¹⁴. Elle permet de synthétiser par cette voie des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des ligands thiolés hydrophiles. La quantité de NaBH_4 (le réducteur) a une influence sur le diamètre des nanoparticules d'or synthétisées par cette voie.

Avec cette méthode de Brust, il est possible d'obtenir des nanoparticules de très petite taille qui peuvent être dispersées à forte concentration en milieu aqueux. C'est à partir de cette méthode qu'a été mise au point la synthèse des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) utilisées dans ce projet de thèse.

2.2.2. Les principales voies de synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer

2.2.2.1. Synthèse par co-précipitation

Le procédé de co-précipitation est la voie chimique la plus simple et la plus largement employée pour la synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer.

Brièvement, les nanoparticules sont préparées en agitant un mélange stœchiométrique de sels ferreux et ferrique dans un milieu aqueux dans des conditions basiques pour donner de la magnétite (Fe_3O_4) en l'absence d'oxygène. Cependant, l'état d'oxydation du fer (II) est instable et la magnétite peut rapidement se transformer en maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, oxyde de fer (III)) au contact de l'air, ou dans des conditions acides en l'absence d'oxygène.

Les nanoparticules d'oxyde de fer (magnétite ou maghémite) peuvent être fonctionnalisées *in situ* en utilisant des additifs tels que des composés organiques (citrate de sodium) ou des polymères (le dextrane, l'alcool polyvinylique).

Le principal avantage de cette approche est qu'on peut synthétiser une grande quantité de nanoparticules. Cependant, le contrôle de la distribution en taille des nanoparticules est limitée car seul les facteurs cinétiques contrôlent la croissance du cristal^{15,16}.

2.2.2.2. Autres méthodes de synthèse

Il existe d'autres méthodes de synthèse comme la synthèse par décomposition thermique ou encore par voie électrochimique.

La première méthode de synthèse consiste à décomposer à haute température des précurseurs organométalliques dans des solvants organiques pour permettre un meilleur contrôle de la taille et de la forme des nanoparticules synthétisées¹⁷. La taille ainsi que la forme des nanoparticules peuvent être réglées par le choix du précurseur

et de la température. Les nanoparticules d'oxyde de fer produites par décomposition thermique sont fonctionnalisées par des composés hydrophobes pour faciliter la stabilisation dans des solvants organiques, mais réduit considérablement leur stabilité colloïdale dans les milieux aqueux (tels que les fluides biologiques).

Le principe de la méthode de synthèse par voie électrochimique est basé sur l'utilisation d'une électrode en fer plongée dans une solution composée de diméthylformamide (DMF) et de surfactants cationiques^{18,19}. L'ajustement de la densité de courant permet de contrôler la taille des particules synthétisées. Le dépôt électrochimique dans des conditions oxydantes a été utilisé pour préparer des nanoparticules de maghémite (Fe_2O_3) et de magnétite (Fe_3O_4)²⁰. Les nanoparticules d'oxyde de fer (magnétite ou maghémite) synthétisées par ces méthodes bien que très intéressantes ne sont pas stables en milieu aqueux. Cela constitue une contrainte pour l'utilisation de ces nanoparticules en milieu biologique.

2.2.2.3. Synthèse par voie polyol

La synthèse en milieu polyol est une voie chimique, elle repose sur l'utilisation de solvants à hauts points d'ébullitions comme les polyols qui sont des molécules possédant plusieurs fonctions alcools permettant entre autres d'obtenir des nanoparticules d'oxydes métalliques. Ce procédé de synthèse offre des opportunités intéressantes car les polyols servent à la fois de solvant, de réducteurs et de stabilisants pour contrôler la croissance des particules.

La synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer par la méthode polyol consiste à faire réagir des précurseurs de sels ferreux et ferrique avec NaOH dans un polyol liquide. Le mélange est agité et chauffé à une température donnée qui peut atteindre la température d'ébullition du polyol. Durant cette réaction, les molécules de polyol interagissent avec les précurseurs et s'adsorbent à la surface des germes en croissance pour finalement produire des nanoparticules d'oxyde de fer (magnétite ou maghémite) recouvertes d'une couche de polyol.

Comparée aux autres méthodes, cette approche présente plusieurs avantages²¹. En premier lieu, la surface des nanoparticules de magnétite préparées est fonctionnalisée par des ligands polyols (des polyalcools tel que le diéthylène glycol) hydrophiles. Par conséquent, les nanoparticules peuvent être assez facilement dispersées dans un milieu aqueux ou dans un autre solvant polaire.

Deuxièmement la température de réaction relativement élevée de ce système favorise la synthèse des particules ayant une haute cristallinité qui est essentiel pour préparer des matériaux magnétiques possédant une aimantation élevée. En raison de la viscosité du milieu réactionnel (les polyols sont caractérisés par une forte viscosité même à température élevée) et de l'adsorption de polyol à la surface des germes en croissance, ce mode de synthèse assure un contrôle efficace de la taille et garantit une distribution en taille des nanoparticules plus étroite que celle observée n'empruntant d'autres voies de synthèse²². Un meilleur contrôle de la forme est également constaté dans le cas de la synthèse en milieu polyol.

Les travaux de Pierre Hugouenq sous la direction de Valérie Cabuil et de Rana Bazzi ont montré que la méthode polyol pouvait être adaptée pour produire des assemblages nanostructurés en forme de fleurs (nanofleurs) avec un excellent contrôle de la taille et des propriétés magnétiques ²³.

En raison des nombreux avantages qu'elles offrent, la méthode polyol sera utilisée dans ce projet de thèse pour la synthèse des nanofleurs de maghémite.

2.3. Partie expérimentale

2.3.1. Généralités

Les synthèses de suspensions colloïdales en phase aqueuse ont été réalisées dans des ballons préalablement lavés à l'eau régale et à l'eau distillée.

Les suspensions colloïdales en phase aqueuse ont été également préparées avec de l'eau ultrapure ($\rho = 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$).

2.3.2. Synthèse des nanofleurs de maghémite

2.3.2.1. Principe

La synthèse des nanofleurs d'oxyde de fer ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nécessite trois étapes. La première étape consiste à faire réagir des sels ferriques et des sels ferreux (ratio molaire $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} = 2$) avec une solution d'hydroxyde de sodium dans un mélange équimolaire de deux solvants polyols, le diéthylène glycol (DEG) et la N-méthyl-diéthanolamine (NMDEA), selon un protocole adapté des travaux de Caruntu²⁴.

Dans la deuxième étape, différents lavages sont effectués pour recueillir les nanofleurs de magnétite (Fe_3O_4).

Lors de la troisième étape, les nanofleurs de magnétite sont traitées par le nitrate de fer et chauffé à haute température (80°C) pour obtenir les nanofleurs de maghémite (Figure 3).

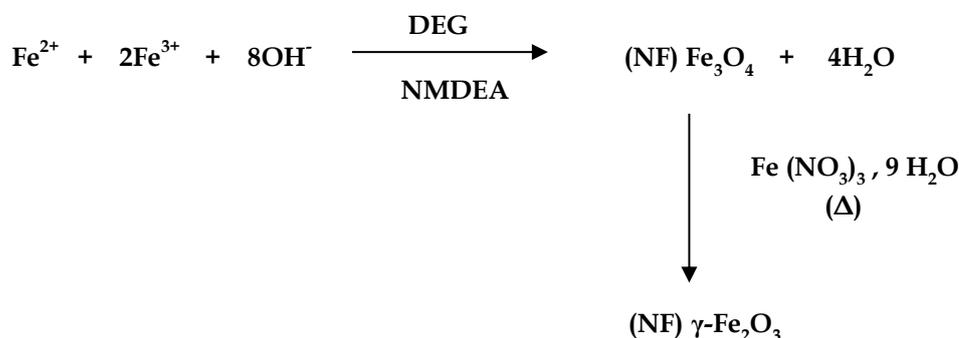


Figure 3. Schéma de la réaction de synthèse des nanofleurs de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

2.3.2.2. Protocole expérimental

Dans un ballon de 250 mL $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,67 g ; $3,37 \cdot 10^{-3}$ mol) et $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,82 g ; $6,74 \cdot 10^{-3}$ mol) sont dissous dans mélange de polyols (57 mL de DEG et 57 mL de

NMDEA). Cette solution de coloration verdâtre est laissée sous agitation pendant une heure.

Deux jours auparavant, une quantité d'hydroxyde de sodium (6,4 g) a été préalablement dissous dans du diéthylène glycol (180 mL) dans un flacon de 250 mL.

Ensuite, à cette solution d'hydroxyde de sodium (30 mL) et la solution de NMDEA (30 mL) ont été ajoutées dans le ballon contenant le mélange ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ dans DEG/NMDEA) avant de laisser sous agitation pendant 3 heures. Après cet ajout, le mélange présente une coloration orange-brun.

Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 220°C avec une montée en température continue et un palier de 4 heures. La montée en température et le palier de 4 heures à 220°C permettent la formation et la coalescence de grains de magnétite monocristalline de 11 nm en taille pour former des nanofleurs.

La solution colloïdale de magnétite formée est ensuite lavée successivement avec de l'éthanol, un mélange d'éthanol et d'acétate d'éthyle, de l'acétate d'éthyle, de l'acide nitrique, de l'eau distillée, de l'acétone et enfin de l'éther diéthylique. Après chaque lavage, le surnageant est éliminé tout en maintenant la poudre au fond du bécher à l'aide d'un aimant.

La suspension de coloration noire de nanofleurs de magnétite (Fe_3O_4) recueillie après les différentes étapes de purification est transvasée dans un flacon dans lequel on ajoute également une solution de nitrate de fer (III) ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) préalablement préparée (1 g de nitrate de fer solubilisé dans 10 mL d'eau ultrapure). Le mélange est chauffé à 80°C pendant 45 minutes. L'oxydation forcée des nanofleurs de magnétite conduit à la formation d'une solution de coloration marron. Ce ferrofluide contient des nanofleurs de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

Le ferrofluide subit ensuite un traitement avec 2 mL d'acide nitrique tout en ajoutant 10 mL d'eau distillée, suivi de deux lavages avec d'abord de l'acétone puis avec de l'éther diéthylique. L'éther diéthylique étant volatil, un bain-marie à 50°C pendant une trentaine de minutes permet d'éliminer toute trace de ce dernier.

Le ferrofluide est redispersé ensuite dans l'eau ultrapure à des concentrations en fer comprises entre 30 et 46 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Le pH de la suspension colloïdale est compris entre 2 et 3. Les nanofleurs flocculent à pH 4. Pour assurer la stabilité colloïdale dans des gammes de pH supérieures à 4, une complexation avec le citrate de sodium a été réalisée.

Typiquement, une solution de citrate de sodium est ajoutée à la suspension colloïdale de nanofleurs avec un rapport molaire citrate/fer = 0,2. Le mélange est mis sous agitation à 80°C pendant 30 minutes. Après le chauffage, on laisse décanter la suspension de nanofleurs pendant 10 min sur une plaque magnétique avant d'éliminer le surnageant. Ensuite l'échantillon est purifié par un lavage avec de l'acétone et de l'éther diéthylique avant de redisperser les nanoparticules dans l'eau ultrapure.

Les conditions d'injection doivent respecter le caractère isotonique des milieux biologiques (pH~7,4 et une osmolarité de 300 mosmol.L⁻¹) et sont obtenues par ajout d'un volume adéquat d'une solution tampon constituée d'un mélange hepes (253 mM)/citrate de sodium (1,8365 M) pour avoir des concentrations finales de 10 mM en hepes et 72,5 mM en citrate de sodium

Le pH est ajusté à 7,4 par ajout d'une solution concentrée d'hydroxyde de sodium. La suspension colloïdale est ensuite stérilisée à l'aide d'une membrane stérile en nylon dont la taille des pores est de 0,2 µm.

2.3.2.3. Greffage de la dopamine et du DTPA-BA sur les NF de maghémite.

Les nanofleurs de maghémite préalablement synthétisées ont été post-fonctionnalisées par la dopamine afin de permettre le greffage du ligand DTPA-BA. L'immobilisation de la dopamine sur les nanofleurs est rendue possible grâce à l'affinité que présentent les fonctions catéchols avec les surfaces d'oxyde de fer. La présence de la fonction amine primaire permet le greffage covalent de la dopamine avec le ligand DTPA-BA grâce à la formation d'une liaison amide issue de la condensation de l'amine primaire avec la fonction acide carboxylique du DTPA-BA.

Protocole expérimental

Une solution aqueuse (500 µL) de dopamine (4,1 mg ; 2,16.10⁻⁵ mol) a été ajoutée à la suspension colloïdale de NF de maghémite (5 mL ; 40 g/L en fer). Le mélange a été chauffé à 50°C pendant 24 heures et sous agitation magnétique.

Afin d'éliminer les molécules de dopamine qui n'ont pas été greffées sur les nanofleurs, une étape de purification a été effectuée. Après avoir éliminé le surnageant, un lavage à l'acétone et un lavage à l'éther diéthylique ont été réalisés avant de redisperser les nanofleurs dans l'eau ultrapure. Après chaque lavage, le surnageant est éliminé tout en maintenant la poudre au fond du bécher à l'aide d'un aimant

La deuxième étape de la synthèse consistait à accrocher le ligand DTPA-BA sur les NF préalablement post-fonctionnalisées par la dopamine. Une quantité de DTPA-BA dissous dans 10 mL de DMSO a été ajoutée à la suspension de NF@dopamine dans un rapport molaire dopamine/DTPA-BA égal à 1. Le mélange a été mis sous agitation magnétique. L'échantillon de nanofleurs NF@dopamine-DTPA a ensuite été lavé successivement avec de l'eau ultrapure, de l'acétone et de l'éther diéthylique. Les nanofleurs NF@dopamine-DTPA ont ensuite été redispersées dans l'eau ultrapure.

Pour rendre la suspension colloïdale de NF@dopamine-DTPA compatible avec les conditions d'injection, un volume adéquat d'une solution tampon constituée d'un mélange hepes (253 mM)/citrate de sodium (1,8365 M) a été ajouté pour obtenir des concentrations finales de 10 mM en hepes et 72,5 mM en citrate de sodium.

2.3.3. Synthèse des nanoparticules Au@DTDTPA

2.3.3.1. Principe

L'élaboration des nanoparticules d'or repose sur l'adaptation de la méthode monophasique établie par Brust et *al*²⁵.

Le principe de cette synthèse consiste à réduire Au (III) de l'acide tétrachloroaurique ($\text{HAuCl}_4, 3\text{H}_2\text{O}$) par NaBH_4 (un réducteur puissant) en présence de dérivés thiols. Dans notre cas, le dérivé dithiolé de l'acide diéthylènetriamine pentaacétique (appelé dans ce manuscrit DTDTPA) est ajouté au milieu réactionnel.

Ce dernier, en s'adsorbant sur la surface des nanoparticules d'or en croissance assure une bonne homogénéité en taille et une bonne stabilité colloïdale (Figure 4).

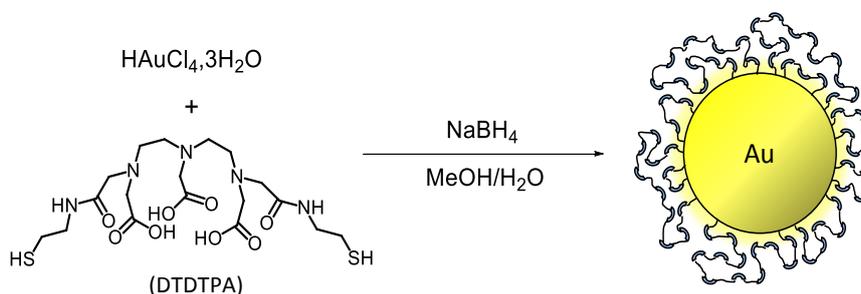


Figure 4. Schéma réactionnel de la synthèse des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA).

2.3.3.2. Protocole expérimental

Dans un ballon de 250 mL, $\text{HAuCl}_4, 3\text{H}_2\text{O}$ (192 mg ; $4,90 \cdot 10^{-4}$ mol) est dissous dans le méthanol (60 mL). Cette solution de coloration jaune est placée sous agitation et est protégée de la lumière.

Dans un flacon, le DTDTPA (256 mg ; $5,90 \cdot 10^{-4}$ mol) est dissous préalablement dans l'eau ultrapure (38 mL). La solution aqueuse de DTDTPA est ensuite ajoutée dans le ballon. Une coloration orangée est observée au premier contact, puis celle-ci devient opaque.

De l'acide acétique (1,92 mL) est ensuite ajouté au mélange pour acidifier et éviter l'agglomération des nanoparticules.

Dans un autre flacon, NaBH_4 (182 mg ; $4,80 \cdot 10^{-3}$ mol) est dissous dans l'eau ultrapure (13,2 mL). Cette solution est introduite dans le ballon par petites fractions. Au premier point de contact une coloration marron-noir apparaît et s'étend rapidement dans tout le contenu du ballon. Cette coloration témoigne de la réduction de l'or (III) en or métallique.

Le mélange est laissé sous agitation modérée pendant une heure sans mettre de bouchon sur le col du ballon pour faciliter ainsi l'évacuation du dihydrogène.

Après une heure d'agitation, l'acide chlorhydrique (2 mL ; 1 mol.L⁻¹) est introduit dans le mélange qui est laissé sous agitation pendant une minute avant de laisser sédimenter le mélange.

La suspension colloïdale de nanoparticules (Au@DTDTPA) est ensuite filtrée avec une membrane Osmonic en nylon (taille des pores : 0,22 µm). Les nanoparticules sont ensuite lavées avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 10⁻¹ M, de l'eau ultrapure, de l'acétone et enfin avec de l'éther diéthylique.

La poudre noire obtenue après les différentes phases de purification est redispersée dans une solution aqueuse de NaOH à 10⁻²M à une concentration de 10 g.L⁻¹. Le pH de la suspension colloïdale de nanoparticules est compris entre 5 et 6.

Les conditions d'injection doivent respecter le caractère isotonique des milieux biologiques (pH~7,4 et une osmolarité de 300 mosmol.L⁻¹) et sont obtenues par ajout d'un volume adéquat d'une solution tampon hepes (135 mM) et NaCl (4 M) pour avoir des concentrations finales de 150 mM en NaCl et 5 mM en hepes.

Le pH est ajusté à 7,4 par ajout d'une solution concentrée d'hydroxyde de sodium. La suspension colloïdale est ensuite stérilisée à l'aide d'une membrane stérile en nylon dont la taille des pores est de 0,2 µm.

2.3.4. Assemblage contrôlé des nanofleurs d'oxyde de fer et des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA)

2.3.4.1. Principe

La stratégie que nous avons développée pour assembler les nanoparticules d'or aux nanofleurs repose sur l'utilisation de la dopamine. La présence de la fonction amine primaire permet le greffage covalent de la dopamine sur les nanoparticules grâce à la formation d'une liaison amide résultant de la condensation de l'amine primaire avec une des nombreuses fonctions acide carboxylique présentes dans la couche organique (environ 400-450 par nanoparticules). Le couplage entre dopamine et nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) conduit à introduire dans la couche organique entourant les cœurs d'or des groupements catéchol qui sont connus pour leur forte affinité vis-à-vis des surfaces d'oxyde métallique (en particulier l'oxyde de fer) ²⁶⁻²⁹ (Figure 5).

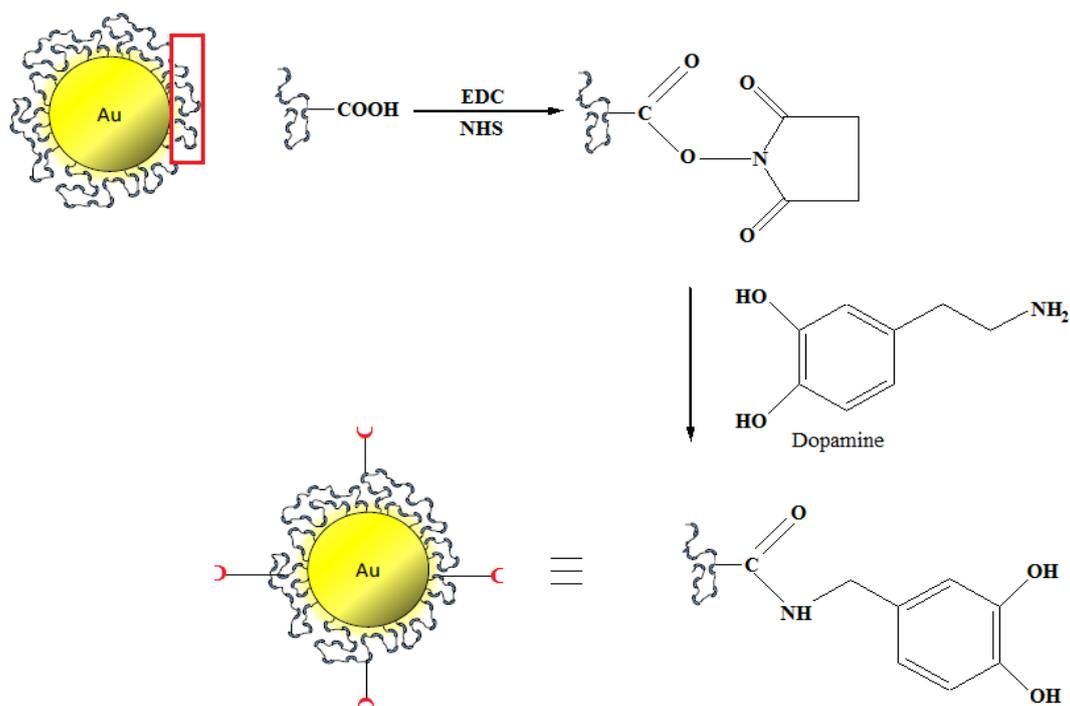


Figure 5. Schéma décrivant le principe de greffage des fonctions amine primaires de la dopamine sur les nanoparticules d'or via les fonctions acides carboxyliques (-COOH) du ligand DTDTPA pour former des liaisons amides.

Afin de valider cette stratégie, des nanofleurs de maghémite ont été mises en contact avec des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) avec et sans dopamine avec différents rapports Au@DTDTPA/NF (25, 50, 100 et 200 Au@DTDTPA par NF) et à différents pH (naturel, 5,5 et 8).

2.3.4.2. Protocoles expérimentaux

Protocole 1 :

Nous avons testé l'assemblage des nanoparticules Au@DTDTPA avec les NF avec trois différents rapports Au@DTDTPA/NF (25, 50 et 100 Au@DTDTPA/NF). En outre, ces expériences d'assemblage ont été réalisées avec des nanoparticules d'or Au@DTDTPA-dopa et Au@DTDTPA c'est-à-dire avec et sans dopamine.

Fonctionnalisation des nanoparticules Au@DTDTPA par la dopamine

Le pH de la suspension colloïdale de nanoparticules d'or (Au@DTDTPA ; 10 mL ; 10 g.L⁻¹) est ajusté à pH=6. La suspension est agitée pendant 90 minutes, après avoir introduit dans l'échantillon une solution aqueuse (2 mL) d'EDC, HCl (138 mg ; 7,2.10⁻⁴ mol) et de NHS (165 mg ; 1,44.10⁻³ mol).

Ensuite la dopamine (2,3 mg ; 1,21.10⁻⁵ mol) est ajoutée au mélange pour pouvoir accrocher 10 molécules de dopamine par nanoparticule. Le pH de la suspension colloïdale est ajusté à 8 avant de laisser sous agitation modérée pendant au moins une nuit, et la solution est protégée de la lumière.

Afin d'éliminer les molécules de dopamine qui ne sont pas greffées sur les nanoparticules d'or (Au@DTDTPA), une étape de purification par dialyse a été appliquée aux nanoparticules. La suspension colloïdale est introduite dans une membrane perméable sous forme de boudin avec une taille de pore adaptée qui est assez large pour éliminer les molécules de dopamine libres et assez petite pour retenir les nanoparticules fonctionnalisées.

Le boudin contenant la suspension colloïdale est à son tour introduit dans un bécher contenant de l'eau ultrapure. Les molécules de carbodiimide (EDC), de N-hydroxysuccinimide (NHS) et de dopamine étant hydrosolubles, l'excès ainsi que les molécules de dopamine n'ayant pas été greffées sont éliminées par dialyse.

La purification est réalisée en utilisant des boudins de dialyse composés de membranes semi-perméables de seuil de coupure (MWCO) compris entre 6 à 8 kDa.

