

Étude de l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'oxyde de fer sur une lignée cellulaire cancéreuse

Ing. C. VANDERDONCK
HELHa – Mons

Ms I. TERNAD
Dr D. STANICKI
Prof S. LAURENT
UMONS - Mons

Cet article est le point de départ de l'étude exploratoire avec comme hypothèse que les nanoparticules d'oxyde de fer pourraient être utilisées comme agent radiosensibilisant. Pour cela, différents tests ont été effectués avant de vérifier que ces nanoparticules sont inhibitrices d'une enzyme du système de détoxification des cellules cancéreuses, la thiorédoxine réductase.

Mots-clefs : cancer, radiothérapie, agents radiosensibilisants, nanoparticules d'oxyde de fer, thiorédoxine réductase.

This article is the starting point of the exploratory study with the hypothesis that iron oxide nanoparticles could be used as radiosensitising agents. For this purpose, different tests were carried out before verifying that these nanoparticles are inhibitors of an enzyme of the detoxification system of cancer cells, thioredoxin reductase.

Keywords: cancer, radiotherapy, radiosensitising agents, iron oxide nanoparticles, thioredoxin reductase.

1. Introduction

La radiothérapie est un des traitements de lutte contre le cancer les plus utilisés de nos jours. Bien qu'en constante évolution, ce procédé thérapeutique n'en présente pas moins certaines limitations. Parmi celles-ci, nous relèverons plus particulièrement les dommages générés au niveau des tissus sains avoisinant la tumeur, ce qui peut être à l'origine de nombreux effets secondaires indésirables, pouvant aller jusqu'au développement de cancers radio-induits. Dès lors, un des défis actuels consiste à trouver de nouvelles approches qui maximiseraient la réponse différentielle entre la dose de rayonnement déposée dans la tumeur et celle déposée dans les tissus sains.

Depuis les travaux pionniers d'Hainfeld en 2004, les preuves démontrant une synergie entre une irradiation par rayons X combinée à l'administration de nanoparticules (NPs) métalliques se sont succédées, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Malgré un vif intérêt pour ce domaine d'investigation, les études réalisées se sont essentiellement concentrées sur les particules constituées d'atomes à numéro atomique élevé (typiquement l'or, le platine, le gadolinium, ...). La focalisation sur ce type de nanosystèmes résulte entre autres d'hypothèses largement admises dans le domaine et qui s'appuient principalement sur des phénomènes physiques (l'émission d'électrons secondaires résultant de l'interaction du faisceau avec la matière inorganique). De manière intéressante, de récentes études ont mis en évidence l'importance de mécanismes biochimiques complémentaires aux phénomènes physiques inhérents à l'irradiation de ce type de particules, notamment au travers d'une perturbation des mécanismes de détoxification cellulaire. De manière plus spécifique, nous relèverons que le groupe du professeur S. Lucas (UNamur) a pu corréler, au moins partiellement, l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'or à une inhibition de la thiorédoxine réductase ; une enzyme jouant un rôle clé dans la détoxification des dérivés réactifs de l'oxygène [1].

Sur base de ce constat, il a semblé intéressant d'étudier l'effet radiosensibilisant induit par d'autres types de nanoparticules. Plus spécifiquement, nous avons choisi les nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (SPION). L'utilisation de SPION pour des applications biomédicales est un domaine très largement documenté. En plus de présenter une faible toxicité, ces particules sont caractérisées par des propriétés superparamagnétiques qui les rendent naturellement utilisables comme agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Si elles démontrent un effet radiosensibilisant, les nanoparticules d'oxyde de fer deviendraient, en plus d'être un traceur IRM, un agent thérapeutique.

Cet article a été réalisé en collaboration avec le service de Chimie Générale, Organique et Biomédicale de l'UMONS (Prof S. Laurent).

Dans le cadre du projet PROTHER-WAL (Proton Therapy in Wallonia), le service travaille en collaboration avec des chercheurs de l'université de Namur. Ce sont ces derniers qui ont étudié l'inhibition du système de détoxification des cellules par les nanoparticules d'or. Ce projet est financé par la Région Wallonne.

