

Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules hybrides plasmoniques-semiconductrices pour la photothérapie du cancer

Cette thèse se situe dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe « Synthèse et Imagerie de Sondes Inorganiques », du Laboratoire de Physique et d'Etude des Matériaux, spécialiste de la synthèse et de la fonctionnalisation de nanoparticules (NPs) pour des applications biologiques et biomédicales, et l'équipe de G. Bousquet, du laboratoire MASCOT, spécialiste d'oncologie médicale et de l'application de NPs d'or pour le traitement des tumeurs multi-résistantes. Elle a pour objectif la conception de nouvelles NPs pour la thérapie photothermique et photodynamique de tumeurs multi-résistantes,

En effet, les nano-bâtonnets d'or (Figure 1A) offrent une absorption importante dans le proche infrarouge, la gamme de transparence des tissus biologiques, grâce à leur résonance plasmonique. Cette propriété peut être utilisée pour produire de la chaleur et/ou des espèces réactives de l'oxygène (ROS) permettant la destruction de tissus tumoraux par une simple illumination infrarouge, sans toxicité systémique associée.[1] Cette technique est particulièrement prometteuse pour le traitement de cancers résistants aux thérapies médicamenteuses classiques.[2] Par exemple, nous avons montré, dans un travail précédent, l'effet de NPS d'or conjuguées à des anticorps anti-HER2 pour la photo-thérapie dans des modèles de souris xénotransplantées avec des tumeurs sur-exprimant HER2 et résistantes au trastuzumab (Figure 1C).[3] Nous avons observé une inhibition de la croissance tumorale, mais pas de destruction complète de la tumeur.

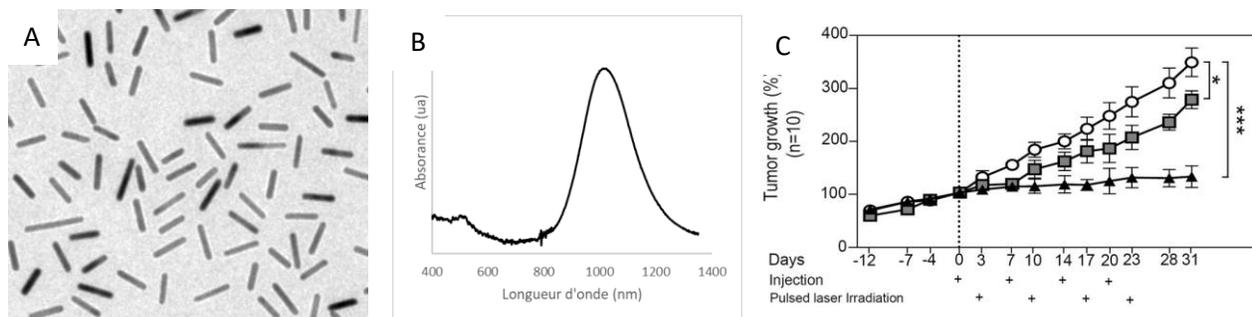


Figure 1 A: Image de microscopie électronique de batonnets d'or (6x30nm). B: Spectre d'absorption C : Croissance tumorale chez une souris non irradiée (o), irradiée et injectée avec des NPs non ciblées (□) ou ciblées (Δ).

Cependant, les utilisations cliniques des NPs restent limitées, notamment du fait de leur reconnaissance rapide par le système immunitaire. Les NPs sont alors rapidement éliminées de la circulation sanguine, et de ce fait leur ciblage vers des tissus tumoraux est très inefficace : typiquement, seulement 1% des NPS injectées atteignent leur cible. [4] Il est donc impératif d'améliorer la chimie de surface enrobant ces NPs afin de permettre d'éviter toute reconnaissance par les biomolécules du système immunitaire. D'autre part, l'efficacité thérapeutique dépend également fortement des processus mis en jeu lors de l'éclairement, dont la production de chaleur (effet photothermique) et la production de ROS cytotoxiques (effet photodynamique) pouvant conduire à l'apoptose. L'optimisation de la thérapie nécessite donc de contrôler la production de ROS, en jouant sur la nature de la nanoparticule et sur le mode d'illumination.

