



HAL
open science

Synthèse et caractérisation de nanoparticules magnétiques répondantes pour des applications en thérapie cancéreuse

Zied Ferjaoui

► **To cite this version:**

Zied Ferjaoui. Synthèse et caractérisation de nanoparticules magnétiques répondantes pour des applications en thérapie cancéreuse. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Université de Lorraine, 2020. Français. NNT : 2020LORR0013 . tel-02877472

HAL Id: tel-02877472

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02877472>

Submitted on 22 Jun 2020

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université de Lorraine

École Doctorale Chimie Mécanique Matériaux Physique (C2MP)

THÈSE présentée par :

Zied FERJAOUI

Soutenue le : 27 avril 2020

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Lorraine**

Discipline/ Spécialité : **Sciences des Matériaux**

Synthèse et caractérisation de nanoparticules magnétiques répondantes pour des applications en thérapie cancéreuse

JURY

**Eric GAFFET
Halima ALEM-
MARCHAND
Souad AMMAR**

**Christine MENAGER
Florent MEYER**

Raphael SCHNEIDER

**DR1 (CNRS)
MCF (Université de Lorraine)
Membre Junior IUF
Professeur (Université de Paris
Diderot)**

**Professeur (Université de Sorbonne)
Professeur- PH (Université de
Strasbourg)**

Professeur (Université de Lorraine)

**Directeur de thèse
Co-directeur de
thèse
Rapporteur**

**Rapporteur
Examineur**

Examineur

Remerciements

Je tiens à remercier très chaleureusement mes directeurs de thèse, M. Eric GAFFET et Mme Halima ALEM-MARCHAND, qui ont développé ce projet au sein de l'équipe « Nanomatériaux et Santé » de l'Institut Jean Lamour (UMR 7198, CNRS – Université de Lorraine) et m'ont proposé de participer à leur travail de recherche. C'était un réel plaisir de travailler et d'échanger avec eux tout au long de ces trois années, avec une grande liberté et de nombreuses collaborations afin de mener ce projet à bon port. Ensuite, j'exprime toute ma reconnaissance envers Mme Halima Alem-Marchand. Je la remercie pour la confiance totale qu'elle m'a accordée. Son soutien, sa patience et son encouragement constant tout au long de mes travaux de recherches m'ont toujours stimulé dans mes investigations expérimentales. Merci beaucoup !

Je remercie également chaleureusement Prof Christine MENAGER, Prof Souad AMMAR, Prof. Florent MEYER et Prof. Raphael SCHNEIDER ; les membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Je remercie également Enaam JAMAL Al DINE, avec laquelle j'ai commencé mes premiers travaux de recherche. Je lui témoigner notre gratitude pour sa bonne humeur et l'excellente ambiance qu'elle a su développer au sein du groupe. Je veux dire ; Désolé Enaam ; car je n'arrive pas à trouver les mots appropriés retranscrivant exactement mes émotions et le plaisir que j'ai eus à travailler avec toi.

Un très grand merci à Sara NAHLE, membre de notre équipe de recherche à l'Institut Jean Lamour. Je la remercie vivement de m'avoir épaulé tout au long de cette recherche. Elle m'a tout appris sur les différentes évaluations biologiques *in vitro* qu'on a réalisées. En outre, la bonne humeur, l'ambiance, la dynamique, l'investissement du groupe m'ont permis de mener à bien ce projet.

Aussi, je remercie Mme Sophie MARCHAL et Mme Lina BOLOTINE de l'Institut de cancérologie de Lorraine avec lesquelles nous avons commencé à travailler sur les tests biologiques appliqués aux cellules cancéreuses.

Je remercie chaleureusement Dr. Damien MERTZ et Prof Sylvie BEGIN de l'Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg (IPCMS, UMR 7504 CNRS – Université de Strasbourg), Département de Chimie et des Matériaux Inorganiques (DCMI) pour les mesures d'hyperthermie magnétique.

Je remercie M. Abdelaziz MEFTAH, directeur de mon mastère à la Faculté des Sciences de Tunis (Tunisie), là j'ai été heureux de commencer ma formation durant ma licence de physique, puis de continuer celle-ci lors de mon mastère. Merci à vous de m'avoir transmis votre passion pour la recherche.

Ensuite, je souhaite remercier toutes les personnes que j'ai eu l'occasion de côtoyer au sein de l'Institut Jean Lamour pendant ces trois années qui m'ont parue très courtes tant que j'ai été heureux d'y travailler dans un climat chaleureux et empreint de confiance et de respect mutuel.

Je remercie toute ma famille, mes parents et mon frère Ahmed et mes sœurs Jihed et Wissal et toute ma famille qui réside à Lyon pour m'avoir soutenu pendant ces trois années qui ont été denses,

prenantes, motivantes et enthousiasmantes. Je suis très content que vous ayez pu assister à ma soutenance et je suis content d'avoir pu partager ce moment avec vous. Je remercie Francis GROSSE, pour tous les bons moments passés avec lui et notamment en la 1^{ère} année quand j'étais logé chez lui, qu'il m'a aussi permis de lui faire connaître la richesse de la cuisine tunisienne et aussi la chaleur explosive des piments tunisiens. Merci pour votre soutien, votre gentillesse, votre aide, votre patience et surtout votre humanité. Toutes ces qualités, la chaleur de votre accueil, votre sollicitude, sont pour moi les représentatifs des vertus et valeurs humanistes de ce merveilleux pays qu'est la FRANCE. Merci à tous mes amis qui m'ont soutenu tout au long de ces trois années.

Enfin un Grand merci pour mon pays la TUNISIE, qui m'a toujours impulsé l'énergie, le courage etc... J'espère qu'un jour, vous viendrez dans ma magnifique région montagneuse et je serai heureux de vous faire goûter l'hospitalité de notre maison. Merci à mon pays de naissance, que j'aime beaucoup.

Merci !

Abréviations

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PDT	Photodynamic therapy
PS	Photosensibilisateur
EPR	Effet de <i>perméabilité</i> et de <i>réretention</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
NPs	Nanoparticules
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PDT	Photodynamic therapy
PS	Photosensibilisateur
EPR	Effet de <i>perméabilité</i> et de <i>réretention</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
NPs	Nanoparticules
NPMs	Magnetic nanoparticle
SPMNP	Superparamagnetic nanoparticles
SPIONs	superparamagnetic iron oxide nanoparticles
PEG	Polyéthylène glycol
PNIPAAm	Poly (N-isopropylacrylamide)
SRE	Système réticulo-endothélial
SAR	<i>Specific absorption rate</i>
CMPTMS	((Chlorométhyl) phényléthyl) triméthoxysilane
MEO ₂ MA	Méthacrylates d'Oligo (éthylène glycol) 2-méthoxy
PRC	Polymérisation radicalaire contrôlée
ATRP	<i>Atom transfer radical polymerization</i>
NMP	<i>Nitroxide-mediated polymerization</i>
AF	Acide folique
RAFT	Reversible addition-fragmentation chain-transfer
DOX	Doxorubicine
E _a	Energie d'activation
LCST	<i>Lower critical solution temperature</i>
UCST	Upper critical solution temperature
DRX	Diffraction des rayons X
IR-TF	Fourier-transform infrared spectroscopy
HR-TEM	<i>High-resolution transmission electron microscopy</i>
ILP	Puissance intrinsèque de perte
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DMF	N- Dimethylformamid
MNC	Magnetic nanocomposite
DLC	<i>Drug loading contents</i>
DLE	<i>Drug loading efficiency</i>
UV-vis	Ultraviolet-visible
AFM	Champ magnétique alternatif
MTX	Méthotrexate
CDF	Cancer Drugs Fund
CLSM	Microscope confocal à balayage laser
R _H	Rayon hydrodynamique
ZnO	Oxyde de zinc
IRM	Imagerie par résonance magnétique
FeCl ₃	Le chlorure de fer(III)
FeSO ₄	Le sulfate de fer(II)
TMAH	Tétraméthylammonium
T _B	Temperature de blocage

PBS	Le tampon phosphate salin
CHMP	Comité des Médicaments à Usage Humain
EMA	Agence européenne des médicaments
pH	Potentiel hydrogène
PTX	Paclitaxel
MP	Milieu physiologique
5-FU	5-Fluorouracile
PEI	Polyéthylèneimine
TEP	Tomographie par l'émission de positons
Mn ₃ O ₄	L'oxyde de manganèse
ATG	Acide thioglycolique
PLA	L'acide polylactique
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
Fbg	Fibrinogène
HSA	Human Serum Albumin

Sommaire

1	INTRODUCTION GENERALE	9
2	CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART, LES NANOVECTEURS HYBRIDES POUR LA DELIVRANCE D'AGENTS ANTICANCEREUX	12
2.1	INTRODUCTION	12
2.2	LE CANCER	12
2.3	LES TRAITEMENTS ACTUELS DU CANCER	13
2.3.1	La radiothérapie	13
2.3.2	Photothérapie dynamique (PDT)	13
2.3.3	La chimiothérapie et les effets secondaires	14
2.4	LE NANOSYSTEME POUR LA CHIMIOOTHERAPIE	14
2.5	EVOLUTION DES NANOVECTEURS : VERS DES NANO-OBJETS DE PLUS EN PLUS PERFORMANTS	16
2.6	NOUVEAUX NANOVECTEURS A BASE DE NANOPARTICULES MAGNETIQUES	17
2.7	LES LIMITES ACTUELS DES NANOVECTEURS	22
2.7.1	Libération immédiate dès injection des nanovecteurs	22
2.7.2	Efficacité du chargement du principe actif	22
2.7.3	Formation d'une couronne de protéines	23
2.8	LES BRIQUES ELEMENTAIRES DE NOS NANOVECTEURS	25
2.8.1	Nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer	26
2.8.2	Les polymères thermosensibles :	28
2.9	PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE	34
2.10	REFERENCES	36
3	CHAPITRE 2 : FORMULATION DU NANOVECTEUR À BASE DES NANOPARTICULES D'OXYDES DE FER POUR LA DÉLIVRANCE D'AGENTS ANTICANCÉREUX	46
3.1	INTRODUCTION	46
3.2	MATERIELS ET METHODES	48
3.2.1	Matériels	48
3.2.2	Synthèse de nanoparticules superparamagnétiques de $Fe_3\text{-}O_4$	48
3.2.3	Silanisation des NPs de $Fe_3\text{-}O_4$	48
3.2.4	Fonctionnalisation des surfaces des NPs silanisées par le P(MEO ₂ MA _x -OEGMA _{100-x})	49
3.2.5	Encapsulation de la DOX	50
3.3	RESULTATS ET DISCUSSION	50
3.3.1	Analyse par spectroscopie infra-rouge	50
3.3.2	Analyse thermogravimétrique (TGA)	51
3.3.3	Morphologie, structure cristalline et taille des NPs	52
3.3.4	Comportement colloïdal des nano-objets dans les milieux physiologiques	55
3.3.5	Propriétés magnétiques des nano-objets	57
3.3.6	Interaction entre P(MEO ₂ M _x -OEGMA _{100-x}) et la DOX	59
3.3.7	Libération des principes actifs en fonction de la température	60
3.4	CONCLUSION	61
3.5	REFERENCES	63
4	CHAPITRE 3 : EVALUATION DES PERFORMANCES BIOLOGIQUES D'UN NANOVECTEUR MAGNETIQUE THERMOSENSIBLE	65
4.1	INTRODUCTION	65
4.2	MATERIELS ET METHODES	66
4.2.1	Matériels	66
4.2.2	Analyse de cinétique de libération de la DOX	66
4.2.3	Mesure d'hyperthermie	67
4.2.4	Caractérisation biologique	68
4.3	RESULTATS ET DISCUSSION	68
4.3.1	Profil de la libération et mécanisme du DOX en fonction de la température	68
4.3.2	Étude de la stabilité des NPs chargées en DOX à 20 ° C	70
4.3.3	Étude sur l'hyperthermie magnétique	71
4.3.4	Evaluation biologique	73
4.4	CONCLUSION	76
4.5	REFERENCES	77

5	CHAPITRE 4 : PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET PERFORMANCE THERAPEUTIQUE DE LA VECTORISATION DE LA SONDE $Fe_3\Delta O_4$ @ P(MEO₂M_x-OEGMA_{100-x}) MODIFIEE PAR L'ACIDE FOLIQUE.....	80
5.1	INTRODUCTION	80
5.2	MATERIELS ET METHODES	81
5.2.1	Modification de la surface des NPs fonctionnalisées par l'acide folique.....	81
5.2.2	Caractérisation biologique	82
5.3	RESULTATS ET DISCUSSION.....	82
5.3.1	Analyse du greffage de l'acide folique	82
5.3.2	Confirmation de la stabilité cristalline à chaque étape du greffage	83
5.3.3	Propriétés superparamagnétiques des NPs $Fe_3\delta O_4$ @ P(MEO ₂ M _x -OEGMA _{100-x}) -AF.....	84
5.3.4	Comportement colloïdal des nanovecteurs.....	85
5.3.5	Cinétique et mécanisme de la libération de la DOX.....	86
5.3.6	Étude de la stabilité du nanovecteur chargé en DOX à 37 ° C.....	87
5.3.7	Étude sur l'hyperthermie <i>in vitro</i>	88
5.3.8	Évaluations biologiques des nouvelles formulations.....	88
5.3.9	Internalisation des nanoparticules entières	90
5.4	CONCLUSION.....	91
5.5	REFERENCES.....	93
6	CHAPITRE 5 : ÉTUDES DES PROPRIETES DE LA FURTIVITE DES $Fe_3\Delta O_4$ @ P(MEO₂MAX-OEGMA_{100-X}).....	95
6.1	INTRODUCTION	95
6.2	MATERIELS ET METHODES	97
6.2.1	Matériels	97
6.2.2	Modification de la surface des NPs $Fe_3\delta O_4$ par (3-aminopropyl) triéthoxysilane ($Fe_3\delta O_4$ @NH ₂).....	98
6.2.3	Contact des NPs avec la HA et le Fbg.....	98
6.3	RESULTATS ET DISCUSSION.....	98
6.3.1	Préparation et caractérisation des NPs	98
6.3.2	Interaction entre les NPs cœur/coquille et les protéines	100
6.3.3	Propriété colloïdale des NPs cœur/coquille après contact avec protéine.....	102
6.3.4	Cinétique et mécanisme de la libération de la DOX après le contact avec les protéines.....	104
6.3.5	Etude de l'internalisation : Microscopie confocale.....	105
6.4	CONCLUSION.....	107
6.5	REFERENCES.....	108
7	SYNTHESE	111
7.1	REFERENCES.....	116
8	CONCLUSION GENERALE	120
8.1	L'ELABORATION ET LA CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES NPs DU TYPE CŒUR/COQUILLE ET L'ETUDE DE CES NANOSYSTEMES :	120
8.2	ETUDE <i>IN VITRO</i> DES NANOVECTEURS MAGNETIQUES POUR LA DELIVRANCE DE LA DOX SUR LES CELLULES SKOV-3 ET HT 29.....	120
8.3	ÉVALUATION <i>IN VITRO</i> DES NANOVECTEURS DE LA QUATRIEME GENERATION MODIFIEE PAR UNE MOLECULE DU CIBLAGE VIS-A-VIS DES CELLULES DU TYPE SKOV-3.....	121
8.4	ÉVALUATION <i>IN VITRO</i> DES PROPRIETES DE LA FURTIVITE DES NANOMATERIAUX	121
9	PERSPECTIVES	122
10	ANNEXE 1 : TECHNIQUES DE CARACTERISATIONS.....	124
10.1	DIFFRACTION DES RAYONS X (DRX).....	124
10.2	MAGNETOMETRE A SQUID	125
10.3	SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A LA TRANSMISSION DE FOURIER (IR-TF).....	125
10.4	DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE (DLS).....	126
10.5	MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A UNE TRANSMISSION HAUTE RESOLUTION (HR-TEM).....	127
10.6	SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE (UV-VIS)	128
10.7	ANALYSE THERMOGRAVIMETRIQUE (TGA).....	129
11	ANNEXE 2	131
11.1	SYNTHESE DE L'ACIDE FOLIQUE.....	131
11.1.1	Modification de l'acide folique :	131

11.1.2	Greffage de l'acide folique modifié à l'extrémité de la chaîne polymère.....	131
11.2	NANOPARTICULAIRES CŒUR/COQUILLE CHARGES EN DOX	133
11.3	NANOPARTICULAIRES CŒUR/COQUILLE MODIFIE PAR L'AF CHARGES EN DOX	134
11.3.1	Nanoparticulaires cœur/coquille chargés en DOX après le contact avec des protéines	134

Introduction générale

Le cancer est connu pour être une maladie dont les chances de rémission restent encore très modestes, c'est pourquoi de nombreux groupes de recherche de disciplines différentes concentrent leurs efforts dans la lutte anti-cancer. En effet, une étude récente du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC/IARC), qui dépend de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), prédit qu'en 2030, 12 millions de patients diagnostiqués pourront conduire à des décès^{1,2} dans le monde.

De nos jours la chimiothérapie, la radiothérapie et la chirurgie, sont les méthodes les plus efficaces et les plus communément utilisées pour lutter contre cette maladie. La chimiothérapie consiste à traiter les tumeurs par des produits chimiques qui peuvent être extraits de végétaux ou de produits issus de la synthèse chimique. Malheureusement les propriétés pharmaco-cinétiques sont faibles, les effets secondaires subissent par les patients ainsi que le développement des cellules résistantes à la médication limitent l'efficacité de la chimiothérapie actuelle.

Récemment, le développement des nanotechnologies pour le domaine de la médecine a permis de surmonter les limites des méthodes traditionnelles et d'ouvrir de nouvelles voies de traitements.

L'ensemble des applications des nanotechnologies en médecine a été rassemblé sous le terme de nanomédecine. Ainsi l'index thérapeutique de certains médicaments a pu peut-être augmenté³, l'administration de médicaments a pu être optimisée⁴, le développement de nouveaux agents thérapeutiques a aussi pu être opéré⁵. De plus en plus, les termes de « système intelligent » ou de « thérapie intelligente » sont employés dans le cadre de la nanomédecine^{4,6}. Par « intelligent » on qualifie des matériaux ou biomatériaux sensibles à l'environnement local, ou à un stimulus externe.

Dans le cadre de la thérapie cancéreuse, lors de la conception nouveaux nanosystèmes, il est nécessaire qu'ils puissent être utilisés comme un réservoir de médicaments, qu'ils puissent circuler dans le milieu sanguin sans être phagocytés et qu'ils permettent finalement le ciblage de la cellule cancéreuse et la libération du médicament. Or et malgré les nombreux progrès en nanomédecine dans le développement de vecteurs, deux obstacles restent à surmonter notamment : augmenter leur accumulation dans les tumeurs (avec un suivi *in situ*) et permettre leur élimination par le système immunitaire.

Parmi ces nano-objets, les nanoparticules (NPs) d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIOs) sont des candidats idéaux et bénéficient d'une grande attention depuis une vingtaine d'années. Et de surcroît, leurs propriétés spécifiques dues à leurs dimensions nanométriques et leurs formes permettent de moduler leur biodistribution dans l'organisme. La possibilité de revêtir ces NPs biocompatibles par des couches de polymères devrait permettre aussi d'améliorer la stabilité et la furtivité de ces nanomatériaux dans l'organisme, et de favoriser leur biodistribution.

Au cours de nos travaux, nous avons donc développé de nouveaux systèmes thermo-répondant basés sur un cœur SPIO capables, d'une part, de transporter un principe actif anticancéreux, i.e. la doxorubicine (DOX) et d'autre part de le relarguer dans le milieu physiologique à une température contrôlée. De plus, grâce aux propriétés d'hyperthermie magnétiques du cœur, il est possible d'envisager que ces objets puissent combiner un traitement par une hyperthermie et un relargage de la DOX.

Ce travail réalisé au sein de l'équipe « Nanomatériaux et santé », encadré par M. Eric Gaffet, Directeur de Recherche au CNRS et Mme Halima Alem-Marchand, Maître de Conférences à l'Université de Lorraine, s'inscrit dans un champ de recherches très actif ces dernières années.

Le rapport de thèse se compose de cinq Chapitres :

- Le premier Chapitre consiste en une introduction bibliographique,
- Le second Chapitre présente la synthèse et les propriétés physico-chimiques, physiques des nano-objets ainsi que leur efficacité en tant que réservoir de Doxorubicine,
- Le troisième Chapitre se concentre sur une étude approfondie pour les nanovecteurs élaborées dans le premier Chapitre en vue du traitement du cancer de l'ovaire.
- Le quatrième Chapitre porte sur les propriétés physico-chimiques, d'encapsulation et de vectorisation du nano-objet synthétisé dans le Chapitre 3 après modification par l'acide folique (AF).
- Enfin, le Chapitre 5 est consacré à l'étude des propriétés de furtivité de nos nouveaux nanomatériaux.

Les résultats de ce projet s'articulent en quatre étapes :

- i. formulation de nanovecteurs à base de NPs d'oxydes de fer pour la délivrance d'agents anticancéreux
- ii. étude *in vitro* des nanovecteurs magnétiques pour la délivrance de la DOX sur les cellules SKOV-3 et HT 29
- iii. évaluation *in vitro* des nanovecteurs de la quatrième génération vis-à-vis des cellules de type SKOV-3
- iv. évaluation *in vitro* des propriétés de furtivité des nanomatériaux

Ce travail a pu être effectué grâce aux collaborations avec les laboratoires suivants :

- ✓ Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, UMR 7274 CNRS – Université de Lorraine) pour la synthèse des NPs Fe_3O_4 et la mesure de la relargage de DOX par UV-vis.
- ✓ Institut de Cancérologie de Lorraine de l'équipe Mme Sophie Marchal pour les résultats préliminaires et les évaluations biologiques.
- ✓ Centre de Compétences Magnétisme et Cryogénie (Institut Jean Lamour, UMR 7198 CNRS – Université de Lorraine) avec M. Crosby Soon Chang pour la partie relative aux mesures magnétiques.
- ✓ Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg (IPCMS, UMR 7504 CNRS – Université de Strasbourg), Département de Chimie et des Matériaux Inorganiques (DCMI) avec M Damien Mertz pour les mesures d'hyperthermies.

Références

- (1) Eisenkop, S. M.; Spirtos, N. M.; Lin, W.-C. M. “Optimal” Cytoreduction for Advanced Epithelial Ovarian Cancer: A Commentary. *Gynecol. Oncol.* **2006**, *103* (1), 329–335
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.07.004>.
- (2) Vergote, I.; Amant, F.; Kristensen, G.; Ehlen, T.; Reed, N. S.; Casado, A. Primary Surgery or Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Interval Debulking Surgery in Advanced Ovarian Cancer. *Eur. J. Cancer* **2011**, *47*, S88–S92.
[https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(11\)70152-6](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(11)70152-6).
- (3) Jokerst, J. V.; Raamanathan, A.; Christodoulides, N.; Floriano, P. N.; Pollard, A. A.; Simmons, G. W.; Wong, J.; Gage, C.; Furmaga, W. B.; Redding, S. W.; McDevitta J. T. Nano-Bio-Chips for High Performance Multiplexed Protein Detection: Determinations of Cancer Biomarkers in Serum and Saliva Using Quantum Dot Bioconjugate Labels. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (12), 3622–3629.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.05.026>.
- (4) Peppas, N. A. Intelligent Therapeutics: Biomimetic Systems and Nanotechnology in Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56* (11), 1529–1531.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.07.001>.
- (5) Mikhail, A. S.; Allen, C. Block Copolymer Micelles for Delivery of Cancer Therapy: Transport at the Whole Body, Tissue and Cellular Levels. *J. Controlled Release* **2009**, *138* (3), 214–223.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.04.010>.
- (6) Hilt, J. Z.; Byrne, M. E. Configurational Biomimesis in Drug Delivery: Molecular Imprinting of Biologically Significant Molecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56* (11), 1599–1620.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.04.002>.

Chapitre 1 : Etat de l'art, les nanovecteurs hybrides pour la délivrance d'agents anticancéreux

1.1 Introduction

Depuis les années 1980¹, l'intérêt porté aux nanomatériaux a pris de plus en plus d'ampleur dans le cadre d'applications diverses et de domaines variés, de l'énergie, la catalyse, l'électronique et surtout le domaine biomédical. L'utilisation des nanotechnologies pour des applications médicales et la nanomédecine, est extrêmement prometteuse en raison de la taille réduite des nano-objets qui permet une exploration du vivant jusqu'au niveau cellulaire.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés au traitement du cancer par la théranostique. En effet, cette méthode peut traiter différents types du cancer quelle que soit leur localisation dans l'organisme avec une efficacité importante par rapport aux autres techniques thérapeutiques du cancer².

L'objectif de ce Chapitre est de présenter les notions de base nécessaires à la compréhension du travail exposé dans ce rapport. Nous rappellerons donc dans un premier temps les différentes stratégies employées dans le cadre de la thérapie cancéreuse ainsi que leurs limitations, en particulier, la technique de la chimiothérapie. Dans un deuxième temps, nous décrirons les différentes voies de la vectorisation développée afin d'améliorer les traitements par chimiothérapie. La troisième partie sera consacrée aux motivations conduisant le travail sur ces nanomatériaux et à l'efficacité de la méthode utilisée pour l'élaboration de ce nano-objet. Enfin, nous décrirons le choix du principe actif utilisé dans le traitement par rapport aux cellules cancéreuses utilisées au cours de notre projet.

1.2 Le Cancer

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'en 2030, le nombre de décès causés par le cancer s'élèvera à 12 millions (Figure I-1)^{3,4}. A travers cette statistique, cette maladie est donc un véritable problème de santé publique mondiale.

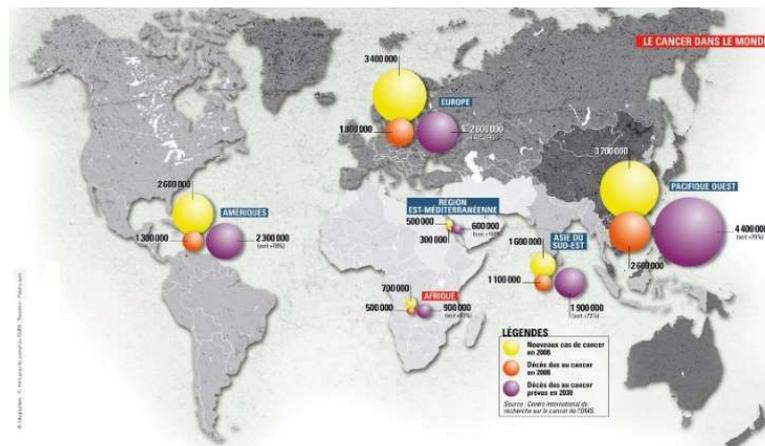


Figure I-1 : Statistiques des cancers dans le monde (d'après OMS^{3,4}) (Jaune : nouveaux cas de cancer en 2008, Orange : Décès cas au cancer en 2008 et Violet : Décès cas au cancer prévus en 2030).

Au niveau cellulaire, le cancer est caractérisé par une prolifération importante de cellules anormales formant une tumeur maligne. Ces cellules en division anarchique possèdent des propriétés

communes, c'est-à-dire une division et une croissance accélérée. Le phénomène d'apoptose sera quasi inexistant car les cellules cancéreuses sont capables de déréguler les voies de signalisation de la prolifération en leur faveur. Ainsi la survie des cellules tumorales est garantie par la combinaison d'une forte prolifération et d'une résistance accrue à la mort cellulaire. En effet, à partir d'une tumeur primaire, des cellules cancéreuses peuvent pénétrer et circuler après la pénétration dans les vaisseaux sanguins, lymphatiques et sanguins pour rejoindre des tissus sains, indépendamment de la distance par rapport au site tumoral, c'est ainsi que des métastases s'installent et se développent dans différents organes à partir d'un seul site malade⁵. En général, trois caractéristiques traduisent la présence d'une tumeur⁵:

- i) Hyperactivité des régulateurs de la prolifération,
- ii) Désactivation des gènes réparateurs d'ADN,
- iii) Inhibition des gènes limitant la réplication de l'ADN.

Les techniques curatives contre le cancer actuellement utilisées sont les décrites ci-dessous.

1.3 Les traitements actuels du cancer

Il existe de nombreux traitements⁶ notamment : radiothérapie⁷, thérapie photodynamique⁸ et la chimiothérapie², qui très souvent doivent être complétés par des soins dits « de support » qui ont pour rôle de gérer les effets secondaires afin de garantir au patient une meilleure qualité de vie.

1.3.1 La radiothérapie

C'est un outil de traitement locorégional des cancers. Cette technique consiste à utiliser des rayonnements pour détruire les cellules cancéreuses. Ainsi, les radiations ionisantes ciblant les cellules permettent de limiter leurs croissance et multiplication par la modification de leurs gènes pour une efficacité accrue du traitement, la dose délivrée doit induire des lésions suffisamment importantes dans le site cancéreux⁷.

1.3.2 Thérapie photodynamique (PDT)

La thérapie photodynamique (PDT) est une méthode anticancéreuse utilisée depuis les années 1980^{9,8}. Le principe de la PDT repose sur une réaction chimique activée par l'énergie lumineuse qui est utilisée pour la destruction sélective des cellules tumorales. Par conséquent, cette réaction nécessite la présence d'un photo-sensibilisateur (PS) dans la tumeur cible et d'une source lumineuse produisant des radiations à des longueurs d'ondes absorbées par le PS (Figure I.2)¹⁰. La réaction induite produit de l'oxygène singulet ou de radicaux hydroxyles qui possédant des effets cytotoxiques (Figure I-2). Cette technique du traitement est surtout utilisée dans le traitement des cellules précancéreuses et des carcinomes cutanés superficiels^{9,8}.

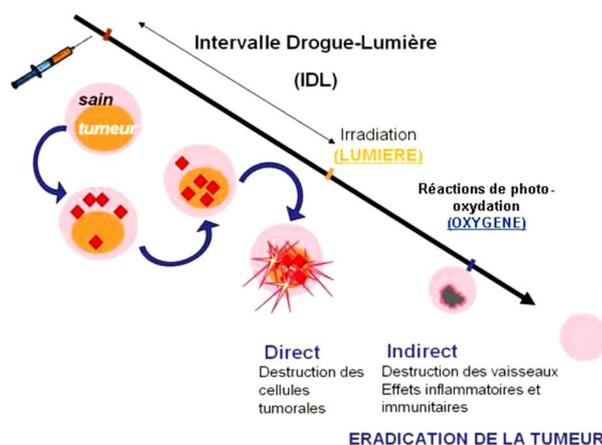


Figure I-2 : Principe de la photothérapie dynamique (PDT)¹⁰.

1.3.3 La chimiothérapie et les effets secondaires

La chimiothérapie est actuellement la technique la plus utilisée dans la lutte anti-cancer^{11,12}. Elle consiste à administrer des médicaments qui détruisent les cellules cancéreuses par différentes voies (orale, intra-péritonéale, intraveineuse, intramusculaire...)². Les médicaments utilisés lors de cette thérapie anticancéreuse sont également toxiques pour les cellules saines car ils altèrent la réplication de l'ADN et les phases de la multiplication cellulaire. En conséquence, chaque médicament utilisé lors du traitement peut produire des effets indésirables particuliers. Ainsi, les cellules sanguines, les globules blancs ou les cellules de l'appareil digestif se divisant très vite, sont souvent les plus touchés par ces effets.

Les effets secondaires généralement répertoriés sont les suivants¹³:

- ❖ L'immunosuppresseurs: diminution du nombre de globules blancs.
- ❖ L'alopécie (chutes des cheveux): ce phénomène est souvent temporaire.
- ❖ L'anémie (la fatigue)
- ❖ Autres effets: infertilité, nausées, vomissements

Actuellement, pour réduire ces effets secondaires, les chercheurs concentrent leurs efforts dans le développement de nouvelles stratégies afin que le médicament se dirige et se concentre plus spécifiquement sur les cellules cancéreuses ; ce qui permettrait de diminuer la dose administrée de médicaments anti-cancer par patient et ainsi limiter les effets secondaires subit par le patient. C'est ainsi que la notion donc le champ disciplinaire de la vectorisation a vu le jour. La vectorisation de vers l'environnement tumoral peut être passive ou active.

Dans les pages suivantes, nous décrirons ces deux mécanismes de vectorisation ainsi que les différentes générations des nano-objets utilisés actuellement pour le ciblage.

1.4 Le nanosystème pour la chimiothérapie

L'objectif principal du développement et de l'utilisation des nanosystèmes dans le traitement du cancer est de favoriser le ciblage, l'accumulation et la pénétration du principe actif au niveau de la cellule tumorale. Différentes approches en termes de conception de nanoparticules ont été développées dans le cadre du traitement du cancer. Peuvent être cités, les micelles de polymère, les liposomes, le graphène, les protéines ou les NPs d'oxyde de fer, de silice présentant des structures variables^{14, 15, 16} (Figure I-3). Ces nanomatériaux utilisés pour le transport et la libération d'agents thérapeutiques et/ou le diagnostic combinent souvent des propriétés de différents matériaux/macromolécules/molécules. Afin d'augmenter les performances thérapeutiques des nanomatériaux tout en maintenant leur biocompatibilité, et leur biodégradabilité, des ciblage vers les cellules cancéreuses ont été développés et rendus possibles via le greffage à la surface des nano-objets de molécules cibles tels polyamines, peptides ou anticorps, etc^{17, 18, 19}. Ces nouveaux objets sont communément appelés des vecteurs, qui ont la capacité de véhiculer de façon ciblée le principe actif vers les tumeurs.

Les trois mécanismes de ciblage décrits dans la littérature sont les suivants :

Ciblage passif: Les tumeurs solides sont caractérisées par des vaisseaux qui présentent des ouvertures de 200 nm en moyenne et jusqu'à 700 nm plus grandes que les vaisseaux sains (70 nm)^{20, 21}. Cette structure anormale présente une fuite pour les macromolécules, les NPs ainsi que les composés plasmatiques peuvent plus facilement s'accumuler dans la tumeur. En effet, la libération de composés thérapeutiques d'une manière passive au sein des tumeurs solides est décrite depuis une vingtaine d'année et est appelée l'effet EPR pour « Enhanced Permeability and Retention » (Figure I-4)²². L'utilisation de ce type de ciblage nécessite la formulation des nano-objets avec une taille comprise entre 50 et 200 nm afin d'éviter leur élimination par le foie et la voie rénale²³.

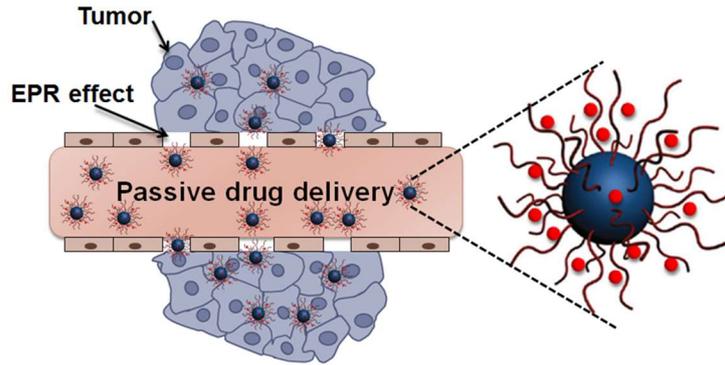


Figure I-3: Effet de perméabilité et de rétention (EPR)

Ciblage actif: la vectorisation active, est une approche alternative développée afin de contourner les limites du ciblage passif. Pour cette raison la plupart des nanovecteurs développés récemment ajoute une stratégie de ciblage actif biochimique et/ou physique à la formulation²⁴. Pour le ciblage biochimique, il s'agit de fonctionnaliser des vecteurs avec une molécule permettant une meilleure reconnaissance des cibles tumorales, notamment des ligands spécifiques de certains récepteurs surexprimés au niveau des cellules tumorales, et ces ligands peuvent aider au ciblage des cellules tumorales, mais aussi faciliter la pénétration des nanovecteurs au sein de ces cellules^{25, 26}.

A titre d'exemple, les recherches explorent la modification des NPs avec des ligands spécifiques, de façon à augmenter la spécificité de la capture par les cellules tumorales:

- ✓ Ligands pour le récepteur à intégrine²⁷
- ✓ Le récepteur au folate²⁸
- ✓ Des récepteurs spécifiques de certaines lignées cellulaires²⁹⁻³², et parmi eux des anticorps et des peptides, etc ...

L'exemple le plus connu est l'utilisation de l'AF son récepteur étant très largement surexprimé dans un bon nombre de types du cancers^{33, 34} (Figure I-4).

Dans nos travaux, nous avons modifié les NPs par l'AF car les NPs que nous avons développé dans ce travail de thèse seront testées sur les lignées cellulaires (SKOV-3), qui sont riches en récepteurs au folate à leur surface^{35, 36}.

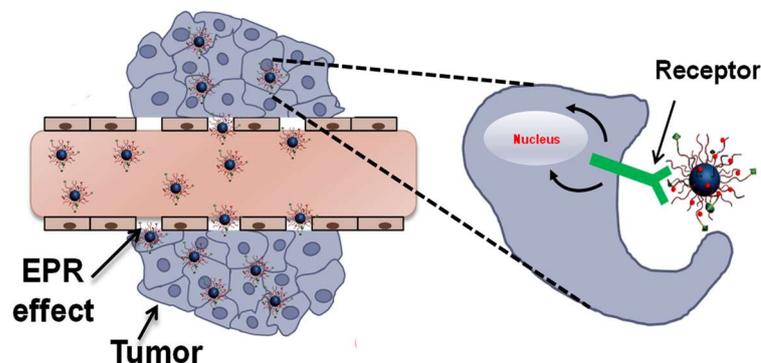


Figure I-4: Ciblage actif

Ciblage physique: À côté de ce ciblage actif de nature biologique, le concept de ciblage physique s'est développé dans les années 70', au moyen d'un champ magnétique appliqué au niveau des tumeurs. La vectorisation magnétique repose sur l'utilisation de NPs magnétiques, classiquement

à base d'oxydes de fer. Après l'injection systémique, l'application d'un champ magnétique externe focalisé sur la tumeur permet de concentrer les nanovecteurs au niveau de l'environnement tumoral³⁷.

Il est particulièrement adapté aux tumeurs solides superficielles³⁸. Un certain nombre important des travaux traitent ces nanosystèmes théranostiques^{38,39} (Figure I-5).



Figure I-5 : Schéma de la vectorisation magnétique et de l'accumulation de NPs en réponse à un champ statique⁴⁰.

Dans la suite de ce document (Chapitre 5.), l'accent sera porté sur les différentes générations de ces nano-objets ainsi que sur leurs limites et sur les améliorations nécessaires pour bénéficier d'un nanosystème, avec une activité cytotoxicité importante vis-à-vis les cellules cancéreuses.

1.5 Evolution des nanovecteurs: vers des nano-objets de plus en plus performants

Depuis l'élaboration des premiers nanovecteurs dans les années 70, les technologies de synthèse et de ciblage n'ont cessé de progresser vers l'élaboration de nanocomposites de plus en plus complexe et intelligent permettant le contrôle et le ciblage du médicament vers les cellules cancéreuses (voire pré-cancéreuses). La Figure I-6 présente les différentes générations des NPs développées et utilisées comme nanovecteurs de principes actifs.

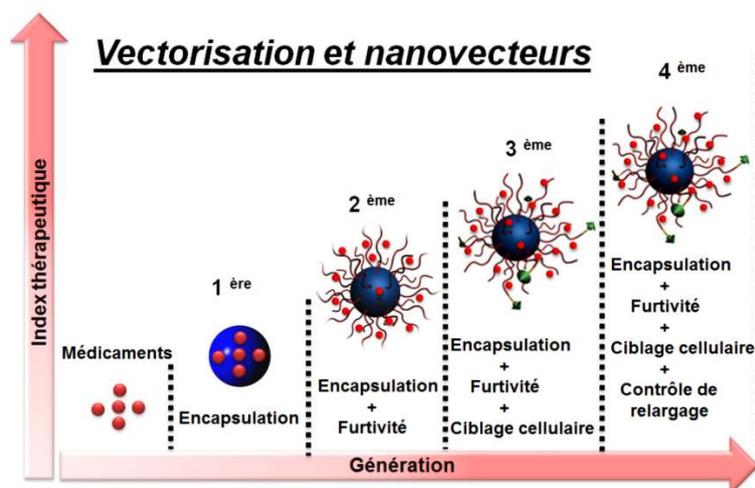


Figure I-6. Représentation schématique des générations des nanovecteurs

Actuellement, on parle de NPs de « première, deuxième, troisième et même de quatrième générations ». Ce classement prend en compte les améliorations apportées aux nanomatériaux pour surmonter les nombreux obstacles rencontrés *in vitro/in vivo*.

La première génération présente une capacité à associer efficacement les molécules d'intérêt mais sans aucune propriété de ciblage ni de furtivité. Cette génération se caractérise par une faible spécificité, une forte accumulation hépatosplénique (relative au foie et à la rate) et une durée de circulation réduite dans le sang. Les nanovecteurs de la première génération sont capturés très facilement par les cellules phagocytaires du système réticulo-endothélial (SRE), ce qui diminue fortement l'efficacité thérapeutique des molécules transportées.

La seconde génération des vecteurs présentent les mêmes caractéristiques que la première génération mais ils introduisent la notion de la « furtivité », permettant de diminuer leur élimination par le système immunitaire et leur accumulation dans le foie et la rate. L'introduction des chaînes polymériques hydrophiles neutres (très souvent le polyéthylène glycol, PEG), permet d'augmenter leur durée de circulation dans le sang. Cette faculté est très intéressante pour la fabrication des molécules anticancéreuses, car l'augmentation de la durée de circulation dans le sang, permet d'accroître son accumulation dans les tumeurs par l'effet EPR. On parle également du ciblage « passif ».

Aujourd'hui les nano-objets de la « **troisième génération** » intègrent le concept du ciblage actif, qui augmente la spécificité pour un site donné. Pour cela, des marqueurs du ciblage sont associés à la surface de la nanoparticule qui seront reconnus par des récepteurs présents dans les tissus ciblés^{41,42}.

Finalement, **la « quatrième génération »** dite « intelligente » ou encore « agile » (smart), reprend les nanovecteurs de troisième génération mais avec des composants réagissant à l'environnement extracellulaire. Cette quatrième génération montre une sensibilité aux différents facteurs extérieurs, tels que le pH, la lumière, la température et le champ magnétique. Nous allons citer dans ce paragraphe les travaux actuellement menés portant sur des nanovecteurs intelligents en traitement du cancer. En effet, de nombreuses publications se rapportent à l'utilisation des particules métalliques notamment à base d'or ou d'origine minérale^{43, 44}, magnétiques^{45,46,47}, ou encore des particules de silice⁴⁸, modifiées chimiquement par des ligands spécifiques dans le but d'assurer une bonne interaction avec les tumeurs. Les nanovecteurs de « quatrième génération » sont caractérisés par une libération du médicament par des mécanismes très complexes qui sont aujourd'hui de plus en plus optimisés⁴⁹. Dans ce contexte, il existe un grand nombre d'exemples de nanosystèmes permettant de libérer de manière contrôlée le principe actif et le cibler activement vers les cellules cancéreuses⁴³⁻⁴⁹.

Dans la partie suivante, nous nous sommes limités à citer des nano-objets de type cœur/coquille à base de NPs magnétiques et de polymères, permettant de déclencher la libération via un stimuli extérieur.

1.6 Nouveaux nanovecteurs à base de nanoparticules magnétiques

Les nanovecteurs actuels utilisés pour la libération de principe actif, sont formés par des matériaux sensibles à des stimuli variés. L'intérêt de la mise en œuvre de ces matériaux est d'augmenter l'efficacité thérapeutique de ces systèmes. Comme nous l'avons indiqué au début du Chapitre, ces stimuli peuvent être le pH, la température (qui peut être générée par des NPs magnétiques après l'excitation par AFM) ou bien à des réactions d'oxydo-réduction etc....

Dans ce contexte, on peut citer les travaux menés par Thorat *et al.*,⁵⁰ mettant en œuvre des NPs de $\text{La}_{0.7}\text{Sr}_{0.3}\text{MnO}_3$ fonctionnalisées par l'oleic acid-polyethylene glycol (PEG) dans lesquelles un principe actif anticancéreux a été encapsulé: la doxorubicine (DOX), une anthracycline de la famille des antibiotiques. La DOX permet de traiter une large variété de cancers, dont des leucémies, des cancers ovariens, et des cancers du sein avancés⁵¹ (Figure I-7). Les auteurs ont pu montrer par des évaluations biologiques (tests MTT) *in vitro*, où pour une concentration autour de $\sim 10.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DOX libérées par le nanovecteur conduit à une viabilité (Cellule MCF7) autour de $80 \pm 5\%$ sans AMF et une viabilité d'environ de $25 \pm 4\%$ avec AMF⁵⁰. Lorsque ces nano-objets étaient soumis à un champ magnétique alternatif (300 Oe, 267 kHz) dans un milieu physiologique, la solution pouvait atteindre une température d'environ 42°C après 10 min. Les chercheurs montrent le potentiel d'utilisation de NPs magnétiques revêtues du polymère dans le traitement efficace du cancer par la combinaison de la chimiothérapie et l'utilisation accrue de l'hyperthermie magnétique⁵⁰.

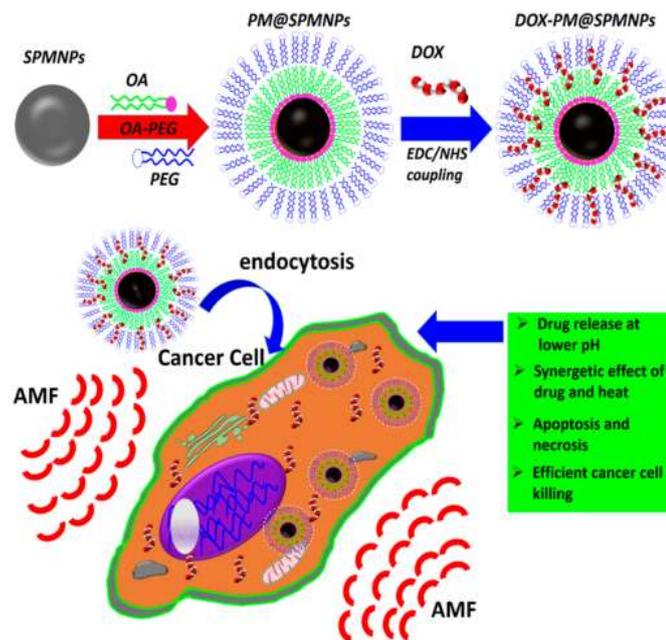


Figure I-7: : Nano-objet thermosensible⁵⁰.

Une autre option consiste à élaborer des nano-objets à partir d'un cœur sensible au champ magnétique et d'une coquille sensible à la température ; Binh T Mai *et al.*,⁵² ont ainsi élaboré des NPs magnétiques d'oxyde de fer de forme cubique fonctionnalisées avec un copolymère sensible à la température, P(DEGMA-co-OEGMA), et chargées de DOX pour la délivrance *in vitro/in vivo* dans les cellules cancéreuses (Figure I-8).

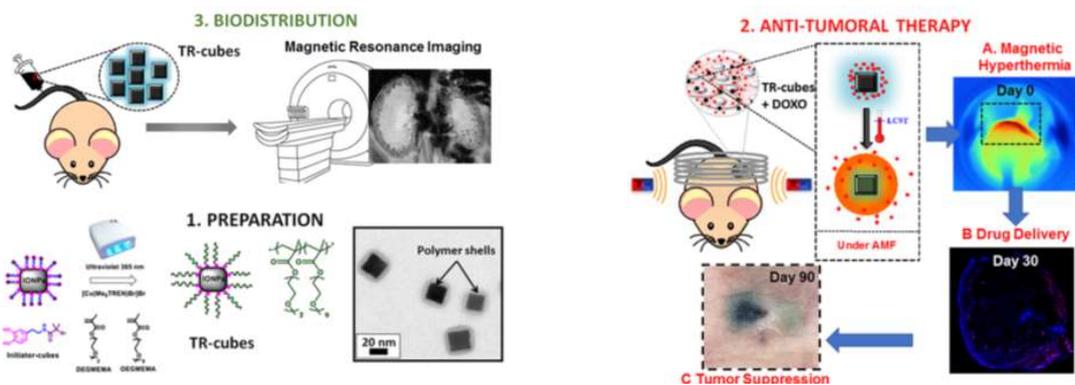


Figure I-8: Application *in vitro* et *in vivo* d'un nano-objet thermosensible⁵².

Cette étude *in vitro* montre une libération du principe actif dans de conditions physiologiques dépendant de la température. A une température $T = 40^{\circ}\text{C}$, environ 70% de la DOX a été libérés par le nanosystème après 4 heures. Cependant à $T = 25^{\circ}\text{C}$, il est observé une libération du principe actif d'environ 30% après 160 h. Cette libération du principe actif a été confirmée par microscopie confocale à balayage laser (CLSM) après une application par un champ magnétique, la libération de la DOX subcellulaire (*in vitro*) a été visualisée qualitativement. La Figure I-9 montre les images CLSM des cellules A431 lorsqu'elles sont incubées avec ces nanovecteurs chargés en DOX sans et avec un champ magnétique pendant 4 h ; l'internalisation de la nanoparticule avec la libération de DOX dans les cellules A431 a pu être démontrée (zone rose plus intense dans la figure I-9) . Finalement, ce nanosystème montre une haute efficacité dans le traitement du cancer par la combinaison de l'hyperthermie et le relargage de principe actif anticancéreux (Figure I-9).

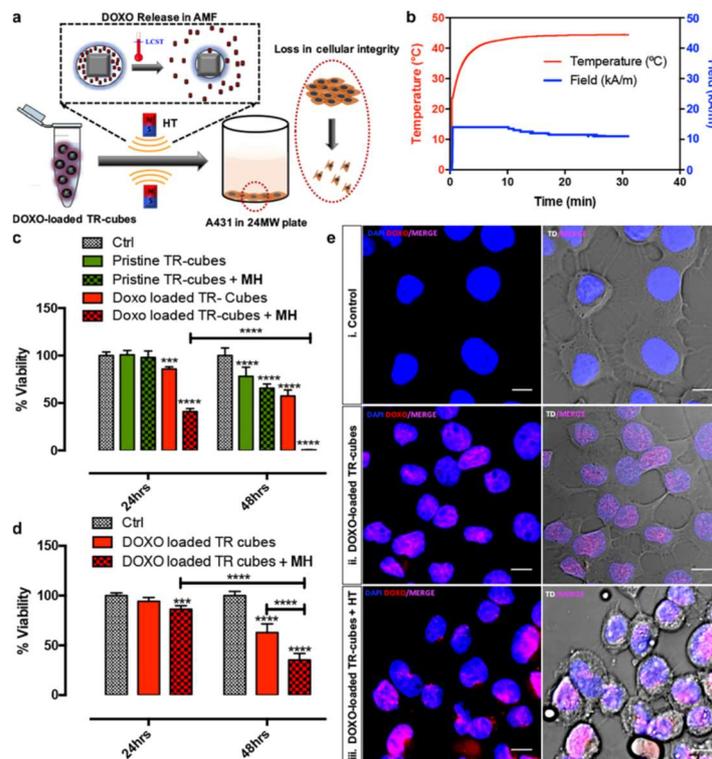


Figure I-9 : Viabilité de la cellule cancéreuse⁵²

La fabrication des nanovecteurs de quatrième génération à base de nanoparticules magnétiques a aussi été développée par Duy Luong *et al.*⁵³. Ils ont élaboré un nanosystème thermosensible via l'approche « Grafting-from », où la polyamidoamine (PAMAM) et l'AF ont été greffés sur des NPs d'oxyde de fer superparamagnétiques de forme sphérique ($\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4$) élaborés par la technique de coprecipitation. Ces chercheurs ont montré l'importance de l'AF comme une molécule de ciblage permettant de faciliter l'internalisation dans les cellules de type SKOV-3 (cancer de l'ovaire) et HeLa (cervical) par la présence des récepteurs sensibles au folate à leur membrane⁵³. L'internalisation des NPs a été étudiée par microscopie de fluorescence (Figure I-10), pour les nanovecteurs sans et avec AF après un contact de 6 heures avec les cellules de type SKOV-3 : une forte quantité des nanovecteurs avec AF a été observée autour des noyaux des cellules SKOV-3 par rapport aux nanovecteurs sans AF comme l'atteste la figure 1-10, où la DOX est visible en rouge et de manière plus concentrée lorsque les NPs greffées acide folique sont concernées.

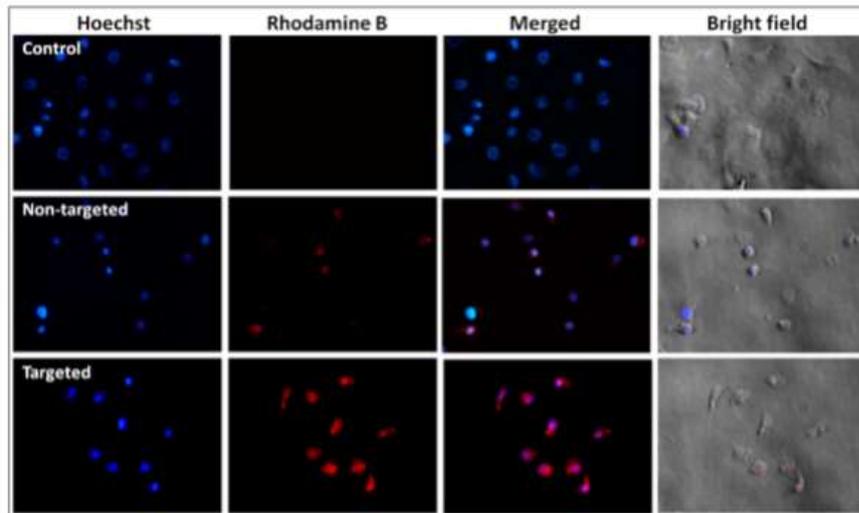


Figure I-10. Images obtenues par microscopie à fluorescence des cellules SKOV-3 incubées avec des NPs sans et avec des AF pendant 6 heures. Marquage des noyaux avec le Hoechst (fluorescence bleue) et des nanovecteurs avec le Rhodamine B (fluorescence rouge) ⁵³.

De plus les tests de cytotoxicité montrent une viabilité autour de 18% (SKOV-3) et 10% (HeLa) en présence de NPs greffées par AF alors que les cellules cancéreuses en présence de nanovecteurs sans acide folique présentent une viabilité d'environ 28% (SKOV-3) et 22% (HeLa) ⁵³.

L'utilisation d'AF comme une molécule de ciblage est très large, par exemple en s'appuyant sur les travaux réalisés par S.Rajkumar⁵⁴ *et al.*, des nanovecteurs magnétiques ($Fe_{3-\delta}O_4@Au$) ont été fonctionnalisés avec le méthoxy poly (éthylène glycol) (mPEG) et le poly-éthylène glycol lié à l'AF (PEG-AF) et chargées en DOX pour la délivrance *in vitro* dans les cellules cancéreuses HeLa (Figure I-11). Les NPs de $Fe_{3-\delta}O_4@Au$ modifiées par AF de tailles d'environ 18 et 38 nm ont une valeur de magnétisation de saturation (M_s) de 23 emu g^{-1} .

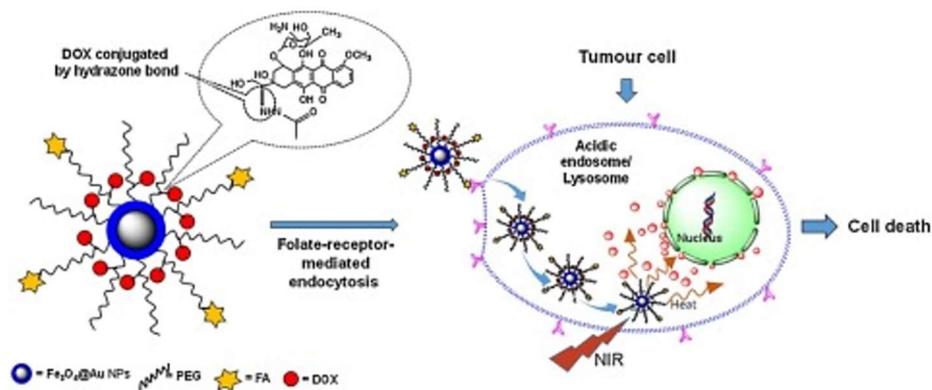


Figure I-11: Nanovecteurs de la quatrième génération⁵⁴.

Les NPs ainsi développées présentent une plus forte libération de médicament dans le milieu acide que dans le milieu alcalin doux en raison de la présence d'une liaison hydrazone sensible aux acides⁵⁴ ; à pH = 7, une libération d'environ 20% de la DOX a été observée par le nanovecteur après 70 heures alors que 100% de la DOX ont été relargués à pH = 5 dans le même intervalle de temps. En raison de la présence d'AF, les résultats de l'absorption cellulaire suggèrent que les NPs $Fe_3O_4@Au$ -PEG-AF ont une spécificité au ciblage vers les cellules HeLa qui surexpriment des récepteurs de AF⁵⁴. Des mesures d'internalisation *in vitro* des $Fe_{3-\delta}O_4@Au$ -mPEG et $Fe_{3-\delta}O_4@Au$ -PEG-AF sur les HeLa, pour une concentration de 10 $\mu g mL^{-1}$ de la DOX, montrent une forte internalisation des NPs

avec l'AF (microscopie de fluorescence après un contact de 6 heures avec les cellules HeLa⁵⁴). De même, les résultats *in vitro* obtenus par des images d'imagerie par la résonance magnétique (IRM), affichent une différence significative des intensités du signal T₂ lors de l'injection avec des NPs Fe₃-₈O₄@Au ciblées par AF⁵⁴, ce qui permet de confirmer que les NPs avec AF sont de meilleurs vecteurs, d'où l'importance de l'AF dans la voie du ciblage actif⁵⁴. De plus, l'importance de l'AF comme une molécule biologique a été confirmée par des tests MTT. En effet, une concentration 10 µg mL⁻¹ de DOX relarguée par Fe₃-₈O₄@Au-DOX-mPEG permet de réduire la viabilité à 60 ± 5% pour les cellules A549 et Hela. Par contre, les NPs Fe₃-₈O₄@Au-DOX-mPEG-FA présentent une la viabilité cellulaire d'environ 61 ± 3% après contact avec les cellules A549 et 22 ± 4% pour les HeLa qui sont plus riches en leurs membrane par les récepteurs folate que les A549⁵⁴. En résumé, les NPs Fe₃-₈O₄@Au-mPEG-AF semblent être des agents prometteurs pour la détection du col utérin (CCU) humain par IRM, et éventuellement aussi pour le traitement hyperthermal des tumeurs⁵⁴.

Sahoo et Banalata⁵⁵ ont mis au point une sonde multifonctionnelle à base de NPs de Fe₃-₈O₄ revêtues de copolymère poly (N-isopropylacrylamide)-bloc-poly (acide acrylique) sensibles au pH et à la température, synthétisées par la polymérisation par le transfert de chaîne réversible par l'addition/la fragmentation (RAFT) et modifiées par l'AF. La DOX a été chargée dans les nanoparticules et son comportement de libération a été étudié. Les travaux ont montré une libération de DOX dépendante de pH et de la température (Figure I-12).

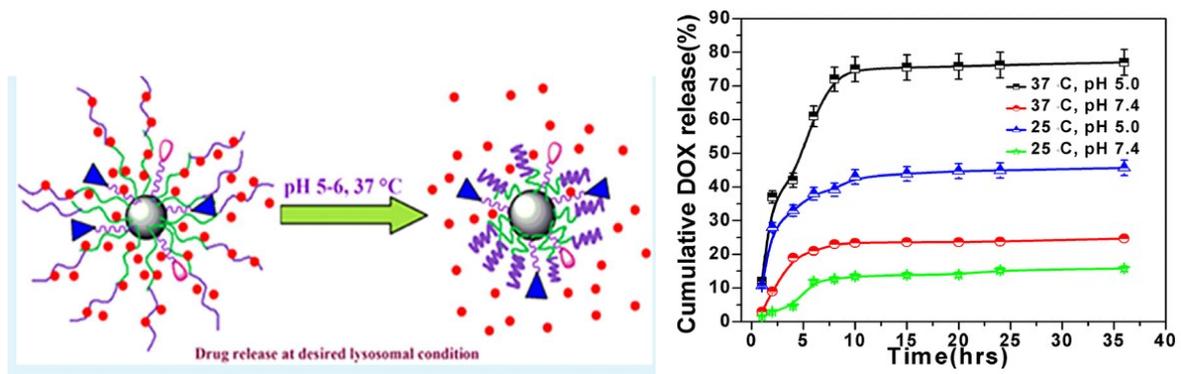


Figure I-12: Nanovecteurs de la quatrième génération⁵⁵.

La toxicité via des tests MTT, vis-à-vis des cellules L929 et HeLa montrent que les nano-objets chargés en DOX avaient une plus haute toxicité que la même concentration de DOX libre⁵⁵. De plus, pour une concentration de 100 µg.mL⁻¹ de la DOX relarguée par NPs vis-à-vis des L929 une viabilité d'environ 70 ± 3% a été montrée après 24 heures de traitement. Tandis qu'une viabilité des cellules Hela est autour de 19%. En effet, les tests MTT ont confirmés que les NPs sont sélectivement absorbées en périphérie des tumeurs HeLa qui sur-expriment à leur surface le gène FR- α ⁵⁵, alors qu'une faible absorption a été mesurée lorsque les récepteurs de ces mêmes tumeurs étaient bloqués.

Le Tableau I-1 regroupe des exemples illustratifs des NPs de type cœur/coquille étudiées dans la littérature ainsi que les améliorations chimiques apportées pour accroître l'efficacité du ciblage vers la tumeur.

Nanoparticule	Polymère	Propriété	Taille (nm)	Principe actif	Ligants	Cellule cancéreuse	Réf
La _{0.7} Sr _{0.3} MnO ₃	PM	pH	20-60	DOX	----	MCF7	50
IONPs	P(DEGMEMA-co-OEGMEMA)	Température	295	DOX	----	A431	52
Fe ₃ O ₄	PAMAM	Température	95.9	CDF	FA	SKOV-3	53
Fe ₃ O ₄	PEG	pH	36-42	DOX	FA	HeLa	54
MMSN	P(NIPAM-co-MAA)	Température-pH	255±28	DOX	FA	HeLa	55

Tableau I-1 : Nanovecteurs magnétiques pour la libération contrôlée de principe actif

1.7 Les limites actuels des nanovecteurs

Malgré tous les progrès réalisés, un certain nombre de verrous technologiques très importants demeurent. Parmi ces limites, nous décrirons dans ce manuscrit :

- le contrôle de la libération du principe actif⁵⁶,
- l'efficacité du chargement du médicament⁵⁷
- la formation d'une couronne de protéine à la surface des NPs⁵⁸.

1.7.1 Libération immédiate dès l'injection des nanovecteurs

Le but ultime de l'encapsulation d'un principe actif, est de maintenir le principe actif dans le vecteur et de le libérer au plus proche du site tumoral. En pratique, une fraction du principe actif est effectivement piégée, mais une autre, parfois plus importante, va s'absorber en surface de NPs. En conséquence, lorsque l'administration est réalisée par une voie intraveineuse, il y aura une libération immédiate et totalement incontrôlée du médicament. De plus, l'utilisation des certains polymères sensibles à la température (au-dessous de 37°C) conduit à une libération immédiate lors de l'injection⁵⁶.

1.7.2 Efficacité du chargement du principe actif

Le taux de charge de médicament reste à l'heure actuelle une limite importante. En effet plus ce taux sera élevé plus il sera possible d'envisager le relargage d'une quantité maximale de médicament sur le site malade. Ce dernier est généralement appelé dans la littérature DLC (pour Drug Loading Content - Charge de médicament contenu)

$$\text{DLC (\%)} = \frac{\text{masse de principe actif dans le NPs}}{\text{masse de NPs}} \times 100 \quad (\text{I} - 1)$$

La DLC renseigne sur l'efficacité du traitement car la quantité du médicament injectée est insuffisante et la performance du nano-objet est faible, ce qui va imposer d'administrer des grandes concentrations de nanovecteurs. L'apparition de nombreux effets secondaires, liés à la toxicité par une accumulation intracellulaire du matériau du nanovecteur sera donc à considérer.

L'efficacité de chargement de médicament est une grandeur largement utilisée dans la littérature. Elle renseigne sur la capacité du nanovecteur à encapsuler son principe actif. Plus cette dernière sera élevée, plus le nanovecteur sera considéré comme efficace car capable d'encapsuler un maximum de médicament dans un temps défini⁵⁷. Elle est connue sous le nom de DLE (pour Drug Loading efficiency - Efficacité du chargement du médicament)

$$\text{DLE (\%)} = \frac{\text{masse de principe actif dans le NPs}}{\text{masse de principe actif utilisée}} \times 100\% \quad (\text{I} - 2)$$

Des travaux importants sont réalisés par différentes équipes, pour élaborer de nouveaux objets qui pourront surmonter ces limites.

On peut citer dans ce champ, les travaux d'Aziliz Hervault *et al.*⁵⁹. Ils ont élaboré un nanosystème sensible au pH et à la température ; les copolymères composés par P(DEGMA-*co*-PEGMA-*b*-[TMSPMA-*co*-VBA]) ont été greffés sur des NPs d'oxyde de fer superparamagnétiques (Fe_{3-δ}O₄) d'une forme sphérique, synthétisées par polymérisation par le transfert de chaîne réversible par l'addition/ la fragmentation (RAFT)⁵⁹. Cette étude montre des valeurs de DLC d'environ 7,6% et DLE autour de 82,3%⁵⁹.

Un autre nanosystème formé par des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques hydrophobes fonctionnalisées par 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N- [méthoxyle (polyéthylène glycol) -2000] (DSPE-PEG 2000) a été élaboré par Chen Shen *et al.*⁶⁰. Les auteurs montrent que ces nanovecteurs permettent d'atteindre des valeurs de DLC autour de 14% et de DLE d'environ 67%.

Dans le même contexte, Yuhua Chen *et al.*⁶¹ montrent que l'utilisation d'une coquille formée par PDA-PGE (polydopamine-polyéthylène glycol) greffée à la surface des NPs Fe_{3-δ}O₄ est un bon candidat de polymère qui permet d'atteindre une valeur de DLC autour de 30%. Cette étude montre que les types d'interactions électrostatiques et π – π entre polymère (PDA) et la DOX permettent d'augmenter d'une part le taux de chargement de DOX dans le nano-objet et de le relarguer par une simple stimulation⁶¹. Le Tableau I-2 regroupe des exemples illustratifs des NPs de type cœur/coquille étudiées dans la littérature ainsi que leurs propriétés en termes d'efficacité de la charge et de libération du principe actif.

NPs	Polymère	Propriété	Principe actif	DLC (%)	DLE (%)	Réf
Fe ₃ O ₄	PAMAM	Température	CDF	9.81	----	55
Fe ₃ O ₄	P (DEGMA- <i>co</i> -PEGMA- <i>b</i> -[TMSPMA- <i>co</i> -VBA])	pH-Température	DOX	7.6	82.3	59
SPIONS	DSPE-PEG 2000	pH	DOX	14.45±0.55	67.45±2.82	60
Fe ₃ O ₄	PEG	pH	DOX	30.8	----	61
Fe ₃ O ₄	CS	pH	DOX		96	62

Tableau I-2 : Efficacité du chargement du principe actif de nanosystèmes à base de polymères et de NPs magnétiques^{53,61,59,55,60,62} (DLC : contenu de la charge du médicament et DLE : efficacité du chargement du médicament)

Malgré les progrès effectués pour élaborer des nanovecteurs avec des valeurs de DLC permettant d'augmenter l'efficacité du traitement, un autre obstacle à prendre en considération est l'absorption de protéine pouvant créer une libération immédiate lors de l'interaction des nanovecteurs avec le milieu biologique humain ou son élimination par le système immunitaire.

En conséquence, la partie suivante sera une étude dans le choix de polymère afin d'avoir une faible absorption de protéine à la surface de nano-objet.

1.7.3 Formation d'une couronne de protéines

Parmi les obstacles majeurs de ces nanovecteurs limitant le passage vers la phase clinique, nous pouvons citer l'absorption des protéines à la surface. Cette absorption peut influencer directement sur les propriétés des nanovecteurs. Une revue récente⁶³ montre que la formation d'une couche autour d'un nanovecteur peut influencer notamment la taille, la stabilité, les propriétés de surface, qui définissent leur absorption cellulaire, la pharmacocinétique, la biodistribution et la toxicité⁶³ (Figure I-13).

Par ailleurs, la couronne de protéine pourrait masquer les ligands de ciblage du nanovecteur et ainsi compromettre les capacités de ciblage⁶³. Des nombreux travaux étudient les interactions NPs-

protéines *in vitro*. Cependant la corrélation *in vivo* de l'interaction NPs-protéines avec les réponses biologiques susmentionnées n'a pas encore été évaluée de manière approfondie. Les interactions entre les protéines et les NPs limitent également la durée de vie de leur circulation en raison de la promotion de l'opsonisation et de la reconnaissance par le système phagocytaire mononucléé⁶³.

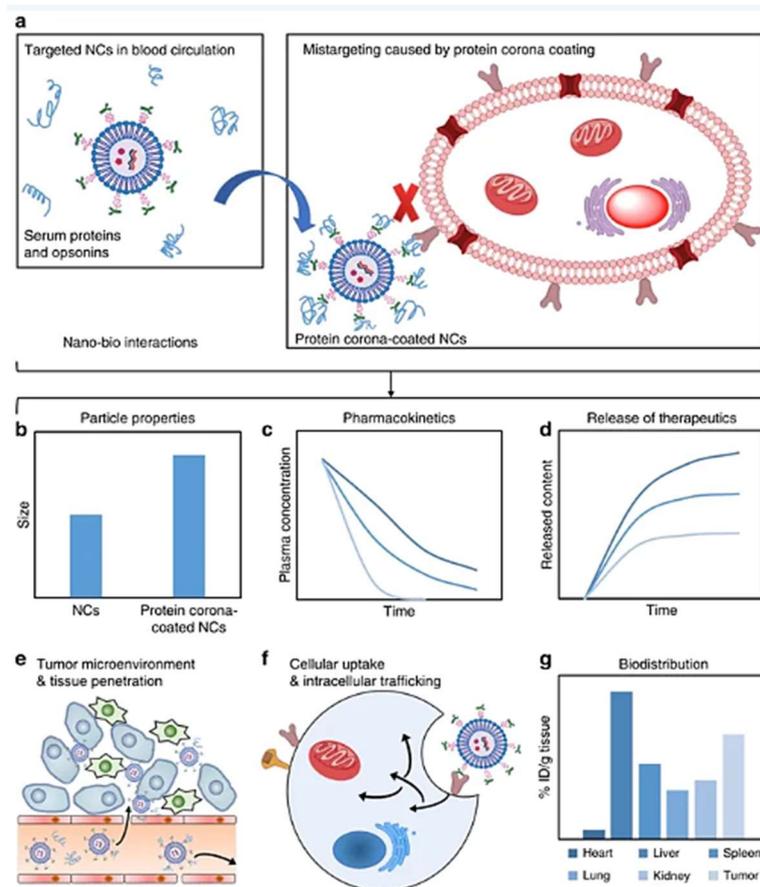


Figure I-13 : Conséquences de la formation d'une couronne de protéine autour d'un nanovecteur⁶³

Afin d'augmenter la furtivité, les nanovecteurs développés dans la littérature la stratégie communément utilisée est de contrôler l'absorption des protéines, ou empêcher totalement la formation d'une couronne à la surface. La modification des surfaces par des polymères⁵⁸, des multicouches de polyelectrolytes⁶⁴, ou par des protéines⁶⁵ peut être un moyen limitant l'absorption des protéines. Donc, un point important afin d'améliorer la furtivité ; c'est la détermination des différents mécanismes de l'absorption des protéines et des effets de cette couronne sur les propriétés intrinsèques des nanovecteurs⁶⁶.