Cet article synthétise le début de l'étude de l'effet radiosensibilisant des nanoparticules d'oxyde de fer *in vitro*. Il s'agit d'établir une base de travail pour la suite de l'étude.

2. Effets radiosensibilisants des nanoparticules

Les cellules cancéreuses sont des cellules anormales ayant subi une mutation génétique. Il s'agit d'une altération successive de dix à vingt gènes. Les cellules cancéreuses ont alors un avantage sélectif¹, cela signifie qu'elles prolifèrent plus que les cellules saines (apparition d'une lésion précancéreuse). Par la suite, la probabilité d'avoir une seconde mutation génétique est plus grande. Les étapes de prolifération et de mutation se produisent de manière successive et aboutissent à la sélection de cellules hautement cancéreuses. La dernière étape de transformation en cellule cancéreuse est appelée la dédifférenciation ; la cellule surexprime les gènes des cellules souches indifférenciées. Ces cellules cessent alors d'assumer leur rôle au sein de l'organisme.

Les méthodes de traitement du cancer sont diverses et dépendent de plusieurs facteurs tels que le type de cancer, la taille de la tumeur, l'âge du patient, etc. Les trois principaux traitements sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie et peuvent être utilisés seuls ou combinés.

Dans cet article, nous nous intéressons à la radiothérapie, qui consiste à envoyer un rayon ionisant de haute énergie sur la tumeur pour détruire le code génétique des cellules cancéreuses. Ces dernières ne sont alors plus capables de réparer le code génétique de manière suffisante pour continuer la lignée.

Bien que tous les paramètres d'échec et de succès aient été identifiés, la radiothérapie est encore limitée par les effets secondaires provoqués sur les tissus sains. C'est pourquoi la radiothérapie a fortement évolué ces dernières années. L'utilisation d'une molécule qui viendrait se placer au sein même de la tumeur et qui aurait la capacité d'augmenter la destruction des cellules cancéreuses lors de l'irradiation serait une avancée quant à l'efficacité de cette thérapie. Ce type de molécules est appelé *radiosensibilisatrice*. Plusieurs études ont démontré que les nanomatériaux à haut numéro atomique sont de bons candidats en raison de leur grand coefficient d'absorption des rayons X. Ils sont donc susceptibles d'augmenter les dommages provoqués aux organites et à l'ADN par la radiothérapie tout en limitant ceux provoqués aux tissus sains.

Le nanomatériau le plus étudié comme agent radiosensibilisant est l'or car il a un grand coefficient d'absorption des rayons X et une bonne biocompatibilité [2]. De nombreuses études ont déjà porté sur la radiosensibilisation par les nanoparticules d'or.

¹ Avantage sélectif : caractère génétique héréditaire qui permet de mieux survivre.

Divers mécanismes sont induits par les nanoparticules d'or lors de la radiothérapie. La réaction de l'or avec l'oxygène moléculaire favorise la formation de ROS (reactive oxygen species ou dérivés réactifs de l'oxygène). Lors de l'irradiation, l'énergie augmente au sein de la cellule contenant des nanoparticules d'or. Cela entraîne différents dommages à la cellule et amplifie la formation de ROS.

Le système de défense antioxydante de la cellule s'attaque au niveau élevé de ROS. Cependant, cette action est limitée par l'or qui inhibe les enzymes actives de détoxification. Les ROS entraînant des dommages aux membranes, les mitochondries subissent une dépolarisation qui interfère avec la chaîne de transport des électrons. Cela conduit à une libération d'O₂ radicalaire et de cytochrome C (déclencheur de l'apoptose²) dans le cytosol, ainsi qu'à une diminution de production d'ATP. Cette dernière affecte le processus de réparation et de réplication de l'ADN qui nécessite une grande quantité d'ATP [3].