Accrochage des nanoparticules d'or sur les nanofleurs d'oxyde de fer

Les nanoparticules d'or sans dopamine (Au@DTDTPA) ou préalablement post-fonctionnalisées par la dopamine (Au@DTDTPA-dopa) sont mélangées à une suspension de nanofleurs d'oxyde de fer ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) de façon à avoir environ 25, 50 et 100 nanoparticules d'or par nanofleurs d'oxyde de fer.

Le mélange a été réalisé sans ajustement de pH. Ensuite, les suspensions colloïdales de nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA, NF-Au@DTDTPA-dopa) ont été purifiées par différents lavages avec de l'eau ultrapure, de l'acétone et de l'éther diéthylique jusqu'à l'obtention d'un surnageant transparent avant d'être redispersées dans l'eau.

Afin d'évaluer l'influence du pH sur le greffage de nanoparticules d'or sur les nanofleurs, un deuxième protocole a été testé avec un rapport de 200 Au@DTDTPA/NF avec et sans dopamine et à différents pH (5.5, 8 et au pH naturel).

Protocole 2 :

Les nanoparticules d'or avec et sans dopamine ont été mises en contact avec les nanofleurs de maghémite de façon à avoir 200 Au@DTDTPA/NF. Plusieurs échantillons avec et sans dopamine ont été préparées à différents pH (5.5, 8 et au pH naturel) (Tableau 1).

Conditions	Echantillons	Concentrations (g/L)	Volumes (mL)	pH
1	Nanofleurs	38,4 (fer)	1,25	5,47*
	Au@DTDTPA-dopa	2,85 (Au)	10	
2	Nanofleurs	38,4 (fer)	1,25	6,24*
	Au@DTDTPA	10 (Au)	2,85	
	H ₂ O		7,15	
3	Nanofleurs	38,4 (fer)	1,25	5,5**
	Au@DTDTPA-dopa	2,85 (Au)	10	
4	Nanofleurs	38,4 (fer)	1,25	5,5**
	Au@DTDTPA	10 (Au)	2,85	
	H ₂ O		7,15	
5	Nanofleurs	38,4 (fer)	1,25	8**
	Au@DTDTPA-dopa	2,85 (Au)	10	
6	Nanofleurs	38,4 (fer)	1,25	8**
	Au@DTDTPA	10 (Au)	2,85	
	H ₂ O		7,15	

Tableau 1. Récapitulatif des différentes conditions de synthèse des NF dorées (avec et sans dopamine) et à différents pH (*pH naturel, **pH ajusté) (Protocole 2).

Après mélange, les suspensions colloïdales (NF-Au@DTDTPA, NF-Au@DTDTPA-dopa) ont été purifiées avant d'être redispersées dans l'eau comme décrit au protocole 1.

Un troisième protocole a été étudié, avec un couplage théorique à 200 Au@DTDTPA/NF avec dopamine, à pH acide (5,5) et en chauffant le milieu réactionnel.

Protocole 3 :

Nous sommes partis d'un couplage théorique à 200 Au@DTDTPA/NF avec dopamine, à pH 5,5 seulement et en chauffant le milieu réactionnel à 50°C (Tableau 2).

Conditions	Echantillons	Concentrations (g/L)	Volumes (mL)	pH	T (°C)
1	Nanofleurs	36,7 (fer)	9	5,5	50
	Au@DTDTPA-dopa	4,64 (Au)	43,12		
2	Nanofleurs	36,7 (fer)	9	5,5	50
	Au@DTDTPA	10 (Au)	20		
	H ₂ O		23,12		

Tableau 2. Récapitulatif des différentes conditions de synthèse des NF dorées (avec et sans dopamine), à pH acide (5,5) et chauffé à 50°C (Protocole 3).

Les étapes de couplage des particules en présence de dopamine sont identiques que celles décrites dans le protocole 1 et 2.

Après ajustements du pH, le mélange de nanoparticules d'or et de nanofleurs a été chauffé pendant 24h à 50°C et sous agitation.

Avant redispersion, les suspensions colloïdales ont été purifiées par des lavages avec de l'eau ultrapure, de l'acétone et de l'éther diéthylique jusqu'à l'obtention d'un surnageant transparent. Par la suite, quelques ajustements sont effectués sur les suspensions fraîchement redispersées pour les rendre injectables en milieu biologique.

2.3.5. Solution injectable

Après l'élaboration des nanofleurs dorées, s'ensuit l'ajustement de la force ionique afin de les injecter dans l'organisme vivant comme agent nanothéranostique.

Le pH de la suspension colloïdale doit être ajusté à 7,4 (pH physiologique) avec une osmolarité de 300 mosmol.L⁻¹.

Pour ce faire une solution tampon d'hépes/citrate (0,253 M/1,8365 M) est ajoutée à la suspension colloïdale de façon à obtenir une concentration en citrate de 72,5 mM et en hépes de 10 mM.

Ensuite le pH est ajusté à 7,4 par ajout d'une solution de NaOH et d'HCl à 1M.

Pour finir, afin de stériliser la suspension et pouvoir injecter dans un organisme vivant, les suspensions de nanofleurs dorées sont filtrées à l'aide d'une seringue et d'une membrane stérile de 0,2 µm de pores.

2.3.6. Complexation de l'ion gadolinium sur les nanofleurs dorées

L'accrochage des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) sur les nanofleurs devrait conférer à l'objet final un comportement d'agent de contraste positif en IRM car la couche organique garantit l'immobilisation par complexation des ions paramagnétiques Gd³⁺.

Protocole expérimental

L'immobilisation des ions Gd^{3+} sur les nanofleurs dorées est réalisée par simple ajout d'une solution de chlorure de gadolinium ($GdCl_3$). Ensuite la suspension est ajustée à pH 7,4 en ajoutant quelques gouttes de solution d'hydroxyde de sodium à 1 M. D'autres méthodes d'imagerie comme l'imagerie nucléaire sont également employées pour le suivi de la biodistribution des nanofleurs dorées.

2.3.7. Radiomarquage des nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA), des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) et des nanofleurs (NF@dopamine-DTPA)

Afin d'étudier la biodistribution *in vivo* des nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA), ces dernières ont été marquées par un radiotracer (^{99m}Tc) émetteur de photon γ grâce au ligand DTDTPA qui permettent de les complexer.

L'immobilisation du technétium sur les nanofleurs dorées devrait permettre le suivi des nanoparticules par scintigraphie. Les nanoparticules Au@DTDTPA et les nanofleurs préalablement fonctionnalisées par le ligand (DTPA-BA) (NF@dopamine-DTPA) ont également été radiomarquées par le technétium afin de suivre leur biodistribution et comparé aux nanofleurs dorées.

2.3.7.1. Radiomarquage par le technétium (^{99m}Tc)

Le technetium-99m est produit par un générateur $^{99}Mo/^{99m}Tc$. Les nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA) ont été marquées par le ^{99m}Tc en réduisant $^{99m}TcO_4^-$ par le dichlorure d'étain ($SnCl_2$).

Protocole expérimental

Typiquement une suspension de nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA, 1mL) a été mélangée avec 400 μ L de $^{99m}TcO_4^-$ (qui correspond à 460 MBq) et 100 μ l de $SnCl_2$ à 0,01 $g.L^{-1}$. Une agitation au vortex a ensuite été effectuée.

Le ^{99m}Tc réduit est complexé par les chélateurs DTDTPA présents à la surface des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) qui sont greffées sur les nanofleurs d'oxyde de fer ($\gamma-Fe_2O_3$). Un protocole similaire a été utilisé pour le radiomarquage des nanoparticules Au@DTDTPA et pour les nanofleurs (NF@dopamine-DTPA).

2.4. Caractérisations

2.4.1. Spectrophotométrie d'absorption UV-Visible

L'enregistrement des spectres UV-visible a été réalisé en utilisant un spectrophotomètre UV-visible specord 250 dans une gamme comprise entre 400 et 800 nm.

Les suspensions colloïdales ont été préalablement diluées à 0,2 g/L en or pour les nanoparticules Au@DTDTPA et à 0,2 g/L en fer pour les nanofleurs d'oxyde de fer ($\gamma-Fe_2O_3$) et les nanohybrides NF-Au@DTDTPA.

2.4.2. Dosage de l'or, du fer et du gadolinium par ICP-OES

La spectrométrie d'émission atomique a été utilisée pour le contrôle des rapports atomiques Au/Fer, et Au/Gd des nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA).

Les suspensions de nanoparticules hybrides (NF-Au@DTDTPA et NF-Au@DTDTPA-Gd) ont été minéralisées préalablement par l'ajout d'eau régale composé d'acide chlorhydrique et d'acide nitrique (1/3 HNO₃ (3 mL) et 2/3 HCl (6 mL)).

2.4.3. Microscopie électronique à transmission

Les mesures des diamètres et des tailles des cœurs des nanoparticules d'or et des nanofleurs ont été réalisées à l'aide d'un microscope électronique à transmission.

Une goutte de suspension colloïdale est déposée sur une grille en cuivre pour être analysée après séchage à l'air.

2.4.4. Mesure du potentiel zêta et du diamètre hydrodynamique

Les mesures de potentiel zêta et du diamètre hydrodynamique ont été réalisées à l'aide d'un appareil Zetasizer Nano de Malvern Instrument utilisant un laser He-Ne à 633 nm.

Les suspensions aqueuses de nanofleurs d'oxyde de fer (γ -Fe₂O₃), de nanofleurs dopamine (NF@dopamine) et de nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA) ont été préalablement diluées à 0,8 g/L en fer dans une solution aqueuse contenant 10⁻² M de NaCl.

2.4.5. Contrôle du radiomarquage des nanofleurs dorées, des nanoparticules d'or Au@DTDTPA et des nanofleurs (NF@dopamine-DTPA)

2.4.5.1. Radiomarquage par le technétium (^{99m}Tc)

La pureté radiochimique a été évaluée en utilisant une chromatographie sur couche mince instantanée ITLC-SG (Varian, US) avec une détection par un scanner radio-TLC (LabLogic, UK). La méthyléthylcétone a été utilisée comme phase mobile pour déterminer le pourcentage de pertechnétate libre (TcO₄⁻). Dans ce système, les nanoparticules radiomarquées par le technétium (^{99m}Tc) (NF-Au@DTDTPA(Tc), NF@dopamine-DTPA(Tc) et Au@DTDTPA(Tc) et le technétium réduit non complexé (TcO₂) sont restés à l'origine alors que le pertechnétate libre a migré avec le front de solvant.

2.5. Résultats et discussion

Les nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) et les nanofleurs de maghémite (γ -Fe₂O₃) ont été synthétisées séparément avant de les assembler et procéder aux caractérisations physico-chimiques des nanoparticules.

2.5.1. Nanoparticules d'or (Au@DTDTPA)

Après leur synthèse, les nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) ont dans un premier temps été caractérisées en premier par spectrophotométrie UV visible.

La spectrophotométrie UV-visible est parfaitement adaptée pour l'étude des nanoparticules d'or qui sont caractérisées par des propriétés optiques modulables dans le domaine du visible. Le phénomène de résonance de plasmon qui repose sur l'oscillation collective des électrons de la bande de conduction est à l'origine des propriétés optiques qui dépendent de la taille, de la forme et de l'environnement des nanoparticules. Il en résulte que les suspensions de nanoparticules peuvent présenter une large palette de couleurs en fonction de ces différentes caractéristiques. En d'autres termes, ces suspensions absorbent fortement la lumière visible à certaines longueurs d'onde. La bande d'absorption est appelée bande plasmon. Pour les nanoparticules d'or les plus petites (< 3 nm), cette bande n'est plus visible et la suspension du fait d'une absorption sur tout le domaine est noire (Figure 6).

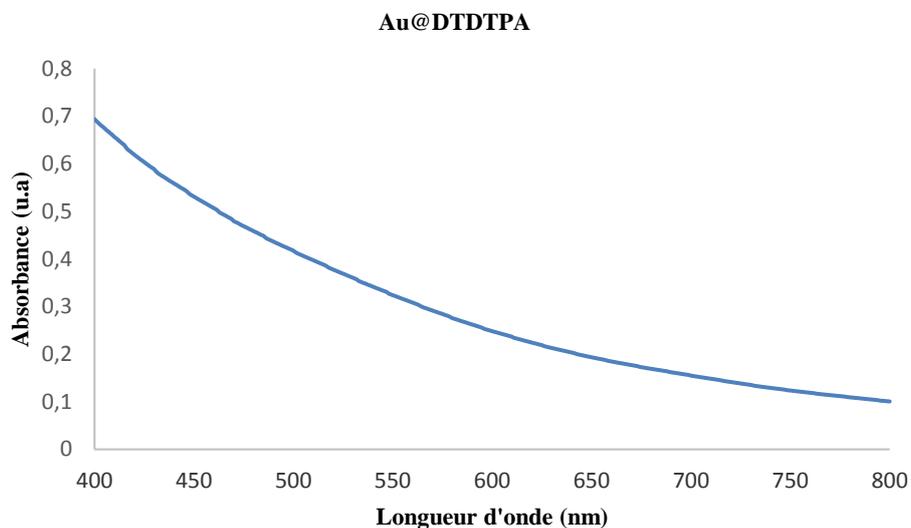


Figure 6. Spectre UV-visible d'une suspension aqueuse de nanoparticules d'or (Au@DTDTPA).

Comme le montre la figure 6, les suspensions de nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) sont caractérisées par un spectre UV-visible dépourvu de bande plasmon. Cette absence est confirmée par la coloration marron-noire de cette suspension. D'après ces informations (coloration noire, absence de bande plasmon), nous pouvons en déduire que le cœur d'or de ces nanoparticules présente une taille inférieure à 3 nm (Figure 7).

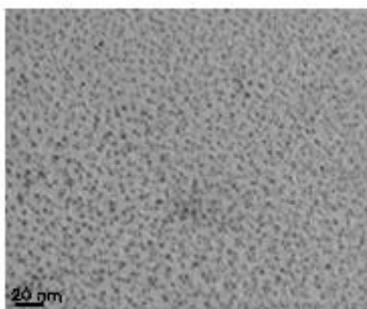


Figure 7. Image MET des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA).

Afin de confirmer la taille des cœurs d'or, les nanoparticules ont été analysées par MET. Les clichés obtenus montrent une multitude de taches sombres distinctes et de dimension semblable. Chacune d'elles correspond au cœur d'or des nanoparticules (Au@DTDTPA). L'homogénéité dans la répartition sur la grille indique que ces nanoparticules sont bien dispersées en phase aqueuse.

En outre, l'homogénéité dans la taille des taches indique une faible distribution en taille et donc un bon contrôle de la synthèse.

2.5.2. Nanofleurs de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)

D'après les travaux récemment réalisés par Pierre Hugouenq et Rana Bazzi ²³, nous avons fixé les conditions (décrites dans le paragraphe 2.3.2) qui permettent d'obtenir des nanofleurs de maghémite d'une taille comprise entre 25 et 30 nm (Figure 8).

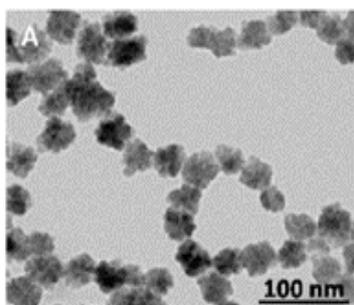


Figure 8. Image MET des nanofleurs de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

Les clichés MET après synthèse montrent que la dimension de ces nanostructures est comprise dans cette gamme de taille. Le diamètre moyen calculé à partir de 100 nanofleurs de maghémite sur différents clichés est égale à 28 ± 2 nm.

L'observation des clichés révèle une structure granuleuse caractéristique des nanofleurs. Elle résulte de l'assemblage de plusieurs nanoparticules de maghémite.

Les nanofleurs de maghémite sont stables à pH acide (2-3) mais flocculent à partir de pH 4. Pour une utilisation en milieu biologique, les nanofleurs ont été fonctionnalisées par le citrate de sodium. La fonctionnalisation par le citrate permet d'établir un équilibre, et les nanofleurs sont dès lors stable à des pH supérieurs à 4 (Figure 9).

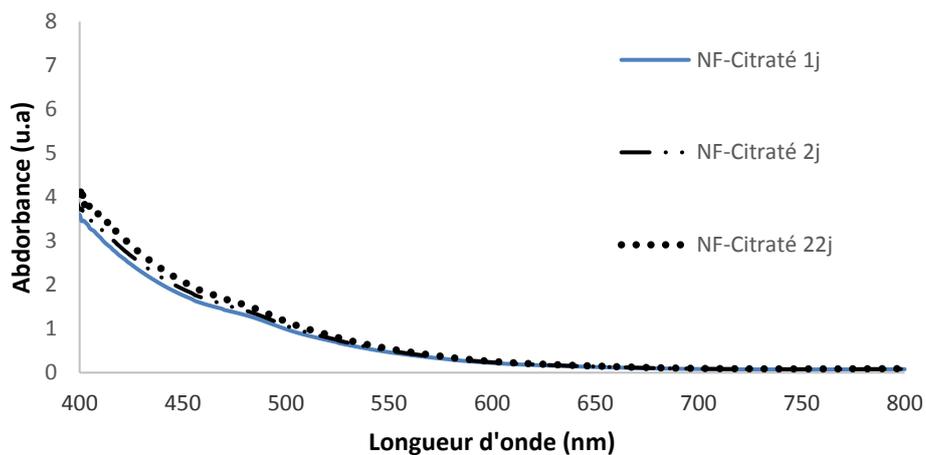


Figure 9. Spectre UV-visible d'une suspension de nanofleurs de maghémite citratées au cours du temps à pH 7.

On observe sur le spectre que les nanofleurs citratées sont stables à pH 7 pendant plus de deux semaines. Cette stabilité colloïdale peut s'expliquer par l'évolution du potentiel zêta des nanofleurs citratées en fonction du pH (Figure 10).

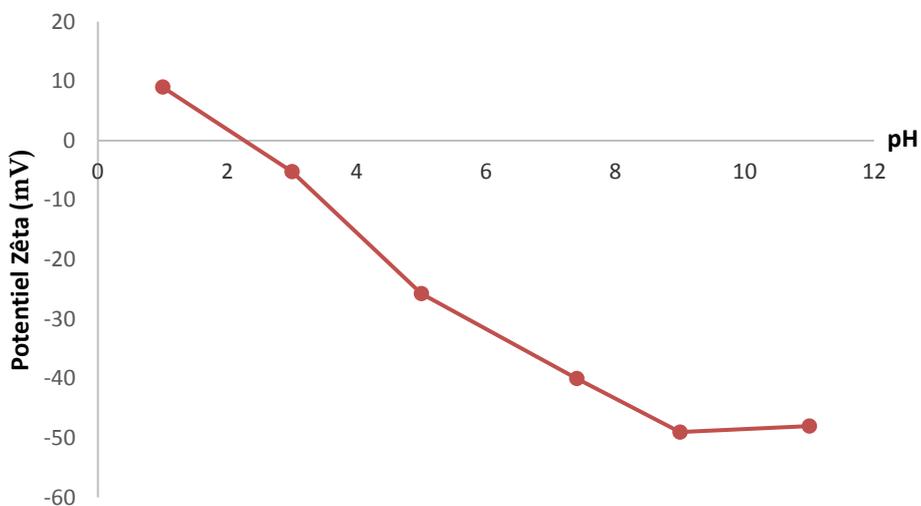


Figure 10. Potentiel zêta des nanofleurs citratées en fonction du pH.

Comme le montre la figure 10, les nanofleurs de maghémite fonctionnalisées par le citrate de sodium ont un potentiel zêta de -40 mV à pH 7. La présence des ions citrates assure la stabilité de la suspension colloïdale par répulsion électrostatique entre les nanoparticules chargées négativement.

2.5.2.1. Post-fonctionnalisation de la dopamine et du DTPA-BA sur les NF de maghémite

Les NF de maghémite post-fonctionnalisées par la dopamine (NF@dopamine) ont dans un premier temps été caractérisées par le potentiel zêta pour valider la présence de la dopamine (Figure 11).

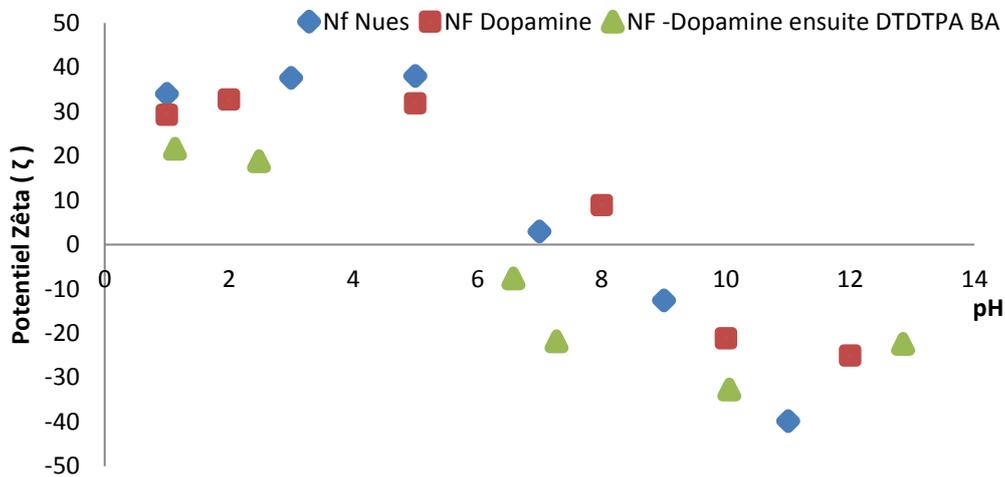


Figure 11. Superposition des potentiels zêta des NF, NF@dopamine et NF@dopamine-DTPA à différents pH.

Comme le montre la figure 11, la comparaison des potentiels zêta des nanofleurs et des nanofleurs@dopamine (en fonction du pH) permet de valider l'accrochage de la dopamine sur les NF. Nous constatons sur la courbe que le point de charge nulle pour les nanofleurs post-fonctionnalisées par la dopamine (nanofleurs@dopamine) est proche de pH autour de 8-9 alors que le point de charge nulle des nanofleurs « nues » est proche de 6-7. Cette différence entre les deux courbes peut s'expliquer par la présence de la dopamine car le pKa des fonctions amines primaires est autour de 8,9.

L'accrochage de la dopamine sur les nanofleurs (NF@dopamine) permet de faciliter le couplage avec les fonctions COOH du ligand DTPA-BA via une réaction de condensation conduisant à la formation d'une fonction amide. La comparaison entre les différentes courbes de potentiel ζ met en évidence des changements entre les différentes situations. A faible pH, tous les échantillons présentent un potentiel ζ positif mais les nanofleurs (NF@dopamine) qui ont été en contact avec DTPA-BA sont caractérisées par une plus faible valeur positive. La plus faible valeur de potentiel ζ indique une diminution des charges positives à la surface. En d'autres termes, il y aurait moins de fonctions amine parce qu'elles seraient impliquées dans l'accrochage avec le DTPA-BA. En outre, l'inversion du signe du potentiel ζ se produit à une plus faible valeur de pH que celle observée pour les NF nues et NF@dopamine (7-8 pour NF nues et 8-9 pour NF@dopamine contre 6-7 pour NF@dopamine-DTPA). Cette inversion à plus faible pH est le signe de l'immobilisation du DTPA à la surface des

nanofleurs car chaque DTPA apporte des groupements carboxylate (COO⁻) chargés négativement. De cette étude comparative de potentiel ζ , nous pouvons estimer que les nanofleurs post-fonctionnalisées par la dopamine (NF@dopamine) ont pu être modifiées par le ligand DTPA-BA qui est connu dans la littérature pour sa grande capacité à complexer les ions d'intérêts pour l'imagerie nucléaire ^{30,31}.

2.5.3. Nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA)

Afin de combiner les propriétés magnétiques des nanofleurs au pouvoir absorbant des nanoparticules d'or, différents essais d'assemblages des nanofleurs de maghémite et des nanoparticules d'or ont été effectués.

Dans le premier protocole deux paramètres ont été étudiés pour réaliser le greffage. Le premier paramètre que nous avons testé est le rapport particules d'or/nanofleurs qui fait référence au nombre de nanoparticules d'or ajoutées par nanofleurs pour l'assemblage. L'influence de la dopamine a été également testée (Tableau 3).

Nbre de nps d'or/NF	25		50		100	
Avec et sans dopamine	Sans	Avec	Sans	Avec	Sans	Avec
Clichés des échantillons après redispersion						

Tableau 3. Clichés photographiques après redispersion des échantillons préparés selon le Protocole 1.