Par exemple, dans le cas d'une injection intraveineuse, la formation d'une couronne de protéines sur le vecteur, lorsque celui-ci est un colloïde, influence sa biodistribution⁶⁷ : l'élimination des nanovecteurs par le foie et la rate sera accélérée par l'absorption des protéines de type fibrinogènes et immunoglobuline⁶⁷. Bien que l'accumulation de ces nanovecteurs chargés en principe actif au niveau de ses organes permette de créer un effet de toxicité, un défi majeur pour le ciblage actif des nanovecteurs est le contrôle de l'absorption des protéines pour assurer à la fois leur biocompatibilité et leur biodistribution. La modification des nanoparticules par le polyéthylène glycol (PEG) montre une efficacité importante pour empêcher la formation d'une couronne de protéine à la surface des nanovecteurs.

En s'appuyant sur le travail effectué par Walkey *et al.*⁶⁸, ayant élaboré un nanoobjet constitué de nanoparticules d'or, fonctionnalisées par le polyéthylène glycol (PEG). Les auteurs montrent qu'en fonction de la densité du PEG, l'adsorption des protéines est limitée. Comme le polymère est hydrophile, il favorise la solubilité des nanovecteurs augmentant ainsi leur circulation dans le sang.

Mais selon l'étude d'Owens *et al.*⁶⁹, la fonction principale de ce polymère est de constituer une barrière stérique entre les opsonines et le nanovecteur. Cette propriété empêche l'élimination rapide des vecteurs par le système réticulo-endothélial, alors on parle de vecteurs "furtifs".

Les travaux réalisés par Stathopoulos *et al.*⁷⁰, Martin *et al.*⁷¹, montrent que la durée de circulation dans le sang évolue de quelques minutes pour des NPs sans PEG à quelques heures voire quelques jours avec des nanoparticules modifiées par PEG.

Finalement, afin de limiter la formation d'une couronne à la surface, une étude *in vitro/in vivo* reste à réaliser dans le but de comprendre l'interaction protéine-protéine pour chaque nanovecteur élaboré dans cet objectif⁶³.

Dans ce but, de nouveaux systèmes ont été développés au cours de ce doctorat. Les objectifs de notre nanosystème sont :

- ✓ une capacité de charge permettant de détruire les cellules cancéreuses.
- ✓ un contrôle de libération du médicament en fonction de la température.
- ✓ la combinaison de deux techniques thérapeutiques (hyperthermie magnétique et chimiothérapie)
- ✓ le ciblage actif: l'utilisation d'un ligand (AF) et la vectorisation physique (par champ magnétique)
- ✓ une efficacité très importante dans la lutte des cellules cancéreuses.
- ✓ une furtivité importante exprimée par la non-absorption de protéine autour des NPs

1.8 Les briques élémentaires de nos nanovecteurs

Nous nous focaliserons dans la suite sur la fonctionnalisation de NPs $Fe_3\delta O_4$ par un copolymère thermosensible et modifié par l'AF. L'intérêt de cette méthode de couplage réside dans l'utilisation des conditions de réactions douces et dans l'extrême sélectivité de la réaction, ce qui permet d'éviter la formation de produits secondaires et celle de la couronne de la protéine autour de la surface. Ce nanovecteur magnétique offre de nombreux avantages comme les plateformes :

Tout d'abord, les oxydes de fer présentent une toxicité inférieure à celle des autres métaux et des autres oxydes métalliques⁷², le métabolisme du fer dans l'organisme est par ailleurs capable de gérer un apport externe relativement important⁷³.

De plus, ces NPs sont superparamagnétiques, c'est-à-dire qu'elles offrent une magnétisation importante dans le champ, tout en ne possédant pas de rémanence magnétique après leur exposition dans un champ magnétique^{74,75}. Elles sont donc indiquées pour réaliser un ciblage magnétique, tout en limitant les risques de la thrombose due à une agrégation magnétique hors du champ magnétique.

Par ailleurs, l'utilisation d'une coquille permettra de garantir la biocompatibilité et la stabilité de ces nanovecteurs.

Finalement, ces nanovecteurs, permettant à la fois la délivrance d'une molécule active et des applications en imagerie pour le diagnostic et/ou le suivi de la délivrance, sont très attendus comme

une nouvelle génération de nanovecteurs, pour des applications de type « théragnostique ». C'est donc un avantage que ne possèdent pas les NPs exclusivement de type polymères.

1.8.1 Nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer

Les particules $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ utilisées pour élaborer les nanovecteurs dans ce projet, ont une taille typiquement comprise entre 5 et 20 nm. La méthode d'élaboration de ces NPs est généralement la co-précipitation⁷⁶.

Les avantages de cette méthode sont⁷⁷:

- ❖ Un contrôle de la taille des NPs en fonction du pH,
- ❖ Une procédure expérimentale simple et réalisable dans un temps court (30 min)
- ❖ Un milieu aqueux pour éviter tout solvant toxique
- ❖ Une production des NPs bien dispersées.

Le diamètre des particules colloïdales est inférieur à l'épaisseur nécessaire à la formation d'une paroi de Bloch, limitant dans le matériau massif deux domaines magnétiques d'orientations différentes. Ainsi, ces particules dites monodomaines, sont définies comme des matériaux superparamagnétiques dont l'aimantation résiduelle en l'absence du champ magnétique est égale à zéro. Deux états équivalents de plus basses énergies sont alors obtenus, alignés parallèlement (spin haut) ou antiparallèlement (spin bas) à l'axe de facile aimantation (Figure I-14).

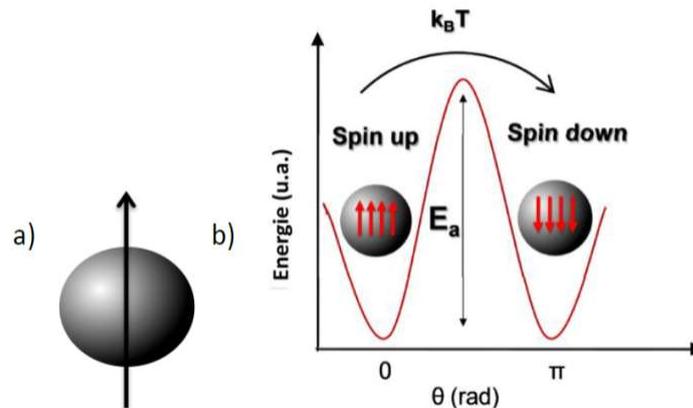


Figure I-14 : a) Représentation de l'axe de facile aimantation. b) Profil énergétique d'une nanoparticule en fonction de l'angle θ entre l'axe de facile aimantation et les moments magnétiques de spin pour une symétrie unidirectionnelle ⁷⁸.

L'énergie d'anisotropie magnétique, ou l'énergie d'activation E_a , correspond à l'énergie requise pour faire basculer les moments magnétiques d'un état à un autre. Elle est définie par la relation suivante (Équation I-3).

$$E_a(\theta) = KV \sin^2\theta \quad (\text{I-3})$$

où θ présente l'angle entre l'axe du facile aimantation et les moments magnétiques de spin, K la constante d'anisotropie, et V le volume.

En deçà d'une certaine température T, l'énergie thermique est inférieure à l'énergie d'activation. Les moments magnétiques sont donc orientés et bloqués selon les deux directions de plus basses énergies^{79,80}. Cependant, au-delà d'une certaine température nommée « température de blocage T_B », l'énergie thermique apportée au système est suffisante pour contre-balancer l'énergie d'anisotropie, les moments magnétiques de spin fluctuent librement entre les deux états stables iso

énergétiques, conduisant à une aimantation globale nulle du système. La température du blocage est donc la fonction de la constante d'anisotropie du système K et du volume V de la nanoparticule.

Les particules superparamagnétiques s'orientent le long de la direction du champ magnétique alternatif appliqué, créant une aimantation globale non nulle du système. Après la suppression du champ magnétique extérieur, les NPs relaxent selon deux mécanismes : Le premier mécanisme correspond à une relaxation interne du moment magnétique de spin. Il a été défini par Néel et il est caractérisé par un temps τ_N , selon l'équation (Équation I-4) (Figure I-15)⁸⁰. Cette inversion peut avoir lieu pour des NPs en suspension ou immobilisées.

$$\tau_N = \tau_0 \exp - E_a / k_B T \quad (I-4)$$

avec τ_0 un temps d'essai,
 E_a l'énergie d'anisotropie magnétique,
 k_B la constante de Boltzmann,
et T la température.



Figure I-15 : Représentation schématique de la relaxation de Néel.

La deuxième possibilité pour une particule superparamagnétique de s'aligner avec la direction du champ magnétique correspond à la rotation de la particule sur elle-même (Figure I-16).

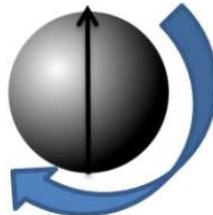


Figure I-16: Représentation schématique de la relaxation de Brown.

Il s'agit de la relaxation de Brown qui n'est possible qu'en suspension. Le temps nécessaire τ_B à cette relaxation est défini par la relation suivante (Équation I-5).

$$\tau_B = \frac{3R_H\eta}{k_B T} \quad (I-5)$$

où T présente la température,
 R_H le rayon hydrodynamique,
et η la viscosité du milieu.

Une application très prometteuse des NPs Fe_3O_4 superparamagnétiques dans le traitement du cancer s'appuie sur l'hyperthermie magnétique^{81,82}. Le principe consiste à augmenter la température de la cellule cancéreuse au-delà de la température normale. Une fois les NPs liées aux cellules cancéreuses, l'application d'un champ magnétique alternatif externe à haute fréquence permet d'échauffer localement la cellule cancéreuse. Cette élévation de température supprime uniquement

les cellules tumorales ciblées. *In vivo*, il a été observé que la majorité des tumeurs caractérisée par le fait que l'oxygène s'y trouve à une faible quantité et dans un milieu cellulaire acide, présentent une grande sensibilité à l'échauffement par rapport aux cellules saines⁸⁴.

Trois mécanismes sont responsables de cette génération de la température :

- les pertes par le courant de Foucault,
- les pertes par hystérésis,
- les pertes par la relaxation (brownienne et de Néel).

L'amplitude et la fréquence du champ magnétique appliqué ainsi que les propriétés des matériaux magnétiques sont les facteurs principaux pour avoir une efficacité de la transformation d'énergie importante⁸³. Pour déterminer cette efficacité, on utilise le SAR (Specific Absorption Rate ou taux d'absorption spécifique) défini par l'équation suivante :

$$\text{SAR} = C \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad (\text{I-6})$$

où C marque la chaleur spécifique du matériau en J/gK et correspond à la puissance du chauffage d'un matériau magnétique par gramme.

La détermination de la valeur SAR est importante puisque plus grande elle sera, plus la dose de matériau magnétique injectée au patient pourra être faible⁸⁵, pour une même quantité de chaleur délivrée.

L'ILP (the Intrinsic Loss Parameter ou puissance intrinsèque de perte), défini par Pankhurst *et al.*⁸⁵ est considéré comme une propriété intrinsèque des NPs car il est obtenu en normalisant le SAR par la fréquence et le champ magnétique comme indiqué ci-dessous (exprimé en nHm² K⁻¹)

$$\text{ILP} = \frac{\text{SAR}}{fH^2} \quad (\text{I-7})$$

Par conséquent, on peut directement comparer l'efficacité de chauffage entre différents nanosystèmes mesurés dans différentes conditions expérimentales en utilisant la valeur de l'ILP.

Pour un domaine de températures de 42 à 46°C maintenues durant quelques minutes, les cellules cancéreuses peuvent être détruites complètement. Ainsi, afin d'assurer un traitement efficace et de limiter leurs effets sur les cellules saines, il est important de déterminer la concentration et la durée de l'échauffement à appliquer. Une revue de la littérature portant sur le traitement thérapeutique par une hyperthermie magnétique appliquée à des cellules cancéreuses⁸³ ou directement *in vivo* sur des animaux a été réalisée. Même si les résultats sont encourageants *in vivo*, une application sur l'homme reste encore en phase d'évaluation. Des études prometteuses sont menées en combinant de différentes techniques thérapeutiques afin d'avoir une efficacité importante dans le traitement. Par exemple, la conjonction de l'hyperthermie magnétique avec une chimiothérapie⁸⁶ et une radiothérapie⁸⁷ a démontré une amélioration significative dans le traitement du cancer.

1.8.2 Les polymères thermosensibles :

Dans les ouvrages scientifiques consacrés à l'étude du traitement du cancer, les polymères sensibles à une variation de température sont très largement décrits⁸⁸. A une température bien définie, ce type de polymères passe d'un état hydrophile à un état hydrophobe, ou inversement.

Il existe deux classes de polymères thermosensibles :

- les polymères hydrophiles (dispersables) à une basse température et hydrophobes (non dispersables) à une haute température. Ce type de polymères présente une température critique inférieure de la solubilité (LCST, *Lower Critical Solution Temperature*).
- les polymères hydrophobes à une basse température et hydrophiles à une haute température, ces derniers supportent une température critique supérieure de la solubilité (UCST, *Upper Critical Solution Temperature*)⁸⁹.

A l'état hydrophile, les solutions aqueuses de polymères sont constituées d'une seule phase, au passage à l'état hydrophobe, la solution aqueuse est bi-phasique (polymère précipité dans le solvant). La Figure I-17 montre les diagrammes de phases des polymères pour LCST et UCST.

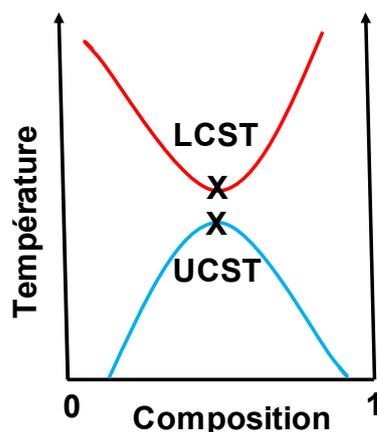


Figure I-17. Diagramme de phases de mélange binaire polymère-solvant présentant LCST et UCST.

La concentration volumique des polymères en solution, la masse molaire ainsi que la nature chimique de polymère et de solvant, sont des paramètres qui influencent directement sur la solubilité du polymère⁹⁰. Le Tableau I-3 montre la variation de LCST et UCST en fonction de la nature chimique des polymères. Les polymères présentant une LCST sont les plus étudiés dans la bibliographie pour des applications biomédicales alors que ceux qui ont une UCST sont minoritaires du fait de leur hydrophobie en dessous de leur LCST.

Polymère	Sigles	Type	T(°C)	Réf
Poly(N-isopropylacrylamide)	PNIPAM	LCST	30-35	54
Poly(N-isopropylméthacrylamide)	PNIPMAM	LCST	47	91
Poly(N-propylacrylamide)	PnPAM	LCST	10	92
Poly(2-(2-méthoxyéthoxy)éthyl méthacrylate)	PMEOMA (n=2)	LCST	26	93
Poly(éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate	POEGMA300 (n=4-5)	LCST	64	94
Poly(éthylène glycol) méthyl éther méthacrylate	POEGMA 475 (n=8-9)	LCST	90	95
Poly(N-acryloylasparaginamide)	PNAAM	UCST	4-28	96
Poly(N-acryloylglycinamide)	PNAGA	UCST	22-23	97
Poly(méthacrylamide)	PMA	UCST	57	98

Tableau I-3 : Exemples de polymères sensibles à la température (n : représente le degré de la polymérisation)^{54,91-98}

Dans ce travail, nous nous sommes concentrés sur l'encapsulation au sein d'un copolymère thermosensible, dont l'unité répétitive contient des dérivés poly (éthylène glycol) à base de (2-(2-méthoxy)éthyle méthacrylate et oligo (éthylène glycol)méthacrylate. Ce copolymère (détaillé ci-

dessous) ; a été choisi car il présente des propriétés de furtivité très intéressantes en empêchant l'absorption des protéines⁹⁹. Sa LCST peut être modulée et contrôlée en jouant sur le ratio des monomères qui le composent.

1.8.2.1 Généralité P(MEO₂MA-OEGMA) : le poly((2-(2-méthoxy) éthyle méthacrylate et oligo (éthylène glycol) méthacrylate))

Depuis les années 80, les oligomères d'éthylène glycol (EO) fonctionnalisés à leur extrémité par une fonction méthacrylate (EO_nMA) sont apparus dans la littérature (Figure I-18)^{100,101}. Ces composés sont appelés « macromonomères » car la fonction méthacrylate peut se polymériser comme un monomère.

Des travaux ont montré qu'il était possible d'obtenir des polymères à une architecture contrôlée via des procédés classiques de la polymérisation. Parmi les architectures obtenues actuellement, figurent des homopolymères (poly (EO_nMA) ou PEO_nMA) ou encore des copolymères à blocs amphiphiles ou des copolymères en peigne¹⁰².

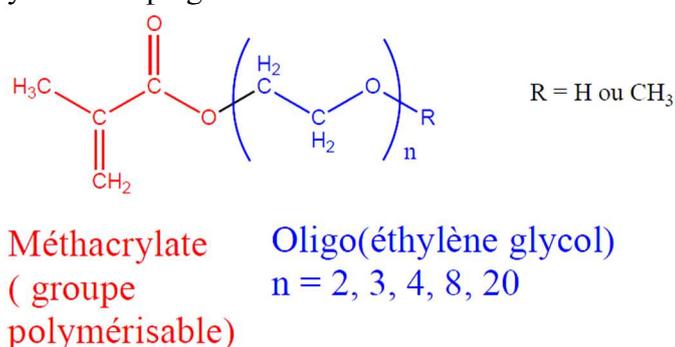


Figure I-18 : Formule générale des macromonomères méthacrylates d'Oligo (éthylène glycol). Les parties hydrophobes et hydrophiles de ce produit sont indiquées en rouge et bleu, respectivement.

Dans la littérature, on rencontre différents types de macromonomères EO_nMA dont la longueur de la chaîne d'Oligo (éthylène glycol) varie (n représente le degré de la polymérisation précis de la chaîne oligo (éthylène glycol)). Ces copolymères sont qualifiés de thermosensibles : leurs propriétés en solutions aqueuses sont modifiées sous l'action de la température^{103, 104}. Les copolymères possédant des parties PEO_nMA ont été utilisés pour la construction d'une grande variété des matériaux modernes tels que les transporteurs de principes actifs¹⁰².

Dans la suite, sera discutée la solubilité de P(MEO₂MA-OEGMA) dans un milieu aqueux.

1.8.2.2 Comportement colloïdal du P(MEO₂MA_x-OEGMA_{100-x})

Les PMEO_nMA possédant des parties poly (oxyde d'éthylène) présentent des propriétés intéressantes dans le milieu aqueux. En fonction de la longueur de leur chaîne latérale et de la nature du groupement terminal, les PMEO_nMA peuvent être insolubles/solubles dans la phase aqueuse. En fait, la proportion entre les parties hydrophobes et hydrophiles dans ces polymères est le paramètre qui détermine leurs propriétés dans les solutions. Cependant, les PMEO_nMA à très courtes chaînes latérales ne sont pas solubles dans l'eau (faiblement hydrophiles).

Un copolymère obtenu à partir du mélange du MEO₂MA (à longues chaînes latérales (2 unités d'EO)) et du OEGMA conduit à des polymères hydrosolubles thermosensibles ayant une LCST de 26°C et 90°C¹⁰⁵. En effet, les atomes d'oxygène des parties oligo (éthylène glycol) forment des

liaisons hydrogène stables avec de l'eau^{106, 107}, alors que le squelette carbone-carbone apolaire conduit à un effet hydrophobe concurrentiel¹⁰³.

A température ambiante, la solubilité dans l'eau est favorisée par la formation des liaisons hydrogènes entre les atomes d'oxygène des fonctions éther des chaînes oligo (éthylène glycol) et les atomes d'hydrogène de l'eau.

Au-dessus de la LCST, cet équilibre est perturbé et des interactions polymère-polymère deviennent thermodynamiquement favorisées par rapport aux interactions polymère-eau (Figure I-19), ce qui provoque la précipitation du polymère dans la phase aqueuse.

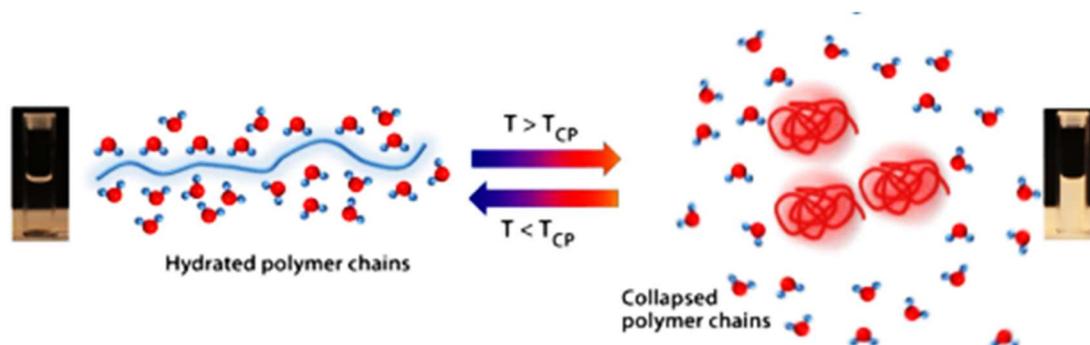


Figure I-19 : Mécanisme proposé pour expliquer la thermo sensibilité des PMEO_nMA [https://ultroxa.com/technology/].

Le P(MEO₂MA_x-OEGMA_{100-x}) présente une déshydratation réversible car il n'y pas de possibilité de créer des liaisons hydrogène fortes entre les chaînes oligo (éthylène glycol)¹⁰⁸. Les transitions des phases sont généralement réversibles (les comportements au chauffage et au refroidissement sont presque similaires).

Par exemple, on peut citer les travaux menés par Lutz *et al.*¹⁰⁹, qui ont préparé des copolymères par une copolymérisation statistique de MEO₂MA et OEGMA. Ils obtiennent des valeurs de LCST comprises entre 26 et 90 °C, pouvant être ajustées finement en faisant varier la composition du copolymère obtenu (Figure I-20).

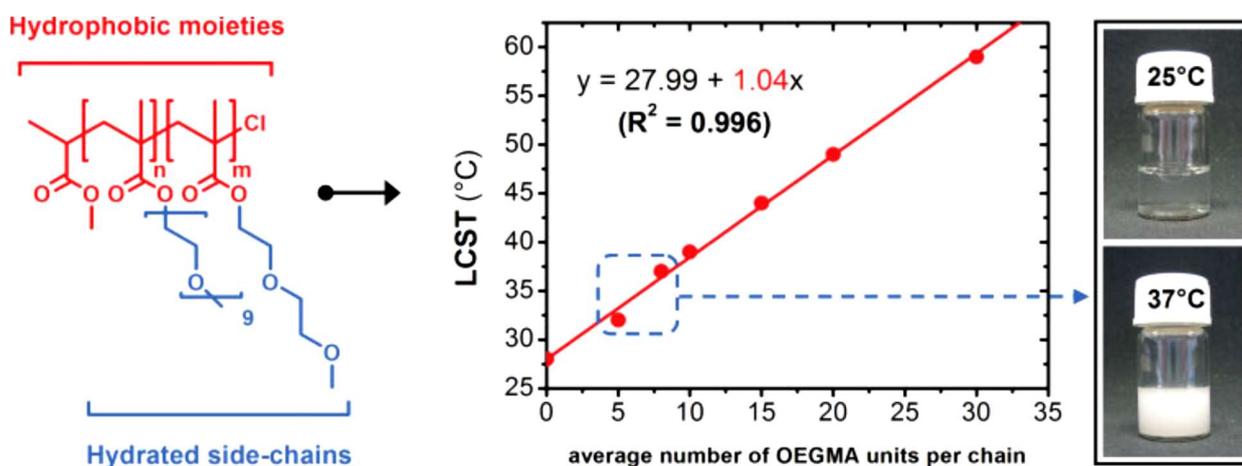


Figure I-20 : LCST des analogues du PEG en tant qu'une fonction du contenu des unités OEGMA¹⁰⁹.

Finalement, les transitions des phases bien définies ne peuvent être observées que pour les copolymères statistiques (constitué de macromolécules dans lesquelles la distribution séquentielle des

unités monomères obéit à des lois statistiques connues) préparés par l'une des techniques de polymérisations contrôlée ou vivante. En effet, la fraction molaire des MEO₂MA et OEGMA est le facteur principal qui influe sur la LCST¹⁰⁹, il est donc néanmoins essentiel de préparer ce copolymère avec une composition uniforme, ce qui est impossible à obtenir à partir d'une polymérisation radicalaire conventionnelle.

De plus, il existe toujours des écarts de composition qui bien qu'ils soient faibles, ont une influence sur les transitions de phases. Cela permet d'expliquer pourquoi les domaines des transitions de phases observées dans le cas des copolymères statistiques sont généralement un peu plus larges que pour celles observées pour les homopolymères.

1.8.2.3 Biocompatibilité de P(MEO₂MA_x-OEGMA_{100-x})

Comme il est mentionné plus tôt, les copolymères construits à partir des MEO_nMA peuvent être particulièrement utiles pour les applications dans le domaine biomédical. Les PMEONMA sont dits biocompatibles car ils sont composés principalement de segments oligo (éthylène glycol). Ces segments sont largement utilisés dans le domaine des biotechnologies car ils sont non chargés, solubles dans l'eau, non toxiques et non immunogènes.

Les premiers exemples d'applications biomédicales des poly (éthylène glycol) ont été publiés dès 1940¹¹⁰. La biocompatibilité des polymères de PMEONMA a été démontrée¹⁰⁹.

La Figure I-21 présente une comparaison de la cytotoxicité de divers PMEONMA et du poly (éthylène glycol) commercial⁹⁶.

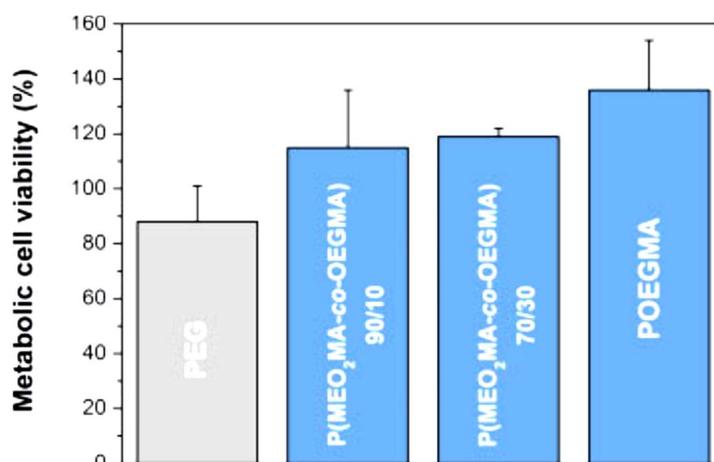


Figure I-21: Métabolisme de la viabilité cellulaire mesurée pour le carcinome hépatocellulaire humain (HepG2) des rangées des cellules incubées à 37 °C en présence du poly (éthylène glycol), un copolymère P(MEO₂MA-co-MEOMA₄₇₅), un copolymère P(MEO₂MA-co-MEOMA₄₇₅) ou d'un homopolymère PMEOMA₄₇₅¹⁰⁹.

Dans tous les cas, les essais cellulaires *in vitro* montrent une excellente biocompatibilité. Ainsi, le PMEONMA et le copolymère P(MEO₂MA_xOEGMA_{100-x}) ne conduisent pas à la mort cellulaire, même lorsqu'ils sont présents à des concentrations aussi élevées que 10 mg.mL⁻¹. Cependant, pour observer de tels résultats, les polymères doivent être soigneusement purifiés. En effet, certains résidus de la polymérisation peuvent être très cytotoxiques ; c'est par exemple le cas pour les monomères n'ayant pas réagi ou encore les polymères préparés par l'ATRP où les traces de catalyseur de cuivre peuvent induire une mort cellulaire importante¹¹¹.

1.8.2.4 Techniques de fonctionnalisation

Il existe deux voies pour obtenir des particules greffées :

- la première consiste à lier de manière covalente la particule et la couronne du polymère,
- la seconde repose sur la simple absorption des chaînes de polymère à la surface de la particule sans une formation de liaisons covalentes.

Cette dernière est un peu utilisée, puisqu'elle n'assure pas une bonne stabilité des objets formés qui sont thermiquement instables et très sensibles aux changements des solvants et peuvent être instables dans les milieux biologiques. En ce qui concerne la première voie citée il existe deux techniques du greffage : le « Grafting to » et le « Grafting from ».

Grafting to/from

La technique dite « **Grafting to** » permet de greffer des chaînes de polymère directement sur la surface¹¹². L'avantage de cette méthode est l'utilisation d'un très grand nombre de polymères différents de masses relativement élevées. De nombreux travaux ont été réalisés par cette méthode.

Mais dans l'objectif d'un fort taux d'encapsulation, il apparaît nécessaire d'avoir une densité du greffage élevée, celle-ci est possible via le « Grafting from » qui consiste à faire croître les chaînes de polymères directement à partir de la surface des particules. En effet, lors du grafting onto, la gêne stérique occasionnée par la structure des chaînes de polymères va limiter la densité de greffage. Il est possible de surmonter cela, en faisant croître les chaînes à partir de la surface. Ici la seule limitation est la recombinaison/le transfert des radicaux à la fin de la chaîne qui peuvent arrêter la polymérisation^{112, 113}. Pour cela, un amorceur de la polymérisation est greffé sur la surface des particules en mettant à profit la réactivité des groupements réactionnels portés par la particule. La réaction de polymérisation démarre alors à partir de ces amorceurs préalablement greffés de manière covalente, et la densité du greffage peut alors être largement supérieure à celle du « Grafting onto » (≈ 10 fois)^{114,115}. Cette méthode permet de contrôler la densité du greffage et, à être associée à des techniques de la polymérisation adéquates telle que la radicalaire contrôlée où la taille des chaînes greffées peut également être régulée. Le contrôle de ces deux paramètres est très important pour obtenir des nano-objets parfaitement bien définis (Figure I-22).

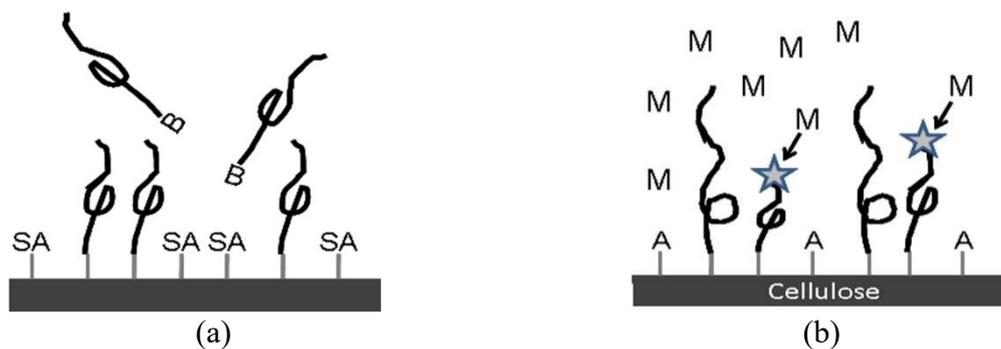


Figure I-22 : Greffages de chaînes du polymère par “(a) « grafting-to » et (b) « grafting-from ». SA : sites d’ancrages, B : fonctionnalité du polymère, A : amorceur, M : monomère

1.8.2.5 Technique de la polymérisation : ARGET-ATRP

L'objectif de cette section est de rappeler le mécanisme de la polymérisation que nous avons utilisée pour greffer la P(MEO₂Ma_x-OEGMA_{100-X}) à la surface de Fe_{3- α} O₄. En effet, la synthèse de nanoparticule cœur/coquille parfaitement bien définie nécessite de contrôler la croissance des chaînes de polymère via une polymérisation radicalaire contrôlée (PRC).

Trois principales techniques de PRC existent pour ce greffage de nano-objets :

- i. la polymérisation radicalaire par le transfert d'atome (Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP))
- ii. la polymérisation médiée par les nitroxydes (Nitroxide Mediated Polymerization (NMP))
- iii. la polymérisation par le transfert de chaîne réversible par l'addition/ la fragmentation (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT)).

Le procédé de la polymérisation choisi au cours de ce projet, est la polymérisation radicalaire par un transfert d'atomes (ATRP), à travers les activateurs régénérés par un transfert d'électrons (ARGET), ce procédé est connu sous l'acronyme ARGET-ATRP. Cette technique est une nouvelle méthodologie, basée sur l'ATRP et permettant de diminuer la quantité du catalyseur à l'échelle du ppm métallique à employer^{116,117,118,119}. Cette technique est une suite des travaux qui portaient sur la capacité des métaux au degré d'oxydation (n-1) à réduire les métaux du degré d'oxydation n+1 accumulés dans le système¹²⁰. Ainsi, l'ARGET-ATRP met en jeu des amorceurs halogénés (RX), un catalyseur d'ATRP à son degré d'oxydation n+1 (ex : Cu^{II}) et un agent réducteur. L'agent réducteur, étant incapable d'amorcer l'ATRP, réduit le catalyseur métallique Cu^{II} initialement introduit en une espèce au degré d'oxydation inférieur (ex : Cu^I) qui peut alors arracher l'atome halogène situé sur les amorceurs et permettre l'amorçage. Cet agent réducteur peut être le métal au degré d'oxydation n-1 (ex : Cu⁰), le 2-éthylhexanoate d'étain (II) (Sn (oct) 2)¹²¹, l'acide ascorbique¹²² ou la triéthylamine¹²³ ou encore tris(2-pyridylmetyl)¹²⁴ (Figure I-23). L'ARGET-ATRP peut être efficacement menée en présence d'une faible quantité d'air et d'une masse ou en miniémulsion¹²⁵.

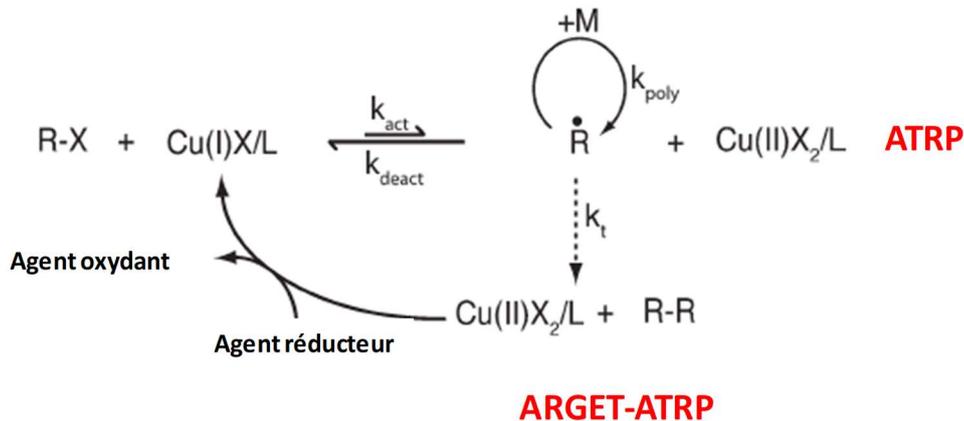


Figure I-23 : Principe de l'ARGET-ATRP, cas d'une macro-amorceur halogénée.

1.9 Présentation du travail de thèse

Cette thèse a été réalisée en collaboration avec de nombreuses équipes :

- Equipe « Nanomatériaux et Santé » (NaSa, Institut Jean Lamour, Nancy),
- Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP) (ENSIC Nancy),
- Institut de cancérologie de Lorraine,
- IPCMS (Strasbourg).

Ces travaux s'inscrivent dans la continuité de la thèse de Mme Enaam Jamal Al Dine qui a caractérisé et étudié la capacité de NPs ZnO@P(MEO₂MA-OEGMA) et des Fe_{3-δ}O₄@P(MEO₂MA-OEGMA), composées d'un cœur d'oxyde de zinc recouvert du copolymère P(MEO₂MA_x-OEGMA_{100-x}), à être employées en tant qu'agent en thérapie anticancéreuse^{112,77,129}.

L'objectif de ce travail consiste à réaliser le même type d'objet en remplaçant l'oxyde de zinc par l'oxyde de fer et en modifiant le nanosystème par l'AF. Les NPs d'oxyde de fer ont l'avantage

d'être facilement synthétisées, d'avoir une taille facilement contrôlable, et d'être fonctionnalisables. Elles présentent également une faible toxicité et peuvent servir de plateforme thérapeutique en combinant une double action par l'effet thermique et par le principe actif transporté.

Dans la première partie de ce projet, nous nous proposons d'élaborer des NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4$ d'une taille de 10 nm capables de pénétrer d'une manière passive (EPR) les tumeurs. Les NPs sont stabilisées et fonctionnalisées par le $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ qui est également utilisé comme un agent du ciblage actif (Figure I-24). Toutes ces NPs ont été caractérisées par la MET (Microscopie Electronique à Transmission), TGA, DLS et FT-IR.

En parallèle les principes actifs anticancéreux sont extraits, caractérisés puis encapsulés dans le copolymère préalablement fixé d'une manière supramoléculaire au $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$.

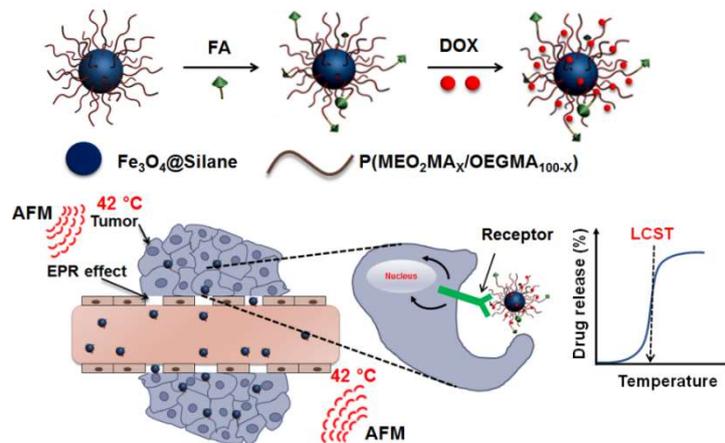


Figure I-24 : L'objectif de notre projet

Dans une seconde partie, et dans le cadre de l'amélioration du ciblage des cellules cancéreuses par les NPs de type cœur/coquille vers la cellule cancéreuse, nous nous proposons d'élaborer des NPs d'oxyde de fer fonctionnalisées par le $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ d'une part et par l'AF d'une autre part.

La fonctionnalisation de la fin de la chaîne du $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ par l'AF permettra d'améliorer la sélectivité et l'internalisation dans les cellules cancéreuses.

La DOX est encapsulée dans le composé obtenu afin d'étudier le contrôle de sa libération en fonction de la température et du temps.

Les propriétés d'hyperthermie de ces nano-objets sont décrites ainsi que leurs performances thérapeutiques sur les cellules cancéreuses *in vitro*.

1.10 Références

- (1) Devreese, J. T. Importance of Nanosensors: Feynman's Vision and the Birth of Nanotechnology. *MRS Bull.* **2007**, 32 (09), 718–725 <https://doi.org/10.1557/mrs2007.147>.
- (2) Loyer, P.; Bedhouche, W.; Huang, Z. W.; Cammas-Marion, S. Degradable and Biocompatible Nanoparticles Decorated with Cyclic RGD Peptide for Efficient Drug Delivery to Hepatoma Cells in Vitro. *Int. J. Pharm.* **2013**, 454 (2), 727–737 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.060>.
- (3) Eisenkop, S. M.; Spirtos, N. M.; Lin, W.-C. M. “Optimal” Cytoreduction for Advanced Epithelial Ovarian Cancer: A Commentary. *Gynecol. Oncol.* **2006**, 103 (1), 329–335 <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.07.004>.
- (4) Vergote, I.; Amant, F.; Kristensen, G.; Ehlen, T.; Reed, N. S.; Casado, A. Primary Surgery or Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Interval Debulking Surgery in Advanced Ovarian Cancer. *Eur. J. Cancer* **2011**, 47, S88–S92 [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(11\)70152-6](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(11)70152-6).
- (5) Ogata, M.; Matsukawa, K.; Kogusuri, K.; Yamashita, T.; Hikage, T.; Ito, K.; Saitoh, Y.; Tsutsumi, K. Gentian Extract Induces Caspase-Independent and Mitochondria-Modulated Cell Death. *Adv. Biol. Chem.* **2011**, 01 (03), 49–57 <https://doi.org/10.4236/abc.2011.13007>.
- (6) Sonnenschein, C.; Soto, A. M. Theories of Carcinogenesis: An Emerging Perspective. *Semin. Cancer Biol.* **2008**, 18 (5), 372–377 <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.012>.
- (7) Bhide, S.; Nutting, C. Recent Advances in Radiotherapy. *BMC Med.* **2010**, 8 (1). <https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-25>.
- (8) Moghissi, K.; Parsons, R. J.; Dixon, K. Photodynamic Therapy (PDT) for Bronchial Carcinoma with the Use of Rigid Bronchoscope. *Lasers Med. Sci.* **1992**, 7 (1–4), 381–385 <https://doi.org/10.1007/BF02594076>.
- (9) Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbely, M.; Moan, J.; Peng, Q. Photodynamic Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, 90 (12), 889–905 <http://doi.org/10.1093/jnci/90.12.889>
- (10) Brodin, N. P.; Guha, C.; Tomé, W. A. Photodynamic Therapy and Its Role in Combined Modality Anticancer Treatment. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2015**, 14 (4), 355–368 <https://doi.org/10.1177/1533034614556192>.
- (11) Liang, X.-J.; Chen, C.; Zhao, Y.; Wang, P. C. Circumventing Tumor Resistance to Chemotherapy by Nanotechnology. In *Multi-Drug Resistance in Cancer*; Zhou, J., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; Vol. 596, pp 467–488. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-416-6_21.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-416-6_21
- (12) Arruebo, M.; Vilaboa, N.; Sáez-Gutierrez, B.; Lambea, J.; Tres, A.; Valladares, M.; González-Fernández, Á. Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies. *Cancers* **2011**, 3 (3), 3279–3330. <https://doi.org/10.3390/cancers3033279>.
- (13) Coates, A.; Abraham, S.; Kaye, S. B.; Sowerbutts, T.; Frewin, C.; Fox, R. M.; Tattersall, M. H. N. On the Receiving End—Patient Perception of the Side-Effects of Cancer Chemotherapy. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1983**, 19 (2), 203–208. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(83\)90418-2](https://doi.org/10.1016/0277-5379(83)90418-2).
- (14) Maruyama, null; Ishida, null; Takizawa, null; Moribe, null. Possibility of Active Targeting to Tumor Tissues with Liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 40 (1–2), 89–102. <https://DOI:10.1016/j.addr.2010.09.003>

- (15) Couvreur, P.; Vauthier, C. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharm. Res.* **2006**, *23* (7), 1417–1450. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-0284-8>
- (16) Embleton, M. J.; Rowland, G. F.; Simmonds, R. G.; Jacobs, E.; Marsden, C. H.; Baldwin, R. W. Selective Cytotoxicity against Human Tumour Cells by a Vindesine-Monoclonal Antibody Conjugate. *Br. J. Cancer* **1983**, *47* (1), 43–49. <https://doi.org/10.1038/bjc.1983.5>
- (17) Tamarov, K.; Näkki, S.; Xu, W.; Lehto, V.-P. Approaches to Improve the Biocompatibility and Systemic Circulation of Inorganic Porous Nanoparticles. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (22), 3632–3649. <https://doi.org/10.1039/C8TB00462E>
- (18) Mir, M.; Ishtiaq, S.; Rabia, S.; Khatoon, M.; Zeb, A.; Khan, G. M.; ur Rehman, A.; ud Din, F. Nanotechnology: From In Vivo Imaging System to Controlled Drug Delivery. *Nanoscale Res. Lett.* **2017**, *12* (1). <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2249-8>
- (19) Lin, J.; Li, Y.; Li, Y.; Wu, H.; Yu, F.; Zhou, S.; Xie, L.; Luo, F.; Lin, C.; Hou, Z. Drug/Dye-Loaded, Multifunctional PEG–Chitosan–Iron Oxide Nanocomposites for Methotrexate Synergistically Self-Targeted Cancer Therapy and Dual Model Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (22), 11908–11920. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b01685>
- (20) Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor Vascular Permeability and the EPR Effect in Macromolecular Therapeutics: A Review. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2000**, *65* (1–2), 271–284. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(99\)00248-5](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(99)00248-5)
- (21) Zhao, Y.; Trewyn, B. G.; Slowing, I. I.; Lin, V. S.-Y. Mesoporous Silica Nanoparticle-Based Double Drug Delivery System for Glucose-Responsive Controlled Release of Insulin and Cyclic AMP. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (24), 8398–8400. <https://doi.org/10.1021/ja901831u>
- (22) Iyer, A. K.; Khaled, G.; Fang, J.; Maeda, H. Exploiting the Enhanced Permeability and Retention Effect for Tumor Targeting. *Drug Discov. Today* **2006**, *11* (17–18), 812–818. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.07.005>
- (23) Hoshyar, N.; Gray, S.; Han, H.; Bao, G. The Effect of Nanoparticle Size on *in Vivo* Pharmacokinetics and Cellular Interaction. *Nanomed.* **2016**, *11* (6), 673–692. <https://doi.org/10.2217/nmm.16.5>
- (24) Iwai, K.; Maeda, H.; Konno, T. Use of Oily Contrast Medium for Selective Drug Targeting to Tumor: Enhanced Therapeutic Effect and X-Ray Image. *Cancer Res.* **1984**, *44* (5), 2115–2121.
- (25) Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2008**, *5* (4), 505–515. <https://doi.org/10.1021/mp800051m>
- (26) Ruoslahti, E.; Bhatia, S. N.; Sailor, M. J. Targeting of Drugs and Nanoparticles to Tumors. *J. Cell Biol.* **2010**, *188* (6), 759–768. <https://doi.org/10.1083/jcb.200910104>
- (27) Jiang, J.; Yang, S.; Wang, J.; Yang, L.; Xu, Z.; Yang, T.; Liu, X.; Zhang, Q. Sequential Treatment of Drug-Resistant Tumors with RGD-Modified Liposomes Containing siRNA or Doxorubicin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *76* (2), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.06.011>
- (28) Bothun, G. D.; Lelis, A.; Chen, Y.; Scully, K.; Anderson, L. E.; Stoner, M. A. Multicomponent Folate-Targeted Magnetoliposomes: Design, Characterization, and Cellular Uptake. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2011**, *7* (6), 797–805.

- <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.02.007>.
- (29) Etzerodt, A.; Maniecki, M. B.; Graversen, J. H.; Møller, H. J.; Torchilin, V. P.; Moestrup, S. K. Efficient Intracellular Drug-Targeting of Macrophages Using Stealth Liposomes Directed to the Hemoglobin Scavenger Receptor CD163. *J. Controlled Release* **2012**, *160* (1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.034>.
- (30) Eliaz, R. E.; Nir, S.; Marty, C.; Szoka, F. C. Determination and Modeling of Kinetics of Cancer Cell Killing by Doxorubicin and Doxorubicin Encapsulated in Targeted Liposomes. *Cancer Res.* **2004**, *64* (2), 711–718.
- (31) Wagner, S.; Rothweiler, F.; Anhorn, M. G.; Sauer, D.; Riemann, I.; Weiss, E. C.; Katsen-Globa, A.; Michaelis, M.; Cinatl Jr., J.; Schwartz, D. Enhanced Drug Targeting by Attachment of an Anti Av Integrin Antibody to Doxorubicin Loaded Human Serum Albumin Nanoparticles. *Biomaterials* **2010**, *31* (8), 2388–2398. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.093>.
- (32) Lowery, A.; Onishko, H.; Hallahan, D. E.; Han, Z. Tumor-Targeted Delivery of Liposome-Encapsulated Doxorubicin by Use of a Peptide That Selectively Binds to Irradiated Tumors. *J. Controlled Release* **2011**, *150* (1), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.006>.
- (33) Mani, G.; Kim, S.; Kim, K. Development of Folate-Thioglycolate-Gold Nanoconjugates by Using Citric Acid-PEG Branched Polymer for Inhibition of MCF-7 Cancer Cell Proliferation. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (8), 3257–3267. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00543>.
- (34) Luong, D.; Sau, S.; Kesharwani, P.; Iyer, A. K. Polyvalent Folate-Dendrimer-Coated Iron Oxide Theranostic Nanoparticles for Simultaneous Magnetic Resonance Imaging and Precise Cancer Cell Targeting. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (4), 1197–1209. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01885>.
- (35) Siwowska, K.; Schmid, R.; Cohrs, S.; Schibli, R.; Müller, C. Folate Receptor-Positive Gynecological Cancer Cells: In Vitro and In Vivo Characterization. *Pharmaceuticals* **2017**, *10* (4), 72. <https://doi.org/10.3390/ph10030072>.
- (36) Xu, J.; Xu, B.; Shou, D.; Qin, F.; Xu, Y.; Hu, Y. Characterization and Evaluation of a Folic Acid Receptor-Targeted Cyclodextrin Complex as an Anticancer Drug Delivery System. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *83*, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.11.008>.
- (37) Lin, J.; Li, Y.; Li, Y.; Wu, H.; Yu, F.; Zhou, S.; Xie, L.; Luo, F.; Lin, C.; Hou, Z. Drug/Dye-Loaded, Multifunctional PEG–Chitosan–Iron Oxide Nanocomposites for Methotrexate Synergistically Self-Targeted Cancer Therapy and Dual Model Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (22), 11908–11920. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b01685>.
- (38) May, J. P.; Li, S.-D. Hyperthermia-Induced Drug Targeting. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2013**, *10* (4), 511–527. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.758631>.
- (39) Vassie, J. A.; Whitelock, J. M.; Lord, M. S. Targeted Delivery and Redox Activity of Folic Acid-Functionalized Nanoceria in Tumor Cells. *Mol. Pharm.* **2018**, *15* (3), 994–1004. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00920>.
- (40) Woodard, L. E.; Dennis, C. L.; Borchers, J. A.; Attaluri, A.; Velarde, E.; Dawidczyk, C.; Searson, P. C.; Pomper, M. G.; Ivkov, R. Nanoparticle Architecture Preserves Magnetic Properties during Coating to Enable Robust Multi-Modal Functionality. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29711-0>.
- (41) Kumar, A.; Ma, H.; Zhang, X.; Huang, K.; Jin, S.; Liu, J.; Wei, T.; Cao, W.; Zou, G.; Liang, X.-J. Gold Nanoparticles Functionalized with Therapeutic and Targeted Peptides for Cancer

- Treatment. *Biomaterials* **2012**, *33* (4), 1180–1189.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.058>.
- (42) Porta, F.; Lamers, G. E. M.; Morrhayim, J.; Chatzopoulou, A.; Schaaf, M.; den Dulk, H.; Backendorf, C.; Zink, J. I.; Kros, A. Folic Acid-Modified Mesoporous Silica Nanoparticles for Cellular and Nuclear Targeted Drug Delivery. *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2* (2), 281–286.
<https://doi.org/10.1002/adhm.201200176>.
- (43) Pissuwan, D.; Cortie, C. H.; Valenzuela, S. M.; Cortie, M. B. Functionalised Gold Nanoparticles for Controlling Pathogenic Bacteria. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28* (4), 207–213.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.004>.
- (44) Zhou, J.; Ralston, J.; Sedev, R.; Beattie, D. A. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Structure and Colloid Stability. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *331* (2), 251–262.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.12.002>.
- (45) Amstad, E.; Textor, M.; Reimhult, E. Stabilization and Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Nanoscale* **2011**, *3* (7), 2819.
<https://doi.org/10.1039/c1nr10173k>.
- (46) Hao, R.; Xing, R.; Xu, Z.; Hou, Y.; Gao, S.; Sun, S. Synthesis, Functionalization, and Biomedical Applications of Multifunctional Magnetic Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (25), 2729–2742.
<https://doi.org/10.1002/adma.201000260>.
- (47) Ito, A.; Shinkai, M.; Honda, H.; Kobayashi, T. Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, *100* (1), 1–11.
<https://doi.org/10.1263/jbb.100.1>.
- (48) Trewyn, B. G.; Slowing, I. I.; Giri, S.; Chen, H.-T.; Lin, V. S.-Y. Synthesis and Functionalization of a Mesoporous Silica Nanoparticle Based on the Sol–Gel Process and Applications in Controlled Release. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40* (9), 846–853.
<https://doi.org/10.1021/ar600032u>.
- (49) Feng, L.; Zhu, C.; Yuan, H.; Liu, L.; Lv, F.; Wang, S. Conjugated Polymer Nanoparticles: Preparation, Properties, Functionalization and Biological Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (16), 6620.
<https://doi.org/10.1039/c3cs60036j>.
- (50) Thorat, N. D.; Bohara, R. A.; Noor, M. R.; Dhamecha, D.; Soulimane, T.; Tofail, S. A. M. Effective Cancer Theranostics with Polymer Encapsulated Superparamagnetic Nanoparticles: Combined Effects of Magnetic Hyperthermia and Controlled Drug Release. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3* (7), 1332–1340.
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00420>.
- (51) Mohan, P.; Rapoport, N. Doxorubicin as a Molecular Nanotheranostic Agent: Effect of Doxorubicin Encapsulation in Micelles or Nanoemulsions on the Ultrasound-Mediated Intracellular Delivery and Nuclear Trafficking. *Mol. Pharm.* **2010**, *7* (6), 1959–1973.
<https://doi.org/10.1021/mp100269f>.
- (52) Mai, B. T.; Balakrishnan, P. B.; Barthel, M. J.; Piccardi, F.; Niculaes, D.; Marinaro, F.; Fernandes, S.; Curcio, A.; Kakwere, H.; Autret, G.; et al. Thermoresponsive Iron Oxide Nanocubes for an Effective Clinical Translation of Magnetic Hyperthermia and Heat-Mediated Chemotherapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (6), 5727–5739.
<https://doi.org/10.1021/acsami.8b16226>.
- (53) Luong, D.; Sau, S.; Kesharwani, P.; Iyer, A. K. Polyvalent Folate-Dendrimer-Coated Iron Oxide Theranostic Nanoparticles for Simultaneous Magnetic Resonance Imaging and Precise Cancer Cell Targeting. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (4), 1197–1209.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01885>.

- (54) S., R.; M., P. Multi-Functional Core-Shell Fe₃O₄@Au Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *174*, 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.004>.
- (55) Hoang Thi, T.; Nguyen Tran, D.-H.; Bach, L.; Vu-Quang, H.; Nguyen, D.; Park, K.; Nguyen, D. Functional Magnetic Core-Shell System-Based Iron Oxide Nanoparticle Coated with Biocompatible Copolymer for Anticancer Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (3), 120. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030120>.
- (56) Sasikala, A. R. K.; GhavamiNejad, A.; Unnithan, A. R.; Thomas, R. G.; Moon, M.; Jeong, Y. Y.; Park, C. H.; Kim, C. S. A Smart Magnetic Nanoplatform for Synergistic Anticancer Therapy: Manoeuvring Mussel-Inspired Functional Magnetic Nanoparticles for PH Responsive Anticancer Drug Delivery and Hyperthermia. *Nanoscale* **2015**, *7* (43), 18119–18128. <https://doi.org/10.1039/C5NR05844A>.
- (57) Hoang Thi, T.; Nguyen Tran, D.-H.; Bach, L.; Vu-Quang, H.; Nguyen, D.; Park, K.; Nguyen, D. Functional Magnetic Core-Shell System-Based Iron Oxide Nanoparticle Coated with Biocompatible Copolymer for Anticancer Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (3), 120. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030120>.
- (58) Huang, N.-P.; Michel, R.; Voros, J.; Textor, M.; Hofer, R.; Rossi, A.; Elbert, D. L.; Hubbell, J. A.; Spencer, N. D. Poly(l-Lysine)-g-Poly(Ethylene Glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Surface-Analytical Characterization and Resistance to Serum and Fibrinogen Adsorption. *Langmuir* **2001**, *17* (2), 489–498. <https://doi.org/10.1021/la000736+>.
- (59) Hervault, A.; Dunn, A. E.; Lim, M.; Boyer, C.; Mott, D.; Maenosono, S.; Thanh, N. T. K. Doxorubicin Loaded Dual PH- and Thermo-Responsive Magnetic Nanocarrier for Combined Magnetic Hyperthermia and Targeted Controlled Drug Delivery Applications. *Nanoscale* **2016**, *8* (24), 12152–12161. <https://doi.org/10.1039/C5NR07773G>.
- (60) Shen, C.; Wang, X.; Zheng, Z.; Gao, C.; Chen, X.; Zhao, S.; Dai, Z. Doxorubicin and Indocyanine Green Loaded Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with PEGylated Phospholipid Coating for Magnetic Resonance with Fluorescence Imaging and Chemotherapy of Glioma. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *Volume 14*, 101–117. <https://doi.org/10.2147/IJN.S173954>.
- (61) Chen, Y.; Zhang, F.; Wang, Q.; Lin, H.; Tong, R.; An, N.; Qu, F. The Synthesis of LA-Fe₃O₄@PDA-PEG-DOX for Photothermal Therapy–Chemotherapy. *Dalton Trans.* **2018**, *47* (7), 2435–2443. <https://doi.org/10.1039/C7DT04080F>.
- (62) Unsoy, G.; Khodadust, R.; Yalcin, S.; Mutlu, P.; Gunduz, U. Synthesis of Doxorubicin Loaded Magnetic Chitosan Nanoparticles for PH Responsive Targeted Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *62*, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.05.021>.
- (63) Rosenblum, D.; Joshi, N.; Tao, W.; Karp, J. M.; Peer, D. Progress and Challenges towards Targeted Delivery of Cancer Therapeutics. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03705-y>.
- (64) Czeslik, C. Factors Ruling Protein Adsorption. *Z. Für Phys. Chem.* **2004**, *218* (7–2004), 771–801. <https://doi.org/10.1524/zpch.218.7.771.35722>.
- (65) Convert, L. Système microfluidique d’analyse sanguine en temps réel pour l’imagerie moléculaire chez le petit animal., 2013.
- (66) Oja, C. D.; Semple, S. C.; Chonn, A.; Cullis, P. R. Influence of Dose on Liposome Clearance: Critical Role of Blood Proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1281* (1), 31–37. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(96\)00003-x](https://doi.org/10.1016/0005-2736(96)00003-x)

- (67) Cullis, null; Chonn, null; Semple, null. Interactions of Liposomes and Lipid-Based Carrier Systems with Blood Proteins: Relation to Clearance Behaviour in Vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, 32 (1–2), 3–17.
PMID: 10837632
- (68) Walkey, C. D.; Olsen, J. B.; Guo, H.; Emili, A.; Chan, W. C. W. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (4), 2139–2147.
<https://doi.org/10.1021/ja2084338>.
- (69) Owens, D.E; Peppas, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.* **2006**, 307(1): 93-102
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>
- (70) Stathopoulos, G.P.; Boulikas, T.; Vougiouka, M.; Deliconstantinos, G.; Rigatos, S.; Darli, E.; Viliotou, V.; Stathopoulos, J.G.; Pharmacokinetics and adverse reactions of a new liposomal cisplatin (Lipoplatin): phase I study. *Oncol Rep.* **2005**, 13(4): 589-95
PMID:15756428
- (71) Martin, F.; Boulikas, T. The challenge of liposomes in gene therapy. *Gene Ther Mol Biol.* **1998**, (1): 173-214.
- (72) Shen, B.; Ma, Y.; Yu, S.; Ji, C. Smart Multifunctional Magnetic Nanoparticle-Based Drug Delivery System for Cancer Thermo-Chemotherapy and Intracellular Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8 (37), 24502–24508.
<https://doi.org/10.1021/acsami.6b09772>.
- (73) Mahmoudi, M.; Simchi, A.; Milani, A. S.; Stroeve, P. Cell Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, 336 (2), 510–518.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.04.046>.
- (74) Lee, P.-W.; Hsu, S.-H.; Wang, J.-J.; Tsai, J.-S.; Lin, K.-J.; Wey, S.-P.; Chen, F.-R.; Lai, C.-H.; Yen, T.-C.; Sung, H.-W. The Characteristics, Biodistribution, Magnetic Resonance Imaging and Biodegradability of Superparamagnetic Core–Shell Nanoparticles. *Biomaterials* **2010**, 31 (6), 1316–1324.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.010>.
- (75) Gupta, A. K.; Gupta, M. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biomaterials* **2005**, 26 (18), 3995–4021.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>.
- (76) Ferjaoui, Z.; Schneider, R.; Meftah, A.; Gaffet, E.; Alem, H. Functional Responsive Superparamagnetic Core/Shell Nanoparticles and Their Drug Release Properties. *RSC Adv.* **2017**, 7 (42), 26243–26249.
<https://doi.org/10.1039/C7RA02437A>.
- (77) Yamaura, M.; Camilo, R. ; Sampaio, L. ; Macêdo, M. ; Nakamura, M.; Toma, H. . Preparation and Characterization of (3-Aminopropyl)Triethoxysilane-Coated Magnetite Nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **2004**, 279 (2–3), 210–217.
<https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2004.01.094>.
- (78) Douziech-Eyrolles, L.; Marchais, H.; Hervé, K.; Munnier, E.; Soucé, M.; Linassier, C.; Dubois, P.; Chourpa, I. Nanovectors for Anticancer Agents Based on Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2007**, 2 (4), 541–550.
PMID: 18203422
- (79) Bacri, J.-C.; Perzynski, R.; Salin, D.; Cabuil, V.; Massart, R. Magnetic Colloidal Properties of Ionic Ferrofluids. *J. Magn. Magn. Mater.* **1986**, 62 (1), 36–46.
[https://doi.org/10.1016/0304-8853\(86\)90731-6](https://doi.org/10.1016/0304-8853(86)90731-6).
- (80) Fortin, J.-P.; Wilhelm, C.; Servais, J.; Ménager, C.; Bacri, J.-C.; Gazeau, F. Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia. *J. Am.*

- Chem. Soc.* **2007**, *129* (9), 2628–2635.
<https://doi.org/10.1021/ja067457e>.
- (81) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (6), 2064–2110.
<https://doi.org/10.1021/cr068445e>.
- (82) Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fähling, H.; Roland Felix. Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH): Cancer Treatment with AC Magnetic Field Induced Excitation of Biocompatible Superparamagnetic Nanoparticles. *J. Magn. Mater.* **1999**, *201* (1–3), 413–419.
[https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(99\)00088-8](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(99)00088-8).
- (83) Kumar, C. S. S. R.; Mohammad, F. Magnetic Nanomaterials for Hyperthermia-Based Therapy and Controlled Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63* (9), 789–808.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.008>.
- (84) Naharissoua, H.; Sarrade, V.; Follet, M.; Calas, B. Use of 6 M HCl for Removal of the N-Alpha-Tert-Butyloxycarbonyl Group during Solid-Phase Peptide Synthesis. *Pept. Res.* **1992**, *5* (5), 293–299.
<https://doi.org/10.1002/psc.657>
- (85) Suzuki, M.; Shinkai, M.; Honda, H.; Kobayashi, T. Anticancer Effect and Immune Induction by Hyperthermia of Malignant Melanoma Using Magnetite Cationic Liposomes. *Melanoma Res.* **2003**, *13* (2), 129–135.
<https://doi.org/10.1097/01.cmr.0000056212.78713.62>.
- (86) Hainfeld, J.; Huang. Intravenous Magnetic Nanoparticle Cancer Hyperthermia. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, 2521.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S43770>.
- (87) Urano, M.; Kuroda, M.; Nishimura, Y. For the Clinical Application of Thermochemotherapy given at Mild Temperatures. *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group* **1999**, *15* (2), 79–107.
- (88) Kurzhals, S.; Schroffenegger, M.; Gal, N.; Zirbs, R.; Reimhult, E. Influence of Grafted Block Copolymer Structure on Thermoresponsiveness of Superparamagnetic Core–Shell Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (5), 1435–1444.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01403>.
- (89) Dine, E. J. A.; Ferjaoui, Z.; Roques-Carmes, T.; Schjen, A.; Meftah, A.; Hamieh, T.; Toufaily, J.; Schneider, R.; Gaffet, E.; Alem, H. Efficient Synthetic Access to Thermo-Responsive Core/Shell Nanoparticles. *Nanotechnology* **2017**, *28* (12), 125601.
<https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa5d81>.
- (90) Jamal Al Dine, E.; Ferjaoui, Z.; Ghanbaja, J.; Roques-Carmes, T.; Meftah, A.; Hamieh, T.; Toufaily, J.; Schneider, R.; Marchal, S.; Gaffet, E.; et al. Thermo-Responsive Magnetic Fe₃O₄@P(MEO 2 MA X -OEGMA 100-X) NPs and Their Applications as Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532* (2), 738–747.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.019>.
- (91) Schild, H. G. Poly(N-Isopropylacrylamide): Experiment, Theory and Application. *Prog. Polym. Sci.* **1992**, *17* (2), 163–249.
[https://doi.org/10.1016/0079-6700\(92\)90023-R](https://doi.org/10.1016/0079-6700(92)90023-R).
- (92) Fujishige, S.; Kubota, K.; Ando, I. Phase Transition of Aqueous Solutions of Poly(N-Isopropylacrylamide) and Poly(N-Isopropylmethacrylamide). *J. Phys. Chem.* **1989**, *93* (8), 3311–3313.
<https://doi.org/10.1021/j100345a085>.
- (93) Ito, D.; Kubota, K. Solution Properties and Thermal Behavior of Poly(N - n - Propylacrylamide) in Water. *Macromolecules* **1997**, *30* (25), 7828–7834.
<https://doi.org/10.1021/ma971005s>.

- (94) Maeda, Y.; Kubota, T.; Yamauchi, H.; Nakaji, T.; Kitano, H. Hydration Changes of Poly(2-(2-Methoxyethoxy)Ethyl Methacrylate) during Thermosensitive Phase Separation in Water. *Langmuir* **2007**, *23* (22), 11259–11265. <https://doi.org/10.1021/la7016006>.
- (95) Ishizone, T.; Seki, A.; Hagiwara, M.; Han, S.; Yokoyama, H.; Oyane, A.; Deffieux, A.; Carlotti, S. Anionic Polymerizations of Oligo(Ethylene Glycol) Alkyl Ether Methacrylates: Effect of Side Chain Length and ω -Alkyl Group of Side Chain on Cloud Point in Water. *Macromolecules* **2008**, *41* (8), 2963–2967. <https://doi.org/10.1021/ma702828n>.
- (96) Lutz, J.-F.; Akdemir, Ö.; Hoth, A. Point by Point Comparison of Two Thermosensitive Polymers Exhibiting a Similar LCST: Is the Age of Poly(NIPAM) Over? *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (40), 13046–13047. <https://doi.org/10.1021/ja065324n>.
- (97) Liu, H. Y.; Zhu, X. X. Lower Critical Solution Temperatures of N -Substituted Acrylamide Copolymers in Aqueous Solutions. *Polymer* **1999**, *40* (25), 6985–6990. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(98\)00858-1](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00858-1).
- (98) Seuring, J.; Bayer, F. M.; Huber, K.; Agarwal, S. Upper Critical Solution Temperature of Poly(N -Acryloyl Glycinamide) in Water: A Concealed Property. *Macromolecules* **2012**, *45* (1), 374–384. <https://doi.org/10.1021/ma202059t>.
- (99) Pelaz, B.; del Pino, P.; Maffre, P.; Hartmann, R.; Gallego, M.; Rivera-Fernández, S.; de la Fuente, J. M.; Nienhaus, G. U.; Parak, W. J. Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano* **2015**, *9* (7), 6996–7008. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01326>.
- (100) Maier-Hauff, K.; Ulrich, F.; Nestler, D.; Niehoff, H.; Wust, P.; Thiesen, B.; Orawa, H.; Budach, V.; Jordan, A. Efficacy and Safety of Intratumoral Thermotherapy Using Magnetic Iron-Oxide Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy on Patients with Recurrent Glioblastoma Multiforme. *J. Neurooncol.* **2011**, *103* (2), 317–324. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0389-0>.
- (101) Masson, P.; Beinert, G.; Franta, E.; Rempp, P. Synthesis of Polyethylene Oxide Macromers. *Polym. Bull.* **1982**, *7* (1). <https://doi.org/10.1007/BF00264152>.
- (102) Ito, K.; Tsuchida, H.; Hayashi, A.; Kitano, T.; Yamada, E.; Matsumoto, T. Reactivity of Poly(Ethylene Oxide) Macromonomers in Radical Copolymerization. *Polym. J.* **1985**, *17*, 827.
- (103) Lutz, J.-F. Polymerization of Oligo(Ethylene Glycol) (Meth)Acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (11), 3459–3470. <https://doi.org/10.1002/pola.22706>.
- (104) Lee, H.; Pietrasik, J.; Matyjaszewski, K. Phototunable Temperature-Responsive Molecular Brushes Prepared by ATRP. *Macromolecules* **2006**, *39* (11), 3914–3920. <https://doi.org/10.1021/ma060350r>.
- (105) Xu, F. J.; Yang, W. T. Polymer Vectors via Controlled/Living Radical Polymerization for Gene Delivery. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36* (9), 1099–1131. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.11.005>.
- (106) Reeve, M. S.; McCarthy, S. P.; Downey, M. J.; Gross, R. A. Polylactide Stereochemistry: Effect on Enzymic Degradability. *Macromolecules* **1994**, *27* (3), 825–831. <https://doi.org/10.1021/ma00081a030>.

- (107) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2001**, *40* (11), 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40)
- (108) Israelachvili, J. The Different Faces of Poly(Ethylene Glycol). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94* (16), 8378–8379. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8378>.
- (109) Lutz, J.-F.; Jahed, N.; Matyjaszewski, K. Preparation and Characterization of Graft Terpolymers with Controlled Molecular Structure. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2004**, *42* (8), 1939–1952. <https://doi.org/10.1002/pola.20043>.
- (110) Han, S.; Hagiwara, M.; Ishizone, T. Synthesis of Thermally Sensitive Water-Soluble Polymethacrylates by Living Anionic Polymerizations of Oligo(Ethylene Glycol) Methyl Ether Methacrylates. *Macromolecules* **2003**, *36* (22), 8312–8319. <https://doi.org/10.1021/ma0347971>.
- (111) Lutz, J.-F. Polymerization of Oligo(Ethylene Glycol) (Meth)Acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (11), 3459–3470. <https://doi.org/10.1002/pola.22706>.
- (112) Minko, S. Grafting on Solid Surfaces: “Grafting to” and “Grafting from” Methods. In *Polymer Surfaces and Interfaces*; Stamm, M., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; pp 215–234. https://doi.org/10.1007/978-3-540-73865-7_11.
- (113) *Polymer Surfaces and Interfaces*; Stamm, M., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-73865-7>.
- (114) Zhang, Z.; Berns, A. E.; Willbold, S.; Buitenhuis, J. Synthesis of Poly(Ethylene Glycol) (PEG)-Grafted Colloidal Silica Particles with Improved Stability in Aqueous Solvents. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *310* (2), 446–455. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.02.024>.
- (115) Matsuno, R.; Yamamoto, K.; Otsuka, H.; Takahara, A. Polystyrene- and Poly(3-Vinylpyridine)-Grafted Magnetite Nanoparticles Prepared through Surface-Initiated Nitroxide-Mediated Radical Polymerization. *Macromolecules* **2004**, *37* (6), 2203–2209. <https://doi.org/10.1021/ma035523g>.
- (116) Garcia, I.; Tercjak, A.; Zafeiropoulos, N. E.; Stamm, M.; Mondragon, I. Generation of Core/Shell Iron Oxide Magnetic Nanoparticles with Polystyrene Brushes by Atom Transfer Radical Polymerization. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2007**, *45* (20), 4744–4750. <https://doi.org/10.1002/pola.22233>.
- (117) Liu, P.; Zhong, W.; Shi, H.; Xue, D. Polymer-Grafted Magnetite Nanoparticles via a Facile *in Situ* Solution Radical Polymerisation. *J. Exp. Nanosci.* **2009**, *4* (4), 323–329. <https://doi.org/10.1080/17458080903108150>.
- (118) Pintauer, T.; Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Addition and Polymerization Reactions Catalyzed by Ppm Amounts of Copper Complexes. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (6), 1087. <https://doi.org/10.1039/b714578k>.
- (119) Tsarevsky, N. V.; Matyjaszewski, K. “Green” Atom Transfer Radical Polymerization: From Process Design to Preparation of Well-Defined Environmentally Friendly Polymeric Materials. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (6), 2270–2299. <https://doi.org/10.1021/cr050947p>.
- (120) Jakubowski, W.; Matyjaszewski, K. Activator Generated by Electron Transfer for Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **2005**, *38* (10), 4139–4146. <https://doi.org/10.1021/ma047389l>.