Les objectifs de cette thèse sont la synthèse de nouvelles NPS permettant la production de ROS contrôlée sous illumination infrarouge, recouvertes d'une chimie de surface efficace pour éviter la reconnaissance par le système immunitaire et fonctionnalisées pour cibler efficacement les tumeurs.

1) Synthèse de nanoparticules hybrides métalliques/semi-conductrices : Comment optimiser la production de ROS ? (1^{ère} et 2^{ème} année)

Les NPS métalliques, notamment d'or, présentent une grande section efficace d'absorption, réglable en longueur d'onde en changeant leur forme, due à la résonance plasmonique de surface. Ainsi nous synthétiserons des nanobatonnets d'or absorbant dans la zone de l'infrarouge court, aux alentours de 1030nm. Dans cette gamme spectrale, la lumière pénètre en effet encore plus profondément dans les tissus qu'aux alentours de 800 nm où la plupart des études sont effectuées. Cela permettra à terme une meilleure homogénéité d'irradiation dans la profondeur des tumeurs. Nous développerons en particulier la synthèse de mini-batonnets (diamètre < 7 nm). Cela permettra d'une part d'éviter l'endommagement observés dans les grands batonnets (diamètre > 10 nm) dû à une surchauffe du matériau et des reconstructions de surface, et d'autre part, d'améliorer la diffusion et pénétration des NPS dans le tissu tumoral.

Afin d'augmenter la quantité de ROS produits, nous synthétiserons des NPS hybrides or/semiconducteurs (Figure 2), en s'inspirant de ce qui a été développé pour la photocatalyse de l'eau. Sous illumination, un électron chaud produit dans la nanoparticule plasmonique après excitation va pouvoir être transféré dans la bande de conduction du semiconducteur, puis, piégé à sa surface, produire des ROS ($O_2^{\cdot-}$). En particulier, nous nous intéresserons aux hybrides or/ TiO_2 et or/ ZnO , qui présentent des activités de production de ROS prometteuses. Les matériaux synthétisés seront caractérisés par TEM au LPEM, ainsi que pour leur efficacité d'échauffement et de production de ROS sous illumination continue ou pulsée.

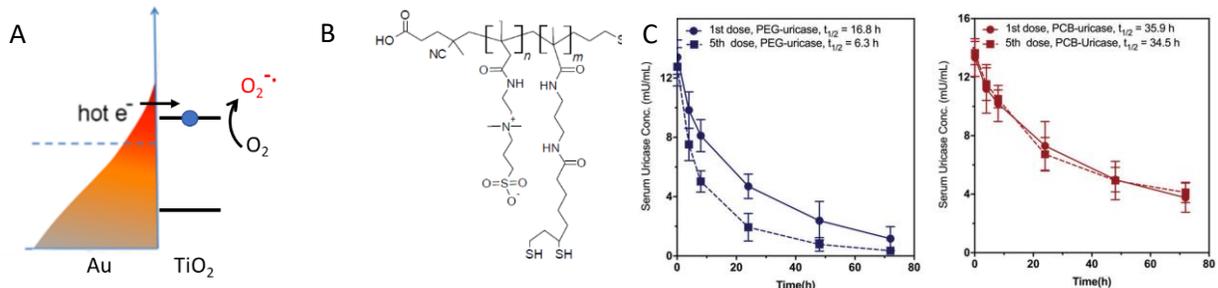


Figure 2 : A : Schéma d'une nanoparticule hybride or/semiconducteur ; extraction d'électrons chauds suivant une absorption de photons conduisant à la production de ROS. B : Exemple de chimie de surface zwitterionique proposée : copolymère à bloc sulfobetaine-dithiol. C : Circulation sanguine de protéines modifiées PEG ou zwitterion (PCB) après la 1^{ère} ou la 5^{ème} injection.[5]

2) Chimie de surface zwitterionique : Comment prolonger la circulation sanguine *in vivo* en évitant la reconnaissance par le système immunitaire ? (1^{ère} et 2^{ème} années)