D'après ces clichés, nous constatons qu'en absence de dopamine les nanoparticules assemblées précipitent pour les quantités en nanoparticules d'or les plus faibles (25 et 50 particules d'or/nanofleurs). Par contre, la fonctionnalisation des nanoparticules d'or par la dopamine exerce un effet bénéfique sur la redispersion car elle conduit à la formation d'assemblages NF-nanoparticules d'or (NF-Au@DTDTPA-dopa) plus faciles à redisperser. La redispersion des nanofleurs dorées dépend également du nombre de nanoparticules d'or. D'après le tableau 2, la facilité à redisperser les nanofleurs dorées augmente avec le nombre de nanoparticules d'or pour une même quantité de nanofleurs. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le caractère hydrophile et par la charge négative que la couche organique confère aux nanoparticules d'or. Une fois les nanoparticules d'or greffées sur les nanofleurs, ces caractéristiques garantissent une meilleure redispersion des nanofleurs. Cependant elles ne suffisent pas à assurer une stabilité colloïdale durable. Dans le cas le plus favorable qui correspond à celui des nanofleurs dorées les plus faciles à redisperser (mélange de 100 nanoparticules

d'or par nanofleurs), les nanoparticules précipitent 2 jours après redispersion. Pour conclure, on retient de cette expérience que pour mieux redisperser les nanoparticules assemblées on a besoin de la présence de dopamine et d'une quantité importante de nanoparticules d'or. C'est la raison pour laquelle nous avons testé le protocole 2.

Le second protocole se distingue du premier par le fait que la quantité de particules d'or a été doublée par rapport aux conditions les plus favorables (100 particules d'or/nanofleurs). Un rapport de 200 Au@DTDTPA/NF a donc été testé pour réaliser l'assemblage. L'effet de la dopamine et l'influence du pH (5,5 ; 8 et pH naturel) ont été également étudiés (Tableau 4).

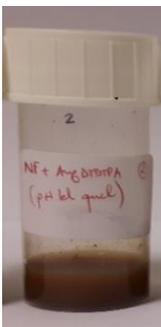
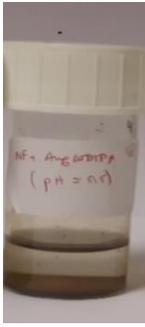
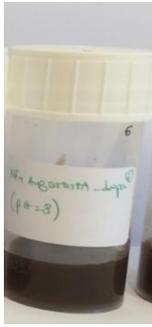
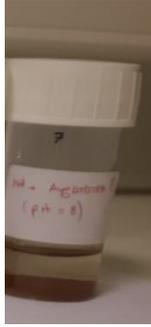
200 NP Au@DTDTPA/NF	Sans contrôle de pH		pH 5,5		pH 8	
Clichés des échantillons après redispersion						
Contenu de chaque échantillon	1	2	3	4	6	7
	1 Au@DTDTPA + NF sans contrôle du pH	2 (Au-dopa + nF)	3 Au-dopa + nF	4 Au + nF	6 Au-dopa + nF	7 Au + nF

Tableau 4. Clichés photographiques après redispersion des échantillons préparés selon le Protocole 2.

Nous pouvons remarquer sur ces clichés que les assemblages nanofleurs-nanoparticules d'or précipitent lorsqu'ils ont été réalisés avec des nanoparticules d'or dépourvues de dopamine. Cette expérience confirme le rôle de la dopamine observé dans la mise en œuvre du protocole 1. En présence de dopamine on constate que la redispersion est meilleure et surtout aux pH acides (5,5 et pH naturel). L'ajout d'un nombre plus important de nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) permet d'augmenter le nombre de particules chargées à la surface des nanofleurs et assure par conséquent une meilleure stabilité. Afin de confirmer ces observations, des analyses de spectrophotométrie UV-visible ont été réalisées (Figure 12).

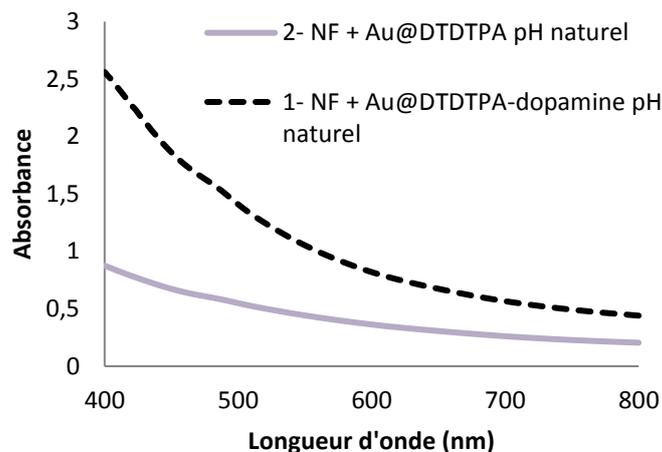
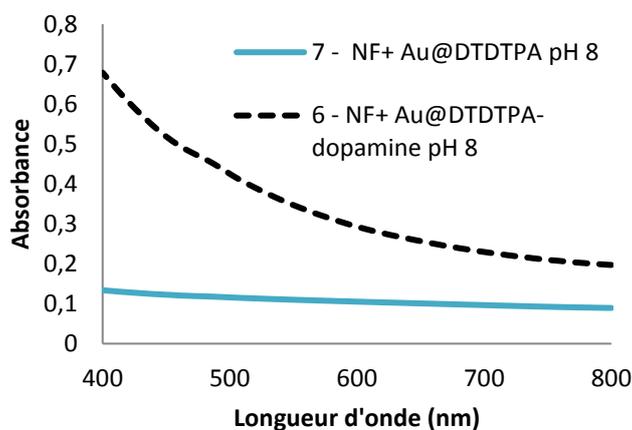
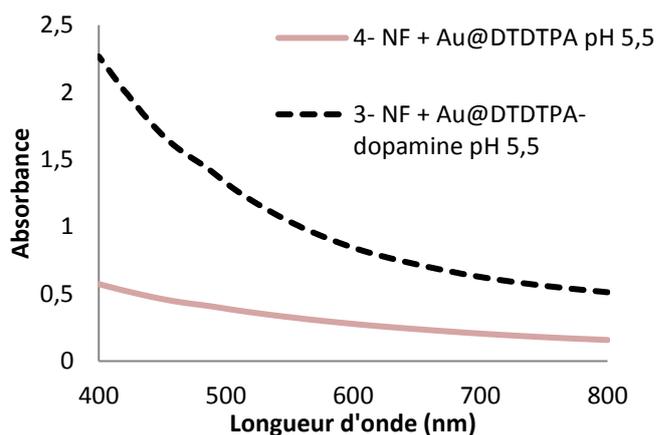


Figure 12. Spectre UV-visible des nanofleurs dorées à différents pH (5,5 ; 8 et au pH naturel).

D'après les spectres UV-visible, les suspensions de nanoparticules assemblées en présence de dopamine présentent quel que soit le pH une absorbance plus importante que dans le cas des assemblages réalisés avec des nanoparticules d'or dépourvues de dopamine. Comme la quantité de nanofleurs est identique dans tous les échantillons analysés, l'augmentation de l'absorbance est attribuée à l'augmentation du nombre de nanoparticules d'or greffées sur les nanofleurs. La fonctionnalisation des nanoparticules d'or par la dopamine permet donc de greffer un nombre plus important de nanoparticules d'or sur les nanofleurs. De plus la comparaison des spectres UV-visible des suspensions de nanofleurs dorées (figure 12) montre que

l'absorbance est plus forte à pH acide (5,5 et naturel ~ 5) qu'à pH alcalin (8). L'assemblage des nanofleurs et des nanoparticules d'or est donc beaucoup plus efficace lorsqu'il est réalisé à pH acide. Cette analyse fondée sur les spectres UV-visible révèle donc que les conditions les plus favorables pour réaliser l'assemblage nanofleurs-nanoparticules d'or sont rencontrées lorsque les nanoparticules d'or sont fonctionnalisées par la dopamine et lorsque le pH du mélange est acide (environ 5). L'analyse de ces spectres révèle un autre point important à souligner. Aucune bande plasmon n'est visible. Cette absence indique que les nanoparticules d'or restent individualisées après leur greffage sur les nanofleurs. Afin d'évaluer la quantité d'or rapportée au fer dans chaque échantillon, nous avons effectué des analyses ICP (Tableau 5).

Echantillons	Dopamine	Nombre de particules d'or/NF	pH	Rapport Au/Fer
1- NF-Au@DTDTPA	Avec	200	Naturel	94,74
2- NF-Au@DTDTPA	Sans	200	Naturel	18,65
3- NF-Au@DTDTPA	Avec	200	5,5	114,10
4- NF-Au@DTDTPA	Sans	200	5,5	20,66
5- NF-Au@DTDTPA	Avec	200	8	17,31
6- NF-Au@DTDTPA	Sans	200	8	7,13

Tableau 5. Résultats des analyses ICP effectuées sur les échantillons de nanofleurs dorées après purification (200 Au@DTDTPA/NF, avec et sans dopamine) à différent pH (pH naturel ; 5,5 ; 8).

Les résultats obtenus lors des analyses ICP montrent très clairement que le rapport Au/Fer est très important lorsqu'on utilise la dopamine et cela quel que soit le pH. On constate également que ce rapport est très élevé aux pH acides et surtout à pH 5,5. La présence de la dopamine permet donc l'augmentation du nombre de nanoparticules d'or/nanofleurs qui permet d'améliorer la stabilité colloïdale et donc ces données confortent nos hypothèses. Pour conclure, une quantité de 200 Au@DTDTPA/NF est une condition nécessaire pour pouvoir accrocher une centaine de nanoparticules d'or. De plus, pour réaliser le couplage l'utilisation de la dopamine est importante et le greffage doit être réalisé à pH acide (pH 5,5). Cependant, les nanofleurs dorées précipitent même dans les cas les plus favorables 10 jours seulement après synthèse. Ce manque de stabilité colloïdale nous a conduit à développer un troisième protocole.

Ce troisième protocole, reprend les conditions les plus favorables du protocole 2, à savoir une quantité de 200 nanoparticules d'or/nanofleurs, un couplage réalisé en présence de dopamine et à pH acide (pH 5,5). Ces conditions étant fixées, nous avons choisi d'étudier l'influence de la température. Le mélange réactionnel a été chauffé à 50°C pendant 24 heures (Tableau 6).

Echantillon	Dopamine	Nombre de particules d'or/NF	pH	Chauffage à 50°C	Cliché de l'échantillon	Rapport Au/Fer
1- NF-Au@DTDTPA	Avec	200	5,5	24 heures		50

Tableau 6. Conditions expérimentales du protocole 3 pour l'assemblage nanofleurs-nanoparticules d'or et résultats (cliché de l'échantillon et rapport Au/Fe par ICP).

D'après ce cliché on constate que les suspensions colloïdales de nanofleurs dorées sont bien redispersées et cela est dû à la présence d'un grand nombre de nanoparticules d'or par nanofleurs comme le confirme les résultats ICP. Bien que le rapport Au/Fe soit moins important que celui obtenu dans les conditions les plus favorables du protocole 2, la quantité d'or est suffisante pour assurer une bonne redispersion. Puisque les nanofleurs dorées obtenues par assemblage à 50°C de nanofleurs et de nanoparticules d'or fonctionnalisées par la dopamine sont bien redispersées, nous avons cherché à vérifier la stabilité colloïdale de cette suspension et son évolution dans le temps. Pour ce faire des mesures de spectrophotométrie UV-visible ont été réalisées (Figure 13).

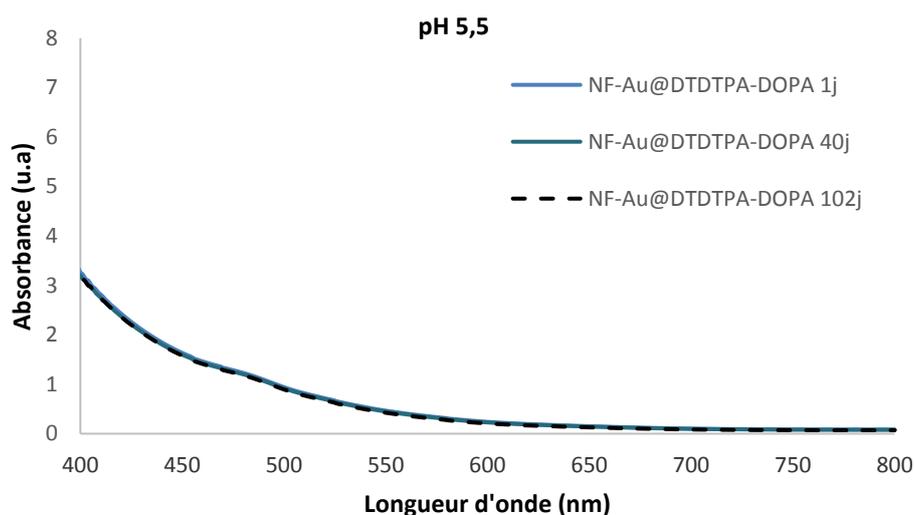


Figure 13. Spectre UV-visible d'une suspension de nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA-dopa) obtenues à 50°C.

Comme le montre la figure 13, les spectres UV-visible enregistrés à différents temps d'une suspension de nanofleurs dorées préparées selon les protocoles sont parfaitement superposées. Cela indique que la suspension ne subit pas de modification au cours du temps. Nous pouvons conclure que la stabilité colloïdale est garantie pendant plus de trois mois. La comparaison de l'évolution des potentiels zêta de nanofleurs et de nanofleurs dorées (en fonction du pH) permet d'expliquer ce regain de stabilité colloïdale des suspensions de nanofleurs dorées (Figure 14).

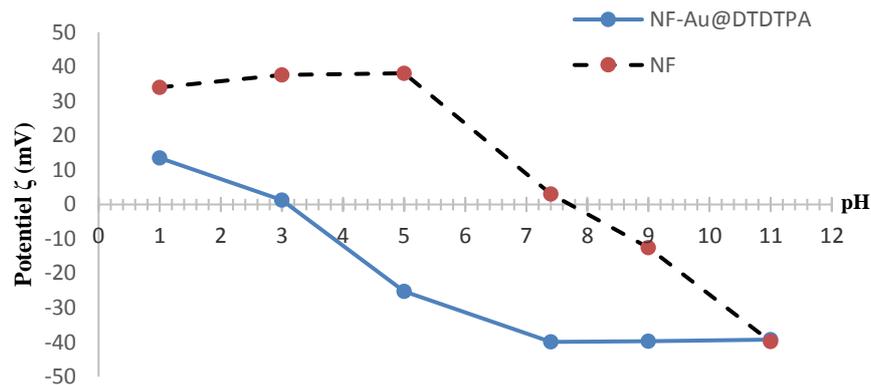


Figure 14. Superposition des potentiel zêta des nanofleurs et des nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA-dopa) à différents pH.

Quelle que soit le type de nanofleurs, le potentiel zêta est positif à pH acide puis négatif pour des valeurs plus élevées de pH. L'inversion de signe intervient à pH plus faible pour les nanofleurs dorées que pour les nanofleurs (sans nanoparticules d'or). Il en résulte que le potentiel zêta des nanofleurs dorées est fortement négatif à pH physiologique (pH = 7,4) alors que dans les mêmes conditions les nanofleurs sont caractérisées par une valeur proche de zéro. La forte valeur négative du potentiel zêta des nanofleurs dorées est à l'origine de l'amélioration de la stabilité colloïdale en raison des répulsions électrostatiques entre nanoparticules chargées négativement. Cette différence de potentiel zêta entre les nanofleurs dorées et les nanofleurs est attribuée au comportement des fonctions COOH de la couche organique des nanoparticules d'or accrochées aux nanofleurs. A pH basique, les fonctions COOH perdent leur proton pour donner la fonction carboxylate qui est chargée négativement.

Les nanofleurs dorées préparées selon le protocole 3 présentent une stabilité colloïdale supérieure à celle des nanofleurs dorées préparées selon le protocole 2 bien que le nombre de nanoparticules d'or qui semblent pourtant jouer un rôle prépondérant dans la stabilité colloïdale des suspensions soit plus faible. La seule différence entre ces 2 protocoles réside dans la température à laquelle a été effectué l'assemblage des nanofleurs et des nanoparticules d'or (20°C pour le protocole 2 contre 50°C pour le protocole 3). L'augmentation de la température conduit donc à une meilleure stabilité colloïdale.

Pour conclure, la condition la plus intéressante que nous garderons pour la suite de la thèse est celle du protocole 3 qui permet la formation de nanofleurs dorées par

assemblage de nanofleurs et de nanoparticules d'or fonctionnalisées par la dopamine (200 Au@DTDTPA/NF) à pH acide (5,5) et chauffé à 50°C pendant 24 heures.

2.5.4. Caractéristiques des nanofleurs dorées du protocole 3.

2.5.4.1. Distribution en taille

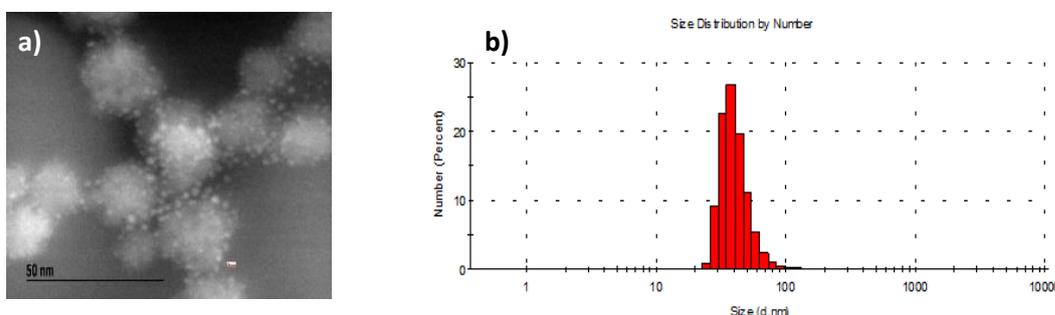


Figure 15. Image (Figure a) et diamètre hydrodynamique (Figure b) des nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA-dopa).

L'observation des nanofleurs dorées en MET révèle qu'il est difficile de mettre en évidence la présence des nanoparticules d'or sur les nanofleurs. La différence de contraste entre les nanoparticules d'or extrêmement petites (< 3 nm) et des nanofleurs beaucoup plus larges est trop faible. Pour cette raison, ces échantillons ont été imagés par microscope électronique à champ sombre annulaire (HAADF, high-angle annular dark-field imaging). Ce mode d'imagerie électronique est très sensible aux variations de numéro atomique des atomes composant l'échantillon. La nette différence entre le numéro atomique du fer ($Z = 26$) et celui de l'or ($Z = 79$) a permis de mieux distinguer les nanoparticules d'or en HAADF qu'en MET classique (Figure 15a). Sur les clichés HAADF, des structures aux contours irréguliers sont visibles. Elles sont couvertes de taches brillantes de taille nettement inférieure à celle de la structure irrégulière qui les porte. Ces petites taches ($\sim 2,6$ nm) sont identifiées aux nanoparticules d'or alors que les structures plus larges et aux contours irréguliers constituent les nanofleurs. Il est à souligner que les nanoparticules d'or conservent leur individualité (il n'y a pas d'agrégat visible sur les nanofleurs) et qu'il n'y a pas de nanoparticules d'or en dehors des nanofleurs. Ce dernier point indique que le greffage et la purification sont bien maîtrisés. Le diamètre moyen calculé à partir de 100 nanostructures hybrides est égale à 33 ± 2 nm. Le diamètre hydrodynamique des nanofleurs dorées qui a été également mesuré est quant à lui de 47 ± 1 nm (Figure 15b).

D'après la littérature (voir chapitre 1), ces particules sont trop larges pour une élimination rénale. Notre objectif qui consiste à mieux exploiter les propriétés radiosensibilisantes des nanoparticules d'or Au@DTDTPA ($D_h < 8$ nm) en retardant l'élimination rénale est donc partiellement atteint. En ayant réussi à immobiliser les nanoparticules Au@DTDTPA sur des nanofleurs dont les dimensions ne permettent pas l'élimination par voie rénale, nous pouvons espérer un temps de résidence vasculaire plus important lorsque les nanoparticules d'or sont greffées sur les nanofleurs. Comme ces nanofleurs qui jouent le rôle de transporteur sont biodégradables⁸, d'après les travaux de Florence Gazeau, cette large taille n'est pas

une contrainte à condition d'éviter l'opsonisation qui se traduit par une capture fulgurante dans le foie et rate des nanoparticules circulant dans le sang. D'autre part la dissolution des transporteurs devrait permettre l'élimination rénale des nanoparticules d'or qui serait alors seulement retardée.

2.5.4.2. Complexation par l'ion gadolinium (Gd^{3+})

Les travaux antérieurs de l'équipe NCM ont montré que les nanoparticules d'or ($Au@DTDTPA$) étaient parfaitement adaptées pour complexer le gadolinium. Il en résulte que ces nanoparticules ont pu être utilisées comme agents de contraste positif pour l'IRM. Malgré le greffage des nanoparticules $Au@DTDTPA$ sur les nanofleurs, leur capacité à immobiliser les ions Gd^{3+} est préservée. Les analyses ICP montrent que les ions Gd^{3+} sont présents dans l'échantillon après ajout d'une solution de $GdCl_3$ et purification (Tableau 7).

Echantillons	Dopamine	Nombre de particules d'or/NF	pH	Chauffage à 50°C	Rapport Au/Gd
NF-Au@DTDTPA-Gd	Avec	200	5,5	24 heures	4

Tableau 7. Données ICP des nanofleurs dorées après marquage par le gadolinium (NF-Au@DTDTPA-dopa (Gd)).

En raison de cette capacité à complexer l'ion gadolinium (Gd^{3+}), les nanofleurs dorées sont parfaitement adaptées pour une utilisation comme agent de contraste en IRM combinant imagerie pondérée T_1 et T_2 .

Comme les propriétés de la couche de ligands sont préservées, la complexation du technétium a été réalisée afin de suivre ces nanofleurs dorées par imagerie nucléaire (TEMP).

2.5.4.3 Radiomarquage par le technétium

Le radiomarquage par le technétium (^{99m}Tc) est souvent utilisé pour le diagnostic en clinique, en raison de sa facilité d'obtention à partir d'un générateur $^{99}Mo/^{99m}Tc$ disponible dans le commerce. Cet émetteur de photons γ a une durée de vie courte ($t_{1/2} = 6,02$ h) qui permet une administration de dose de rayonnement suffisante sans trop exposer le patient.

La couche de ligands (DTDTPA) permet d'immobiliser des radioéléments tel que le technétium (^{99m}Tc) obtenu en réduisant ($^{99m}TcO_4^-$) par $SnCl_2$ ⁶. Le radiomarquage des nanoparticules $Au@DTDTPA$ par le technétium (^{99m}Tc) a permis d'étudier la biodistribution des nanoparticules d'or. Cette étude a clairement mis en évidence l'élimination rénale des nanoparticules d'or $Au@DTDTPA$ ⁶.

La pureté radiochimique des nanofleurs dorées radiomarquées a été déterminée par sur CCM qui permet de quantifier la radioactivité de chacune des espèces en comparant les rapports frontaux des espèces technetiées.

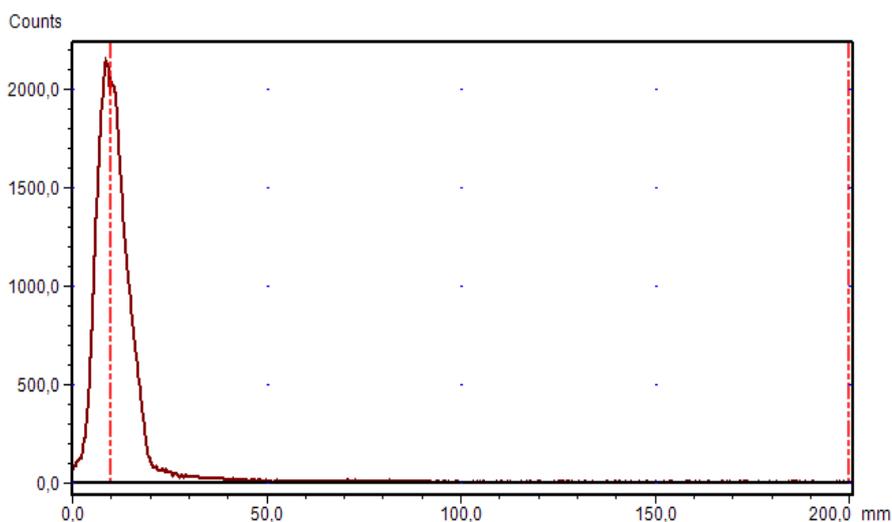


Figure 16. Radiochromatogramme des nanofleurs dorées radiomarquées par le technétium (^{99m}Tc).