- (121) Min, K.; Gao, H.; Matyjaszewski, K. Preparation of Homopolymers and Block Copolymers in Miniemulsion by ATRP Using Activators Generated by Electron Transfer (AGET). *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (11), 3825–3830. <https://doi.org/10.1021/ja0429364>.
- (122) Grimaud, T.; Matyjaszewski, K. Controlled/“Living” Radical Polymerization of Methyl Methacrylate by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **1997**, *30* (7), 2216–2218. <https://doi.org/10.1021/ma961796i>.
- (123) Dong, H.; Tang, W.; Matyjaszewski, K. Well-Defined High-Molecular-Weight Polyacrylonitrile via Activators Regenerated by Electron Transfer ATRP. *Macromolecules* **2007**, *40* (9), 2974–2977. <https://doi.org/10.1021/ma070424e>.
- (124) Al Dine, E. J.; Marchal, S.; Schneider, R.; Hamie, B.; Ghanbaja, J.; Roques-Carmes, T.; Hamieh, T.; Toufaily, J.; Gaffet, E.; Alem, H. A Facile Approach for Doxorubicine Delivery in Cancer Cells by Responsive and Fluorescent Core/Shell Quantum Dots. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (7), 2248–2256. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00253>.
- (125) Mueller, L.; Jakubowski, W.; Tang, W.; Matyjaszewski, K. Successful Chain Extension of Polyacrylate and Polystyrene Macroinitiators with Methacrylates in an ARGET and ICAR ATRP. *Macromolecules* **2007**, *40* (18), 6464–6472. <https://doi.org/10.1021/ma071130w>.

2 Chapitre II: Formulation du nanovecteur à base des nanoparticules d'oxydes de fer pour la délivrance d'agents anticancéreux

2.1 Introduction

Comme nous l'avons indiqué précédemment, le traitement du cancer et la délivrance ciblée et contrôlée du principe actif dans un site cancéreux est un problème de santé publique majeur¹, qui mobilise les efforts d'équipes de recherches partout dans le monde académique et industriel pour le développement de médicaments ou d'outils pour une thérapie de plus en plus performante.

Comme décrit dans le Chapitre I, l'avènement de la nanomédecine, a permis l'élaboration de nano-objets de différentes architectures permettant de dépasser les limites des propriétés pharmacocinétiques des agents thérapeutiques seuls. Parmi les nombreux nano-objets développés^{5,6}, les systèmes intelligents dont la délivrance du médicament est souvent activée par un stimuli extérieur tel que la température, le pH, le champ magnétique^{2,3,4} etc sont de bons candidats. Par exemple, les nanoformulations permettant de fonctionnaliser un cœur magnétique et une coquille thermosensible permettent d'obtenir des nano-objets dont l'introduction et la circulation *in-vivo* peuvent être suivies par des méthodes conventionnelles d'imagerie telle que l'IRM (Imagerie par résonance magnétiques)⁶. La coquille thermosensible permettra de charger l'agent thérapeutique et de le relarguer sur le site de la tumeur sous l'action d'un stimuli tel que la température^{3,4}.

Ainsi Alexander *et al.*⁶, ont synthétisé des NPs de type cœur/coquille, formées par des NPs de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) modifiées par la suite en surface par de la silice à l'aide de la procédé de microémulsion. Le nano-objet final a été fonctionnalisé par le 2- (diméthylamino) -méthacrylate d'éthyle (DMAEMA) via l'approche Grafting from, la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (ATRP) a été utilisée, des NPs hybrides cœur/coquille ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @ silice @ PDMAEMA) ont ainsi pu être obtenues. La densité du greffage obtenue est de l'ordre de 0.04 chaîne/nm² par la particule. La sensibilité du PDMAEMA en fonction de pH et de la température a été étudiée par la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et des mesures de turbidité. Les tests de toxicité des hybrides ont été réalisés vis à vis des cellules CHO-K1 et L929, révélant une faible cytotoxicité⁶.

Une autre approche intéressante de synthèse des NPs cœur/coquille a été développée par l'équipe de Kurzhals *et al.*⁷. Ils ont élaboré un nanosystème thermosensible via l'approche Grafting-to, où les copolymères composés par 2-isopropylloxazoline (IPO_x) et 2-éthylloxazoline (EtO_x) ont été greffés sur des NPs d'oxyde de fer superparamagnétiques (FeO_x) d'une forme sphérique. Cette étude montre une efficacité pour la fonctionnalisation des NPs par les polymères sensibles à la température et exprimés par une densité du greffage importante autour de 1 et 0.6 chaîne/nm². Les auteurs montrent la possibilité du contrôle de la transition de la phase hydrophile/hydrophobe à partir de l'agrégation des NPs. Les résultats assurent la possibilité d'utiliser ces nano-objets pour l'administration des médicaments, l'hyperthermie, l'IRM, etc⁷. La quantité du principe actif chargé dépend de la densité du greffage et sa libération est déterminée par la transition hydrophile/hydrophobe⁷.

L'axe de la fonctionnalisation des NPs par des polymères thermosensibles est donc très varié dans la littérature. Mais dans ce travail de thèse, nous avons préparé des NPs superparamagnétiques 'intelligentes', capables de transporter la DOX et de la libérer en fonction de la température. La stratégie consiste à fonctionnaliser des NPs superparamagnétiques par le copolymère thermosensible P(MEO₂MA_x-OEGMA_{100-x}) composé d'un ratio contrôlé de (2-(2-méthoxy) éthyle

méthacrylate (MEO₂MA) et oligo (éthylène glycol) méthacrylate (OEGMA) décrit dans le précédent Chapitre.

Nous avons choisi de faire croître le polymère à partir de la surface de la NPs, i.e Grafting-from, afin d'obtenir la plus grande densité de greffage. Afin de contrôler au maximum la taille des chaînes, une polymérisation radicalaire contrôlée a été utilisée. Plus précisément, ARGET-ATRP dont les avantages ont été décrits précédemment.

L'efficacité de cette technique de fonctionnalisation, a été confirmée par Alem *et al.*⁹, à travers la synthèse d'un nanosystème thermosensible de type cœur/coquille. Les auteurs montrent que l'ARGET-ATRP permet la bonne stabilité chimique des nanocomposites.

L'efficacité de ce procédé pour ce type de copolymère a été confirmée par les travaux de Jamal Al Dine *et al.*⁵ (thèse précédente). En effet, ces copolymères thermosensibles biocompatibles ont crû à partir de la surface des NPs de zinc oxyde (ZnO), de SiO₂, ainsi que de Fe₃₋₈O₄ en utilisant ce même procédé de polymérisation radicalaire contrôlée initiée à partir de la surface des NPs. A travers cette technique de la polymérisation, les auteurs ont montré qu'en fonction du ratio entre les deux monomères, des NPs avec des LCST différentes peuvent être obtenues de manière reproductible. Le comportement colloïdal, de ces nanoparticules a pu donc être contrôlé en jouant sur le ratio de monomère lors de la synthèse. Enfin, la cytotoxicité vis-à-vis des cellules HT29 du cancer du côlon humain des NPs cœur / coquille a été testée. Les résultats ont montré que les NPs greffées par le polymère ne présentaient pratiquement aucune toxicité à des concentrations pouvant atteindre 12,5 µg. mL⁻¹.

Dans ce Chapitre, nous transposons ce procédé de synthèse en vue d'obtention de NPs cœur/coquille afin de contrôler le comportement colloïdal des NPs dans des conditions physiologiques. En effet, même si le comportement colloïdal dans l'eau des NPs est parfaitement connu et dirigé par le comportement des macromolécules dans l'eau, l'influence des sels et protéines présents dans le milieu physiologique doit être mis en évidence pour imiter au mieux la physiologie du corps humain. Cependant, lorsque des polymères présentant une LCST sont mis en solution dans un milieu aqueux de force ionique non nulle, la présence de sels en fonction de leur caractère kosmotropes ou chaotropes peut diminuer ou augmenter la LCST⁵. Des travaux ont montré que les milieux physiologiques tels que le PBS ou les milieux de cultures avaient tendance à induire des changements de phase des polymères (ou copolymères répondants) à des températures plus basses que lorsque ces mêmes mesures sont effectuées dans l'eau⁵.

Ainsi dans le cadre de ce Chapitre de thèse, nous avons d'abord synthétisé des NPs cœur/coquilles dont le cœur est constitué de Fe₃₋₈O₄ et la couronne de P(MEO₂MA_X-OEGMA_Y). A partir des travaux de Enaam Jamal Al Dine *et al.*⁵, nous avons sélectionné deux compositions telles que X soit compris entre 40 et 80 et que Y soit compris entre 60 et 20. Il a été montré que dans cette tranche de valeur, le copolymère pouvait présenter une LCST au-dessus de 42°C dans l'eau permettant d'envisager une LCST autour de 41°C dans les milieux physiologiques ou de culture sauf pour la composition X/Y = 80/20 qui est la composition pour laquelle nous avons une LCST proche de celle du poly(N-isopropyl acrylamide), le PNIPAM, qui reste à ce jour le polymère thermo-répondant le plus étudié malgré sa cytotoxicité démontrée⁹.

Après avoir synthétisé les nano-objets dont les comportements colloïdaux ont été modifiés en jouant sur la composition du copolymère, une étude structurale des nano-objets a été menée. L'influence de la composition du copolymère sur les propriétés magnétiques, structurale et colloïdales des nano-objets a été étudiée. Enfin les performances de ce nano-objet en tant que vecteur de DOX ont été étudiées.

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Matériels

La synthèse des NPs magnétiques (NPMs) $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ stabilisées par le citrate de sodium a été réalisée à l'aide de chlorure de fer (III) hexahydraté (Lancaster, 98%), de sulfate de fer (II) heptahydraté (Merck, 99,5%), d'ammoniac (NH_3 , à 28%) et du citrate de sodium (99,8%), achetés auprès du Sigma-Aldrich.

Les initiateurs de polymérisation, sont le (chlorométhyl) phényléthyl triméthoxysilane (CMPETMS) (Gelest, > 95%), l'hydroxyde de tétraméthylammonium pentahydrate (TMAH) (99,8%) et du toluène (réactif de laboratoire, > 99,3%).

Pour la polymérisation initiée en surface du méthacrylate, nous avons utilisé le 2- (2-méthoxy) éthyle de P (MEO₂MA_X-OEGMA_{100-X}) (MEO₂MA) (98%), l'oligo (éthylène glycol) (OEGMA) (98%), N, N-Diméthylformamide (DMF) (> 99,8%), le diméthylsulfoxyde (DMSO) (> 99,8%) l'eau Milli-Q de Sigma-Aldrich.

2.2.2 Synthèse de nanoparticules superparamagnétiques de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$

Les NPs de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ superparamagnétiques ont été synthétisées par une co-précipitation.

- un mélange de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (6 mmol; 1,622 g) et de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5 mmol; 1,39 g) a été dissous dans 40 mL d'eau dans un ballon à trois cols.
- 5 mL d'une solution aqueuse d'ammoniac à 28% (v / v) ont été ensuite ajoutés au mélange et la solution finale a été chauffée à 90 ° C sous une atmosphère d'argon et sous agitation magnétique.
- ensuite, 4,4 g (14,9 mmol) de citrate de sodium dans 15 mL d'eau ont été ajoutés goutte à goutte jusqu'à l'obtention d'une solution noire. Le mélange réactionnel a été agité pendant 30 min à 90°C.
- les NPMs de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ ont été finalement récupérées par une séparation magnétique, lavées plusieurs fois à l'éthanol et redispersées dans 100 mL d'eau.

2.2.3 Silanisation des NPs de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$

Des études récentes portant sur la modification des NPs par des agents du couplage silanique montrent que le mécanisme du greffage de ces molécules dans une solution aqueuse à la surface d'un oxyde s'effectue en trois étapes¹⁰ et conduit à la formation d'un film de polysiloxane autour des NPMs par une condensation des hydroxyles à leurs surfaces (Figure II-1, pour une représentation du greffage avec le CMPETMS).

Le protocole de la silanisation que nous avons adapté est réalisé en deux étapes :

- **La première étape de la silanisation** consiste à disperser les NPs magnétiques ($\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$) (50 mg) dans une solution de 10 mL de toluène. Puis le mélange est soumis aux ultrasons pendant 15 mn pour réaliser la dispersion parfaite des NPs dans le solvant. Ensuite, 0,2 mmol, (V = 49,1 μL) de chlorométhylphényléthyltriméthoxysilane (CMPETMS) est injecté dans la solution. Le mélange est chauffé à 50°C sous une pression d'argon et sous une agitation mécanique. À cette température, 1 mL d'une solution de TMAH (108,75 mg dans 3 mL d'éthanol) a été ajouté au mélange. Ce dernier est agité pendant 15 min. Par la suite, les NPs sont refroidies jusqu'à la température ambiante, les NPMs sont récupérées par une décantation magnétique à l'aide d'un aimant suivi, l'étape suivie est de deux lavages successifs par le toluène.
- **Dans la deuxième étape de la silanisation**, les NPMs sont dispersées dans 10 mL de toluène. Le mélange est chauffé à 50°C sous une agitation et sous l'argon. À cette température, 2 mL

d'une solution de TMAH sont ajoutés. Nous laissons agir les réactifs pendant 30 mn. Le mélange est alors refroidi dans un bain d'eau froide. Les NPMs sont récupérées par une séparation magnétique et lavées deux fois avec le toluène.

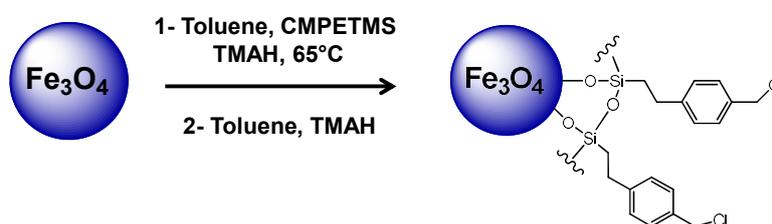


Figure II-1 : Silanisation des NPs magnétiques de $Fe_{3.8}O_4$

2.2.4 Fonctionnalisation des surfaces des NPs silanisées par le P(MEO₂MA_x-OEGMA_{100-x})

L'étape qui suit le greffage du silane sur les surfaces des NPMs est celle de la croissance du copolymère thermosensible MEO₂MA/OEGMA à partir de la surface des NPs. Comme il est mentionné dans le premier Chapitre et afin d'étudier la relation entre le pourcentage de chaque monomère et la valeur de la LCST, nous avons synthétisé quatre échantillons de différentes compositions. Les caractéristiques des différents échantillons sont indiquées dans le Tableau suivant.

Nano-objets	MEO ₂ MA	OEGMA
$Fe_{3.8}O_4@P(MEO_2MA_{80}-OEGMA_{20})$	1,55 mL	0,571 mL
$Fe_{3.8}O_4@P(MEO_2MA_{75}-OEGMA_{25})$	1,45 mL	0,714 mL
$Fe_{3.8}O_4@P(MEO_2MA_{65}-OEGMA_{35})$	1,26 mL	1 mL
$Fe_{3.8}O_4@P(MEO_2MA_{60}-OEGMA_{40})$	1,16 mL	1,14 mL

Tableau II-1 : Rapport volumique de différents échantillons élaborés

Le greffage de ce copolymère est effectué par une polymérisation initiée à partir de la surface des NPMs. Le procédé de la polymérisation choisi est ARGET-ATRP (défini dans le Chapitre 1).

Dans cette étape de la synthèse (Figure II-2), nous avons adopté le protocole suivant :

- les NPs d'oxyde de fer silanisées ($Fe_3O_4@Silane$) sont placées dans une solution de 9 mL de Diméthylsulfoxyde (DMSO) et 1 ml de N- Diméthylformamide (DMF) puis sont dispersées aux ultrasons pendant 2 minutes,
- ensuite, une quantité fixe des monomères (suivant le Tableau II.1) du 2-(2-méthoxy) éthyle méthacrylate (MEO₂MA) et oligo (éthylène glycol) méthacrylate (OEGMA) est ajoutée à la solution (voir Tableau II-1),
- par la suite, nous ajoutons 200 μ L de CuBr₂ (CuBr₂/TPMA/DMSO) (0.884 mmol CuBr₂, 4.3 mmol TPMA) jouant le rôle d'activation du greffage du polymère sur le silane. La réaction est réalisée sous l'agitation et le chauffage jusqu'à une température d'environ 65°C,
- une fois cette température atteinte, nous avons injecté 250 μ L de Hydrazine/DMSO (7.1 mg mL⁻¹). Le mélange reste sous agitation et l'argon pendant 2 heures.

Enfin, le mélange est versé progressivement dans 100 mL d'eau chaude (50°C), les NPs sont alors précipitées dans l'eau à 50°C, isolées et lavées deux fois à l'eau à 50°C.

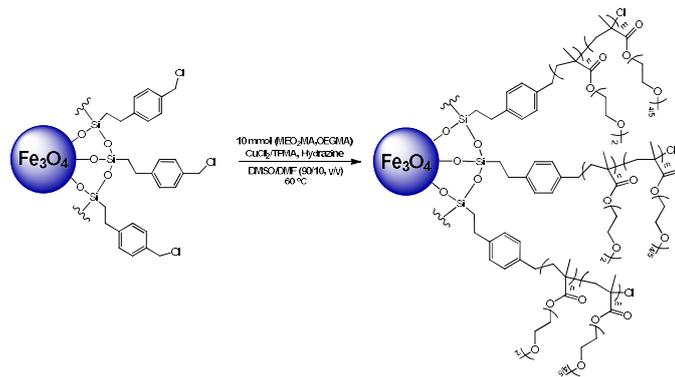


Figure II-2 : Fonctionnalisation par le P(MEO₂M_x-OEGMA_{100-x}) des surfaces des NPs silanisées

2.2.5 Encapsulation de la DOX

La conjugaison de la DOX avec le copolymère a été réalisée par la formation d'une liaison hydrogène avec des groupes éther-oxyde du copolymère P(MEO₂M_x-OEGMA_{100-x}) (Figure II-3) :

- les NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M_x-OEGMA_{100-x}) (2,5 mg) ont été mises en suspension dans 5 mL du milieu physiologique (DMEM) (pH = 7),
- ensuite, 5 mg de DOX ont été ajoutés (la concentration de la DOX était de 1 mg mL⁻¹). Le mélange a été agité dans l'obscurité pendant 24h,
- ensuite, les NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M_x-OEGMA_{100-x}) chargées en DOX ont été lavées dans un milieu physiologique par une décantation magnétique dix fois jusqu'à ce que le surnageant soit claire et qu'aucun signal de la DOX ne puisse être détecté par spectroscopie UV-visible,
- ensuite, les NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M_x-OEGMA_{100-x}) chargées en DOX ont été dispersées dans 5 mL dans un milieu physiologique.

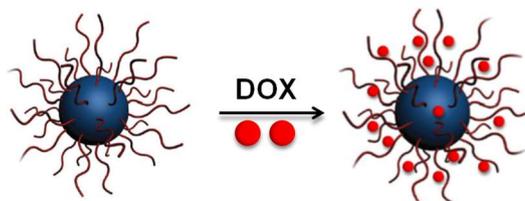


Figure II-3 : Encapsulation du principe actif (DOX)

La concentration de la DOX libérée en fonction de la température est calculée en mesurant l'absorbance du surnageant à 480 nm de la DOX libre restant dans la solution après un chauffage du mélange avec une plaque chauffante (Annexe 1).

Le pourcentage de médicament libéré (%) pourrait ensuite être calculé à partir de l'équation (II-1).

$$\text{quantite de DOX libéré par NPs} = \frac{\text{masse de la DOX libérée}}{\text{masse de DOX chargée}} \times 100\% \quad (\text{II-1})$$

2.3 Résultats et discussion

2.3.1 Analyse par spectroscopie infra-rouge

Afin de confirmer la modification des NPs Fe_{3-δ}O₄ par la monocouche de silane et de copolymère, une analyse par spectroscopie infra-rouge (IR) (Annexe 1) a été réalisée. Cette technique

permet de mettre en évidence la présence des espèces absorbées et/ou greffées sur les surfaces des NPs à travers les vibrations caractéristiques.

La Figure II-4 montre les spectres IRTF en transmission correspondant aux NPs modifiées par le silane et le copolymère.

Tout d'abord, nous remarquons que le spectre IR des NPs modifiées par le silane présente des bandes caractéristiques du silane. En effet la bande à 1051 cm^{-1} dans le spectre (a) est attribuée aux vibrations des liaisons Fe-O-Si montrant que la couche de silane est bien polymérisée autour des particules.

La présence des silanes est aussi révélée par les vibrations d'élongation des liaisons C-C à 1200 et à 1400 cm^{-1} .

Après la fonctionnalisation des surfaces des NPs par le P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}), de nouvelles bandes d'absorption situées à 2900 et 2987 cm^{-1} sont observées (Figure II-5, Spectre (b)). Ces bandes peuvent être attribuées à des liaisons C-H.

Les bandes à 1102 et 1723 cm^{-1} sont attribuées à des vibrations C-O et C=O. De plus, les pics situés à 1452 et 2875 cm^{-1} correspondent à C-H.

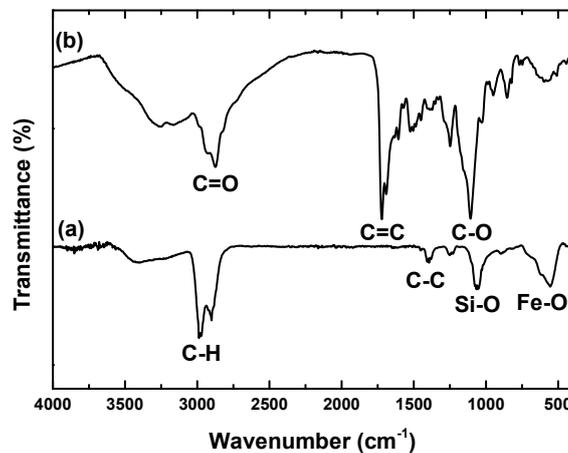


Figure II-4. Spectres IR des NPs Fe_{3-δ}O₄@ Silane (a) et NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}) (b)

2.3.2 Analyse thermogravimétrique (TGA)

Dans l'objectif de définir la composition des espèces présentes sur les surfaces des NPs Fe_{3-δ}O₄, des analyses TGA (voir Annexe 1) ont été réalisées dans la gamme de température comprise entre 50°C et 500°C (Figure II-5).

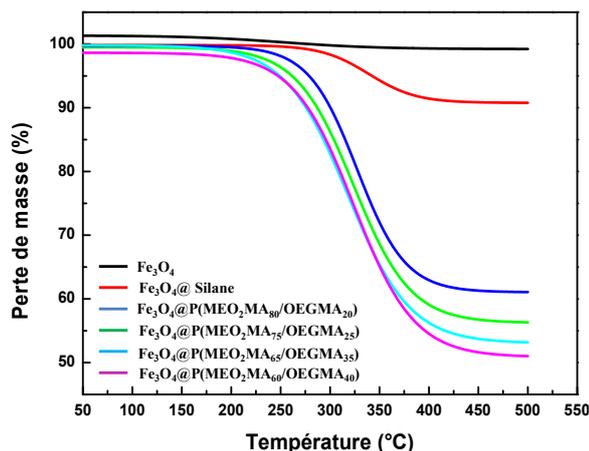


Figure II-5 : Evolution de la masse en fonction de la température lors des analyses thermogravimétriques

La perte de masse observée entre 250°C et 500°C est attribuée à la décomposition thermique du copolymère.

Les pertes de masse observées varient selon le Tableau suivant.

Nano-objets	Perte de masse (%)
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{80}\text{-OEGMA}_{20})$	35
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{75}\text{-OEGMA}_{25})$	38
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$	43
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$	48

Tableau II-2 : Pertes de masse en fonction de la nature des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{100-x}\text{-OEGMA}_x)$

Ceci montre qu'une quantité élevée de copolymère est greffée à la surface des NPs. Or, en comparant nos résultats à ceux déjà publiés¹¹ et qui reportent qu'un pourcentage de perte de la masse variant entre 8 et 15%¹¹, nous pouvons donc confirmer que le processus du greffage (ARGET-ATRP) via le 'Grafting from' permet l'ancrage d'une quantité plus importante du copolymère sur les surfaces des NPs que la quantité observée dans la littérature¹¹.

La haute densité de chaînes polymérisées est très prometteuse, car la quantité du principe actif qui sera encapsulée dans les NPs de type cœur/coquille dépend aussi de la quantité du polymère greffée sur les surfaces des NPs.

2.3.3 Morphologie, structure cristalline et taille des NPs.

Dans le but d'étudier la stabilité structurale de ces NPs après une modification par le silane et le copolymère, une caractérisation par un microscope électronique par transmission (MET) (Annexe 1) a été effectuée. La Figure II-6, montre les clichés MET des NPs silanisées et fonctionnalisées par le $\text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$. Ces clichés montrent des NPs d'oxyde de fer de forme sphérique plus ou moins agrégée.

Par ailleurs, la Figure II-6 présente des histogrammes des tailles de NPs. Ces histogrammes sont réalisés à partir de plusieurs centaines des NPs pour chaque échantillon synthétisé. La distribution a été ajustée par une loi de type log-normale. Le diamètre moyen de ces NPs est d'environ 10 nm.

La dispersion des NPs observées dans l'image (Figure II-6b) a été permise par la présence de couches organiques (monocouche de silane et une couche du copolymère) à la surface des NPs, ce qui permet de diminuer l'interaction magnétique entre les particules.

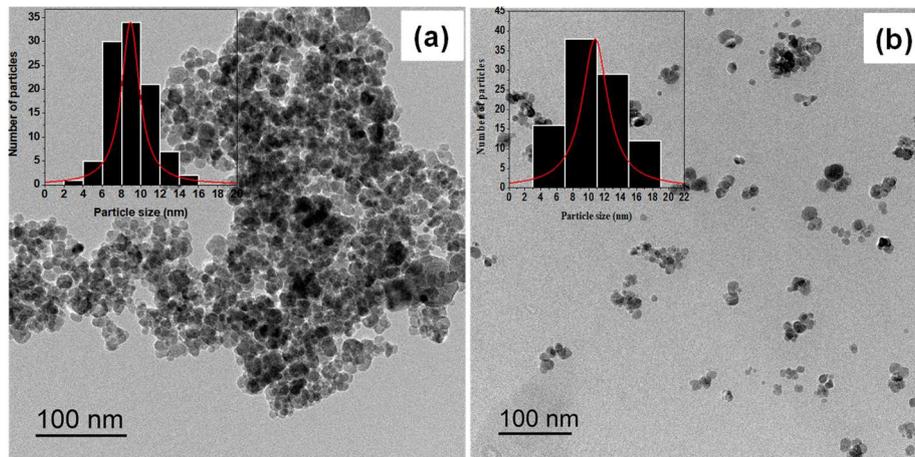


Figure II-6. Clichés MET (fond clair) et histogramme des tailles des NPs synthétisées : NPs Fe_{3-δ}O₄ @Silane(a) et NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀) (b)

Aussi, la confirmation de la fonctionnalisation des NPs par P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}) a été étudiée par la microscopie électronique par transmission (HR-TEM et HR-TEM) combinée à une analyse par la microscopie électronique par transmission à énergie filtrée (EELS). Le signal élémentaire du carbone (en vert, figure III-7) a été détecté à la surface et entre les particules (Figure III-7), indiquant la présence du copolymère autour des NPs magnétiques d'oxyde de fer.

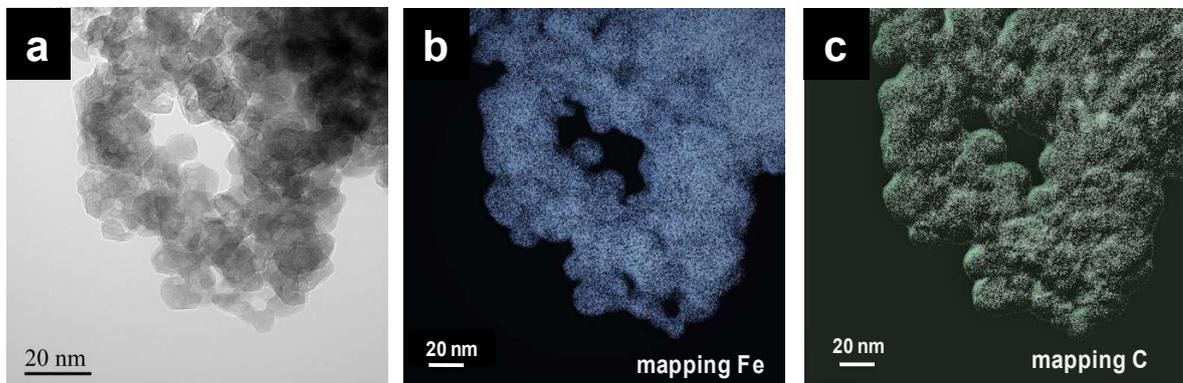


Figure III-7 : Observations des HR-TEM combinés à une analyse EF-TEM des NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X})

La Figure II-8 représente les diffractogrammes respectivement des NPs nues (noir), des NPs silanisées (rouge), et des NPs modifiées avec le P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) (bleu). Aucune différence significative n'a été enregistrée. Ces diffractogrammes présentent tous les mêmes pics de Bragg, caractéristiques de la magnétite ((200), (311), (400), (422), (511) et (440)).

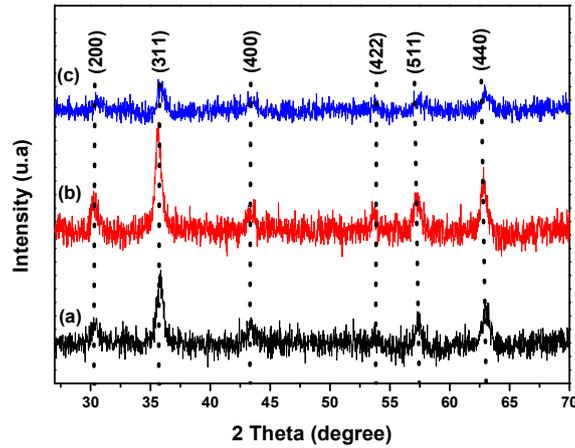


Figure II- 8. Diffractogrammes RX des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ (a) NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @Silane (b) et NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @ P(MEO₂M₆₀-OEGMA_{100-X}) (c).

Les tailles des NPs, déterminées à partir des largeurs des raies de diffraction X et la relation de Scherrer (voir Annexe 1), sont données dans le Tableau II-3. Les résultats nous montrent un bon accord entre les tailles déterminées par une diffraction des RX et par la diffraction électronique par MET.

Nano-objets	Taille (nm) (DRX)	Taille (nm) (TEM)
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$	11±1,7	9±1,2
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @Silane	11,5±2	10±1,4
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @P(MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀)	12±2,1	11±1

Tableau II-3 : Tailles des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$, NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @Silane et NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @ P(MEO₂M₆₀OEGMA₄₀), déterminées par MET et DRX

La Figure II-9 montre des clichés des diffractions électroniques par MET pour les différentes phases d'encapsulation des NPs.

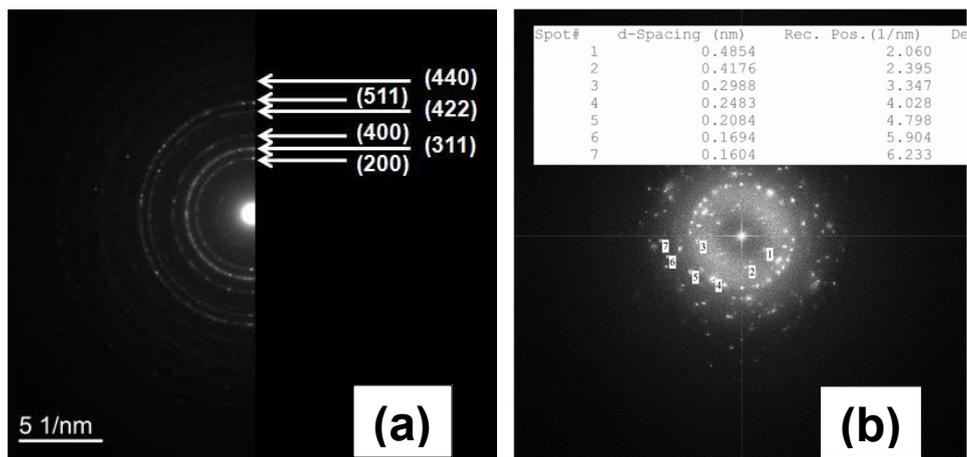


Figure II-9. Cliché des diffractions électroniques en sélection d'aire obtenu par MET sur des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @ P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) (b).

Les clichés des diffractions électroniques présentent des cercles concentriques, associés à des plans cristallins (200), (311), (400), (422), (511) et (440). Ces derniers sont identiques à ceux de la magnétite. Ces résultats montrent que les NPs fonctionnalisées sont bien cristallisées sur la totalité de leur volume à chacune des étapes du greffage.

La combinaison de la microscopie en transmission ainsi que de la diffraction des RX nous confirment bien que les étapes de fonctionnalisation des NPs n'ont aucune influence sur la structure cristalline des nanoparticules.

2.3.4 Comportement colloïdal des nano-objets dans les milieux physiologiques.

Pour étudier l'influence du milieu et la température sur les propriétés colloïdales des copolymères dans les nanostructures $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$, des analyses DLS ont été effectuées sur ces nanostructures en milieu aqueux et dans le milieu physiologique (Annexe 1).

La Figure II-10 montre l'évolution du diamètre hydrodynamique de tous les échantillons pour des températures variant entre 25 et 50° C :

- ❖ à des basses températures inférieures à la LCST, les NPs ne montrent pas de changement du diamètre moyen,
- ❖ lorsque la température augmente, le diamètre moyen des NPs augmente brusquement pour atteindre une valeur stable à partir de laquelle aucun changement significatif n'est observé.
- ❖

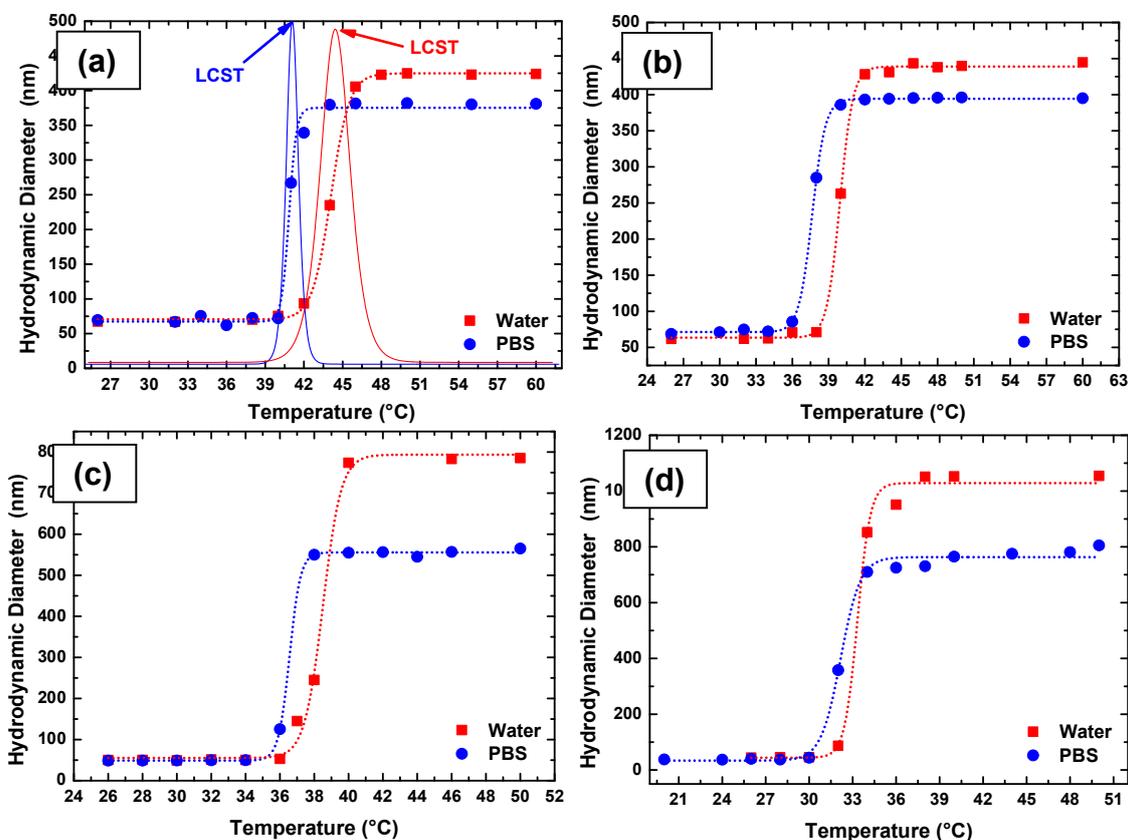


Figure II-10. Evolution du diamètre des NPs dérivées avec la température dans l'eau et PBS (a) $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$, (b) $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$, (c) $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ P(\text{MEO}_2\text{MA}_{75}\text{-OEGMA}_{25})$ et (d) $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ P(\text{MEO}_2\text{MA}_{80}\text{-OEGMA}_{20})$

En dessous de la LCST, le diamètre hydrodynamique est plus petit parce que les NPs cœur/coquilles ont été dispersées dans le milieu aqueux car les chaînes de polymères sont gonflées par le solvant via des liaisons d'hydrogène entre les groupements polaires du copolymère et l'eau⁵.

Au-dessus de la LCST, l'organisation des NPs dans le milieu aqueux évolue de la dispersion à l'agrégation comme il est illustré dans la Figure II-13. Ce processus est dû au fait que lorsque la température excède la LCST, comme il est expliqué dans le Chapitre 1, les ponts hydrogènes entre les molécules d'eau sont brisés et les chaînes de polymères précipitent à la surface des NPs rendant

la surface hydrophobe. ce qui conduit donc à l'agrégation des NPs dans le milieu aqueux et donc de l'élargissement des pics obtenus en DLS

Les valeurs des LCST des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ sont indiquées dans le Tableau II-4.

Nano-objets	LCST dans l'eau (°C)	LCST dans PBS (°C)
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{80}\text{-OEGMA}_{20})$	32	30
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{75}\text{-OEGMA}_{25})$	38	36
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$	40	38
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$	44	42

Tableau II-4 : Valeurs de la LCST des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ dans l'eau et dans le milieu physiologique, déterminées par DLS

Il a été expliqué dans le Chapitre 1, l'influence du nombre de groupe éthers-oxyde sur la valeur de la LCST et il a été montré que plus l'unité monomère contenait des groupements éther-oxydes, plus la LCST était décalée vers les hautes températures, ce qui se confirme pour nos échantillons. En effet lorsque nous augmentons les quantités d'OEGMA dans les échantillons, la LCST est décalée vers les hautes températures. Par exemple, l'échantillon avec 20% d'OEGMA présente une LCST égale à 33°C dans l'eau alors qu'elle est de 44°C pour l'échantillon avec une quantité double d'OEGMA.

La Figure II-10 montre un changement dans la LCST des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ NPs de 44°C dans l'eau à 42°C dans un milieu physiologique avec une agrégation significative. Les anions kosmotropiques diminuent la LCST du copolymère par rapport à celle des molécules d'eau interfaciales polarisantes¹². Cet effet de polarisation est donc capable d'affaiblir la liaison hydrogène des molécules d'eau avec l'oxygène des groupes éther dans les copolymères $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ ¹³. Ce qui conduit à la diminution de la LCST dans les milieux physiologiques.

Enfin, afin d'étudier la réversibilité (dispersion et d'agrégation) de nos systèmes avec la température, des cycles successifs du chauffage ($T > \text{LCST}$) et de refroidissement ($T < \text{LCST}$) ont été effectués. Les résultats sont présentés dans la Figure II-11 indiquant l'évolution du diamètre hydrodynamique en fonction de la température, et confirme que les processus sont donc entièrement réversibles.

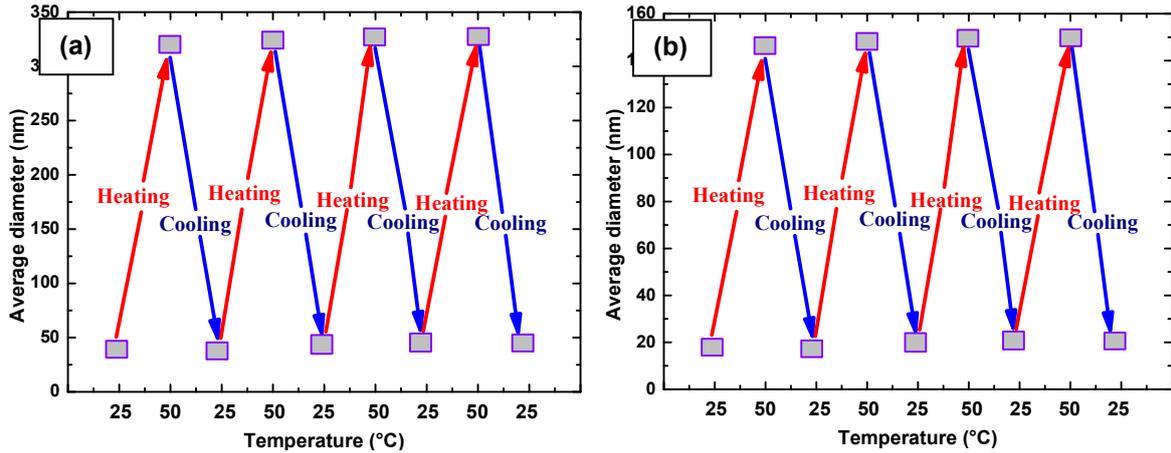


Figure II-11. Réversibilité de l'évolution du diamètre hydrodynamique des NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) avec des cycles successifs de chauffage et de refroidissement dans (a) l'eau et (b) dans le PBS.

À une température ambiante (inférieure à la LCST pour les NPs Fe_{3-δ}O₄@P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀), le diamètre hydrodynamique est faible car les NPs sont bien dispersés dans le milieu. Quant à 50°C (température supérieure à la LCST qui est autour de 40°C pour ces NPs), le diamètre hydrodynamique est plus grand à cause de l'agrégation des NPs. Dans le sens inverse, le copolymère est réhydraté pendant le processus de refroidissement, ce qui permet la nouvelle dispersion des NPs. Ce comportement est en accord avec la capacité d'hydratation élevée de l'éthylène glycol et des groupes du copolymère P(MEO₂MA_X-OEGMA_{100-X}) aux températures inférieures à la LCST⁵.

2.3.5 Propriétés magnétiques des nano-objets

Pour étudier les propriétés magnétiques des NPs élaborées, des mesures d'aimantation en fonction du champ ont été effectuées (Annexe 1). Les courbes d'aimantation des NPs en fonction du champ magnétique pour les différentes compositions des Fe_{3-δ}O₄ fonctionnalisées par le copolymère sont présentées dans la Figure II-12. Le cycle relatif aux différents échantillons ne comporte pas d'hystérésis à 300 K¹². Les valeurs d'aimantation à saturation des NPs fonctionnalisées par le copolymère sont présentées dans le Tableau suivant.

Nano-objets	M(emu/g)
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ MA ₈₀ -OEGMA ₂₀)	38
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ MA ₇₅ -OEGMA ₂₅)	35
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ MA ₆₅ -OEGMA ₃₅)	32
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀)	30

Tableau II-5 : Valeur d'aimantation à une saturation (emu. g⁻¹) en fonction de la nature des NPs fonctionnalisées

La diminution de la valeur d'aimantation à une saturation de 38 emu. g⁻¹ pour les NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂MA₈₀-OEGMA₂₀) à 30 emu. g⁻¹ pour les NPs Fe_{3-δ}O₄ @ le P (MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) est attribué à une couche organique à la surface des NPs, qui permet de diminuer l'interaction magnétique^{5,12}.

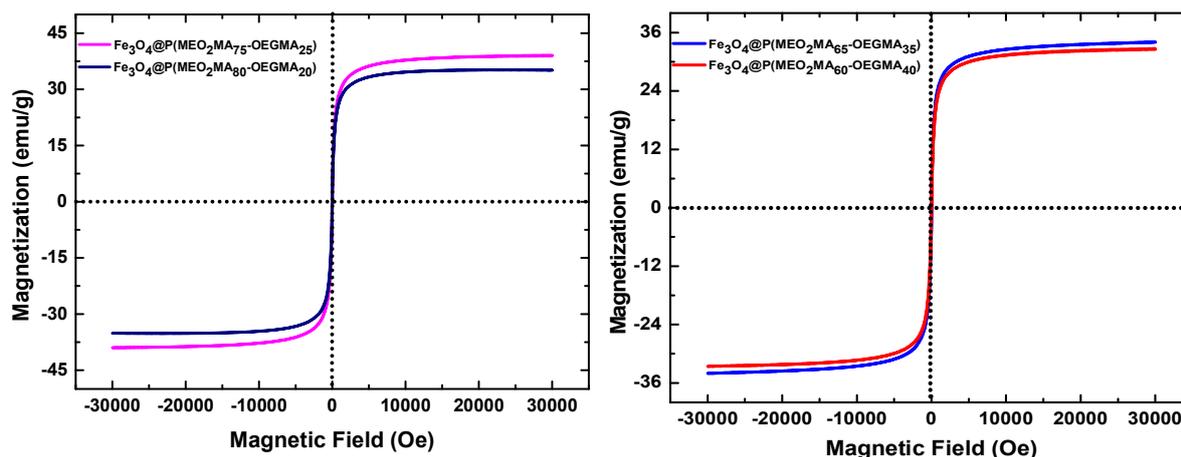


Figure II-12 : Valeur de l’aimantation en fonction du champ magnétique pour des NPs de $Fe_{3-\delta}O_4 @ P(MEO_2MA_x-OEGMA_{100-x})$

Afin d’étudier l’effet de la température sur les propriétés magnétiques, des mesures magnétiques avec une aimantation en fonction du champ et de la température ont été réalisées.

La Figure II-13 présente l’évolution de la magnétisation des NPs $Fe_{3-\delta}O_4 @ P(MEO_2MA_{60}-OEGMA_{40})$ et $Fe_{3-\delta}O_4 @ P(MEO_2MA_{65}-OEGMA_{35})$ en fonction du champ magnétique à différentes températures, en dessous et au-dessus de la LCST.

Les résultats montrent que les propriétés superparamagnétiques des NPs de $Fe_{3-\delta}O_4$ ne sont pas modifiées par le changement de la température et donc avec l’état d’agrégation des NPs.

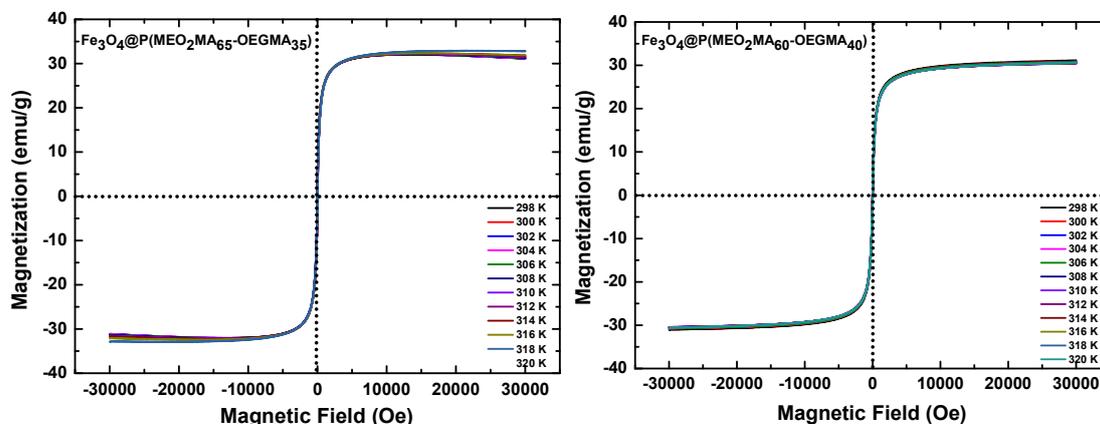


Figure II-13 : Valeur de l’aimantation en fonction du champ magnétique pour des différentes températures et des NPs de $Fe_{3-\delta}O_4 @ P(MEO_2MA_x-OEGMA_{100-x})$

Des mesures d’aimantation de type ZFC/FC ont été réalisées sur les différentes poudres des NPs. La Figure II-13 montre les différentes courbes expérimentales obtenues. A l’aide de ces courbes ZFC/FC donnant l’aimantation en fonction de la température pour un champ magnétique constant de 75 Oe, la température du blocage a pu être déterminée pour les différents échantillons de NPs synthétisées selon les différentes méthodes.

Sur les Figures II-13a et II-13b, l’aimantation augmente avec la température pour atteindre un maximum puis une légère diminution est observée. Le maxima de chacune des courbes correspond à la température dite « de blocage¹¹ » (T_B). Plusieurs informations ressortent de ces courbes :

- ✓ d’une part, nous confirmons qu’à une température ambiante, les NPs d’oxyde de fer synthétisées sont dans l’état superparamagnétique,

- ✓ d'autre part, nous connaissons les températures du blocage. Et cette température est de $250\text{K} \pm 10\text{K}$ environ.

Cette température du blocage est légèrement supérieure à celle rapportée pour d'autres NPs d'oxyde de fer de tailles similaires suggérant une certaine agrégation de NPs lors des mesures¹¹.

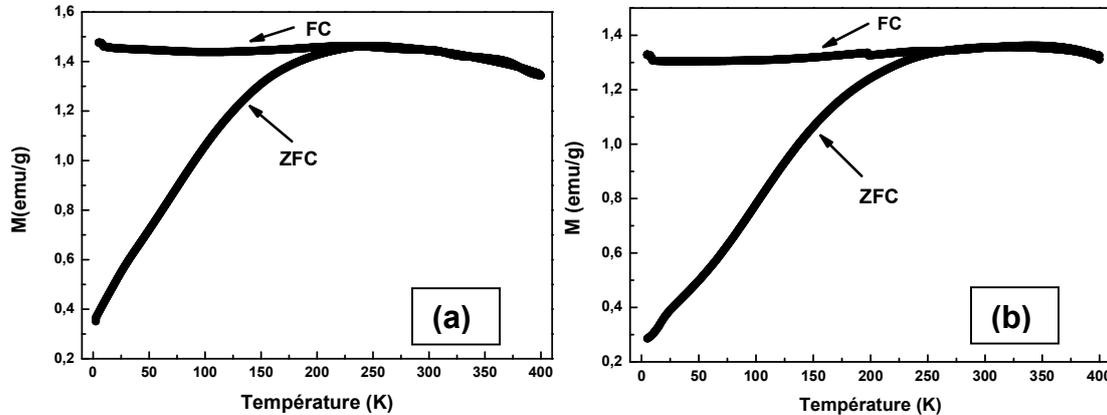


Figure II-13. Courbes d'aimantation en mode ZFC/FC des NPs de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @Silane (a) et $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @ P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) (b)

2.3.6 Interaction entre P(MEO₂M_x-OEGMA_{100-x}) et la DOX

Afin d'étudier l'interaction entre les chaînes du copolymère et la DOX, une analyse par FTIR-ATR a été réalisée. La Figure II-14 montre les spectres de la DOX, des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀) et NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀) chargées en DOX dans le milieu DMEM.

Les affectations ont été effectuées conformément à la littérature^{13,14} sur ce sujet.

Le spectre de la DOX (Figure II-14 (a)) montre des bandes bien définies à 1582, 1285, 1269, 1211, 1013 et 990 cm^{-1} attribuées aux fractions aromatiques de la DOX. De plus, les bandes à 1724 et 1624 cm^{-1} ont été attribuées à la bande d'étirement C = O et N-H dans NH₂, respectivement. Le spectre des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @ P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀) (Figure II-14 (b)) est clairement différent et il montre deux larges bandes à 1556 et 1394 cm^{-1} attribuées principalement au groupe carboxylate des groupes citrates.

La bande à 1247 cm^{-1} a été attribuée aux groupes Si-CH₂-R et les bandes localisées entre 1150 et 1000 cm^{-1} ont été attribuées aux bandes des groupes C-OH, Si-O-Si et Si-O.

Le spectre des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀) après le contact avec la DOX et le rinçage ultérieur montrent des bandes à 1285, 1266, 1211, 1015 et 995 cm^{-1} (Figure II-14 (c)). Ils sont attribués aux fragments aromatiques de la DOX et ils vérifient la présence de la DOX sur les NPs.

La bande C = O absorbe à 1741 cm^{-1} dans les DOX-NPs, montrant probablement une liaison hydrogène du groupe ester de la DOX.

Une caractéristique intéressante du spectre est la « disparition » de la bande de NH₂ précédemment observée à 1624 cm^{-1} . Il est très probable que cette liaison a été déplacée dans la région située entre 1550 et 1580 cm^{-1} , où plusieurs bandes s'affichent. Ce décalage est dû à une forte liaison hydrogène impliquant le groupe amine de la DOX et l'éther oxydant des groupes polaires du copolymère.

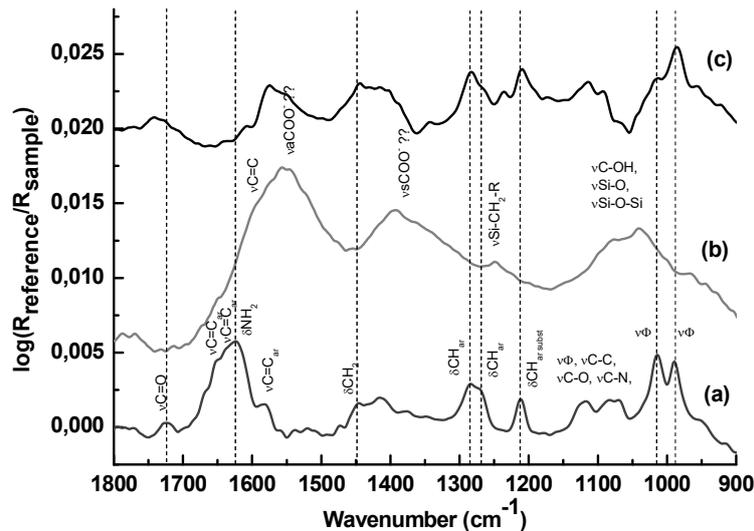


Figure II-14: Spectres FTIR en mode ATR de la (a) DOX, (b) NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ et (c) NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ chargé en DOX dans un milieu DMEM (référence = milieu DMEM dans lequel les espèces se trouvent).

2.3.7 Libération des principes actifs en fonction de la température

Comme nous l'avons mentionné dans le premier Chapitre, la DOX a été choisie comme un principe actif modèle pour déterminer les propriétés de la libération du principe actif à partir des NPs de type cœur/coquille.

Les NPs de type cœur/coquille développées dans ce travail ont été chargées en DOX dans les chaînes de copolymères par des interactions supramoléculaires. Les interactions dipôle-dipôle du type Van der Waals peuvent également être envisagées, mais les principales d'interactions qui permettent la pénétration de la DOX dans ces échantillons sont les interactions du types hydrogène comme confirmer précédemment^{15,16}. En effet, nous avons privilégié les interactions supramoléculaires pour encapsuler la DOX pour développer un système qui peut rapidement libérer le médicament uniquement via une faible augmentation de la température^{17,18}. Tandis que les chaînes des copolymères sont gonflées sous la LCST grâce à la liaison hydrogène avec les molécules H_2O , la DOX peut diffuser dans la coquille des copolymères et être bloquée par les interactions du type hydrogène. Une fois que la LCST est atteinte, les chaînes de copolymères vont subir une transition hydrophile/hydrophobe et leur effondrement à la surface des NPs de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ permettra la libération de la DOX^{19,20}.

Nous avons choisi d'effectuer des expériences dans un court laps de temps (5 min) pour démontrer l'effet de la température sur nos NPs cœur/coquille. La Figure II-15 montre l'évolution de la libération cumulative de la DOX en fonction de la température pour les NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ dans l'eau et dans le PBS.

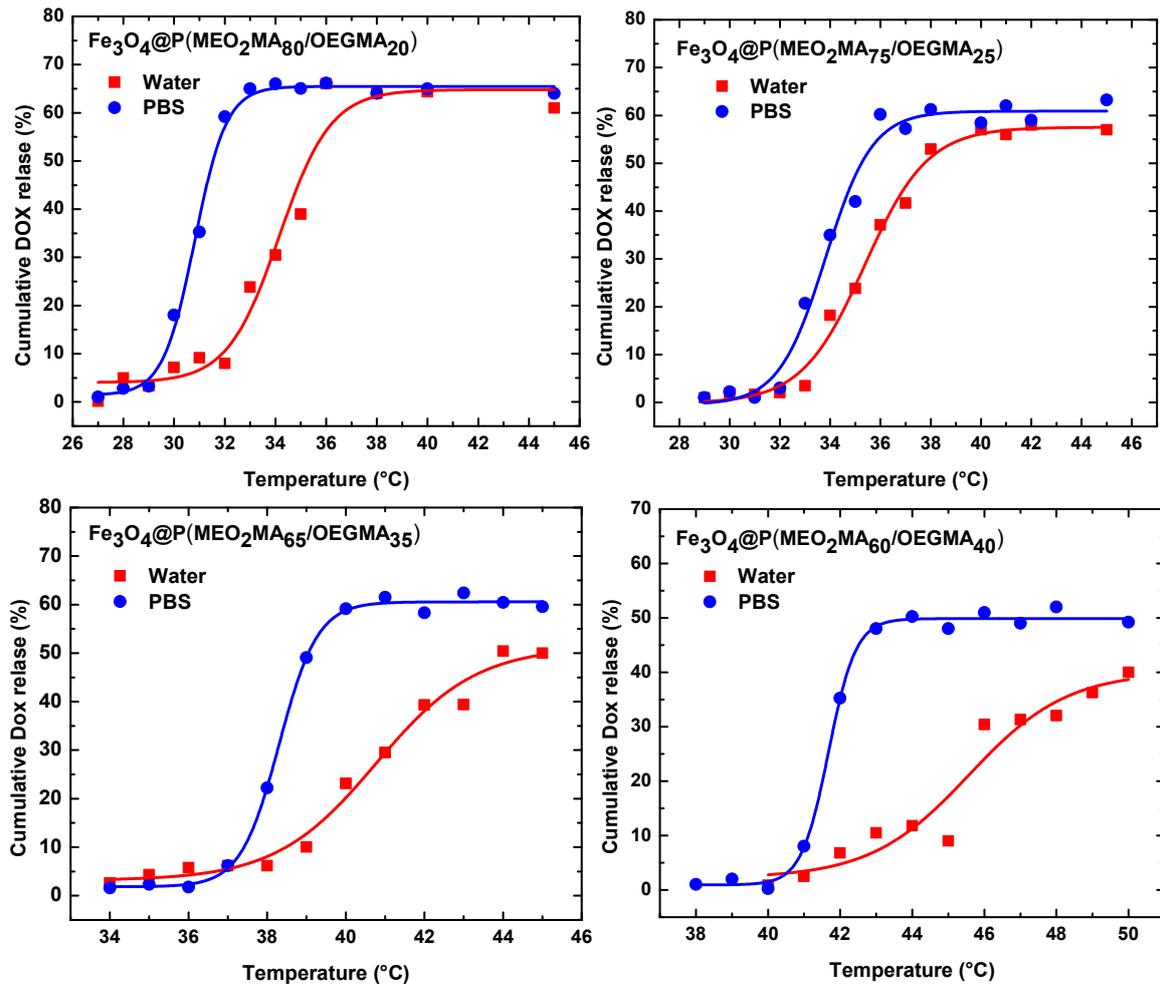


Figure II-15. Courbes de la cumulation des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ dans l'eau et le PBS

Étonnamment, il n'y a presque pas de DOX libérée pour les quatre échantillons en dessous de la LCST (Figure II-15). Lorsque la température augmente, nous observons un changement de la pente des courbes dès que la LCST est atteinte. La forte libération a lieu à 32, 35, 40 et 44°C respectivement pour les NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{80}\text{-OEGMA}_{20})$, NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{75}\text{-OEGMA}_{25})$, NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ et NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ dans l'eau et à 30, 33, 38°C et 42°C dans le PBS. Ces températures correspondent respectivement aux LCST des échantillons dans l'eau et du PBS.

De plus l'évolution du taux de libération du médicament est également influencée par la quantité OEGMA dans la structure du copolymère. Citons l'exemple, des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ contenant une quantité élevée d'OEGMA, la gamme de température entre le début de la libération du médicament et sa totalité de la libération est très importante par rapport à celle des NPs qui ont moins de quantité d'OEGMA. Néanmoins, seulement $60 \pm 10\%$ de la quantité totale de la DOX ont été libérées dans ce délai très court (≈ 5 min), assurant ainsi une forte diffusion de DOX hors du copolymère et indiquant qu'une durée plus grande est nécessaire pour libérer totalement le principe actif²¹.

2.4 Conclusion

Dans cette étude, même si la méthode mise en place demande des améliorations, nous avons montré que la stimulation thermique a pour effet de déclencher la libération de la DOX en fonction de la température des NPs.

Donc afin d'assurer leurs performances comme un vrai nanovecteur de la DOX, dans le Chapitre suivant, nous développerons l'étude du mécanisme de relargage de la DOX. Nous les mettrons par la suite en contact avec des cellules cancéreuses afin de mettre en évidence leur performances en tant que nanovecteurs.

2.5 Références

- (1) Li, L.; Jiang, W.; Luo, K.; Song, H.; Lan, F.; Wu, Y.; Gu, Z. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as MRI Contrast Agents for Non-Invasive Stem Cell Labeling and Tracking. *Theranostics* **2013**, *3* (8), 595–615. <https://doi.org/10.7150/thno.5366>.
- (2) Sun, X.; Du, R.; Zhang, L.; Zhang, G.; Zheng, X.; Qian, J.; Tian, X.; Zhou, J.; He, J.; Wang, Y.; et al. A PH-Responsive Yolk-Like Nanoplatform for Tumor Targeted Dual-Mode Magnetic Resonance Imaging and Chemotherapy. *ACS Nano* **2017**, *11* (7), 7049–7059. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b02675>.
- (3) Dine, E. J. A.; Ferjaoui, Z.; Roques-Carmes, T.; Schjen, A.; Meftah, A.; Hamieh, T.; Toufaily, J.; Schneider, R.; Gaffet, E.; Alem, H. Efficient Synthetic Access to Thermo-Responsive Core/Shell Nanoparticles. *Nanotechnology* **2017**, *28* (12), 125601. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa5d81>.
- (4) May, J. P.; Li, S.-D. Hyperthermia-Induced Drug Targeting. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2013**, *10* (4), 511–527. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.758631>.
- (5) Al Dine, E. J.; Marchal, S.; Schneider, R.; Hamie, B.; Ghanbaja, J.; Roques-Carmes, T.; Hamieh, T.; Toufaily, J.; Gaffet, E.; Alem, H. A Facile Approach for Doxorubicine Delivery in Cancer Cells by Responsive and Fluorescent Core/Shell Quantum Dots. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (7), 2248–2256. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00253>.
- (6) Majewski, A. P.; Stahlschmidt, U.; Jérôme, V.; Freitag, R.; Müller, A. H. E.; Schmalz, H. PDMAEMA-Grafted Core–Shell–Corona Particles for Nonviral Gene Delivery and Magnetic Cell Separation. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (9), 3081–3090. <https://doi.org/10.1021/bm400703d>.
- (7) Kurzhals, S.; Schroffenegger, M.; Gal, N.; Zirbs, R.; Reimhult, E. Influence of Grafted Block Copolymer Structure on Thermoresponsiveness of Superparamagnetic Core–Shell Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (5), 1435–1444. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01403>.
- (8) Louguet, S.; Rousseau, B.; Epherre, R.; Guidolin, N.; Goglio, G.; Mornet, S.; Duguet, E.; Lecommandoux, S.; Schatz, C. Thermoresponsive Polymer Brush-Functionalized Magnetic Manganite Nanoparticles for Remotely Triggered Drug Release. *Polym. Chem.* **2012**, *3* (6), 1408. <https://doi.org/10.1039/c2py20089a>.
- (9) Alem, H.; Schejn, A.; Roques-Carmes, T.; Ghanbaja, J.; Schneider, R. Thermo-Responsive and Aqueous Dispersible ZnO/PNIPAM Core/Shell Nanoparticles. *Nanotechnology* **2015**, *26* (33), 335605. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/33/335605>.
- (10) Xu, Z.; Liu, Q.; Finch, J. A. Silanation and Stability of 3-Aminopropyl Triethoxy Silane on Nanosized Superparamagnetic Particles: I. Direct Silanation. *Appl. Surf. Sci.* **1997**, *120* (3–4), 269–278. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(97\)00234-1](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(97)00234-1).
- (11) Gloria, A.; Russo, T.; D’Amora, U.; Zeppetelli, S.; D’Alessandro, T.; Sandri, M.; Banobre-Lopez, M.; Pineiro-Redondo, Y.; Uhlarz, M.; Tampieri, A.; et al. Magnetic Poly(ε-Caprolactone)/Iron-Doped Hydroxyapatite Nanocomposite Substrates for Advanced Bone Tissue Engineering. *J. R. Soc. Interface* **2013**, *10* (80), 20120833–20120833. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0833>.
- (12) Hervault, A.; Dunn, A. E.; Lim, M.; Boyer, C.; Mott, D.; Maenosono, S.; Thanh, N. T. K. Doxorubicin Loaded Dual PH- and Thermo-Responsive Magnetic Nanocarrier for Combined Magnetic Hyperthermia and Targeted Controlled Drug Delivery Applications. *Nanoscale* **2016**,

- 8 (24), 12152–12161.
<https://doi.org/10.1039/C5NR07773G>.
- (13) Chiu, J. J.; Kim, B. J.; Kramer, E. J.; Pine, D. J. Control of Nanoparticle Location in Block Copolymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (14), 5036–5037.
<https://doi.org/10.1021/ja050376i>.
- (14) Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z.; Shin, D. M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (5), 1310–1316.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1441>.
- (15) Guo, L.; Ding, W. Immobilized Transferrin Fe₃O₄@SiO₂ Nanoparticle with High Doxorubicin Loading for Dual-Targeted Tumor Drug Delivery. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, 4631.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S51745>.
- (16) Vigevani, A.; Ballabio, M.; Gandini, E.; Penco, S. ¹H NMR and IR Spectra of Antitumour Anthracyclines: Effect of the Substitution Pattern on the Chemical Shift Values of the Phenolic Protons and on IR Absorptions of the Quinone System. *Magn. Reson. Chem.* **1985**, *23* (5), 344–352.
<https://doi.org/10.1002/mrc.1260230513>.
- (17) Missirlis, D.; Kawamura, R.; Tirelli, N.; Hubbell, J. A. Doxorubicin Encapsulation and Diffusional Release from Stable, Polymeric, Hydrogel Nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29* (2), 120–129.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.06.003>.
- (18) Louguet, S.; Rousseau, B.; Epherre, R.; Guidolin, N.; Goglio, G.; Mornet, S.; Duguet, E.; Lecommandoux, S.; Schatz, C. Thermoresponsive Polymer Brush-Functionalized Magnetic Manganite Nanoparticles for Remotely Triggered Drug Release. *Polym. Chem.* **2012**, *3* (6), 1408.
<https://doi.org/10.1039/c2py20089a>.
- (19) Lefkowitz, R. J. Identification of Adenylate Cyclase-Coupled Beta-Adrenergic Receptors with Radiolabeled Beta-Adrenergic Antagonists. *Biochem. Pharmacol.* **1975**, *24* (18), 1651–1658.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(75\)90001-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(75)90001-5)
- (20) Moghaddam, S. Z.; Thormann, E. Hofmeister Effect on Thermo-Responsive Poly (Propylene Oxide) in H₂O and D₂O. *RSC Adv.* **2016**, *6* (33), 27969–27973.
<https://doi.org/10.1039/C6RA02703B>.
- (21) Iwahara, J.; Esadze, A.; Zandarashvili, L. Physicochemical Properties of Ion Pairs of Biological Macromolecules. *Biomolecules* **2015**, *5* (4), 2435–2463.
<https://doi.org/10.3390/biom5042435>.

3 Chapitre III : Evaluation des performances biologiques d'un nanovecteur magnétique thermosensible

3.1 Introduction

Comme il a été expliqué, les NPs, décrites dans le Chapitre précédent peuvent être utilisées pour le diagnostic et la libération contrôlée de médicament^{1,2}. Afin d'augmenter leur efficacité thérapeutique, il était intéressant de déterminer les propriétés d'hyperthermie des nanoparticules afin de pouvoir envisager un traitement bimodal, à savoir la combinaison de l'hyperthermie et le relargage de la DOX³⁻⁸. En effet l'application de l'hyperthermie au sein des cellules cancéreuses a montré des résultats prometteurs, où il a été démontré que les cellules cancéreuses ne survivaient pas à des températures supérieures à 42°C⁹⁻¹¹.

L'hyperthermie résulte de la génération locale de chaleur lorsque les SPIONs sont exposées à un champ magnétique alternatif (AMF)⁶⁻⁸ (comme expliqué dans le Chapitre 1). Afin d'optimiser les propriétés d'hyperthermie et la circulation des NPs dans le milieu physiologique, nous avons transposé le procédé précédemment décrit au même cœur, mais en contrôlant le ratio entre les deux monomères afin d'obtenir une température de relargage autour de 41°C dans les milieux physiologiques.

Nos travaux s'inscrivent dans la suite des travaux de Christopher *et al.*¹², pour lesquels des NPs cœur/coquille composées d'un cœur d'oxyde de fer superparamagnétique et d'une coquille polyéthylène glycol (PEG) ont été élaborées. Ces chercheurs ont montré qu'en fonction de la longueur de chaîne du PEG greffé à la surface, un taux de chargement de la DOX au-delà de 30% a pu être atteint. Lorsque ces NPs étaient soumises dans un milieu physiologique, à un champ magnétique alternatif (23.77 kA/m, 355 kHz), la température de la solution (100 µg mL⁻¹) pouvait augmenter de 37°C à 43°C après 30 min. Cette température est suffisante pour déclencher l'apoptose des cellules cancéreuses. En effet, les auteurs montrent que lorsque ces nano-objets sont mis en contact avec les cellules HeLa *in vitro*, jusqu'à des concentrations de 100 µg mL⁻¹ de NPs chargées en DOX, la viabilité cellulaire passe de 60 ± 15% sans AMF à 30 ± 10% lorsqu'AMF est appliqué.