3. Thiorédoxine réductase

Les ROS sont naturellement produits, bien qu'ils soient mortels lorsqu'ils sont présents en trop grande quantité. C'est pourquoi, les cellules contiennent un système de détoxification de ceux-ci. Ce système est composé de différentes enzymes dont le couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase.

Après la régulation des ROS, la thiorédoxine (Trx) n'est plus active et nécessite une régénération apportée par une seconde enzyme ; la thiorédoxine réductase (TrxR). L'inactivation de la thiorédoxine correspond à son oxydation lors de la régulation des ROS. Ensuite, la thiorédoxine réductase réduit la thiorédoxine afin que cette dernière soit à nouveau active. Il est à noter que le mécanisme catalytique de la thiorédoxine réductase est toujours discuté.

La thiorédoxine réductase est une enzyme homodimérique (elle présente deux sous-unités identiques). La réaction catalytique de réduction de la thiorédoxine est assurée par un site FAD (flavine adénine dinucléotide) et par un site disulfure à activité d'oxydoréduction. Il existe généralement un troisième site actif qui est également un groupe rédox : soit un second disulfure rédox, soit un sélénosulfure. Ce dernier varie selon l'espèce. Chez l'homme, le troisième site actif est un sélénosulfure.

Dans les cellules cancéreuses, le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase est, la plupart du temps, surexprimé. Ce qui suggère qu'il pourrait jouer un rôle clé dans le développement de ces cellules. L'étude de l'inhibition de la TrxR suscite un intérêt, d'autant plus que ses sites actifs sont facilement accessibles et qu'elle est, de ce fait,

² Apoptose : mort cellulaire.

aisée à inhiber. Le plus visé pour l'inhibition est le troisième site (sélénolate³) car il s'agit du plus réactif. Cependant, une inhibition du site FAD est également envisageable.

Or, l'or inhibe la thiorédoxine réductase dans différentes conformations. En effet, plusieurs études [2; 3; 4] ont démontré que des complexes à base d'or sont inhibiteurs bien que très peu d'entre elles aient exploré le mécanisme à un niveau moléculaire. Bindoli et ses collaborateurs ont mis en évidence que les complexes d'or (I) modifient préférentiellement les sites actifs de la sélénocystéine tandis que les complexes d'or (III) provoquent des dommages oxydatifs au niveau des thiols et sélénols [4].

³ Sélénolate : dérivé des sélénols dans lequel un atome de métal remplace l'hydrogène attaché au sélénium (Se)

4. Nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules d'or ont, néanmoins, deux désavantages majeurs, ce dernières sont chères à produire et peu utilisées en imagerie médicale. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont, quant à elles, déjà utilisées en tant que traceurs pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM). De plus, le fer a été identifié comme un inhibiteur de la thiorédoxine réductase. Il est donc intéressant d'investiguer les nanoparticules d'oxyde de fer comme inhibiteur de la TrxR.

4.1. Agent de contraste en IRM

Le cœur magnétique des nanoparticules est constitué d'oxygène et d'ions ferreux et ferriques. De cette configuration résulte une aimantation non-nulle qui confèrent aux nanoparticules leurs propriétés superparamagnétiques. C'est cette propriété qui est utilisée pour leurs applications en IRM.

Deux grandes catégories de nanoparticules d'oxyde de fer ont été largement utilisées cliniquement :

- Les SPIO (Superparamagnetic Particles of Iron Oxide) qui sont constitués de plusieurs cristaux d'oxyde de fer piégés dans une matrice à base de dextran. Ils sont caractérisés par un diamètre hydrodynamique supérieur à 50 nm.
- Les USPIO (Ultrasmall Superparamagnetic Particles of Iron Oxide) qui sont des systèmes monocristallins. Elles sont utilisées pour des applications nécessitant une demi-vie plasmatique plus longue et subissent une capture par le foie et la rate plus lente après administration intraveineuse. Leur diamètre hydrodynamique est inférieur à 50 nm.