Ce radiochromatogramme montre clairement l'absence de technétium libre. Les nanoparticules radiomarquées au ^{99m}Tc (NF-Au@DTDTPA(Tc)) et le technétium réduit non complexé (TcO_2) sont restés à l'origine alors que le pertechnétate libre (TcO_4^-) a migré avec le front du solvant. Nous avons cherché un système pour déterminer le pourcentage de technétium réduit mais aucune des conditions de CCM testées (11 conditions) n'a permis de séparer le technétium réduit et les nanoparticules radiomarquées (NF-Au@DTDTPA(Tc)). La détermination du technétium réduit (TcO_2) a été réalisée sur une petite partie de chaque radiomarquage par filtration à travers un filtre Millex-GV de $0,22\ \mu\text{m}$ (Merck Millipore, Irlande). Le technétium réduit (TcO_2) est retenu sur la membrane. La filtration des produits radiomarqués a montré la présence de 5% de technétium réduit pour les nanofleurs dorées radiomarquées (NF-Au@DTDTPA(Tc)) et donc la pureté radiochimique est de 95% (Figure 16).

La filtration des nanofleurs et des nanoparticules d'or Au@DTDTPA radiomarquées a montré la présence de 0,5% et 2,9% de technétium réduit et donc les puretés radiochimiques sont respectivement de 99,5% et de 97,1% (Figure 17).

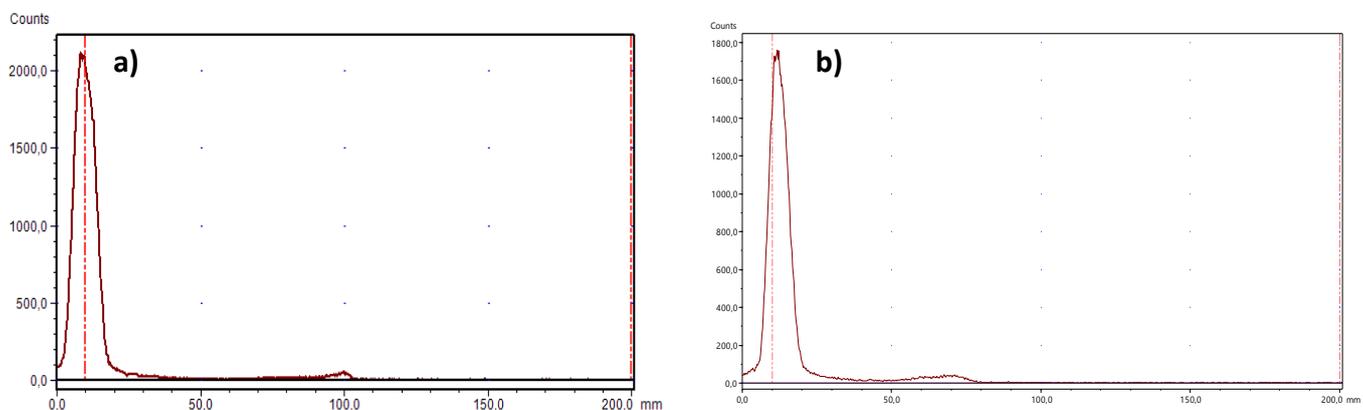


Figure 17. Radiochromatogrammes des nanofleurs (a) et des nanoparticules d'or (b) radiomarquées par le technétium (^{99m}Tc).

2.6. Conclusion partielle

Différents protocoles et modes opératoires ont été développés afin de greffer les nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) sur les nanofleurs d'oxyde de fer (γ -Fe₂O₃) pour former des nanofleurs dorées. Les nanofleurs dorées préparées dans les conditions optimales (200 Au@DTDTP fonctionnalisées par la dopamine par NF, pH acides et assemblage à 50°C pendant 24h) présentent une taille globale de 35 nm, un diamètre hydrodynamique autour de 48 nm et un potentiel zêta fortement négatif à pH physiologique (7,4).

Il en résulte une stabilité colloïdale considérablement améliorée contrairement aux nanofleurs. Les nanofleurs dorées forment des suspensions aqueuses stables pendant au moins trois mois. Cette caractéristique cruciale pour des applications en milieu biologique s'explique par la présence de la couche organique (DTDTPA) autour des nanoparticules d'or. Cette couche remplit une autre fonction qui permet d'élargir avantageusement la palette de propriétés et donc d'applications des nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA).

En raison de la capacité du ligand (DTDTPA) à former des complexes stables avec le gadolinium (Gd³⁺) et certains radioéléments, il est possible d'immobiliser des ions gadolinium (Gd³⁺) et le technétium (^{99m}Tc⁴⁺) sur les nanofleurs dorées. Comme ses ions présentent un intérêt pour l'imagerie médicale (IRM avec Gd³⁺ et TEMP avec ^{99m}Tc⁴⁺), nous espérons pouvoir suivre ces nanofleurs dorées par IRM pondérée T₁ et par TEMP en complément de l'IRM pondérée T₂ rendue possible par les propriétés superparamagnétiques des NF de maghémite.

Références

1. Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P. & Benoit, J.-P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* **27**, 4356–4373 (2006).
2. Otsuka, H., Nagasaki, Y. & Kataoka, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 403–419 (2003).
3. Faure, A.-C. *et al.* Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* **5**, 2565–2575 (2009).
4. Debouttière, P.-J. *et al.* Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. *Adv. Funct. Mater.* **16**, 2330–2339 (2006).
5. Arifin, D. R. *et al.* Trimodal gadolinium-gold microcapsules containing pancreatic islet cells restore normoglycemia in diabetic mice and can be tracked by using US, CT, and positive-contrast MR imaging. *Radiology* **260**, 790–798 (2011).
6. Alric, C. *et al.* The biodistribution of gold nanoparticles designed for renal clearance. *Nanoscale* **5**, 5930–5939 (2013).
7. Lartigue, L. *et al.* Cooperative Organization in Iron Oxide Multi-Core Nanoparticles Potentiates Their Efficiency as Heating Mediators and MRI Contrast Agents. *ACS Nano* **6**, 10935–10949 (2012).
8. Javed, Y. *et al.* Biodegradation Mechanisms of Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers and Tunable Shield Effect of Gold Coating. *Small* **10**, 3325–3337 (2014).
9. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55–75 (1951).
10. Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature* **241**, 20–22 (1973).
11. Slot, J. W. & Geuze, H. J. *Eur. J. Cell Biol.* **38**, 87–93 (1985).
12. Giersig, M. & Mulvaney, P. Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition. *Langmuir* **9**, 3408–3413 (1993).

13. Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Whyman, R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 801–802 (1994).
14. Brust, M., Fink, J., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Kiely, C. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1655–1656 (1995).
15. Laurent, S. *et al.* Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **108**, 2064–2110 (2008).
16. Salunkhe, A. B., Khot, V. M. & Pawar, S. H. Magnetic hyperthermia with magnetic nanoparticles: a status review. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 572–594 (2014).
17. Wu, W., He, Q. & Jiang, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Res. Lett.* **3**, 397–415 (2008).
18. Reetz, M. T., Helbig, W. & Quasick, S. A. Active Metals, Preparation, Characterization, Applications. in (1996).
19. C. Pascal, J. L. Pascal, and, Favier, F., Moubtassim, M. L. E. & Payen, C. Electrochemical Synthesis for the Control of γ -Fe₂O₃ Nanoparticle Size. Morphology, Microstructure, and Magnetic Behavior. (1998).
20. Khan, H. R. & Petrikowski, K. Anisotropic structural and magnetic properties of arrays of Fe₂₆Ni₇₄ nanowires electrodeposited in the pores of anodic alumina. *J. Magn. Magn. Mater.* **215–216**, 526–528 (2000).
21. Merikhi, J., Jungk, H.-O. & Feldmann, C. Sub-micrometer CoAl₂O₄ pigment particles – synthesis and preparation of coatings. *J. Mater. Chem.* **10**, 1311–1314 (2000).
22. Laurent, S. *et al.* Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, Muller RN Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev* 108:2064–2110. **110**, (2008).

23. Hugounenq, P. *et al.* Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers for Highly Efficient Magnetic Hyperthermia. *J. Phys. Chem. C* **116**, 15702–15712 (2012).
24. Caruntu, D. *et al.* Synthesis of Variable-Sized Nanocrystals of Fe₃O₄ with High Surface Reactivity. *Chem. Mater.* **16**, 5527–5534 (2004).
25. Brust, M., Fink, J., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Kiely, C. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1655–1656 (1995).
26. Xie, J. *et al.* Linking Hydrophilic Macromolecules to Monodisperse Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles via Trichloro-s-triazine. *Chem. Mater. Publ. Am. Chem. Soc.* **18**, 5401–5403 (2006).
27. Xie, J. *et al.* Ultrasmall c(RGDyK)-coated Fe₃O₄ nanoparticles and their specific targeting to integrin $\alpha(v)\beta_3$ -rich tumor cells. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 7542–7543 (2008).
28. Xu, C. *et al.* Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9938–9939 (2004).
29. Gu, H., Yang, Z., Gao, J., Chang, C. K. & Xu, B. Heterodimers of Nanoparticles: Formation at a Liquid–Liquid Interface and Particle-Specific Surface Modification by Functional Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 34–35 (2005).
30. Hazari, P. P. *et al.* Synthesis of Specific SPECT-Radiopharmaceutical for Tumor Imaging Based on Methionine: ^{99m}Tc-DTPA-bis(methionine). *Bioconjug. Chem.* **21**, 229–239 (2010).
31. Park, J.-A. *et al.* Heteronuclear Gd-^{99m}Tc Complex of DTPA-Bis(histidylamide) Conjugate as a Bimodal MR/SPECT Imaging Probe. *ACS Med. Chem. Lett.* **3**, 299–302 (2012).

Chapitre 3. Amélioration de l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'or.....	101
3.1. Introduction	101
3.2. Protocole expérimental	102
3.2.1. Imagerie par résonance magnétique (IRM)	102
3.2.2. Imagerie nucléaire (TEMP/CT) et scintigraphie	103
3.2.3. Etude du caractère radiosensibilisant des NF dorées	106
3.3. Résultats et discussions	109
3.3.1. Rétention des nanofleurs dorées dans la tumeur	109
3.3.2. Etude de la croissance tumorale	111
3.3.3. La biodistribution des nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA) après injection intraveineuse	114
3.3.4. Etude comparative de l'effet radiosensibilisant des nanofleurs dorées après injection IV	118
3.4. Conclusion partielle	122
Références.....	123

Chapitre 3. Amélioration de l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'or

3.1. Introduction

D'après les travaux réalisés par l'équipe NCM, les nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) sont très efficaces pour la radiosensibilisation guidée par imagerie ^{1,2}. Néanmoins leur potentiel est sous-exploité en raison d'une élimination rénale trop rapide qui limite leur accumulation dans la zone d'intérêt (tumeur solide) à traiter.

Pour pallier cette limitation, plusieurs pistes sont en cours d'exploitation. Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous avons opté pour le greffage de ces nanoparticules d'or sur des nanofleurs de maghémite qui en plus de jouer le rôle de transporteur devraient conférer à la nanostructure (NF-Au@DTDTPA) un comportement d'agent de contraste négatif pour l'IRM et d'agent chauffant pour l'hyperthermie magnétique ³.

Après avoir montré dans le chapitre 2 qu'il était possible de contrôler l'assemblage entre nanofleurs et nanoparticules d'or pour former des nanostructures hybrides, des nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA), nous nous sommes consacrés à l'étude comparative de leur biodistribution et de leur potentiel radiosensibilisant après injection intratumorale à des souris porteuses de mélanome (A375) et injection intraveineuse à des rats porteurs de gliosarcome 9L.

3.2. Protocole expérimental

3.2.1. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM permet un suivi de la biodistribution et de l'accumulation des nanoparticules dans la tumeur. Cette dernière permet également de déterminer le moment opportun pour activer le traitement thérapeutique.

3.2.1.1. Appareillage

Les expériences d'imagerie par résonance magnétique nucléaire ont été réalisées au GIN de Grenoble ⁴ à l'aide d'un appareil de marque Bruker Biospec 70/20 USR AVIII. Ce dernier est doté d'un système horizontal à haut-champ (7 T), d'un aimant de 200 mm de diamètre interne, ainsi qu'un fourreau de gradients de 120 mm et d'amplitude 600 mT/m (Figure 1).



Figure 1. Cliché photographique de l'appareil utilisé en IRM.

3.2.1.2. Animaux et anesthésie

L'implantation d'une tumeur de type gliosarcome 9L a été réalisée par injection de cellules de gliosarcome 9L dans l'hémisphère droit du cerveau de rats mâles Fisher dix jours avant les expériences d'imagerie.

Les animaux ont été anesthésiés par injection d'un mélange de xylazine/kétamine (64,5/5,4 mg. kg⁻¹) par voie péritonéale.

Une vérification de la présence et de l'emplacement de la tumeur a été réalisée en imagerie T₂ avant l'injection des agents de contraste.

Le suivi de la biodistribution a été réalisé sur les rats porteurs de gliosarcome 9L après injection de NF dorées (NF-Au@DTDTPA(Gd)), de NF et de nanoparticules d'or (Au@DTDTPA)(Gd) au niveau de la veine saphène. Les concentrations et volumes d'injection pour les NF dorées, les NF et les nanoparticules d'or étaient respectivement (1 mL ; 183 mM en fer ; 10 mM en Au ; 1 mM en Gd³⁺), (1 mL, 250 mM en fer) et (0,7 mL ; 45 mM en Au ; 5 mM en Gd³⁺).

3.2.1.3. Nanoparticules et imagerie *in vivo*

Les nanoparticules d'or ont été préalablement complexées par l'ion gadolinium (Au@DTDTPA(Gd)) afin de suivre leur biodistribution en imagerie pondérée T_1 grâce à l'ion métallique (Gd^{3+}) qui est un agent de contraste paramagnétique ⁵.

Les nanofleurs d'oxyde de fer ont été suivies en imagerie pondérée T_2 en raison de leur propriété superparamagnétique.

Le suivi en IRM des nanofleurs dorées a été réalisé en imagerie T_2 en raison de la présence des nanofleurs d'oxyde de fer qui sont magnétiques, mais aussi en imagerie pondérée T_1 grâce aux nanoparticules d'or préalablement marquées par les ions gadolinium (Gd^{3+}).

Pour suivre l'évolution et le devenir des nanoparticules dans le corps (cerveau et reins), des acquisitions ont été réalisées à des temps différents après l'injection par voie intraveineuse.

Le premier suivi a été réalisé entre 0 et 15 minutes après injection, puis 1h après injection pour imager le cerveau. Les reins ont été imagés 2h30-3h après l'injection des nanoparticules.

Deux autres acquisitions ont été lancées à 5h et 6h après injection pour un suivi au niveau du cerveau et dans les reins. La dernière image du cerveau est obtenue 24h après injection des nanoparticules.

3.2.2. Imagerie nucléaire (TEMP/CT) et scintigraphie

Afin de compléter les données collectées par IRM, la biodistribution des nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA) a été suivie par imagerie nucléaire.

3.2.2.1. Imagerie TEMP/CT

3.2.2.1.1. Appareillages

Les expériences d'imagerie TEMP/CT ont été réalisées sur la plateforme GAIA de Grenoble. Cette dernière est équipée d'un appareil de marque Mediso nanoscan combinant TEMP et CT et de collimateurs multi-pinholes permettant de réaliser des acquisitions rapides de corps entier avec une très haute résolution (0,5 mm). Pour le comptage γ de la radioactivité un appareil de marque WIZARD 2480 a été utilisé (Figures 2 et 3).



Figure 2. Cliché photographique de l'imager TEMP/CT de la plateforme GAIA.

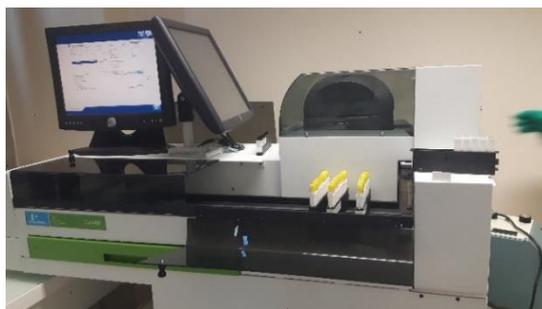


Figure 3. Cliché photographique du compteur gamma de la plateforme GAIA.

3.2.2.1.2. Animaux et anesthésie

L'implantation d'une tumeur de type gliosarcome 9L a été réalisée par injection de cellules de gliosarcome 9L dans l'hémisphère droit du cerveau de rats mâles Fisher dix jours avant les expériences d'imagerie.

Les animaux ont été anesthésiés par injection d'un mélange de xylazine/kétamine (64,5/5,4 mg. kg⁻¹) par voie péritonéale.

Avant d'effectuer l'imagerie nucléaire, la présence de la tumeur a été vérifiée par IRM pondérée T₁ après injection intraveineuse du DOTAREM (150 µL à 0,5 mM).

3.2.2.1.3. Nanoparticules et imagerie *in vivo*

Les nanofleurs dorées, les nanoparticules d'or et les nanofleurs de maghémite ont été préalablement radiomarquées par le technétium (^{99m}Tc) selon le protocole décrit dans le chapitre 2 paragraphe (2.3.7).

Après l'injection des nanoparticules radiomarquées au niveau de la veine caudale, le suivi de la biodistribution a été réalisé par imagerie TEMP/CT à différents temps entre (t₀ et t₀+24h).

Les acquisitions ont été réalisées au moment de l'injection des nanoparticules (à t₀), trois heures (t₀ + 3h) et vingt-quatre heures (t₀+24h) après injection (Tableau 1).

	Paramètres d'acquisitions	Durée
TEMP/CT1 (t ₀)	<ul style="list-style-type: none"> - 40 secondes /Projection (1^{er} scan TEMP) - 40 secondes /Projection (2nd scan TEMP) - 30 secondes /Projection (3^{eme} scan TEMP) <ul style="list-style-type: none"> - 480 projections (scan CT) 	<ul style="list-style-type: none"> - 15 min (1^{er} scan TEMP) - 15 min (2nd scan TEMP) - 10 min (3^{eme} scan TEMP) - 300 ms (scan CT)
TEMP/CT2 (t ₀ +3h)	<ul style="list-style-type: none"> - 120 secondes /Projection (scan TEMP) <ul style="list-style-type: none"> - 480 projections (scan CT) 	<ul style="list-style-type: none"> - 40 min (scan TEMP) - 300 ms (scan CT)
TEMP/CT3 (t ₀ +24h)	<ul style="list-style-type: none"> - 60 secondes /Projection (scan TEMP) <ul style="list-style-type: none"> - 480 projections (scan CT) 	<ul style="list-style-type: none"> - 20 min (scan TEMP) - 300 ms (scan CT)

Tableau 1. Les paramètres d'acquisition de l'imagerie TEMP/CT.

3.2.2.1.4. Etude *ex vivo* de la biodistribution

Après les expériences d'imagerie nucléaire, les animaux ont été euthanasiés par injection du pentobarbital.

Différents organes (foie, rate, muscle, hémisphère gauche du cerveau (sans tumeur), hémisphère droit du cerveau (avec tumeur), rein, sang, poumon et intestin) ont été prélevés et mis dans des tubes pesés avant et après l'ajout des organes.

Ces derniers ont été stockés dans un congélateur, après avoir effectué un comptage γ de leur radioactivité.

3.2.2.1.5. Dosage post-mortem de l'or et du fer dans les organes

Les organes ont été minéralisés afin de doser les quantités d'or et de fer contenus dans chaque organe. Un volume adéquat d'eau régale (1/3 HNO₃ et 2/3 HCl) a été ajouté dans les tubes contenant les organes disséqués et le sang prélevé. Ensuite ces derniers ont été dosés par ICP.

3.2.2.2. Imagerie scintigraphique

3.2.2.2.1. Appareillage

Les expériences d'imagerie nucléaire planaire ont été menées à Dijon en collaboration avec le CGFL (Centre George François Leclerc).

3.2.2.2.2. Animaux et anesthésie

Une tumeur de type mélanome a été implantée sur des souris par injection sous cutanée de cellules A375 sur la patte postérieure droite cinq semaines avant les

expériences d'imagerie nucléaire. Avant d'effectuer l'imagerie, les animaux ont été anesthésiés avec un mélange de xylamine/kétamine (64,5/5,4 mg. Kg⁻¹) par voie péritonéale.

3.2.2.2.3. Nanoparticules et imagerie *in vivo*

Les nanoparticules d'or et les nanofleurs dorées ont été préalablement radiomarquées par l'indium (¹¹¹In). Ces derniers ont été ensuite injectés aux animaux par voie intratumorale avant de réaliser les expériences d'imagerie. Une image a été enregistrée vingt-quatre heures (24h) après l'injection des nanoparticules (Au@DTDTPA(In)) et NF-Au@DTDTPA(In)).

3.2.2.2.4. Etude *ex vivo* de la biodistribution

Après les expériences d'imagerie, les animaux ont été sacrifiés par euthanasie.

Les organes d'intérêt (foie, rate, muscle, hémisphère droit du cerveau (avec tumeur), hémisphère gauche du cerveau (cerveau sain), reins, poumons et intestins) ont été prélevés pour un comptage de la radioactivité γ .

3.2.3. Etude du caractère radiosensibilisant des NF dorées

3.2.3.1. Etude du caractère radiosensibilisant des NF dorées après injection intratumorale

La première étape a été d'étudier le caractère radiosensibilisant des NF dorées en injectant les nanoparticules par voie intratumorale pour s'affranchir des problèmes de biodistribution.

3.2.3.1.1. Appareillage

Les expériences de radiothérapie par microfaisceau ont été réalisées sur la ligne biomédicale ID17 de l'ESRF de Grenoble.

La radiothérapie par microfaisceau (MRT) utilise des rayons X émis tangentiellement à partir d'électrons de haute énergie circulant dans un anneau de stockage. Le spectre des rayonnement photoniques présente une gamme d'énergie assez large (10 keV – 250 keV) avec un maximum à 90 keV.

Les faisceaux issus de la source sont fractionnés en microfaisceaux grâce à un collimateur multi-taille réglable. Ces derniers prennent une allure en forme de « peigne » séparé d'une largeur de 200 μm entre les faisceaux et chaque faisceau mesure 50 μm .

Ce collimateur est positionné à 33 m de la source de photons et 80 cm en amont de la tête des animaux⁶ (Figure 4).

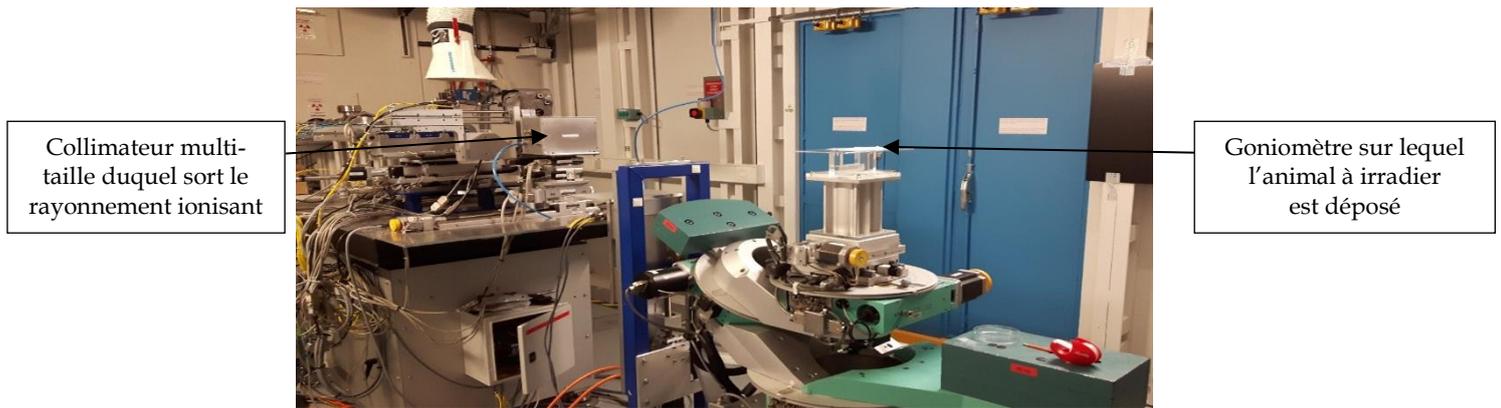


Figure 4. Cliché photographique de la plateforme pour la radiothérapie par microfaisceau (MRT).