Une autre option pour fabriquer un nanovecteur magnétique thermosensible a été démontrée dans le deuxième Chapitre^{13,14} : des NPs d'oxyde de fer fonctionnalisées par un copolymère thermosensible affichent une LCST modulable/ajustable en fonction de la quantité des deux monomères dans la plage de la température corporelle ont été fabriquées¹⁵⁻¹⁷. L'utilisation des polymères thermosensibles présentant une LCST dans une plage d'une température de 40 à 42 °C montre un grand intérêt pour les NPs cœur/coquille conçues pour les applications biomédicales^{18,19}. En dessous de la température physiologique, une fois que les macromolécules sensibles se sont greffées d'une manière covalente à la surface des NPs, elles peuvent piéger un médicament anticancéreux par des interactions non covalentes comme nous avons démontré précédemment, où leur caractère hydrophile pourrait permettre leur bonne dispersion et leur circulation dans le sang^{17,20}. Lors du chauffage local (via l'hyperthermie, par exemple) entre 40 et 42 °C, la libération du médicament pourrait être déclenchée d'une manière contrôlée en fonction du temps^{15,21}.

Dans ce Chapitre, nous avons étudié des nanovecteurs élaborées dans le Chapitre 2, et nous avons sélectionné deux échantillons (Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₅-OEGMA₃₅) et Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀)) qui présentent des LCST dans le milieu physiologique supérieurs à 37°C.

La cinétique de la libération du médicament a été étudiée et il a été montré qu'elle dépendait de la température et du temps. La libération est observée autour de 42° C, avec une libération

cumulative de la DOX d'environ 100% après 52 heures. Il a également été démontré que les NPs magnétiques chargées présentaient des propriétés d'hyperthermie magnétique lorsqu'un champ magnétique alternatif était appliqué.

Les résultats de la cytotoxicité ont montré que les NPs cœur/coquille présentent une cytotoxicité limitée à une concentration de $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ vis-à-vis des lignées de cancer de HT29. Mais lorsque les NPs chargées en DOX sont en contact avec les cellules SKOV-3 et sont placées dans un incubateur à 42°C , nous avons montré que ces NPs sont beaucoup plus cytotoxiques que la DOX libre.

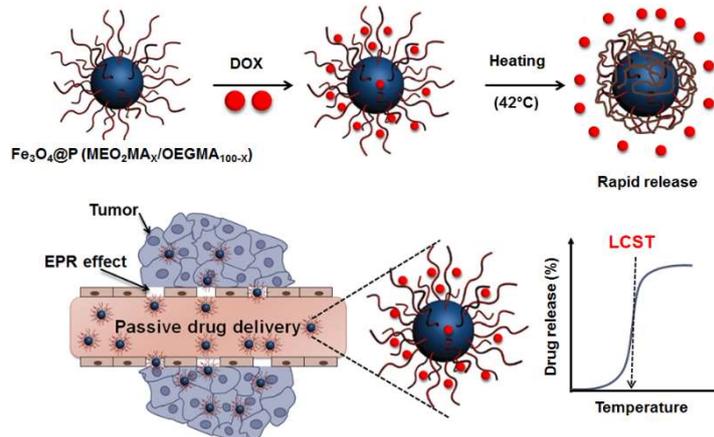


Figure III-1 : Schéma général de l'objectif du Chapitre 3

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 Matériels

Les études biologiques ont été réalisées sur la croissance cellulaire avec du glucose (DMEM; Sigma Aldrich, Saint-Louis) de Dulbecco, ils ont complété par un sérum fœtal de veau à 15% (FBS; Sigma-Aldrich, Saint-Louis), 100 U mL^{-1} , la pénicilline et 100 g mL^{-1} de la streptomycine, 4 mM de L-glutamine et $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ d'amphotéricine B. Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO_2 .

3.2.2 Analyse de cinétique de libération de la DOX

Différents modèles mathématiques empiriques et mécanistiques sont proposés pour décrire la libération de principe actif à partir des nanoparticules de type cœur/coquille¹. Nous avons comparé quatre modèles mathématiques à notre étude afin de mieux identifier le mécanisme de libération du principe actif et la vitesse de la libération²² : d'ordre zéro ; premier ordre ; Higuchi²³ et Korsmeyer-Peppas²⁴. Le Tableau III-1 : récapitule les équations de ces différents modèles et la nature des mécanismes qui contrôlent la libération.

La libération cinétique d'ordre zéro dépend de la concentration et peut être exprimée comme se suit :

$$M_t = M_0 + K_0 \cdot t \quad (\text{III-1})$$

Lorsque M_t est la quantité de principe actif dissoute au temps t , M_0 est la quantité initiale du principe actif dans la solution (la plupart du temps, $M_0 = 0$) et K_0 est la constante de la libération d'ordre zéro exprimée en unité de concentration / du temps.

La libération cinétique du premier ordre dépend de la concentration et peut être exprimée

$$M_t = M_\infty [1 - \exp(-K_1 \cdot t)] \quad (\text{III-2})$$

Lorsque M_0 est la concentration initiale du principe actif, K_1 est la constante du premier ordre et t est le temps. En effet, le relargage est commencé par une vitesse rapide (diffusion du principe actif encapsulé proche de la surface) puis se ralentit (diffusion plus lente).

Le modèle d'Higuchi²³ décrit la libération du principe actif à partir des matrices solides, et il est décrit comme :

$$M_t = K_h \cdot t^{1/2} \quad (\text{III-3})$$

où M_t est le principe actif libéré à l'instant t , et K_h est la constante de la vitesse. Une fois que la courbe de $M_t / t^{1/2}$ est linéaire avec une pente ≥ 1 , on considère qu'elle suit la cinétique de la libération du principe actif décrite par le modèle de Higuchi²³.

Le modèle de Korsmeyer-Peppas²⁴ consiste en une relation simple, qui décrit la libération d'un médicament à partir d'une matrice polymérique, et s'écrit comme se suit :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_{kp} \cdot t^n, \quad \frac{M_t}{M_\infty} < 0,6 \quad (\text{III-4})$$

où M_t / M_∞ est la fraction de la libération du principe actif à l'instant t ; K_{kp} est une constante ; et n est l'exposant de la libération. Le modèle de libération suit la diffusion de Fickian comme $n < 0.5$, et non-Fickian comme $0.5 < n < 1$ ²⁴. En comparant le coefficient de la régression (R^2) du modèle différent, la précision de chaque ajustement a pu être vérifiée. Pour chaque température, le modèle qui donne le R^2 le plus élevé a été considéré comme le meilleur ajustement des données de rejet.

Modèle mathématique	Equation	Nature du mécanisme
Ordre zéro	$M_t = M_0 + K_0 \cdot t$	Vitesse de libération indépendante de la concentration du principe actif dissous
Premier ordre	$M_t = M_\infty [1 - \exp(-K_1 \cdot t)]$	Vitesse de libération dépendante de la concentration du principe actif dissous
Higuchi	$M_t = K_h \cdot t^{1/2}$	Libération par diffusion
Korsmeyer-Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_{kp} \cdot t^n, \quad \frac{M_t}{M_\infty} < 0,6$	La magnitude de l'exposant n indique le mécanisme de libération (diffusion Fickien, diffusion non-Fickien)

Tableau III-1 : Les modèles cinétiques régissant les mécanismes de libération^{1,22-24}

3.2.3 Mesure d'hyperthermie

Mesure de la capacité thermique: Les capacités thermiques des mélanges à la pression atmosphérique ont été mesurées à l'aide d'un calorimètre du type Calvet, Setaram C80 (France), dans une plage d'une température allant de 298 K à 373K. Une description complète de la procédure est donnée dans des travaux antérieurs^{25,26}. En quelques mots, tout d'abord la température de l'échantillon a été fixée à 298 K pendant 2 heures. Ensuite, la vitesse du balayage a été fixée à 0,5 K min⁻¹ jusqu'à 373 K. Cette température a été maintenue pendant 1 h.

Mesure d'hyperthermie magnétique : Des mesures du chauffage magnétique ont été effectuées pour évaluer les performances du chauffage des nanocomposites en utilisant un système d'hyperthermie magnétique fonctionnant à une fréquence $f = 536,5$ kHz et une amplitude de champ alternatif $H = 300$ Oe. Des échantillons constitués de 1 mL de NPs $Fe_{3-\delta}O_4 @ P(MEO_2M_X-OEGMA_{100-X})$ dispersées dans de l'eau et le DMEM à une concentration de 4,5 mg mL⁻¹ ont été placés au centre de la bobine. L'augmentation de la température a été enregistrée en continu à l'aide des sondes à fibres optiques

centrées dans la suspension. Deux sondes ont été utilisées afin de limiter les erreurs éventuelles provenant d'un chauffage spatial non homogène de la suspension. La mesure a été lancée lorsque la température de la suspension a été stabilisée à la température ambiante et le temps de mesure a été limité à 10 minutes.

3.2.4 Caractérisation biologique

Culture cellulaire : Les lignées cellulaires HT29 et SKOV-3 ont été obtenues auprès de la collection des cellules ATCC® (LGC Promochem, Molsheim, France). Les cellules ont été cultivées dans une atmosphère humidifiée (5% de CO₂) à 37 °C dans un milieu de Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) sans le rouge phénol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), additionnée de 9% de sérum fœtal de veau (SVF), inactivé par la chaleur et 1% L-glutamine 200 mM (Life Technologies, Carlsbad, États-Unis).

Trois jours avant l'ajout des NPs, les cellules SKOV-3 ont été traitées à la trypsine, récupérées dans du DMEM supplémenté et ensemencées dans une plaque à 96 puits à un débit de 10⁵ cellules / mL (2,5 * 10⁴ cellules par puits).

Les cellules ont été exposées pendant 24 h à 37°C et 5 h à 41°C à :

- de la DOX libre (0.7 µg mL⁻¹),
- des NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}) (plage en concentrations de 2,5-10 µg mL⁻¹)
- des NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}) chargées en DOX (plage en concentrations de 2,5-10 µg mL⁻¹)

3.3 Résultats et discussion

3.3.1 Profil de la libération et mécanisme du DOX en fonction de la température

Comme décrit précédemment, lorsque la LCST est atteinte, le polymère devient hydrophobe et les chaînes se contractent en expulsant les molécules d'eau de solvatation. De plus nous avons montré que la DOX interagissait avec les fractions copolymères éther-oxydes polaires via une liaison hydrogène (Chapitre 2). Les interactions entre les molécules d'eau et la doxorubicine étant des interactions principalement hydrogènes, la principale driving-force de la libération de la DOX a été la température, et donc que cette dernière serait libérée autour de la LCST du copolymère (en fonction de la nature du milieu). Il est à noter que l'encombrement de la DOX peut induire une libération précoce de cette dernière. Sur la base des modèles pharmaceutiques décrits dans la littérature, nous avons suivi la cinétique de libération de la doxorubicine à la température corporelle (37°C) et dans les conditions de relargage (à 42°C) dans le milieu de culture en vue de se rapprocher au plus près des conditions physiologiques.

À 37°C, dans le milieu de culture, la proportion initiale de la libération cumulative de la DOX par les NPs de Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀) était d'environ 0% jusque 10 heures (Figure III-2). L'étude cinétique montre un changement de pente apparaît indiquant le déclenchement de la libération de la DOX bien en dessous de la LCST à partir de 25 heures. Ceci indique que les sels et protéines présents dans le milieu de culture interagissent avec les groupements donneurs de ponts hydrogène en déstabilisant la cage de solvatation de l'unité répétitive (monomère) et finalement modifient l'état d'hydratation des macromolécules (« salting out »)²⁰. Le taux de relargage de la DOX à partir des Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₅-OEGMA₃₅) atteint un maximum de 65% au bout de 54 heures à la température corporelle. Cependant, lorsqu'il faudra considérer l'application pharmaceutique de ces nanoparticules, il sera nécessaire de mettre en contact la DOX avec les NPs moins de 24 heures avant l'éventuelle injection du nano-système.

À 42° C, on observe la libération linéaire en fonction de temps de la DOX allant jusqu'à 100% après 54 h pour les NPs Fe_{3-δ}O₄@P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}) (Figure III-2) . Ce comportement linéaire de la libération de DOX est induit par la transition hydrophile/hydrophobe du P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}) observée après LCST (Chapitre 2). Aussi, des libérations initiales de 25% et 40% ont été observées pour les NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀) et Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₅-OEGMA₃₅). Ceci est expliqué par le fait que la température choisie de 42°C était supérieure à la LCST des copolymères (Chapitre 2).

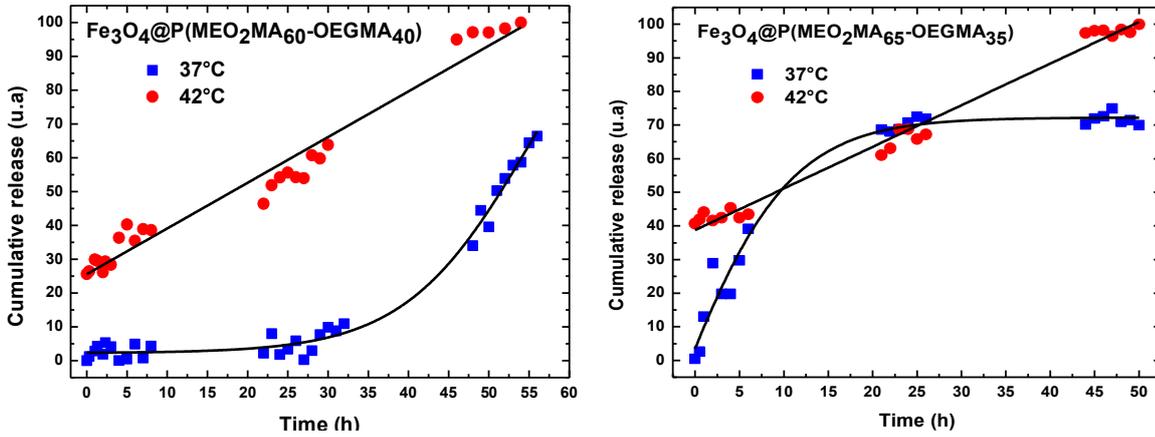


Figure III-2 : Libération de la DOX à partir des NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀) et des NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₅-OEGMA₃₅) dans un milieu physiologique (DMEM).

Les paramètres (K₁, K_h, K_{kp} et n) des modèles mathématiques décrits précédemment de libération de la DOX, sont présentés dans le tableau III-2, ainsi que les valeurs de corrélation (R²). Les modèles cinétiques de Higuchi et de Korsmeyer – Peppas ne cadrent pas bien avec les données expérimentales comme le montrent les faibles valeurs de R², alors que la cinétique du premier ordre et ordre zéro semblent être les meilleurs modèles traduire les relargages à T=37°C et 42°C respectivement.

Nano-objets	T°(C)	Zero Order		First Order		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
		K ₁	R ²	K ₁	R ²	K _h	R ²	K _{kp}	n	R ²
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ MA ₆₅ -OEGMA ₃₅)	37	0.0019	0.7180	1.4254	0.9603	1.1012	0.8461	0.5765	0.3825	0.8468
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀)	37	0.0034	0.8300	0.0034	0.9887	0.8264	0.6684	0.9113	0.2770	0.8230
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ MA ₆₅ -OEGMA ₃₅)	42	1.2382	0.9874	1.7473	0.9842	0.4449	0.8060	0.6466	0.2224	0.8060
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀)	42	4.1378	0.9897	0.0183	0.9881	0.0904	0.8596	0.5568	0.2908	0.8608

Tableau III-2. Données cinétiques de la libération de la DOX par les nanovecteurs NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}), X = 65 et 60, pour des températures égales à 37°C et 42°C.

Les équations associées à chacun des nano-systèmes sont les suivantes :

Pour Fe_{3-δ}O₄@P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀)-DOX à 42°C :

$$C_{60/40}^{42^\circ C}(\%) = 25.5716 + 1,3516 t \quad (III-5)$$

Pour Fe_{3-δ}O₄@P(MEO₂MA₆₅-OEGMA₃₅)-DOX à 42°C :

$$C_{65/35}^{42^\circ C}(\%) = 38.7545 + 1.2382 t \quad (III-6)$$

Pour Fe_{3-δ}O₄@P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀)-DOX à 37°C

$$C_{60/40}^{37^\circ C}(\%) = 0,0075 \cdot \exp\left(\frac{t}{16.5}\right) + 0,01324 \quad (III-7)$$

Pour Fe_{3-δ}O₄@P(MEO₂MA₆₅-OEGMA₃₅)-DOX à 37°C

$$C_{65/35}^{37^{\circ}C}(\%) = -0,1181 \cdot \exp\left(-\frac{t}{8,5}\right) + 0,1659 \quad (\text{III-8})$$

où $C_{y/z}^{x^{\circ}C}(\%)$ représente le pourcentage du relargage cumulative de DOX, avec x la température à laquelle la cinétique a été suivie, y le ratio de MEO₂MA, et z le ratio de OEGMA.

La DLC (%) et la DLE (%) des nano-systèmes atteignent 6,6% et 56,1% pour le Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀) respectivement, nous atteignons des valeurs similaires pour le système DOX-Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₅-OEGMA₃₅), c-à-d DLC = 5,9% et DLE=50,8% (tous les résultats ont été extraits des courbes UV et des données présentées dans la Figure 7 et 8 à l'Annexe 2).

Nos résultats sont comparables à ceux de la littérature. La valeur de DLC est proche de celles issues de la littérature pour des nano-objets de structure proche^{27,28}. Le Tableau III-2 montre des valeurs de DLC (%) et de DLE (%) pour nos nanovecteurs et pour quelques vecteurs de la littérature.

Une étude de l'équipe Nidhi Andhariya et al.²⁹, où un nanovecteur thermosensible de type cœur/coquille composé de NPs d'oxyde de fer (Fe₃O₄) et un polymère (polyéthylène oxyde – poly D, L lactide-co-glycolide– oxyde de polyéthylène (PEO–PLGA–PEO)) a été élaboré. Ces nano-objets présentent des valeurs de DLC autour de 8,1% et une valeur de DLE d'environ 89%²⁹.

Les équipes Binh T Mai et al³⁰ et Aziliz Hervault et al¹ ont montré qu'avec la même structure (cœur/coquille), ils ont eu des valeurs DLC et DLE autour de nos valeurs (Tableau III-3).

Nano-objets	DLC (%)	DLE (%)	Réf
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ MA ₆₅ -OEGMA ₃₅)	5,9	50,8	
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀)	6,6	56,1	
Fe ₃ O ₄ @ P(DEGMA-co-PEGMA-b-[TMSPMA-co-VBA])	7,6	82,3	[1]
Fe ₃ O ₄ @PEO–PLGA–PEO	7,2	23,1	[28]
Fe ₃ O ₄ @P(DEGMEMA-co-OEGMEMA)	3,29	---	[29]

Tableau III-3 : Données DLC (%) et DLE (%) pour des nanovecteurs^{1,27,28}.

3.3.2 Étude de la stabilité des NPs chargées en DOX à 20 ° C

Au vu des résultats obtenus à 37°C montrant l'instabilité du système DOX-nanoparticules et dans une stratégie de future application pharmaceutique, il a été important d'étudier la stabilité des NPs chargées en DOX en fonction du temps à 20°C (pour modéliser la température ambiante) : la DOX (1 mg mL⁻¹) et les NPs (0,5 mg mL⁻¹) ont été incubées dans le DMEM à 20 ° C.

Nous avons suivi l'évolution du diamètre hydrodynamique du nanosystème par DLS jusqu'à 72 heures (Figure III-3a), la limpidité des solutions présentées dans Figure III-3b confirme cette stabilité.

Les résultats présentés dans la Figure III-3, montrent une variation négligeable du diamètre des nanosystèmes. L'effet de « salting-out » observé à 37°C n'a donc pas lieu à 20°C dans la plage horaire de 72 heures.

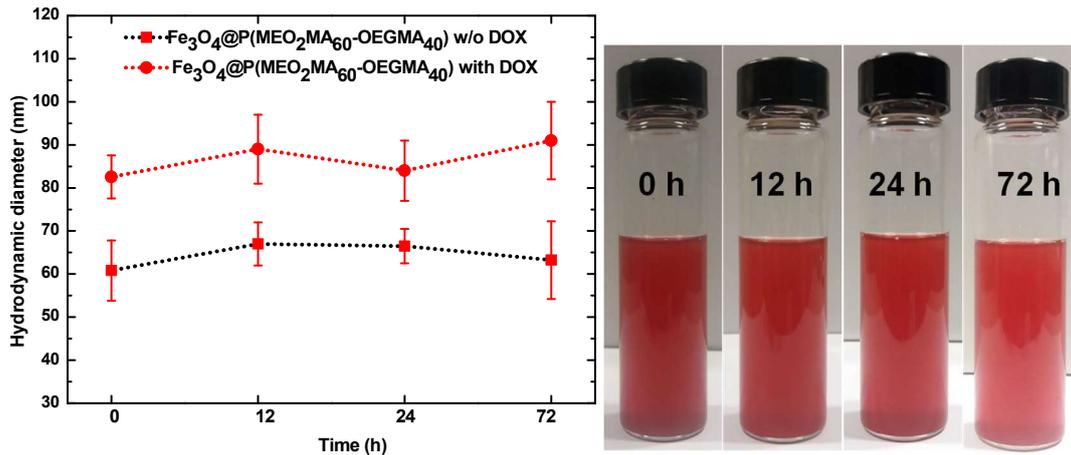


Figure III-3. Evolution du diamètre des NPs $\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ en fonction du temps dans le DMEM

3.3.3 Étude sur l'hyperthermie magnétique

Afin d'étudier les propriétés d'hyperthermie magnétique de nos nano-objets une collaboration avec Sylvie Begin-Colin et Damien Merz de l'ICPMS à Strasbourg a été engagée. Cette propriété permettrait d'envisager un échauffement local et contrôlé des NPs une fois dans l'organisme plutôt que l'échauffement plus général autour de la zone tumorale.

Les études des propriétés magnétiques des nano-objets ont confirmé que les $\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ possèdent des propriétés superparamagnétiques. Ainsi, le facteur principal de la génération de la chaleur pour les NPs superparamagnétiques sera les relaxations du spin de Brownien et / ou de Néel⁶⁻⁸ (Chapitre 1).

Sous l'application d'un champ de 300 Oe et une fréquence de 536,5 KHz, la température des solutions constituées d'eau ou de milieu de culture contenant les NPs sélectionnées ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) augmente progressivement (Figure III-4). Au bout de 7 min, une augmentation de température de 7°C des solutions (eau et milieu de culture) est obtenue, ce qui nous permet d'envisager d'atteindre la LCST voire même la température de 43°C , température à laquelle la membrane des cellules cancéreuse est déstabilisée conduisant à l'apoptose des cellules.

En d'autres termes, via ces propriétés d'hyperthermie, il est possible d'envisager que nos systèmes soient doublement efficaces en induisant un échauffement local combiné le relargage de la DOX afin d'induire un maximum de mort cellulaire des cellules cancéreuse tout en préservant au maximum les cellules saines. Il est à noter que les valeurs de champ magnétique utilisé ($H=300 \text{ Oe}$) et de Fréquence ($F= 536,5 \text{ KHz}$) sont très proches des valeurs utilisées dans d'autres travaux¹, mais ce travail de thèse est une première étape avant d'envisager de travailler sur un cœur de nanoparticules avec des propriétés magnétiques et d'hyperthermie permettant de respectées les doses en champ et fréquence que l'homme peut subir.

La puissance dissipée par les NPs magnétiques lorsqu'elles sont soumises au champ sélectionné (décrite comme la SAR) a été calculée et les données sont présentées dans le Tableau III-3. Il est important de noter que la SAR diminue avec la densité du copolymère et la nature du milieu dispersant. La SAR obtenue dans le milieu physiologique pour les NPs $\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ et NPs $\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ (par rapport au concentration de Fer), était d'environ $45,7 \text{ W.g}^{-1}$ et $12,6 \text{ W.g}^{-1}$, et respectivement de $61,7 \text{ W.g}^{-1}$ et $25,2 \text{ W.g}^{-1}$ dans DMEM et l'eau (Tableau III-4).

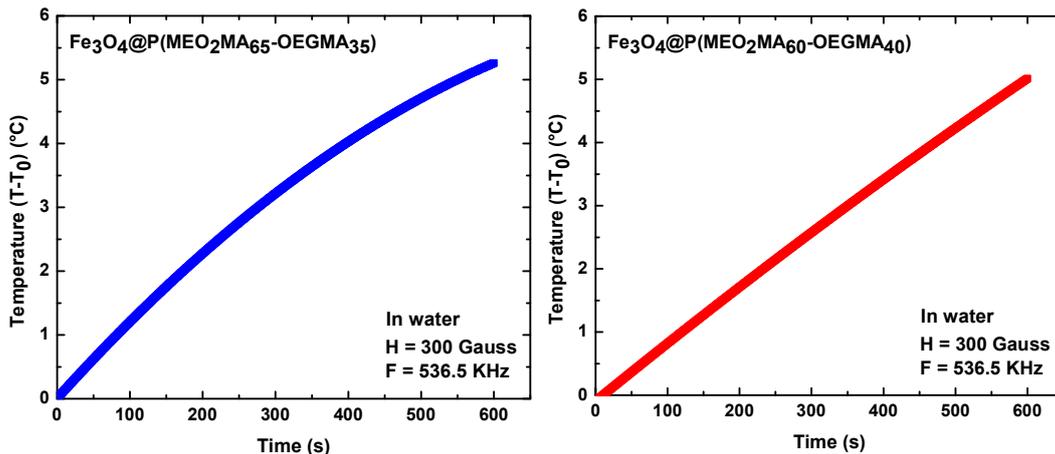
Comparées aux valeurs du SAR de NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4$ uniquement stabilisée par les citrates, les valeurs de la SAR, de l'ordre de $100 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ et $101 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ dans l'eau et le milieu de culture, sont plus faibles malgré la non-altération de la dispersion des NPs fonctionnalisées par le copolymère dans chacun des milieux.

De même que l'aimantation, le greffage d'une couche organique à la surface des NPs va influencer la SAR car ceci peut contribuer à une diminution de l'interaction magnétique entre les $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4$ avec le revêtement diamagnétique¹. Les mesures DLS montrent que jusqu'à 36°C , il n'y a pas d'agrégation des NPs dans l'eau (ou dans les milieux de culture). Mais il faut tenir compte du fait que pendant les mesures, nous mesurons la température de la solution, alors qu'un chauffage local des NPs doit être envisagé³¹. Ce chauffage local peut atteindre 50°C , ce qui devrait provoquer la précipitation des chaîne polymère (voir Chapitre 2) greffées à la surface des NPs, conduisant ensuite à l'agrégation des NPs et enfin à la diminution de la valeur SAR, dépendante de l'état d'agrégation des NPs, ce qui a pour conséquence sa réduction de moitié³².

En ce qui concerne l'influence du milieu, il est clair que, lorsque les NPs cœur / coquille sont dispersées dans le milieu de culture, la SAR est largement réduite. Nous avons montré que le comportement colloïdal des NPs cœur / coquille est complètement guidé par les chaînes du copolymère greffées à leur surface. Lorsque les NPs sont dispersées dans les milieux de culture, les sels qui le composent perturbent la structure d'hydratation des chaînes polymères et donc leur configuration¹⁵.

Dans l'état actuel de nos travaux de thèse nous n'avons pas pu élucider cette question. En effet, les mesures DLS font état d'une parfaite dispersion des NPs dans l'eau ainsi que dans le milieu de culture.

Cette étude devra donc être approfondie en utilisant des technologies plus avancées telles que la diffraction de neutrons³² ou en utilisant des appareillages de diffusion de la lumière plus avancés permettant de tenir compte de la forme exacte des NPs ainsi que des indices de réfractions de chacun des milieux.



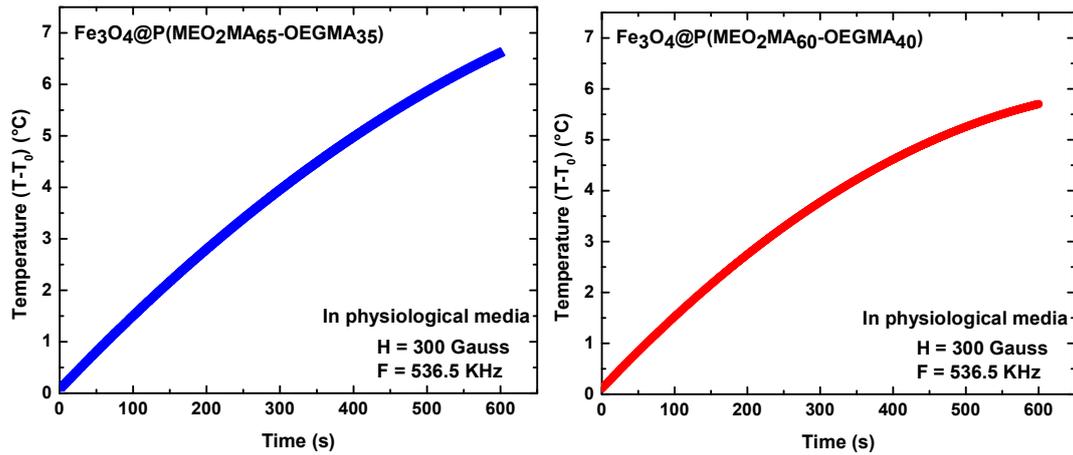


Figure III-4 : Température des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ sous un champ magnétique alternatif dans l'eau et le DMEM

Nano-objets	SAR dans l'eau (W/g)	SAR dans PBS (W/g)
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$	61,7	45,7
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$	25,2	12,6

Tableau III-4 : Valeurs de la SAR calculées pour les NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$, $x = 65$ et 60

Après avoir caractérisé nos nano-objet et mis en évidence leur propriété de chargement et relargage de la DOX, nous nous sommes intéressés à évaluer leur efficacité en tant que vecteur de médicament via des test de mise en contact avec des cellules cancéreuses en 2 dimensions (2D).

3.3.4 Evaluation biologique

Toutes les évaluations biologiques ont été réalisées au sein de l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Les lignées choisies sont

- des cellules cancéreuses de type HT29 (lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal humain avec une morphologie épithéliale),
- et des cellules de type SKOV-3 (lignée cellulaire d'adénocarcinome ovarien humain).

Les viabilités cellulaires sont mesurées par la méthode du MTT.

3.3.4.1 Evaluation biologique des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ sur les cellules HT29

Avant de réaliser les tests biologiques sur les nanostructures, la cytotoxicité du nanovecteur sur les cellules de type HT29 a été évaluée via des tests classiques (MTT).

La Figure III-5 montre que les NPs cœur /coquille présentent une cytotoxicité dépendante de la dose de NPs. Pour une concentration supérieure à $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, la Figure III-5 montre que les NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ provoquent une diminution de la viabilité cellulaire, qui peut atteindre 75 ± 7 et de $54 \pm 22\%$ après 24 h et 72 h à une concentration de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Le mécanisme de la cytotoxicité dépendant de la dose des NPs magnétiques proposé par Chen *et al.*³³ implique une augmentation des ions Fe^{2+} libérés avec l'augmentation de la quantité de NPs. Cependant, compte-tenu de la faible solubilité des ions Fe^{2+} dans les milieux aqueux à pH physiologique, le mécanisme que nous supposons conduire à l'apoptose est celui impliquant des réactives de l'oxygène (ROS) par l'oxyde de fer pouvant induire un stress oxydatif des cellules de type HT29 via la réaction de Fenton³³.

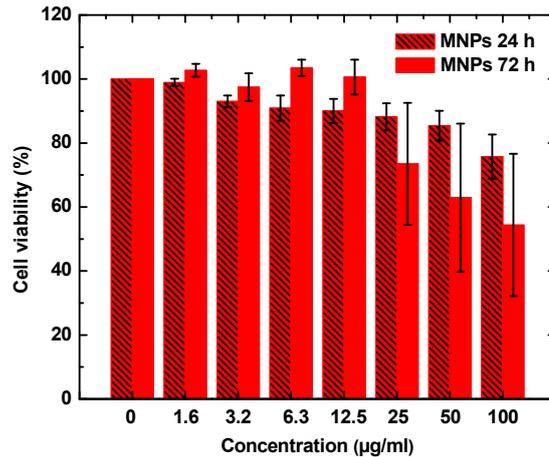


Figure III-5 : Viabilité des cellules HT29 après (a) 24 et (b) 72 h d'exposition aux NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$

Dans les tests de la cytotoxicité, pour toutes les concentrations de NPs cœur/coquille, il est apparu que la cytotoxicité diminuait avec la quantité du copolymère greffée à la surface des NPs (voir Annexe 4). Il est alors évident que la coquille en copolymère a contribué à réduire le stress oxydatif des cellules HT29 pouvant survenir au cours de la réaction de Fenton. Cependant, ces NPs présentent toujours une faible cytotoxicité permettant d'envisager leur transition vers des test animaux.

3.3.4.2 Evaluation biologique des NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ sur les cellules de type SKOV-3

Les études de la cytotoxicité sur les cellules de type HT29 démontrent que ce nanovecteur présente une faible toxicité pour des concentrations inférieures à de 12 mg mL^{-1} . Pour étudier l'efficacité de ces nanovecteurs en tant qu'agent thérapeutiques, nous les avons mis en contact avec des cellules de type SKOV-3 qui sont sensibles à la DOX³⁴. Pour étudier l'influence de la DOX, nous devons étudier l'influence de la température sur la viabilité cellulaire. En effet, le relargage rapide de la DOX ne peut avoir lieu que lorsque la solution contenant les NPs est chauffée à 41°C . L'influence de la température sur la viabilité des cellules a donc de l'être étudiée.

Comme présenté à la Figure III-6, nous avons étudié deux conditions de températures dans un incubateur dont la teneur en CO_2 est maintenue à 5%. Lorsque les cellules sont maintenues en contact avec les NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ à 37°C pendant 24 heures et à 41°C pendant 5 heures, le nanovecteur présente une cytotoxicité modérée (Figure III-6), quelle que soit la température des NPs.

La viabilité cellulaire à 37°C a été maintenue au-dessus de 80%, même pour la plus forte dose de NPs ne conduisant qu'à une faible diminution de la viabilité cellulaire de 10% (viabilité cellulaire à $90,85 \pm 10,60 \%$).

À 41°C , la viabilité cellulaire a diminué mais elle est restée comprise entre 70 et 80%, à l'exception de la concentration des NPs la plus élevée ($12,5 \text{ mg mL}^{-1}$) pour laquelle une viabilité de $65,08 \pm 2,23\%$ a été obtenue.

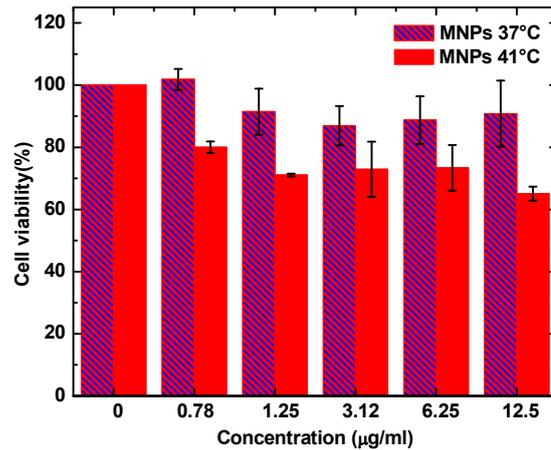


Figure III-6 : Viabilité des cellules SKOV-3 après 5 h. (à 41°C) et 24 h. (à 37°C) d'exposition aux NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$.

3.3.4.3 Cytotoxicité de la DOX chargée dans le nanovecteur par rapport à la DOX libre

Pour étudier l'efficacité des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ en tant qu'un vecteur du principe actif, la viabilité des cellules SKOV-3 vis-à-vis de la DOX a été évaluée dans différentes conditions.

Les NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ ont été sélectionnées comme des porteurs du principe actif car elles affichent une LCST dans un milieu physiologique supérieur à 41 ° C. Nous avons comparé la viabilité des cellules de type SKOV-3 lorsqu'elles sont soumises à la DOX libre et lorsque la DOX est incorporée aux NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ (qui seront nommées NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ -DOX).

Toutes les expériences ont été effectuées dans un milieu de culture de cellules de type SKOV-3 à 37 °C pendant 24 heures et à 41 °C pendant 5 heures (pour limiter l'impact de la température sur la mort cellulaire décrit précédemment).

Dans la Figure III-7, les pourcentages de viabilité cellulaire obtenue à partir de cellules exposées à une concentration autour de 0.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DOX libre pendant 24h à 37°C et 5 h à 41°C sont de $85,97 \pm 10\%$ et $72,9 \pm 9,1\%$ respectivement.

Une cytotoxicité accrue était attendue lorsque les cellules étaient exposées à des NPs chargées de la DOX pendant 5 h à 41 ° C (Figure III-7). À 0,04 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de la DOX relarguée par des NPs-DOX, le pourcentage de la viabilité cellulaire est légèrement inférieur à 60% et pour 0,07 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, une viabilité cellulaire proche de 30% a été atteinte ($58,76 \pm 9,07\%$, $48,02 \pm 6,96\%$ et $32,97 \pm 4,31\%$ à 0,04, 0,05 et 0,07 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivement).

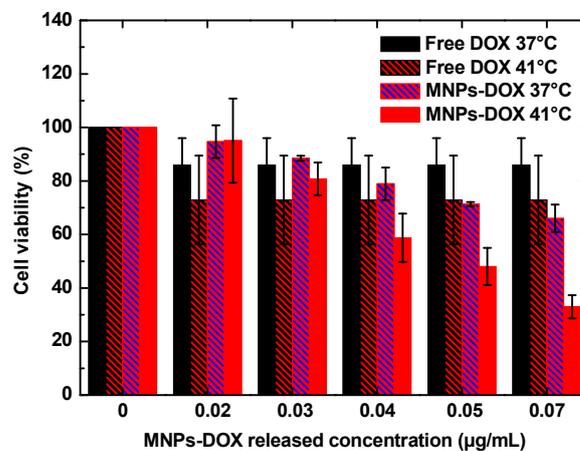


Figure III-7. Viabilité des cellules SKOV-3 exposition à la DOX libre et aux NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ -DOX à 37 et à 41 ° C.

Finalement, cette étude démontre une efficacité importante dans le traitement des cellules cancéreuses par le relargage de la DOX, où les tests biologiques ont montré que les NPs-DOX augmente l'activité cytotoxique par rapport à la DOX libre.

Pour accroître l'efficacité cytotoxique, nous avons pensé à greffer nos nanovecteurs par un ligand spécifique pour ce type de cancer. Ceci sera l'objectif du prochain Chapitre de ce manuscrit.

3.4 Conclusion

Etude cinétique : Sur la base de l'étude du relargage réalisée dans les Chapitres 2 et 3 ces nanovecteurs présentent des propriétés importantes dans la libération de la DOX. En effet, nous avons montré une libération de 100% de la DOX après 54 heure à 42°C, alors qu'à 37°C et pendant 27 heures aucune libération de la DOX, a été remarquée pour ce type de nano-objets.

Hyperthermie magnétique : Les propriétés hyperthermiques des NPs ont été démontrées au Chapitre 3 de cette étude. Une élévation locale de la température d'environ 7°C se produit dans les 10 minutes suivant une excitation AMF ($H=300$ Oe et $F = 536,5$ KHz).

Cytotoxicité : Les tests cytotoxiques sur les cellules de type SKOV-3 du cancer du côlon humain par des NPs cœur /coquille ont démontré que ces nanomatériaux fonctionnels non chargés ne présentaient pratiquement aucune toxicité à des concentrations pouvant atteindre $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Une fois les NPs chargées en DOX, une cytotoxicité élevée vis-à-vis des cellules cancéreuses SKOV-3 ont été observées.

Ce travail ouvre une nouvelle voie prometteuse pour la conception de nouveaux outils en matière de traitement du cancer. Le Chapitre suivant portera sur une étude physico-chimique des NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$, modifiées par le greffage d'AF.

3.5 Références

- (1) Hervault, A.; Dunn, A. E.; Lim, M.; Boyer, C.; Mott, D.; Maenosono, S.; Thanh, N. T. K. Doxorubicin Loaded Dual PH- and Thermo-Responsive Magnetic Nanocarrier for Combined Magnetic Hyperthermia and Targeted Controlled Drug Delivery Applications *Nanoscale* **2016**, *8* (24), 12152–12161.
<https://doi.org/10.1039/C5NR07773G>.
- (2) Richard, S.; Saric, A.; Boucher, M.; Slomianny, C.; Geffroy, F.; Mériaux, S.; Lalatonne, Y.; Petit, P. X.; Motte, L. Antioxidative Theranostic Iron Oxide Nanoparticles toward Brain Tumors Imaging and ROS Production. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11* (10), 2812–2819.
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00558>.
- (3) Gallo, J.; Long, N. J.; Aboagye, E. O. Magnetic Nanoparticles as Contrast Agents in the Diagnosis and Treatment of Cancer. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (19), 7816.
<https://doi.org/10.1039/c3cs60149h>.
- (4) Janko, C.; Ratschker, T.; Nguyen, K.; Zschiesche, L.; Tietze, R.; Lyer, S.; Alexiou, C. Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) as Platform for the Targeted Multimodal Tumor Therapy. *Front. Oncol.* **2019**, *9*.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00059>.
- (5) Kandasamy, G.; Maity, D. Recent Advances in Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) for in Vitro and in Vivo Cancer Nanotheranostics. *Int. J. Pharm.* **2015**, *496* (2), 191–218.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.058>.
- (6) Annama neni, S.; Vishwakarma, S. K.; Meka, P. B.; Khan, A. A.; Nallari, P. Regulation of Heat Shock Protein-70 Gene Transcripts in Breast Cancer Cells during Hypo and Hyperthermia Exposure. *Meta Gene* **2019**, *20*, 100548.
<https://doi.org/10.1016/j.mgene.2019.100548>.
- (7) Das, P.; Colombo, M.; Prospero, D. Recent Advances in Magnetic Fluid Hyperthermia for Cancer Therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *174*, 42–55.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.051>.
- (8) Saliev, T.; Feril, L. B.; Begimbetova, D.; Baiskhanova, D.; Klodzinskyi, A.; Bobrova, X.; Aipov, R.; Baltabayeva, T.; Tachibana, K. Hyperthermia Enhances Bortezomib-Induced Apoptosis in Human White Blood Cancer Cells. *J. Therm. Biol.* **2017**, *67*, 9–14.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.04.009>.
- (9) Thorat, N. D.; Bohara, R. A.; Noor, M. R.; Dhamecha, D.; Soulimane, T.; Tofail, S. A. M. Effective Cancer Theranostics with Polymer Encapsulated Superparamagnetic Nanoparticles: Combined Effects of Magnetic Hyperthermia and Controlled Drug Release. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3* (7), 1332–1340.
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00420>.
- (10) Guo, X.; Li, W.; Luo, L.; Wang, Z.; Li, Q.; Kong, F.; Zhang, H.; Yang, J.; Zhu, C.; Du, Y.; et al. External Magnetic Field-Enhanced Chemo-Photothermal Combination Tumor Therapy via Iron Oxide Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (19), 16581–16593.
<https://doi.org/10.1021/acscami.6b16513>.
- (11) Blanco-Andujar, C.; Walter, A.; Cotin, G.; Bordeianu, C.; Mertz, D.; Felder-Flesch, D.; Begin-Colin, S. Design of Iron Oxide-Based Nanoparticles for MRI and Magnetic Hyperthermia. *Nanomед.* **2016**, *11* (14), 1889–1910.
<https://doi.org/10.2217/nmm-2016-5001>.
- (12) Quinto, C. A.; Mohindra, P.; Tong, S.; Bao, G. Multifunctional Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Combined Chemotherapy and Hyperthermia Cancer Treatment. *Nanoscale* **2015**, *7* (29), 12728–12736.
<https://doi.org/10.1039/C5NR02718G>.

- (13) Mai, B. T.; Balakrishnan, P. B.; Barthel, M. J.; Piccardi, F.; Niculaes, D.; Marinaro, F.; Fernandes, S.; Curcio, A.; Kakwere, H.; Autret, G.; et al. Thermoresponsive Iron Oxide Nanocubes for an Effective Clinical Translation of Magnetic Hyperthermia and Heat-Mediated Chemotherapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (6), 5727–5739. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b16226>.
- (14) Jamal Al Dine, E.; Ferjaoui, Z.; Ghanbaja, J.; Roques-Carmes, T.; Meftah, A.; Hamieh, T.; Toufaily, J.; Schneider, R.; Marchal, S.; Gaffet, E.; et al. Thermo-Responsive Magnetic Fe₃O₄@P(MEO 2 MA X -OEGMA 100-X) NPs and Their Applications as Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532* (2), 738–747. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.019>.
- (15) Jamal Al Dine, E.; Ferjaoui, Z.; Ghanbaja, J.; Roques-Carmes, T.; Meftah, A.; Hamieh, T.; Toufaily, J.; Schneider, R.; Marchal, S.; Gaffet, E.; et al. Thermo-Responsive Magnetic Fe₃O₄@P(MEO2MAX-OEGMA100-X) NPs and Their Applications as Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532* (2), 738–747. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.019>.
- (16) Lutz, J.-F. Polymerization of Oligo (Ethylene Glycol) (Meth)Acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (11), 3459–3470. <https://doi.org/10.1002/pola.22706>.
- (17) Gao, X.; Kučerka, N.; Nieh, M.-P.; Katsaras, J.; Zhu, S.; Brash, J. L.; Sheardown, H. Chain Conformation of a New Class of PEG-Based Thermoresponsive Polymer Brushes Grafted on Silicon as Determined by Neutron Reflectometry. *Langmuir* **2009**, *25* (17), 10271–10278. <https://doi.org/10.1021/la901086e>.
- (18) Nath, N.; Chilkoti, A. Creating “Smart” Surfaces Using Stimuli Responsive Polymers. *Adv. Mater.* **2002**, *14* (17), 1243–1247. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(20020903\)14:17<1243:AID-ADMA1243>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-4095(20020903)14:17<1243:AID-ADMA1243>3.0.CO;2-M).
- (19) Roy, D.; Brooks, W. L. A.; Sumerlin, B. S. New Directions in Thermoresponsive Polymers. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (17), 7214–7243. <https://doi.org/10.1039/C3CS35499G>.
- (20) Ferjaoui, Z.; Schneider, R.; Meftah, A.; Gaffet, E.; Alem, H. Functional Responsive Superparamagnetic Core/Shell Nanoparticles and Their Drug Release Properties. *RSC Adv.* **2017**, *7* (42), 26243–26249. <https://doi.org/10.1039/C7RA02437A>.
- (21) Dine, E. J. A.; Ferjaoui, Z.; Roques-Carmes, T.; Schjen, A.; Meftah, A.; Tayssir Hamieh; Toufaily, J.; Schneider, R.; Gaffet, E.; Alem, H. Efficient Synthetic Access to Thermo-Responsive Core/Shell Nanoparticles. *Nanotechnology* **2017**, *28* (12), 125601. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa5d81>.
- (22) Mortensen, N. P.; Hurst, G. B.; Wang, W.; Foster, C. M.; Nallathamby, P. D.; Retterer, S. T. Dynamic Development of the Protein Corona on Silica Nanoparticles: Composition and Role in Toxicity. *Nanoscale* **2013**, *5* (14), 6372. <https://doi.org/10.1039/c3nr33280b>.
- (23) Yeeling, W.; Sonali, B.; Nataša, Š. B.; Massimilian, P. C. Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2019**, *138*, 105026. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105026>.
- (24) Duygu, K.; Kurtul, K.; Neslihan, A. Modeling the drug release from reduced graphene oxide reinforced hyaluronic acid/gelatin/poly (ethylene oxide) polymeric films. *Carbohydrate Polymers* **2019**, *215*, 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.041>

- (25) Martínez-López, J. F.; Schneider, S.; Salavera, D.; Mainar, A. M.; Urieta, J. S.; Pardo, J. I. Molar Heat Capacities of the Mixture {1,8-Cineole + Ethanol} at Several Temperatures and Atmospheric Pressure. *J. Chem. Thermodyn.* **2016**, *92*, 146–151 <https://doi.org/10.1016/j.jct.2015.09.012>.
- (26) Abumandour, E.-S.; Mutelet, F.; Alonso, D. Performance of an Absorption Heat Transformer Using New Working Binary Systems Composed of {ionic Liquid and Water}. *Appl. Therm. Eng.* **2016**, *94*, 579–589. <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2015.10.107>.
- (27) Shen, S.; Wu, Y.; Liu, Y.; Wu, D. High Drug-Loading Nanomedicines: Progress, Current Status, and Prospects. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 4085–4109. <https://doi.org/10.2147/IJN.S132780>.
- (28) Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug Delivery. *Nat. Mater.* **2013**, *12* (11), 991–1003. <https://doi.org/10.1038/nmat3776>.
- (29) Andhariya, N.; Chudasama, B.; Mehta, R. V.; Upadhyay, R. V. Biodegradable Thermoresponsive Polymeric Magnetic Nanoparticles: A New Drug Delivery Platform for Doxorubicin. *J Nanopart Res* **2011**, *13* (4), 1677–1688 <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9921-6>.
- (30) Mai, B. T.; Balakrishnan, P. B.; Barthel, M. J.; Piccardi, F.; Niculaes, D.; Marinaro, F.; Fernandes, S.; Curcio, A.; Kakwere, H.; Autret, G.; et al. Thermoresponsive Iron Oxide Nanocubes for an Effective Clinical Translation of Magnetic Hyperthermia and Heat-Mediated Chemotherapy. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2019**, *11* (6), 5727–5739. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b16226>.
- (31) Périgo, E. A.; Hemery, G.; Sandre, O.; Ortega, D.; Garaio, E.; Plazaola, F.; Teran, F. J. Fundamentals and Advances in Magnetic Hyperthermia. *Appl. Phys. Rev.* **2015**, *2* (4), 041302. <https://doi.org/10.1063/1.4935688>.
- (32) Inder, K.; Laura-Jayne, E.; Isabella, R.; Ratna, T.; Marie, C.; Soline, A.; Martine, M.L.; Caterina, M.; Wolfgang, U.; Annegret, P.; Steffi, R.; Eugenia, V.J. Dispersion of Nanomaterials in Aqueous Media/ Towards Protocol Optimization. *Journal of Visualized Experiments* **2017**, ; (130): 56074. <https://doi.org/10.3791/56074>.
- (33) Chen, Y.; Ai, K.; Liu, J.; Sun, G.; Yin, Q.; Lu, L. Multifunctional Envelope-Type Mesoporous Silica Nanoparticles for PH-Responsive Drug Delivery and Magnetic Resonance Imaging. *Biomaterials* **2015**, *60*, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.003>.
- (34) Xu, J.; Xu, B.; Shou, D.; Qin, F.; Xu, Y.; Hu, Y. Characterization and Evaluation of a Folic Acid Receptor-Targeted Cyclodextrin Complex as an Anticancer Drug Delivery System. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *83*, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.11.008>.

Chapitre IV: Propriétés physico-chimiques et performance thérapeutique de la vectorisation de la sonde $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4$ @ P(MEO₂M_x-OEGMA_{100-x}) modifiée par l'acide folique

4.1 Introduction

L'objectif de ce Chapitre est d'améliorer l'activité cytotoxicité des nanovecteurs élaborés dans le chapitre 3 vis-à-vis les SKOV-3. En effet, le cancer de l'ovaire est l'une des formes de cancer les plus courantes chez les femmes¹.

Divers médicaments chimiques sont largement utilisés tels que le 5-fluorouracile (5-FU), le paclitaxel, le cytoxan et la doxorubicine qui montre une efficacité importante pour ce traitement². Mais d'une part, leur faible solubilité dans l'eau, donc dans les milieux physiologiques et d'autre part leur non-vectorisation sont une réelle limite à leur efficacité pharmaceutique^{3,4}. Pour augmenter leur index thérapeutique, il est nécessaire de mettre en contact le malade avec la quantité la plus faible de médicament tout en s'assurant de maintenir son efficacité.

Développer de nouveaux nanosystèmes permettant non seulement d'encapsuler le médicament mais aussi de le relarguer de manière contrôlée au plus près de la tumeur via la vectorisation du nano-objet permettrait donc de réduire drastiquement la toxicité vis-à-vis des cellules saines⁴.

Nous avons montré dans le Chapitre précédent que les nanoparticules développées dans le cadre de thèse permettent d'encapsuler la doxorubicine et la relarguer de manière contrôlée à une température autour de 41°C. Le suivi cinétique nous a permis de modéliser et donc comprendre le comportement du système « nanoparticule+DOX » à la température physiologique et au-dessus de la LCST.

Pour augmenter l'efficacité thérapeutique de nos nano-objets, nous avons développé un procédé de greffage de l'AF en bout de chaîne afin d'augmenter l'internalisation des NPs dans les cellules cancéreuses de l'ovaire. L'AF a été choisi du fait de son faible coût, de sa biocompatibilité et son caractère non immunogène^{5,6}. De plus, outre sur l'ovaire, les récepteurs du folate sont surexprimés dans plusieurs types de tumeurs incluant les reins, le cerveau, le sein et le poumon^{5,6}. Ainsi la translation de ces nano-objets peut être envisagée vers différents types de cancer.

Dans la littérature, Zhang *et al.*⁷ ont montré que pour des NPs d'oxydes de fer à laquelle est greffé un copolymère à base de poly(éthylèneimine) (PEI) et poly(éthylène glycol) PEG et fonctionnalisé en bout de chaîne par l'AF, notées Fe_3O_4 @ PEI-PEG-AF conduisent à une meilleure internalisation⁷. En effet, des mesures d'internalisation *in vitro* sur les SKOV-3 pour une concentration 0.4 mM des NPs sans et avec AF montrent une internalisation des NPs sans l'AF d'environ 10pg/cell, alors qu'elle est de 30 pg/cell pour les NPs modifiés par AF²⁰. De même, les résultats *in vivo* obtenus par des images d'imagerie par la résonance magnétique (IRM) (après l'injection intra-péritonéale de 1×10^6 cellules SKOV-3 / souris), affichent une différence significative des intensités du signal T₂ des tissus tumoraux xénogreffes lors de l'injection avec des NPs Fe_3O_4 ciblées et non ciblées par AF après 4 heures⁷, ce qui permet de confirmer que les cellules surexprimant les récepteurs d'AF⁷.

Le groupe de Jingyi Zhu *et al.*⁸ a mis au point une sonde multifonctionnelle à la base de NPs de Mn_3O_4 revêtues de polyéthylèneimine (PEI) et modifiées par AF. Cette sonde est utilisée pour l'imagerie TEP (une tomographie par l'émission de positons) / IRM de xénogreffes de souris atteintes d'un cancer du col de l'utérus et surexprimant le folate récepteur (FR). Les résultats *in vivo* ont été réalisés pour mettre en évidence la spécificité de la liaison au FR de NPs. En effet, les imageries TEP ont montré que les NPs sont sélectivement absorbées en périphérie des tumeurs HeLa qui sur-

expriment à leur surface le gène FR⁸, alors qu'une faible absorption a été mesurée lorsque les récepteurs de ces mêmes tumeurs étaient bloqués.

Une autre étude récente a pour objectif la comparaison des performances biologiques pour les NPs modifiées avec AF et le principe actif libre. C'est l'étude de Gajendiran Mani *et al.*⁹, elle était basée sur la synthèse d'un nano-objet de type cœur/coquille formé par une nanoparticule d'or comme un cœur et une coquille en acide thioglycolique (ATG) modifié à l'extrémité par AF. Les études de cytotoxicité *in vitro*, ont démontré que ces nano-plateformes n'étaient pas toxiques pour les cellules normales jusqu'à une concentration de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Lorsque les nano-objets ont été chargés par le 5-fluorouracil (5-FU) (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), ils ont présenté une viabilité cellulaire autour de 46%, tandis que le 5-FU libre a présenté une viabilité cellulaire de 70% à 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ après 24 heures du traitement alors que 5% de cette concentration est libéré par ce nanosystème pendant cette période. Cependant, les NPs fonctionnalisées par l'AF montrent une efficacité en tant qu'inhibiteur de prolifération dans les cellules cancéreuses MCF-7 (cancer de l'ovaire) à une concentration de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ après 3 jours d'incubation⁹.

Dans le même thème, les travaux réalisés par Hongyu Chen *et al.*¹⁰ ont démontré que les nanovecteurs du $\text{Gd}_2\text{O}_3\text{:Eu@PLA-PEG}$ chargés des médicaments, et fonctionnalisés par AF, accroissent leurs efficacités thérapeutiques (ciblage, et taux élevé de cellules cancéreuses mortes). Les auteurs ont montré que des viabilités cellulaires, pour les MCF-7 de 5% étaient atteintes avec les NPs modifiées par l'AF, alors qu'uniquement 30% était atteint lorsque les NPs ne contenaient pas d'AF¹⁰. Cette amélioration d'activité cytotoxique est due à une forte internalisation des NPs dans les cellules MCF-7.

Les nano-objets ainsi élaborés dans cette partie sont formés alors par des NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4$, recouverts du copolymère $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ et modifiées à la surface par l'AF. Le but de ce chapitre est donc de mettre en évidence l'impact du greffage de l'AF sur l'internalisation des NPs au sein des SKOV-3 précédemment étudiées. La stratégie générale de ce chapitre est illustrée dans la Figure IV-1.

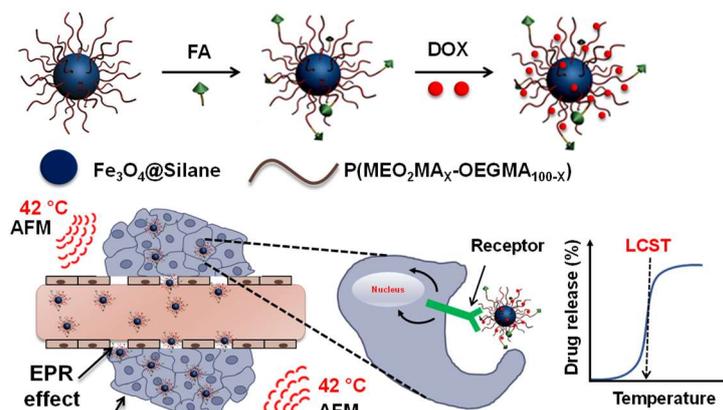


Figure IV-1 : Schéma général de l'objectif du Chapitre 4.

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Modification de la surface des NPs fonctionnalisées par l'acide folique

Les NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ fonctionnalisées par l'AF (Annexe 2) ont été préparées selon un protocole de synthèse suivant (Figure IV-2) :

- ✓ 8,33 mg de NPs de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @ P (MEO₂MA_X-OEGMA_{100-X}) NPs et 200 mg de AF modifiée (voir annexe) ont été dispersés dans 20 mL d'éthanol et 200 μL de CuBr_2 / TPMA (0,884 μmol CuBr_2 / 4,3 μmol de TPMA),
- ✓ le mélange a été agité sous une atmosphère d'argon pendant 30 min.
- ✓ ensuite, 250 μL d'hydrazine (7,1 mg mL^{-1} dans du DMSO) ont été ajoutés et le mélange a été agité sous l'argon pendant 24 h,
- ✓ à la fin du processus de la polymérisation, le mélange a été versé dans de l'eau de Milli-Q chaude de façon à précipiter les composants insolubles.

Les matériaux ont été purifiés en les lavant avec de l'eau Milli-Q chaude suivie d'une centrifugation.

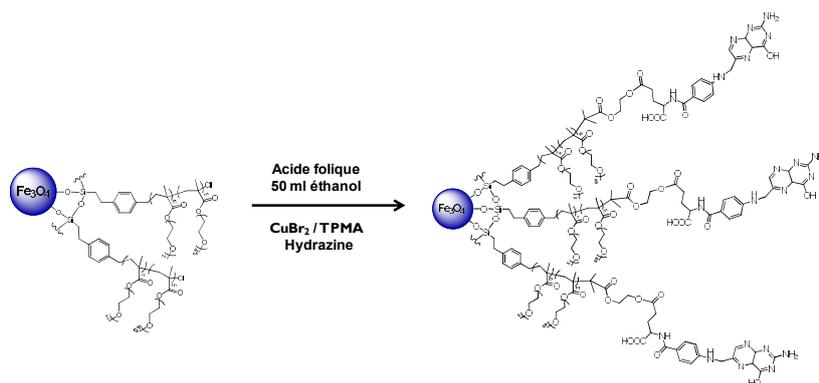


Figure IV-2 : Illustration schématique du procédé de la synthèse des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @ P (MEO₂MA_X-OEGMA_{100-X}) - AF.

4.2.2 Caractérisation biologique

WST-1: Le sel de tétrazolium 2- (4-iodophényl) -3- (4nitrophényl) -5- (2,4-disulfophényl) -2H-tétrazolium, sel monosodique, qui est mieux connu sous le nom de WST-1 (Roche) mesure la viabilité cellulaire en détectant l'activité de la déshydrogénase mitochondriale. Après le traitement, 5 μL de WST-1 ont été ajoutés et incubés pendant 2 h à 37 ° C. L'absorbance a été mesurée à 450 nm avec des longueurs d'onde de référence de 690 nm, en utilisant un lecteur de microplaques iMarKTM (BIO-RAD Laboratories, Japon). La concentration inhibitrice IC₅₀ a été calculée par la formule de Reed – Muench.

Traitement cellulaire : Les cellules ont été exposées pendant 24h à 37°C et 5 h à 41°C (le chauffage est effectuée à l'aide incubateur) à :

- la DOX libre (plage de 0,01-0,07 $\mu\text{g mL}^{-1}$).
- des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @ P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}) -AF (plage de 0,7-12 $\mu\text{g mL}^{-1}$).
- des $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @ P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}) -AF-DOX (plage de 0,7 -12 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

4.3 Résultats et discussion

4.3.1 Analyse du greffage de l'acide folique

A l'issue de la synthèse, nous avons procédé à la caractérisation chimique des nouveaux nano-objets.

La Figure IV-3 montre le spectre FT-IR en transmission correspondant aux NPs modifiées par l'AF. En effet la bande à 585 cm^{-1} dans le spectre est attribuée à la bande Fe-O.

La présence de copolymère est aussi révélée par les vibrations d'élongation des liaisons C-O et C=O à 1102 et à 1723 cm^{-1} . Les pics situés à 1452 et 2875 cm^{-1} correspondent à C-H. Cependant, la présence d'un grand bande intense à 3400 cm^{-1} provenant de la liaison N-H de l'AF et des pics C-N et N-H situé à 1350 cm^{-1} et 700 cm^{-1} respectivement, confirment le greffage de l'AF en bout de chaîne.

Il est noté que les rinçages successifs post synthèse permettent d'éliminer tout AF qui serait uniquement adsorbé à la surface des NPs ou à l'intérieur des chaînes de copolymère.

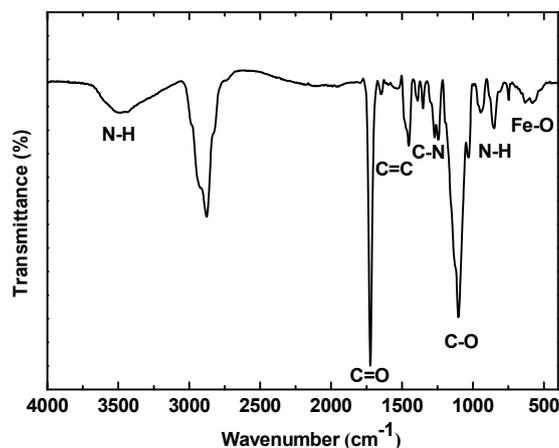


Figure IV-3 : Spectres IR des NPs $\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ - AF

Après une confirmation chimique de la modification des NPs du type cœur/coquille par AF, des caractérisations physiques ont été réalisées pour étudier leurs stabilités physiques après cette étape de la fonctionnalisation.

4.3.2 Confirmation de la stabilité cristalline à chaque étape du greffage

Dans le but de s'assurer que le procédé utilisé n'altère pas la structure cristalline des nanoparticules ainsi que le greffage du copolymère, nous avons transposé les mêmes méthodes de caractérisation que celles décrites dans le précédent chapitre.

Ainsi, comme il est montré par les clichés microscopie électronique en transmission dans la Figure IV-4, le cœur inorganique des NPs greffées AF garde toujours leur forme sphérique. Après le traitement par ImageJ, nous avons calculé une taille moyenne des NPs est toujours d'environ $10 \pm 1,6$ nm.

De plus, à haute résolution l'image HR-TEM et EF-TEM montre la présence d'une couche amorphe autour des NPs $\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4$. Nous avons montré précédemment que cette couche correspondait à la couronne de polymère $\text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ mais à laquelle s'ajoute l'AF. Mais il est évident que ces clichés ne permettent pas d'identifier précisément l'AF.

Les clichés de diffraction électronique des NPs $\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ - AF sont formés des taches brillantes qui sont à leurs tours indexées par des plans cristallins (400), (511), (422), (400), (311) et (220) (Ces diffractogrammes présentent tous les mêmes pics de Bragg, caractéristiques de la Fe_3O_4) et des grands anneaux diffus interprétés comme étant liés à la présence de l'amorphe dans les échantillons.

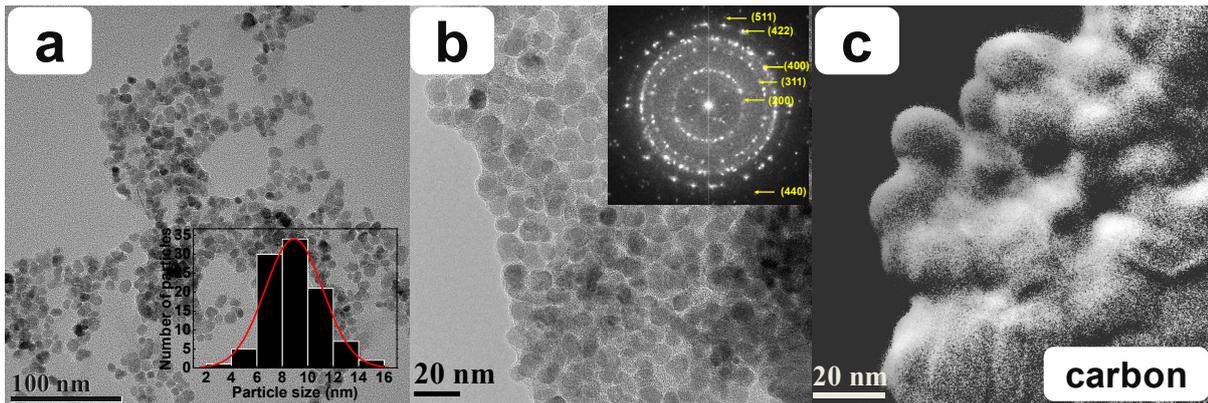


Figure IV-4 : Observations HR-TEM combinées à une analyse EF-TEM des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_x\text{-OEGMA}_{100-x})\text{-AF}$

Finalement, la combinaison des différentes techniques structurales montre que le procédé de la fonctionnalisation par l'AF n'altère pas la structure cristalline du cœur (voir le Chapitre 2).

4.3.3 Propriétés superparamagnétiques des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_x\text{-OEGMA}_{100-x})\text{-AF}$

Nous avons montré dans le Chapitre 2, que les nanoparticules cœur/coquille élaborées dans le Chapitre 2 sont superparamagnétiques à température ambiante. Après la modification par AF, les mesures des propriétés magnétiques ont été réalisées afin de confirmer le maintien des propriétés superparamagnétiques après le greffage de AF.

La Figure IV-5a montre des courbes FC et ZFC indiquant une température du blocage d'environ 250 K, largement inférieure à la plage de la température physiologique. Donc à 37°C, ces nanovecteurs présentent un caractère superparamagnétique^{11,12}.

De plus, les mesures magnétiques d'aimantation en fonction du champ réalisées dans le milieu, montrent des aimantations à saturation des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ et des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{65}\text{-OEGMA}_{35})\text{-AF}$ d'environ 20 $\text{emu} \cdot \text{g}^{-1}$ et 25 $\text{emu} \cdot \text{g}^{-1}$, valeurs inférieures à celles des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ et des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ (Chapitre 3) (Figure IV-5b).

Malgré la diminution de la magnétisation, toutes les NPs interagissent rapidement et fortement avec l'aimant (Figure IV-5).

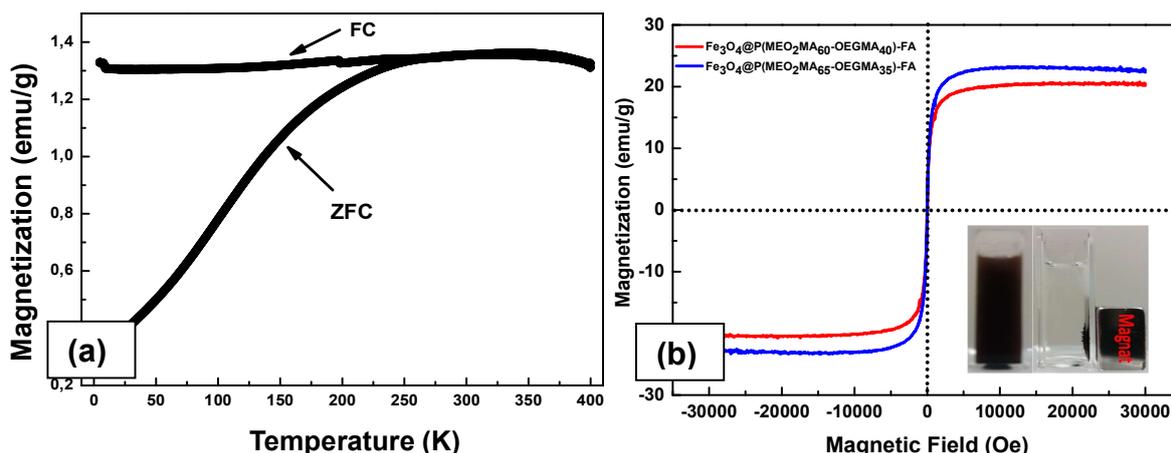


Figure IV-5 (a) Courbes ZFC / FC de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$, $B = 75 \text{ Oe}$ et (b) Courbe de la magnétisation de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ à 300 K .

Nous avons pu confirmer le greffage de l'AF en bout de chaîne des polymères, et confirmé le maintien de la structure cristalline du cœur ainsi que les propriétés superparamagnétiques à chaque étape du greffage. Nous nous intéresserons donc dans la suite aux propriétés colloïdales des NPs qui sont un point clefs de leur application en nanomédecine.

4.3.4 Comportement colloïdal des nanovecteurs

Comme nous l'avons démontré dans le Chapitre 2, ces nanovecteurs sont thermosensibles. Cette partie étudiera l'influence d'AF sur le comportement colloïdal des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$.

La Figure IV-6 montre que lorsqu'une solution de NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ et une solution de NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{65}\text{-OEGMA}_{35})\text{-AF}$ sont chauffées de 26°C à 50°C , leurs diamètres hydrodynamiques commencent à augmenter, respectivement, à 41°C et à 38°C , ce qui correspond respectivement à la LCST de $\text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ et de $\text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ dans un milieu physiologique (DMEM).