Les nanoparticules d'oxyde de fer possèdent une excellente biocompatibilité et sont facilement éliminées. Du point de vue physiologique, le corps humain possède des ressources en fer endogène situées au sein de protéines (ex : hémoglobine, ferritine). Lors de l'administration de nanoparticules, celles-ci sont internalisées par les cellules du système réticulo-endothélial (RES) par endocytose et dégradées en fer élémentaire par les lysosomes. Finalement, le fer est véhiculé par la transferrine en direction du foie pour être stocké ou éliminé par voie naturelle [5].

4.2. Stabilisation des nanoparticules

La stabilisation des nanosystèmes représente un point crucial pour les applications biomédicales visées. Les suspensions colloïdales de nanoparticules sont des systèmes soumis à une grande énergie interfaciale à cause de leur taille et donc de leur surface de contact avec le milieu dispersant. Au sein d'une dispersion colloïdale, les particules sont animées d'un mouvement brownien leur conférant une probabilité importante de collision entre elles. En plus de ces mouvements, les nanoparticules

sont soumises à deux types de forces opposées dont l'impact est décrit dans la littérature à l'aide de la théorie DLVO [6] :

- Attractives : si elles sont majoritaires, l'état sera défavorable pour garantir la stabilité du système. Il s'agit, par exemple, des forces de van der Waals.
- Répulsives : si celles-ci sont majoritaires, la stabilité colloïdale est maintenue. Il peut être cité à titre d'exemple : les forces de répulsion électrostatiques ou stériques.

Les modifications de surface des nanoparticules représentent donc une étape clé pour prévenir les effets oxydants de l'oxygène contenu dans l'air ambiant, éviter la déstabilisation des suspensions de nanoparticules par formation d'agrégats, augmenter leur biodisponibilité ainsi que leur temps de demi-vie sanguin et permettre leur fonctionnalisation [5].

La stabilisation des nanosystèmes s'effectue au travers d'une modification de leur surface, dont le but est d'augmenter les forces de répulsions inter-particulaires. Les forces de répulsions sont soit électrostatiques au travers de l'introduction de charges en surface des particules, soit stériques via l'ancrage de macromolécules en surface des nanoparticules. Lors de cette étude, ces deux forces répulsives ont été considérées par l'intermédiaire de deux types d'agents d'enrobage :

- Carboxy-silane, sous forme de TEPSA (3-(triéthoxysilyl)propylsuccinic anhydride): la silice est un matériau inorganique capable de former une enveloppe en se liant de manière covalente autour des nanoparticules. Elle a également la capacité de former des liaisons croisées pour stabiliser l'entière de la structure. L'intérêt des dérivés organosilaniques réside en la présence de certains groupes fonctionnels dérivatisables. Les nanoparticules d'oxyde de fer coatées au TEPSA sont rapidement captées par les cellules dendritiques et les macrophages. Elles ne restent pas longtemps dans la circulation sanguine et sont rapidement éliminées [7]. Dans le cadre de cette étude, il s'agit d'un inconvénient qui est résolu par l'ajout de PEG.
- Polyéthylène glycol (PEG) : la suspension de nanoparticules coatées au PEG est stabilisée par l'augmentation des forces de répulsion stériques. L'avantage de ce polymère dans l'organisme est qu'il est hydrosoluble et biocompatible. De ce fait, il adsorbe peu les protéines présentes dans le plasma et n'est pas éliminé rapidement par les macrophages. Les nanoparticules PEGylées circulent, de ce fait, plus longtemps dans le sang [8].

4.3. Lots utilisés

Pour cette étude, différents lots de nanoparticules ont été utilisés afin de pouvoir comparer les résultats entre eux et définir le lot le plus adéquat pour la suite de l'étude. Ces différentes nanoparticules sont :

- 7 nm IONPs⁴ carbonylés : sont des nanoparticules d'oxyde de fer coatées au TEPSA. Elles ne sont pas magnétofiltrées. De ce fait, leur distribution en taille est assez large.
- 7 nm IONPs PEG₅₀₀₀ : ce lot de nanoparticules PEGylées. Ce lot n'a pas subi de filtration magnétique, la distribution des tailles est donc assez large. La chaîne de polyéthylène glycol contient 115 monomères.