3.2.3.1.2. Inoculation de la tumeur épidermique de type mélanome (A375 sc) et anesthésie des animaux

Les cellules d'une tumeur de type mélanome (A375 sc) ont été implantées sur une des pattes postérieures de souris cinq semaines avant les expériences de thérapie.

3.2.3.1.3. Nanoparticules et irradiation des animaux

Après l'anesthésie des animaux par injection d'un mélange xylazine/kétamine (64,5/5,4 mg.kg⁻¹), des NF dorées (50 µL, ~ 625 mM en fer et 30 mM en Au), des nanoparticules d'or (50 µL, ~ 30 mM en Au) et des nanofleurs (50 µL, ~ 625 mM en fer) ont été injectées par voie intratumorale.

Les animaux ont été positionnés sur une plateforme motorisée qui permet de déplacer les souris par rapport au faisceau. Ces dernières ont été irradiées par deux faisceaux perpendiculaires (de l'avant vers l'arrière de la patte et de la droite vers la gauche de la patte) avec des doses de 2x400 Gray en pic et 2x20 Gray en vallée (Figure 5).

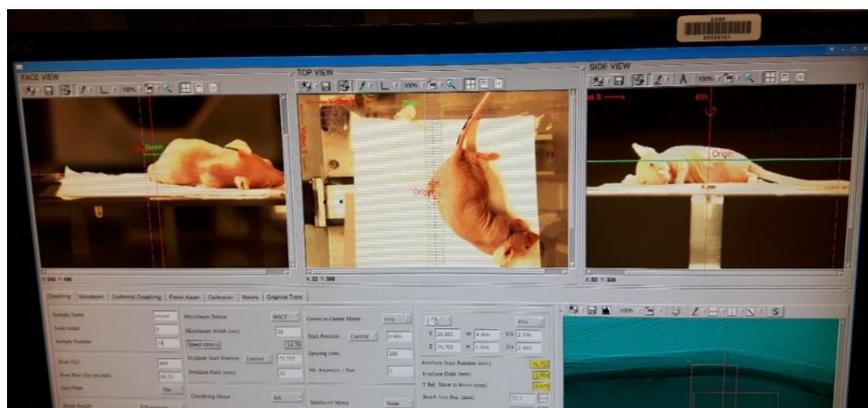


Figure 5. Cliché photographique du positionnement des animaux lors de l'irradiation par MRT.

Pour cette expérience, nous avons cinq groupes d'animaux dont deux groupes « contrôle ». Le premier groupe « contrôle » concerne des rats qui n'ont été soumis à

aucun traitement (pas d'injection de nanoparticule, pas d'irradiation) et le second groupe rassemble les rats qui ont reçu une injection de nanoparticules mais qui n'ont pas été traités par irradiation. Les trois autres groupes d'animaux ont été traité par MRT. Le premier groupe a été traité sans injection de nanoparticules, le second groupe a été traité par MRT après injection de nanoparticules d'or et le dernier a été traité par MRT après injection de NF dorées (Tableau 2).

Groupes	Au@DTDTPA	NF-Au@DTDTPA	MRT
1			
2			
3			
4			
5			

Tableau 2. Le traitement des cinq groupes de rats porteurs de mélanome (A375 sc).

3.2.3.2. Etude du caractère radiosensibilisant des NF dorées après injection intraveineuse

L'effet radiosensibilisant des NF dorées a également été évalué après injection par voie intraveineuse. Ce mode d'administration permet d'atteindre les tumeurs profondes.

3.2.3.2.1. Implantation de la tumeur cérébrale (gliosarcome 9L) et anesthésie des animaux

Des cellules gliosarcome 9L ont été implantées dans l'hémisphère droit du cerveau de rats mâles Fisher 344 afin d'initier la croissance d'une tumeur.

Brièvement, les animaux anesthésiés ont été placés sur un cadre stéréotaxique et 10^4 cellules de gliosarcome 9L en suspension dans 1 μ L de milieu de culture avec des antibiotiques ont été injectées dans l'hémisphère droit du cerveau ⁷.

3.2.3.2.2. Nanoparticules et irradiation des animaux

Des NF dorées (0,9 mL ; \sim 183 mM en fer et 10 mM en Au), des nanoparticules d'or (0,7 mL ; \sim 15 mM en Au) et des nanofleurs (1 mL ; \sim 183 mM en fer) ont été injectées à des rats porteurs de gliosarcome 9L par voie intraveineuse et sous anesthésie.

Dix jours après l'implantation de la tumeur, les animaux des groupes 2-5 sont soumis à un traitement (Tableau 3). Ils sont au préalable anesthésier avec 5% d'isoflurane puis par injection d'un mélange xylazine/kétamine (64,5/5,4 mg.kg⁻¹) par voie péritonéale pour maintenir l'anesthésie.

Les animaux ont été répartis en cinq groupes, à savoir deux groupes « contrôle » avec et sans traitement par MRT, et trois autres groupes traités par MRT dix minutes après injection de NF dorées, de nanoparticules d'or et de nanofleurs.

Groupes	Au@DTDTPA	NF	NF-Au@DTDTPA	MRT
1				
2				
3				
4				
5				

Tableau 3. Le traitement des cinq groupes de rats porteurs de gliosarcome 9L.

Avant d'être irradiés, les rats porteurs de gliosarcome 9L ont été positionnés et immobilisés sur une plateforme motorisée qui permet de déplacer les animaux par rapport au faisceau. Il a ainsi été possible de traiter les animaux par deux irradiations perpendiculaires (de l'avant vers l'arrière du crâne et de la droite vers la gauche du crâne). Les doses de rayonnement étaient de 2x400 Gray en pic et 2x20 Gray en vallée. Un film radiochromique (Gafchromic, HD-810) a été placé entre le collimateur multifente et le crâne des animaux pour s'assurer de la qualité de l'irradiation⁸.

3.3. Résultats et discussions

3.3.1. Rétention des nanofleurs dorées dans la tumeur

Le greffage des nanoparticules d'or sur les nanofleurs a été réalisé dans le but de ralentir l'élimination rénale et de favoriser l'accumulation dans les tumeurs. Afin de vérifier que cette stratégie conduit à une meilleure rétention des nanoparticules, nous avons effectué en collaboration avec la plateforme d'imagerie nucléaire du CGFL une étude comparative du devenir des nanofleurs dorées et des nanoparticules d'or 24 h après injection intratumorale dans une tumeur sous cutanée (mélanome A375 sc). Après radiomarquage par l'indium (¹¹¹In), des images de scintigraphie planaire ont été enregistrées 24h après l'injection IT puis la radioactivité de chaque organe a été mesurée par comptage gamma après sacrifice des animaux. Les clichés scintigraphiques montrent clairement que les nanofleurs dorées et les nanoparticules d'or se comportent différemment. Contrairement aux souris ayant reçu une dose de nanoparticules d'or, les souris dont la tumeur renferme des nanofleurs dorées présentent une radioactivité supérieure 24h après l'injection IT. La radioactivité est essentiellement localisée dans la tumeur et le foie lorsque les nanofleurs dorées ont été injectées alors que dans le cas des nanoparticules d'or radiomarquées, la radioactivité est plus faible au niveau de la tumeur et du foie (Figure 6).

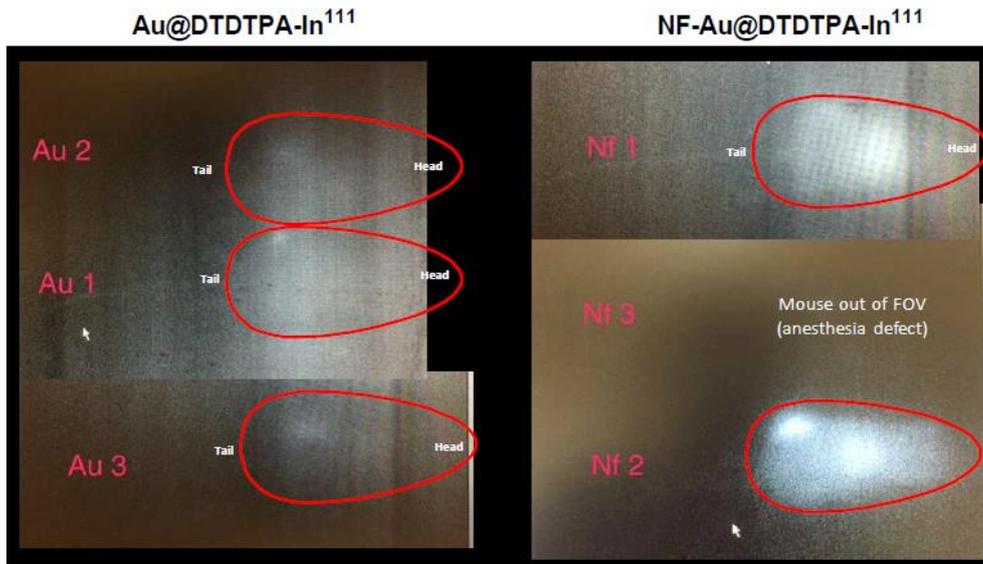


Figure 6. Clichés scintigraphiques de petits animaux ayant reçu une injection de nanoparticules d'or (clichés de gauche) et des nanofleurs dorées (clichés de droite) préalablement radiomarquées par l'indium 111 (^{111}In).

La présence de la radioactivité dans la tumeur et le foie est confirmée par le comptage gamma post-mortem des organes. Ce comptage montre en outre que les nanoparticules sont également présentes dans les reins. En revanche la radioactivité mesurée dans la rate, les poumons, les muscles et le cerveau est au moins dix fois inférieures à celle mesurée dans la tumeur, les reins ou le foie. La comparaison des résultats du comptage gamma indique que la radioactivité est plus importante dans la tumeur, les reins et le foie lorsque les nanofleurs dorées ont été injectées (Figure 7).

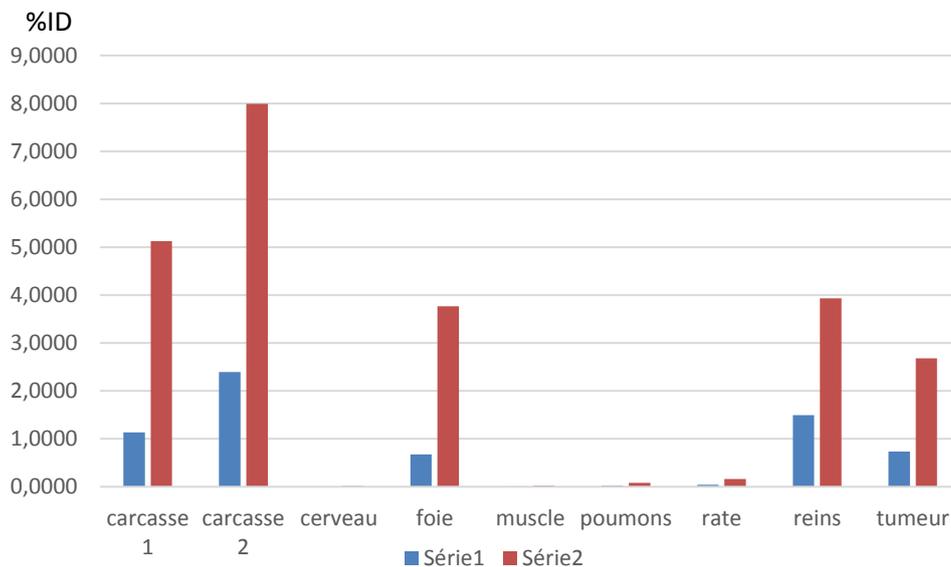


Figure 7. Biodistribution des nanoparticules d'or (rectangle bleu) et des nanofleurs dorées (rectangle rouge) préalablement radiomarquées par l'indium 24h après injection IT.

De ces deux données nous pouvons déduire deux informations essentielles. La première concerne la fuite des nanoparticules d'or et des nanofleurs dorées. Ces particules ne restent pas cantonnées à la zone d'injection car une part non négligeable

de ces nanoparticules est retrouvée en dehors de la tumeur, dans les reins et le foie. C'est le signe que ces nanoparticules parviennent à s'échapper de la zone tumorale via la circulation sanguine. Il est intéressant de noter que les nanofleurs dorées plus volumineux que les nanoparticules d'or (D_h (NF-Au@DTDTPA) = 48 nm contre 7 nm pour Au@DTDTPA) sont plus retenues dans les reins et le foie. La deuxième information fournie par cette étude comparative concerne la rétention des nanofleurs dorées. Les clichés de scintigraphie et le comptage gamma de la tumeur montrent que les nanofleurs dorées sont plus retenues dans la tumeur que les nanoparticules d'or. Ce constat confirme l'intérêt de greffer les nanoparticules d'or sur les nanofleurs.

Bien que les nanoparticules d'or soient moins retenues dans la tumeur, leur quantité dans les reins, le foie et le reste de la carcasse est plus faible que celle des nanofleurs dorées. Une grande quantité de nanoparticules d'or ont donc été éliminées de l'organisme comme le confirme la figure 8.

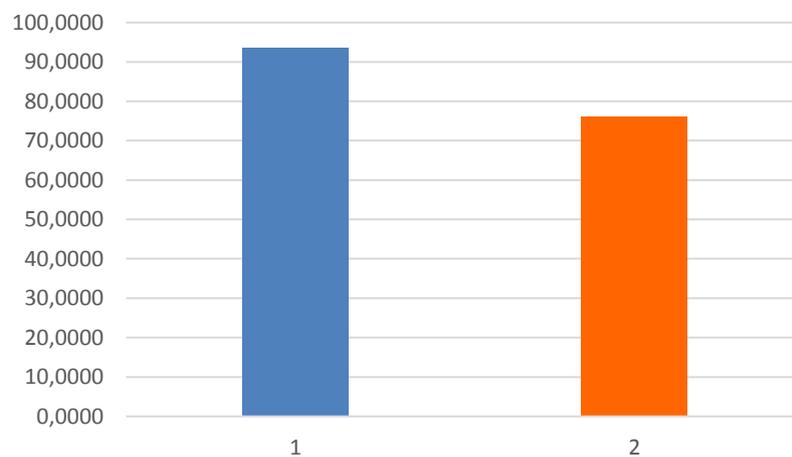


Figure 8. Elimination des nanofleurs dorées (rectangle orange) et des nanoparticules d'or (rectangle bleu) préalablement radiomarquées par l'indium.

Une telle différence s'explique par une plus grande efficacité d'élimination des nanoparticules d'or par la voie rénale. Cette expérience de scintigraphie planaire et de comptage gamma montre que les nanofleurs dorées sont mieux retenues dans la tumeur et semblent plus difficiles à éliminer par voie rénale. Ces résultats sont extrêmement encourageants car ils montrent que le greffage des nanoparticules d'or sur les nanofleurs constitue une stratégie pertinente pour mieux exploiter le potentiel radiosensibilisant des nanoparticules d'or.

3.3.2. Etude de la croissance tumorale

La meilleure rétention tumorale des nanofleurs dorées révélée par le suivi en imagerie nucléaire et le comptage gamma (3.3.1) devrait se traduire par un meilleur contrôle de la croissance tumorale lorsque les tumeurs sont irradiées 24h après l'injection IT. Afin

de le vérifier, l'évolution du volume tumoral a été comparée entre différents groupes ayant été soumis à des traitements.

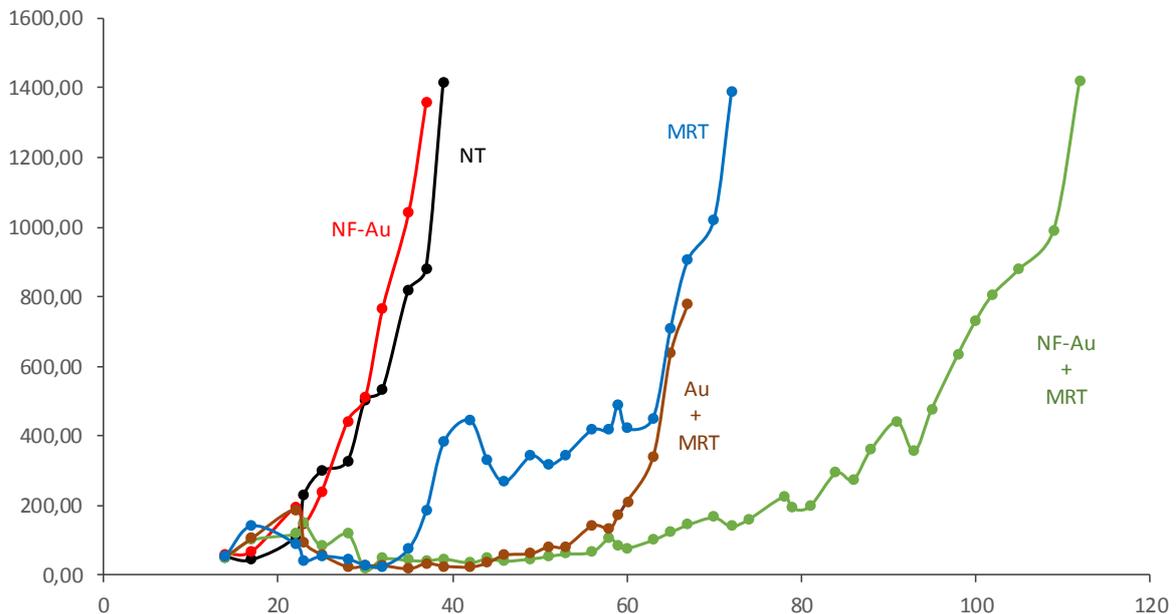


Figure 9. Suivi de la croissance de tumeur A375 implantée en sous-cutanée à des souris : non traité (en noire), traité seulement par injection IT de NF dorées (en rouge), traité uniquement par MRT (en bleu), traité par MRT après injection IT de NF dorées (en vert), traité par MRT après injection IT de nanoparticules d'or (en marron).

La figure 9 qui rassemble les courbes de croissance tumorale pour chaque groupe met en évidence que les nanofleurs dorées n'ont ni d'effet toxique, ni d'effet chimiothérapeutique car l'évolution de la tumeur parmi les souris du groupe 2 (injection IT de NF-Au@DTDTPA sans MRT) est très semblable à celle des animaux non traités (groupe 1). Pour ces deux groupes témoins (1 et 2), la croissance de la tumeur est très rapide, ce qui réduit la survie des animaux porteurs de mélanome dont la médiane de survie (MeST = 42 j et 38 j respectivement pour le groupe 1 et 2) ne dépasse pas 45 jours (Tableau 4).

Groupes	Médiane de survie (j)	ILS (%)
Non traités	42	--
NF-Au@DTDTPA	38	-9.5
MRT	88.5	111
MRT+Au@DTDTPA	78	86
MRT+NF-Au@DTDTPA	105	150

Tableau 4. Médiane de survie et ILS pour les différents groupes d'animaux.

La croissance tumorale est nettement ralentie lorsque les rats ont été traités par radiothérapie (MRT) (groupes 3, 4 et 5). Un décalage très net est observé entre les courbes des animaux n'ayant pas été traités par MRT et celles des animaux traités par MRT. Le décalage reflète un retard de la croissance des tumeurs et donc un meilleur contrôle du développement tumoral. L'effet bénéfique de la radiothérapie est plus marqué lorsque l'irradiation est réalisée 24h après l'injection IT des nanoparticules, et en particulier des nanofleurs dorées. Le ralentissement de la croissance tumorale est plus net pour les animaux traités par MRT après injection IT de nanofleurs dorées que pour les animaux traités par MRT après injection IT de nanoparticules Au@DTDTPA bien que la quantité en or injectée soit identique. Cette différence entre les nanofleurs dorées et les nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) trouve probablement son origine dans la meilleure rétention tumorale des nanofleurs dorées qui a été révélée par les expériences de scintigraphie planaire et de comptage gamma réalisées 24h après injection IT des nanoparticules (voir 3.3.1). Le ralentissement de la croissance tumorale observée lorsque la MRT est mise en œuvre 24h après l'injection IT des nanoparticules s'accompagne d'une augmentation de la survie des rats porteurs de mélanome. Les médianes de survie (MeST = 78 j et 105 j respectivement pour les animaux traités par MRT après IT de nanoparticules d'or et de NF dorées) des animaux traités par MRT 24h après l'injection IT des nanoparticules sont presque deux fois supérieures à celles calculées pour les animaux non traités par radiothérapie (groupe 1 et 2). En outre, l'injection IT des nanofleurs dorées avant l'irradiation ne conduit pas seulement à un meilleur contrôle de la croissance tumorale mais également à une meilleure survie car les animaux ainsi traités présentent la médiane de survie (MeST = 105 j) la plus élevée parmi les 5 groupes. Les résultats collectés lors de l'étude de la croissance tumorale et de suivi des nanoparticules par imagerie nucléaire après injection intratumorale sont très encourageants.

Cependant, si l'injection IT permet de s'affranchir des effets de la biodistribution et donc de se concentrer sur les propriétés intrinsèques des nanoparticules, elle ne

constitue pas un mode d'injection courant car l'injection IT est limitée aux tumeurs superficielles ou facilement accessibles. En outre, l'injection IT peut favoriser la dissémination des cellules cancéreuses dans des tissus sains. Au contraire, l'injection intraveineuse (IV) garantit une meilleure accessibilité avec une meilleure sécurité car le réseau vasculaire irrigue tous les tissus.

3.3.3. La biodistribution des nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA) après injection intraveineuse

En raison du caractère superparamagnétique des nanofleurs et de la possibilité d'immobiliser des radioisotopes dans la couche organique DTDTPA des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA), la biodistribution des nanofleurs dorées a pu être suivie par IRM pondérée T_2 et par imagerie nucléaire, en l'occurrence TEMP après radiomarquage au technétium (^{99m}Tc). Le comportement des nanofleurs dorées après injection intraveineuse a été comparé à celui des nanofleurs et des nanoparticules d'or. Pour les suivre par TEMP, les nanofleurs ont été fonctionnalisées par le DTPA-BA qui a permis l'immobilisation du technétium. Les nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) ont été marquées par le gadolinium (Gd^{3+}) et par le technétium (^{99m}Tc) pour étudier leur biodistribution par IRM pondérée T_1 et par TEMP. Le comptage gamma des organes a également été réalisé après le sacrifice des animaux (soit 22h après l'injection IV). L'étude de la biodistribution après injection IV a été réalisée sur des rats porteurs de gliosarcome 9L implanté dans l'hémisphère droit de leur cerveau.

Les images acquises par IRM pondérée T_2 montrent que la zone tumorale visible avant l'injection IV des nanofleurs et nanofleurs dorées (zone gris clair dans l'hémisphère droit du cerveau) s'assombrit après l'injection (Figure 10).

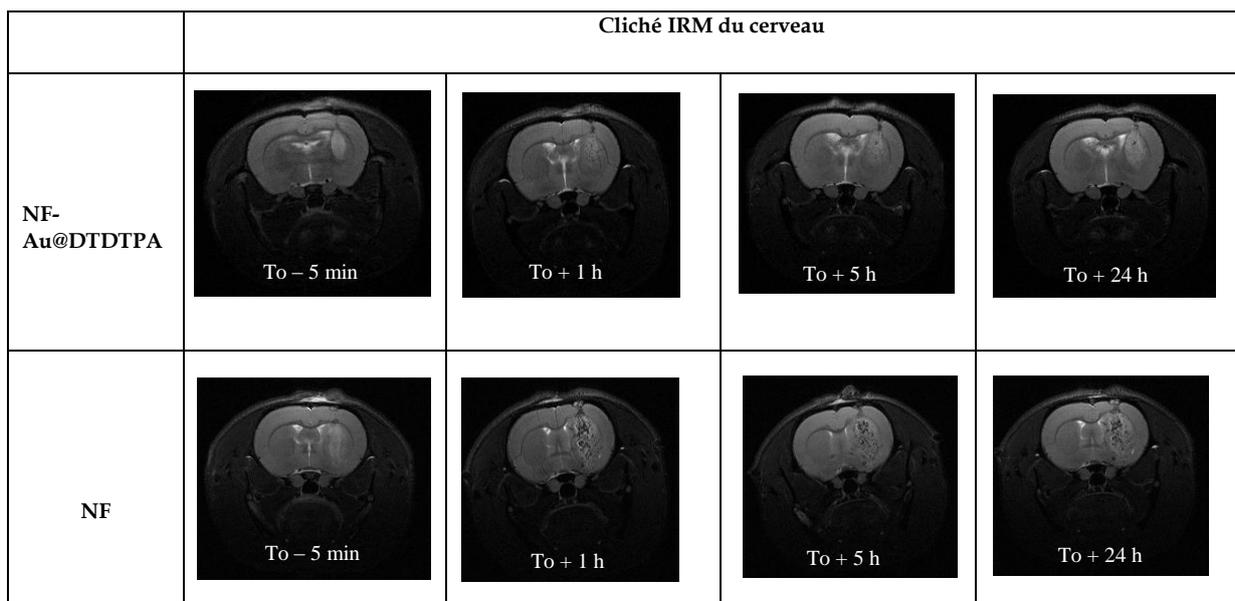


Figure 10. Images acquises par IRM pondérée T_2 avant ($t_0-5\text{min}$), 1h, 5h et 24h après l'injection intraveineuse de nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA) et de NF.