La parfaite dispersion des NPs dans le milieu aqueux en dessous de la LCST et leur agrégation au-delà de la température de transition sont illustrées dans la Figure IV-6b (à gauche les NPs dispersées et à droite les NPs agrégées). Ce comportement est bien entendu attendu et confirme bien que seules les propriétés en solutions des macromolécules greffées dictent le comportement thermal des NPs.

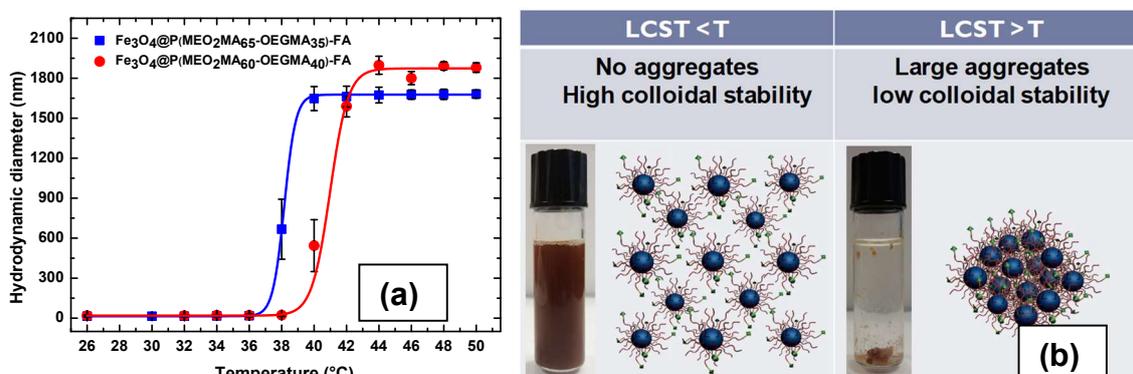


Figure IV-6: (a) Evolution du diamètre des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})\text{-AF}$ dans DMEM entre 26 et 50°C . (b) Les suspensions de NPs dispersées dans du DMEM en dessous de (37°C) et au-dessus (42°C) de la LCST sont respectivement représentées.

La réversibilité complète du système est confirmée via cinq cycles successifs de chauffage ($T > LCST$) et de refroidissement ($T < LCST$) (les graphes sont présentés en Annexe 2).

4.3.5 Cinétique et mécanisme de la libération de la DOX

Cette partie a pour but de confirmer que le greffage de l'AF n'impacte pas le mécanisme de relargage de la DOX par rapport aux nanosystèmes décrits dans les chapitres précédents.

La Figure IV-7 montre que les NPs $Fe_{3-\delta}O_4 @ P(MEO_2M_X-OEGMA_{100-X}) - AF$ chargées en médicament présentent des propriétés de la libération soutenues dans des milieux biologiques avec de différentes vitesses de la libération en fonction de la température.

Comme il est prévu, le processus de la libération à $37^\circ C$ et $42^\circ C$ pour les nanovecteurs avec l'AF est similaire à celui sans l'AF (Chapitre 3). En effet, le relargage à $37^\circ C$ a été beaucoup plus lent que celui à $42^\circ C$.

Dans les milieux de culture, après l'incubation à $37^\circ C$, la proportion initiale de la libération cumulative de la DOX à partir des NPs $Fe_{3-\delta}O_4 @ P(MEO_2M_{60}-OEGMA_{40}) - AF$ était de 0%. Comme il a été montré dans le Chapitre 3, une libération de la DOX a lieu à partir de 25h, conduisant au changement abrupte de la pente de la courbe présentée dans la figure IV-7. Après 54h, la proportion de la DOX libérée atteint 85%. Cette première étude est donc essentielle pour la prochaine étape qui consistera en une étude *in vitro* de ces nanovecteurs.

À $42^\circ C$, on observe avec le temps une augmentation linéaire de la libération du médicament de même que pour les échantillons du chapitre précédent. Une libération initiale de 25% a été observée pour les NPs $Fe_{3-\delta}O_4 @ P(MEO_2M_{60}-OEGMA_{40}) - AF$ et augmente linéairement avec le temps jusqu'à atteindre 100% après 54 heures. Néanmoins, l'influence de la température sur le processus d'administration du médicament peut être clairement vue, car le taux de la libération de la DOX et sa quantité sont beaucoup plus élevés à $42^\circ C$ que les $37^\circ C$ avec le temps (Figure IV-7).

Les NPs $Fe_{3-\delta}O_4 @ P(MEO_2M_{65}-OEGMA_{35})-AF$ affichent une LCST à $38^\circ C$ dans un milieu physiologique, à $37^\circ C$, le maximum de la libération de la DOX de 70% est alors atteint plus tôt (après 25 heures) et un relargage de 65% est observé à $42^\circ C$.

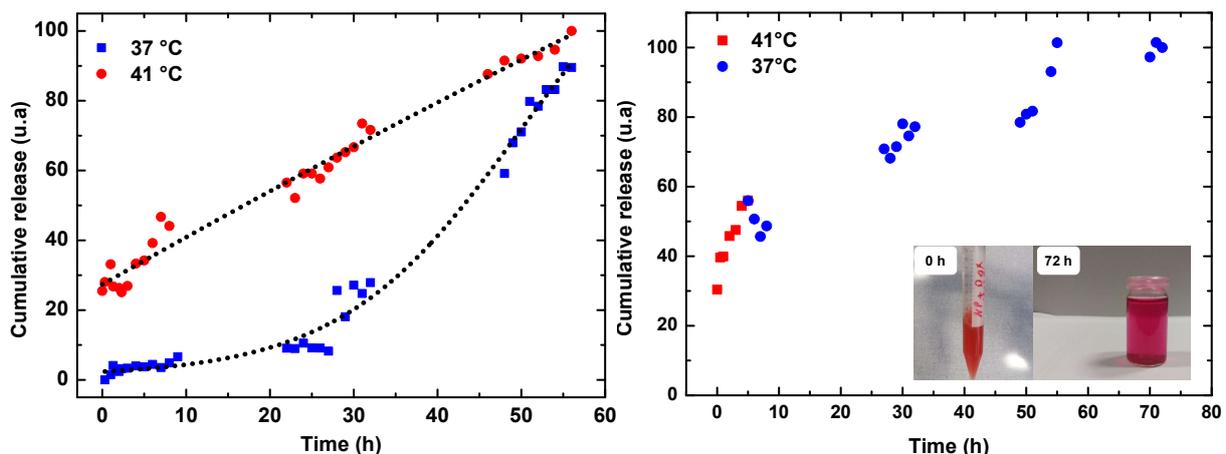


Figure IV-7 : Libération de la DOX des NPs $Fe_{3-\delta}O_4@P(MEO_2MA_{60}-OEGMA_{40}) - AF$ dans un milieu physiologique (DMEM).

Pour mieux mettre en évidence les performances des NPs $Fe_{3-\delta}O_4@P(MEO_2MA_{60}-OEGMA_{40}) - AF$ comme un nano-transporteur efficace du médicament, nous avons réalisé une

mesure de relargage en fonction de la température et du temps. A cet effet, un chauffage de 41°C pendant 5 heures de la solution de NPs Fe_{3-δ}O₄@P (MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) – AF-DOX a été suivie par une diminution de la température à 37°C pendant 67 heures dans le cas des tests *in-vitro*, c’est pourquoi nous avons étudié le mécanisme de relargage de la DOX dans les mêmes conditions.

La Figure IV-7 montre que les NPs Fe_{3-δ}O₄@P (MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) – AF ont un profil de la libération quasi linéaire en fonction de la température pendant 72 heures (41°C à 5h et 67h à 37°C). En fait, en fonction de ces conditions, les NPs libèrent 100% après 55 heures. Finalement, ces conditions de la libération de la DOX à partir Fe_{3-δ}O₄@P (MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) – AF seront prises en compte pour les évaluations biologiques envisagées dans un court terme.

Pour vérifier que nous avons toujours le même modèle cinétique de la libération que les NPs sans AF nous avons déterminé les différents paramètres de la libération pour chaque modèle (K₁, K_h, K_{kp} et n) présentés dans le Tableau IV-1, ainsi que les valeurs de la corrélation (R²).

Comme prévu (NPs sans AF de Chapitre 3) , la cinétique de Higuchi et le modèle de Korsmeyer–Peppas ne cadrent pas bien avec les données expérimentales, alors que la cinétique du premier ordre semble toujours être le meilleur modèle pour la condition 37°C et le modèle d’ordre zéro s’applique pour les résultats déterminés à T=42°C.

Nano-objets	T°(C)	Zero Order		First Order		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
		K ₁	R ²	K ₁	R ²	K _h	R ²	K _{kp}	n	R ²
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ MA ₆₅ -OEGMA ₃₅)-FA	37	0.0431	0.8810	0.0031	0.9850	0.7870	0.5468	0.1772	1.0941	0.8967
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀)-FA	37	0.1161	0.8456	0.0165	0.9458	0.0847	0.6476	0.3466	0.4522	0.6476
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ MA ₆₅ -OEGMA ₃₅)-FA	42	0.1016	0.9903	0.0010	0.9801	0.3643	0.8031	0.4479	0.0959	0.8311
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ MA ₆₀ -OEGMA ₄₀)-FA	42	0.0043	0.9893	0.0183	0.9882	0.0915	0.8601	0.5658	0.3285	0.8598

Tableau IV-1. Données cinétiques de la libération de la DOX par les nanovecteurs NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}) -AF.

Les valeurs de DLC (%) et le DLE (%) des nanosystèmes ont presque les mêmes valeurs trouvées pour les NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀) sans AF (Chapitre 3). En effet, 6.1 % et 53.7 % pour les NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀) -AF. A partir de ces résultats, nous avons la garantie que l’AF n’a pas d’influence sur les propriétés du chargement et du relargage de la DOX de ce nanovecteur élaborées au cours de ce projet.

4.3.6 Étude de la stabilité du nanovecteur chargé en DOX à 37 ° C

La stabilité des NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀) -AF chargées en DOX a été étudiée aussi en fonction du temps. En effet, la DOX (1 mg.mL⁻¹) et les NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀) -AF (0,5 mg.mL⁻¹) ont été incubées dans du DMEM à 37°C, le diamètre hydrodynamique résultant du système chargé de la DOX a été mesuré par les DLS à partir de leur contact jusqu'à 72 heures, tous les résultats sont représentés en Figure IV-8. Les données illustrées à la Figure IV-8, en considérant la barre d'erreur et les valeurs de PDI, montrent que les diamètres des nanosystèmes chargés de la DOX ne changent pas avec le temps (jusqu'à 72 heures). Cette étude confirme la haute stabilité de ce nanovecteur dans les milieux physiologiques.

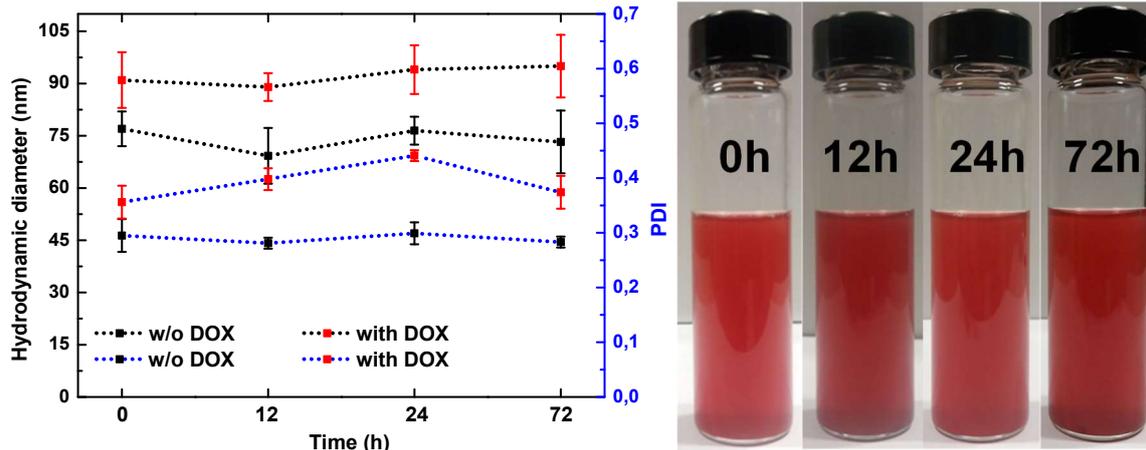


Figure IV-8. Evolution du diamètre des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ en fonction du temps dans le DMEM

4.3.7 Étude sur l'hyperthermie *in vitro*

Le comportement au chauffage *in vitro* d'une suspension aqueuse de NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})\text{-AF}$ ($4,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) soumise à un AMF de fréquence $f = 536,5 \text{ KHz}$ et à une amplitude du champ $H = 300 \text{ Oe}$ est présenté dans la Figure IV-9.

Lorsqu'elles sont soumises à un AMF, les NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})\text{-AF}$ présentent une augmentation de température jusqu'à 7°C en 3 minutes seulement, la génération suffisante pour atteindre les températures d'hyperthermie et donnant des valeurs de ILP est de $0,61$ et $0,47 \text{ nHm}^2 \text{ K}^{-1}$ (ce qui se traduit par un SAR de $99,11$ et $76,46 \text{ W/g}$) pour les NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{65}\text{-OEGMA}_{35})\text{-AF}$ et les NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ dispersés dans le DMEM. Cette valeur d'ILP se compare avantageusement aux autres valeurs d'ILP obtenues pour des matériaux magnétiques d'oxyde de fer spécialement synthétisés pour les applications d'hyperthermie¹³ et les ferrofluides disponibles dans le marché avec des valeurs d'ILP allant de $0,15 \text{ nHm}^2 \text{ K}^{-1}$ à $3,1 \text{ nHm}^2 \text{ K}^{-1}$ ^{14,15}.

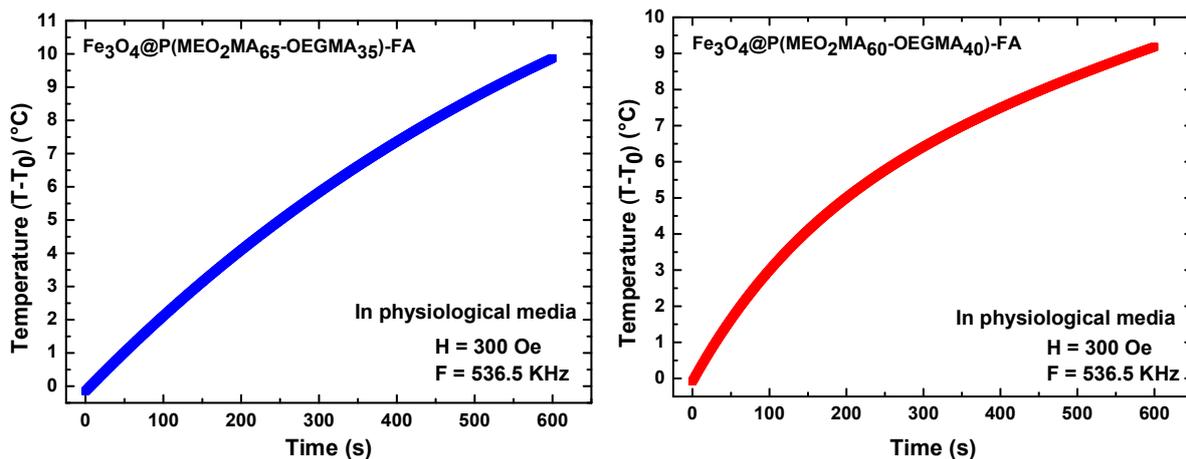


Figure IV-9. Température des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})\text{-AF}$ sous un champ magnétique alternatif dans le DMEM.

4.3.8 Évaluations biologiques des nouvelles formulations

Toutes les évaluations biologiques réalisées dans cette partie sont effectuées au sein de l'équipe « Nanomatériaux et Santé » de l'Institut Jean Lamour. Les lignées choisies sont des lignées

de cellules cancéreuses SKOV-3 (lignée cellulaire d'adénocarcinome ovarien humain). Les viabilités cellulaires sont révélées par la méthode du WST-1.

4.3.8.1 Evaluations biologiques des NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ sur les cellules SKOV-3

Avant de tester les activités biologiques de ces nanostructures comme un nano-transporteur sur les SKOV-3, leur cytotoxicité sur ces lignés cellulaires sont quantifiées. En effet, la cytotoxicité des NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ a été étudiée par les WST-1 après une incubation avec des cellules SKOV-3 pendant 24 et 72 h.

La Figure IV-10 montre que les NPs cœur/coquille modifiées par AF présentent une cytotoxicité dépendante de la dose de NPs¹⁴. Pour une concentration jusqu'à $100 \mu\text{g. mL}^{-1}$, il a été démontré que les NPs de $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ induisent une faible mortalité cellulaire, qui est respectivement de 85 ± 3 et de 95 ± 4 % après 24 h et 72 h (Figure IV-10).

Cependant, pour être en cohérence avec les études réalisées dans le chapitre 3, nous avons limité notre concentration à $12 \mu\text{g. mL}^{-1}$ pour la suite des évaluations biologiques avec les NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$. En effet, pour une concentration de $12 \mu\text{g. mL}^{-1}$, les NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ présentent une viabilité autour de 99 ± 4 et 97 ± 3 % après respectivement 24 h et 72 h.

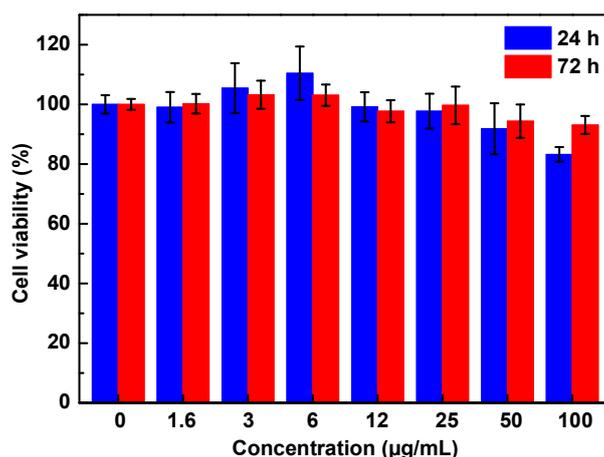


Figure IV-10 : Viabilité des cellules SKOV-3 après (a) 24 et (b) 72 h d'exposition aux NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$.

4.3.8.2 Etude de la cytotoxicité des NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ chargée avec la DOX

La cytotoxicité *in vitro* des nanoformulations chargées de la DOX a été examinée vis à vis de la lignée cellulaire SKOV-3 avec une gamme de concentration de NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ chargée en DOX ($0,7\text{-}12 \mu\text{g mL}^{-1}$). En effet, la toxicité de ce vecteur sans la DOX est négligeable via sa viabilité cellulaire qui est autour de 97 ± 3 % après 72 heures.

L'activité anticancéreuse de la formulation ciblée a été analysée et comparée à la DOX libre à la même concentration. Les résultats ont révélé une IC_{50} (concentration inhibitrice semi-maximale) de $0,04 \mu\text{g.L}^{-1}$, $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ et $0,07 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour la DOX libre, les NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ chargé respectivement en DOX à 37 à 41 ° C. La IC_{50} est nettement inférieure à celle des $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ à 41 ° C par rapport au DOX libre à 41 ° C d'une part où une concentration de $0,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de la DOX relarguée, permet de diminuer le pourcentage de la viabilité cellulaire à moins de 25%. Dans les mêmes conditions, la DOX libre conduit à une

viabilité cellulaire de $82,97 \pm 4,31\%$ (Figure IV-11). Cette amélioration de l'activité cytotoxique est probablement due à la présence de l'AF à la surface de ces NPs¹⁵.

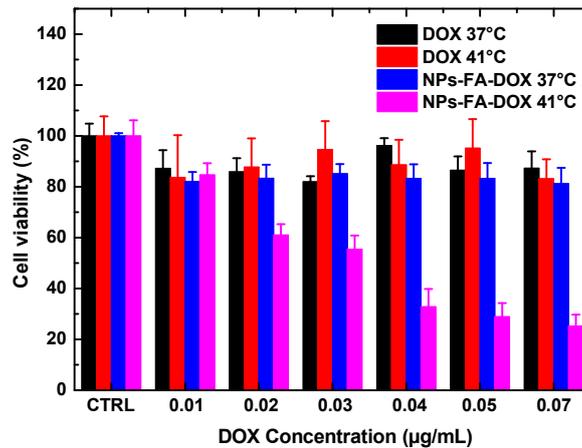


Figure IV-11. Viabilité des cellules SKOV-3 d'exposition à la DOX libre et NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ chargé en DOX à 37 et 41 °C.

En résumé, l'activité cytotoxique de ces NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ a été améliorée avec la présence de la molécule de ciblage, de l'AF avec les lignées cellulaires SKOV-3¹⁶. En effet, une amélioration d'un facteur 3,33 est apportée. Cette efficacité est probablement due à la haute internalisation de ce nanovecteur dans le SKOV-3. La partie suivante consiste à répondre à cette hypothèse.

Par conséquent, cette activité cytotoxique est due aussi au taux de relargage de ces NPs qui étaient de 30 % (0.07 µg) après 5 heures alors que ces nanovecteurs relèguent 100% après 54 heures. Au contraire, d'autres nanosystèmes de la vectorisation ne permettent pas d'atteindre une libération de 100%.

4.3.9 Internalisation des nanoparticules entières

L'activité cytotoxique observée dans les paragraphes précédents par les NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ sans et avec l'AF peut être expliquée par les trois hypothèses suivantes :

- ✓ Les NPs libèrent la DOX avant l'entrée dans les cellules
- ✓ Les NPs s'absorbent sur les membranes des cellules puis elles libèrent de la drogue
- ✓ Les NPs entrent toutes entières dans les cellules puis elles libèrent la DOX à l'intérieur.

Afin de vérifier l'internalisation des NPs fonctionnalisées avec et sans AF dans les cellules SKOV-3, une étude par un microscope confocale a été effectuée. Les cellules SKOV-3 sont incubées pendant 3 heures avec $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ des NPs avec et sans AF. Les noyaux en bleu (après la coloration avec le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, bleu) nous permettent de localiser les noyaux des cellules.

Les clichés obtenus par microscopie confocale de la Figure IV-13 indique que les NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ s'internalisent mieux que celles $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$. La présence de l'AF ciblant les récepteurs $\text{FR}\alpha$ à la surface des cellules permet l'internalisation des NPs modifiées par AF⁹ (Figure V-13) au sein des cellules cancéreuses.

Les clichés de microscopie de confocale tels que ceux présentés dans la Figure IV-13 ne permettent pas de mettre en évidence l'augmentation de la concentration des NPs fonctionnalisées par l'acide folique par rapport à celle sans AF. C'est pourquoi il faudrait mettre au point une méthode de visualisation par microscopie en transmission (travail qui n'a pu être effectué dans le cadre de cette

thèse) pour confirmer l'augmentation de la concentration des nano-objets fonctionnels au sein des noyaux.

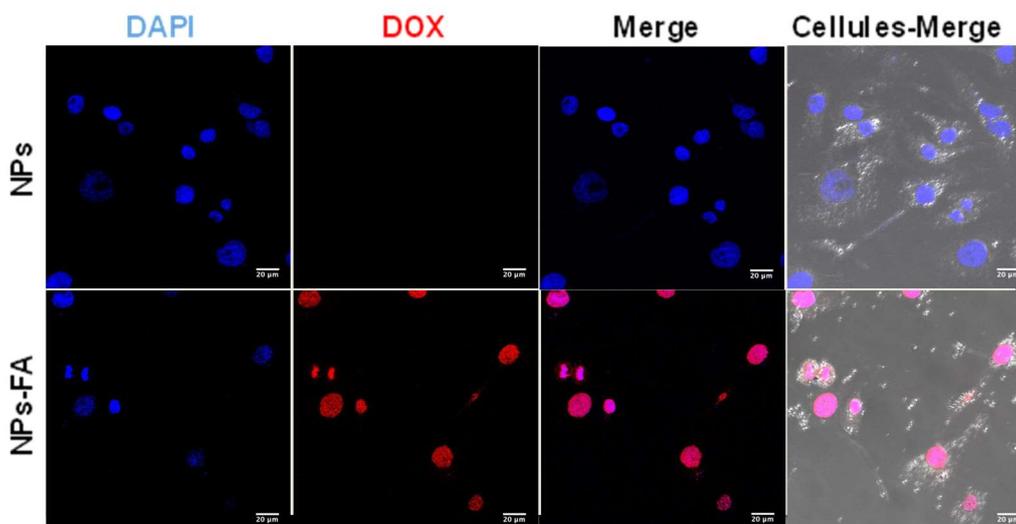


Figure IV-13 : Images obtenues par microscopie confocale des cellules SKOV-3 traitées avec des $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ (NPs) et $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ (NPs-FA) chargées en DOX pendant 3 heures. Marquage des noyaux avec le DAPI (bleu)

En résumé, la vectorisation de la DOX via des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})\text{-AF}$ permet d'envisager des matériaux avec des performances accrues en termes de la thérapie cancéreuse¹⁶⁻²¹. En outre, une valeur de DLC de l'ordre de 6.1 %, permet d'éviter les effets secondaires de la chimiothérapie et par l'internalisation efficace, il permet d'envisager de meilleurs résultats thérapeutiques.

De plus il est à noter que les nanoformulations sont stables dans le milieu biologique DMEM à 37°C, améliorent l'activité cytotoxique de la DOX libre. Les NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})\text{-AF}$ affichent des viabilités plus faibles par rapport à la DOX libre. En revanche, d'autres travaux *in vitro* réalisés avec des NPs chargées en DOX sont moins cytotoxiques envers les SKOV-3 que la DOX libre. Aussi les mêmes résultats sont obtenus par Dai *et al.* et Fu *et al.*^{22,23}.

Les résultats démontrant *in vitro* de l'activité cytotoxique des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})\text{-AF}$ sont très encourageants pour le passage vers des évaluations biologiques *in vivo*.

4.4 Conclusion

L'AF a pu être greffé à la surface des NPs et être utilisé comme une molécule de ciblage. Son insertion aux extrémités des $\text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ permet d'améliorer l'activité thérapeutique des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$.

A notre connaissance, il s'agit de la première étude utilisant une chimie simple et efficace pour fabriquer des nanovecteurs intelligents chargés d'un médicament actif pour une administration ciblée. Une liaison efficace de type covalent entre les différents matériaux formant le nanovecteur afin d'assurer la bonne stabilité lors des études *in vivo* a pu être ainsi confirmée.

De plus, nous avons démontré des propriétés d'hyperthermie magnétique intéressantes ainsi qu'un bon contrôle du relargage du médicament. Les tests de cytotoxicité effectués ont montré qu'une faible quantité de la DOX relarguée suffisait pour obtenir un très fort taux d'apoptose pour les cellules

SKOV-3, ce qui permet d'ouvrir la voie vers des nouveaux nano-objets qui permettraient d'envisager la réduction des effets secondaires de la DOX.

Enfin, afin de modéliser complètement le comportement des NPs *in-vitro*, une étude d'absorption de protéines a été menée *in vitro* est décrite dans le Chapitre suivant.

4.5 Références

- (1) Herrington, C. S. Tumors of the Ovary, Maldeveloped Gonads, Fallopian Tube and Broad Ligament. Atlas of Tumor Pathology. Third Series, Fascicle 23 Robert E. Scully, Robert H. Young and Philip B. Clement. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1998. No. of Pages: 527. Price: \$95.00. ISBN: 1 881041 43 3. *J. Pathol.* **1999**, *189* (1), 145–145. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<145::AID-PATH420>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<145::AID-PATH420>3.0.CO;2-F).
- (2) Zoli, W.; Ulivi, P.; Tesei, A.; Fabbri, F.; Rosetti, M.; Maltoni, R.; Giunchi, D. C.; Ricotti, L.; Briigliadori, G.; Vannini, I.; et al. Addition of 5-Fluorouracil to Doxorubicin-Paclitaxel Sequence Increases Caspase-Dependent Apoptosis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer Res.* **2005**, *7* (5). <https://doi.org/10.1186/bcr1274>.
- (3) Mani, G.; Kim, S.; Kim, K. Development of Folate-Thioglycolate-Gold Nanoconjugates by Using Citric Acid-PEG Branched Polymer for Inhibition of MCF-7 Cancer Cell Proliferation. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (8), 3257–3267. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00543>.
- (4) Kayl, A. E.; Meyers, C. A. Side-Effects of Chemotherapy and Quality of Life in Ovarian and Breast Cancer Patients: *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **2006**, *18* (1), 24–28. <https://doi.org/10.1097/01.gco.0000192996.20040.24>.
- (5) Azcona, P. L.; Montiel Schneider, M. G.; Grünhut, M.; Lassalle, V. L. Stimuli-Responsive Nanotheranostics Intended for Oncological Diseases: *In Vitro* Evaluation of Their Target, Diagnostic and Drug Release Capabilities. *New J. Chem.* **2019**, *43* (5), 2126–2133. <https://doi.org/10.1039/C8NJ05289A>.
- (6) Igartúa, D. E.; Azcona, P. L.; Martinez, C. S.; Alonso, S. del V.; Lassalle, V. L.; Prieto, M. J. Folic Acid Magnetic Nanotheranostics for Delivering Doxorubicin: Toxicological and Biocompatibility Studies on Zebrafish Embryo and Larvae. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *358*, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.09.009>.
- (7) Zhang, H.; Li, J.; Hu, Y.; Shen, M.; Shi, X.; Zhang, G. Folic Acid-Targeted Iron Oxide Nanoparticles as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging of Human Ovarian Cancer. *J. Ovarian Res.* **2016**, *9* (1). <https://doi.org/10.1186/s13048-016-0230-2>.
- (8) Zhu, J.; Li, H.; Xiong, Z.; Shen, M.; Conti, P. S.; Shi, X.; Chen, K. Polyethyleneimine-Coated Manganese Oxide Nanoparticles for Targeted Tumor PET/MR Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (41), 34954–34964. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b12355>.
- (9) Mani, G.; Kim, S.; Kim, K. Development of Folate-Thioglycolate-Gold Nanoconjugates by Using Citric Acid-PEG Branched Polymer for Inhibition of MCF-7 Cancer Cell Proliferation. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (8), 3257–3267. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00543>.
- (10) Chen, H.; He, S. PLA-PEG Coated Multifunctional Imaging Probe for Targeted Drug Delivery. *Mol. Pharm.* **2015**, *12* (6), 1885–1892. <https://doi.org/10.1021/mp500512z>.
- (11) Daou, T. J.; Pourroy, G.; Bégin-Colin, S.; Grenèche, J. M.; Ulhaq-Bouillet, C.; Legaré, P.; Bernhardt, P.; Leuvre, C.; Rogez, G. Hydrothermal Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2006**, *18* (18), 4399–4404. <https://doi.org/10.1021/cm060805r>.
- (12) Baaziz, W.; Pichon, B. P.; Fleutot, S.; Liu, Y.; Lefevre, C.; Greneche, J.-M.; Toumi, M.; Mhiri, T.; Begin-Colin, S. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Reproducible Tuning of the Size and Nanosized-Dependent Composition, Defects, and Spin Canting. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (7), 3795–3810.

- <https://doi.org/10.1021/jp411481p>.
- (13) May, J. P.; Li, S.-D. Hyperthermia-Induced Drug Targeting. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2013**, *10* (4), 511–527.
<https://doi.org/10.1517/17425247.2013.758631>.
- (14) Chen, Y.; Ai, K.; Liu, J.; Sun, G.; Yin, Q.; Lu, L. Multifunctional Envelope-Type Mesoporous Silica Nanoparticles for PH-Responsive Drug Delivery and Magnetic Resonance Imaging. *Biomaterials* **2015**, *60*, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.003>.
- (15) Luong, D.; Sau, S.; Kesharwani, P.; Iyer, A. K. Polyvalent Folate-Dendrimer-Coated Iron Oxide Theranostic Nanoparticles for Simultaneous Magnetic Resonance Imaging and Precise Cancer Cell Targeting. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (4), 1197–1209.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01885>.
- (16) Ferjaoui, Z.; Schneider, R.; Meftah, A.; Gaffet, E.; Alem, H. Functional Responsive Superparamagnetic Core/Shell Nanoparticles and Their Drug Release Properties. *RSC Adv.* **2017**, *7* (42), 26243–26249.
<https://doi.org/10.1039/C7RA02437A>.
- (17) Cao, Y.; He, J.; Liu, J.; Zhang, M.; Ni, P. Folate-Conjugated Polyphosphoester with Reversible Cross-Linkage and Reduction Sensitivity for Drug Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (9), 7811–7820.
<https://doi.org/10.1021/acsami.7b18887>.
- (18) Xu, M.; Zhang, C. Y.; Wu, J.; Zhou, H.; Bai, R.; Shen, Z.; Deng, F.; Liu, Y.; Liu, J. PEG-Detachable Polymeric Micelles Self-Assembled from Amphiphilic Copolymers for Tumor-Acidity-Triggered Drug Delivery and Controlled Release. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (6), 5701–5713.
<https://doi.org/10.1021/acsami.8b13059>.
- (19) Shen, S.; Wu, Y.; Liu, Y.; Wu, D. High Drug-Loading Nanomedicines: Progress, Current Status, and Prospects. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *Volume 12*, 4085–4109.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S132780>.
- (20) Vallet-Regi, M.; Rámila, A.; del Real, R. P.; Pérez-Pariente, J. A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (2), 308–311.
<https://doi.org/10.1021/cm0011559>.
- (21) Wu, J.; Zhu, Y.-J.; Cao, S.-W.; Chen, F. Hierarchically Nanostructured Mesoporous Spheres of Calcium Silicate Hydrate: Surfactant-Free Sonochemical Synthesis and Drug-Delivery System with Ultrahigh Drug-Loading Capacity. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (6), 749–753.
<https://doi.org/10.1002/adma.200903020>.
- (22) Dai, Y.; Yang, D.; Ma, P.; Kang, X.; Zhang, X.; Li, C.; Hou, Z.; Cheng, Z.; Lin, J. Doxorubicin Conjugated NaYF₄:Yb³⁺/Tm³⁺ Nanoparticles for Therapy and Sensing of Drug Delivery by Luminescence Resonance Energy Transfer. *Biomaterials* **2012**, *33* (33), 8704–8713.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.029>.
- (23) Fu, C.; Yang, R.-M.; Wang, L.; Li, N.; Qi, M.; Xu, X.; Wei, X.; Jiang, X.-Q.; Zhang, L.-M. Surface Functionalization of Superparamagnetic Nanoparticles by an Acid-Liable Polysaccharide-Based Prodrug for Combinatorial Monitoring and Chemotherapy of Hepatocellular Carcinoma. *RSC Adv.* **2017**, *7* (66), 41919–41928.
<https://doi.org/10.1039/C7RA05042A>.

5 Chapitre V : Études des propriétés de la furtivité des Fe₃-δO₄ @ P(MEO2MAX-OEGMA100-X)

5.1 Introduction

Ce chapitre a pour objectif de présenter l'étude des propriétés de furtivité de ces nanovecteurs synthétisés au cours de Chapitre 3. En effet, les nanoparticules colloïdales (NPs) entrent en contact avec l'environnement biologique par leur surface^{1,2}. Lorsque l'injection intraveineuse est envisagée pour les nanoparticules ainsi que leur voyage au sein du système veineux, l'éventualité de l'absorption des protéines dans un milieu physiologique doit être considérée^{3,4,5}. En effet, leur présence peut largement inhiber l'absorption cellulaire des nanovecteurs, ce qui entraverait l'efficacité thérapeutique du nouveau médicament⁶. De plus, ces nanovecteurs ne doivent pas être reconnus par les macrophages, afin d'éviter leur élimination par le système immunitaire⁷. Les NPs doivent donc pouvoir être «furtives», une fois injectée dans le systèmes veineux^{7,8,9}.

L'absorption des protéines sur les nanovecteurs dépend de plusieurs paramètres, tels que la composition chimique en surface du nanosystème, les propriétés de la surface, le potentiel zêta des NPs, etc¹⁰. Le greffage de polyéthylène glycol à la surface de nano-objets, tels que des liposomes d'abord, mais aussi d'autres structures, s'est donc développé depuis les années afin de tirer parti de ses propriétés d'adsorption de molécules d'eau¹¹. En effet, la PEGylation rend les nanoparticules transparentes au système immunitaire, ce dernier ne « voyant » qu'une couronne d'eau^{12,13,14,15}.

Généralement, le défi le plus important lors de l'injection de nano-objet au sein du système veineux est d'empêcher ce qui est appelé l'« opsonisation » qui conduit à la phagocytose des nano-objets par les macrophages ou à la diminution de leur endocytose par les cellules biologiques. En effet lors de son parcours dans le corps humain, une nanoparticule ou un nanomatériau en général est recouvert de molécules appelées opsones (en général des protéines et/ou anticorps) qui permettent la reconnaissance par des macrophages conduisant à la phagocytose. Cette dernière est un processus extrêmement complexe et aucun modèle unique à l'heure actuelle ne peut rendre compte de la diversité des structures et des résultats associés à l'ingestion de particules. Néanmoins, indépendamment du nano-objet ingéré, la première étape pour étudier ces adsorption de protéines consiste à mettre en contact les nano-objets avec des solutions l'Albumines et Fibrinogène qui sont des protéines très largement présentes dans le corps et constituent la première étape d'opsonisation¹⁶. Comme il a été décrit précédemment, le PEG est la macromolécule de référence actuellement pour avoir une furtivité optimale.

Nous nous concentrerons dans ce Chapitre dans l'étude de l'influence de cette couronne de protéines sur l'endocytose, bien que la phagocytose reste un élément indispensable à étudier.

Beatriz Pelaz *et al.*¹⁷ ont étudié l'effet de l'absorption des protéines et l'internalisation par des cellules en culture pour les nanoparticules des FePt et Fe₃-δO₄ fonctionnalisées par liaison covalente par un polyéthylène glycol (PEG). Après la mise en contact des NPs dans un milieu de culture enrichi de sérum albumine humaine (HSA) et ensuite de fibrinogène (Fbg), une augmentation du diamètre des NPs a été mesuré par DLS, confirmant l'absorption d'une monocouche de HSA¹⁷. Pour ces travaux, les auteurs, ont mis en contact les NPs dans une solution fortement concentrée en NPs (une concentration de 1 nM de NPs en contact avec une différente concentration de HSA (0.01 à 1000 μM) et en Fbg (10⁻⁴ à 10² μM). L'augmentation du diamètre est constatée lorsque les NPs ne sont pas modifié par PEG, et qu'ils étaient en contact avec 1000 μM de HSA et 10² μM Fbg sont 3 nm et 20 ± 2 nm. Alors que pour les NPs modifiées par le PEG l'augmentation de la taille due à la

formation de couronne HSA était seulement $\sim 1,5$ nm pour les NPs FePt-PMA-PEG et donc elle réduit d'un facteur 2 environ par rapport aux valeurs obtenues pour les NPs non PEGylées (FePt-PMA, FePt-PMA-glucose, Fe₃O₄-PMA)¹⁷. C'est un résultat très intéressant car l'épaisseur obtenue, 1,5 nm est moins que la plus petite extension de HSA (3 nm)¹⁷. Les auteurs montrent que la HSA pénètre partiellement dans la couche de PEG, ce qui explique la réduction augmentation de la taille lors de l'incubation des NPs avec la HSA. En revanche une évolution du diamètre de l'ordre 5 nm pour les NPs fonctionnalisées par le PEG après le contact avec 10^2 μ M de Fbg a été observée. Finalement, les auteurs ont pu démontrer le lien entre cette augmentation de diamètre et la formation d'une couronne de protéine autour des NPs (nous appellerons dans la suite de ce manuscrit, par le nom du phénomène décrit dans la littérature, 'protéine-corona'. Lorsque ces NPs PEGylées entourées de la couronne de la protéine ont été mises en contact *in vitro* avec des fibroblastes 3T3, leur incorporation au sein des cellules a été réduite d'environ 10%. Ainsi, bien que la modification par les chaînes de PEG n'ait pas complètement empêché l'absorption des protéines, l'absorption cellulaire de ces nanoparticules est réduite par rapport aux NPs sans PEG.

Des travaux intéressants menés par Walkey *et al.*¹⁸ ont montré que dans le cas des NPs d'or, la densité du greffage du PEG peut contrôler l'absorption de 70 protéines sériques, c'est-à-dire que pour une densité du PEG d'env. 0,25 PEG.nm⁻² une densité autour de 0.18 μ g.cm⁻² de la protéine a été adsorbé à la surface, cependant pour une densité de 1,25 PEG.nm⁻² seulement 0.01 μ g.cm⁻² ont été absorbés. En augmentant la densité de PEG, l'adsorption totale des protéines sériques a été diminuée et la structure de la couronne fut donc modifiée. Le greffage d'une couche de PEG autour des NPs a donc montré une efficacité prometteuse pour la limite de l'absorption des protéines sériques lorsque leur densité du greffage a été élevée (1,25 PEG.cm⁻²) mais diminue malgré tout l'internalisation des NPs au sein des cellules¹⁸.

Pour comprendre des différents types d'interaction entre les NPs et les protéines, Weiss *et al.*¹⁹ ont effectué des mesures sur l'absorption de la protéine par des particules de silice fonctionnalisées par poly (2-méthacryloyloxyéthylphosphorylcholine). Ils ont montré que la formation de la couronne des protéines est divisée cinétiquement en trois phases différentes: (1) absorption des protéines d'une manière irréversible (dans des conditions physiologiquement pertinentes) à la surface de la particule, (2) une seconde couche de protéines vient par la suite se former grâce à la première couche des protéines pré-absorbées, et (3) une couronne de protéines liées de manière réversible¹⁹.

Concernant le copolymère étudié dans le cadre de cette thèse, l'influence d'un sérum de la protéine sur l'activité cytotoxique et l'internalisation des nanoparticules d'argent (Ag) greffées par le P(MEO₂MA_X-OEGMA_Y) (X=90, 95 et Y=10, 05) vis-à-vis des Fibroblastes L929 a aussi été effectuées par Anderson *et al.*²⁰. Pour évaluer le rôle de l'absorption des protéines dans des voies spécifiques d'endocytose, les cellules ont été exposées à des inhibiteurs d'endocytose en présence ou en absence des protéines sériques (la dansylcadaverine et la nystatine) dans le milieu de la culture cellulaire.

La présence de protéines sériques a entraîné une diminution de 34% et 15% de l'absorption cellulaire d'Ag@ P(MEO₂MA₉₀-co-OEGMA₁₀) et de 54% et 48% pour le Ag@ P(MEO₂MA₉₅-co-OEGMA₀₅)²⁰.

En revanche, la magnitude de la réduction de l'absorption avec dansylcadaverine était seulement de 8 à 9% dans des conditions sans sérum pour les deux compositions. De même, la nystatine avait un effet négligeable sur l'inhibition de l'absorption d'Ag@P(MEO₂MA_X-co-OEGMA_Y) en absence des protéines sériques.

De plus, la dansylcadaverine et la nystatine étaient significativement plus efficaces pour inhiber la cytotoxicité d'Ag@ P(MEO₂MA₉₅-co-OEGMA₀₅) en présence de protéines sériques par

rapport à la composition le plus hydrophile $\text{Ag}@ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{90}\text{-co-OEGMA}_{10})^{20}$. La cytotoxicité induite par l' $\text{Ag}@ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{95}\text{-co-OEGMA}_{05})$ a été inhibée d'environ 60% pour la dansylcadaverine et la nystatine, et l'action inhibitrice de ces dernières a été essentiellement éliminée dans des conditions sans sérum. Cela met en évidence un rôle essentiel pour l'absorption des protéines sur les surfaces des NPs dans l'endocytose à médiation par le récepteur d' $\text{Ag}@ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_X\text{-co-OEGMA}_Y)$ et la toxicité cellulaire ultérieure. En outre, la modulation de l'hydrophobicité de la surface du NPs par le biais de la composition du copolymère suggère que l'endocytose médiée par le récepteur contribue d'une manière significative à la cytotoxicité induite par $\text{Ag}@ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{95}\text{-co-OEGMA}_{05})$, tandis que la toxicité d' $\text{Ag}@ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{90}\text{-co-OEGMA}_{10})$ est largement indépendante du récepteur endocytose médiée en présence ou en absence des protéines sériques²⁰.

Pour des nano-objets développés en vue de la thérapie cancéreuse, il a été montré que la PEGylation de la surface diminue l'internalisation des NPs au sein des cellules²¹, mais le mécanisme reste à éclaircir, afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique des NPs.

L'enjeu actuel auquel nous souhaiterions répondre dans ce Chapitre est l'étude de la capacité de nos nanoparticules fonctionnalisées par le copolymère composé de MEO_2MA et OEGMA (greffé ou non d'AF) à ne pas adsorber de protéines modèles telles que la HA et Fbg et d'étudier leur internalisation cancéreuse tout en maintenant après mise en contact avec un milieu enrichi par ces deux protéines modèles. Ainsi, l'interaction de l'albumine, du fibrinogène et des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ greffés avec du silane (NH_2) ou $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ est étudiée en utilisant la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la spectroscopie de rayons X à la dispersion d'énergie (EDS) et des mesures par la spectroscopie infrarouge.

Enfin, nous avons proposé d'étudier la cinétique du relargage et l'internalisation par un microscope confocale vis-à-vis SKOV-3 pour des NPs après le contact avec la HA afin d'étudier l'influence de la formation d'une couronne de la protéine sur la cinétique du relargage d'une part et l'internalisation des nanoparticules dans SKOV-3 d'autre part (Figure V-1).

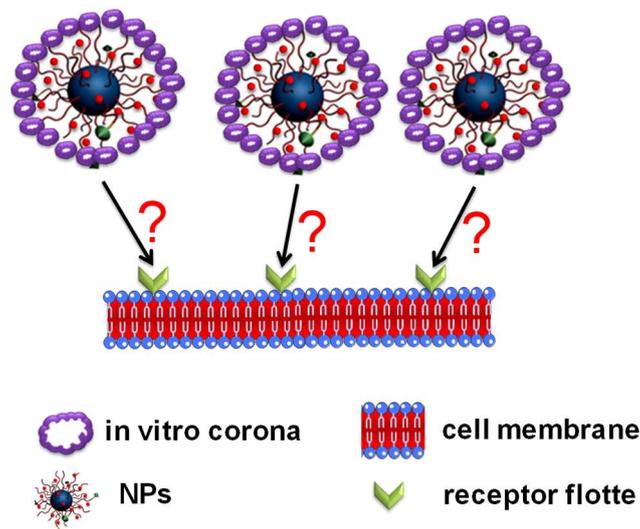


Figure V-1 : Schéma général de l'objectif du chapitre 5

5.2 Matériels et méthodes

5.2.1 Matériels

Pour modifier la surface des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$, le (3-aminopropyl) triéthoxysilane (Gelest, > 95%) a été utilisé. Les protéines utilisées pour étudier l'interaction entre les NPs et les protéines sont l'albumine humaine (HA) et le fibrinogène (Fbg) de (Sigma Aldrich).

5.2.2 Modification de la surface des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ par (3-aminopropyl) triéthoxysilane ($\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @\text{NH}_2$)

Le protocole de modification de la surface que nous avons adoptée est le même protocole établi dans le chapitre 2. Brièvement, la procédure est réalisée en deux étapes :

- La première étape de la silanisation consiste à : disperser les NPs magnétiques ($\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$) contenues du 50 mg dans une solution de 10 mL de toluène. Puis le mélange est soumis à des ultrasons pendant 15 mn pour réaliser la dispersion parfaite des NPs dans le solvant. Ensuite, 0,2 mmol, ($V = 49,1 \mu\text{L}$) de (3-aminopropyl) triéthoxysilane est injecté dans la solution. Le mélange est chauffé à 50°C sous une pression d'argon et sous une agitation mécanique. À cette température, 1 mL d'une solution de TMAH (108,75 mg dans 3 mL d'éthanol) a été ajouté au mélange. Ce dernier est agité pendant 15 min. Par la suite, les nanoparticules sont refroidies jusqu'à la température ambiante. Les NPMs sont récupérées par une décantation magnétique à l'aide d'un aimant, l'étape suivie de deux lavages successifs par le toluène.
- Dans la deuxième étape de la silanisation, les NPMs sont dispersées dans 10 mL de toluène. Le mélange est chauffé à 50°C sous une agitation et sous l'argon. À cette température, 2 mL d'une solution de TMAH sont ajoutés. Nous laissons agir les réactifs pendant 30 mn. Le mélange est alors refroidi dans un bain d'eau froide. Les NPMs sont récupérées.

5.2.3 Contact des NPs avec la HA et le Fbg

L'enrobage d'albumine et du fibrinogène des différentes nanoparticules ($\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ et $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @\text{NH}_2$) a été réalisée en immergeant les particules (5 mg dispersés dans 5 mL de PBS) dans les solutions des protéines de différentes concentrations (0,5, 1, 2,5, 5 mg mL^{-1}) pendant 2 h à 20°C sous une agitation constante. La purification a été effectuée en isolant les particules par centrifugation (5000g, 15 min) et en les remettant en suspension dans PBS. Cette étape a été répétée trois fois pour supprimer toutes les protéines non liées. Les particules ont été stockées dans un réfrigérateur (8°C).

Cependant, les nanoparticules $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ et $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ chargées en DOX sont immergeant dans une solution de HA d'une concentration de 5 mg mL^{-1} . Le mélange est agité pendant 2 heures, suivi par trois lavages avec le PBS afin de supprimer toutes les protéines non liées.

5.3 Résultats et discussion

5.3.1 Préparation et caractérisation des NPs

La morphologie déterminée par le microscope électronique par la transmission des nanoparticules dispersées dans le PBS après le contact avec 5 mg mL^{-1} de HA est illustrée à la Figure V-2. En effet, la taille des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @\text{NH}_2$, $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ et NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ est toujours d'environ $10 \pm 1,5 \text{ nm}$.

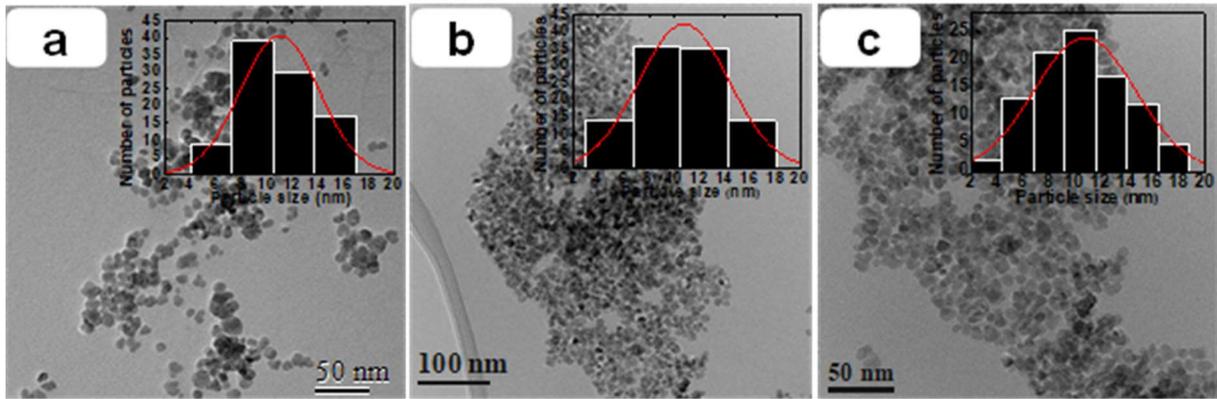


Figure V-2. Image TEM des NPs : (a) Fe_{3-δ}O₄ @NH₂ (b) Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₅-OEGMA₃₅) et (c) Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀).

De même, la présence d'une couche organique autour des NPs : (a) Fe_{3-δ}O₄ @NH₂, et Fe_{3-δ}O₄@P(MEO₂MA_x-OEGMA_{100-x}) a été assurée par la microscopie électronique en transmission (HR-TEM) combinée à une analyse par une microscopie électronique en transmission avec un filtrage d'énergie (Figure V-3). Le signal élémentaire du carbone dus aux silanes et P(MEO₂MA_x-OEGMA_{100-x}) a été détecté à la surface et entre les NPs Fe_{3-δ}O₄. Cependant, les nanoparticules présentent une stabilité de leurs propriétés physiques *in vitro* après la mise en contact avec la plus forte concentration de HA (5mg.mL⁻¹).

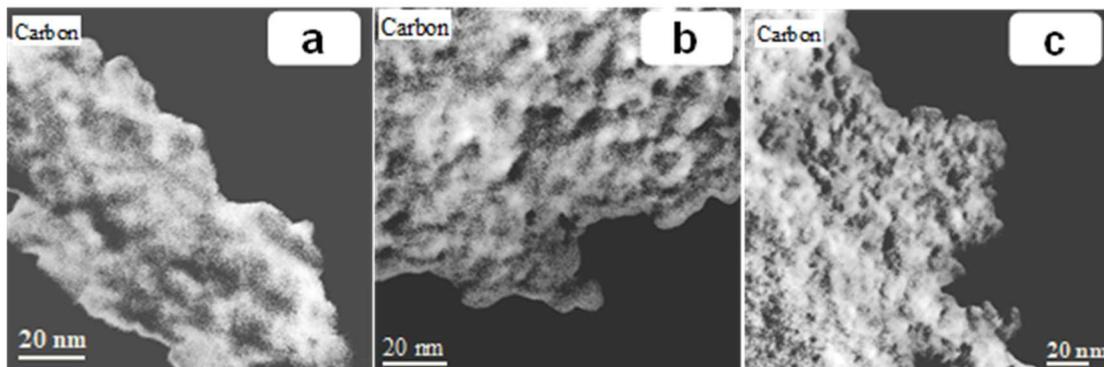


Figure V-3 : Observations HR-TEM combinés à une analyse EF-TEM des NPs (a) Fe_{3-δ}O₄ @NH₂ (b) Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₅-OEGMA₃₅) et (c) Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M₆₀-OEGMA₄₀).

Une première analyse élémentaire sur les surfaces des nanoparticules après le contact avec 5 mg.mL⁻¹ de HA a été effectuée par la spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDS).

La Figure V-4 montre la présence de différents éléments chimiques dans les échantillons (fer, silicium, carbone, oxygène). Malgré la présence d'azote avec une faible quantité dans les Fe_{3-δ}O₄ @NH₂, il nous a été impossible de le détecter par EDS dans le spectre (a) relatif au NPsFe_{3-δ}O₄ @NH₂, cette technique ne sera donc pas utilisée dans la suite de ce travail.

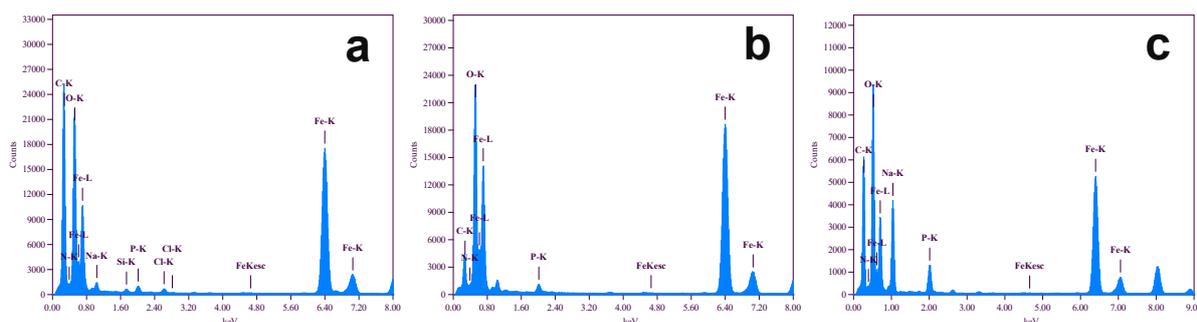


Figure V-4 : Spectres EDS des NPs (a) $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @\text{NH}_2$ (b) $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ et (c) $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$.

Alors, pour évaluer l'absorption de la protéine à la surface de nos nanoparticules nous avons donc décidé de combiner des études tel que le FT-IR et la DLS.

5.3.2 Interaction entre les NPs cœur/coquille et les protéines

Une étude des interactions entre les nanoparticules et les protéines a été donc conduite par spectroscopie infrarouge.

La Figure V-5a montre les spectres FTIR-ATR des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @$ Silane, NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ et NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ enregistrés dans leur milieu PBS avant le contact avec les protéines.

Le spectre infrarouge des NPs avec le silane présente des bandes caractéristiques du revêtement de silane. En effet, la bande à 1100 cm^{-1} a été attribuée à la vibration des liaisons Fe-O-Si confirmant ainsi la formation d'une couche du silane bien greffée à la surface des NPs. La présence du silane a été également mise en évidence par les vibrations d'élongation des liaisons C-C à 800 et 1200 cm^{-1} .

Par ailleurs, les bandes entre 1500 et 1700 cm^{-1} ont été attribuées respectivement à la bande d'élongation de C = O et à la bande N-H du groupe NH_2 .

Le spectre des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ est nettement différent et il montre une large bande à 1460 cm^{-1} attribuée principalement au groupe carboxylate, alors que la bande à 1724 cm^{-1} a été attribuée à la bande C = O.

La bande à 1247 cm^{-1} a été attribuée aux groupes Si- CH_2 -R près du cœur et les bandes se chevauchant entre 1150 et 1000 cm^{-1} ont été attribuées aux bandes d'étirement des groupes C-OH, Si-O-Si et Si-O.

La Figure V-5b montre les spectres FTIR-ATR de HA et Fbg. En effet, deux bandes ont été assignées pour les deux spectres des protéines attribués à l'amide I et II²². L'amide I est la bande d'absorption la plus intense en protéines. Elle est généralement contrôlée par les vibrations d'étirement des groupes C = O et C-N. Sa fréquence se situe entre 1600 et 1700 cm^{-1} . La position exacte de la bande est déterminée par la conformation du squelette et de motif de liaison hydrogène. L'amide II se trouve dans les régions de 1510 et 1580 cm^{-1} et il est plus complexe que l'amide I²². L'amide II provient principalement de la flexion dans le plan de N-H. Le reste de l'énergie potentielle provient des vibrations d'étirement C-N et C-C²².

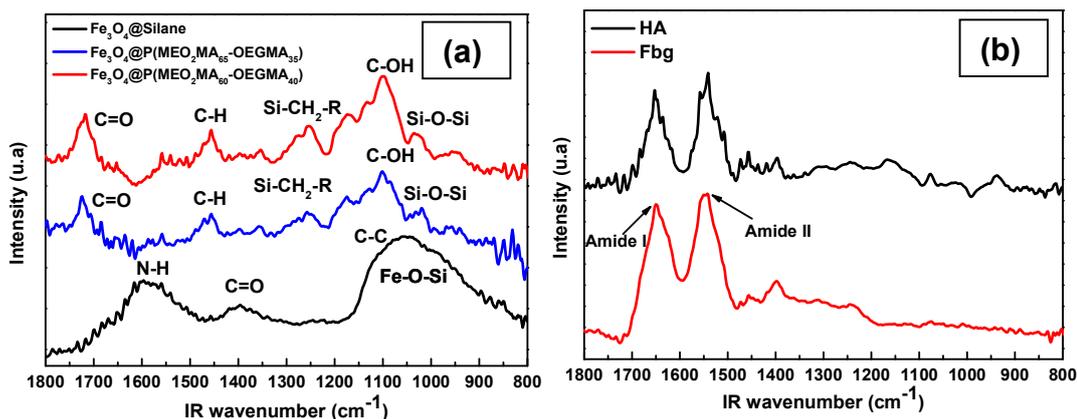


Figure V-5: Spectres IR de (a) NPs et (b) HA et Fbg (référence = milieu PBS)

Afin d'étudier la formation d'une couronne de protéines à la surface des différentes NPs élaborées, nous avons comparé les spectres FTIR-ATR de trois échantillons après le contact avec de différentes concentrations des protéines (Figure V-6).

Selon les résultats présentés dans la Figure V-6, nous avons réalisé une comparaison entre les différents spectres (NPs après le contact avec les protéines) dans la plage de nombre d'onde de 1400 et 1800 cm⁻¹. En effet, à cette gamme, les protéines montrent des bandes à 1550 et 1650 cm⁻¹, résultats attribués aux bandes amide I et amide II comme décrit précédemment.

En conséquence, la Figure V-6 montre que les spectres infrarouges des NPs après le contact avec les différentes concentrations de HA et Fbg, ne présentent aucun changement par rapport aux spectres des NPs sans un contact avec les protéines.

Cette observation indique que les deux protéines ne s'absorbent ni sur le silane, ni sur P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}).

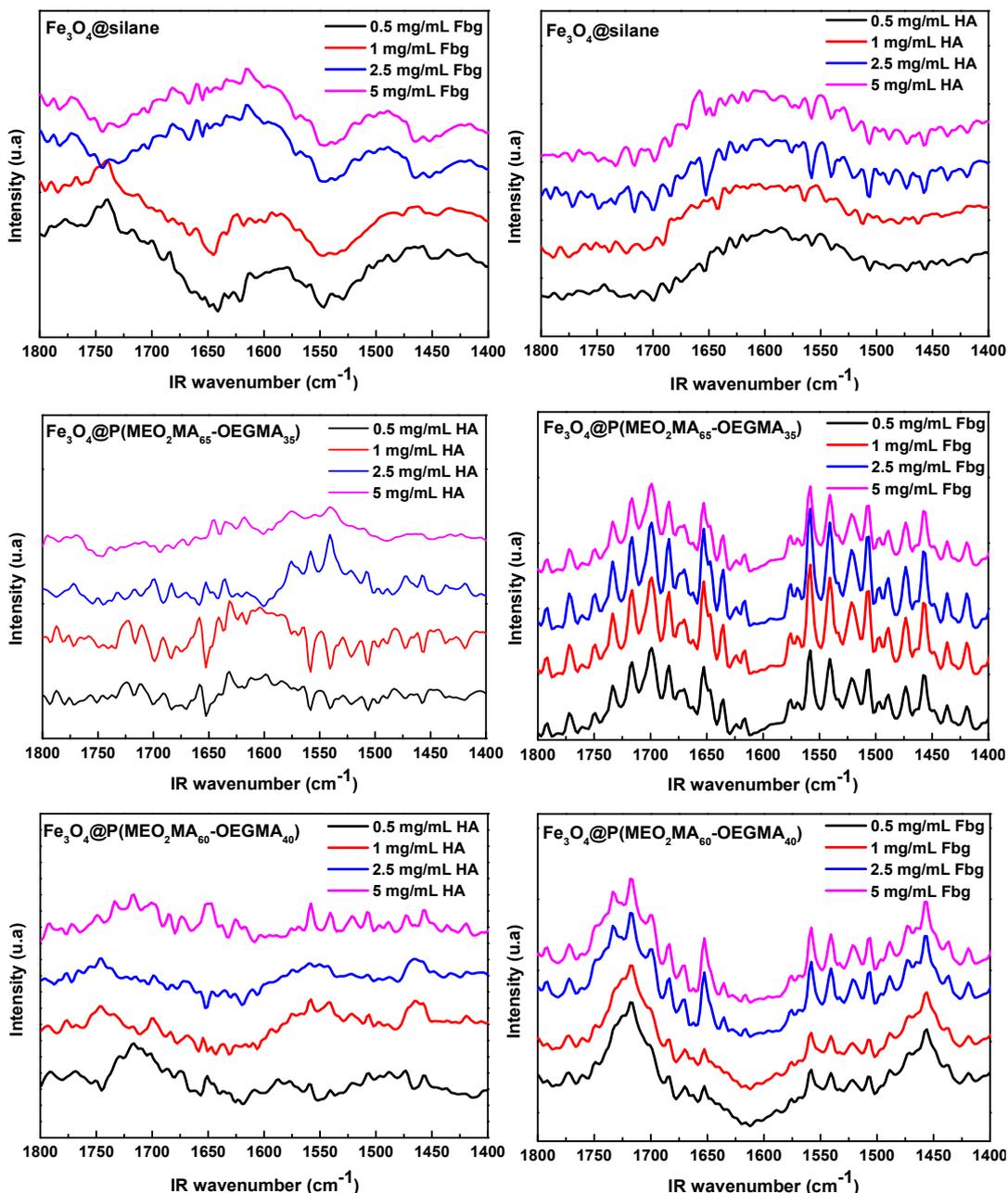


Figure V-6: Spectres IR des NPs après le contact avec la HA et le Fbg (référence = milieu PBS)

En outre, on peut obtenir une confirmation supplémentaire de l'absence d'absorption de protéines sur ces NPs en observant l'évolution de la taille hydrodynamique de différentes NPs après le contact avec de différentes concentrations de HA et du Fbg.

5.3.3 Propriété colloïdale des NPs cœur/coquille après contact avec protéine

Nous avons alors cherché dans cette partie, s'il existait une évolution du diamètre hydrodynamique provoquée par la formation d'une couronne des protéines à la surface des nanoparticules. Ces expériences ont été réalisées par la diffusion de la lumière dynamique (DLS).

Les résultats obtenus (Figure V-7) représentent la mesure du diamètre hydrodynamique des nanoparticules en fonction de la concentration des protéines. Pour toutes les concentrations, le diamètre des nanoparticules ne montre pas de changement significatif à l'absorption des protéines.

Alors qu'une évolution du diamètre de l'ordre de 50 ± 7 nm pour les NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{NH}_2$ à une concentration de $5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ du Fbg a été remarquée.

Cette augmentation est due probablement d'une part à la formation de NH_3^+ pour les NPs de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{NH}_2$ et la présence de charges négatives pour Fbg²³, ce que permet de créer une interaction électrostatique entre les NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{NH}_2$ et le Fbg²³, et d'autre part à la forte concentration du Fbg ($5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) où les molécules Fbg s'adsorbent sur la couche de silane et sans doute s'auto-assemblent par la suite formant une couche épaisse à la surface de la nanoparticules d'une taille d'environ 25 ± 2 nm.

La différence de la taille entre ces NPs avant et après le contact avec 5 mg mL^{-1} correspond à la taille d'une molécule de protéine du Fbg (45 nm)¹⁷. Donc la présence d'une monocouche de Fbg à la surface provoque une compression des NPs de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{NH}_2$, de sorte que d'autres protéines du Fbg ne peuvent pas être absorbées¹⁷.

Enfin, une formation d'une monocouche du Fbg est probablement formée à la surface $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{NH}_2$, qui reste indétectable par IR.

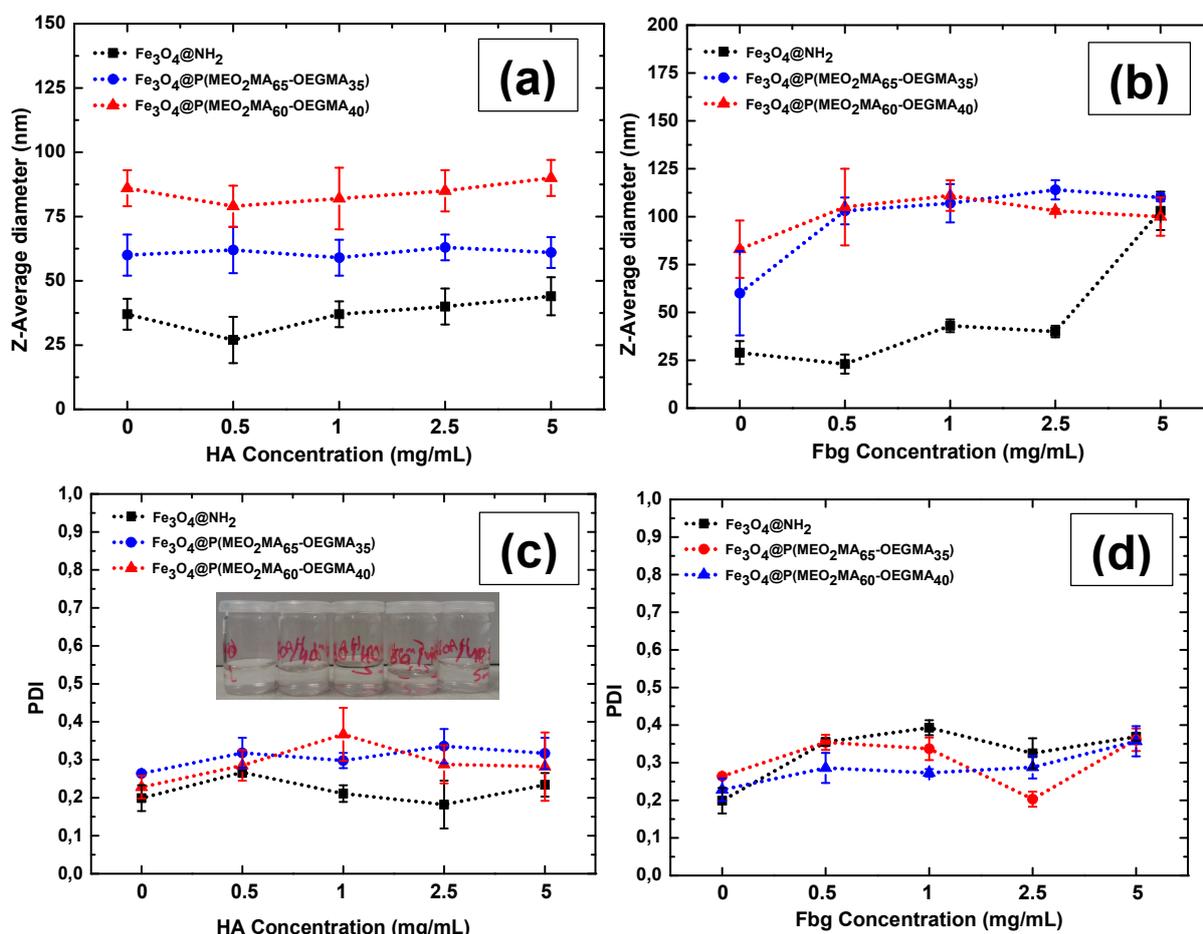


Figure V-7: Diamètre hydrodynamique des NPs après le contact avec (a) HA et (b) Fbg et polydispersité (PDI) des NPs après le contact avec (c) HA et (d) Fbg.

Finalement, le Tableau V-1 montre les tailles et les valeurs de PDI pour les différents échantillons avant et après le contact avec les HA et les Fbg. Ces valeurs assurent la haute qualité d'empêchement de l'adsorption de la HA mais pas de la Fbg à la surface des nanoparticules

fonctionnalisées par P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}). La dispersion des NPs dans le milieu est malgré tout confirmées par les faibles valeurs PDI.

Protéine	Concentration (mg/mL)		Taille (nm)		Polydispersité (PDI)	
	HA	Fbg	HA	Fbg	HA	Fbg
Fe _{3-δ} O ₄ @ Silane	0	0	37±3	29±6	0.199±0.034	0.191±0.026
	0.5	0.5	27±4	23±5	0.267±0.012	0.355±0.010
	1	1	37±3	43±3	0.211±0.022	0.393±0.034
	2.5	2.5	40±3	40±4	0.182±0.063	0.325±0.040
	5	5	44±4	103±3	0.234±0.031	0.369±0.061
Fe _{3-δ} O ₄ @ P(MEO ₂ M ₆₅ -OEGMA ₃₅)	0	0	60±5	60±22	0.264±1E-3	0.241±0.013
	0.5	0.5	62±4	103±7	0.318±0.04	0.354±0.020
	1	1	59±3	107±9	0.298±0.02	0.337±0.030
	2.5	2.5	63±3	114±5	0.336±0.045	0.203±0.020
	5	5	61±4	110±2	0.317±0.041	0.361±0.030
Fe _{3-δ} O ₄ @ P(MEO ₂ M ₆₀ -OEGMA ₄₀)	0	0	86±5	83±15	0.228±0.03	0.222±0.030
	0.5	0.5	79±4	105±20	0.285±0.04	0.246±0.021
	1	1	82±4	111±8	0.367±0.07	0.237±0.072
	2.5	2.5	85±5	103±9	0.288±0.05	0.286±0.054
	5	5	90±3	100±10	0.282±0.09	0.357±0.041

Tableau V-1 : Données physico-chimiques des NPs avant et après le contact avec les protéines

5.3.4 Cinétique et mécanisme de la libération de la DOX après le contact avec les protéines

Dans l'introduction de ce Chapitre, nous avons cité des travaux qui ont montré que les protéines pouvaient diffuser au sein des chaînes de PEG et s'adsorber de manière stable.