Le tableau 1 reprend la taille des nanoparticules déterminée via les deux méthodes de caractérisation (DLS et TEM). Les écarts des résultats s'expliquent par la différence d'information que fournit chaque mesure. En effet, la DLS (dynamic light scattering) mesure le diamètre hydrodynamique des NPs⁵ tandis que la TEM (transmission electron microscopy) mesure uniquement le diamètre du cœur magnétique.

Tableau 1 - Tailles des différents lots de nanoparticules

Lot de NPs	Mesure de la taille par DLS	Mesure de la taille par TEM
7 nm IONPs carbonylés	21 nm	7,5 ± 2,8 nm
7 nm IONPs PEG ₅₀₀₀	49 nm	7,5 ± 2,8 nm

⁴ IONPs : Iron Oxide Nanoparticles

⁵ NPs : nanoparticules

5. Résultats

5.1. Viabilité cellulaire

La biocompatibilité des différents lots de nanoparticules a été évaluée par la méthode du test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-dipéényl tétrazolium). Les résultats de ces essais permettent de déterminer s'il est pertinent de continuer l'étude de ces nanoparticules et de définir une concentration de travail pour les essais suivants. De plus, les nanoparticules passent également par les tissus sains. C'est pourquoi il est important que ces nanoparticules soient biocompatibles.

Tous les résultats obtenus ont été discutés à l'aide d'une analyse de la variance à un facteur (ANOVA 1). Le seuil d'acceptation de la viabilité cellulaire est de 80 %. Le tableau 2 reprend les résultats de viabilité cellulaire pour les différents lots de nanoparticules après 24 et 48 heures d'incubation avec celles-ci.

Tableau 2 - Résultats de la viabilité cellulaire pour tous les lots de nanoparticules

Lots	24 heures d'incubation	48 heures d'incubation
7 nm IONPs carbonylés	Il n'existe aucune différence significative de viabilité entre les cellules incubées avec des nanoparticules d'oxyde de fer à différentes concentrations et les cellules incubées sans nanoparticules.	
7nm IONPs PEG ₅₀₀₀	La viabilité cellulaire n'est pas influée par la présence de nanoparticules.	

En conclusion, les cellules ne semblent pas ou peu affectées par l'exposition à une concentration croissante en nanoparticules. Pour la majorité des cas, la viabilité cellulaire demeure supérieure à 80 %. Cela induit que les nanoparticules d'oxyde de fer sont, comme attendu, peu toxiques à l'égard de la lignée étudiée.

5.2. Internalisation des nanoparticules

Lors de cette manipulation, la quantité de fer cellulaire est déterminée afin d'évaluer l'internalisation des IONPs par celles-ci. Cette quantification a été effectuée par la méthode colorimétrique de Perls se basant sur la formation de bleu de Prusse ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) [9].

Lors des manipulations d'internalisation, la concentration en nanoparticules est de 50 μg de fer/mL de milieu durant 24 heures d'incubation. Le tableau 3 présente les résultats obtenus pour les différents lots de nanoparticules étudiées.

Tableau 3 - Internalisation des nanoparticules après 24 heures d'incubation

Lots	Picogramme de fer par cellule après 24 heures d'incubation	Écart-type [pg Fe/cell]
7 nm IONPs carbonylés	4,6	1,2
7 nm IONPs PEG ₅₀₀₀	1,6	0,4

La différence de concentration en fer cellulaire obtenue pour les 7 nm IONPs carbonylés et 7nm IONPs PEG₅₀₀₀ s'expliquent par la différence de coating des nanoparticules ; les 7 nm IONPs carbonylés ayant une surface chargée négativement tandis que les 7nm IONPs PEG₅₀₀₀ sont quant à eux neutres. L'état de surface négatif permet aux NPs d'adsorber des opsonines, ce qui facilite la phagocytose. Le PEG étant soluble dans les membranes cellulaires, les NPs peuvent pénétrer dans les cellules.