Le rehaussement du contraste négatif dans la zone tumorale est associé à la présence des nanofleurs et nanofleurs dorées. Durant les cinq heures qui suivent l'injection le rehaussement de contraste négatif est important et diminue entre 5h et 24h. En effet, nous constatons que 24h après l'injection IV le contraste des images est semblable à celui observé avant l'injection. Les images acquises 1h, 5h et 24h après l'injection des nanofleurs et nanofleurs dorées permettent de retracer le parcours des nanoparticules. Les NF et NF-Au@DTDTPA présentent un comportement similaire comme le montre l'évolution temporelle du contraste négatif qui est quasiment le même pour ces deux types de nanoparticules. La présence de nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) n'affecte pas le comportement des nanofleurs en tant qu'agent de contraste négatif pour l'IRM.

D'après les images (Figure 10), les nanofleurs et les nanofleurs dorées sont présentes dans la tumeur durant au moins 5 heures après l'injection IV. Malheureusement il n'a pas été possible de suivre les nanoparticules d'or non supportées (Au@DTDTPA) sur une aussi longue durée (Figure 11).

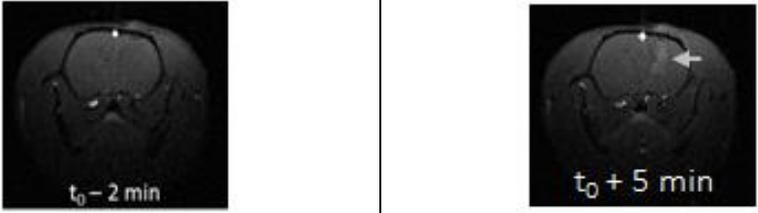
Cliché IRM du cerveau	
Au@DTDTPA (Gd)	

Figure 11. Images acquises par IRM pondérée T₁ avant (t₀-5min) et 5 min après l'injection intraveineuse de nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) (Gd).

En effet, le rehaussement de contraste positif que les nanoparticules d'or Au@DTDTPA (Gd) induisent passe par un maximum entre 5 et 10 minutes et n'est plus visible 1h après l'injection IV. La disparition du contraste positif n'indique pas nécessairement l'absence de nanoparticules d'or mais la quantité présente dans la zone tumorale est trop faible pour induire un contraste suffisamment prononcé pour être visible. En outre, les nanoparticules Au@DTDTPA sont éliminées plus rapidement car les images IRM centrées sur les reins montrent un rehaussement positif dans la zone corticale des reins qui est plus prononcé 2h que 5h après l'injection intraveineuse des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) (Gd) (Figure 12).

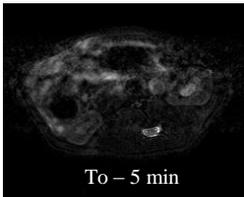
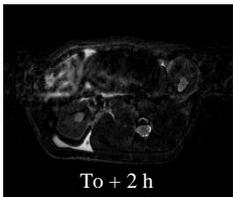
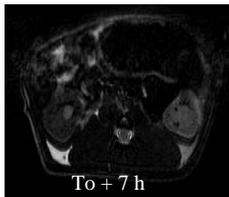
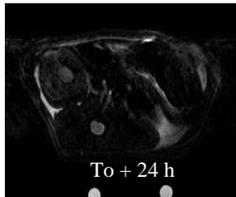
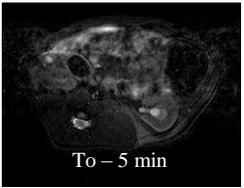
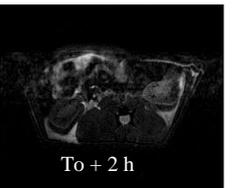
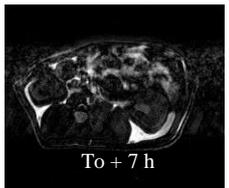
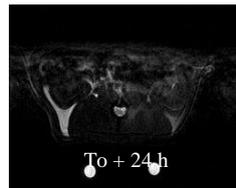
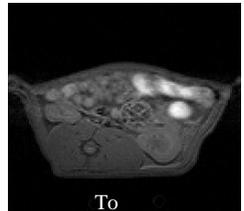
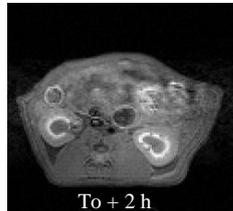
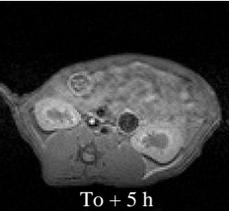
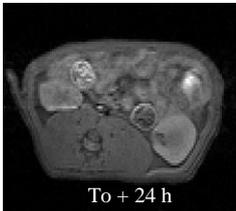
	Cliché IRM dans les reins			
NF- Au@DTDTPA	 To - 5 min	 To + 2 h	 To + 7 h	 To + 24 h
NF	 To - 5 min	 To + 2 h	 To + 7 h	 To + 24 h
Au@DTDTPA- Gd	 To	 To + 2 h	 To + 5 h	 To + 24 h

Figure 12. Images des reins acquises par IRM pondérée T_2 après injection IV des NF, des NF-Au@DTDTPA et par IRM pondérées T_1 après injection IV des nanoparticules d'or Au@DTDTPA (Gd).

Les nanofleurs dorées se distinguent des nanoparticules d'or Au@DTDTPA non supportées car le contraste négatif induit par les nanofleurs superparamagnétiques dans les reins évolue peu entre 2h et 24h après l'injection IV des nanofleurs.

D'après l'IRM, les nanofleurs, les nanofleurs dorées et les nanoparticules d'or sont donc présentes dans le cerveau après injection intraveineuse. En outre, les nanoparticules d'or semblent être éliminées par voie rénale plus rapidement que les nanofleurs. Cependant la comparaison du comportement des nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA) et des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA), bien qu'elles possèdent en commun les nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) de même taille et de même composition, n'est pas pertinente car le mode d'acquisition de ces images (IRM pondérée T_2 et pondérée T_1 , respectivement) diffère selon le caractère magnétique (superparamagnétique pour les nanofleurs dorées et paramagnétique pour les nanoparticules d'or Au@DTDTPA marquées par le gadolinium Gd^{3+}). Afin de surmonter cette difficulté, nous avons marqué un échantillon de nanofleurs dorées avec des ions gadolinium (Gd^{3+}). Malheureusement, aucun rehaussement de contraste positif n'est visible sur les images acquises par IRM pondérée T_1 après injection des nanofleurs dorées NF-Au@DTDTPA (Gd) contrairement à ce qui a été observée avec les nanoparticules Au@DTDTPA. Deux raisons peuvent être avancées pour expliquer cette différence. La première repose sur le fait que la concentration en nanoparticules

d'or dans les échantillons injectés est trois fois plus faible dans la suspension de nanofleurs dorées que dans celle de nanoparticules Au@DTDTPA. En effet, la forte viscosité des nanofleurs dorées ne permet pas d'injecter des suspensions avec une concentration en or aussi élevée que les suspensions de nanoparticules Au@DTDTPA. Or la concentration en gadolinium (Gd^{3+}) dans les suspensions de nanoparticules Au@DTDTPA est tout juste suffisante pour rehausser le contraste positif des images acquises par IRM. La dilution des nanofleurs dorées NF-Au@DTDTPA n'est donc pas favorable pour suivre leur biodistribution par IRM pondérée T_1 . De plus, à cette limitation s'est ajoutée une erreur de dilution de la solution de marquage révélée après les expériences d'imagerie. La solution de marquage était trop diluée pour conférer aux nanofleurs dorées NF-Au@DTDTPA (Gd) un comportement d'agent de contraste positif pour l'IRM.

En revanche, l'imagerie TEMP et le comptage gamma post-mortem des organes ont été réalisés de la même façon pour les nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA) et les nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) avec la même concentration en nanoparticules d'or. En effet, l'imagerie nucléaire étant beaucoup plus sensible que l'IRM il a été possible de suivre les nanofleurs dorées et les nanoparticules d'or Au@DTDTPA après injection d'une suspension diluée. Comme la quantité d'isotope est proportionnelle au nombre de nanoparticules d'or Au@DTDTPA (identique dans les suspensions injectées de NF-Au@DTDTPA et Au@DTDTPA), il est possible de comparer l'accumulation des nanoparticules d'or non supportées (Au@DTDTPA) et supportées par les nanofleurs (NF-Au@DTDTPA). Il est à noter que cette concentration en nanoparticules d'or est celle qui a été utilisée pour l'IRM des nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA) et qui sera utilisée pour les expériences de radiothérapie.

La comparaison du comportement des nanofleurs et des nanofleurs dorées ne sera pas par contre aussi fiable que dans le cas de l'IRM. Même si la quantité de nanofleurs injectée et la nature du chélateur sont les mêmes, la procédure de radiomarquage diffère par la quantité des chélateurs présents sur les nanofleurs et les nanofleurs dorées.

La présence des nanofleurs, nanofleurs dorées et nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) est confirmée par la quantification *in vivo* de la radioactivité au cours des expériences TEMP. D'après cette quantification, il ressort que la proportion de dose injectée par gramme de tumeur (% ID/g) après injection IV des nanofleurs dorées est entre 1,5 et 2 fois supérieure à celle mesurée après injection IV des nanoparticules d'or Au@DTDTPA durant les 45 premières minutes qui suivent l'injection. En outre, le rapport de radioactivité mesuré dans la tumeur et dans la zone contralatérale saine après injection des nanofleurs dorées est également supérieure à celui des nanoparticules d'or Au@DTDTPA (Figure 13).

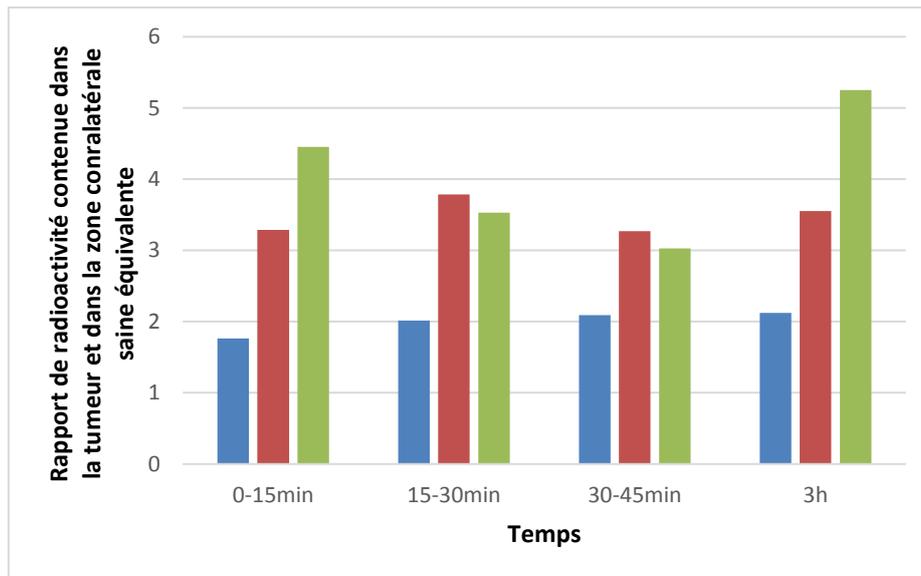


Figure 13. Rapport de radioactivité contenue dans la tumeur et dans la zone contralatérale saine équivalente après injection IT de nanoparticules d'or (bleu), de NF dorées (rouge), et NF (vert).

Quel que soit le type de nanoparticules, nous constatons que ce rapport est supérieur à 1. Il y a donc plus de nanoparticules dans la tumeur que dans les tissus sains environnants. Ce point est extrêmement positif dans le cadre d'une application thérapeutique. Ces données qui montrent que la proportion de dose injectée par gramme de tumeur et le rapport de radioactivité entre tumeur et tissus sains sont plus élevés pour les nanofleurs dorées (NF-Au@DTDTPA) que dans le cas des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) nous amènent à conclure qu'il y a plus d'or dans la tumeur quand les nanoparticules d'or sont greffées sur les nanofleurs. Les nanofleurs dorées assurent donc un transport efficace des nanoparticules d'or.

3.3.4. Etude comparative de l'effet radiosensibilisant des nanofleurs dorées après injection IV

L'effet radiosensibilisant des nanofleurs dorées a été révélée par l'expérience de radiothérapie réalisée après injection IT (voir 3.3.2). Le contrôle de la croissance tumorale est mieux assuré quand la radiothérapie est effectuée avec des nanofleurs dorées localisées dans la tumeur. Si l'injection intratumorale est très utile pour mettre en évidence l'effet radiosensibilisant des nanofleurs dorées, elle est cependant rarement mise en œuvre en clinique car elle est limitée aux tumeurs facilement accessibles (essentiellement en surface du corps du patient). D'autre part, la pratique de l'IT est restreinte car il existe un risque de dissémination de cellules cancéreuses dans les parties saines de l'organisme lors du retrait de l'aiguille. Parmi les différents modes d'administration, l'injection IV présente l'intérêt de faire circuler les nanoparticules dans le réseau sanguin qui irrigue toutes les parties de l'organisme. Les nanoparticules peuvent alors avoir accès à tout l'organisme. En outre, l'accumulation dans les zones tumorales peut exploiter l'effet EPR⁹⁻¹¹ (voir chapitre 1). Afin de valider l'effet thérapeutique de ces nanofleurs dorées dans les conditions d'administration les

plus proches de la réalité, les nanofleurs dorées ont été injectées par voie intraveineuse à des rats porteurs de gliosarcome 9L. L'étude de la biodistribution reposant sur l'IRM et la TEMP (3.3.3), a montré que les nanofleurs se comportent comme des transporteurs efficaces de nanoparticules d'or puisque la quantité de nanoparticules d'or présentes dans les tumeurs et le rapport tumeur/tissu sain après injection IV à des rats porteurs de gliosarcome 9L étaient plus élevés quand les nanoparticules d'or étaient au préalable greffées sur les nanofleurs. Ces caractéristiques sont probablement à l'origine de l'amélioration de la survie des animaux traités par radiothérapie après injection IV des nanofleurs dorées à des rats porteurs de gliosarcome 9L (Figure 14).

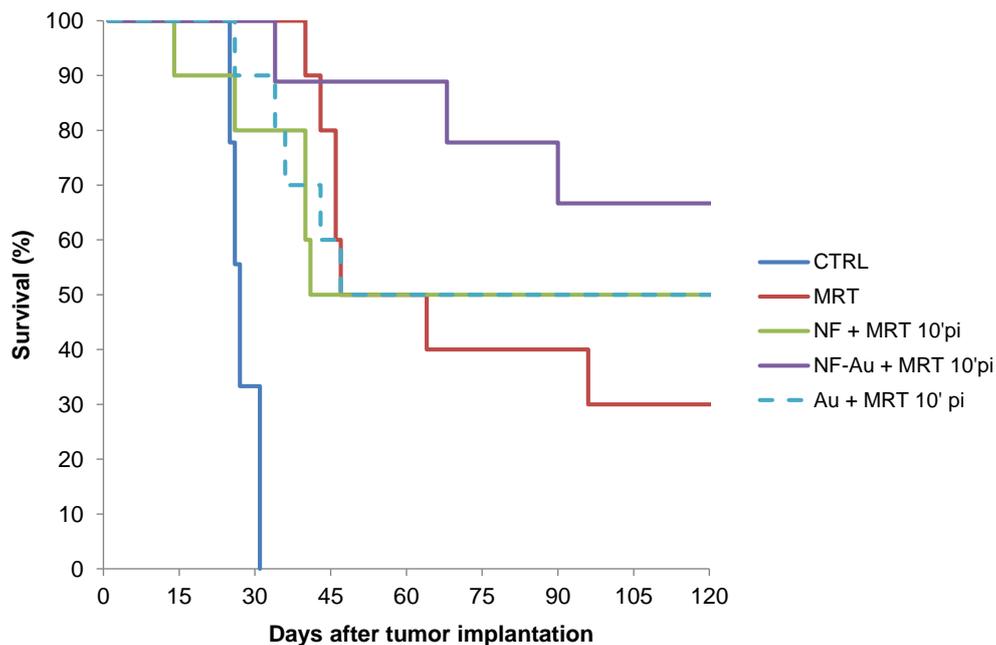


Figure 14. Courbes de survie de rats porteurs de gliosarcome 9L dans l'hémisphère droit de leur cerveau- CTRL : groupe contrôle non traité (pas d'injection, pas d'irradiation) ; MRT : groupe traité uniquement par radiothérapie ; NF+MRT 10'pi ; NF-Au + MRT10'pi ; Au + MRT 10'pi : groupes traités par radiothérapie 10 min après injection IV de NF, de NF dorées et de nanoparticules d'or non supportées, respectivement.

La figure 14 rassemble les courbes de survie de chacun des cinq groupes de rats porteurs de gliosarcome 9L implanté dans l'hémisphère droit du cerveau 10 jours avant l'irradiation. Les animaux non traités (pas d'injection, pas d'irradiation) meurent rapidement (en moins de 32 jours) en raison de l'agressivité de ce type de tumeur (la médiane de survie MeST=27 jours). Le traitement de ces animaux par radiothérapie (MRT) conduit à une nette amélioration de la survie car la médiane de survie passe de 27 jours (pour les animaux non traités) à 55 jours (pour les animaux traités uniquement par MRT) soit une augmentation de la durée de vie de 104% (Tableau 5).

Groupes	Médiane de survie (j)	ILS (%)	Nbre de jours durant lesquels le taux de survie est supérieur à 67%
Non traités	27		26
MRT	55	104	46
MRT+NF	>81	>200	40
MRT+Au@DTDTPA	>83	>207	43
MRT+NF-Au@DTDTPA			>121

Tableau 5. Médiane de survie et ILS pour les différents groupes d'animaux.

$$ILS = \frac{MeST(i) - MeST(\text{contrôle})}{MeST(\text{contrôle})} * 100$$

(Avec MeST qui correspond à la médiane de survie et l'ILS (Increase in lifespan) correspond à l'augmentation de la durée de vie en pourcentage).

L'effet bénéfique de la radiothérapie est renforcé lorsque l'irradiation a lieu 10 min après l'injection IV des nanoparticules d'or Au@DTDTPA, des nanofleurs et des nanofleurs dorées. Comme cela a déjà été montré dans le cadre de nos travaux antérieurs², les nanoparticules Au@DTDTPA exercent un effet radiosensibilisant qui améliore la survie des animaux. Au bout de 121 jours après l'implantation de la tumeur (et donc 110 j après l'irradiation et l'injection) 50% des animaux porteurs de gliosarcome 9L sont toujours vivant contre 30% pour les animaux traités uniquement par MRT (et 0% pour les animaux non traités). La médiane de survie est supérieure à 83 jours soit une augmentation de la durée de vie (ILS) supérieure à 207% par rapport aux animaux non traités et 51% par rapport aux animaux traités uniquement par MRT. Ces valeurs qui confirment le potentiel radiosensibilisant des nanoparticules d'or sont quasiment identiques à celles déterminées pour les animaux traités par radiothérapie après injection IV des NF puisque 50% des animaux sont toujours vivants 121 jours après l'implantation de la tumeur (MeST>81 jours et ILS > 200% par rapport aux animaux non traités et ILS > 47% par rapport aux animaux traités uniquement par MRT). Ces résultats indiquent que les nanofleurs exercent un effet radiosensibilisant. L'effet radiosensibilisant des nanoparticules à base de fer a déjà été rapporté¹²⁻¹⁴, bien que le numéro atomique du fer ($Z_{\text{Fe}} = 26$) soit nettement inférieur à celui de l'or ($Z_{\text{Au}} = 79$), les nanoparticules à base de fer sont capables de rehausser l'effet de dose délivré en radiothérapie. Dans le cas de notre étude, les nanofleurs exercent un effet radiosensibilisant aussi efficace que celui des nanoparticules d'or mais avec une concentration en fer de la suspension injectée de NF 6 fois supérieure à celle de l'or. La faiblesse de l'effet radiosensibilisant résultant de la faible valeur du numéro atomique du fer est donc compensée par le nombre d'atomes de fer. Avec la même concentration en fer que celle des suspensions injectables de NF et la même concentration en or des suspensions injectables de nanoparticules d'or Au@DTDTPA, les nanofleurs dorées

exercer un effet thérapeutique nettement plus efficace que les NF et les nanoparticules d'or Au@DTDTPA comme le révèle le décalage de la courbe de survie vers les durées plus longues. Le pourcentage de rats porteurs de gliosarcome 9L vivants 121 jours après l'implantation de la tumeur est le plus élevé de tous les groupes de cette expérience. Il s'élève à 67% contre 50% pour les animaux traités par radiothérapie après injection IV de NF, de nanoparticules d'or, 30% pour les animaux traités uniquement par radiothérapie. Un tel taux de survie n'est observé que pendant les 26 premiers jours pour les animaux non traités, les 46 premiers jours pour les animaux traités uniquement par MRT et les 40 premiers jours pour les animaux traités par radiothérapie après injection de nanoparticules Au@DTDTPA et les NF. Les animaux traités par radiothérapie après injection IV de nanofleurs dorées bénéficient de la plus forte amélioration de survie dans les 120 jours qui suivent l'implantation de la tumeur. Le greffage des nanoparticules d'or Au@DTDTPA sur les NF permet donc de mieux exploiter le potentiel radiosensibilisant. Ces résultats confirment l'intérêt des nanofleurs dorées pour augmenter l'efficacité de la radiothérapie.

3.4. Conclusion partielle

Cette étude qui consistait à comparer le comportement de biodistribution et l'effet radiosensibilisant des nanofleurs dorées à celui des nanoparticules d'or après administration a fourni des résultats extrêmement intéressants.

Premièrement, il est possible de suivre la biodistribution de ces nanofleurs dorées par IRM pondérée T_2 et par TEMP. Sur la base de données collectées par l'imagerie, nous pouvons conclure que les nanofleurs dorées sont mieux retenues dans les tumeurs après injection IT que les nanoparticules d'or Au@DTDTPA. Ce constat extrêmement prometteur pour des applications médicales peut s'expliquer par la taille des nanofleurs dorées qui étant plus large ralentit l'évasion des nanofleurs dorées de la zone tumorale. Cette meilleure rétention permet de mieux exploiter l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'or greffées sur les nanofleurs. L'étude montre effectivement que les nanofleurs dorées exercent un effet radiosensibilisant conduisant à ralentir la croissance tumorale. Ce contrôle de la croissance tumorale exercée par la combinaison MRT - injection IT de nanofleurs dorées est meilleure que celui observé lorsque les nanoparticules d'or Au@DTDTPA sont utilisées comme agent radiosensibilisant.

Cette conclusion est corroborée par les résultats du traitement des rats porteurs de gliosarcome 9L. Les nanofleurs dorées sont les particules les plus efficaces dans le cadre du traitement par radiothérapie. Les effets de la radiothérapie sont nettement améliorés lorsque l'irradiation est effectuée après l'injection IV des nanofleurs dorées. Ce résultat prometteur repose sur une conjonction de plusieurs facteurs comme une biodistribution plus adaptée pour le ciblage de la tumeur et la combinaison des effets radiosensibilisants du fer et de l'or. Les nanofleurs dorées apparaissent donc comme des candidates prometteuses pour la radiothérapie guidée par imagerie. Ce potentiel pourrait être renforcé par la possibilité que possèdent les NF à chauffer l'environnement local lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique alternatif de haute fréquence.