De plus les études FT-IR n'ont pas montré d'adsorption franche de la HA mais ont confirmé l'adsorption de Fbg.

Dans le cadre de ce travail de thèse il n'a pas été possible d'étudier de manière approfondie le mécanisme de diffusion de la Fbg au sein des chaînes de polymère et mettre en évidence son interaction avec les chaînes de polymère. Par contre nous avons démontré que la DOX diffusait à l'intérieur des chaînes de polymère et interagissait via des interactions de type hydrogène avec les groupes éthylène-oxyde du polymère.

Concernant cette étude, nous nous sommes uniquement concentrés sur l'impact de la mise en contact avec la HA car c'est la protéine la plus abondante dans le corps et aussi pour une raison de temps pour la fin de la thèse. Une manière indirecte de mise en évidence de la diffusion de la HA et au sein des chaînes de polymère est donc l'étude de leur impact éventuel lorsque les nanoparticules sont mises par la suite en contact avec la DOX dans un milieu enrichi de HA ou Fbg. C'est pourquoi nous étudions dans la suite le mécanisme du relargage de la DOX et le comparons aux mécanismes décrits dans les chapitres précédents.

La Figure V- 8 montre que les NPs Fe_{3-δ}O₄ @ P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}) chargées en DOX et après le contact avec la HA (5 mg.mL⁻¹) pendant 2 heures présentent des propriétés de la libération soutenues dans DMEM avec de différentes vitesses de la libération en fonction de la température.

Sans une surprise, le processus de la libération à 37° C et 42°C pour les nanovecteurs après le contact avec 5mg.mL⁻¹ de HA est similaire à celle trouvée dans le Chapitre 3.

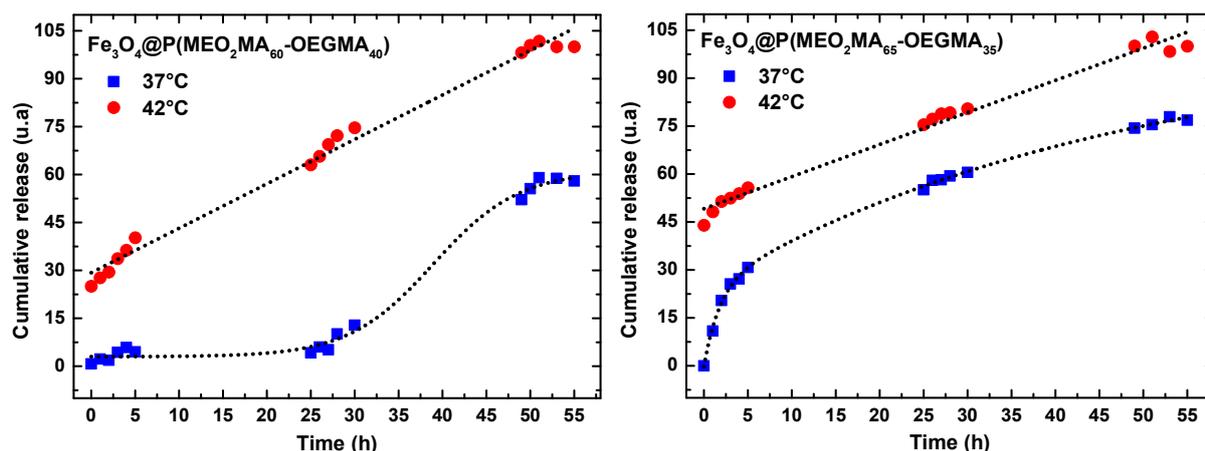


Figure V-8 : Libération de la DOX des NPs $\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ dans un milieu physiologique (DMEM) après le contact avec 5mg/mL de HA.

Pour s’assurer que nous avons toujours le même modèle cinétique de la libération avant et après le contact avec les protéines, nous avons déterminé les différents paramètres de la libération pour chaque modèle (K_1 , K_h , K_{kp} et n) qui sont présentés dans le tableau 2, ainsi que les valeurs de la corrélation (R^2) d’une part. Comme il est prévu, la cinétique de Higuchi et le modèle de Korsmeyer–Peppas ne cadrent pas bien avec les données expérimentales, alors que la cinétique du premier ordre semble toujours être le meilleur modèle pour la condition 37°C et le modèle d’ordre zéro reste destiné pour les résultats déterminés à $T=42^\circ\text{C}$.

Nano-objets	T°(C)	Zero Order		First Order		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
		K_1	R^2	K_1	R^2	K_h	R^2	K_{kp}	n	R^2
$\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$	37	1.1918	0.9539	0.0403	0.9987	0.1741	0.6320	0.2099	0.9970	0.8899
$\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$	37	1.0611	0.8994	0.0589	0.9934	0.8771	0.7591	0.7210	0.5917	0.7543
$\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$	42	1.0045	0.9922	0.0342	0.9881	0.4680	0.8209	0.6554	0.4551	0.8621
$\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$	42	1.3909	0.9974	0.0701	0.9912	0.9912	0.8729	0.5991	0.4713	0.8602

Tableau V-2. Données cinétiques de la libération de la DOX par les nanovecteurs NPs $\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4 @ P(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ après le contact avec 5mg mL⁻¹ de HA.

D’autre part, les valeurs de DLC (%) et le DLE (%) des nanosystèmes ont presque les mêmes valeurs trouvés pour les NPs $\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4 @ P(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ avant le contact avec les protéines (voir le Chapitre 3). En effet, 6.4 % et 55.2% pour les NPs $\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4 @ P(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$. A partir de ces résultats, nous avons la garantie que le contact avec 5mg.mL⁻¹ de HA n’a pas d’influence sur les propriétés de chargement et du relargage de la DOX de ce nanovecteur élaborées au cours de ce projet, ce qui tend à confirmer la non-adsorption de HA à la surface des nanoparticules répondantes. Finalement, pour assurer les performances de ces nanovecteurs dans le traitement du cancer, une étude d’internalisation après le contact avec 5 mg.mL⁻¹ de HA a été réalisée par un microscope confocal.

5.3.5 Etude de l’internalisation : Microscopie confocale

Les résultats physico-chimiques réalisées dans ce Chapitre permettent de valider le concept de la grande furtivité de ces NPs $\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4 @ P(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ élaboré au cours de ce projet. Dans le but de confirmer que ces nanovecteurs présentent toujours les mêmes performances vis-à-vis des SKOV-3, une étude d’internalisation a été faite par un microscope confocal. Les différents nanovecteurs $\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4 @ P(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ et $\text{Fe}_{3.8}\text{O}_4 @ P(\text{MEO}_2\text{M}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ chargé en DOX ont été testé avant et après le contact à une concentration de 5mg mL⁻¹ d’albumine humaine.

Les clichés de la microscopie confocale de la Figure V-9 montrent la localisation des NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ et NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ chargé en DOX dans les cellules SKOV-3 après 3 heures d'incubation, représentés par la fluorescence en rouge de la DOX. Les noyaux en bleu (après coloration avec le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, bleu)) nous permettent de localiser les noyaux des cellules (figure V-9).

Les NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ sont clairement internalisés dans les cellules et localisés autour des noyaux. Cette observation est également confirmée sur la reconstruction 3D (Figure V-9). De plus, les marges montrent que la DOX encapsulée dans les NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ est dans les noyaux cellulaires, ou des points rouges sont localisés sur les noyaux en bleu, ceci est dû probablement au milieu intracellulaire.

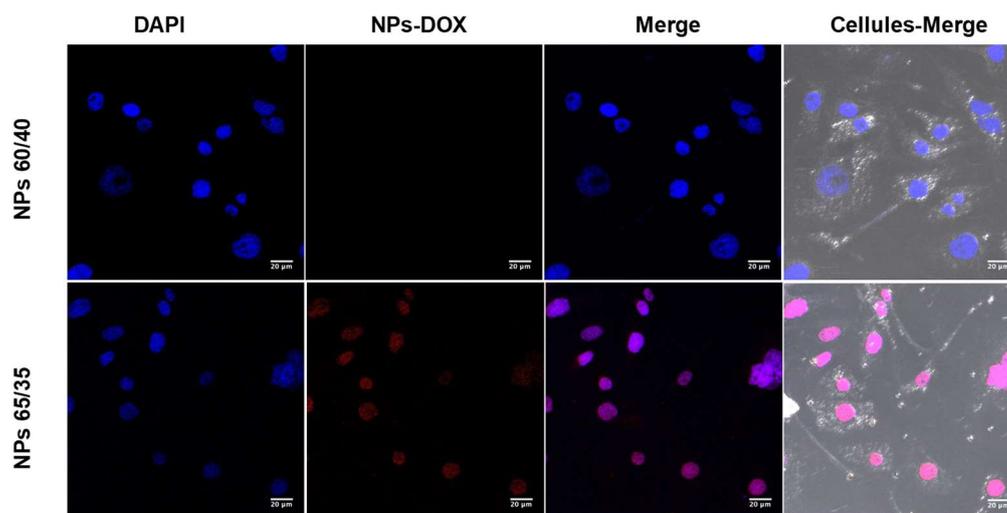


Figure V-9 : Les clichés de la microscopie confocale des cellules SKOV-3 traitées avec des $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ des NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ (NPs 60/40) et $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ (NPs 65/35) chargées en DOX après le contact avec 5mg mL^{-1} de HA. Marquage des noyaux avec DAPI (bleu)

La Figure V-10 montre des clichés de la microscopie confocale pour les NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ et NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ chargé en DOX après le contact avec d'albumine humaine. Ces différentes images montrent des nanoparticules chargées en DOX (colleur rouge) localisé au niveau des noyaux (bleu)^{23,24,25}. Une simple comparaison entre les images enregistrées pour les nanovecteurs avant le contact avec la HA et après permettent de confirmer l'absence de l'effet des formations des couronnes des protéines à la surface de ces nanovecteurs, ce qui permet de réduire leur internalisation dans les cellules. Cette étude sera assurée par une évaluation biologique vis-à-vis des SKOV-3. Ce point est développé dans des perspectives à court terme.

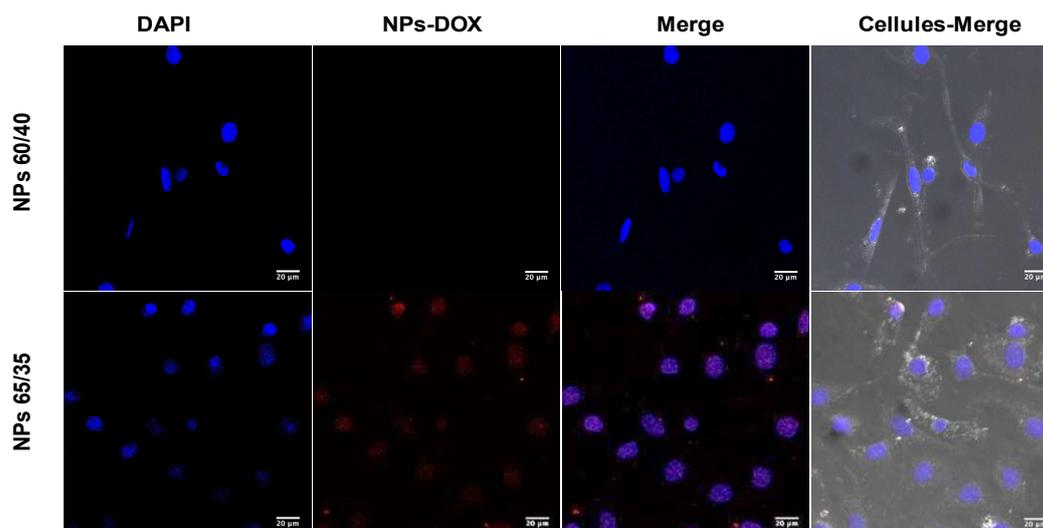


Figure V-10: Les clichés de la microscopie confocale des cellules SKOV-3 traitées avec des NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4$ @ $\text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ et $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4$ @ $\text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ chargées en DOX après le contact avec 5mg mL^{-1} de HA. Marquage des noyaux avec le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, bleu)

5.4 Conclusion

Les nanovecteurs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4$ @ $\text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ ont été synthétisés dans le deuxième Chapitre par la technique SI-ARGET ATRP en faisant croître les copolymères poly($\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X}$) à partir de la surface des NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4$.

Les propriétés de furtivité des $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4$ @ $\text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ ont été étudiées via leurs contacts avec des solutions enrichies en albumine humaine et de fibrinogène.

Les résultats physico-chimiques montrent que les nanoparticules modifiées à la surface par $\text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ n'affichent pas des signaux dus à la formation d'une couronne des protéines concernant la HA mais confirment l'adsorption du fibrinogène.

Les propriétés de la charge et du relargage de la DOX après le contact avec l'albumine humaine restent inchangées par rapport aux études des chapitres précédents. Ainsi une étude plus avancée par une microscopie confocale a confirmé l'internalisation de ces nanovecteurs avant et après le contact avec HA.

L'étude de l'impact du fibrinogène devra être menée et plus généralement les performances en tant qu'agent anti-cancer de ces nanovecteurs devront être élucidées. L'élucidation des mécanismes d'absorption des protéines par ces nanomatériaux greffés par des chaînes de copolymère répondant est un enjeu important pour la suite de ce travail afin d'améliorer la conception de ces objets nanoparticulaires pour la thérapie cancéreuse.

5.5 Références

- (1) Hamad, I.; Al-Hanbali, O.; Hunter, A. C.; Rutt, K. J.; Andresen, T. L.; Moghimi, S. M. Distinct Polymer Architecture Mediates Switching of Complement Activation Pathways at the Nanosphere–Serum Interface: Implications for Stealth Nanoparticle Engineering. *ACS Nano* **2010**, *4* (11), 6629–6638.
<https://doi.org/10.1021/nn101990a>.
- (2) Nel, A. E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano–Bio Interface. *Nat. Mater.* **2009**, *8* (7), 543–557.
<https://doi.org/10.1038/nmat2442>.
- (3) Banerjee, I.; Pangule, R. C.; Kane, R. S. Antifouling Coatings: Recent Developments in the Design of Surfaces That Prevent Fouling by Proteins, Bacteria, and Marine Organisms. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (6), 690–718.
<https://doi.org/10.1002/adma.201001215>.
- (4) Nir, S.; Reches, M. Bio-Inspired Antifouling Approaches: The Quest towards Non-Toxic and Non-Biocidal Materials. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *39*, 48–55.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.12.012>.
- (5) Aggarwal, P.; Hall, J. B.; McLeland, C. B.; Dobrovolskaia, M. A.; McNeil, S. E. Nanoparticle Interaction with Plasma Proteins as It Relates to Particle Biodistribution, Biocompatibility and Therapeutic Efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61* (6), 428–437.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.009>.
- (6) Müller, J.; Simon, J.; Rohne, P.; Koch-Brandt, C.; Mailänder, V.; Morsbach, S.; Landfester, K. Denaturation via Surfactants Changes Composition of Protein Corona. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (7), 2657–2664.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00278>.
- (7) Pelaz, B.; del Pino, P.; Maffre, P.; Hartmann, R.; Gallego, M.; Rivera-Fernández, S.; de la Fuente, J. M.; Nienhaus, G. U.; Parak, W. J. Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano* **2015**, *9* (7), 6996–7008.
<https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b01326>.
- (8) Rodríguez-Nogales, C.; González-Fernández, Y.; Aldaz, A.; Couvreur, P.; Blanco-Prieto, M. J. Nanomedicines for Pediatric Cancers. *ACS Nano* **2018**, *12* (8), 7482–7496.
<https://doi.org/10.1021/acs.nano.8b03684>.
- (9) Mani, G.; Kim, S.; Kim, K. Development of Folate-Thioglycolate-Gold Nanoconjugates by Using Citric Acid-PEG Branched Polymer for Inhibition of MCF-7 Cancer Cell Proliferation. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (8), 3257–3267.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00543>.
- (10) Winzen, S.; Schwabacher, J. C.; Müller, J.; Landfester, K.; Mohr, K. Small Surfactant Concentration Differences Influence Adsorption of Human Serum Albumin on Polystyrene Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2016**, *17* (11), 3845–3851.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01503>.
- (11) Guerrini, L.; Alvarez-Puebla, R.; Pazos-Perez, N. Surface Modifications of Nanoparticles for Stability in Biological Fluids. *Materials* **2018**, *11* (7), 1154.
<https://doi.org/10.3390/ma11071154>.
- (12) He, Q.; Zhang, J.; Shi, J.; Zhu, Z.; Zhang, L.; Bu, W.; Guo, L.; Chen, Y. The Effect of PEGylation of Mesoporous Silica Nanoparticles on Nonspecific Binding of Serum Proteins and Cellular Responses. *Biomaterials* **2010**, *31* (6), 1085–1092.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.046>.

- (13) Moros, M.; Pelaz, B.; López-Larrubia, P.; García-Martin, M. L.; Grazú, V.; de la Fuente, J. M. Engineering Biofunctional Magnetic Nanoparticles for Biotechnological Applications. *Nanoscale* **2010**, *2* (9), 1746.
<https://doi.org/10.1039/c0nr00104j>.
- (14) Rivera-Gil, P.; Jimenez De Aberasturi, D.; Wulf, V.; Pelaz, B.; Del Pino, P.; Zhao, Y.; De La Fuente, J. M.; Ruiz De Larramendi, I.; Rojo, T.; Liang, X.-J.; et al. The Challenge To Relate the Physicochemical Properties of Colloidal Nanoparticles to Their Cytotoxicity. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46* (3), 743–749.
<https://doi.org/10.1021/ar300039j>.
- (15) Sperling, R. A.; Liedl, T.; Duhr, S.; Kudera, S.; Zanella, M.; Lin, C.-A. J.; Chang, W. H.; Braun, D.; Parak, W. J. Size Determination of (Bio) Conjugated Water-Soluble Colloidal Nanoparticles: A Comparison of Different Techniques. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (31), 11552–11559.
<https://doi.org/10.1021/jp070999d>.
- (16) Deng, J.; Li, Z.; Yao, M.; Gao, C. Influence of Albumin Configuration by the Chiral Polymer-Grafted Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2016**, *32* (22), 5608–5616.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01447>.
- (17) Pelaz, B.; del Pino, P.; Maffre, P.; Hartmann, R.; Gallego, M.; Rivera-Fernández, S.; de la Fuente, J. M.; Nienhaus, G. U.; Parak, W. J. Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano* **2015**, *9* (7), 6996–7008.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01326>.
- (18) Walkey, C. D.; Olsen, J. B.; Guo, H.; Emili, A.; Chan, W. C. W. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (4), 2139–2147.
<https://doi.org/10.1021/ja2084338>.
- (19) Weiss, A. C. G.; Krüger, K.; Besford, Q. A.; Schlenk, M.; Kempe, K.; Förster, S.; Caruso, F. In Situ Characterization of Protein Corona Formation on Silica Microparticles Using Confocal Laser Scanning Microscopy Combined with Microfluidics. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (2), 2459–2469.
<https://doi.org/10.1021/acсами.8b14307>.
- (20) Anderson, C. R.; Gnopo, Y. D. M.; Gambinossi, F.; Mylon, S. E.; Ferri, J. K. Modulation of Cell Responses to Ag-(MeO₂ MA- Co -OEGMA): Effects of Nanoparticle Surface Hydrophobicity and Serum Proteins on Cellular Uptake and Toxicity: CELL RESPONSES TO POLYMERIC AgNPs. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2018**, *106* (4), 1061–1071.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36302>.
- (21) Nazarenus, M.; Zhang, Q.; Soliman, M. G.; del Pino, P.; Pelaz, B.; Carregal-Romero, S.; Rejman, J.; Rothen-Rutishauser, B.; Clift, M. J. D.; Zellner, R.; et al. In Vitro Interaction of Colloidal Nanoparticles with Mammalian Cells: What Have We Learned Thus Far? *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, *5*, 1477–1490.
<https://doi.org/10.3762/bjnano.5.161>.
- (22) Bernhard, C.; Bauer, K. N.; Bonn, M.; Wurm, F. R.; Gonella, G. Interfacial Conformation of Hydrophilic Polyphosphoesters Affects Blood Protein Adsorption. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (1), 1624–1629.
<https://doi.org/10.1021/acсами.8b17146>.
- (23) Zhang, H.; Wu, T.; Yu, W.; Ruan, S.; He, Q.; Gao, H. Ligand Size and Conformation Affect the Behavior of Nanoparticles Coated with in Vitro and in Vivo Protein Corona. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (10), 9094–9103.
<https://doi.org/10.1021/acсами.7b16096>.

- (24) Oh, J. Y.; Kim, H. S.; Palanikumar, L.; Go, E. M.; Jana, B.; Park, S. A.; Kim, H. Y.; Kim, K.; Seo, J. K.; Kwak, S. K.; et al. Cloaking Nanoparticles with Protein Corona Shield for Targeted Drug Delivery. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 4548.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-06979-4>.
- (25) Chen, C.; Sun, J.; Chen, S.; Liu, Y.; Zhu, S.; Wang, Z.; Chang, S. A Multifunctional-Targeted Nanoagent for Dual-Mode Image-Guided Therapeutic Effects on Ovarian Cancer Cells. *Int. J. Nanomedicine* **2019**, *Volume 14*, 753–769.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S187929>.

6 Synthèse

Le cancer est une maladie grave qui conduit chaque année une mortalité très élevée dans le monde entier^{1,2}. Et lutter contre cette maladie est donc une priorité en termes de la santé publique.

La chimiothérapie, la radiothérapie et la chirurgie sont à l'heure actuelle les méthodes les plus efficaces pour lutter contre cette maladie^{1,3,4}. De nos jours, les nanotechnologies ont permis le développement de nouveaux objets pour surmonter les limitations des méthodes conventionnelles de traitement. Les notions de « système intelligent » ou de « thérapie intelligente » sont donc apparues très rapidement, dans le but de contrôler et de cibler activement le relargage de principe actif, afin de minimiser les effets secondaires du traitement⁵⁻⁹.

Dans ce travail de thèse, nous avons donc développé de nouveaux systèmes thermo-répondants basés sur un cœur superparamagnétique (SPIOs – Superparamagnetic Particles of Iron Oxide) qui sont capables, à la fois, de transporter un principe actif anticancéreux, i.e. la doxorubicine (DOX) et de le relarguer dans le milieu physiologique à une température contrôlée¹⁰.

De plus, grâce aux propriétés d'hyperthermie magnétiques du cœur, il est largement possible d'envisager que ces objets puissent combiner un traitement par une hyperthermie et un relargage de la DOX (Figure 1).

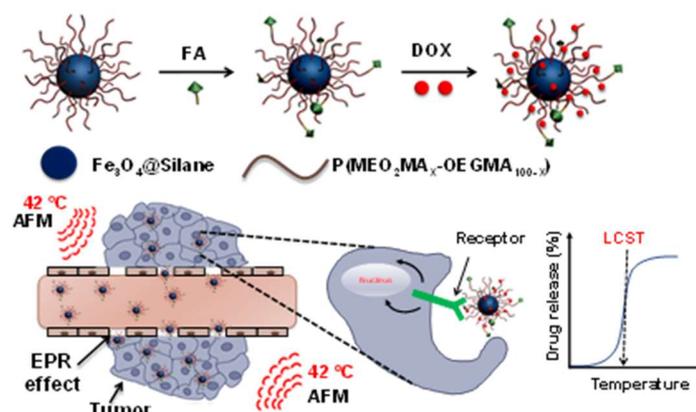


Figure 1 : Représentation générale du projet de la thèse

Après la mise au point de la synthèse et la caractérisation des nanoparticules (NPs) du type cœur/coquille superparamagnétiques dont le noyau est $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4$ greffées par un copolymère thermosensible, pour l'encapsulation et la libération d'un médicament.

Les propriétés fonctionnelles de ces nanomatériaux ont été obtenues en premier lieu par le greffage d'un copolymère bio-inerte et biocompatible contenant des segments oligo-(éthylène). Le copolymère choisi $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ est constitué du 2(2-méthoxy) éthyle méthacrylate (MEO_2MA) (en proportion X), oligo (éthylène glycol) méthacrylate (OEGMA) (en proportion $100-X$) car la valeur la plus basse de la température de la solubilisation critique (ou LCST pour Lower Critical Solution Temperature, représentant la température à partir de laquelle la conformation des chaînes change) peut être modulée en jouant sur la quantité de MEO_2MA et de OEGMA . Pour greffer le copolymère, le procédé de polymérisation choisi est la polymérisation radicalaire par un transfert d'atomes (ATRP), à travers les activateurs régénérés par un transfert d'électrons (ARGET), procédé

connu sous l'acronyme ARGET-ATRP¹⁰⁻¹⁵. Après la fonctionnalisation des NPs par un initiateur d'ATRP, le polymère va croître à partir de la surface des NPs par ARGET-ATRP. Le greffage covalent des copolymères a été confirmé par FT-IR. Par ailleurs, le caractère réversible d'une manière complètement réversible des systèmes a été démontré par DLS.

L'étude des capacités d'encapsulation et de la libération des systèmes développés dans le cadre de ce travail de thèse a été réalisée avec une molécule anti cancer modèle, la DOX, un médicament anti-cancéreux à l'indice thérapeutique élevé¹⁶. Le Tableau 1 montre que la DOX est bien encapsulée avec une DLC d'environ 7% et une efficacité (DLE) d'environ 50%. Il est important de noter que lorsque la DOX est incubée (pendant 2 h et dans DMAM), il a été observé par le DLS dans l'eau et dans le milieu physiologique, que le relargage a lieu à une température inférieure à la LCST. Ceci conduit à penser que lorsque la DOX est en contact avec les macromolécules, elle induit une déshydratation précoce des dernières et donc une transition prématurée.

L'évolution de la libération cumulative de médicaments par rapport aux temps pour les NPs de Fe_{3-δ}O₄@P(MEO₂MA_X-OEGMA_{100-X}) dans un milieu physiologique en dessous et au-dessus de la LCST (c'est à dire la température de la transition hydrophile/hydrophobe du nano-objet) a été étudiée par une telle méthode afin de déterminer les performances du relargage de ces nanovecteurs en fonction du temps avant et après dans l'éventualité d'une transposition vers l'industrie pharmaceutique.

Nanovecteurs	Perte de masse (%)	taille NPs (nm)	Dh(nm)	A(emu/g) 300K	LCST (l'eau) (°C)	LCST (MP) (°C)	DLC(%) / DLE(%)	SAR (W/g)(MP)	Réf
Fe _{3-δ} O ₄ non revêtues	0	9±1,2		80	---	---	---	106	---
Fe _{3-δ} O ₄ @Silane	10	10±1,4	25±5	77	---	---	---	---	---
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ M ₈₀ -OEGMA ₂₀)	38	10±0,5	47±8	38	33	31	---	---	---
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ M ₇₅ -OEGMA ₂₅)	35	10±1,1	58±5	35	38	36	---	---	---
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ M ₆₅ -OEGMA ₃₅)	43	11±0,7	69±8	32	41	38	5,9/50,8	45,7	---
Fe _{3-δ} O ₄ @P(MEO ₂ M ₆₀ -OEGMA ₄₀)	48	11±1	78±4	30	44	41	6,6/56,1	12,6	---
Fe ₃ O ₄ @ P(DEGMA-co-PEGMA-b-[TMSPPMA-co-VBA])	8,1	13± 2,2	120	75	28,8-39,9	---	7,6/82,3	47	[17]
P(MEO ₂ M-s-s-OEGMA15)	---	---	196	---	42.8	---	7,2/23,1	---	[18]
Fe ₂ O ₄ @P(DEGMEMA-co-OEGMEMA)	---	16	100	---	---	37/40	3,29/---	125	[19]
MagSi@Chi-g-NIPAAm	---	5-10	30-50	20,14	---	40	---/74,28	8,36	[20]
DOX-MMSN@P(NIPAM-co-MAA)	18.4	100-150	255±28	6	---	37-50	---	---	[21]
MMSN@PNIPAM-co-MPS	8,5	76	125	19,5	---	40	24/---	---	[22]
PLGA-DOX-PLU-OA-Fe ₃ O ₄	49.3	10.7	36.39	16.4	---	45-50 °C	8,1/89	---	[23]
DOX-AF-PNIPA-Fe ₃ O ₄	8,9	20-25	180	44	---	31	23/74,4	---	[24]

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques^{17, 18,19, 20, 21, 22, 23, 24} de différents nanovecteurs

Dans un deuxième temps, nous avons mis l'accent sur l'une des propriétés intéressantes de Fe_{3-δ}O₄ : l'hyperthermie magnétique. Dans cet objectif, nous avons démontré au cours de ce projet que ces nanovecteurs superparamagnétiques sont capables de générer localement de la chaleur permettant d'atteindre des températures de 41 et 44°C. Cette augmentation de la température présente un grand avantage pour nos nanovecteurs, d'une part on peut contrôler le relargage du principe actif par la génération de chaleur locale au voisinage de la LCST du copolymère, qui permet de passer de l'état hydrophile à celui d'hydrophobe, et d'autre part de traiter le cancer par une voie localisée thermique²⁵ (Figure 2). Plusieurs études ont montré l'efficacité de l'hyperthermie dans le traitement du cancer ; les cellules cancéreuses ont disparu presque complètement par une évolution de la température d'environ 43 et 45°C^{26,27}.

Les valeurs d'ILP pour nos nanovecteurs sont dans les normes par rapport aux valeurs bibliographiques des ferrofluides disponibles sur le marché [les valeurs d'ILP varient de 0,15 nHm² K⁻¹ à 3,1 nHm² K^{28,29}], « article paru : Doxorubicin Loaded Thermo-responsive Superparamagnetic Nanocarriers for Controlled Drug Delivery and Magnetic Hyperthermia Applications ».

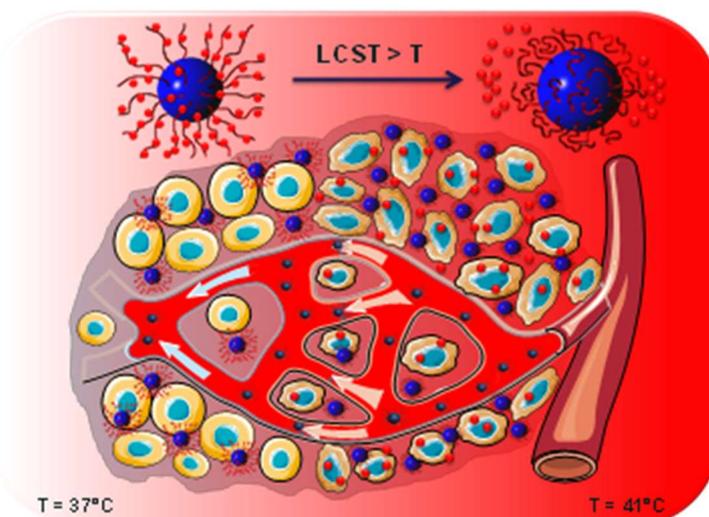


Figure 2 : Contrôle du relargage des NPs chargée en DOX en fonction de LCST.

Afin d'étudier les performances biologiques de ces nanovecteurs, des tests de cytotoxicité sur HT29 et SKOV-3 ont été effectués. Les résultats ont montré que les nanostructures magnétiques ont une cytotoxicité dépendante de la concentration. Les NPs cœur/coquille magnétiques ont une cytotoxicité limitée jusqu'à $12.5\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ces NPs présentent une compatibilité favorable pour des applications biomédicales. Afin d'évaluer l'efficacité cytotoxique de ces NPs chargées en DOX, un test de la viabilité a été réalisé. Toutes les expériences ont été effectuées à 37°C et à 41°C dans le milieu de la culture des cellules SKOV-3 pendant 5 heures, (pour limiter l'impact de la température sur la viabilité des cellules).

Le Tableau 2 présente la valeur de la viabilité des cellules de la DOX relarguée par $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nanovecteurs d'environ 37%. Cependant pour la DOX libre, la viabilité est tombée autour de 50% pour la même concentration ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Une telle haute activité cytotoxique des nanovecteurs par rapport à la DOX libre et des nanovecteurs dans d'autres travaux (Tableau 2) est attribuée généralement aux propriétés physico-chimiques (Taille, forme, PDI etc...) qui permettent de créer une forte internalisation des NPs dans les cellules^{30,31}.

Nous avons vérifié cette hypothèse par une étude d'internalisation à l'aide de la microscopie à fluorescence et confocale, qui montrent que les NPs entrent entières dans les cellules (autour des noyaux) puis elles libèrent la DOX à l'intérieur, ce qui a été démontré par d'autres travaux^{32,33}.

Nanovecteurs	[NPs]/[PA] ($\mu\text{g/mL}$)	Temps de traitement	Viabilité (%)	Viabilité (%) (chargée en PA)	Réf
$\text{Fe}_{3-6}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$	12,5	5 heures	100 ± 7	32 ± 4	---
$\text{Fe}_{3-6}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$	12,5	5 heures	100 ± 5	25 ± 3	---
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu@PLA-PEG-AF}$	500	72 heures	90 ± 4	8 ± 3	[32]
5FU-FA-TGA-AuNPs	200	3 jours	100 ± 2	$2 \pm 0,5$	[33]
$\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{Au-DOX-mPEG/PEG-AF}$	10	48 heure	100 ± 3	37 ± 5	[34]
DOX-MagSi@Chi-g-NIPAAm	500	24 heure	60 ± 2	2	[20]
DOX-MMSN@P(NIPAM-co-MAA)	100	8 heure	95 ± 20	20 ± 8	[21]
DOX-AF-Poly-MFNPs	25	24 heure	90	20	[35]
$4s[\text{PCL-b-2s}(\text{P}(\text{NIPAAm-co-AAm})\text{-b-MPEG/PEG-AF})]$	20	24 heure	100	10	[36]
DOX-AF-PNIPA- Fe_3O_4	100	24 heure	100 ± 7	18	[24]
R11-PAC- Fe_3O_4	500	24 heure	90 ± 5	40 ± 10	[37]

Tableau 2 : Données toxico-cinétiques des nanovecteurs^{32,33,34, 20, 21, 35, 36, 24, 37}. (Principe actif (PA))

Dans le but d'améliorer cette activité cytotoxique des nanovecteurs et d'augmenter la concentration des NPs internalisées dans la cellule une modification par l'AF a été effectuée ; les récepteurs du type FR- α sont surexprimés à la surface des cellules cancéreuses (SKOV-3). Ainsi ces NPs peuvent être dirigées spécifiquement sur les cellules cancéreuses (Figure 3). Plusieurs molécules ont été déjà utilisées pour la vectorisation d'une molécule du ciblage, l'AF^{38,39,40}.

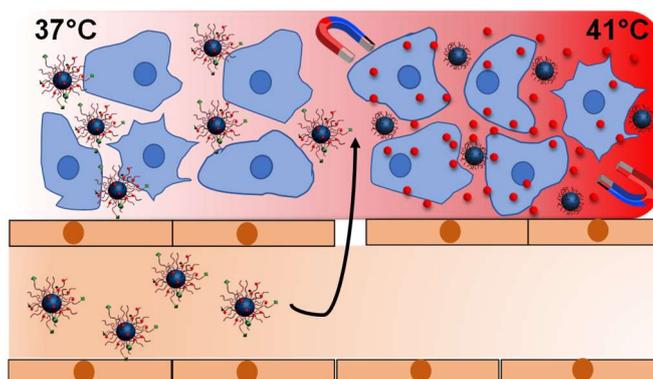


Figure 3 : Ciblage actif des NPs-AF vis-à-vis SKOV-3

Le greffage de l'AF sur les NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ a été vérifié avec FT-IR. Ensuite des tests d'internalisation ont été réalisés avec les NPs avec et avec l'AF. L'analyse par la microscopie à fluorescence et par la microscopie confocale ont révélé que le taux d'internalisation décroît pour les NPs sans l'AF par rapport aux NPs avec l'AF « articles en cours de la rédaction, titre : Development of Folate-Superparamagnetic Nanoconjugates by Using Copolymer Thermosensible for Inhibition of Cancer Cell Proliferation ».

Cette observation est en accord avec des études précédentes faisant intervenir un ciblage actif dans les formulations (cf. introduction générale^{41,42,43}). En augmentant l'interaction avec les cellules, les NPs avec l'AF affichent une meilleure activité cytotoxique par rapport aux NPs sans l'AF et à la DOX libre. Pour optimiser l'action de ces molécules du ciblage, il est envisageable :

- i) d'augmenter leur pourcentage sur la surface des $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$
- ii) d'introduire d'autres molécules plus affines (ex : les aptamères, les anticorps...) ^{44,45}.

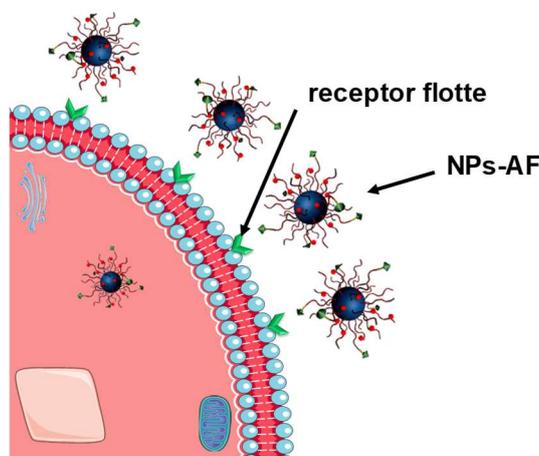


Figure 4 : Mécanisme de l'internalisation de NPs -AF dans la cellule.

Avant de traduire ces nanovecteurs *in vivo*, une étude d'absorption de protéines à la surface des NPs a été réalisée *in vitro*. A cet effet, nous avons étudié l'absorption de protéines sur ces nanoformulations. Nous avons utilisé deux protéines pour notre étude: l'albumine humaine (HA) et le fibrinogène (Fbg). L'albumine est la protéine la plus abondante dans le sérum sanguin et constitue donc le principal type de protéines adsorbé à la surface des NPs⁴⁶. L'interaction de l'albumine, du fibrinogène et des NPs Fe_{3-δ}O₄ greffés avec du silane (NH₂) ou P (MEO₂MA_X-OEGMA_{100-X}) a été étudiée en utilisant la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la spectroscopie de rayons X à la dispersion d'énergie (EDS) et des mesures par la spectroscopie infrarouge. Les résultats physico-chimiques montrent que les NPs modifiées à la surface par P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}) n'affichent pas des signaux dus à la formation d'une couronne de protéines pour l'albumine, mais pas dans le cas du Fbg. Ainsi une étude plus avancée par une microscopie confocale a confirmé l'internalisation de ces nanovecteurs avant et après le contact avec la HA.

Ces matériaux appartiennent à la famille connue des nanovecteurs de quatrième génération car ils sont capables de s'approcher d'une façon sélective de la cellule, de pénétrer à l'intérieur des cellules et d'y délivrer le principe actif.

A l'heure actuelle ces nanovecteurs de quatrième génération sont essentiellement obtenus par l'utilisation d'une couronne du type poly (éthylène glycol) (PEG) qui est par la suite fonctionnalisée par des ligands spécifiques.

Les NPs que nous avons développées sont essentiellement constituées d'une couronne à base du copolymère MOE₂MA et OEGMA (copolymère biocompatible et qui possède des propriétés de la furtivité et du greffage sur les nanoparticules) sont plus aisées que la mise en œuvre d'un autre polymère (PEG) classiquement mis en œuvre dans la littérature, ce qui simplifie le procédé de la synthèse.

Enfin une transposition de ces études vers des ligands très spécifiques (ARN, peptides) et vers des cellules cancéreuses très résistantes aux traitements actuels (glandes surrénales, foie, poumon) pourra être envisagée à la suite de ce projet.

6.1 Références

- (1) Vergote, I.; Amant, F.; Kristensen, G.; Ehlen, T.; Reed, N. S.; Casado, A. Primary Surgery or Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Interval Debulking Surgery in Advanced Ovarian Cancer. *European Journal of Cancer* **2011**, *47*, S88–S92.
[https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(11\)70152-6](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(11)70152-6).
- (2) Eisenkop, S. M.; Spirtos, N. M.; Lin, W.-C. M. “Optimal” Cytoreduction for Advanced Epithelial Ovarian Cancer: A Commentary. *Gynecologic Oncology* **2006**, *103* (1), 329–335.
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.07.004>.
- (3) Bhide, S.; Nutting, C. Recent Advances in Radiotherapy. *BMC Medicine* **2010**, *8* (1), 25.
<https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-25>.
- (4) Moghissi, K.; Parsons, R. J.; Dixon, K. Photodynamic Therapy (PDT) for Bronchial Carcinoma with the Use of Rigid Bronchoscope. *Lasers in Medical Science* **1992**, *7* (1–4), 381–385.
<https://doi.org/10.1007/BF02594076>.
- (5) Coates, A.; Abraham, S.; Kaye, S. B.; Sowerbutts, T.; Frewin, C.; Fox, R. M.; Tattersall, M. H. N. On the Receiving End—Patient Perception of the Side-Effects of Cancer Chemotherapy. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* **1983**, *19* (2), 203–208.
[https://doi.org/10.1016/0277-5379\(83\)90418-2](https://doi.org/10.1016/0277-5379(83)90418-2).
- (6) Rodríguez-Nogales, C.; González-Fernández, Y.; Aldaz, A.; Couvreur, P.; Blanco-Prieto, M. J. Nanomedicines for Pediatric Cancers. *ACS Nano* **2018**, *12* (8), 7482–7496.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.8b03684>.
- (7) Hervault, A.; Dunn, A. E.; Lim, M.; Boyer, C.; Mott, D.; Maenosono, S.; Thanh, N. T. K. Doxorubicin Loaded Dual PH- and Thermo-Responsive Magnetic Nanocarrier for Combined Magnetic Hyperthermia and Targeted Controlled Drug Delivery Applications. *Nanoscale* **2016**, *8* (24), 12152–12161.
<https://doi.org/10.1039/C5NR07773G>.
- (8) Quinto, C. A.; Mohindra, P.; Tong, S.; Bao, G. Multifunctional Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Combined Chemotherapy and Hyperthermia Cancer Treatment. *Nanoscale* **2015**, *7* (29), 12728–12736.
<https://doi.org/10.1039/C5NR02718G>.
- (9) Oh, J. Y.; Kim, H. S.; Palanikumar, L.; Go, E. M.; Jana, B.; Park, S. A.; Kim, H. Y.; Kim, K.; Seo, J. K.; Kwak, S. K.; et al. Cloaking Nanoparticles with Protein Corona Shield for Targeted Drug Delivery. *Nature Communications* **2018**, *9* (1), 4548.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-06979-4>.
- (10) Ferjaoui, Z.; Schneider, R.; Meftah, A.; Gaffet, E.; Alem, H. Functional Responsive Superparamagnetic Core/Shell Nanoparticles and Their Drug Release Properties. *RSC Advances* **2017**, *7* (42), 26243–26249.
<https://doi.org/10.1039/C7RA02437A>.
- (11) Milichko, V. A.; Nechaev, A. I.; Valtsifer, V. A.; Strelnikov, V. N.; Kulchin, Y. N.; Dzyuba, V. P. Photo-Induced Electric Polarizability of Fe₃O₄ Nanoparticles in Weak Optical Fields. *Nanoscale Research Letters* **2013**, *8* (1), 317.
<https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-317>.
- (12) Maity, D.; Agrawal, D. C. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles under Oxidizing Environment and Their Stabilization in Aqueous and Non-Aqueous Media. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, *308* (1), 46–55.
<https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.05.001>.
- (13) Mascolo, M.; Pei, Y.; Ring, T. Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large PH Window with Different Bases. *Materials* **2013**, *6* (12), 5549–5567.
<https://doi.org/10.3390/ma6125549>.

- (14) Ali, A.; Zafar, H.; Zia, M.; ul Haq, I.; Phull, A. R.; Ali, J. S.; Hussain, A. Synthesis, Characterization, Applications, and Challenges of Iron Oxide Nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications* **2016**, Volume 9, 49–67.
<https://doi.org/10.2147/NSA.S99986>.
- (15) Jamal Al Dine, E.; Ferjaoui, Z.; Ghanbaja, J.; Roques-Carmes, T.; Meftah, A.; Hamieh, T.; Toufaily, J.; Schneider, R.; Marchal, S.; Gaffet, E.; et al. Thermo-Responsive Magnetic Fe₃O₄@P(MEO 2 MA X -OEGMA 100-X) NPs and Their Applications as Drug Delivery Systems. *International Journal of Pharmaceutics* **2017**, 532 (2), 738–747.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.019>.
- (16) Kaminskas, L. M.; McLeod, V. M.; Kelly, B. D.; Sberna, G.; Boyd, B. J.; Williamson, M.; Owen, D. J.; Porter, C. J. H. A Comparison of Changes to Doxorubicin Pharmacokinetics, Antitumor Activity, and Toxicity Mediated by PEGylated Dendrimer and PEGylated Liposome Drug Delivery Systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2012**, 8 (1), 103–111.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.013>.
- (17) Hervault, A.; Dunn, A. E.; Lim, M.; Boyer, C.; Mott, D.; Maenosono, S.; Thanh, N. T. K. Doxorubicin Loaded Dual PH- and Thermo-Responsive Magnetic Nanocarrier for Combined Magnetic Hyperthermia and Targeted Controlled Drug Delivery Applications. *Nanoscale* **2016**, 8 (24), 12152–12161.
<https://doi.org/10.1039/C5NR07773G>.
- (18) Mai, B. T.; Balakrishnan, P. B.; Barthel, M. J.; Piccardi, F.; Niculaes, D.; Marinaro, F.; Fernandes, S.; Curcio, A.; Kakwere, H.; Autret, G.; et al. Thermoresponsive Iron Oxide Nanocubes for an Effective Clinical Translation of Magnetic Hyperthermia and Heat-Mediated Chemotherapy. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2019**, 11 (6), 5727–5739.
<https://doi.org/10.1021/acsami.8b16226>.
- (19) Tian, Y.; Bian, S.; Yang, W. A Redox-Labile Poly(Oligo(Ethylene Glycol)Methacrylate)-Based Nanogel with Tunable Thermosensitivity for Drug Delivery. *Polymer Chemistry* **2016**, 7 (10), 1913–1921.
<https://doi.org/10.1039/C6PY00057F>.
- (20) Pon-On, W.; Tithito, T.; Maneeprakorn, W.; Phenrat, T.; Tang, I.-M. Investigation of Magnetic Silica with Thermoresponsive Chitosan Coating for Drug Controlled Release and Magnetic Hyperthermia Application. *Materials Science and Engineering: C* **2019**, 97, 23–30.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.076>.
- (21) Tian, Z.; Yu, X.; Ruan, Z.; Zhu, M.; Zhu, Y.; Hanagata, N. Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles Coated with Thermo-Responsive Copolymer for Potential Chemo- and Magnetic Hyperthermia Therapy. *Microporous and Mesoporous Materials* **2018**, 256, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.07.053>.
- (22) Peralta, M. E.; Jadhav, S. A.; Magnacca, G.; Scalarone, D.; Mártire, D. O.; Parolo, M. E.; Carlos, L. Synthesis and in Vitro Testing of Thermoresponsive Polymer-Grafted Core-Shell Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles for Efficient Controlled and Targeted Drug Delivery. *Journal of Colloid and Interface Science* **2019**, 544, 198–205.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.02.086>.
- (23) Andhariya, N.; Chudasama, B.; Mehta, R. V.; Upadhyay, R. V. Biodegradable Thermoresponsive Polymeric Magnetic Nanoparticles: A New Drug Delivery Platform for Doxorubicin. *J Nanopart Res* **2011**, 13 (4), 1677–1688.
<https://doi.org/10.1007/s11051-010-9921-6>.
- (24) Sahoo, B.; Devi, K. S. P.; Banerjee, R.; Maiti, T. K.; Pramanik, P.; Dhara, D. Thermal and PH Responsive Polymer-Tethered Multifunctional Magnetic Nanoparticles for Targeted Delivery of Anticancer Drug. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5 (9), 3884–3893.
<https://doi.org/10.1021/am400572b>.

- (25) Dormann, J. L. Le Phénomène de Superparamagnétisme. *Revue de Physique Appliquée* **1981**, *16* (6), 275–301.
<https://doi.org/10.1051/rphysap:01981001606027500>.
- (26) Kallumadil, M.; Tada, M.; Nakagawa, T.; Abe, M.; Southern, P.; Pankhurst, Q. A. Suitability of Commercial Colloids for Magnetic Hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2009**, *321* (10), 1509–1513.
<https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2009.02.075>.
- (27) Blanco-Andujar, C.; Ortega, D.; Southern, P.; Pankhurst, Q. A.; Thanh, N. T. K. High Performance Multi-Core Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia: Microwave Synthesis, and the Role of Core-to-Core Interactions. *Nanoscale* **2015**, *7* (5), 1768–1775.
<https://doi.org/10.1039/C4NR06239F>.
- (28) Blanco-Andujar, C.; Ortega, D.; Southern, P.; Pankhurst, Q. A.; Thanh, N. T. K. High Performance Multi-Core Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia: Microwave Synthesis, and the Role of Core-to-Core Interactions. *Nanoscale* **2015**, *7* (5), 1768–1775.
<https://doi.org/10.1039/C4NR06239F>.
- (29) Dunn, A. E.; Dunn, D. J.; Macmillan, A.; Whan, R.; Stait-Gardner, T.; Price, W. S.; Lim, M.; Boyer, C. Spatial and Temporal Control of Drug Release through PH and Alternating Magnetic Field Induced Breakage of Schiff Base Bonds. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (10), 3311–3315.
<https://doi.org/10.1039/C4PY00150H>.
- (30) Sene, S.; Marcos-Almaraz, M. T.; Menguy, N.; Scola, J.; Volatron, J.; Rouland, R.; Grenèche, J.-M.; Miraux, S.; Menet, C.; Guillou, N.; et al. Maghemite-NanoMIL-100(Fe) Bimodal Nanovector as a Platform for Image-Guided Therapy. *Chem* **2017**, *3* (2), 303–322.
<https://doi.org/10.1016/j.chempr.2017.06.007>.
- (31) Terracciano, M.; Shahbazi, M.-A.; Correia, A.; Rea, I.; Lamberti, A.; De Stefano, L.; Santos, H. A. Surface Bioengineering of Diatomite Based Nanovectors for Efficient Intracellular Uptake and Drug Delivery. *Nanoscale* **2015**, *7* (47), 20063–20074.
<https://doi.org/10.1039/C5NR05173H>.
- (32) Chen, H.; He, S. PLA–PEG Coated Multifunctional Imaging Probe for Targeted Drug Delivery. *Molecular Pharmaceutics* **2015**, *12* (6), 1885–1892.
<https://doi.org/10.1021/mp500512z>.
- (33) Mani, G.; Kim, S.; Kim, K. Development of Folate-Thioglycolate-Gold Nanoconjugates by Using Citric Acid-PEG Branched Polymer for Inhibition of MCF-7 Cancer Cell Proliferation. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (8), 3257–3267. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00543>.
- (34) S., R.; M., P. Multi-Functional Core-Shell Fe₃O₄@Au Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, *174*, 252–259.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.004>.
- (35) Bhattacharya, D.; Behera, B.; Sahu, S. K.; Ananthakrishnan, R.; Maiti, T. K.; Pramanik, P. Design of Dual Stimuli Responsive Polymer Modified Magnetic Nanoparticles for Targeted Anti-Cancer Drug Delivery and Enhanced MR Imaging. *New J. Chem.* **2016**, *40* (1), 545–557.
<https://doi.org/10.1039/C5NJ02504D>.
- (36) Rezaei, S. J. T.; Nabid, M. R.; Niknejad, H.; Entezami, A. A. Folate-Decorated Thermoresponsive Micelles Based on Star-Shaped Amphiphilic Block Copolymers for Efficient Intracellular Release of Anticancer Drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, *437* (1–2), 70–79.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.069>.
- (37) Sundaresan, V.; Menon, J. U.; Rahimi, M.; Nguyen, K. T.; Wadajkar, A. S. Dual-Responsive Polymer-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Drug Delivery and Imaging Applications. *International Journal of Pharmaceutics* **2014**, *466* (1–2), 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.016>.

- (38) Zhang, H.; Li, J.; Hu, Y.; Shen, M.; Shi, X.; Zhang, G. Folic Acid-Targeted Iron Oxide Nanoparticles as Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging of Human Ovarian Cancer. *Journal of Ovarian Research* **2016**, *9* (1).
<https://doi.org/10.1186/s13048-016-0230-2>.
- (39) Cao, Y.; He, J.; Liu, J.; Zhang, M.; Ni, P. Folate-Conjugated Polyphosphoester with Reversible Cross-Linkage and Reduction Sensitivity for Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2018**, *10* (9), 7811–7820.
<https://doi.org/10.1021/acsami.7b18887>.
- (40) Kaaki, K.; Hervé-Aubert, K.; Chiper, M.; Shkilnyy, A.; Soucé, M.; Benoit, R.; Paillard, A.; Dubois, P.; Saboungi, M.-L.; Chourpa, I. Magnetic Nanocarriers of Doxorubicin Coated with Poly(Ethylene Glycol) and Folic Acid: Relation between Coating Structure, Surface Properties, Colloidal Stability, and Cancer Cell Targeting. *Langmuir* **2012**, *28* (2), 1496–1505.
<https://doi.org/10.1021/la2037845>.
- (41) Luong, D.; Sau, S.; Kesharwani, P.; Iyer, A. K. Polyvalent Folate-Dendrimer-Coated Iron Oxide Theranostic Nanoparticles for Simultaneous Magnetic Resonance Imaging and Precise Cancer Cell Targeting. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (4), 1197–1209.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01885>.
- (42) Lin, W. J.; Liu. Polymeric Nanoparticles Conjugate a Novel Heptapeptide as an Epidermal Growth Factor Receptor-Active Targeting Ligand for Doxorubicin. *International Journal of Nanomedicine* **2012**, 4749.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S32830>.
- (43) Vassie, J. A.; Whitelock, J. M.; Lord, M. S. Targeted Delivery and Redox Activity of Folic Acid-Functionalized Nanoceria in Tumor Cells. *Molecular Pharmaceutics* **2018**, *15* (3), 994–1004.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00920>.
- (44) Sakhtianchi, R.; Atyabi, F.; Yousef, P.; Vasheghani-Farahani, E.; Movahedi, M.; Dinarvand, R. Targeted Delivery of Doxorubicin-Utilizing Chitosan Nanoparticles Surface-Functionalized with Anti-Her2 Trastuzumab. *International Journal of Nanomedicine* **2011**, 1977.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S21523>.
- (45) Iyer, A. K.; Khaled, G.; Fang, J.; Maeda, H. Exploiting the Enhanced Permeability and Retention Effect for Tumor Targeting. *Drug Discovery Today* **2006**, *11* (17–18), 812–818.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.07.005>.
- (46) Deng, J.; Li, Z.; Yao, M.; Gao, C. Influence of Albumin Configuration by the Chiral Polymer-Grafted Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2016**, *32* (22), 5608–5616.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01447>.

7 Conclusion Générale

Tout au long de ce doctorat, nous avons développé une nouvelle formulation capable de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses (SKOV-3). Les caractéristiques physico-chimiques des nanovecteurs issues de ce travail pourraient contribuer à l'amélioration de l'index thérapeutique : réduire les effets secondaires et augmenter l'efficacité de la DOX.

Ce travail est divisé en quatre étapes :

- ✓ L'élaboration et la caractérisation physico-chimique des NPs du type cœur/coquille et l'étude de ces nanosystèmes.
- ✓ Etude *in vitro* des nanovecteurs magnétiques pour la délivrance de la DOX sur les cellules SKOV-3 et HT 29
- ✓ Evaluation *in vitro* des nanovecteurs de la quatrième génération modifiée par une molécule de ciblage vis-à-vis des cellules du type SKOV-3
- ✓ Evaluation *in vitro* des propriétés de la furtivité des nanomatériaux

7.1 L'élaboration et la caractérisation physico-chimique des NPs du type cœur/coquille et l'étude de ces nanosystèmes:

Des NPs ont été élaborées avec une nouvelle formulation. Une fois que le cœur des NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ est formé par une première monocouche du silane, une modification par un copolymère thermosensible $\text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ a été réalisée. Le procédé de la polymérisation choisi est fondé sur la polymérisation radicalaire par un transfert d'atomes (ATRP), à travers les activateurs régénérés par un transfert d'électrons (ARGET), connus sous l'acronyme ARGET-ATRP. La caractérisation complète de ces NPs magnétiques cœur/coquille a été réalisée en combinant des méthodes spectroscopiques pour la caractérisation chimique (Transformée de Fourier infrarouge (FT-IR), et les mesures UV). Leur microstructure a été déterminée par une microscopie électronique à la transmission (MET) ainsi que des mesures DRX (diffraction des rayons X). L'influence de la composition du copolymère et les propriétés magnétiques ont été étudiées à des différentes températures. Ces différentes techniques montrent que nous avons élaboré des NPs du type cœur/coquille des performances importantes dans la charge du principe actif. Finalement, une étude des capacités d'encapsulation et de la libération de la doxorubicine des systèmes à cœur/coquille a été réalisée. Cette étude affirme que nous avons bien contrôlé le relargage de la DOX en fonction de la température à partir de ces nanovecteurs.

7.2 Etude *in vitro* des nanovecteurs magnétiques pour la délivrance de la DOX sur les cellules SKOV-3 et HT 29

La deuxième partie présente une étude approfondie des nano-objets superparamagnétiques et thermosensibles qui affichent une LCST au-dessus de 37°C . En effet, ces NPs sont utilisées comme des nanovecteurs pour la délivrance des médicaments vis-à-vis des cellules cancéreuses. La cinétique de la libération du médicament a été étudiée en fonction de la température et dans le MP. Le relargage est observé autour de 42°C , avec une libération cumulative de la DOX d'environ 100 % en 52 heures. Nous pourrions également montrer que les NPs magnétiques chargées du principe actif présentent des propriétés d'hyperthermie, exprimées par la chaleur délivrée par les NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ lorsqu'un champ magnétique alternatif est appliqué. Cette étude montre que les NPs $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ peuvent augmenter la température localement d'une gamme de 41 à 45°C . Les résultats de la cytotoxicité ont montré que les NPs avaient une cytotoxicité limitée jusqu'à une concentration de 12 mg mL^{-1} vis-à-vis des lignées de cancer HT29. Cependant, une fois chargés avec la DOX, les nano-objets sont beaucoup plus cytotoxiques envers ces cellules que la DOX libre.

7.3 Evaluation *in vitro* des nanovecteurs de la quatrième génération modifiée par une molécule du ciblage vis-à-vis des cellules du type SKOV-3

Dans une troisième partie, nous avons préparé des nanosystèmes intelligents fonctionnalisés avec une molécule du ciblage « acide folique ». Ces nanovecteurs ont été conçus de telle sorte à pouvoir cibler d'une manière active les cellules cancéreuses SKOV-3. Nous avons montré que l'internalisation cellulaire des NPs fonctionnalisées avec ces ligands était meilleure qu'en l'absence de ligands sur une lignée cancéreuse SKOV-3. Nous avons également mis en évidence que l'internalisation des nanovecteurs était médiée par l'interaction entre le ligand et son récepteur. Finalement, le couplage de la chimiothérapie ciblée avec la thérapie hyperthermique peut être envisagé pour cette nouvelle formulation.

7.4 Evaluation *in vitro* des propriétés de la furtivité des nanomatériaux

Leurs propriétés de la furtivité ont été étudiées par leurs contacts avec l'albumine humaine (HA) et le fibrinogène (Fbg). Les résultats physico-chimiques montrent que les NPs modifiées à la surface par P(MEO₂M_X-OEGMA_{100-X}) n'affichent pas des signaux qui indiquent la formation d'une couronne de protéines. Ces premières, permettent de présenter un autre avantage pour traduire ces nanovecteurs des évaluations biologiques *in vivo*.

8 Perspectives

La vectorisation de la DOX via des NPs à base d'oxyde de fer est réalisée en deux étapes complémentaires. Dans un premier temps, on s'intéresse à l'élaboration et à la caractérisation physico-chimique des premières formulations des NPs du type cœur/coquille. En effet, une étude dans la charge et le contrôle de la libération du principe actif a été réalisée. Au terme de cette étude, une meilleure formulation (stabilité, contrôle de la libération et de la toxicité...) est sélectionnée puis évaluée *in vitro*. Selon les résultats obtenus de cette dernière étape, le cycle (la caractérisation physico-chimique, l'étude de la cinétique du relargage de la DOX, hyperthermie et l'évaluation *in vitro*) est ensuite renouvelé avec de nouvelles formulations élaborées avec une molécule du ciblage « acide folique » dans le but d'améliorer l'activité des premiers systèmes développés.

Ces mêmes étapes permettent d'envisager des perspectives à court (1 an) et à moyen termes (3 ans) suivantes :

A court terme (un an)

a) Trois pistes sont envisagées pour élaborer de nouvelles formulations afin d'améliorer l'activité anti tumorale des nanovecteurs et d'augmenter leur accumulation dans les tumeurs

i) Les résultats préliminaires des nouvelles formulations $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ -AF nous encouragent à caractériser la stabilité et l'internalisation puis à trouver le pourcentage optimal de $\text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$ de ces NPs.

ii) le ciblage actif : outre l' AF, une molécule du ciblage (anticorps) sera greffée sur la surface des $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_X\text{-OEGMA}_{100-X})$.

iii) l'insertion d'une deuxième drogue 5-Fluoro-Uracile (5-FU) : la stabilité et le taux du chargement en drogue des NPs seront caractérisées.

b) Des études *in vitro* de ces nouvelles formulations seront réalisées. Ces études visent à évaluer l'activité cytotoxique, à inhiber les résistances et à définir le taux d'internalisation. Les cellules qui expriment ou pas les récepteurs ciblés seront utilisés comme des modèles.

c) Ces études physico-chimiques et *in vitro* nous permettront de sélectionner des formulations qui présenteront une meilleure stabilité dans le milieu biologique, une activité cytotoxique plus efficace, une internalisation plus importante et une inhibition complète des résistances. Ces formulations seront ensuite évaluées *in vivo* (l'activité anti tumorale et la bio distribution)

A moyen terme (trois ans)

Des études *in vitro* fondamentales seront réalisées. En effet, plusieurs questions restent sans des réponses : Quelle est la voie d'internalisation de ces NPs ? des moyens peuvent être utilisés : le CryoTEM, la microscopie à faisceau d'ions et la fluorescence. Quelle est la concentration intracellulaire qui permet d'inhiber l'apparition des clones résistants ? Le même test de suivi de la croissance des cellules sera réalisé en changeant les concentrations et les temps du traitement. Après une élaboration et une caractérisation de ces nouvelles formulations chargées des études sur les cellules seront réalisées pour comprendre leur mode d'action. L'insertion d'agent du contraste pour l'IRM (imagerie par résonance magnétique). Un agent du contraste par l'IRM sera inséré afin de pouvoir suivre le devenir de ces NPs chez la souris. L'élaboration de ces formulations modulables nous permet à la fois d'étudier d'une façon fondamentale les mécanismes d'action des NPs, où de nombreux points restent à étudier et aussi de potentialiser au mieux les vecteurs pour une utilisation clinique.

Résumé : Dans le cadre de cette thèse, des nanoparticules intelligentes superparamagnétiques (SPIONs) ont été développées en vue d'être utilisées comme une plateforme médicamenteuse pour la thérapie cancéreuse. Ces nanoparticules du type cœur/coquille sont obtenues à partir de la fonctionnalisation d'un cœur à la base des $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ par un copolymère obtenu à l'aide de la polymérisation initiée à partir de la surface d'un mélange x MEO₂MA et y OEGMA ($x+y=1$). Une fois que leurs structures et leur comportement colloïdal dans l'eau et in-vitro sont parfaitement caractérisés ainsi que la mise en évidence de leurs propriétés thermo-répondantes, des études d'encapsulation et du relargage d'un médicament anticancer, la doxorubicine (DOX) à des températures physiologiques ont été réalisées. Des études in-vitro ont montré la non-cytotoxicité des nanoparticules seules mais lorsque les cellules cancéreuses étaient en contact avec ces mêmes systèmes chargés en DOX, la cytotoxicité était accrue. En vue du ciblage du cancer de l'ovaire et d'internalisation des nanoparticules dans les cellules, nous avons vectorisé les précédentes avec l'acide folique, ces dernières cellules sur-exprimant des récepteurs qui fixent le α du folate (FR- α). La combinaison de différentes techniques de la caractérisation à des échelles macroscopiques et nanométriques nous ont permis de conclure que nos systèmes sont capables d'encapsuler la DOX, de la relarguer d'une manière spécifique et à une température contrôlée. Par ailleurs, elles présentent des propriétés d'hyperthermie prometteuses. Dans la cadre de cette thèse, nous avons donc développé de nouveaux vecteurs de quatrième génération pour la thérapie cancéreuse.

Mots-clés : Nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques (SPIONs), P(MEO₂MA _{x} -OEGMA _{y}), doxorubicine (DOX), délivrance, hyperthermie magnétique, acide folique, HT29, SKOV-3

Abstract: In the frame of this PhD project, smart superparamagnetic nanoparticles (SPIONs) have been developed for a further use as a drug platform for cancer therapy. These nanoparticles of core / shell type are obtained from the functionalization of a core based on $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ by a co-polymer obtained from the surface-initiated polymerization of a mixture x MEO₂MA and y OEGMA ($x + y = 1$). Once their structures and their colloidal behavior in water and in-vitro perfectly characterized as well as the demonstration of their thermo-responsive properties, studies of encapsulation and release of an anti-cancer drug, the doxorubicin (DOX) at physiological temperatures were successfully obtained. In-vitro studies showed the non-cytotoxicity of the nanoparticles, but when the cancer cells were in contact the DOX-loaded NPs, the cytotoxicity was increased. To induce the targeting of ovarian cancer (SKOV3 cells) and the enhancement of the internalization of nanoparticles in cells, we have functionalized the previous nanoparticles with folic acid as these last cells over-express receptors that bind folate α (FR- α). The combination of different macroscopic and nanometric scale characterization techniques allowed us to conclude that our systems are capable of encapsulating DOX, releasing it in a specific manner and at a controlled rate and that they exhibit hyperthermia properties. We have then contributed to successfully develop new third generation vectors for cancer therapy.

Keywords: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), P(MEO₂MA _{x} -OEGMA _{y}), Doxorubicin (DOX), delivery, Folic acid, HT29, SKOV-3

9 Annexe 1 : Techniques de caractérisations

9.1 Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X (DRX) est une technique polyvalente et non destructive utilisée pour l'analyse qualitative des matériaux cristallins. Cette technique est utilisée pour déterminer la structure cristalline des solides donc identifier les matériaux inconnus, la distance entre les plans d'un cristal, l'orientation de monocristaux, l'orientation de poly cristallins, les contraintes, la déformation, la texture, l'épaisseur de films, etc.

Le principe de la DRX est décrit par la loi de Bragg (Equation 1):

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (1)$$

où d est la distance entre les plans atomiques, θ l'angle d'incidence, λ la longueur d'onde de la lumière incidente, et n est un entier.

Une interférence constructive survient lorsque la loi de Bragg est satisfaite et que la différence de la longueur $A + B$ est égale à un nombre entier (n) d'oscillations de l'onde lumineuse (Figure 1).

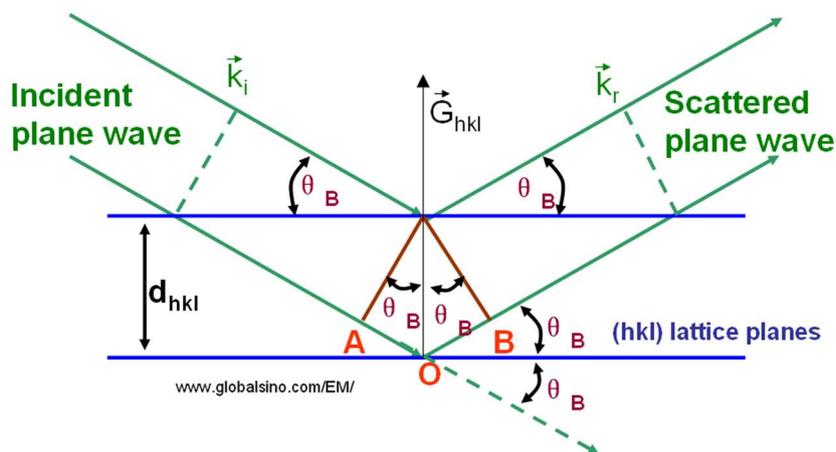


Figure 1 : Illustration schématique de la DRX lorsque la loi de Bragg est satisfaite [d'après <http://www.globalsino.com/EM/page3882.html>]

L'analyse DRX peut fournir une information sur la qualité cristalline et les plans cristallographiques dominants du matériau donné. En outre, le spectre de la diffraction fournit également des informations sur les types des phases présentes dans le matériau et à l'aide de l'équation de Debye - Scherrer (Equation 2) [1] on peut calculer la taille moyenne des NPs (D) :

$$D = \frac{K\lambda}{B\cos\theta} \quad (2)$$

où K est le facteur de forme,

λ est la longueur d'onde de $\text{CuK}\alpha$,

B est la largeur totale à mi-maximum

et θ est l'angle de Bragg obtenu à partir de la valeur 2θ correspondant au pic d'intensité maximum dans le diagramme DRX.

Dans notre protocole expérimental, nous avons utilisé un système de diffractomètre D8 Bruker avec une résolution de $0,02^\circ$ pour 2θ et un tube à rayons X $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) pour étudier la cristallinité des NPs. Des balayages aux rayons X ont été effectués entre les valeurs 2θ de 20° et 80° en utilisant une taille de pas de $0,05$.

9.2 Magnétomètre à SQUID

La mesure magnétique est réalisée par un magnétomètre à SQUID (Figure 2). C'est un détecteur du champ magnétique très sensible. Il est basé sur un détecteur supraconducteur à un interférence quantique nommé "SQUID" (Superconducting Quantum Interference Device). Il s'agit d'un anneau supraconducteur avec une ou deux zones normales à faibles épaisseurs. Le principe de fonctionnement est basé sur l'effet tunnel des porteurs du courant supraconducteur (effet Josephson) soumis à un champ magnétique à travers ces zones normales. Josephson ; en 1962 ; a imaginé qu'un supra courant pouvait intervenir entre deux supraconducteurs séparés par une fine couche isolante.

L'amplitude de ce courant est affectée par un champ magnétique. Une mesure consiste à déplacer l'échantillon dans des bobines du gradient mètre dans un champ magnétique homogène. L'introduction de l'échantillon dans ces bobines initialement compensées perturbe le champ magnétique et produit une variation de flux, qui induit un courant dans les bobines. Un transformateur de flux permet de transmettre le signal dans les bobines au SQUID. L'amplitude de ce signal mesuré est proportionnelle au moment magnétique de l'échantillon. Cet appareil atteint un champ magnétique de 50 kOe avec une sensibilité d'une mesure d'ordre de 10^{-8} uem . De plus, des mesures peuvent être réalisées à différentes températures variant entre $1,8 \text{ K}$ et 400 K .