L'influence du temps d'incubation des 7 nm IONPs carbonylés sur l'internalisation a également été étudiée. L'autre durée étudiée est de 6 heures afin d'analyser le début de l'internalisation.

Tableau 4 - Internalisation des 7 nm IONPs carbonylés après différentes durées d'incubation

Durée d'incubation avec les nanoparticules	Picogramme de fer par cellule après incubation de 7 nm IONPs carbonylés	Écart-type [pg Fe/cell]
6 heures	0,7	0,2
24 heures	4,6	1,2

Comme l'illustre le tableau 4, l'internalisation est rapide étant donné qu'elle est déjà mesurable après six heures. L'internalisation augmente et atteint son maximum après 24 heures de traitements avec les nanoparticules.

5.3. Inhibition de la thiorédoxine réductase

La mesure de l'activité enzymatique de la thiorédoxine réductase est effectuée à l'aide d'un kit commercial. Le but est de déterminer si les nanoparticules d'oxyde de fer sont efficaces du point de vue inhibiteur du système de détoxification des ROS.

L'activité de la thiorédoxine réductase (TrxR) est déterminée par le suivi temporel de la réduction du DTNB (acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)) en TNB (acide 2-nitro-5-thiobenzoïque). Cette réduction mène à un produit de couleur jaune mesuré au spectrophotomètre.

Étant donné que la thiorédoxine n'est pas l'unique enzyme à réduire le DTNB, deux mesures sont effectuées en parallèle. Lors de la première, le DTNB total réduit est

quantifié. Lors de la seconde, la TrxR est inhibée. Le DTNB est alors réduit par toutes les enzymes, autres que la TrxR, permettant, dès lors, de soustraire cette contribution.

Le ratio des pentes obtenues après normalisation par les protéines contenues dans échantillons des cellules traitées et non traitées a permis d'aboutir au pourcentage d'inhibition de l'enzyme.

Comme précédemment, la concentration en nanoparticules lors de l'incubation est de 50 μg de fer/mL de milieu. L'activité résiduelle de la TrxR de la lignée A549 a été étudiée après 24h d'incubation avec les 7 nm IONPs carbonylés.

Comme illustré à la figure 2, l'activité de la thiorédoxine réductase a été évaluée avec des cellules A549 sans nanoparticule (données de couleur bordeaux) et avec des 7 nm IONPs carbonylés (50 μg Fe/mL, données de couleur bleue). Les différents rapports entre les régressions linéaires des résultats permettent de quantifier l'inhibition de la thiorédoxine réductase par les nanoparticules.

Après 24 heures d'incubation avec les 7 nm IONPs carbonylés, l'enzyme thiorédoxine réductase est inhibée à $32 \pm 3 \%$. En d'autres mots, l'activité enzymatique de la TrxR résiduelle au sein des cellules incubées avec les NPs est de 68 % [1].