Références

1. Alric, C. *et al.* The biodistribution of gold nanoparticles designed for renal clearance. *Nanoscale* **5**, 5930–5939 (2013).
2. Miladi, I. *et al.* The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents. *Small* **10**, 1116–1124 (2014).
3. Lartigue, L. *et al.* Cooperative Organization in Iron Oxide Multi-Core Nanoparticles Potentiates Their Efficiency as Heating Mediators and MRI Contrast Agents. *ACS Nano* **6**, 10935–10949 (2012).
4. Institut des Neurosciences de Grenoble.
5. Alric, C. *et al.* Gadolinium Chelate Coated Gold Nanoparticles As Contrast Agents for Both X-ray Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5908–5915 (2008).
6. Serduc, R. *et al.* Synchrotron microbeam radiation therapy for rat brain tumor palliation-influence of the microbeam width at constant valley dose. *Phys. Med. Biol.* **54**, 6711–6724 (2009).
7. Regnard, P. *et al.* Irradiation of intracerebral 9L gliosarcoma by a single array of microplanar x-ray beams from a synchrotron: balance between curing and sparing. *Phys. Med. Biol.* **53**, 861–878 (2008).
8. Butson, M. J., Cheung, T. & Yu, P. K. N. Corresponding dose response of radiographic film with layered gafchromic film. *Phys. Med. Biol.* **47**, N285-289 (2002).
9. Maeda, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **41**, 189–207 (2001).
10. Greish, K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *J. Drug Target.* **15**, 457–464 (2007).

11. Hobbs, S. K. *et al.* Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4607–4612 (1998).
12. Klein, S. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as novel X-ray enhancer for low-dose radiation therapy. *J. Phys. Chem. B* **118**, 6159–6166 (2014).
13. Klein, S., Sommer, A., Distel, L. V. R., Neuhuber, W. & Kryschi, C. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**, 393–397 (2012).
14. Hauser, A. K. *et al.* Targeted iron oxide nanoparticles for the enhancement of radiation therapy. *Biomaterials* **105**, 127–135 (2016).

Chapitre 4. Les Nanofleurs dorées : Agents combinant hyperthermie et radiothérapie	125
4.1. Introduction	127
4.2. Protocoles expérimentaux	128
4.2.1. Evaluation du pouvoir chauffant des NF dorées (in vitro)	128
4.2.2. Combinaison hyperthermie magnétique et radiothérapie	129
4.3. Résultats et discussion.....	131
4.3.1. Evaluation du pouvoir chauffant des NF dorées	131
4.3.2. Le chauffage de tumeurs.....	132
4.3.3. Le contrôle de la croissance tumorale par combinaison de l'hyperthermie magnétique et de la radiothérapie par microfaisceau (MRT).	134
4.4. Conclusion	138
Références.....	139

Chapitre 4. Les Nanofleurs dorées : Agents combinant hyperthermie et radiothérapie

4.1. Introduction

Les nanofleurs dorées exercent un effet radiosensibilisant qui permet comme l'ont montré les expériences du chapitre précédent d'améliorer la survie des animaux porteurs de tumeurs cérébrales. Cet effet est principalement attribué à la présence des nanoparticules d'or greffées sur les nanofleurs de maghémite. Or, les propriétés superparamagnétiques des nanofleurs de maghémite qui confèrent à ces nano-objets un comportement d'agents de contraste négatif en IRM pourraient également être exploitées pour générer un échauffement local (hyperthermie magnétique).

Les travaux antérieurs sur les nanofleurs ont montré qu'elles étaient caractérisées par un fort pouvoir chauffant induit par l'exposition des nanofleurs à un champ magnétique alternatif de haute fréquence ^{1,2}.

Les nanofleurs dorées possèdent donc la capacité d'associer l'hyperthermie magnétique à la radiosensibilisation. Afin de le vérifier, nous avons réalisé une série d'expériences de chauffage en solution et après injection intratumorale et un suivi comparatif de croissance tumorale.

4.2. Protocoles expérimentaux

4.2.1. Evaluation du pouvoir chauffant des NF dorées (*in vitro*)

4.2.1.1. Appareillage

Les expériences d'hyperthermie magnétique *in vitro* ont été réalisées par l'équipe de Florence Gazeau (MSC- Paris Diderot).

Un appareil nommé « nanotherics » constitué d'une bobine a été utilisé. Le « nanotherics » possède un compartiment qui sert à chauffer les échantillons mais qui est également dédié au traitement par hyperthermie magnétique de petits animaux. Lors du chauffage, la température est mesurée à l'aide d'un thermomètre à fibre optique et par la suite la bobine est refroidie à 37°C. La bobine est reliée à deux générateurs. Le premier est un générateur électrique qui permet de régler l'intensité du courant électrique, le second est un générateur de fréquence.

La fréquence imposée est visualisée sur un oscilloscope permettant de vérifier la résonance, une caméra infrarouge qui permet de cibler les zones qui sont chauffées et le tout est connecté à un pilote qui recueille les données (Figure 1).

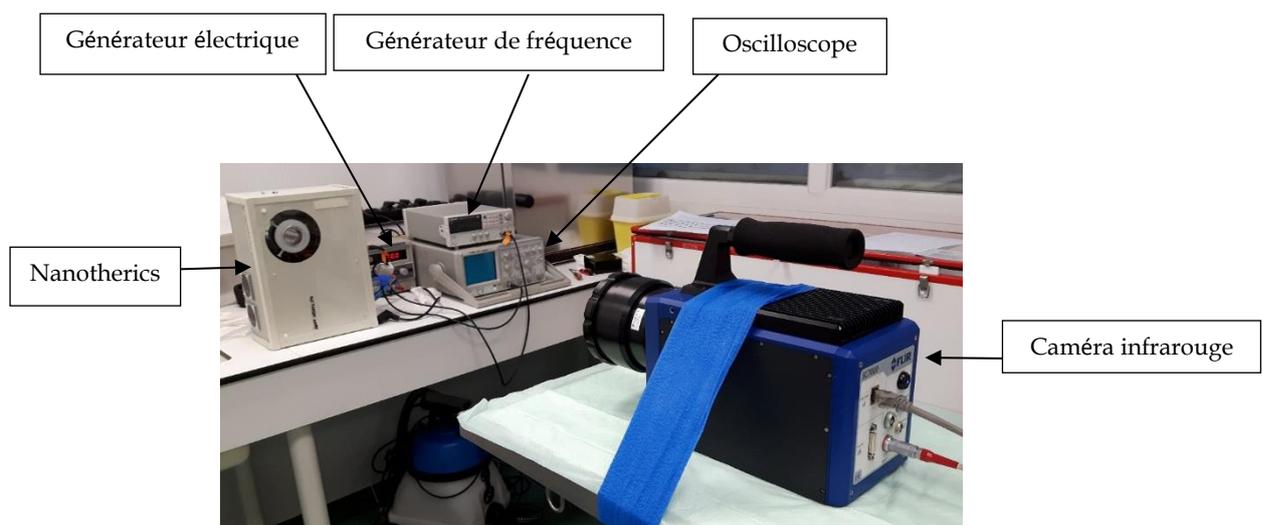


Figure 1. Montage utilisé en hyperthermie magnétique.

4.2.1.2. Milieu physiologique simulé et hyperthermie magnétique

Le pH des suspensions de nanofleurs dorées a été préalablement ajusté à pH 7,4 (pH physiologique) après ajout d'une solution tampon composée d'un mélange citrate (72,5 mM) /hepes (10 mM). La suspension colloïdale avait une osmolarité de 300 mosmol.L⁻¹. Nous avons utilisé le même tampon citrate/hepes pour ajuster le pH des suspensions de nanofleurs de maghémite à 7,4.

Les suspensions ont été introduites dans des tubes Eppendorf avant d'être positionnées dans le tunnel du nanotherics. Un champ d'amplitude de 20 mT a été appliqué aux suspensions colloïdales à une fréquence de 335 kHz.

Par la suite les données ont été enregistrées sur un pilote relié à l'appareillage comme décrit précédemment.

4.2.2. Combinaison hyperthermie magnétique et radiothérapie

4.2.2.1. Appareillages

Les expériences d'hyperthermie magnétique *in vivo* ont été réalisées cette fois-ci à l'ESRF de Grenoble. L'appareillage décrit au paragraphe 4.2.1.1 a été utilisé.

4.2.2.2. Inoculation de la tumeur épidermique de type mélanome (A375 sc) et anesthésie des animaux

Nous avons commandé auprès de la plateforme OPTIMAL (Grenoble) des souris nues porteuses de tumeurs sous-cutanées A375 (mélanome). L'implantation a été réalisée par l'équipe de Véronique Josserand cinq semaines avant les expériences d'hyperthermie.

4.2.2.3. Evaluation du pouvoir chauffant

Des nanofleurs dorées (50 μ L, ~ 625 mM en fer et 30 mM en Au) et des nanofleurs (50 μ L, ~ 625 mM en fer) ont été injecté par voie intratumorale sur les animaux après anesthésie puis placé dans le « nanotherics » afin de chauffer la tumeur par hyperthermie magnétique (Figure 2). Un champ magnétique alternatif de 20 mT a été appliqué à une fréquence de 521,9 kHz.

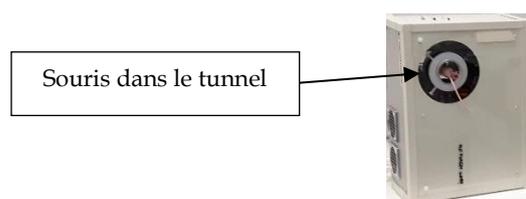


Figure 2. Cliché photographique de la souris dans le tunnel.

Pour cette expérience, nous avons trois groupes d'animaux composés d'un groupe « contrôle » et de deux autres groupes. Les animaux du groupe « contrôle » n'ont subi aucune injection de nanoparticules et aucun traitement alors que les animaux du groupe 2 et du groupe 3 ont subi respectivement un traitement par hyperthermie magnétique après injection de nanofleurs et de nanofleurs dorées (Tableau 1).

Groupes	NF	NF-Au@DTDTPA	HM
1			
2			
3			

Tableau 1. Traitement par hyperthermie magnétique de groupe de petits animaux après implantation de mélanome (A375 sc).

4.2.2.4. Hyperthermie magnétique et radiothérapie

Les expériences d'hyperthermie magnétique et de radiothérapie ont été réalisées à l'ESRF de Grenoble. Le « nanotherics » a été utilisé pour l'hyperthermie magnétique et la ligne ID17 pour les expériences de radiothérapie par microfaisceau (MRT).

Des nanofleurs dorées (50µL ; 625 mM en fer et 30 mM en Au), des nanoparticules d'or isolées (50 µL ; 30 mM en Au), et des NF (50µL ; 625 mM en fer) ont été injectées par voie intratumorale sur des souris porteuses de tumeur sous-cutanée (mélanome A375 sc) comme décrit précédemment (4.2.2.2).

Les animaux ont été traités en premier lieu par l'hyperthermie magnétique en appliquant un champ magnétique alternatif de 20 mT à une fréquence de 521,9 kHz, avant de subir un traitement radiothérapeutique avec des doses de 2x400 Gray en pic et 2x20 Gray en vallée (Figure 3).

Pour les expériences de radiothérapie, les animaux ont été positionnés et immobilisés sur une plateforme motorisée qui permet de déplacer les animaux par rapport au faisceau. Ces derniers ont été irradiés par deux faisceaux perpendiculaires (de l'avant vers l'arrière de la patte et de la droite vers la gauche).

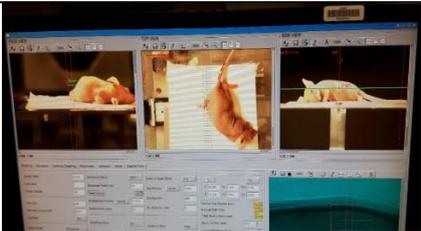
	Hyperthermie magnétique	Radiothérapie
Clichés photographiques des expériences		

Figure 3. Clichés photographiques des expériences d'hyperthermie magnétique et de radiothérapie combinée.

Ces expériences d'hyperthermie magnétique combinée à la radiothérapie regroupaient neuf groupes d'animaux. Cinq groupes « contrôle » dont le premier n'ayant subi aucune injection de nanoparticules ni aucun traitement. Le second groupe « contrôle » rassemble des animaux ayant reçu seulement une injection IT de nanofleurs dorées. Les animaux du troisième et quatrième groupe « contrôle » ont été traité uniquement et respectivement par HM et par MRT sans injection de nanoparticules. Le cinquième et dernier groupe « contrôle » a été traité par HM et MRT combiné sans injection de nanoparticules. Ensuite quatre autres groupes dont le premier a été traité uniquement par hyperthermie magnétique 24h après injection IT de nanofleurs dorées, le second groupe rassemblait des animaux traités par MRT 24h après injection IT de nanoparticules d'or non supportées (Au@DTDTPA). Le troisième groupe a été traité par MRT 24h après injection de nanofleurs dorées et le dernier groupe rassemblait des

animaux traités par la combinaison HM et MRT 24h après injection de nanofleurs dorées (Tableau 2).

Groupes	Au@DTDTPA	NF-Au@DTDTPA	HM	MRT
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				

Tableau 2. Tableau récapitulatif des différents groupes d'animaux et des différents traitements dans le cadre de l'évaluation de la combinaison HM/MRT/NF dorées.

4.3. Résultats et discussion

4.3.1. Evaluation du pouvoir chauffant des NF dorées

Le pouvoir chauffant des nanofleurs dorées a été évalué et comparé à celui des nanofleurs recouvertes de citrate à partir d'expériences réalisées sur des suspensions aqueuses (Figure 4).

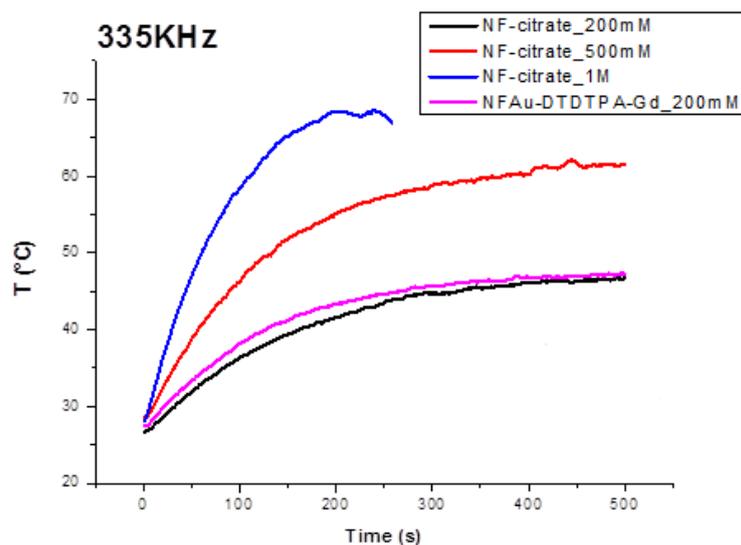


Figure 4. Courbes de température en fonction du temps d'exposition au champ magnétique de suspensions de nanofleurs à différentes concentrations.

Les échantillons ont été soumis à un champ magnétique de 20 mT à une fréquence de 335 kHz. Trois concentrations différentes de nanofleurs « citratées » ont été soumises au champ magnétique alternatif. Cette exposition induit dans chacun des cas une augmentation de température durant les 200 premières secondes. Les NF possèdent donc un pouvoir chauffant. Au-delà de 200 secondes, l'accroissement de température est plus faible : l'évolution de la température atteint un plateau. Plus la concentration est élevée et plus la pente de la courbe est raide. La montée en température est donc plus rapide lorsque pour les mêmes conditions de champ magnétique la concentration augmente. Comme le palier de température est atteint après une durée similaire quelle que soit la concentration, il en résulte que la valeur du palier est plus élevée lorsque la montée en température est plus rapide. En d'autres termes la valeur du palier dépend de la concentration en NF : elle augmente avec la concentration d'agents chauffants. La différence de température (ΔT) entre l'instant initial ($t = 0$ s) et le palier est comprise entre 20°C (pour la concentration la plus faible (200 mM)) et 50°C (pour la concentration la plus élevée). Bien que ces résultats ne puissent pas être directement transposés au cas de l'échauffement produit *in vivo* du fait des différences de viscosité entre l'eau et les tissus biologiques, ils sont de bon augure pour les expériences d'hyperthermie magnétique après injection intratumorale. Cette expérience révèle une seconde caractéristique très intéressante dans la perspective de l'application des nanofleurs dorées pour l'hyperthermie magnétique. La courbe de température des nanofleurs dorées est superposée à celle des nanofleurs pour une même concentration. La présence des nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) n'altère donc pas les propriétés magnétiques et les propriétés de chauffage des nanofleurs. Ce constat est très intéressant pour exploiter le pouvoir chauffant des nanofleurs dans le cadre du contrôle de la croissance tumorale par hyperthermie magnétique.

4.3.2. Le chauffage de tumeurs

Le pouvoir chauffant des nanofleurs (avec et sans nanoparticules d'or) a également été évalué après injection par voie intratumorale à des souris porteuses de mélanome (A375 sc). Ce mode d'administration présente l'avantage de se focaliser sur le potentiel des nanofleurs et nanofleurs dorées en s'affranchissant de la biodistribution. Grâce à la caméra thermique, il est possible d'enregistrer des images de l'animal soumis au champ magnétique alternatif (Figure 5).

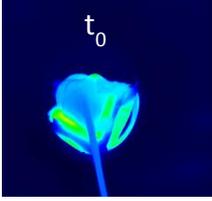
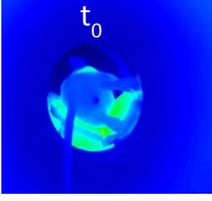
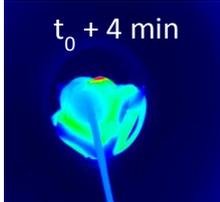
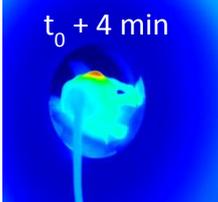
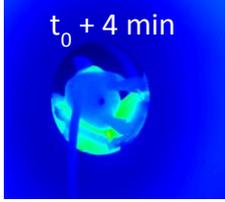
	NF	NF dorées	Sans NF
Clichés avant hyperthermie			
Clichés après hyperthermie			

Figure 5. Images extraites des films enregistrés par la caméra thermique à deux temps différents à t_0 (rangée supérieure) et à $t_0 + 4$ min après l'application du champ magnétique (rangée inférieure).

L'échauffement se traduit par l'apparition de la couleur rouge. En l'absence de NF dans la tumeur, aucune tache de couleur rouge n'apparaît alors qu'après injection intratumorale de NF et de NF dorées une tache virant au rouge apparaît dans la zone tumorale. Elle reflète l'échauffement qui est circonscrit à la zone tumorale. De la comparaison de ces images, nous pouvons en déduire que l'application d'un champ magnétique alternatif produit un échauffement uniquement si les NF (avec ou sans nanoparticules d'or) sont présentes.

La comparaison des courbes de température de la figure 6 confirme l'impression donnée par les images de la caméra thermique.

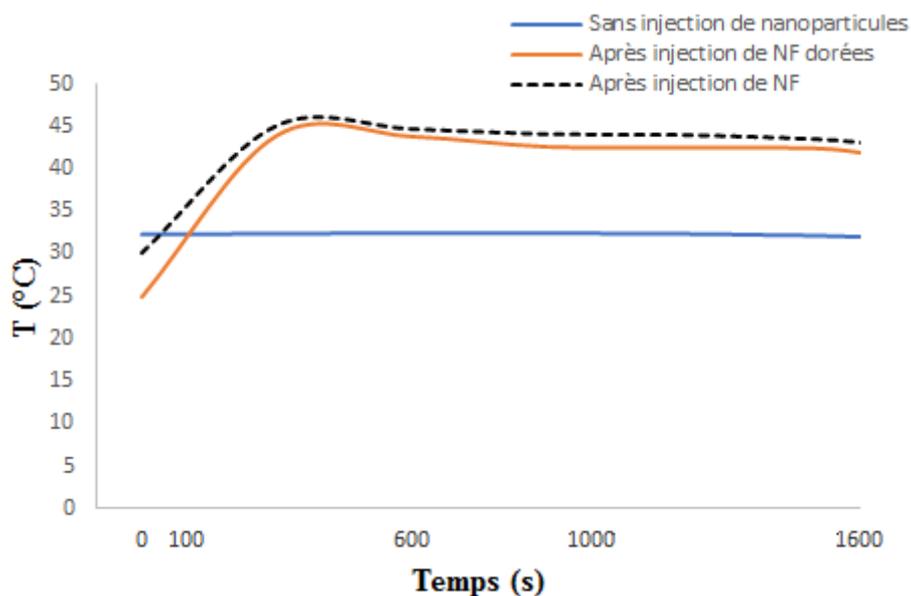


Figure 6. Evolution temporelle de la température au cours de l'application du champ magnétique alternatif sans injection (courbe bleue) après injection IT de NF (courbe en pointillé) et de NF dorées (courbe orange).

Le chauffage n'est effectif qu'en présence de nanofleurs et NF dorées. L'application du champ magnétique en l'absence d'injection IT de NF n'induit aucune augmentation de température. Cette dernière reste comprise entre 32 – 34°C durant l'expérience (entre 0 et 1600 s). La différence est très nette lorsque le champ magnétique alternatif est appliqué après injection IT de NF avec ou sans nanoparticules d'or greffées (courbes orange et courbe en pointillé). Dès l'application du champ magnétique (24h après l'injection IT), la température s'élève rapidement pour atteindre un palier au bout d'environ 400 s. Toutefois, les nanofleurs et nanofleurs dorées chauffent moins bien dans l'organisme que dans l'eau car la montée en température est beaucoup plus rapide lorsque le chauffage est réalisé dans l'eau avec un plateau dès les premières 200 secondes comparé au micro-environnement tumoral où le palier est perceptible à partir de 400 secondes seulement (Figure 4 et 6). De plus, pour atteindre un plateau autour de 45°C, il est nécessaire d'injecter par voie IT des suspensions colloïdales de NF dorées et NF de concentrations en fer 3 fois supérieure à celles des suspensions utilisées lors des expériences *in vitro* (~ 625 mM en fer au lieu de 200 mM). Quel que soit le type de NF, la température du palier est comprise entre 43 – 45°C par ajustement des paramètres du champ. En l'absence d'intervention sur ces paramètres des températures supérieures à 50°C peuvent être atteintes. Une telle élévation de température ne nous paraît pas acceptable en raison de la souffrance que pourrait induire la brûlure générée par des températures trop élevées. Cette expérience de suivi de température au sein de la tumeur confirme d'une part le potentiel des NF à induire un échauffement suffisant pour détruire les cellules et d'autre part la préservation des capacités de chauffage des NF dorées malgré la présence des nanoparticules d'or. Les nanofleurs dorées sont aussi efficaces que les NF pour générer un accroissement de température dans la zone où elles sont accumulées.

4.3.3. Le contrôle de la croissance tumorale par combinaison de l'hyperthermie magnétique et de la radiothérapie par microfaisceau (MRT)

Le pouvoir chauffant des nanofleurs et des nanofleurs dorées permet d'envisager leur utilisation pour les traitements de tumeurs solides par hyperthermie magnétique. Dans le cas des NF dorées, ce traitement peut être combiné à la radiothérapie car il a été montré que les NF dorées exercent un effet radiosensibilisant (chapitre 3). Le traitement de rats porteurs de gliosarcome 9L dans le cerveau par radiothérapie après injection intraveineuse de NF dorées a conduit à une augmentation du nombre de rats survivants pendant 120 jours au cours de l'expérience. Afin de valider le potentiel thérapeutique des nanofleurs dorées en hyperthermie magnétique et dans le cadre d'un traitement combinant hyperthermie magnétique et radiothérapie, nous avons réalisé un suivi de l'évolution du volume tumoral auprès de souris porteuses d'une tumeur sous-cutanée A375 (mélanome) implantée sur le flanc droit (Figure 7). Les animaux ont été répartis dans neuf groupes différents :

- 1- Groupe « contrôle » non traité ;
- 2- Groupe « contrôle » ayant reçu seulement une injection IT de NF dorées ;

- 3- Groupe « contrôle » ayant été traité uniquement par hyperthermie magnétique (HM) ;
- 4- Groupe « contrôle » ayant été traité uniquement par MRT ;
- 5- Groupe « contrôle » ayant été traité par combinaison HM et MRT ;
- 6- Groupe ayant été traité par HM 24h après injection IT de NF dorées ($V_{inj} = 50 \mu\text{L}$, $[\text{Fe}] = 625 \text{ mM}$) ;
- 7- Groupe ayant été traité par MRT 24h après injection de nanoparticules d'or non supportées (Au@DTDTPA) ($V_{inj} = 50 \mu\text{L}$, $[\text{Au}] = 28 \text{ mM}$) ;
- 8- Groupe ayant été traité par MRT 24h après injection IT de NF dorées ($V_{inj} = 50 \mu\text{L}$, $[\text{Fe}] = 625 \text{ mM}$) ;
- 9- Groupe ayant été traité par la combinaison HM et MRT 24h après injection IT de NF dorées ($V_{inj} = 50 \mu\text{L}$, $[\text{Fe}] = 625 \text{ mM}$ et $[\text{Au}] = 28 \text{ mM}$).