Figure 2 : SQUID

9.3 Spectroscopie infrarouge à la transmission de Fourier (IR-TF)

La spectroscopie IR-TF est basée sur l'absorption du rayonnement IR par la molécule analysée. Elle fournit des informations sur les fonctions chimiques présentes dans le matériau via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques.

Le spectre IR d'un échantillon est établi en faisant passer un faisceau de la lumière infrarouge à travers l'échantillon. Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de la vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchié ou transmise. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} ($2,5 - 25 \text{ }\mu\text{m}$) correspond aux domaines d'énergies de la vibration des molécules. Ainsi, toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie.

Pour une géométrie donnée, on peut déterminer les modes de la vibration active en infrarouge grâce à la Théorie des Groupes. La position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de

la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse. Par conséquent, un matériau donné présentera un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques pour l'identification. En analysant le spectre IR, nous pouvons facilement obtenir une information abondante sur la structure d'une molécule.

Cette technique qui utilise un interféromètre conçu par Michelson, se compose de deux miroirs plans placés l'un à côté de l'autre et d'un diviseur de faisceau faisant un angle de 45 ° avec les miroirs (Figure 3). Un miroir est fixé dans une position fixe et l'autre peut être déplacé dans une direction perpendiculaire à sa surface avant d'acquérir une vitesse constante. Un séparateur de faisceau se trouve entre le miroir fixe et le miroir mobile. Il divise la lumière entrante provenant de la source. Celle-ci est transmise à 50% et réfléchi à 50%.

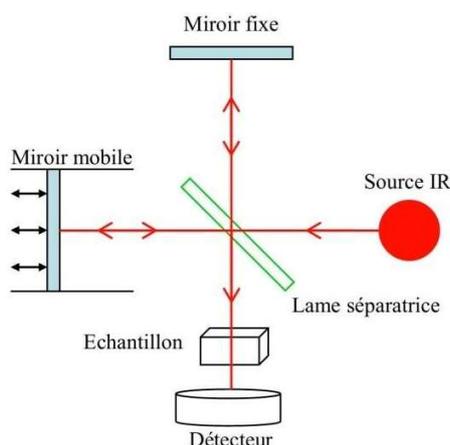


Figure 3 : Schéma d'un spectromètre à transformateur de Fourier

9.4 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La technique DLS a été utilisée pour étudier le comportement des NPs, en suivant l'évolution de la taille en fonction de la température dans les milieux liquides en mesurant la vitesse à laquelle les NPs diffusent en raison du mouvement brownien. En effet, le mouvement brownien est le mouvement aléatoire des particules dû aux interactions / chocs par les molécules du solvant qui les entourent. Par conséquent, les NPs doivent être suspendues dans un liquide lors de l'analyse des DLS (Figure 4).

Le diamètre hydrodynamique est mesuré en analysant le coefficient de la diffusion en translation, qui définit la vitesse du mouvement brownien, à partir de la loi de Stocke-Einstein (Equation 3) :

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

- d_H : Diamètre hydrodynamique (nm),
- T : Température (K),
- D : Coefficient de la diffusion en translation (m^2 / s),
- η : Viscosité du solvant (kg / m^2),
- K : Constante du Boltzmann.

Finalement, de différents facteurs affectent le mouvement brownien des NPs, notamment la concentration et la force ionique du milieu, la forme des NPs et leur structure de la surface. En effet, toute modification de la surface des NPs affectant le mouvement brownien modifiera en conséquence la taille apparente de la particule. Les chaînes polymères greffées sur la surface des NPS réduiront

davantage le mouvement brownien de ces dernières. La nature de la surface du polymère, ainsi que la concentration ionique du milieu peuvent affecter la conformation du polymère, ce qui peut modifier la taille apparente de plusieurs nanomètres [2].

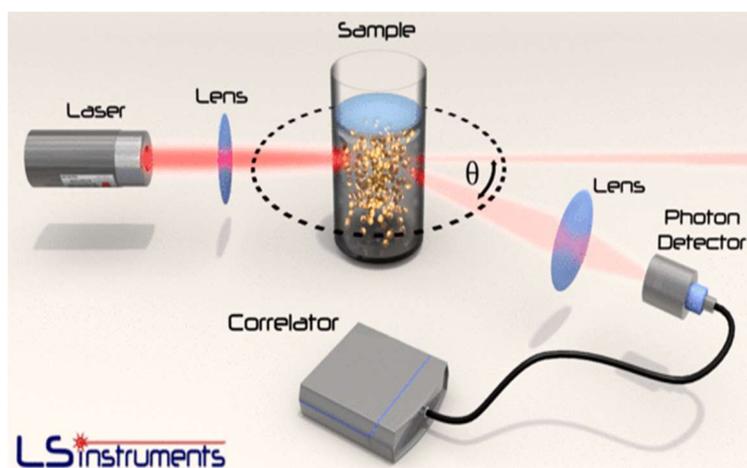


Figure 4 : Principe de la DLS (d'après [<https://lsinstruments.ch/en/technology/dynamic-light-scattering-dls>])

La lumière diffusée peut être interférer d'une manière constructive, entraînant une augmentation de l'intensité détectée (régions claires), ou être une destruction entraînant une diminution de l'intensité détectée (régions sombres). Ce processus est répété à des intervalles du temps courts et l'ensemble résultant de motifs de chatoulement est analysé par un corrélateur automatique qui compare l'intensité de la lumière à chaque point au fil du temps. La distribution des tailles obtenues est un graphique de l'intensité relative de la lumière diffusée par les particules.

9.5 Microscopie électronique à une transmission haute résolution (HR-TEM)

La technique HR-TEM permet d'obtenir des caractéristiques structurales de particules nanométriques ou de composés massifs, simultanément dans un espace réel et dans un espace réciproque (Espace de Fourier).

La structure peut ainsi être visualisée à l'échelle atomique puisque les résolutions spatiales sont atteintes de 0,1 à 0,2 nm. Il a le même principe qu'un microscope ordinaire, mais il utilise une source d'électron plutôt qu'une source de lumière.

Dans un HR-TEM, l'échantillon est déposé sur une grille du carbone (3 mm de diamètre). La grille est placée sur le porte-échantillon puis elle est introduite dans la colonne du microscope. Un faisceau parallèle mono énergétique est généré par un canon à électron (W à 2500 ° C, LaB6 à 1500 ° C). Ces électrons sont accélérés dans la colonne sous le vide (W : 10⁻³-10⁻⁴ Pa, LaB6 : 10⁻⁵-10⁻⁶ Pa). La tension d'accélération de 200 kV est utilisée. Les électrons sont focalisés à l'aide de lentilles magnétiques et d'un objectif. La largeur du faisceau est définie par le choix du plan focal et influence l'éclairage de l'objet.

Le microscope est fourni avec un troisième ensemble de lentilles, des lentilles à projection. Ils permettent de transférer l'image sur l'écran et d'effectuer des grossissements. En modifiant la focalisation de ces projections de lentilles, nous pouvons travailler soit en mode d'imagerie, soit en mode de la diffraction (Figure 5). La résolution en mode d'imagerie est déterminée par la longueur d'onde de l'irradiation. L'utilisation des électrons au lieu de la lumière ordinaire, la résolution peut être grandement améliorée en raison de la très courte longueur d'onde des électrons observant des atomes

uniques et leurs plans cristallins. D'autre part, en utilisant le mode de la diffraction, un motif de la diffraction est obtenu, révélant des informations concernant la structure cristalline.

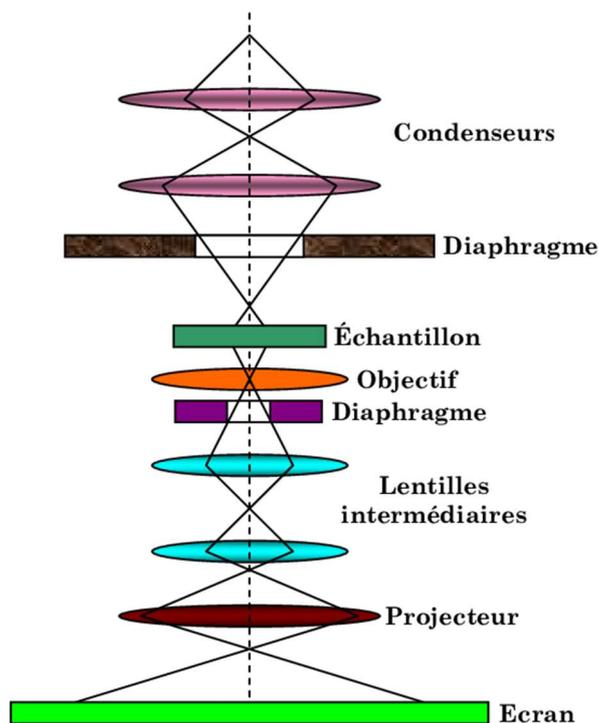


Figure 5 : Schéma du principe d'un MET

Les images HR-TEM ont été obtenues avec un FEG JEOL ARM 200F-Cold FEG (résolution ponctuelle 0,19 nm) équipé d'un GIF Quantum ER. Les NPs fonctionnalisées ont été initialement dispersées à l'aide d'ultrason dans l'éthanol, puis une goutte de la suspension a été déposée sur une grille qui présente des trous de la vide, séchée à la température ambiante et ensuite traitée à la chaleur pour éviter toute contamination.

Des images des NPs de Fe₃O₄ avant et après le greffage du polymère ont été obtenues à un grossissement faible et élevé.

Le calcul du diamètre moyen des échantillons a été effectué à l'aide du logiciel ImageJ à partir d'image HR-TEM contenant au moins 100 particules.

9.6 Spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis)

La spectroscopie UV-Vis est le phénomène qui permet d'observer et de quantifier l'énergie sous la forme de la lumière dans la région spectrale UV-Vis (200-700 nm) en se référant à la spectroscopie d'absorption ou de la réflectance. Les molécules contenant des n électrons ou des électrons ne se liant pas, peuvent absorber l'énergie sous la forme des rayons ultraviolets ou de lumière visible afin d'exciter ces électrons à des orbitales moléculaires plus puissantes.

Dans une telle transition électronique, l'énergie absorbée dépend de la différence d'énergie entre les deux états et, par conséquent, la longueur d'onde de la transition dépend de la relation de Bohr (Equation 4) :

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda} = h\nu \quad (4)$$

où : ΔE la différence d'énergie (Joules),
h la constante de Planck ($6,626 * 10^{-34}$ Js),

c la vitesse de la lumière ($3 * 10^8$ m / s),
 λ la longueur d'onde de la lumière (nm),
et ν la fréquence (s⁻¹).

De plus, à l'aide de la spectroscopie UV-Vis, on peut déterminer la concentration d'un soluté dans une solution à partir de la loi de Beer-Lambert. En effet, lorsque le rayonnement électromagnétique traverse la solution placée dans une cuvette, nous définissons le facteur de la transmission (T) comme le rapport entre l'intensité de la lumière transmise (I) et l'intensité de la lumière incidente (I_0) (Équation 5) :

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (5)$$

Et l'absorbance (A) est exprimée en fonction de I et I_0 par l'équation suivante :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log T \quad (6)$$

La loi de Beer-Lambert établit une relation linéaire entre l'absorbance et la concentration d'un soluté à une longueur d'onde précise (équation 7) :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon l c \quad (7)$$

où ϵ : est le pouvoir d'absorption molaire (L / mol.cm),
 l est la longueur de la lumière traversant l'échantillon (cm),
et c est la concentration molaire en soluté (mol / L).

Les intensités I et I_0 sont mesurées simultanément ou séquentiellement en fonction du matériau utilisé (spectrophotomètre à un ou deux faisceaux). La mesure I_0 est effectuée à l'aide d'un "blanc" qui prend en compte la fraction du rayonnement absorbée et / ou réfléchi par la cuvette et le solvant. Le soluté va absorber une quantité de la lumière à plusieurs longueurs d'onde. Ces valeurs sont représentées par un graphique appelé un « spectre d'absorption », qui donne l'absorbance en fonction de la longueur d'onde. Finalement, les spectres d'absorption sont enregistrés sur un spectrophotomètre UV-visible Thermo Scientific Evolution 220 pour notre mesure UV-Vis. Le balayage en longueur d'onde couvrait la plage de 700 à 200 nm.

9.7 Analyse thermogravimétrique (TGA)

Le TGA est une méthode d'analyse thermique dans laquelle les modifications des propriétés physiques et chimiques des matériaux sont mesurées en fonction de la chaleur (augmentation de la température avec un chauffage constant), ou en fonction du temps (à une température constante). L'influence de la chaleur provoque la décomposition thermique du matériau se traduisant par une perte de la masse permettant de déterminer des fractions de composants organiques présents dans le matériau.

L'instrument d'analyse ATG est composé d'une thermobalance qui mesure les modifications de la masse de l'échantillon causées par l'absorption d'oxygène, la dégradation thermique, l'oxydation ou d'autres réactions hétérogènes lorsque la chaleur est appliquée. Un schéma général d'un système ATG est présenté dans Figure 6.

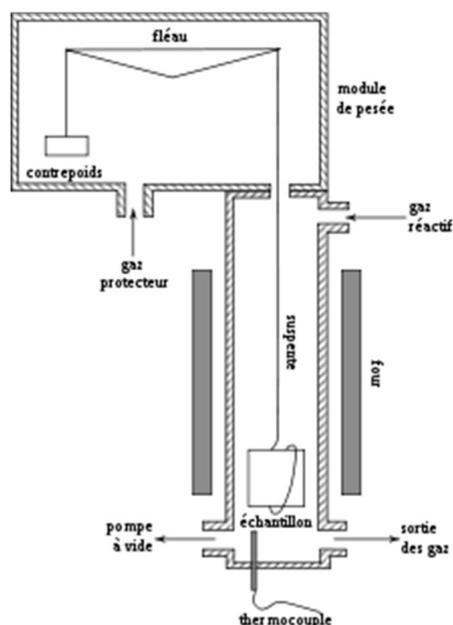


Figure 6 : Représentation schématique d'une TGA

Au cours de notre étude, nous avons utilisé une thermobalance SETSYS Supersonic produite par SETARAM. Le four peut fonctionner à une haute température. Il est composé d'un élément en graphite fonctionnant de la température ambiante jusqu'à 1600 ° C. Il est refroidi par la circulation de l'eau et la régulation se fait par un thermocouple de type S. La microbalance peut être utilisée avec une masse de variation de ± 200 mg ou ± 20 mg avec une résolution de 10^{-7} g. Le poids du charge maximum est de 20 g.

L'appareil est contrôlé par un logiciel nommé « Calisto ». Nous avons utilisé un creuset en alumine (Al_2O_3) avec un volume de 30 μL . Les échantillons presque secs d'environ 50 mg ont été placés dans le creuset. Les échantillons ont été chauffés à partir de la température ambiante jusqu'à 450 °C à une vitesse du chauffage de 5 °C / min sous un atmosphère d'argon. Le pourcentage de la perte de la masse a été tracé en fonction de la température, ce qui a permis de déterminer la quantité du copolymère présent dans la structure de chaque échantillon.

10 Annexe 2

10.1 Synthèse de l'acide folique modifié

10.1.1 Modification de l'acide folique :

La modification de l'AF a été réalisée selon le protocole suivant (Figure 1):

- (2 g, 4,53 mmol) d'AF a été dissous dans du DMSO (20 mL)
- Puis (1,04 g, 5,4 mmol, 1,2) du chlorhydrate de N- (3-diméthylaminopropyl) -N'-éthylcarbodiimide et (0,62 g, 5,4 mmol) N-hydroxysuccinimide ont été ajoutés.
- Après l'agitation du mélange pendant 3 heures, le 2-hydroxyéthyl-2-bromoisobutyrate (0,71 ml, 4,53 mmol) a été ajouté au mélange.
- Après une agitation pendant 24 heures, le AF modifié (AFM) a été précipité dans un excès de dichlorométhane et le solide orange résultant a été lavé plusieurs fois avec du dichlorométhane et de l'acétone et séché sous le vide.

La structure de l'AFM a été confirmée par la RMN. Le rendement de la réaction était de 85%.

10.1.2 Greffage de l'acide folique modifié à l'extrémité de la chaîne polymère

La même preuve a été utilisée pour toute la composition de monomère (Figure 1). 50 mg de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@\text{P}(\text{MEO}_2\text{M}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ ont été dissous dans de l'eau Milli-Q (200 ml). Le AFM a été ajouté à la solution (2 g, 2,15 mmol) et 200 μL de solution de CuBr_2 / TPMA (0,884 μmol de CuBr_2 , 4,3 μmol). Après une agitation pendant 2 heures sous l'argon, 250 μl d'une solution d'hydrazine dans du DMSO (7,1 mg / ml) ont été ajoutés au mélange.

Les NPs ont été maintenus sous l'agitation pendant 24 heures. Ensuite, le mélange a été versé dans de l'eau Milli-Q chaude pour précipiter les composants insolubles. Les matériaux ont été purifiés par un lavage à l'eau chaude Milli-Q par une centrifugation jusqu'à ce que le surnageant soit complètement limpide, afin de s'assurer que tout le AFM non greffé était complètement éliminé du système de NPs. Nous avons confirmé la greffe AFM par FT-IR.

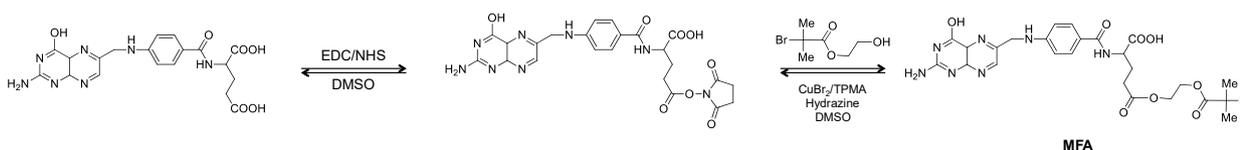


Figure 1: Synthèse de l'AF modifié par l'acide 2-bromoisobutyrate d'hydroxyéthyle.

Les tests SQUID-VSM (Superconducting Interference Device - Vibrating Sample Magnetometer) effectués, illustrés à la Figure 2, démontrent clairement l'absence d'hystérésis des nanoparticules $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$, et suggèrent leur nature superparamagnétique.

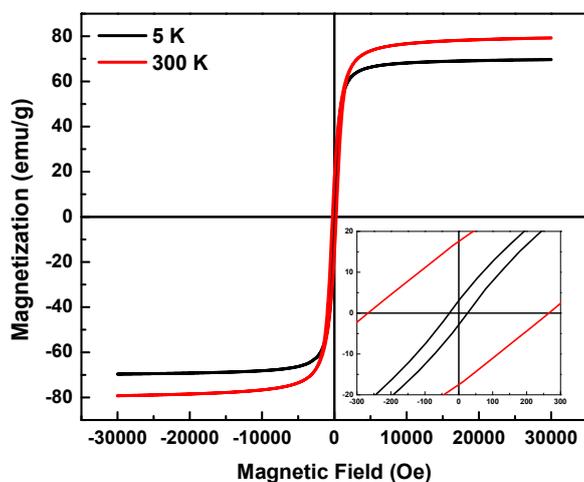


Figure 2. Courbes d'aimantation en fonction du champ pour des NPs de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$

La réversibilité complète du NPs de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ après modification par AF est confirmée via cinq cycles successifs de chauffage ($T > \text{LCST}$) et de refroidissement ($T < \text{LCST}$).

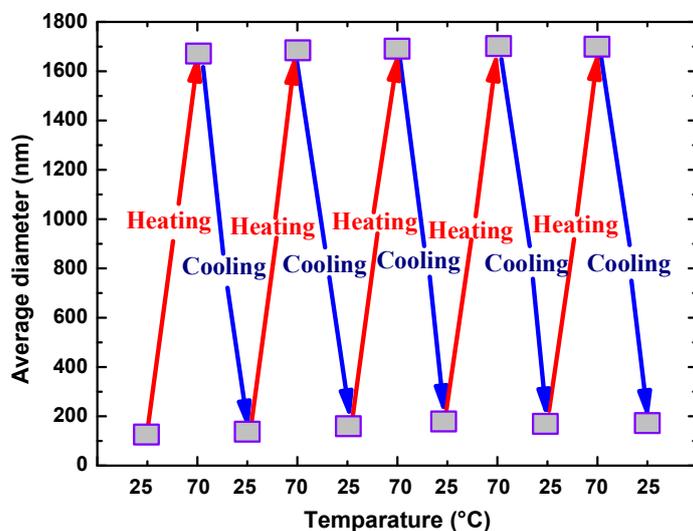


Figure 3. Réversibilité de l'évolution du diamètre hydrodynamique des NPs de $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-AF}$ avec des cycles successifs du chauffage et du refroidissement dans le PBS.

Tableau 1 montre la capacité calorifique des NPs $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ et $\text{Fe}_3\text{-}\delta\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ dans l'eau et DMEM à 37°C.

Samples	C (J/g.K) in water	C (J/g.K) in physiological media
$\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$	4.085	4.081
$\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$	4.056	4.078

Tableau 1 : Capacité calorifique des NPs dans l'eau et DMEM à 37°C

10.2 Nanoparticulaires cœur/coquille chargés en DOX

Le contrôle du relargage de la DOX a été suivi aussi par l'évolution de l'intensité de la fluorescence en fonction de la température. En effet, la Figure 3, montre les spectres de la fluorescence réalisés à l'aide de la spectroscopie de la fluorescence.

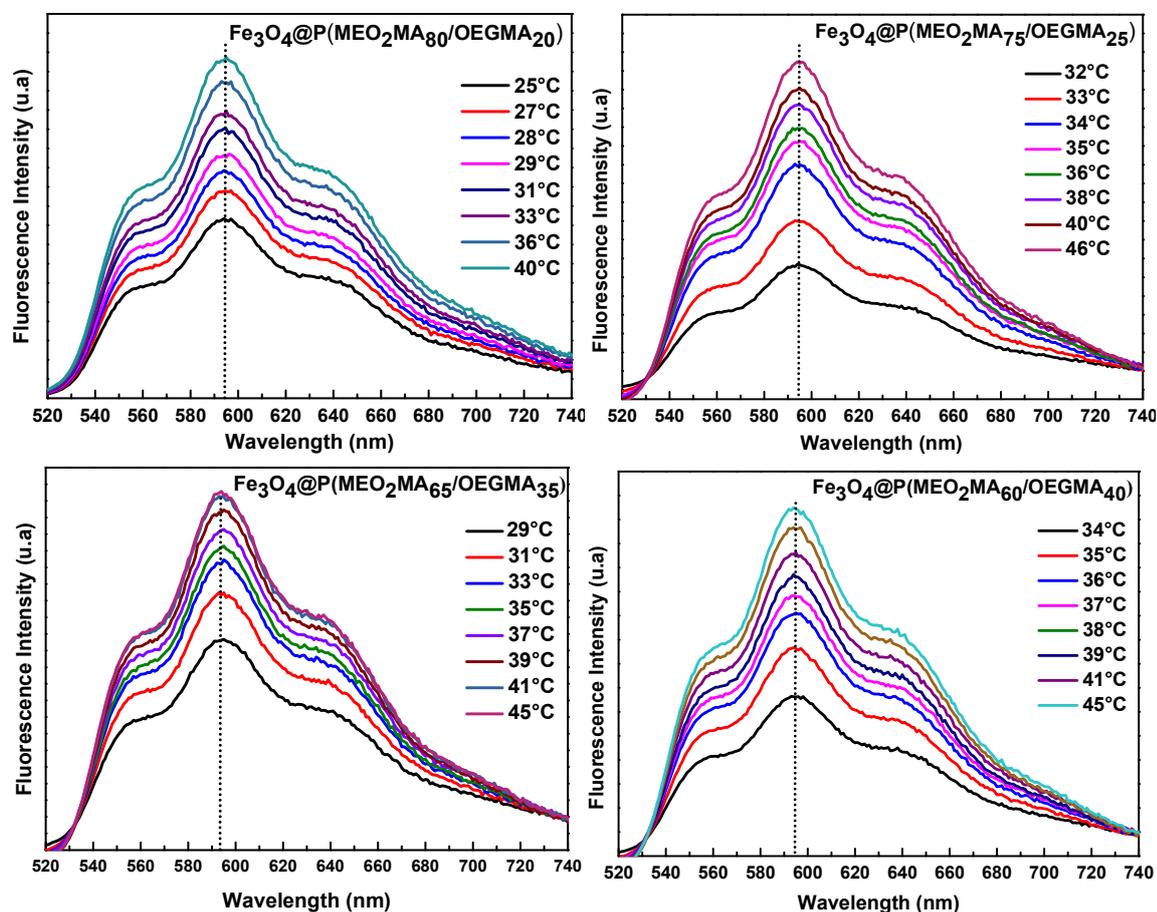


Figure 4. Courbes de la cumulation des NPs dans le PBS

La Figure 5 montre les spectres d'absorption en fonction de différente concentration de DOX, afin de déterminer le courbe d'étalonnage de la DOX en mesurant l'absorbance (pour une longueur d'onde 480 nm) pour les différents concentrations.

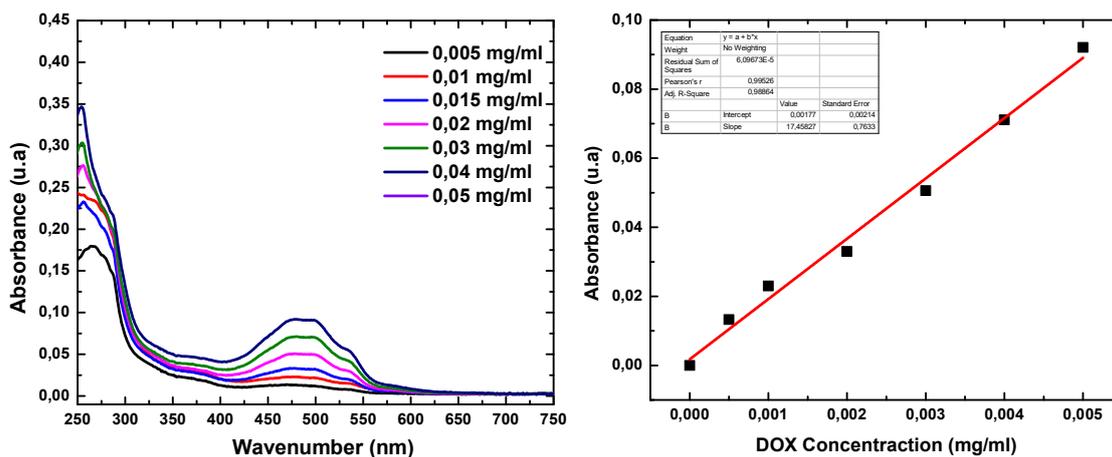


Figure 6: courbe d'étalonnage de la DOX

10.3 Nanoparticulaires cœur/coquille modifié par l'AF chargés en DOX

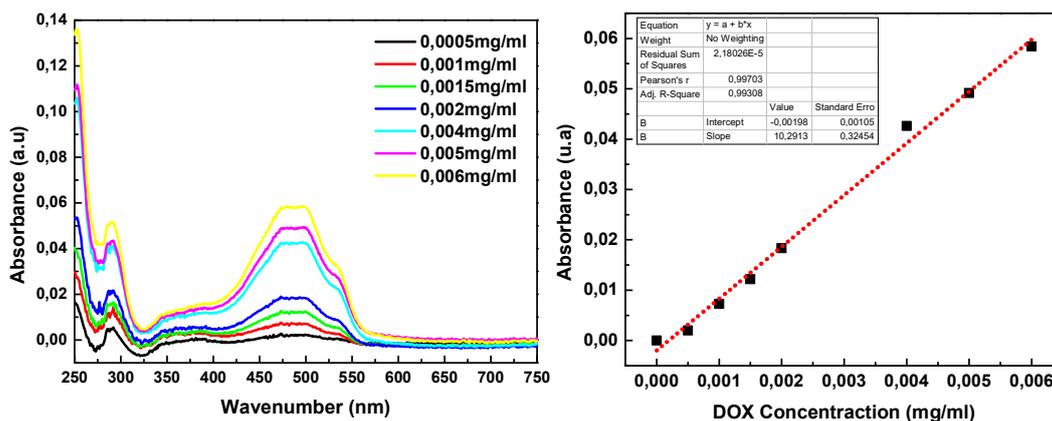


Figure 9 : courbe d'étalonnage de la DOX

10.3.1 Nanoparticulaires cœur/coquille chargés en DOX après le contact avec des protéines

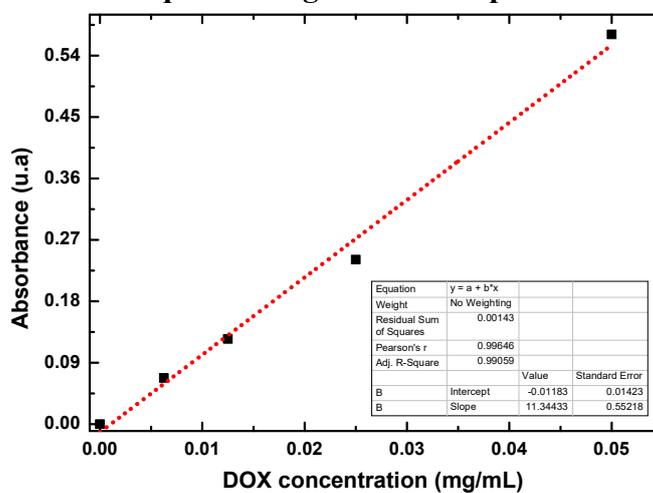
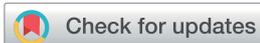


Figure 11: courbe d'étalonnage de la DOX

PAPER

Cite this: *RSC Adv.*, 2017, 7, 26243

Functional responsive superparamagnetic core/shell nanoparticles and their drug release properties†

Zied Ferjaoui,^{ab} Raphaël Schneider,^c Abdelaziz Meftah,^b Eric Gaffet^a and Halima Alem^{*,a}

The preparation of responsive superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles (NPs), able to carry the anticancer drug doxorubicin (DOX) and to release it in physiological media at the physiological temperature, is one of the major challenges in nanomedicine. In this work, two families of NPs were synthesized. The first one consists of superparamagnetic Fe₃O₄ NPs functionalized *via* covalent grafting by a biocompatible responsive copolymer based on 2-(2-methoxy)ethyl methacrylate (MEO₂MA) and oligo(ethylene glycol) methacrylate (OEGMA). The second one consists of the same core/shell NPs but folic acid, a biological cancer targeting molecule, was grafted at the polymer chain end. The core/shell NPs were fully characterized by the combination of spectroscopic and microscopic techniques. The influence of the polymer chain structure in water and in physiological media was studied. We demonstrate that the magnetic properties of the NPs were only influenced by the amount of the grafted polymer and no influence of NP aggregation was evidenced. Indeed, the derived nanostructured materials displayed a combination of the physical properties of the core and the macromolecular behavior of the shell. The drug release experiments confirmed that DOX was largely released above the co-polymer LCST due to the presence of DOX. The nanomaterials developed in this work have high potential as multi-modal cancer therapy tools.

Received 27th February 2017
Accepted 10th May 2017

DOI: 10.1039/c7ra02437a

rsc.li/rsc-advances

1. Introduction

One of the major challenges in nanomedicine is to develop materials able to serve as efficient diagnostic and/or therapeutic tools against severe diseases, such as infectious or neurodegenerative disorders.¹ The most powerful diagnosis tool in medical science is MRI (magnetic resonance imaging).² To enhance MRI images interpretation, contrast agents were developed to increase the signal/noise ratio. Among them, superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles (NPs) have received a great attention since their development as a liver contrast agent twenty years ago.^{3,4} Their properties, originating from their nanosized dimensions, allow different bio-distributions and opportunities compared to the conventional molecular imaging agents.^{3,5–8} SPIONPs are already approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and have been

greatly investigated due to their good biocompatibility, low toxicity and ease of synthesis.^{3,9} Below 27 nm, SPIONPs are superparamagnetic which make them better candidates as diagnostic and/or therapeutic tools compared to the ferri or ferromagnetic NPs.⁷ Indeed, SPIONPs do not retain their magnetization once the magnetic field is removed. The opportunity to coat those NPs with a polymer shell that can ensure a better stability of the materials in the body, enhance their biodistribution and give them new functionalities appears as very challenging for medicinal applications. Synthetic processes leading to SPIONPs displaying diameters smaller than 20 nm have emerged in the last decade.⁷ Owing to their physical properties, SPIONPs received a great attention in many biomedical applications such as drug delivery platforms,^{3,4,7,8} contrast agents,³ and detoxifying agents for biological fluids.^{5,10} Monitoring and controlling the drug loading and its release can be ensured by the development of core/shell NPs. The shell can either improve the drug/cancer cells interactions that can in turn reduce the amount of drugs that have to be administrated during the treatment.

Smart polymers are a subclass of polymers capable to respond to environmental changes such as temperature, pH, ionic strength, electric field, or light, and are a very attractive coating for biomedical applications especially for the controlled release of drugs.^{11–13} Thermo-responsive polymers are known to

^aInstitut Jean Lamour (IJL), Université de Lorraine, Department N2EV, UMR CNRS 7198, Parc de Saurupt CS50840, 54011 Nancy, France. E-mail: halima.alem@univ-lorraine.fr

^bUnité Nanomatériaux et Photonique, Faculty of Sciences of Tunis, Tunis El-Manar University, 2092 Tunis, Tunisia

^cLaboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), Université de Lorraine, UMR CNRS 7274, 1 rue Grandville, 54001 Nancy, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7ra02437a

exhibit either an Upper Critical Solution Temperature (UCST) or a Lower Critical Solution Temperature (LCST).¹⁴ When the UCST is reached upon heating, the polymers become hydrophilic while the LCST is the temperature at which the polymer chains shrink leading to their volume decrease due to the release of the water molecule from its backbone and finally to their hydrophobicity. As a consequence, the use of thermoresponsive polymers displaying a LCST in a temperature range of 40–42 °C is of high interest for a further use in core/shell NPs design. At physiological temperature, once the responsive macromolecules grafted at the surface of SPIONPs, they could trap a cancer drug by supramolecular interactions while their hydrophilicity could allow their good dispersion and circulation in the blood. Upon heating locally at 40–42 °C, the drug release could be triggered in a temporal controlled way.¹⁴ Nowadays, many temperature responsive polymers were reported in the literature, but copolymers containing poly(ethylene glycol) moieties have been found to appear as ideal candidates as they are biocompatible and proteins repellent.¹⁵ Copolymers based on the 2-(2-methoxy)ethyl methacrylate (MEO₂MA) and oligo-(ethylene glycol) methacrylate (OEGMA) can exhibit variable LCST depending on the amount of each monomer. As a consequence, the target temperature range mentioned above (40–42 °C) can be reached by choosing the proper MEO₂MA/OEGMA molar ratio.^{16,17} To prepare stable core/shell NPs, the covalent grafting of the copolymer is preferred to a weak electrostatic association that can be debilitated in physiological media. Responsive polymers or copolymers are generally grafted at the surface of SPIONPs by the “grafting-to” process, *i.e.* the copolymer is first synthesized and then grafted at the surface of the NPs. Hence this process could easily lead to very stable and functional nanomaterials, but as a drug will be trapped within the polymer chain, its quantity is directly related to the amount of polymer chains grafted at the surface, and thus to the grafting density.^{18,19} To increase the grafting density of the copolymer chains, the grafting-from process is a more suitable process as it allows the growth of the copolymer from the NPs surface.²⁰ To initiate the polymerization from the surface, controlled polymerization processes (CRP) have become powerful methods to prepare core/shell NPs with well-defined structure.^{5,18,19} The

recently developed Activator ReGenerated by Electron Transfer-Atom Transfer Radical Polymerization (ARGET-ATRP) is one of the most promising CRP as it can ensure the growth of the copolymer from NPs surface with less sensitivity to oxygen and requires only a ppm amount of the copper catalyst compared to the ATRP process.^{21–23}

In this work, thermoresponsive core/shell NPs for drug delivery purposes were first prepared by growing a responsive statistical copolymer by surface initiated ARGET-ATRP from SPIONPs. Two family of NPs were synthesized. The first one consists in Fe₃O₄ NPs functionalized by a biocompatible responsive copolymer based on MEO₂MA and OEGMA, the copolymers were marked as P(MEO₂MA_{*x*}-*co*-OEGMA_{100–*x*}), where *x* and (100 – *x*) represent the molar fractions of MEO₂MA and OEGMA, respectively. In a second step, to enhance the selective binding and the delivery of the drug to the targeted cells *via* the receptor mediated endocytosis, the introduction of specific antibodies or ligands appeared as essential. Among the various ligands available, folic acid (FA) is one of the best candidate owing to its stability, low cost, absence of immunogenicity and especially due its high affinity for folates receptors that are over expressed in various human carcinomas like breast, kidney, lung or ovary.^{24,25}

To avoid the FA screening by the polymer chains, grafting FA at the chain end appeared as a good strategy.²⁶ In the given work, to increase the FA accessibility with the cancer cell wall, a process has been developed that consists in first the growing of a responsive copolymer based on MEO₂MA, OEGMA and the FA was subsequently grafted at the chain end (Fig. 1). The efficiency of the FA grafting and the final nanomaterials structure were characterized by the combination of spectroscopic and microscopic methods. The drug release capacities of the NPs were investigated by using the Doxorubicin drug.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich, excepted ((chloromethyl)phenylethyl)trimethoxysilane (CMPETMS) (Gel-est, >95%). All the reagents were used as received.

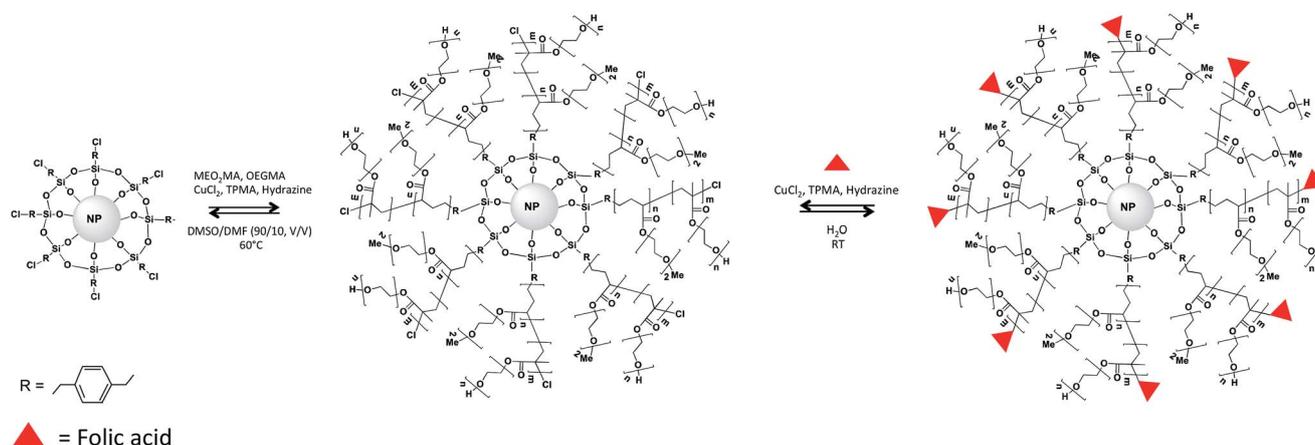


Fig. 1 Schematic representation of the surface-initiated ARGET-ATRP polymerization of P(MEO₂MA_{*x*}-OEGMA_{100–*x*}) from Fe₃O₄@silane.

2.2 Synthesis of Fe₃O₄ NPs

Superparamagnetic Fe₃O₄ nanocrystals were synthesized by coprecipitation. A mixture of FeCl₃·6H₂O (6 mmol; 1.622 g) and FeSO₄·7H₂O (5 mmol; 1.39 g) was dissolved in 40 mL water in a three necked round bottom flask. 5 mL of a 28% (v/v) aqueous ammonia solution were subsequently added to the mixture and the final solution was heated at 90 °C under argon atmosphere with stirring. Then, 4.4 g (14.9 mmol) of sodium citrate in 15 mL water were added dropwise until getting a black solution. The reaction mixture was further stirred for 30 min. Fe₃O₄ SPIONPs were finally recovered by magnetic separation, washed several times with ethanol and redispersed in 100 mL water.

2.3 Synthesis of CMPETMS-coated Fe₃O₄ NPs (Fe₃O₄@silane)

SPIONs were dispersed in 10 mL of toluene under argon. CMPETMS (0.2 mmol, $V = 49.1 \mu\text{L}$) was injected and the mixture stirred for 2 min. Then, 1 mL of an ethanolic solution of tetramethylammonium hydroxide pentahydrate (TMAH) (36.25 mg) was added and the mixture further stirred under argon for 15 min at 50 °C. The mixture was then cooled and SPIONs were separated by centrifugation and washed two times with toluene. The silanized SPIONs were dispersed in 10 mL of toluene and 2 mL of an ethanolic solution of TMAH (36.25 mg) were injected. The reaction was conducted under argon for 30 min at 50 °C under magnetic stirring. The mixture was cooled in a water bath and SPIONPs were separated by centrifugation and washed two times with toluene.

2.4 Synthesis of Fe₃O₄@P(MEO₂MA_x-OEGMA_y) and Fe₃O₄@P(MEO₂MA_x-co-OEGMA_y)-FA NPs

The surface initiated polymerization of P(MEO₂MA_x-OEGMA_y) from iron oxide NPs surface was conducted using an adapted protocol described by Alem *et al.*²³ Briefly, in a 100 mL Schlenk flask, 50 mg Fe₃O₄@silane NPs were dispersed in 20 mL of a DMF/DMSO mixture (10/90, v/v). 1.6 mL of MEO₂MA and 1.14 mL of OEGMA were added for the synthesis of Fe₃O₄@P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀). 1.26 mL of MEO₂MA, 1 mL of OEGMA for Fe₃O₄@P(MEO₂MA₆₅-OEGMA₃₅). Once the NPs were completely dispersed, 200 μL of a CuBr₂/TPMA (0.884 μmol CuBr₂, 4.3 μmol TPMA) stock solution in DMSO were added to the mixture. The reaction mixture was stirred and heated to 65 °C. Next, 250 μL of a stock solution of hydrazine in DMSO (7.1 mg mL⁻¹) were added and the mixture was stirred for 2 h at 65 °C with argon. At the end of the polymerization, the mixture was poured drop by drop into hot Milli-Q water to precipitate the insoluble components. The materials were purified by redispersion of the core/shell NPs in cold water followed by centrifugation of the solution after heating.

Fe₃O₄@P(MEO₂MA_x-OEGMA_y) NPs functionalized by FA (Fe₃-O₄@P(MEO₂MA_x-OEGMA_y)-FA) were prepared according to a one-pot synthesis protocol similar to that described with Fe₃O₄@P(MEO₂MA_x-OEGMA_y). Briefly, 8.33 mg of Fe₃O₄@P(MEO₂MA_x-OEGMA_y) NPs and 400 mg of modified FA (see the synthesis protocol in the ESI†) were dispersed in 20 mL ethanol and 200 μL

of the CuBr₂/TPMA (0.884 μmol CuBr₂, 4.3 μmol TPMA). The mixture was stirred under argon for 30 min. Next, 250 μL of hydrazine (7.1 mg mL⁻¹ in DMSO) were added and the mixture stirred under argon for 24 h. At the end of the polymerization, the mixture was poured into hot Milli-Q water to precipitate the insoluble components. The materials were purified by washing with hot Milli-Q water followed by centrifugation.

2.5 Association with DOX

Conjugation of DOX with the copolymer was achieved through formation of imine bond, also called Schiff base bond, between the primary amine group of DOX and the aldehyde group of the P(MEO₂MA_x-co-OEGMA_y) polymer. Fe₃O₄@P(MEO₂MA_x-OEGMA_y)-FA NPs (2.5 mg) were suspended in 5 mL PBS (pH 7.4). Next, 5 mg of DOX were added (the DOX concentration was 1 mg mL⁻¹). The mixture was stirred in the dark for 12 h. Subsequently, the DOX-loaded Fe₃O₄@P(MEO₂MA_x-OEGMA_y)-FA NPs were washed with PBS by magnetic decantation ten times until the supernatant solution was clear and that no signal of the DOX could be detected by UV-visible spectroscopy. Then, the DOX-loaded Fe₃O₄@P(MEO₂MA_x-OEGMA_y)-FA NPs were dispersed in 5 mL of PBS. The concentration of released DOX vs. temperature (between 25 and 50 °C) is calculated by measuring the absorbance of the supernatant at 480 nm of the free DOX remaining in solution.

2.6 Characterization methods

Dynamic light scattering (DLS) was performed at room temperature using a Malvern zetasizer HsA instrument with an He-Ne laser (4×10^{-3} W) at a wavelength of 633 nm. The NPs aqueous solutions were filtered through Millipore membranes (0.2 μm pore size). The data were analysed by the CONTIN method to obtain the hydrodynamic diameter and size distribution in each aqueous dispersion of NPs. Transmission electron microscopy characterization: for each sample, one drop of a dispersed solution (for each step of the synthesis) was deposited on holey carbon grids and imaged by transmission electron microscopy (TEM). The Microscope used is an ARM 200F. The crystallographic structure of VN thin films was identified by X-Ray Diffraction (XRD) using Philips PW3710 diffractometer with Cu K α radiation. Fourier transform infrared (FT-IR) measurements were conducted by using a Nicolet 6700 FT-IR spectrometer equipped with a deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector in the 400–7000 cm⁻¹ wavelength range (*i.e.*, 1.24–25 μm) in a reflexion mode. A SETSYS Supersonic thermobalance (SETARAM) was used for the thermogravimetric measurements. The furnace is made up of a graphite element operating from room temperature up to 1600 °C. The apparatus is controlled by software appointed Calisto. Dry samples of 30 mg were put in an alumina crucible with a volume of 30 μL . The samples were heated from room temperature to 600 °C at a heating rate of 5 °C min⁻¹ under argon atmosphere. The magnetic properties of the core/shell NPs were studied by superconducting quantum interference device SQUID-VSM combined to Vibrating Sample Magnetometer (Fig. 5 and 6).

3. Results and discussion

3.1 Physicochemical properties of the superparamagnetic NPs

3.1.1 Chemical characterization of SPIONs. The covalent attachment of the copolymer and FA at the surface of Fe_3O_4 NPs was monitored by ATR-FTIR (Fig. 2). The peak relative to the vibration mode of the Fe_3O_4 ($575\text{--}585\text{ cm}^{-1}$) can be observed in both spectra. After the growth of $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_y)$ from the NPs surface, new absorption bands located at 1720 and 1110 cm^{-1} are observed and can be assigned to the ester $\text{C}=\text{O}$ and $\text{C}-\text{O}$ bonds stretching, respectively. The anchorage of FA was confirmed by the presence of a typical large NH stretching peak at 3400 cm^{-1} originating from the $\text{N}-\text{H}$ bond involved in hydrogen bond. The typical aromatic $\text{C}=\text{C}$ stretchings between 1600 and 1450 cm^{-1} can also be seen in the spectrum of $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_y)\text{-FA}$ NPs. The sharp aromatic $\text{C}-\text{N}$ peak at 1350 cm^{-1} and the $\text{N}-\text{H}$ out of plane vibration at 700 cm^{-1} further confirmed the anchorage of FA at the periphery of $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_y)$ NPs.

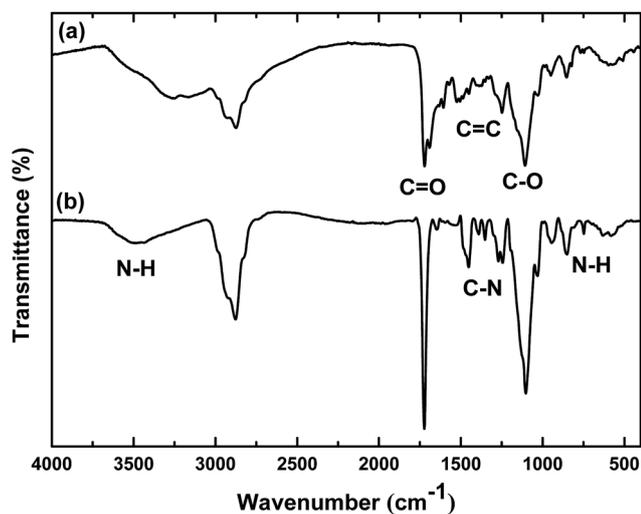


Fig. 2 FT-IR spectra of (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@MEO_2MA\text{-}co\text{-}OEGMA$ (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@MEO_2MA\text{-}co\text{-}OEGMA\text{-}FA$ NPs.

3.1.2 Physical characterization of the SPIONs. Fig. 3 and S12† show HR-TEM micrographs and XRD patterns of the synthesized SPIONs, respectively. The NPs displayed spherical shape with an average diameter of $10 \pm 1.3\text{ nm}$. The magnetite structure of the SPIONs (before and after silanization and polymerization) was confirmed by XRD. The XRD patterns exhibit a set of diffraction peaks that can be assigned to the (200), (311), (400), (422), (511) and (440) planes of magnetite (JCPDS no. 00-019-0629) and indicate that the crystalline structure of the NPs was not altered by the silanization.

3.1.3 Colloidal behavior of the NPs in physiological media. The average diameter of the core/shell NPs measured by DLS is about $30\text{--}40\text{ nm}$ (higher hydrodynamic diameters were observed when the amount of OEGMA is increased) (Fig. 4). It is worth to mention that NPs with sizes varying between 10 and 200 nm preferentially accumulate preferentially into tumor than healthy tissue due to the enhanced permeability and retention effect (EPR).^{27,28} Indeed, due to the porous vascular architecture of the tumors and the degradation of the lymphatic clearance, the NPs diffusion in tumor tissue is largely enhanced. The $30\text{--}40\text{ nm}$ hydrodynamic diameter of the NPs developed in this work is then optimal for the EPR effect.

The responsive behavior and the starting temperature at which the NPs started to aggregate was also monitored by DLS. As depicted in Fig. 4, when a solution of $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{80}\text{-}co\text{-}OEGMA_{20})\text{-FA}$ NPs is heated from 25 to $50\text{ }^\circ\text{C}$, their hydrodynamic diameter started to increase at $30\text{ }^\circ\text{C}$, which corresponds to the LCST of $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-}OEGMA_{40})\text{-FA}$ in PBS. For $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-}OEGMA_{40})\text{-FA}$ and for $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-}OEGMA_{35})\text{-FA}$ NPs, the measured hydrodynamic diameter of the NPs started to increase at 38 and $44\text{ }^\circ\text{C}$, respectively. The shift of the LCST towards higher temperatures when increasing the amount of OEGMA, from $30\text{ }^\circ\text{C}$ for the $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{80}\text{-}OEGMA_{20})\text{-FA}$ NPs to $44\text{ }^\circ\text{C}$ for $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-}OEGMA_{35})\text{-FA}$ NPs, indicates that the thermal properties of the core/shell NPs are completely driven by the macromolecular properties of the copolymer chains (the same evolution of LCST was observed for the samples without FA as shown in Fig. S3†). Finally, to prove that the processes are fully reversible, five successive cycles of heating ($T > \text{LCST}$) and cooling ($T < \text{LCST}$) were conducted. All the

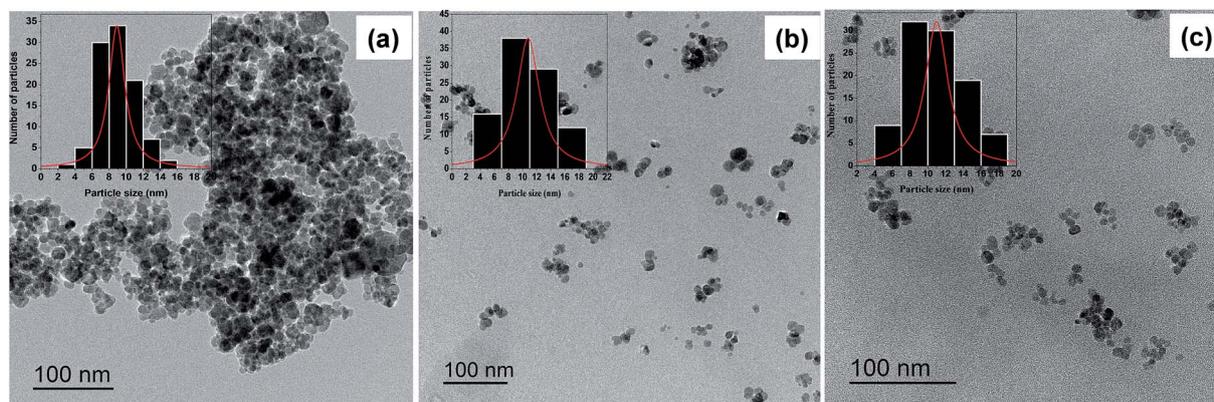


Fig. 3 TEM micrographs of (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@silane$ NPs, (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@MEO_2MA\text{-}co\text{-}OEGMA$ and (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@MEO_2MA\text{-}co\text{-}OEGMA\text{-}FA$ NPs.

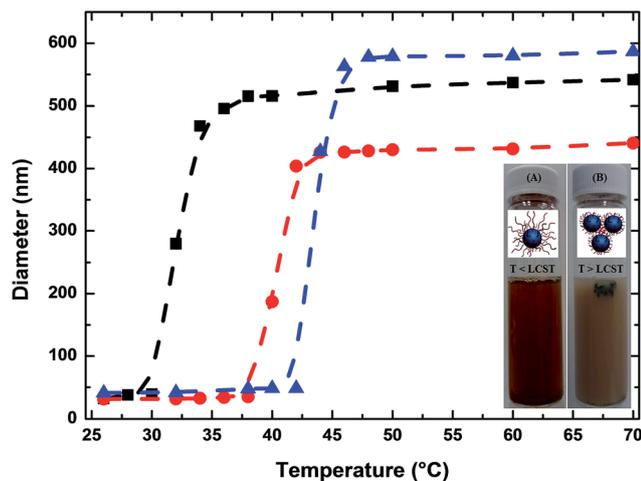


Fig. 4 (A) Evolution of $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{80}\text{-co-OEGMA}_{20})\text{-FA}$ (black), $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-co-OEGMA}_{35})\text{-FA}$ (red) and $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-co-OEGMA}_{40})\text{-FA}$ (blue) diameter and aggregation with temperature. The solutions of the NPs dispersed in water below the and above the LCST are illustrated in (A) and (B) respectively.

results are presented in Fig. S4.† A reversible behavior in physiological media upon heating and cooling was demonstrated for all the samples. This behavior is in perfect agreement with the high hydration capacity of the ethylene glycol groups below the collapse temperature and the chains shrinking above the latter. No influence of FA was detected on the collapse temperature of the polymer chains.

3.1.4 Influence of the amount of copolymer grafted at the surface of SPIONPs. The organic content of the SPIONPs was determined by TGA measurements in the 25 to 500 °C temperature range (Fig. S5†). The weight loss observed between 25 and 250 °C can be attributed to the evaporation of water molecules. The second weight loss between 250 and 450 °C corresponds to the thermal decomposition of the copolymer. The weight loss varies from 48% for the $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{80}\text{-co-OEGMA}_{20})\text{-FA}$ NPs to 43% for $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-co-OEGMA}_{40})\text{-FA}$ NPs. This indicates that a high amount of copolymer is grafted at the surface of the NPs. By comparison of our results to previous reports in which the copolymers are grafted at NPs surface by the grafting-to process (amount of copolymer varying from 8 to 15%),³⁰ it could be noticed that the use of the grafting-from process allows the anchorage of higher amount of polymer at the surface of the SPIONPs. This high density of polymer chains is very promising as the amount of drug that will be encapsulated within the NPs is dependent on the amount of polymer chains grafted on the NPs.

3.1.5 Magnetic measurements. The saturated magnetization of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-co-OEGMA}_{40})\text{-FA}$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{80}\text{-co-OEGMA}_{20})\text{-FA}$ NPs are of $0.0551 \pm 0.000X \text{ emu g}^{-1}$ and $0.1976 \pm 0.000X \text{ emu g}^{-1}$, values lower than that of the uncoated Fe_3O_4 NPs (0.0017) (Fig. 5). This can be attributed to a decrease in the magnetic interaction with diamagnetic coating.¹⁷ Although the magnetism has decreased, NPs quickly and firmly interact with the magnet (Fig. 5). The remanence (M_r) and coercivity (H_c) for $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-co-OEGMA}_y)\text{-FA}$ NPs were close

to zero, which is typical for superparamagnetic NPs.^{6–8,10,29} A similar behavior was observed for the samples that do not contain FA (Fig. S6†). To confirm the superparamagnetic behavior of the NPs, Field-Cooling (FC) and the Zero-Field-Cooling (ZFC) experiments were performed. The magnetization-dependent temperature was studied at an applied field of 750 Oe between 5 and 300 K. Fig. 6 shows the ZFC and FC curves of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-co-OEGMA}_{40})$ sample. The ZFC curves of the NPs are characterized by a gradual increase of the magnetization with the temperature until the blocking temperature (T_B), which is related to the progressive rotation of the magnetization of the blocked magnetic NPs toward the field direction.³⁰ Above the T_B , the magnetization started to decrease with the temperature which indicates that the NPs magnetization is free to align with the magnetic field during the measurement. This special behaviour is the fingerprint of superparamagnetism. As can be seen in Fig. 6, the ZFC curve indicates a blocking temperature of about 250 K, and above this temperature the core/shell NPs are superparamagnetic, in other word the $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-co-OEGMA}_{40})$ display superparamagnetic behavior at room temperature and above.

3.1.6 DOX release properties of the SPIONPs. DOX was chosen as model drug to determine the drug-release properties of the NPs. DOX is one of the most used chemotherapeutic anti-cancer drug and its efficiency relies in its ability to intercalate into DNA and inhibit the action of the topoisomerase II, an essential enzyme for the cell division and development.³¹ This inhibition leads to the cell death by damaging the DNA. However, as almost all anti-cancer drugs, DOX causes harmful side effects.³¹ It is then obvious that reducing its amount during the treatment is crucial in cancer therapy. The NPs developed in this work were designed to encapsulate DOX within the copolymer chains by supramolecular interactions and release it in high concentration once the targeted site and the desired temperature are reached. This should prevent any interaction between the drug and the healthy tissues during the DOX circulation within the body. DOX is well known to be display hydrophobic properties, which could promote the association of the drug with the apolar domains of

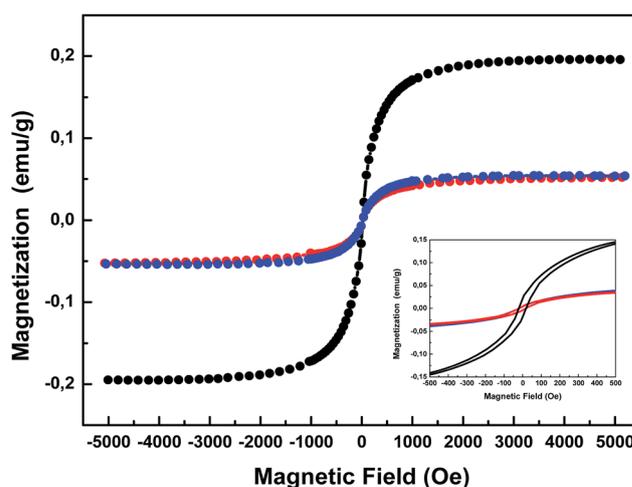


Fig. 5 Magnetization curves of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{80}\text{-co-OEGMA}_{20})\text{-FA}$ (black), $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-co-OEGMA}_{35})\text{-FA}$ (red) and $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-co-OEGMA}_{40})\text{-FA}$ (blue) magnetic NPs.

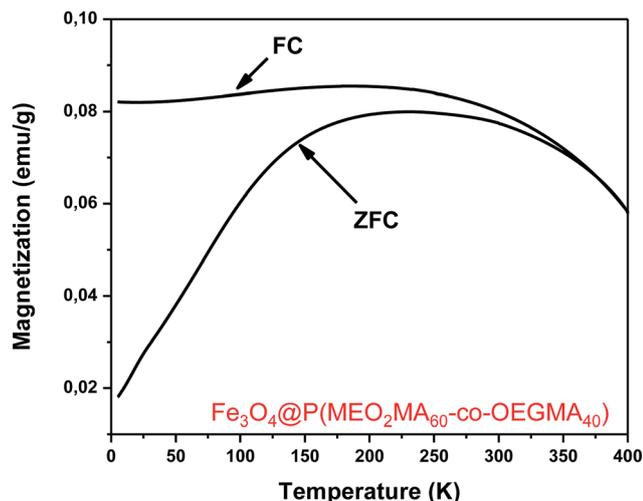


Fig. 6 Temperature variation of ZFC and FC of $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-co-OEGMA}_{40})$, $B = 750$ Oe.

the grafted polymer chains. Hydrogen bonds and van der Waals interactions can also be considered but the main interactions that allow the drug penetration within the polymer shell are the apolar interactions.^{32,33} Supramolecular interactions were used to encapsulate the drug for two main reasons, first to evaluate the stability of the encapsulation by those weak associations, second to develop a system that can release quickly with temperature without the need of a further step of drug linkage as it is the case when the drug is covalently grafted at the NPs surface. Indeed, while the copolymer chains are swollen below the LCST thanks to the hydrogen bonding with water, DOX can diffuse within the copolymer shell and be blocked by the apolar interactions with the polymer backbone. Once the LCST reached, the coil-to-globule transition resulting from the dehydration of the polymer chains and their collapse at the surface of the NPs will allow the release of DOX. A previous study demonstrated that these copolymer chains exhibit a sharp transition with the temperature leading to the fast release of the encapsulated drug.³⁴ We have chosen to perform experiments within a short time lapse (30 s) to demonstrate the temperature effect on our core/shell NPs.

Fig. 7 presents the evolution of the cumulative drug release vs. temperature for $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})\text{-FA}$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-FA}$ NPs. These samples were selected as they display an LCST in PBS close to 40 °C (based on the DLS results presented in Fig. 4), which is important for further applications as drug carrier. Surprisingly, almost no drug was released for both samples below the LCST (Fig. 7). DOX is indeed only stored in the carrier by supramolecular interactions that can be weakened in media with high ionic strength. By increasing the temperature, we could observe a change in the slope of the curve as soon as the LCST is reached. The release was expected to occur at 38 and 44 °C for $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-FA}$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})\text{-FA}$ NPs, respectively, as shown by the LCST measurements. However, once DOX associated with the NPs, the starting temperature at which DOX is released, which is also the temperature at which the copolymer chain is supposed to

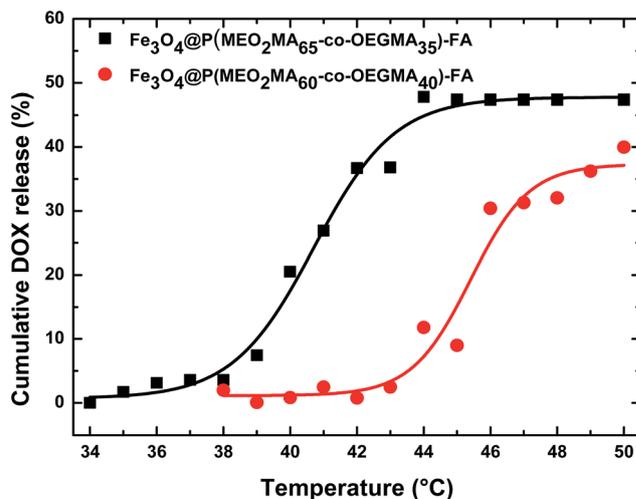


Fig. 7 Cumulative DOX release by the core/shell NPs.

start to collapse, is shifted by 5 °C for both samples. DOX incorporated within the polymer shell seems to act as a kosmotrope molecule which is able to induce an early collapsing of copolymer chains.^{14,35,36} Moreover, as seen in Fig. 7, the temperature range of the DOX release is larger (about 5 °C) for both samples compared to media without DOX, which is the indication that the NPs gradually release DOX. Interestingly, the evolution of the drug release rate is also influenced by the OEGMA amount within the polymer backbone.

For core/shell NPs containing a high amount of OEGMA, *i.e.* $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-FA}$ NPs, the temperature range between the starting of the drug release and its complete release is increased compared to $\text{Fe}_3\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})\text{-FA}$ NPs. Nevertheless, only 50% of the total amount of the DOX was released within this very short time lapse (30 s), thus confirming the high diffusion of DOX within the copolymer shell³⁴ and indicating that longer times are necessary to release the total amount of the drug from the NPs.

Despite of the short time lapse, we showed that the loading of DOX within these NPs generate a more gradual collapse of the polymer chains. Such a phenomenon is accentuated when the macromolecules are more sterically hindered. Nevertheless, the controlled release of DOX from polymer-coated SPIONPs was obtained. For a good control of the drug release properties of those systems, the kosmotrope nature of DOX has to be taken into consideration when those systems will be considered as carrier for this anti-cancer molecule.

4. Conclusions

In this study, core/shell magnetic NPs covered by polymers allowing cancer targeting and macrophage evasion were successfully prepared. Fe_3O_4 NPs have excellent dispersibility and stability in aqueous medium due to the surface coating by MEO₂MA and OEGMA. The LCST of the copolymer could be easily tuned by varying the initial monomer molar ratio. The combination of temperature-triggering release properties and

the possibility of FA targeting would allow to control where and when the drug will be released but longer time than 30 s have to be considered to release the total amount of the drug. We are currently investigating the drug release mechanism to further improve our systems for fast and efficient drug release properties. Thus, by virtue of these advantages, Fe₃O₄@P(MEO₂MA_x-co-OEGMA_y)-FA NPs can potentially be a good candidate for enhancing the targeting efficiency of cancer cells in bioimaging, biodetection, and other *in vivo* medical applications.

Acknowledgements

The financial support was given by the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS). The authors are thankful to Jaafar Ghanbaja for the TEM characterizations.

References

- 1 D. Thassu, M. Deleers and Y. V. Pathak, *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*, CRC Press, 2007.
- 2 H. M. Duvernoy, *The Human Brain: Surface, Three-Dimensional Sectional Anatomy with MRI, and Blood Supply*, Springer Science & Business Media, 2012.
- 3 L. Li, W. Jiang, K. Luo, H. Song, F. Lan, Y. Wu and Z. Gu, *Theranostics*, 2013, **3**, 595–615.
- 4 P. B. Santhosh and N. P. Ulrih, *Cancer Lett.*, 2013, **336**, 8–17.
- 5 R. Ghosh Chaudhuri and S. Paria, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 2373–2433.
- 6 N. Lee, D. Yoo, D. Ling, M. H. Cho, T. Hyeon and J. Cheon, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 10637–10689.
- 7 S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst and R. N. Muller, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2064–2110.
- 8 P. Kucheryavy, J. He, V. T. John, P. Maharjan, L. Spinu, G. Z. Goloverda and V. L. Kolesnichenko, *Langmuir*, 2013, **29**, 710–716.
- 9 M. Mahmoudi, H. Hofmann, B. Rothen-Rutishauser and A. Petri-Fink, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 2323–2338.
- 10 A. K. Gupta and M. Gupta, *Biomaterials*, 2005, **26**, 3995–4021.
- 11 S. Ganta, H. Devalapally, A. Shahiwala and M. Amiji, *J. Controlled Release*, 2008, **126**, 187–204.
- 12 M. A. C. Stuart, W. T. S. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G. B. Sukhorukov, I. Szleifer, V. V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Luzinov and S. Minko, *Nat. Mater.*, 2010, **9**, 101–113.
- 13 I. Y. Galaev and B. Mattiasson, *Trends Biotechnol.*, 1999, **17**, 335–340.
- 14 D. Schmaljohann, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2006, **58**, 1655–1670.
- 15 E. Wischerhoff, K. Uhlig, A. Lankenau, H. G. Börner, A. Laschewsky, C. Duschl and J.-F. Lutz, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 5666–5668.
- 16 M. Chanana, S. Jahn, R. Georgieva, J.-F. Lutz, H. Bäumlner and D. Wang, *Chem. Mater.*, 2009, **21**, 1906–1914.
- 17 A. M. Jonas, K. Glinel, R. Oren, B. Nyssen and W. T. S. Huck, *Macromolecules*, 2007, **40**, 4403–4405.
- 18 R. Barbey, L. Lavanant, D. Paripovic, N. Schüwer, C. Sugnaux, S. Tugulu and H.-A. Klok, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 5437–5527.
- 19 S. Edmondson, V. L. Osborne and W. T. S. Huck, *Chem. Soc. Rev.*, 2004, **33**, 14–22.
- 20 E. J. A. Dine, Z. Ferjaoui, T. Roques-Carmes, A. Schjen, A. Meftah, T. Hamieh, J. Toufaily, R. Schneider, E. Gaffet and H. Alem, *Nanotechnology*, 2017, **28**, 125601.
- 21 K. Matyjaszewski, W. Jakubowski, K. Min, W. Tang, J. Huang, W. A. Braunecker and N. V. Tsarevsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 15309–15314.
- 22 K. Matyjaszewski, H. Dong, W. Jakubowski, J. Pietrasik and A. Kusumo, *Langmuir*, 2007, **23**, 4528–4531.
- 23 H. Alem, A. Schejn, T. Roques-Carmes, J. Ghanbaja and R. Schneider, *Nanotechnology*, 2015, **26**, 335605.
- 24 V. M. Gaspar, E. C. Costa, J. A. Queiroz, C. Pichon, F. Sousa and I. J. Correia, *Pharm. Res.*, 2015, **32**, 562–577.
- 25 N. Li, T. Li, C. Liu, S. Ye, J. Liang and H. Han, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2016, **12**, 878–893.
- 26 B. Sahoo, K. S. P. Devi, R. Banerjee, T. K. Maiti, P. Pramanik and D. Dhara, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, **5**, 3884–3893.
- 27 H. Maeda, K. Tsukigawa and J. Fang, *Microcirculation*, 2016, **23**, 173–182.
- 28 H. Maeda, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2015, **91**, 3–6.
- 29 Y.-X. J. Wang, S. M. Hussain and G. P. Krestin, *Eur. Radiol.*, 2001, **11**, 2319–2331.
- 30 A. Gloria, T. Russo, U. D'Amora, S. Zeppetelli, T. D'Alessandro, M. Sandri, M. Bañobre-López, Y. Piñeiro-Redondo, M. Uhlarz, A. Tampieri, J. Rivas, T. Herrmannsdörfer, V. A. Dediu, L. Ambrosio and R. D. Santis, *J. R. Soc., Interface*, 2013, **10**, 20120833.
- 31 K. Hagane, T. Akera and J. R. Berlin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1988, **246**, 655–661.
- 32 A. Hervault, A. E. Dunn, M. Lim, C. Boyer, D. Mott, S. Maenosono and N. T. K. Thanh, *Nanoscale*, 2016, **8**, 12152–12161.
- 33 D. Missirlis, R. Kawamura, N. Tirelli and J. A. Hubbell, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2006, **29**, 120–129.
- 34 S. Louguet, B. Rousseau, R. Epherre, N. Guidolin, G. Goglio, S. Mornet, E. Duguet, S. Lecommandoux and C. Schatz, *Polym. Chem.*, 2012, **3**, 1408–1417.
- 35 S. Z. Moghaddam and E. Thormann, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 27969–27973.
- 36 J. Iwahara, A. Esadze and L. Zandarashvili, *Biomolecules*, 2015, **5**, 2435–2463.