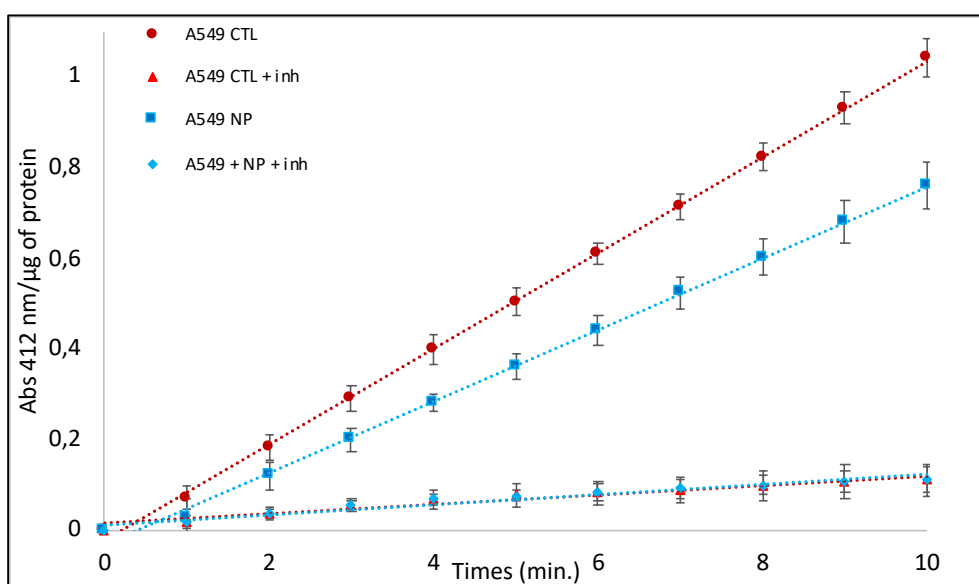


Figure 1 - Mesure de l'inhibition de la TrxR par les 7 nm IONPs carbonylés (24 heures d'incubation)

À titre comparatif, dans les mêmes conditions (cellules A549 et 24 heures d'incubation avec les NPs), les nanoparticules d'or sont internalisées à hauteur de $2,0 \pm 0,4$ pg d'or/cellule et inhibent la thiorédoxine réductase à $72 \pm 3\%$. Bien que les nanoparticules d'oxyde de fer inhibent la thiorédoxine réductase, les nanoparticules d'or inhibent plus de deux fois l'enzyme que celles d'oxyde de fer, à quantité internalisée comparable.

6. Conclusions

Les nanoparticules d'or sont actuellement investiguées comme agent radiosensibilisant. Une des raisons de leur efficacité est leur pouvoir d'inhibition sur le système de détoxification des cellules cancéreuses. Le fer seul semble également inhiber l'enzyme thiorédoxine réductase (acteur principal du système de détoxification). Dès lors, les scientifiques du service de Chimie Générale, Organique et Biomédicale de l'UMONS se sont intéressés à l'effet inhibiteur des nanoparticules d'oxyde de fer sur cette enzyme. En effet, en raison de leurs biocompatibilités et de leurs propriétés superparamagétiques, les nanoparticules d'oxyde de fer pourrait s'imposer comme agent théranostique (traceur IRM et agent radiosensibilisant).

Cette étude se veut être le point de départ d'une étude exploratoire sur le sujet. Il s'agit de fixer des conditions expérimentales, de vérifier l'internalisation des nanoparticules par une lignée cellulaire cancéreuse et enfin, de confirmer l'hypothèse d'inhibition du système de détoxification.

Les résultats obtenus sont encourageants et ouvrent une perspective d'utilisation des nanoparticules d'oxyde de fer comme agent radiosensibilisant dans la lutte contre le cancer.

Une première phase d'essais a porté sur la biocompatibilité des nanoparticules. Les 7 nm IONPs carbonylés n'altèrent pas la viabilité cellulaire jusqu'à 48 heures d'incubation. Cependant, si les 7 nm IONPs carbonylés sont administrées *in vivo*, elles seront éliminées très rapidement par le système immunitaire car elles sont captées par les cellules dendritiques et les macrophages grâce aux opsonines.

C'est pourquoi le même essai a été réalisé avec des 7 nm IONPs PEGylées qui ont un temps de circulation plus importante due à l'adsorption réduite des opsonines sur ces dernières. Ces dernières réduisent légèrement la viabilité cellulaire si elles sont incubées en grandes concentrations. Cette diminution est cependant jugée peu significative.

Ces essais ont permis de déterminer une concentration de travail pour les essais postérieurs : 50 µg de fer/mL de milieu. En effet, cette quantité de NPs présente plusieurs avantages : une telle concentration n'est pas toxique pour les cellules et les NPs ne forment pas d'agrégat à si faible quantité. De plus, les gammes de nanoparticules internalisées sont comparables aux travaux effectués sur les nanoparticules d'or.