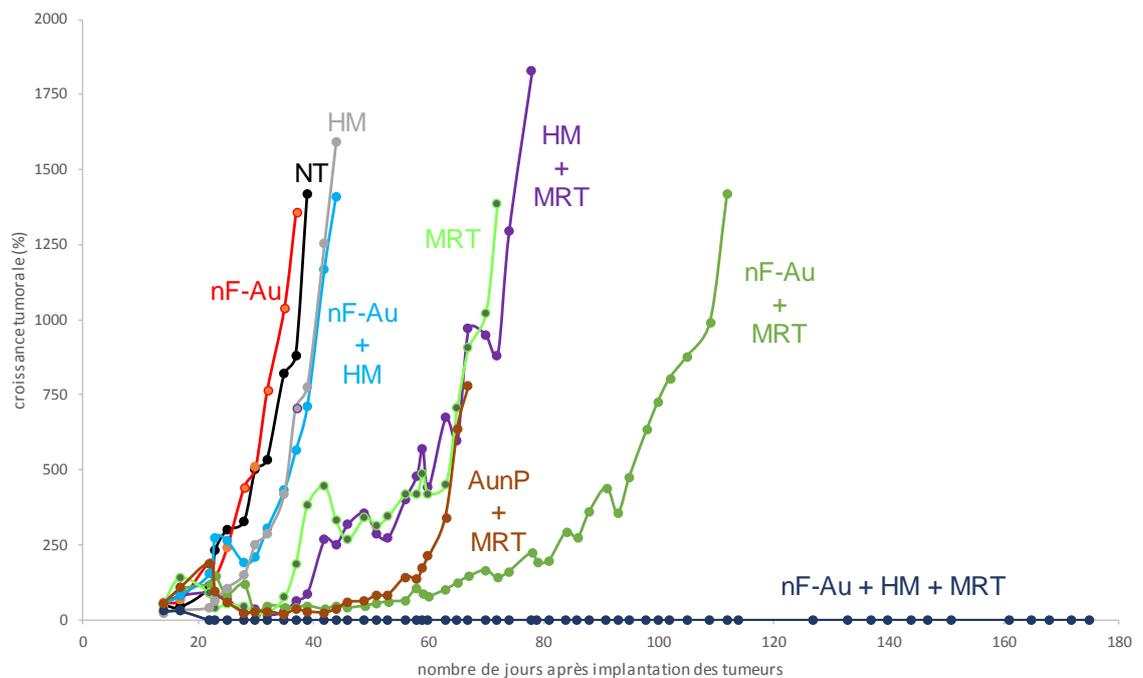


Figure 7. Suivi de la croissance de tumeur A375 implantée en sous-cutanée à des souris : non traité (en noire), traité seulement par injection IT de NF dorées (en rouge), traité uniquement par HM (en vert), traité uniquement par MRT (en vert avec pointillé noire), traité par combinaison HM+MRT (en violet), traité par HM 24h après injection IT de NF dorées (en bleu ciel), traité par MRT 24h après injection IT de nanoparticules d'or Au@DTDTPA (en marron), traité par MRT 24h après injection IT de NF dorées (en vert), traité par HM+MRT+NF-Au@DTDTPA (en bleu foncé).

Comme attendu, le volume tumoral du groupe 1 (aucun traitement) croît rapidement de manière exponentielle. De même, les courbes correspondant à la croissance tumorale des groupes 2 (injection IT de NF dorées) et des groupes 3 (hyperthermie seule) croissent rapidement de manière exponentielle à un rythme semblable à la courbe du groupe 1. Nous en déduisons que les NF dorées n'exercent aucun effet

délétère ni bénéfique en l'absence de stimulus physique extérieure. L'hyperthermie magnétique n'influence pas non plus la croissance tumorale. Ce résultat n'est pas surprenant car l'échauffement induit par l'hyperthermie magnétique nécessite la présence d'agents superparamagnétiques qui convertissent l'énergie magnétique en chaleur (Figures 5 et 6). L'évolution de la courbe 6 (HM 24h après injection IT de NF dorées) est en revanche beaucoup plus surprenante et décevante. L'allure de la courbe et le rythme de croissance sont quasiment les mêmes que ceux observés pour la courbe du groupe 3 (HM seule). Contrairement à ce que nous pouvions attendre d'après les expériences précédentes et les données de la littérature³⁻⁶, l'échauffement généré par les NF dorées sous l'action du champ magnétique alternatif (Figures 5 et 6) n'a pas d'influence bénéfique sur la croissance tumorale. En d'autres termes, la croissance tumorale n'est pas ralentie lorsque les souris porteuses d'une tumeur A375 sous-cutanée sont traitées par HM 24h après injection IT de NF dorées. En revanche, comme cela a été montré dans le chapitre 3, ces nanostructures exercent un effet radiosensibilisant qui conduit à un meilleur contrôle de la croissance tumorale. Ce ralentissement de la croissance est nettement visible quand la courbe du groupe 8 (MRT 24h après injection IT de NF dorées) est comparée à celle du groupe témoin 1 (aucun traitement), du groupe 2 (injection IT de NF dorées) et du groupe 4 (traitement par MRT 24h sans injection de nanoparticules). La courbe du groupe 4 se distingue des courbes des groupes 1 et 2 : le décalage observé dans la croissance reflète l'effet bénéfique du traitement par radiothérapie. Cet effet bénéfique est renforcé lorsque l'irradiation est effectuée 24h après injection de nanofleurs dorées puisque le décalage observé dans la croissance tumorale est encore plus important. Sous l'effet du traitement (MRT après injection IT de NF dorées), la croissance de la tumeur démarre plus tardivement. Les NF dorées exercent donc un effet radiosensibilisant qui permet un meilleur contrôle de la croissance tumorale. Ce retard de croissance est même plus important que celui observé pour le groupe 7 (MRT 24h après l'injection IT des nanoparticules d'or Au@DTDTPA). Avec la même quantité d'or injectée (l'élément radiosensibilisant commun à ces deux types de nanoparticules), la croissance tumorale est plus retardée lorsque l'irradiation est effectuée après l'injection IT de NF dorées. Cette différence entre NF dorées et nanoparticules d'or Au@DTDTPA pourrait s'expliquer par une meilleure rétention des nanofleurs dorées mis en évidence par imagerie nucléaire (chapitre 3) et par la présence de l'élément fer qui pourrait contribuer à l'effet radiosensibilisant comme il a été montré dans des nombreux exemples de la littérature⁷⁻⁹. Même si l'effet radiosensibilisant du fer est moins important que celui de l'or, du fait d'un numéro atomique nettement plus faible ($Z_{Fe} = 26$ et $Z_{Au} = 79$), le grand nombre d'atomes de fer dans les nanofleurs dorées (6 fois plus de fer que d'Or) permet de compenser la faiblesse de l'effet radiosensibilisant du fer. La combinaison MRT et NF dorées est donc très intéressante pour ralentir la croissance tumorale mais elle procure des résultats moins prometteurs que ceux observés lorsque les animaux sont d'abord traités par HM puis par MRT 24h après injection IT de NF dorées. En l'absence des nanofleurs dorées, le traitement par HM 30min avant la MRT n'améliore pas le contrôle de la croissance tumorale car les courbes des groupe 5

(HM+MRT) et du groupe 4 (MRT) sont quasiment superposées. Comme évoqué précédemment, l'hyperthermie magnétique n'exerce aucun effet en l'absence d'agents superparamagnétiques. Bien que nous ayons constaté que la dissipation de l'énergie magnétique sous forme de chaleur observée dans la zone tumorale lors de l'application du champ magnétique alternatif après injection IT de nanofleurs dorées ne permettait pas le contrôle de la croissance tumorale (comparaison des groupes 3 et 6), son association avec le traitement par radiothérapie après injection IT des NF dorées limite considérablement la croissance tumorale. En effet la courbe correspondant au groupe 9 (HM+MRT+ NF-Au@DTDTPA) tend rapidement vers zéro. Un tel traitement inhibe la croissance de la tumeur qui pour la plupart des animaux a disparu.

Ce résultat paraît complètement inattendu au regard de l'évolution du volume tumoral du groupe 6 (HM + NF-Au@DTDTPA). Il semble indiquer que le traitement thermique ne peut à lui seul exercer un contrôle efficace de la croissance tumoral mais que la fragilisation qu'il induit offre une situation propice pour que l'effet radiosensibilisant des NF dorées s'exerce encore plus efficacement. Afin de comprendre, les raisons de l'efficacité du traitement combinant hyperthermie magnétique et radiothérapie (MRT) 24h après injection IT de NF dorées, des études à l'échelle sub-cellulaire sont nécessaires.

4.4. Conclusion

L'étude consacrée au pouvoir chauffant des NF dorées a mis en évidence leur capacité à chauffer leur environnement lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique alternatif de haute fréquence (20 mT, 335-521,9 kHz). Le pouvoir chauffant des NF n'est pas modifié par le greffage de nanoparticules d'or Au@DTDTPA.

Cependant l'élévation de température induite par les NF dorées sous l'effet d'un champ magnétique alternatif de haute fréquence ne permet pas de contrôler la croissance tumorale. Comparé aux travaux menés par l'équipe d'Alphandéry sur les nanoparticules d'oxyde de fer d'origine bactérienne⁶, ce constat est surprenant. Même s'il n'engendre pas d'inhibition de la croissance tumorale, le chauffage du microenvironnement tumoral induit par l'exposition des NF dorées à un champ magnétique n'est pas sans effet comme le montre le suivi de la croissance tumorale après un traitement combinant HM, MRT et injection IT de NF dorées. Un tel traitement assure une plus forte inhibition de la croissance tumorale que dans le cas de la MRT après injection IT de NF dorées. Le chauffage de la tumeur réalisé avant la radiothérapie semble exercer un effet bénéfique.

D'après cette étude comparative, les NF dorées présentent un potentiel prometteur pour le traitement de tumeurs solide car elles permettent de combiner avantageusement HM et MRT.

Références

1. Lartigue, L. *et al.* Cooperative Organization in Iron Oxide Multi-Core Nanoparticles Potentiates Their Efficiency as Heating Mediators and MRI Contrast Agents. *ACS Nano* **6**, 10935–10949 (2012).
2. Hugounenq, P. *et al.* Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers for Highly Efficient Magnetic Hyperthermia. *J. Phys. Chem. C* **116**, 15702–15712 (2012).
3. Johannsen, M. *et al.* Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group* **21**, 637–647 (2005).
4. Sadhukha, T., Niu, L., Wiedmann, T. S. & Panyam, J. Effective Elimination of Cancer Stem Cells by Magnetic Hyperthermia. *Mol. Pharm.* **10**, 1432–1441 (2013).
5. Hergt, R., Dutz, S., Müller, R. & Zeisberger, M. Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *J. Phys. Condens. Matter* **18**, S2919 (2006).
6. Alphanbéry, E., Faure, S., Seksek, O., Guyot, F. & Chebbi, I. Chains of Magnetosomes Extracted from AMB-1 Magnetotactic Bacteria for Application in Alternative Magnetic Field Cancer Therapy. *ACS Nano* **5**, 6279–6296 (2011).
7. Klein, S. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as novel X-ray enhancer for low-dose radiation therapy. *J. Phys. Chem. B* **118**, 6159–6166 (2014).
8. Klein, S., Sommer, A., Distel, L. V. R., Neuhuber, W. & Kryschi, C. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**, 393–397 (2012).
9. Hauser, A. K. *et al.* Targeted iron oxide nanoparticles for the enhancement of radiation therapy. *Biomaterials* **105**, 127–135 (2016).

Conclusion et perspectives

L'objectif de ces travaux de thèse consistait à développer des nanostructures hybrides pour mieux exploiter le potentiel radiosensibilisant des nanoparticules d'or Au@DTDTPA. Comme l'ont montré les travaux antérieurs de l'équipe NCM d'UTINAM, les nanoparticules Au@DTDTPA permettent de guider la radiothérapie par IRM. Il en résulte une amélioration de la survie de rats porteurs de gliosarcome 9L (tumeur cérébrale) dans l'hémisphère droit de leur cerveau lorsqu'ils sont traités par radiothérapie après injection IV. Bien que les résultats soient très prometteurs, leur potentiel semble sous-exploité en raison d'une élimination rénale trop rapide qui limite l'accumulation dans la tumeur par effet EPR. C'est la raison pour laquelle, nous avons développé des NF dorées constituées de NF de maghémite et de nanoparticules d'or Au@DTDTPA. Les NF ont été choisies pour jouer le rôle de transporteur biodégradable des nanoparticules d'or mais également pour conférer à la nanostructure hybride un comportement d'agents de contraste négatif pour l'IRM et d'agents chauffants pour l'hyperthermie magnétique.

Nous avons montré dans le cadre de ces travaux de thèse qu'il était possible de greffer les nanoparticules d'or sur les nanofleurs. Les conditions optimales pour réaliser un tel assemblage sont réunies lorsque :

- (i) les nanoparticules d'or Au@DTDTPA ont été au préalable fonctionnalisées par la dopamine (~ 10 dopamine/nanoparticules) ;
- (ii) le rapport nanoparticules d'or/nanofleurs dans le milieu réactionnel est de 200 ;
- (iii) le pH est de l'ordre de 5,5 ;
- (iv) et la température de 50°C pendant 24 heures.

En respectant ces conditions expérimentales, les NF dorées résultant du greffage des nanoparticules d'or sur les nanofleurs présentent une stabilité colloïdale à pH physiologique très supérieure à celle des NF sans nanoparticules d'or. L'amélioration s'explique par la présence de la couche organique DTDTPA très hydrophile qui adsorbée sur les nanoparticules d'or. En outre les charges négatives des groupements carboxylates présents dans cette couche de DTDTPA à pH physiologique sont à l'origine de forte répulsion électrostatique entre NF chargées négativement, comme le reflète la valeur du potentiel zêta (~ -40 mV à pH 7,4). Grâce au caractère superparamagnétique des NF de maghémite et à la présence de DTDTPA qui forme des complexes stables avec les radioéléments (¹¹¹In et ^{99m}Tc), la biodistribution des NF dorées a pu être suivie par IRM et TEMP après injection IT et IV. L'étude comparative de la biodistribution des NF dorées après injection IT à des souris porteuses de mélanomes A375 sc a montré que leur rétention dans la tumeur était supérieure à celle

des nanoparticules d'or Au@DTDTPA non supportées. De plus, le suivi par IRM et par TEMP associé au comptage post-mortem a montré que les NF dorées s'accumulaient en plus grande quantité dans la tumeur après injection intraveineuse à des rats porteurs de gliosarcome 9L dans l'hémisphère droit de leur cerveau. Cette étude a également révélé que le rapport de nanoparticule d'or entre la tumeur et les tissus sains était supérieur dans le cas des NF dorées. Les données collectées par l'imagerie montrent que l'utilisation de NF comme transporteur de nanoparticules d'or est très prometteuse car elle conduit à une accumulation plus importante et sur une rétention plus longue des nanoparticules d'or que dans le cas des nanoparticules d'or non supportées.

L'accumulation des NF dorées (après injection IT et IV) a été exploitée dans le cadre de traitement par radiation ionisante (radiothérapie). Dans tous les cas étudiés dans le cadre de cette thèse, les animaux traités par radiothérapie après administration de NF dorées présentent un retard de croissance des tumeurs, un accroissement de la durée de vie supérieure à celui des animaux traités par radiothérapie après administration de nanoparticules d'or Au@DTDTPA avec la même quantité en élément or. Ces expériences *in vivo* de radiothérapie confirment que le transport des nanoparticules d'or par les nanofleurs permet une meilleure exploitation du potentiel radiosensibilisant des nanoparticules d'or. Le rôle bénéfique des NF ne se limite pas au transport des nanoparticules d'or. Comme nous l'avons évoqué précédemment, le caractère superparamagnétique des NF a permis le suivi des NF dorées par IRM pondérée T₂. Ce caractère superparamagnétique en conférant un pouvoir chauffant aux nanofleurs lorsqu'elles sont exposées à un champ magnétique alternatif de haute fréquence, est également à l'origine d'un résultat extrêmement prometteur. Bien que le pouvoir chauffant des NF dorées exercent une influence très limitée sur le contrôle de la croissance, la combinaison de l'hyperthermie magnétique et de la radiothérapie a conduit à l'inhibition de la croissance tumorale après injection IT à des souris porteuses de mélanome. En d'autres termes, l'association des propriétés superparamagnétiques des NF de maghémite et du caractère radiosensibilisant des nanoparticules d'or procure un contrôle de la croissance tumorale très efficace.

L'utilisation de NF de maghémite comme transporteurs des nanoparticules d'or Au@DTDTPA est donc très prometteuse car elle permet à la fois une meilleure exploitation de l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'or et la combinaison de l'hyperthermie magnétique et de la radiothérapie pour un meilleur contrôle de la croissance tumorale. Ces résultats très encourageants ne sont cependant pas suffisants pour conclure définitivement sur l'intérêt de cet assemblage NF-Au@DTDTPA pour le traitement du cancer.

Parmi les différentes questions apparues au cours de la thèse et les points qui n'ont pas pu être abordés, la biodégradation des NF devra être étudiée de manière

approfondie afin de vérifier si la dissolution des NF s'accompagne du relargage des nanoparticules d'or. Une telle étude menée par l'équipe de Florence Gazeau (MSC, Paris 7) est au cœur du projet CARGOLD qui vise à exploiter les caractéristiques des NF dorées pour la détection de plaques d'athérosclérose vulnérables par imagerie simultanée IRM/TEP.

Une deuxième piste à explorer concerne l'optimisation du délai entre l'injection IV des NF dorées et le traitement par radiothérapie. Les expériences de radiosensibilisation effectuées au cours de la thèse ont été réalisées avec un délai de 10 minutes entre l'injection IV des nanoparticules radiosensibilisantes et l'irradiation. Ce délai avait été choisi car nous avons montré au cours de travaux précédents que ce délai procurait le plus grand accroissement de survie lorsque les nanoparticules Au@DTDTPA étaient utilisées comme nanoparticules radiosensibilisantes. Cela permettait ainsi de comparer l'effet des NF dorées avec celui des nanoparticules d'or dans les conditions optimales pour les nanoparticules d'or. Mais ce délai de 10 minutes n'est probablement pas optimal dans le cas des NF dorées. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer le délai qui garantirait un plus fort accroissement de la survie.

En outre, il serait pertinent de vérifier que les effets prometteurs observés en appliquant un rayonnement synchrotron le soient également en utilisant un mode d'irradiation plus conventionnel.

Si ces NF dorées présentent un réel intérêt pour le traitement du cancer par radiothérapie guidée par IRM et éventuellement combinée à l'hyperthermie magnétique, elles peuvent également se comporter comme sondes pour l'imagerie simultanée IRM/TEMP. Ces différents points seront abordés dans les projets NanoRX, CARGOLD et BIONANOCAR.

Résumé

Mots-Clés : Nanoparticules d'or, Nanoparticules d'oxyde de fer, Hyperthermie magnétique, Radiothérapie.

Dans les domaines de l'imagerie médicale et la thérapie, l'utilisation des nanoparticules est spécialement attrayante et prometteuse. Il est possible de concentrer dans une même particule plusieurs fonctions complémentaires comme la détection, le ciblage mais aussi la thérapie. Cette multifonctionnalité présente de nombreux avantages, et favorise le développement de nanoparticules pour une thérapie ciblée et guidée par l'imagerie.

C'est dans ce contexte d'intense activité centrée sur le développement des nanoparticules pour les applications médicales (imagerie et/ou thérapie) que s'est déroulé mon travail de thèse qui s'inscrit dans la continuité des travaux de Christophe Alric et de Pierre Hugouenq. Ils ont développé respectivement des nanoparticules d'or multifonctionnelles (Au@DTDTPA) et des nanofleurs d'oxyde de fer (γ -Fe₂O₃).

Les nanoparticules d'or (Au@DTDTPA) présentent un effet radiosensibilisant et se comportent comme agent de contraste pour l'IRM (après marquage par Gd³⁺ rendu possible par les propriétés chélatantes de la couche organique DTDTPA) ou comme radiotraceurs après radiomarquage (le DTDTPA forme des complexes stables avec ^{99m}Tc et ¹¹¹In). Le caractère superparamagnétique des nanofleurs d'oxyde de fer confèrent à ces objets la capacité à rehausser le contraste négatif des images et à induire un échauffement sous l'action d'un champ magnétique alternatif de haute fréquence.

L'objectif principal de ma thèse consistait à assembler ces deux types de nanoparticules afin de créer un objet nanométrique combinant les propriétés complémentaires des nanoparticules d'or et des nanofleurs d'oxyde de fer. Dans un premier temps, les conditions optimales de greffage des nanoparticules d'or sur les nanofleurs ont été déterminées. Nous avons montré que de tels agents présentaient après injection intraveineuse une biodistribution adaptée comme le révèlent les images acquises en IRM (grâce aux propriétés magnétiques des nanofleurs) et en TEMP (grâce au radiomarquage de la couche des nanoparticules d'or). En outre ces objets présentent un caractère radiosensibilisant qui est mieux exploité que celui des nanoparticules d'or entrant dans la composition de ces nanofleurs dorées. Associé au pouvoir chauffant des nanofleurs, le pouvoir radiosensibilisant des nanofleurs dorées a conduit à une forte inhibition de la croissance tumorale quand le traitement de rats portant un mélanome combine hyperthermie magnétique et radiothérapie après injection intratumorale des nanofleurs dorées.

En conclusion, le travail réalisé au cours de cette thèse a mis en évidence l'intérêt de combiner les nanoparticules d'or et les nanofleurs d'oxyde de fer pour traiter des tumeurs solides par thérapie guidée par imagerie.

Abstract

Keywords: Gold nanoparticles, Iron oxide nanoparticles, Magnetic Hyperthermia, Radiotherapy

In the fields of medical imaging and therapy, the use of nanoparticles is especially attractive and promising. It is possible to concentrate in the same particle several complementary functions such as detection, targeting but also therapy. This multifunctionality has many advantages and promotes the development of nanoparticles for targeted therapy and guided by medical imaging.

It is in this context of intense activity focused on the development of nanoparticles for medical applications (imaging and/or therapy) that my thesis work was carried out which is in continuity with the work of Christophe Alric and Pierre Hugouenq. They developed multifunctional gold nanoparticles (Au@DTDTPA) and iron oxide nanoflowers (γ -Fe₂O₃), respectively.

The gold nanoparticles (Au @ DTDTPA) exhibit a radiosensitizing effect and behave as a contrast agent for MRI (after labeling with Gd³⁺, made possible by the chelating properties of the organic layer DTDTPA) or radiotracers after radiolabelling (DTDTPA forms stable complexes with ^{99m}Tc and ¹¹¹In). The superparamagnetic nature of the iron oxide nanoflowers gives these objects the ability to enhance the negative contrast of the images and to induce heating under the action of an alternating magnetic field of high frequency.

The main objective of my thesis was to assemble these two types of nanoparticles in order to create a nanometric object combining the complementary properties of gold nanoparticles and iron oxide nanoflowers. In a first step, the optimal conditions for grafting gold nanoparticles on the nanoflower were determined. We have shown that, after intravenous injection, these agents exhibit a suitable biodistribution, as revealed by MRI images (thanks to the magnetic properties of nanoflowers) and SPECT (thanks to the radiolabeling of the gold nanoparticle layer). Moreover, these objects have a radiosensitizing character which is better exploited than that of the gold nanoparticles in the golden nanoflowers. Associated with the heating power of nanoflower, the radiosensitizing potential of golden nanoflowers has led to a strong inhibition of tumor growth when the treatment of rats carrying melanoma combines magnetic hyperthermia and radiotherapy after injection of golden nanoflower.

In conclusion, the work carried out during this thesis has highlighted the value of combining gold nanoparticles and iron oxide nanoflowers to treat solid tumors by imaging-guided therapy.