Doxorubicin-Loaded Thermoresponsive Superparamagnetic Nanocarriers for Controlled Drug Delivery and Magnetic Hyperthermia Applications

Zied Ferjaoui,[†] Enaam Jamal Al Dine,[†] Aigul Kulmukhamedova,^{‡,§} Lina Bezdetnaya,^{‡,§} Crosby Soon Chang,[†] Raphaël Schneider,^{||} Fabrice Mutelet,^{||} Damien Mertz,[⊥] Sylvie Begin-Colin,[⊥] Fabienne Quilès,[#] Eric Gaffet,[†] and Halima Alem^{*,†}

[†]Institut Jean Lamour (IJL, UMR 7198), Université de Lorraine, CNRS, Campus Artem 2 allée André Guinier - BP 50840, F-54011 Nancy Cedex, France

[‡]Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN, UMR 7039), Université de Lorraine, CNRS, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

[§]Research Department, Institut de Cancérologie de Lorraine, 6 avenue de Bourgogne, CS 30519, F-54519 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

^{||}Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, (LRGP, UMR 7274), Université de Lorraine, CNRS, F-54000 Nancy, France

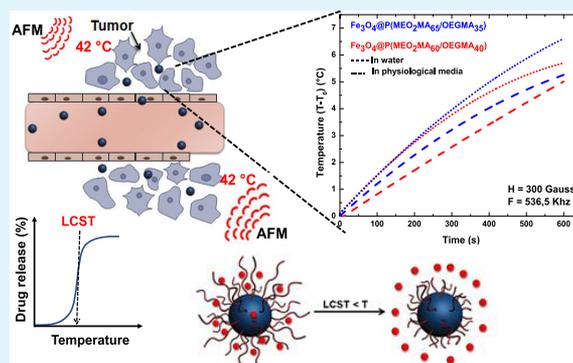
[⊥]Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg (IPCMS, UMR 7504), Université de Strasbourg, CNRS, UMR 7504, F-67034 Strasbourg, France

[#]Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie et Matériaux pour l'Environnement (LCPME, UMR 7564), Université de Lorraine, CNRS, F-54600 Villers-lès-Nancy, France

Supporting Information

ABSTRACT: This study reports on the development of thermoresponsive core/shell magnetic nanoparticles (MNPs) based on an iron oxide core and a thermoresponsive copolymer shell composed of 2-(2-methoxy)ethyl methacrylate (MEO₂MA) and oligo(ethylene glycol)methacrylate (OEGMA) moieties. These smart nano-objects combine the magnetic properties of the core and the drug carrier properties of the polymeric shell. Loading the anticancer drug doxorubicin (DOX) in the thermoresponsive MNPs via supramolecular interactions provides advanced features to the delivery of DOX with spatial and temporal controls. The so coated iron oxide MNPs exhibit superparamagnetic behavior with a saturation magnetization of around 30 emu g⁻¹. Drug release experiments confirmed that only a small amount of DOX was released at room temperature, while almost 100% drug release was achieved after 52 h at 42 °C with Fe_{3-δ}O₄@P(MEO₂MA₆₀OEGMA₄₀), which grafted polymer chains displaying a low critical solution temperature of 41 °C. Moreover, the MNPs exhibit magnetic hyperthermia properties as shown by specific absorption rate measurements. Finally, the cytotoxicity of the core/shell MNPs toward human ovary cancer SKOV-3 cells was tested. The results showed that the polymer-capped MNPs exhibited almost no toxicity at concentrations up to 12 μg mL⁻¹, whereas when loaded with DOX, an increase in cytotoxicity and a decrease of SKOV-3 cell viability were observed. From these results, we conclude that these smart superparamagnetic nanocarriers with stealth properties are able to deliver drugs to tumor and are promising for applications in multimodal cancer therapy.

KEYWORDS: core/shell MNPs, responsive nanomaterials, hyperthermia, drug delivery, SKOV-3 cells



1. INTRODUCTION

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) are well known to display magnetization only when a magnetic field is applied.^{1,2} Moreover, they can generate heat upon application of a local high frequency alternating magnetic field (HAMF).^{1,3–7}

This is particularly interesting when considering cancer therapy since cancer cells hardly survive heating to 45 °C.^{8–10} Indeed, over 42 °C, the natural enzymatic processes ensuring the cells to

be alive are destroyed, and the cancer cells become very sensitive to temperature.^{11,12} With regard to the magnetic hyperthermia properties, the development of SPIONs for cancer therapy using magnetic hyperthermia is an increasing research field.

Received: June 14, 2019

Accepted: July 9, 2019

Published: July 30, 2019

Furthermore, the use of these nano-objects is also envisioned for imaging and theranostics. Many structures with efficient magnetic hyperthermia properties have been developed like iron oxide nanoparticles^{15–16} and lanthanide-doped NPs.¹⁷ To target specific application and ensure the stability of the SPIONs, the grafting of polymer macromolecules at the surface of polymeric SPIONs is appealing compared to small molecules since the final core/shell NPs can take advantages of the macromolecule's physicochemical properties in physiological media.¹⁸ Hence, the stimuli-responsive polymers have been grafted at the surface of SPIONs to ensure responsiveness and drug loading and release at the physiological range.^{19,20} Thermoresponsive polymers are indeed known to exhibit either an upper critical solution temperature (UCST) or a low critical solution temperature (LCST).^{19,21–23} When the UCST is reached upon heating, the polymers become hydrophilic, whereas the LCST is the temperature at which the polymer chains will shrink due to the release of the water molecule from their backbone leading to a decrease of the volume and their hydrophobicity.²¹ Consequently, the use of thermoresponsive polymers displaying an LCST in the temperature range of 40–42 °C is of high interest for the design of core/shell NPs for biomedical applications.^{19,23} Below the targeted temperature, once the thermoresponsive macromolecules are covalently grafted at the surface of SPIONs, the NPs can trap a cancer drug by specific interactions, whereas their hydrophilicity allows their good dispersion and circulation in the blood.^{24,25} Upon heating locally at 40–42 °C, the drug release could be triggered in a temporally controlled way.^{25,26}

For example, poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM), which is the most commonly used thermally responsive polymers with LCST of 32 °C, was grafted at the surface of SPIONs via grafting onto and grafting-from process. However, the low LCST²⁷ and the cytotoxicity²⁸ of PNIPAM prevent its use for further clinical applications. Furthermore, pH-responsive polymers with cationic groups in their backbone, such as poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate) (PDMAEMA), were grafted at the surface of inorganic core/shell γ -Fe₂O₃@SiO₂ and loaded with a high amount of DOX (essentially within the silica shell), and RohB and the pH-dependent release of the drug was demonstrated.²⁹ Another example in the literature shows that PDMAEMA and other positively charged polymers such as polyethylenimine and polyamidoamine can be used as gene carriers for gene delivery applications with nucleic acids loaded via electrostatic adsorptions.^{4,18,22,30,31} For more details, the reader can refer to the following detailed reviews.^{4,22,32} Moreover, when considering further applications of MNPs, which involve their introduction in biological environments such as blood, interstitial fluid, or the extracellular matrix, the rapid covering of their surfaces by various proteins (called protein corona) has to be considered.^{17,33–38} This protein corona modifies the particle surface energy, size, cellular uptake, biodistribution, and toxicity. To achieve NPs with stealth properties, on one hand, poly(ethylene glycol) (PEG) chains were grafted on their surface by the grafting-to process (the grafting of presynthesized polymer chains) method.^{15,39,40} On the other hand, copolymers based on 2-(2-methoxy)ethyl methacrylate (MEO₂MA) and oligo(ethylene glycol)-methacrylate (OEGMA) moieties have shown interesting features compared to PEG. Indeed, besides being biocompatible and protein repellent, these polymers are thermoresponsive and display a tunable LCST in the range of body temperature depending on the ratio of the monomers used.^{25,41,42}

In this work, we report then the development and the characterization of superparamagnetic and thermoresponsive core/shell NPs that can be used as drug delivery systems. We have investigated *in vitro* their use as drug carriers toward the human ovarian cancer cell line (SKOV-3 cells). These NPs are composed of Fe_{3– δ} O₄ NPs coated with P(MEO₂MA_{*x*}–OEGMA_{100–*x*}) (where *x* and 100–*x* represent the molar fractions of MEO₂MA and OEGMA, respectively) and loaded with the cancer drug doxorubicin (DOX). The synthesis of SPIONs and the grafting of the copolymer on their surfaces were performed following the method reported earlier by Alem et al.⁴³

The thermoresponsive polymer was engineered to display an LCST around 41 °C in physiological medium (PM), above the temperature required for living cells in normal conditions. The drug release kinetics was studied for DOX and the release profile was found to be dependent on temperature and time in the culture medium. The drug release occurred at around 42 °C with a cumulative DOX release of around 100% within 52 h. It has been also shown that such prepared drug-loaded magnetic MNPs displayed magnetic hyperthermia properties as the heat was delivered when an alternating magnetic field was applied.

The cytotoxicity results showed that the core/shell MNPs exhibit limited cytotoxicity toward SKOV-3 up to a concentration of 12 μ g mL^{–1}. When loaded with DOX, upon its release, MNPs were much more cytotoxic toward those cells than the free DOX.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich, except for ((chloromethyl)phenylethyl)trimethoxysilane (CMPETMS) (Gelest, >95%). All of the reagents were used as received.

The synthesis of sodium citrate stabilized Fe_{3– δ} O₄ MNPs was carried out using iron(III) chloride hexahydrate (Lancaster, 98%), iron(II) sulfate heptahydrate (Merck, 99.5%), ammonia solution (NH₃, 28–30% w/v), and sodium citrate (99.8%), which were all purchased from Sigma-Aldrich. To graft the polymerization initiator, ((chloromethyl)phenylethyl)trimethoxysilane (CMPETMS) (Gelest, >95%), tetramethylammonium hydroxide pentahydrate (TMAOH) (VWR chemicals, 99.8%), and toluene (Laboratory Reagent, >99.3%) were used. To conduct the grafting of the P(MEO₂MA_{*x*}–OEGMA_{100–*x*}) by surface-initiated polymerization, the 2-(2-methoxy)ethyl methacrylate (MEO₂MA) (98%), oligo(ethylene glycol) methacrylate (OEGMA) (98%), *N,N*-dimethylformamide (DMF) (>99.8%), dimethyl sulfoxide (DMSO) (>99.8%), and Milli-Q water from Sigma-Aldrich, were used. The biological studies were performed in Dulbecco's modified eagle's medium high glucose (DMEM; Sigma-Aldrich, Saint-Louis) for the growth of the cells, supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, Saint-Louis), 100 U mL^{–1} penicillin, 100 g mL^{–1} streptomycin, 4 mM L-glutamine, and 0.25 μ g mL^{–1} of amphotericin B. Cells were grown in an incubator at 37 °C, 5% CO₂ atmosphere, and humidity.

2.2. Synthesis of Fe_{3– δ} O₄ MNPs. Superparamagnetic Fe_{3– δ} O₄ nanocrystals were synthesized by coprecipitation. A mixture of FeCl₃·6H₂O (6 mmol; 1.622 g) and FeSO₄·7H₂O (5 mmol; 1.39 g) was dissolved in 40 mL water in a three-necked round bottom flask. 5 mL of a 28% (v/v) aqueous ammonia solution was subsequently added to the mixture and the final solution was heated at 90 °C under an argon atmosphere with magnetic stirring. Then, 4.4 g (14.9 mmol) of sodium citrate in 15 mL of water was added dropwise until a black solution was obtained. The reaction mixture was further stirred for 30 min. Fe_{3– δ} O₄ SPIONs were finally recovered by magnetic separation, washed several times with ethanol, and redispersed in 100 mL of water.

2.3. Synthesis of CMPETMS-Coated Fe_{3– δ} O₄ MNPs (Fe_{3– δ} O₄@Silane). SPIONs were dispersed in 10 mL of toluene under argon. CMPETMS (0.2 mmol, 49.1 μ L) was injected and the mixture was stirred for 2 min. Then, 1 mL of an ethanolic solution of

tetramethylammonium hydroxide pentahydrate (TMAOH) (36.25 mg) was added and the mixture was further stirred under argon for 15 min at 50 °C. The mixture was then cooled to room temperature and SPIONs were separated by centrifugation and washed two times with toluene. The silanized SPIONs were dispersed in 10 mL of toluene, and 2 mL of an ethanolic solution of TMAOH (36.25 mg) was injected.

The reaction was conducted under argon for 30 min at 50 °C under magnetic stirring. The mixture was cooled in a water bath, SPIONs were separated by centrifugation, and washed two times with toluene.

2.4. Synthesis of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_x-\text{OEGMA}_{100-x})$. The growth of $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_x-\text{OEGMA}_{100-x})$ from the iron oxide MNP surface was conducted using an adapted protocol described by Alem et al.⁴³ Briefly, in a 100 mL Schlenk flask, 50 mg of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @silane MNPs were dispersed in 10 mL of a DMF/DMSO mixture (10:90, v/v). MEO_2MA (1.6 mL) and OEGMA (1.14 mL) were added for the synthesis of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}-\text{OEGMA}_{40})$, whereas 1.26 mL of MEO_2MA and 1 mL of OEGMA were added for the synthesis $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}-\text{OEGMA}_{35})$. Once the MNPs were completely dispersed, 200 mL of $\text{CuBr}_2/\text{TPMA}$ (0.884 mmol CuBr_2 , 4.3 mmol TPMA) stock solution in DMSO was added to the mixture. The reaction mixture was stirred and heated to 65 °C. Next, 250 mL of a stock solution of hydrazine in DMSO (7.1 mg mL^{-1}) was added and the mixture was stirred for 2 h at 65 °C with argon. At the end of the polymerization, the mixture was poured drop by drop into hot Milli-Q water to precipitate the insoluble components. The materials were purified by redispersion of the core/shell MNPs in cold water followed by centrifugation of the solution after heating.

2.5. Drug Conjugation to MNCs. Conjugation of DOX with the MNPs was achieved through the formation of hydrogen bonds with the ether-oxide groups of the $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}-\text{OEGMA})$ copolymer (as illustrated in Figure 6). DOX and MNCs were mixed in DMEM (pH = 7.4) and the mixture was gently shaken in the dark for 24 h at room temperature, thereby leading to the conjugation of DOX via the imine linkage. The DOX-loaded MNCs (DOX–MNCs) were retrieved by magnetic separation and washed thoroughly with DMEM until no DOX was detected in the supernatant (at least 10 washing cycles). The concentration of released DOX as a function of time (at 37 and 42 °C) was calculated by measuring the absorbance of the supernatant at 480 nm of the free DOX remaining in solution. The drug loading content (DLC), drug loading efficiency (DLE), and percentage of drug released (%) could then be calculated from eqs 1–3

$$\text{DLC (wt\%)} = \frac{\text{amount of DOX in the MNPs}}{\text{amount of MNPs}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{DLE (wt \%)} = \frac{\text{amount of DOX in the MNPs}}{\text{total amount of feeding drug}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{percentage of drug released} = \frac{\text{mass of drug released}}{\text{mass of drug loaded}} \times 100\% \quad (3)$$

2.6. Characterization Methods. Dynamic light scattering (DLS) was performed at room temperature using a Malvern Zetasizer HSA instrument with a He–Ne laser (4×10^{-3} W) at a wavelength of 633 nm. The MNP aqueous solutions were filtered through Millipore membranes (0.2 mm pore size). The data were analyzed by the CONTIN method to obtain the hydrodynamic diameter and size distribution in each aqueous dispersion of MNPs. For transmission electron microscopy (TEM) experiments, one drop of a dispersed solution of MNPs was deposited on holey carbon grids and imaged. The microscope used was an ARM 200F. The crystallographic structure of the MNPs was identified by X-ray diffraction (XRD) using a Philips PW3710 diffractometer with $\text{Cu K}\alpha$ radiation. Fourier-transform infrared (FTIR) measurements were conducted (i) on powders using a Nicolet 6700 FTIR spectrometer equipped with a deuterated triglycine sulfate detector in the 400–7000 cm^{-1} wavelength range (i.e., 1.24–25 mm) in a reflection mode (ii) on suspensions in DMEM with a Bruker Vertex 70v using a nine-reflection diamond ATR accessory (DurasamplIR, SensIR Technologies, incidence angle: 45°). A SETSYS

supersonic thermobalance (SETARAM) was used for thermogravimetric measurements. The furnace made of graphite element operates from room temperature up to 1600 °C. The apparatus was controlled by software appointed Calisto. Dry samples of 30 mg were placed in an alumina crucible with a volume of 30 mL. The samples were heated from room temperature to 600 °C at a heating rate of 5 °C min^{-1} under an argon atmosphere. The magnetic properties of the core/shell MNPs were studied by a superconducting quantum interference device SQUID-VSM combined with a vibrating sample magnetometer.

2.7. In Vitro Magnetic Hyperthermia. **2.7.1. Heat Capacity Measurements.** Heat capacities of mixtures at atmospheric pressure were measured using a Calvet type calorimeter, Setaram C80 (France) in a range of temperature from 298 to 373.15 K. A full description of the procedure is given in previous work.^{44,45} In few words, the sample temperature was first fixed at 298 K for 2 h. Then, the scanning rate was set to 0.5 K min^{-1} up to 373 K. This temperature was maintained for 1 h.

2.7.2. Magnetic Hyperthermia Measurements. Magnetic heating measurements were performed to assess the heating performances of the nanocomposites using a magnetic hyperthermia induction apparatus composed of a DM 100 instrument and a DM applicator (Nanoscale Biomagnetics, nB), using MaNiAc software. The system was set to operate at a frequency $f = 536.5$ kHz and field amplitude $H = 300$ Gauss. Samples made of 1 mL of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA}_x-\text{OEGMA}_{100-x})$ dispersed in water (DMEM) with a concentration of 4.5 mg mL^{-1} were placed in the middle of the coil. The increase in temperature was continuously logged using optic fiber probes centered in the suspension. The measurement started when the temperature of the suspension was stabilized at room temperature, and the measurement time was limited to 10 min. The specific absorption rate (SAR) was commonly employed to quantify the heat dissipation rate of a given ferrofluid, even though it was not an intrinsic property of the system as it was strongly dependent upon the frequency and field amplitude used during the measurement. First, a second-order polynomial function was used to fit the plot over the first 120 s and determine $[\text{dT}/\text{dt}]_{t=0}$. In the fitted plot $\Delta T(t) = \text{intercept} + a \times T + b \times T^2$, the a value corresponds to $[\text{dT}/\text{dt}]_{t=0}$ as detailed by Périgo et al.⁷ This allows us to finally calculate the SAR value using the following equation

$$\text{SAR} = \frac{C \Delta T}{m_{\text{Fe}} \Delta t} \quad (4)$$

where C denotes the specific heat capacity of the sample, m_{Fe} is the iron mass per unit volume of liquid, and $\Delta T/\Delta t$ represents the initial temperature rise rate. The SAR was then calculated with regard to iron oxide mass.

2.8. DOX Release Kinetics Studies. To determine the mechanism of drug release and the release rate, the data obtained were fitted with the most relevant kinetic models for our system, such as zero-order, first-order, Higuchi and Korsmeyer–Peppas release models.¹⁶

The zero-order kinetic release is concentration-dependent and can be expressed as

$$M_t = M_0 + K_0 \cdot t \quad (5)$$

where M_t is the amount of drug dissolved in time t , M_0 is the initial amount of drug in the solution ($M_0 = 0$), and K_0 is the zero-order release constant expressed in units of concentration/time.

The first-order kinetic release is concentration-dependent and can be expressed as

$$M_t = M_{\infty} [1 - \exp(-K_1 \cdot t)] \quad (6)$$

where M_0 is the initial concentration of a drug, K_1 is the first-order rate constant, and t is the time.

Higuchi model describes a drug released from solid matrices as

$$M_t = K_h \cdot t^{1/2} \quad (7)$$

where M_t is the drug released at time t and K_h is the rate constant. Once a plot of $M_t/t^{1/2}$ is linear with a slope ≥ 1 , it is considered to follow the Higuchi drug release kinetics.

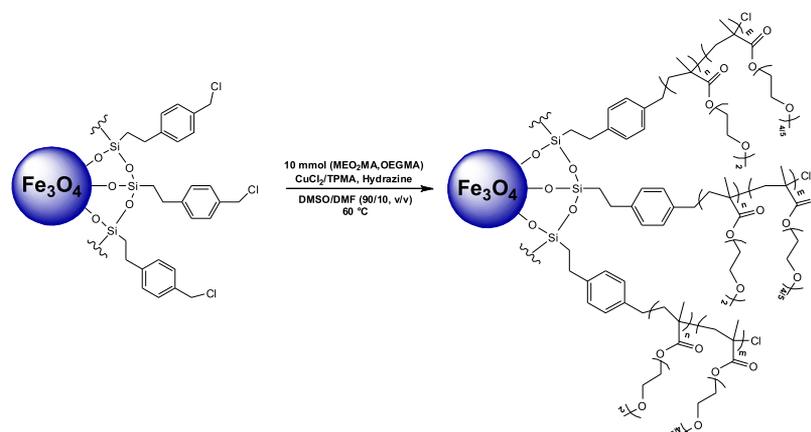


Figure 1. Schematic illustration of the synthetic process for the preparation of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ MNPs.

Korsmeyer–Peppas model consists of a simple relationship, which describes a drug release from a polymeric matrix, and written as

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_{kp} \cdot t^n, \quad \frac{M_t}{M_\infty} < 0.6 \quad (8)$$

where M_t/M_∞ is the drug release fraction at time t ; K_{kp} is a constant; and n is the release exponent. The release model follows Fickian diffusion as $n \leq 0.5$, while non-Fickian as $0.5 < n < 1$.¹⁶ By comparing the regression coefficient (R^2) of different models, the accuracy of each fitting could be verified. For each temperature, the model giving the highest R^2 was considered as the best fit of the release data.

2.9. Biological Characterization. The human ovarian adenocarcinoma cell line SKOV-3 was obtained from ATCC (LGC Promochem, Molsheim, France). The cells were grown in a humidified atmosphere, 5% CO_2 , at 37 °C in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) without phenol red (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 9% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 1% 200 mM L-glutamine (Life Technologies, Carlsbad). Three days before adding the MNPs, SKOV-3 cells were trypsinized, recovered in supplemented DMEM and seeded in a 96-well plate at 10^5 cells mL^{-1} (2.5×10^4 cells per well). The cells were exposed to free DOX (range 1.3–10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ (range 0.78–12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), or DOX-loaded $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ (range 1.3–10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MNPs) for 24 h at 37 °C or 5 h at 41 °C.

Cell viability was assessed by the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; Sigma] colorimetric assay, which measures the capacity of mitochondrial dehydrogenase in viable cells to reduce MTT to purple formazan crystals. Following incubation, the cells were washed twice with cold PBS, fresh medium was added, and the cells were maintained in an incubator. 24 h later, the medium was removed, the MTT solution was added to each well, and the cells were placed in an incubator for 3 h. The formazan crystals were solubilized by adding dimethyl sulfoxide and the absorbance was measured at 540 nm with a plate reader (Ascent Multiskan). The cell death percentage was obtained by referring the treated samples to control nontreated cells.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Characterization of $P(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_y)$ Growth from SPIONS. The efficiency of the growth of $P(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ by the ARGET-ATRP process from the $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@$ silane surface, as illustrated in Figure 1, was confirmed by FTIR. The spectrum of MNPs shows two broad bands at 1556 and 1394 cm^{-1} mainly assigned to the carboxylate group from the remaining citrate groups. The band at 1247 cm^{-1} was assigned to the Si- CH_2 -R groups near the core, and the overlapped bands between 1150 and 1000 cm^{-1} were assigned to the stretching bands from C-OH, Si-O-Si, and Si-O

groups. Concerning the polymer chain chemical signature, absorption bands located at 1720 and 1110 cm^{-1} are assigned to the ester C=O and C-O bonds stretching of the repetitive unit moieties of the $P(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ (see Figure S1).

The amount of copolymer anchored at the MNP surface is of importance as it is directly linked to the amount of drug that can be loaded within the core/shell MNPs. Thermogravimetric analysis was conducted, and as can be seen in Figure 2,

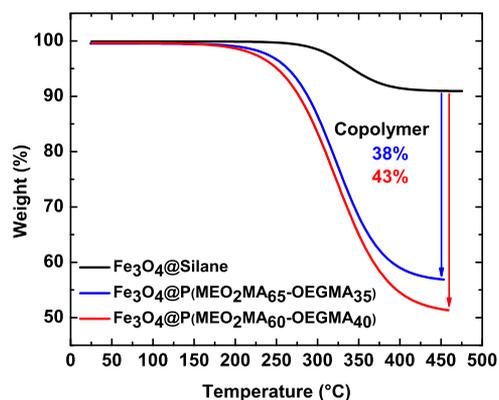


Figure 2. TGA–DTA analysis in a N_2 atmosphere (from room temperature to 600 °C at a heating rate of 5 °C min^{-1}).

depending on the ratio $\text{MEO}_2\text{MA}/\text{OEGMA}$, the amount of the grafted polymer varied from 38% for the $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ to 43% for the $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$, the reference being the $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@$ Silane MNPs. This high calculated amount of copolymer confirms the advantage of the use of grafting-from process (growth of the macromolecule from the MNPs surfaces) compared to the grafting-to process (grafting of the copolymer after its synthesis) that has been shown to lead to amounts of polymers varying between 8 and 15% at the surface of the MNPs.^{15,30}

3.2. Core/Shell MNP Microstructure. To study the microstructure of the MNPs, TEM and high resolution-transmission electron microscopy (HR-TEM) experiments were performed. In Figure 3a, the TEM micrographs of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ confirmed the spherical shape of MNPs with an average size of 10.0 ± 1.5 nm (calculated from TEM images). Moreover, a good coverage of the MNP surfaces by the copolymer could be studied by HR-TEM

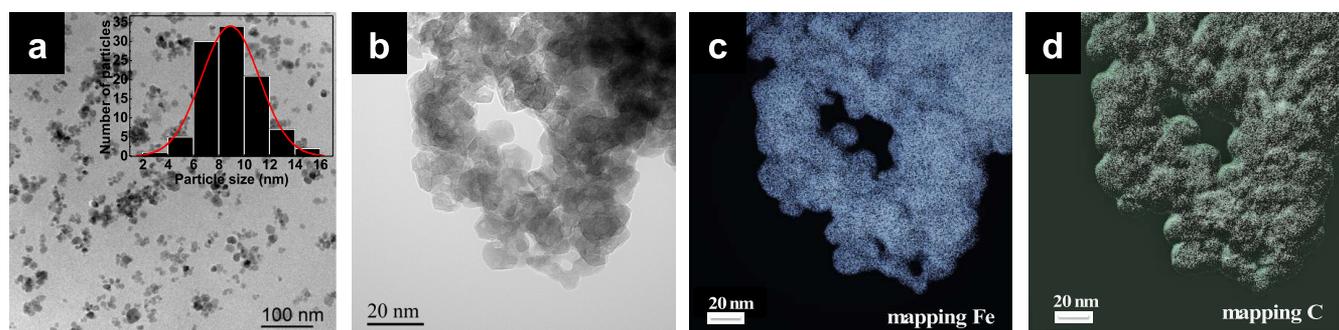


Figure 3. (a, b) TEM micrographs of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ MNPs. (c) Fe mapping images of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ MNPs obtained by EF-TEM, (d) C mapping images of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ MNPs obtained by EF-TEM.

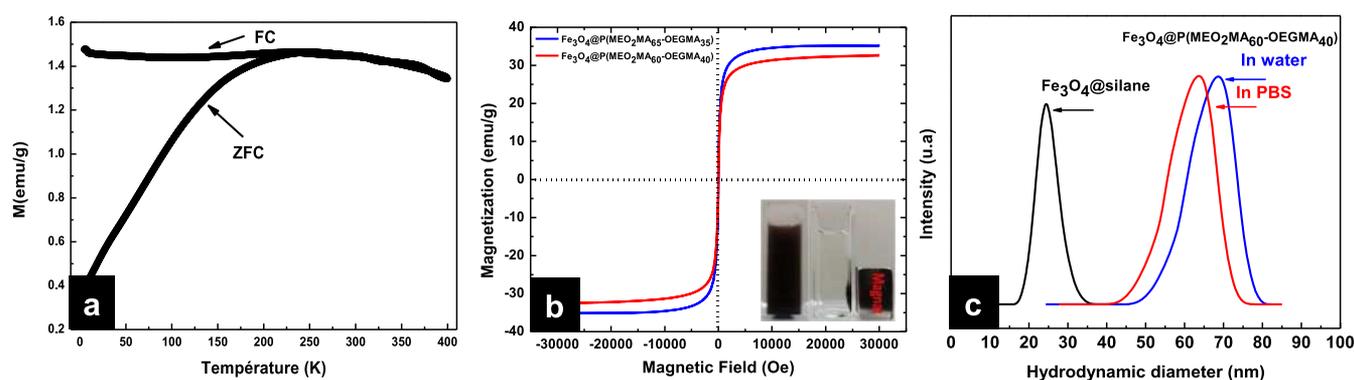


Figure 4. Characterization of NPs, hydrodynamic diameter, and magnetization properties. (a) ZFC/FC curves of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$, $B = 75$ Oe. (b) Magnetization curve of $(\text{MEO}_2\text{MA}\text{-OEGMA}_{100-x})$ -capped $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ NPs at 300 K. (c) Hydrodynamic diameter distribution of bare and $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ MNPs in water and PBS.

combined with energy filtered-transmission electron microscopy (EF-TEM) analysis. The elemental signal of carbon (in white, Figure 3d) was detected at the surface and the interspace between particles indicating the presence of the copolymer around the magnetic MNPs.

Sharp and clearly defined peaks can be observed in the XRD pattern (Figure S2 in the Supporting Information), which indicates a high degree of crystallinity for the MNPs. The diffraction peaks match with the formation of a spinel iron oxide phase. The calculated lattice parameter is 0.841 nm by comparison with those of the Fe_3O_4 magnetite phase of 0.8396 Å (JCPDS PDF no. 00-019-0629) and the maghemite one $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (0.8346 Å, JCPDS file 39-1346). A mean crystallite size of 11.3 nm was calculated from the XRD pattern by the application of the Scherrer equation to the broadening of the (311) reflection signal, which is in good agreement with the particle size determined from TEM micrographs (Figure 3a).

3.2.1. Superparamagnetic Properties of the Core/Shell MNPs. The superparamagnetic properties of the SPIONs at room temperature and as a function of temperature could be verified by the zero-field-cooled–field-cooled (ZFC–FC) measurements. As depicted in Figure 4a, the maximum of the ZFC curve assimilated to the blocking temperature is at around 250 K, which is largely below the physiological temperature range. This blocking temperature is slightly larger than that was reported for other iron oxide nanoparticles with similar sizes, which suggested some aggregation of nanoparticles. Indeed, the presence of dipolar interaction induced a shift of the blocking temperature toward higher temperature.^{46–48} The saturated magnetization of the $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ and $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ MNPs are 30 and

33 emu g^{-1} , respectively, and are lower values than the one for the uncoated $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ MNPs (80 emu g^{-1}) (Figure S3 in the Supporting Information). This can be attributed to a decrease in the magnetic interaction with diamagnetic coating. Despite a decrease of the magnetization, all of the MNPs quickly and firmly interact with a magnet (inset in Figure 4b).

Moreover, this superparamagnetic behavior was evaluated at 5 and 300 K. At 5 K, a hysteresis cycle can be observed due to the transition to a low temperature blocked state with a saturation magnetization of 80 emu g^{-1} and a coercive field of about ≈ 270 Oe. In contrast, at 300 K, no coercive field is observed and a saturation magnetization of 70 emu g^{-1} is obtained for the nude $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ MNPs (Figure S3 in the Supporting Information).

3.2.2. Colloidal Behavior of the Core/Shell Nanoparticles (in Water and in Vitro). To translate these MNPs into clinical applications, a major point is their stability in physiological media. Indeed, contrary to pure water, these media are composed of different salts and proteins that can influence the colloidal behavior of the MNPs. First, the $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@silane$ (in ethanol) displayed a hydrodynamic diameter of about 20–30 nm. In water, the measured $P(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ hydrated coating ($\sim 55\text{--}80$ nm in water and $\sim 50\text{--}75$ nm in PBS) confirms moderate aggregation (Figure 4c). It is worth mentioning that MNPs with sizes varying between 10 and 200 nm preferentially accumulate into tumor than in healthy tissue due to the enhanced permeability and retention effect (EPR).^{13,17} Owing to the porous vascular architecture of the tumors and the degradation of the lymphatic clearance, the MNPs diffusion in tumor tissue would be largely enhanced. The 50–80 nm hydrodynamic diameters of the MNPs developed in this work then seem optimal for the EPR effect.

The responsive behavior and the starting temperature at which the MNPs started to aggregate were also monitored by DLS. As depicted in Figure 5, when solutions of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @

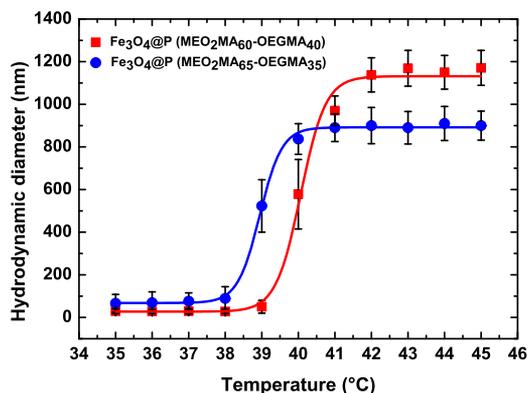


Figure 5. DLS data of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) (red) and $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @P(MEO₂MA₆₅-OEGMA₃₅) (blue) MNPs in DMEM from 35 to 45 °C.

P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) and $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @P(MEO₂MA₆₅-OEGMA₃₅) MNPs are heated from 35 to 45 °C, their hydrodynamic diameter started to increase at 38 and 41 °C, respectively, which corresponds to the LCST's of P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) and P(MEO₂MA₆₅-OEGMA₃₅) in physiological medium (DMEM), respectively. To confirm the complete reversibility of the processes, five successive cycles of heating ($T > \text{LCST}$) and cooling ($T < \text{LCST}$) were conducted (Figure S4). A reversible behavior in the physiological medium upon heating and cooling was demonstrated for the entire sample. This behavior is in perfect agreement with the high hydration capacity of the ethylene glycol groups below the collapse temperature and the chains shrinking above the latter.^{18,19}

3.4. DOX-Loaded Nanoparticulate System Studies.

3.4.1. Interaction between the DOX and the NP-Responsive Shell. To enlighten the interaction between the doxorubicin and the copolymer chains, FT-IR experiments were conducted, and Figure 6 shows that the FTIR-ATR spectra of DOX, MNPs, and NP-DOX recorded in DMEM medium. The assignments were performed according to the literature.^{49–51} The spectrum of DOX (Figure 6a) shows well-defined bands at 1582, 1285, 1269, 1211, 1013, and 990 cm^{-1} assigned to the aromatic moieties of DOX. In addition, the bands at 1724 and 1624 cm^{-1} were

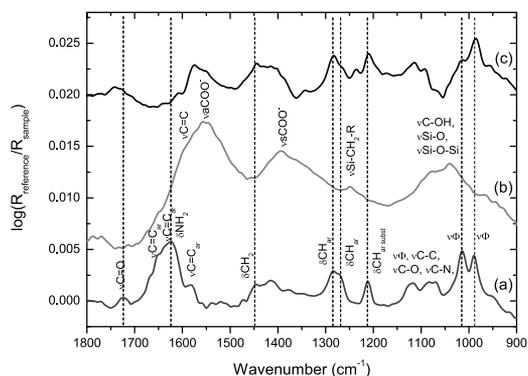


Figure 6. FTIR spectra in the ATR mode of (a) DOX, (b) MNPs, and (c) MNPs-DOX in DMEM medium (reference = DMEM medium).

assigned to the C=O stretching band and the NH₂ bending band, respectively, which clearly differ from the core/shell MNPs as described above. The spectrum of MNPs after contact with DOX and subsequent rinsing shows bands at 1285, 1266, 1211, 1015, and 995 cm^{-1} . They are assigned to the aromatic moieties of DOX, and they ascertain the occurrence of DOX on MNPs. The C=O stretching band absorbs at 1741 cm^{-1} in DOX-MNPs showing probably different hydrogen bonding of the DOX ester group. One interesting feature of the spectrum is the disappearance of the NH₂ bending band previously observed at 1624 cm^{-1} . It strongly suggested that this band was displaced in the region between 1550 and 1580 cm^{-1} where several overlapping bands are observed. This shift is due to strong hydrogen bonding involving the amine group from DOX and the ether-oxide polar groups of the copolymer.

3.4.2. DOX Release Profile and Mechanism as a Function of Temperature. DOX was chosen as a drug model to determine the drug release properties of MNPs. The copolymer responsive behavior translates the fact that upon reaching the LCST, the polymer becomes hydrophobic and shrinks by expelling solvating water molecules. We have shown that DOX interacts with the copolymer polar ether-oxide moieties via hydrogen bonding, as the water molecules. We assumed that DOX molecules are pushing out the water molecules, whereas interacting with the polymer backbone. The drug carrier at different temperatures showed sustained drug release properties in biological media with different release rates. As expected, the release process at 37 °C was much slower than at 42 °C. In the culture medium, after incubation at 37 °C, the initial proportion of the DOX cumulative release from $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) MNPs was 0% within almost 10 h (Figure 7a). The amount of released DOX increased slowly with time and a change in the slope appeared after 25 h of incubation in the culture medium. This change can be related to the presence of different entities in the culture medium, such as proteins and salts, that may act as kosmotropic species (lead to early expelling of water molecules from the grafted polymer chains, which results in a premature collapsing of the polymer chain²⁴), thus inducing the early DOX-polymer bond breaking with time. Finally, after 54 h, the released DOX is 80%.

At 42 °C, a linear increase of drug release with time was observed. As for the studies at 37 °C, the drug release profile with time was not an on/off system. An initial burst release of 20% was observed for the DOX- $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @P(MEO₂MA₆₀-OEGMA₄₀) MNPs followed by a linear increase with time until reaching 100% after 54 h.

Nevertheless, the influence of temperature on the drug delivery process can be clearly seen as the DOX release rate and amount are much higher at 42 °C than 37 °C with time (Figure 7a,b). The same trend of the cumulative DOX release with time was observed for DOX- $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @P(MEO₂MA₆₅-OEGMA₃₅) MNPs. The $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ @P(MEO₂MA₆₅-OEGMA₃₅) MNPs display an LCST at 38 °C in physiological medium, the maximum of DOX release (70%) is reached (after 30 h) and an initial burst of 40% is observed at 42 °C.

The release kinetics and mechanism of DOX from the magnetic MNPs were determined according to the mathematical models previously described. The release parameters for each model (K_1 , K_b , K_{lp} , and n) are shown in Table 1 as well as the correlation values (R^2), which enabled the extraction of an equation for each system in the function of temperature (eqs 9–12). The MNPs display two different release behaviors depending on the temperature. At 37 °C, the zero-order kinetics,

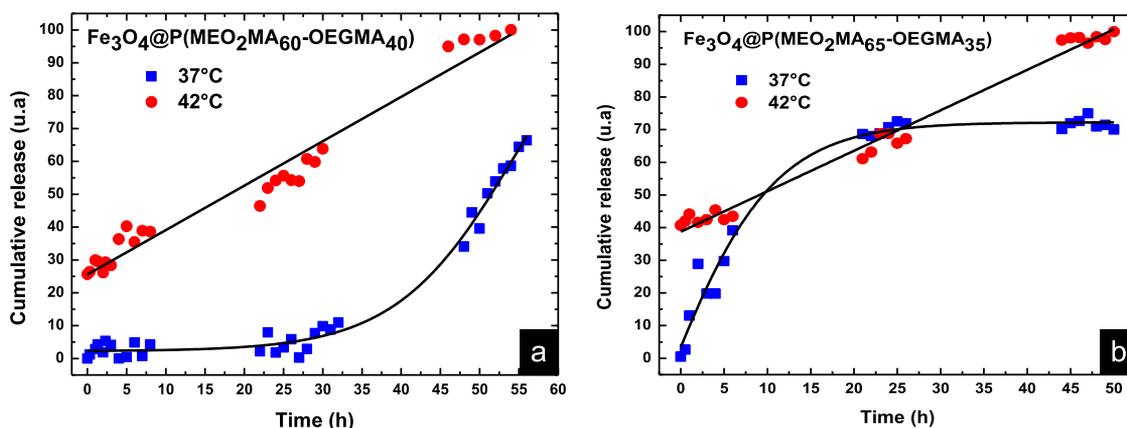


Figure 7. Release of DOX from $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ and $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ MNPs in physiological medium (DMEM).

Table 1. Kinetics Data of DOX Release from the Core–Shell MNPs

samples	T (°C)	zero-order		first-order		Higushi		Korsmeyer–Peppas		
		K_1	R^2	K_1	R^2	K_h	R^2	K_{kp}	n	R^2
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$	37	0.0019	0.7180	1.4254	0.9603	1.1012	0.8461	0.5765	0.3825	0.8468
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$	37	0.003	0.830	0.003	0.988	0.826	0.668	0.911	0.277	0.823
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$	42	1.2382	0.9874	1.7473	0.9842	0.4449	0.8060	0.6466	0.2224	0.8060
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$	42	4.137	0.989	0.018	0.988	0.090	0.859	0.556	0.290	0.860

Higuchi kinetics, and Korsmeyer–Peppas model do not fit well with the experimental data as manifested by low R^2 values, whereas the first-order kinetics seems to be the best illustrating model for our systems at 37 °C (see eqs 9 and 10). Furthermore, the linear increase in drug release at 42 °C shows that the zero-order kinetics is the most relevant model to illustrate the DOX release behavior from the core/shell MNPs above the copolymer LCST (see eqs 11 and 12).

The associated equations for each system are the following. For $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-DOX}$ at 42 °C

$$C_{60/40}^{42^\circ\text{C}} (\%) = 1.3516t + 25.5716 \quad (9)$$

For $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})\text{-DOX}$ at 42 °C

$$C_{65/35}^{42^\circ\text{C}} (\%) = 1.2382t + 38.7545 \quad (10)$$

For $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})\text{-DOX}$ at 37 °C

$$C_{60/40}^{37^\circ\text{C}} (\%) = 0.0075 \cdot \exp\left(\frac{t}{16.5}\right) + 0.01324 \quad (11)$$

For $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})\text{-DOX}$ at 37 °C

$$C_{65/35}^{37^\circ\text{C}} (\%) = -0.1181 \cdot \exp\left(-\frac{t}{8.5}\right) + 0.1659 \quad (12)$$

where $C_{y/z}^{x^\circ\text{C}}$ (%) represents the percentage of cumulative of DOX release, x is the degree at which the release experiment was performed, y is the amount of MEO_2MA , and z is the amount of OEGMA.

Moreover, drug loading capacity (DLC, wt %) and the drug loading efficiency (DLE, wt %) of the core/shell MNPs could reach 6.2 and 56.1%, respectively, for $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$. Close results were also obtained for $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ (DLC of 5.7% and DLE of 57%). All results were extracted from UV curves and data shown in Supporting Information Figure S5. The DLC values were close to those we can find in the literature,⁵² but the

DLE values were lower compared to the literature data.⁵² This can be attributed to the encumbered branched structure of OEGMA that impairs the diffusion of DOX compared to other polymers like PEG whose linear structure allows an easier diffusion of DOX.

3.4.3. DOX-Loaded Nanoparticulate System Stability at 20 °C Study. DOX (1 mg mL^{-1}) and MNPs (0.03 mg mL^{-1}) were incubated in DMEM at 20 °C, once the excess of DOX was removed, the resulting hydrodynamic diameter of the DOX-loaded system was measured by DLS for 72 h. All results are gathered in Figure S7, which shows that considering the error bars, the diameters of the DOX-loaded nanoparticles systems do not change within 72 h.

3.5. Magnetic Hyperthermia Study. The temperature profiles with time and SAR value measurements obtained at the AC field parameters of $H = 300 \text{ Gauss}$ (23.8 kA m^{-1}) and $f = 536.5 \text{ kHz}$ of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}\text{-OEGMA}_{40})$ and $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$ MNPs in water and physiological medium (DMEM) are shown in Figure 8. Magnetic measurements have already shown the superparamagnetic properties of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ MNPs (Figure 4). Thus, the primary factor for heat generated by superparamagnetic MNPs is attributed to Brownian and/or Neel's spin relaxations.

Temperature profile curves show a gradual increase in temperature for the samples in water and physiological media (Figure 8). The required magnetic hyperthermia temperature (i.e., 41–45 °C) can be then achieved as an increase of temperature can be reached within less than 7 min for the $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ MNPs in physiological media at a low applied AC magnetic field (23.8 kA m^{-1} , and $f = 536.5 \text{ kHz}$). The $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_x\text{-OEGMA}_{100-x})$ MNPs disperse more easily in physiological media than in water. From Figure 8, it could be observed that the SAR increased with the polymer density and depends on the solvent. The obtained SAR in physiological media for the $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}\text{-OEGMA}_{35})$

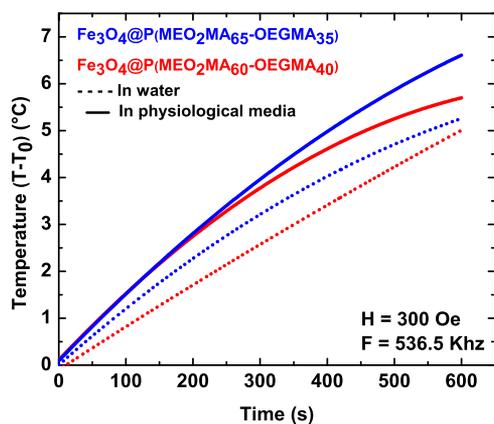


Figure 8. Temperature of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_x-\text{OEGMA}_{100-x})$ MNPs under the AC magnetic field.

OEGMA_{35}) and $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}-\text{OEGMA}_{40})$ MNPs were ~ 45.7 and $\sim 12.6 \text{ W g}^{-1}$ compared to ~ 61.7 and $\sim 25.2 \text{ W g}^{-1}$ in water (Table 2), respectively. Compared to the bare

Table 2. SAR Values in Water and Physiological Medium for $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}-\text{OEGMA}_{35})$ and $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}-\text{OEGMA}_{40})$

samples	SAR (W g^{-1}) in water	SAR (W g^{-1}) in physiological media
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}-\text{OEGMA}_{35})$	61.7	45.7
$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}-\text{OEGMA}_{40})$	25.2	12.6

$\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ MNPs (MNPs before silanization), the SAR which is of ~ 100 and $\sim 101 \text{ W g}^{-1}$ in water and culture media, respectively, is decreased despite the remaining good dispersion in water after the copolymer functionalization.

As shown in Figure 5, until 36°C there is no aggregation of the MNPs in water (or in culture media), but it has to be considered that during the measurements, we collected the temperature of the whole solution (MNPs with aqueous media), whereas a local heating of the MNPs has to be considered.⁷ This local heating may reach 50°C , which should induce the collapse of the polymer chain (see Figure 5) and then the further aggregation of the MNPs. This MNP aggregation by limiting heat transfer finally explains the decrease of the SAR of at least by two as observed in other studies.⁷

Concerning the influence of the medium, it is clear that when the core/shell MNPs are dispersed in the culture medium, the SAR decreased. We have shown that the colloidal behavior of the core/shell MNPs is driven by the copolymer chains grafted at their surfaces. When dispersed in the culture medium (DMEM), the salts within the culture medium disrupt the hydration structure that surrounds the polymer chains and thus decreases the hydrophilicity of the final core/shell structure.²⁰ The direct consequence is that the final dispersion of the MNPs will be less efficient and the SAR will decrease.

3.6. Cytotoxicity Study. **3.6.1. Cytotoxicity toward Human Colon Adenocarcinoma Cell Line HT29.** The cytotoxicity of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}-\text{OEGMA}_{40})$ MNPs was evaluated by conventional MTT assays after incubation with HT29 cells for 24 and 72 h. Figure 9 displays the cell viability after 24 and 72 h exposure to MNPs. The results show that the magnetic core/shell MNPs exhibit a dose-dependent cytotoxicity. Above $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}-$

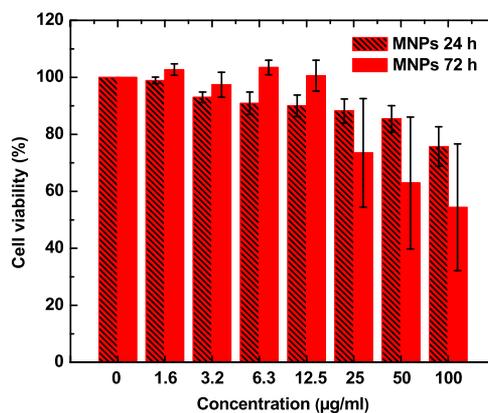


Figure 9. Viability of HT29 cells after 24 (hatched bars) and 72 h (solid bars) exposure to $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}-\text{OEGMA}_{40})$ MNPs.

OEGMA_{40}) MNPs induce a major decrease in cell viability with 85 ± 8 and $75 \pm 55\%$ after 24 and 72 h, respectively. Chen et al. have proposed a dose-dependent cytotoxicity mechanism for MNPs which involves an increase of the metal ions released when the amount of MNPs increases.²¹ Their study highlighted that the leaching of free metal ions from the core/shell MNPs could lead to high toxicity to cells. However, due to the low solubility of Fe^{2+} ions at physiological pH, the most relevant mechanism that can be considered when $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ MNPs come in contact with a tissue is a mitochondrial disturbance, which is translated by an increase of swelling and cell permeability, and the generation of reactive oxygen species with oxidative stress through the Fenton reaction. Our cytotoxicity tests showed that for almost all core/shell MNPs concentrations, the cytotoxicity decreased with the amount of copolymer grafted at the surface of the MNPs. Therefore, the grafting of the copolymer shell prevents oxidative reactions. However, these MNPs still exhibit favorable biocompatibility which makes them useful for biomedical applications.

3.7. Cell Viability after Adding Nonloaded $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@$ Copolymer. **3.7.1. Cytotoxicity toward Ovarian Cancer Line SKOV-3.** SKOV-3 cell viability after 24 h exposure to $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@$ copolymer MNPs at 37 or 41°C revealed mild cytotoxicity irrespective of temperature of nonloaded MNPs. Cell viability at 37°C was above 80% even for the highest MNPs dose that produced only an average of $\sim 10\%$ cell death ($90.85 \pm 10.60\%$ cell viability). At 41°C , the cell viability decreased but remained between 70 and 80% except for the highest MNP concentration for which $65.08 \pm 2.23\%$ cell viability was observed (Figure 10).

3.8. Cytotoxicity of DOX-Loaded in $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@$ Copolymer Compared to Free DOX. To study the efficiency of SPION-responsive MNPs as drug carriers, SKOV-3 cells viability toward DOX was evaluated in different conditions. The $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}-\text{OEGMA}_{40})$ MNPs were selected as drug carriers as they display an LCST in the physiological medium above 41°C , whereas the LCST of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{65}-\text{OEGMA}_{35})$ NPs is around 38°C , which is too close to the body temperature. In all experiments, we compared the SKOV-3 cells viability when cells were subjected to free DOX (at $0.78 \mu\text{g mL}^{-1}$) (the results impact of the increased concentration of the DOX on cells depending on the temperature are gathered in Figure S9) or to DOX incorporated within $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}-\text{OEGMA}_{40})$ MNPs, named MNP-DOX in the graph shown in Figure 11. All experiments were performed in the SKOV-3 cell culture

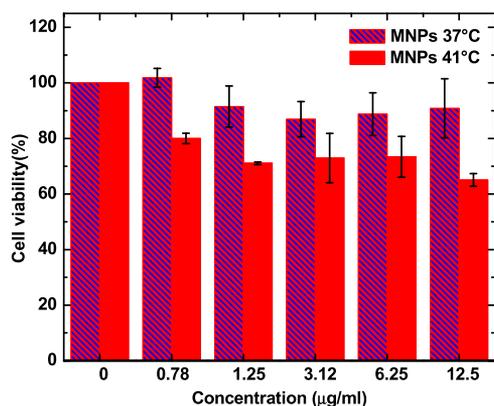


Figure 10. Viability of SKOV-3 as a function of the concentration of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}-\text{OEGMA}_{40})$ MNPs at 37 and 41 °C.

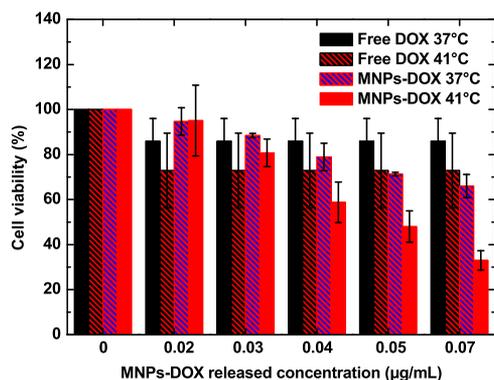


Figure 11. Viability of SKOV-3 cells after 24 h exposure to free DOX, $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}-\text{OEGMA}_{40})$, and $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}-\text{OEGMA}_{40})$ -DOX MNPs at 37 or 41 °C.

medium at 37 °C for 24 h and at 41 °C for 5 h (to limit the impact of temperature on cells). Figure 11 shows the percentages of cell viability obtained when cells were exposed to either free DOX or DOX–MNPs for 24 h at 37 °C.

The concentration of the DOX released from the NPs is actually very low compared to the chosen concentration of the free DOX, but $0.78 \mu\text{g mL}^{-1}$ was the lower concentration to see an impact of the free DOX (especially at 37 °C) on the cell viability.

Hence, at the mentioned concentration of free DOX, the average percentages of SKOV-3 cells viability were 85.97 ± 10.0 and $72.9 \pm 9.1\%$ at 37 and 41 °C, respectively. When the DOX was released from the NPs, even the concentration was very low, up to $0.07 \mu\text{g mL}^{-1}$, a higher amount of cell death could be achieved. Indeed, as depicted in Figure 11, for the concentrations of 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, and $0.07 \mu\text{g mL}^{-1}$, the cells viability at 37 °C was of 94.6 ± 6.1 , 88.5 ± 0.9 , 78.9 ± 6.1 , 71.3 ± 0.8 , and $66.0 \pm 5.1\%$, respectively. At 41 °C, the combination of the DOX release and the increase of the temperature led to the increase of the cytotoxicity toward the cancer cells. As shown in Figure 11, for the same DOX concentration as mentioned before, the cell viability was of 95.0 ± 15.7 , 80.8 ± 6.1 , 58.8 ± 9.1 , 48.0 ± 6.9 , and $32.9 \pm 4.3\%$, respectively. Cell death of almost 70% can then be reached for a DOX concentration as low as $0.07 \mu\text{g mL}^{-1}$, which demonstrates the higher impact of the coated MNPs on the cancer cells. These systems can then be promising candidates for new tools for cancer therapy.

4. CONCLUSIONS

Core/shell $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_x-\text{OEGMA}_{100-x})$ MNPs were synthesized via SI-ARGET ATRP by growing the poly($\text{MEO}_2\text{MA}_x-\text{OEGMA}_{100-x}$) copolymers from the surface of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ MNPs. These core/shell MNPs exhibit a thermoresponsive behavior that could be controlled by tuning the molar ratio of MEO_2MA and OEGMA monomers. The magnetic hyperthermia properties of the MNPs were highlighted. The thermoresponsive behavior denoted by an LCST showed lower values in DMEM. The cytotoxic tests toward human ovary cancer cells SKOV-3 showed that the core/shell MNPs had almost no toxicity at concentrations up to $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, while when loaded with DOX, a cytotoxic effect and a decrease of SKOV-3 cell viability in a short time and at a very low concentration of DOX, as low as $0.07 \mu\text{g mL}^{-1}$, were observed. This work is a promising way for the design of new tools for cancer therapy and theranostics.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsami.9b10444.

Chemical and microstructural characterization (FT-IR, XRD, and electron diffraction based on TEM) of the MNPs at each step of modification are provided; magnetic properties of the core are illustrated by the magnetization curves MNPs; reversibility of the diameter changes of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_{60}-\text{OEGMA}_{40})$ MNPs was confirmed by successive heating and cooling cycles in culture media; monitoring of the DOX release with the increase of temperature from the core/shell NPs in physiological media was performed by combining UV–visible and fluorescence spectroscopies; complete dispersion of the DOX-loaded nanoparticulate system was confirmed by DLS measurement and the homogeneity of the solution was illustrated; SAR measurements, the specific heat capacity of the solutions of $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4@P(\text{MEO}_2\text{MA}_x-\text{OEGMA}_{100-x})$ MNPs was measured in water and culture media; evaluation of the impact of temperature on the SKOV-3 cell viability when exposed to free DOX, viability tests were performed at 37 °C (below the LCST) and 41 °C (above the LCST) (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: halima.alem@univ-lorraine.fr.

ORCID

Raphaël Schneider: 0000-0002-6870-6902

Fabrice Mutelet: 0000-0001-5259-6991

Damien Mertz: 0000-0002-6745-8978

Sylvie Begin-Colin: 0000-0002-2293-2226

Halima Alem: 0000-0002-7918-0504

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The financial support was given by the Center National de la Recherche Scientifique (CNRS, France), French “Ligue Nationale contre le Cancer (CCIR-GE)”, and the JCS “Center for International Programs”, Kazakhstan. The authors would like

to thank Jaafar Ghanbaja and the CC MEM of IJL facilities for the TEM and HR-TEM experiments.

REFERENCES

- (1) Janko, C.; Ratschker, T.; Nguyen, K.; Zschesche, L.; Tietze, R.; Lyer, S.; Alexiou, C. Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) as Platform for the Targeted Multimodal Tumor Therapy. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 59.
- (2) Kandasamy, G.; Maity, D. Recent Advances in Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) for in Vitro and in Vivo Cancer Nanotheranostics. *Int. J. Pharm.* **2015**, *496*, 191–218.
- (3) Cazares-Cortes, E.; Espinosa, A.; Guigner, J.-M.; Michel, A.; Griffete, N.; Wilhelm, C.; Ménager, C. Doxorubicin Intracellular Remote Release from Biocompatible Oligo(Ethylene Glycol) Methyl Ether Methacrylate-Based Magnetic Nanogels Triggered by Magnetic Hyperthermia. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 25775–25788.
- (4) Mertz, D.; Sandre, O.; Bégin-Colin, S. Drug Releasing Nanoplat-forms Activated by Alternating Magnetic Fields. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2017**, *1861*, 1617–1641.
- (5) Thirunavukkarasu, G. K.; Cherukula, K.; Lee, H.; Jeong, Y. Y.; Park, I.-K.; Lee, J. Y. Magnetic Field-Inducible Drug-Eluting Nano-particles for Image-Guided Thermo-Chemotherapy. *Biomaterials* **2018**, *180*, 240–252.
- (6) Xue, W.; Liu, X.-L.; Ma, H.; Xie, W.; Huang, S.; Wen, H.; Jing, G.; Zhao, L.; Liang, X.-J.; Fan, H. M. AMF Responsive DOX-Loaded Magnetic Microspheres: Transmembrane Drug Release Mechanism and Multimodality Postsurgical Treatment of Breast Cancer. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 2289–2303.
- (7) Périgo, E. A.; Hemery, G.; Sandre, O.; Ortega, D.; Garaio, E.; Plazaola, F.; Teran, F. J. Fundamentals and Advances in Magnetic Hyperthermia. *Appl. Phys. Rev.* **2015**, *2*, No. 041302.
- (8) Annamaneni, S.; Vishwakarma, S. K.; Meka, P. B.; Khan, A. A.; Nallari, P. Regulation of Heat Shock Protein-70 Gene Transcripts in Breast Cancer Cells during Hypo and Hyperthermia Exposure. *Meta Gene* **2019**, *20*, No. 100548.
- (9) Das, P.; Colombo, M.; Prosperi, D. Recent Advances in Magnetic Fluid Hyperthermia for Cancer Therapy. *Colloids Surf., B* **2019**, *174*, 42–55.
- (10) Saliev, T.; Feril, L. B.; Begimbetova, D.; Baiskhanova, D.; Klodzinskiy, A.; Bobrova, X.; Aipov, R.; Baltabayeva, T.; Tachibana, K. Hyperthermia Enhances Bortezomib-Induced Apoptosis in Human White Blood Cancer Cells. *J. Therm. Biol.* **2017**, *67*, 9–14.
- (11) Andrä, W.; Nowak, H. *Magnetism in Medicine: A Handbook*; John Wiley & Sons, 2007.
- (12) Bañobre-López, M.; Teijeiro, A.; Rivas, J. Magnetic Nano-particle-Based Hyperthermia for Cancer Treatment. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* **2013**, *18*, 397–400.
- (13) Thorat, N. D.; Bohara, R. A.; Noor, M. R.; Dhamecha, D.; Soulimane, T.; Tofail, S. A. M. Effective Cancer Theranostics with Polymer Encapsulated Superparamagnetic Nanoparticles: Combined Effects of Magnetic Hyperthermia and Controlled Drug Release. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3*, 1332–1340.
- (14) Guo, X.; Li, W.; Luo, L.; Wang, Z.; Li, Q.; Kong, F.; Zhang, H.; Yang, J.; Zhu, C.; Du, Y.; You, J. External Magnetic Field-Enhanced Chemo-Photothermal Combination Tumor Therapy via Iron Oxide Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 16581–16593.
- (15) Hervault, A.; Dunn, A. E.; Lim, M.; Boyer, C.; Mott, D.; Maenoso, S.; Thanh, N. T. K. Doxorubicin Loaded Dual PH- and Thermo-Responsive Magnetic Nanocarrier for Combined Magnetic Hyperthermia and Targeted Controlled Drug Delivery Applications. *Nanoscale* **2016**, *8*, 12152–12161.
- (16) Blanco-Andujar, C.; Walter, A.; Cotin, G.; Bordeianu, C.; Mertz, D.; Felder-Flesch, D.; Bégin-Colin, S. Design of Iron Oxide-Based Nanoparticles for MRI and Magnetic Hyperthermia. *Nanomedicine* **2016**, *11*, 1889–1910.
- (17) Lara, S.; Perez-Potti, A.; Herda, L. M.; Adumeau, L.; Dawson, K. A.; Yan, Y. Differential Recognition of Nanoparticle Protein Corona and Modified Low-Density Lipoprotein by Macrophage Receptor with Collagenuous Structure. *ACS Nano* **2018**, *12*, 4930–4937.
- (18) Zhao, N.; Yan, L.; Zhao, X.; Chen, X.; Li, A.; Zheng, D.; Zhou, X.; Dai, X.; Xu, F.-J. Versatile Types of Organic/Inorganic Nanohybrids: From Strategic Design to Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 1666–1762.
- (19) Nath, N.; Chilkoti, A. Creating “Smart” Surfaces Using Stimuli Responsive Polymers. *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 1243–1247.
- (20) Teotia, A. K.; Sami, H.; Kumar, A. 1 - Thermo-Responsive Polymers: Structure and Design of Smart Materials. In *Switchable and Responsive Surfaces and Materials for Biomedical Applications*; Zhang, Z., Ed.; Woodhead Publishing: Oxford, 2015; pp 3–43.
- (21) Hoogenboom, R. 2 - Temperature-Responsive Polymers: Properties, Synthesis and Applications. In *Smart Polymers and their Applications*; Aguilar, M. R.; San Román, J., Eds.; Woodhead Publishing, 2014; pp 15–44.
- (22) Schmaljohann, D. Thermo- and PH-Responsive Polymers in Drug Delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1655–1670.
- (23) Roy, D.; Brooks, W. L. A.; Sumerlin, B. S. New Directions in Thermoresponsive Polymers. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7214–7243.
- (24) Ferjaoui, Z.; Schneider, R.; Meftah, A.; Gaffet, E.; Alem, H. Functional Responsive Superparamagnetic Core/Shell Nanoparticles and Their Drug Release Properties. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 26243–26249.
- (25) Jamal Al Dine, E.; Ferjaoui, Z.; Ghanbaja, J.; Roques-Carmes, T.; Meftah, A.; Hamieh, T.; Toufaily, J.; Schneider, R.; Marchal, S.; Gaffet, E.; Alem, H. Thermo-Responsive Magnetic Fe₃O₄@P(MEO2MAX-OEGMA100-X) NPs and Their Applications as Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532*, 738–747.
- (26) Dine, E. J. A.; Ferjaoui, Z.; Roques-Carmes, T.; Schjen, A.; Meftah, A.; Hamieh, T.; Toufaily, J.; Schneider, R.; Gaffet, E.; Alem, H. Efficient Synthetic Access to Thermo-Responsive Core/Shell Nanoparticles. *Nanotechnology* **2017**, *28*, No. 125601.
- (27) Plunkett, K. N.; Zhu, X.; Moore, J. S.; Leckband, D. E. PNIPAM Chain Collapse Depends on the Molecular Weight and Grafting Density. *Langmuir* **2006**, *22*, 4259–4266.
- (28) Vihola, H.; Laukkanen, A.; Valtola, L.; Tenhu, H.; Hirvonen, J. Cytotoxicity of Thermosensitive Polymers Poly(N-Isopropylacryla-mide), Poly(N-Vinylcaprolactam) and Amphiphilically Modified Poly(N-Vinylcaprolactam). *Biomaterials* **2005**, *26*, 3055–3064.
- (29) Li, L.; Zhang, C.; Zhang, R.; Xu, Z.; Xu, Z.; Whittaker, A. K. Multifunctional Magnetized Porous Silica Covered with Poly(2-Dimethylaminoethyl Methacrylate) for PH Controllable Drug Release and Magnetic Resonance Imaging. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, *1*, 5027–5034.
- (30) Macchione, M. A.; Biglione, C.; Strumia, M. Design, Synthesis and Architectures of Hybrid Nanomaterials for Therapy and Diagnosis Applications. *Polymers* **2018**, *10*, 527.
- (31) Shim, M. S.; Kwon, Y. J. Stimuli-Responsive Polymers and Nanomaterials for Gene Delivery and Imaging Applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 1046–1059.
- (32) Priya James, H.; John, R.; Alex, A.; Anoop, K. R. Smart Polymers for the Controlled Delivery of Drugs – a Concise Overview. *Acta Pharm. Sin.* **2014**, *4*, 120–127.
- (33) Mortensen, N. P.; Hurst, G. B.; Wang, W.; Foster, C. M.; Nallathamby, P. D.; Retterer, S. T. Dynamic Development of the Protein Corona on Silica Nanoparticles: Composition and Role in Toxicity. *Nanoscale* **2013**, *5*, 6372–6380.
- (34) García-Álvarez, R.; Hadjidemetriou, M.; Sánchez-Iglesias, A.; Liz-Marzán, L. M.; Kostarelos, K. In Vivo Formation of Protein Corona on Gold Nanoparticles. The Effect of Their Size and Shape. *Nanoscale* **2018**, *10*, 1256–1264.
- (35) Al-Ahmady, Z. S.; Hadjidemetriou, M.; Gubbins, J.; Kostarelos, K. Formation of Protein Corona in Vivo Affects Drug Release from Temperature-Sensitive Liposomes. *J. Controlled Release* **2018**, *276*, 157–167.
- (36) Caracciolo, G.; Farokhzad, O. C.; Mahmoudi, M. Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona. *Trends Biotechnol.* **2017**, *35*, 257–264.
- (37) Tenzer, S.; Docter, D.; Kuharev, J.; Musyanovych, A.; Fetz, V.; Hecht, R.; Schlenk, F.; Fischer, D.; Kiouptsi, K.; Reinhardt, C.; Landfester, K.; Schild, H.; Maskos, M.; Shirley K. Knauer, S. K.

Stauber, R. H. Rapid Formation of Plasma Protein Corona Critically Affects Nanoparticle Pathophysiology. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 772–781.

(38) Corbo, C.; Molinaro, R.; Tabatabaei, M.; Farokhzad, O. C.; Mahmoudi, M. Personalized Protein Corona on Nanoparticles and Its Clinical Implications. *Biomater. Sci.* **2017**, *5*, 378–387.

(39) Gillich, T.; Acikgöz, C.; Isa, L.; Schlüter, A. D.; Spencer, N. D.; Textor, M. PEG-Stabilized Core–Shell Nanoparticles: Impact of Linear versus Dendritic Polymer Shell Architecture on Colloidal Properties and the Reversibility of Temperature-Induced Aggregation. *ACS Nano* **2013**, *7*, 316–329.

(40) Sun, Q.; Cheng, D.; Yu, X.; Zhang, Z.; Dai, J.; Li, H.; Liang, B.; Shuai, X. A PH-Sensitive Polymeric Nanovesicle Based on Biodegradable Poly(Ethylene Glycol)-b-Poly(2-(Diisopropylamino)Ethyl Aspartate) as a MRI-Visible Drug Delivery System. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 15316–15326.

(41) Lutz, J.-F. Polymerization of Oligo(Ethylene Glycol) (Meth)Acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 3459–3470.

(42) Gao, X.; Kučerka, N.; Nieh, M.-P.; Katsaras, J.; Zhu, S.; Brash, J. L.; Sheardown, H. Chain Conformation of a New Class of PEG-Based Thermoresponsive Polymer Brushes Grafted on Silicon as Determined by Neutron Reflectometry. *Langmuir* **2009**, *25*, 10271–10278.

(43) Alem, H.; Schejn, A.; Roques-Carmes, T.; Ghanbaja, J.; Schneider, R. Thermo-Responsive and Aqueous Dispersible ZnO/PNIPAM Core/Shell Nanoparticles. *Nanotechnology* **2015**, *26*, No. 335605.

(44) Martínez-López, J. F.; Schneider, S.; Salavera, D.; Mainar, A. M.; Urieta, J. S.; Pardo, J. I. Molar Heat Capacities of the Mixture {1,8-Cineole+ethanol} at Several Temperatures and Atmospheric Pressure. *J. Chem. Thermodyn.* **2016**, *92*, 146–151.

(45) Abumandour, E.-S.; Mutelet, F.; Alonso, D. Performance of an Absorption Heat Transformer Using New Working Binary Systems Composed of {ionic Liquid and Water}. *Appl. Therm. Eng.* **2016**, *94*, 579–589.

(46) Daou, T. J.; Pourroy, G.; Bégin-Colin, S.; Grenèche, J. M.; Ulhaq-Bouillet, C.; Legaré, P.; Bernhardt, P.; Leuvrey, C.; Rogez, G. Hydrothermal Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 4399–4404.

(47) Baaziz, W.; Pichon, B. P.; Fleutot, S.; Liu, Y.; Lefevre, C.; Greneche, J.-M.; Toumi, M.; Mhiri, T.; Begin-Colin, S. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Reproducible Tuning of the Size and Nanosized-Dependent Composition, Defects, and Spin Canting. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 3795–3810.

(48) Guo, Y.; Liu, H.-J.; Chen, J.-Q.; Shang, Y.-Z.; Liu, H.-L. Synthesis of P(MEO2MA-co-OEGMA) Random Copolymers and Thermally Induced Phase Transition Behaviors in Aqueous Solutions. <https://www.ingentaconnect.com/content/apcs/apcs/2015/00000031/00000010/art00010> (accessed Sep 27, 2018).

(49) Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*; Academic Press, 1964.

(50) Vigevani, A.; Ballabio, M.; Gandini, E.; Penco, S. ¹H NMR and IR Spectra of Antitumour Anthracyclines: Effect of the Substitution Pattern on the Chemical Shift Values of the Phenolic Protons and on IR Absorptions of the Quinone System. *Magn. Reson. Chem.* **1985**, *23*, 344–352.

(51) Guo, L.; Ding, W. Immobilized Transferrin Fe₃O₄@SiO₂ Nanoparticle with High Doxorubicin Loading for Dual-Targeted Tumor Drug Delivery. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 4631.

(52) Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug Delivery. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 991–1003.