Dans un second temps, l'internalisation a été approfondie. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont bien internalisées par les cellules cancéreuses. Les 7 nm IONPs

carbonylés sont internalisées à hauteur d'environ 4,5 pg/cellule (24 heures d'incubation), tandis que les 7 nm IONPs PEG₅₀₀₀ sont internalisées à hauteur de 1,5 pg/cellule (24 heures d'incubation). L'écart entre ces résultats est causé par des phénomènes d'internalisation différents. En effet, les 7 nm IONPs carbonylés pénètrent dans les cellules grâce aux opsonines adsorbées à leur surface tandis que les 7 nm IONPs PEG₅₀₀₀ sont solubles dans les membranes cellulaires.

De plus, il a été démontré que les nanoparticules d'oxyde de fer inhibent la thiorédoxine réductase à 32 ± 3 % lorsque les cellules contiennent $4,6 \pm 1,2$ picogrammes de fer par cellule (24 heures d'incubation avec les NPs).

En comparaison, les nanoparticules d'or internalisées à hauteur de $2,0 \pm 0,4$ pg d'or/cellule, sur la même lignée cellulaire (A549) inhibent la thiorédoxine réductase à 72 ± 3 %.

La suite de l'étude consiste enfin à approfondir la fraction survivante de cellules cancéreuses après l'exposition aux radiations. Pour ce faire, il convient d'intégrer dans le raisonnement que les cellules ont déjà été incubées dans les conditions établies dans ce travail (50 µg de fer/mL de milieu, 24 heures d'incubation) avec les 7 nm IONPs PEG₅₀₀₀.

En conclusion, le début de l'étude des nanoparticules d'oxyde de fer comme agent radiosensibilisant est très prometteur. Ces NPs inhibent bien le système de détoxification des cellules.

7. Sources

- [1] Penninckx, S., Heuskin, A.-C., Michiels, C., & Lucas, S. *Thioredoxin Reductase Activity Predicts Gold Nanoparticle Radiosensitization Effect*. *Nanomaterials*, 9(2), février 2019, pp 295.
- [2] Laurent, G., Jimenez Sanchez, G., Bazzi, R., Lux, F., Perriat, P., Tillement, O., & Roux, S.. *Nanoparticules d'or multifonctionnelles pour l'imagerie et la thérapie*. *Techniques de l'ingénieur*, décembre 2014.
- [3] Penninckx, S., Heuskin, A.-C., Michiels, C., & Lucas, S.. *Gold Nanoparticles as a Potent Radiosensitizer: a transdisciplinary approach from physics to patient*. *Cancer*, 12(8), juillet 2020, pp 1-36.
- [4] Bindoli, A., Rigobello, M. P., Scutarib, G., Gabbianic, C., Casinid, A., & Messori, L. *Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs*. *Coordination Chemistry Reviews*, 253, février 2009, pp. 1692-1707.
- [5] Reddy, L., Aria, J., Nicolas, J., & Couvreur, P. *Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications*. *Chemical Reviews*, 112(11), octobre 2012, pp. 5818-78.
- [6] 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*, juin 2007, pp. 2064-2110.
- [7] Stanicki, D., Boutry, S., Laurent, S., Wacheul, L., Nicolas, E., Crombez, D., Vander Elst, L., Muller, R. N. *Carboxy-silane coated iron oxide nanoparticles: a convenient platform for cellular and small animal imaging*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2, novembre 2013, pp.387-397.
- [8] Kumar Gupta, A., & Gupta, M. *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical application*. *Elsevier*, 26, décembre 2004, pp. 3995-4021.
- [9] Boutry, S., Forge, D., Burtea, C., Mahieu, I., Maruriu, O., Laurent, S., & N.Muller, R. *How to quantify iron in an aqueous or biological matrix : a technical note*. *Contrast Media & Molecular imaging*, septembre 2009, pp.299-304.