Les chimies de surface basées sur le poly(éthylène glycol) (PEG) ont été massivement utilisées pour améliorer le temps de circulation de NPs dans le sang. Cependant, des études ont démontré que le PEG était reconnu par le système immunitaire, conduisant à la production d'anticorps anti-PEG et à l'élimination plus rapide des NPs, notamment lors d'injections répétées. Au contraire, les polymères

zwitterioniques (carboxybétaine, CB) ne semblent pas immunogènes. Leur circulation sanguine est donc prolongée, même après de multiples injections.[5,6, Figure 2C] Au LPEM, nous avons démontré que des NPS recouvertes d'un autre zwitterion, la sulfobétaine (SB), évitait entièrement l'adsorption non spécifique de biomolécules dans le sérum complet.[7]. Nous développerons donc une chimie de surface basée sur des polymères à bloc comportant différents zwitterions (SB, CB, phosphorylcholine) ou du PEG pour comparaison et un bloc d'ancrage aux NPS (thiolates) (Figure 2B).

Nous caractériserons le recouvrement des nano-batônnets d'or et hybrides or/TiO₂ ou ZnO par ces polymères, ainsi que la formation de couronnes protéiques dures et dynamiques *in vitro* dans des milieux modèles (sérum, sang complet) par FCS.[7] Nous étudierons ensuite le temps de circulation de ces NPs dans le sang après injections multiples chez la souris immunocompétente (C57bl6) ou le rat (*Ratus Norvegicus*) à MASCOT. Des prélèvements de sang itératifs après injection permettront d'établir une pharmacocinétique de circulation sanguine. La bio-distribution finale sera également étudiée par spectroscopie de masse des différents tissus (notamment foie, rate, rein, cœur, cerveau). Des analyses de coupes de tissu seront également effectuées à MASCOT pour déterminer la distribution tissulaire et sub-cellulaire des NPS par microscopie à champ sombre et TEM. Ces analyses permettront également de confirmer la non-toxicité de ces NPs dans les différents organes (foie, rate, rein, cœur, cerveau, poumons...). Les prélèvements sanguins seront testés pour la présence d'anticorps reconnaissant les différentes chimies de surface injectées par SPR ou test ELISA. Ceci permettra de mieux comprendre la relation entre immunogénicité, temps de circulation et biodistribution finale.

Nous voulons ainsi vérifier que les zwitterions sont peu immunogènes par rapport au PEG, et idéalement définir le zwitterion « optimal » en termes de pharmacocinétique sanguine et biodistribution tissulaire.

3) Ciblage *in vivo* et efficacité photo-thérapeutique : Comment optimiser le ciblage et le traitement de tumeurs par irradiation infrarouge ? (3^{ème} année)

Nous utiliserons des modèles déjà mis en place au laboratoire MASCOT, sous forme de xénogreffes de cancers du sein de patientes surexprimant HER2 et résistantes au trastuzumab. Les NPS d'or et hybrides or/semiconducteurs pourront atteindre les tumeurs par effet EPR, dû à la perméabilité de la néo-vasculature tumorale. Afin d'améliorer le ciblage par un ciblage actif en plus de l'effet EPR, nous fonctionnaliserons également les NPS à l'aide d'anticorps anti-HER2.

Dans un premier temps, une étude de biodistribution sera effectuée afin de déterminer après quel délai la concentration en NPs est maximale dans la tumeur. Cela permettra de déterminer à quel moment l'irradiation infrarouge doit être effectuée. Des souris seront ensuite injectées 3 fois à une semaine d'intervalle et irradiées après chaque injection. Nous effectuerons un suivi temporel de la croissance tumorale, puis des tranches de tissu seront prélevées et analysées. Notamment, nous déterminerons l'effet biologique induit par l'irradiation en présence des différents types de NPs productrices de chaleur et/ou ROS (nécrose, apoptose, autophagie, réponse inflammatoire...). Ceci fournira une clé de compréhension précieuse pour une optimisation de la photothérapie *in vivo*.

[1] Boisselier et al Chem Soc Rev. 38:1759 (2009) [2] Baselga J et al N Engl J Med. 366:109 (2012) [3] Nunes et al J Exp Clin Cancer Res. 38:306 (2019) [4] Wilhelm et al Nat Rev Mater 1:16014 (2016) [5] Li et al Angew. Chem. Int. Ed. 57 :13873 (2018) [6] Li et al Adv. Mater. 30 :1705728 (2018) [7] Debayle et al, Biomaterials, 119357 (2019).