



**HAL**  
open science

# Développement de stratégies de biofonctionnalisation de surface de nano-objets pour des applications biologiques

Laurent Adumeau

► **To cite this version:**

Laurent Adumeau. Développement de stratégies de biofonctionnalisation de surface de nano-objets pour des applications biologiques. Matériaux. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0425 . tel-01674168

**HAL Id: tel-01674168**

**<https://theses.hal.science/tel-01674168>**

Submitted on 2 Jan 2018

**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.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES  
SPÉCIALITÉ : PHYSICOCHIMIE DE LA MATIÈRE CONDENSÉE

Par Laurent ADUMEAU

**DEVELOPPEMENT DE STRATEGIES DE BIOFUNCTIONNALISATION  
DE SURFACE DE NANO-OBJETS POUR DES APPLICATIONS  
BIOLOGIQUES**

Sous la direction de : M. Stéphane MORNET

Soutenue le 9 décembre 2015

Membres du jury :

M. MAGLIONE, Mario  
Mme GAZEAU, Florence  
M. TILLEMENT, Olivier  
M. RICHARD, Cyrille  
M. BRISSON, Alain  
M. MORNET, Stéphane

Directeur de recherche CNRS  
Directrice de recherche CNRS  
Professeur Université Claude Bernard Lyon 1  
Chargé de recherche HDR CNRS  
Professeur Université de Bordeaux  
Chargé de recherche HDR CNRS

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse



## *REMERCIEMENTS*

Parce qu'une thèse est en réalité le résultat d'un travail collectif, j'ai tenu à écrire les quelques lignes suivantes pour remercier les différentes personnes qui ont contribué à ce résultat.

Les travaux de thèse décrits dans ce manuscrit ont principalement été réalisés au sein de l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux (ICMCB). Ainsi, je remercie Claude Delmas, ancien directeur, ainsi que Mario Maglione, directeur actuel, pour m'avoir accueilli au sein de l'institut. Merci également à Etienne Duguet, responsable du groupe « Chimie des nanomatériaux » pour son accueil.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Mme Florence Gazeau et M. Olivier Tillement pour le temps qu'ils ont consacré à rapporter ce travail, ainsi qu'à M. Cyrille Richard et M. Alain Brisson pour avoir accepté d'examiner cette thèse, et enfin, à Mario Maglione pour avoir présidé ce jury de thèse. Je remercie tous les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour les discussions constructives lors de ma soutenance.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, Stéphane Mornet, pour de nombreuses raisons. Tout d'abord, merci d'avoir fait confiance au « biologiste » et de m'avoir permis de faire cette thèse en chimie. Merci également de ne pas avoir hésité à m'impliquer dans plusieurs projets et de m'avoir fait rencontrer de nombreux chercheurs bordelais aux cours des réunions avec lesquels j'ai toujours eu la sensation d'être écouté et considéré durant mes prises de paroles. Merci pour la grande liberté que tu m'as laissée tout en maintenant un échange permanent. Merci pour ta disponibilité, je savais que je pouvais venir te voir et repartir avec de nouvelles idées. Enfin, je te suis redevable pour le temps que tu as consacré à me conseiller et à corriger ce manuscrit de thèse. Merci pour tous ces points formateur.

Je remercie, à l'ICMCB, les personnes qui ont contribué à cette thèse, au travers de discussions scientifiques ou en me donnant accès à différentes caractérisations : Patrick Rosa, Olivier Toulemonde, Thierry Cardinal, Alexandre Fargue, Olivier Nguyen, Laetitia Etienne, Dominique Denux, Etienne Durant, et Mathieu Duttine. Merci également aux services collectifs (accueil, administration et infrastructure) qui nous apportent un soutien quotidien et nous permettent de travailler dans de bonnes conditions et notamment à Stéphane Toulain de la Bibliothèque et Carole Malburet du service mission.

Cette thèse étant le fruit de différentes collaborations, j'ai été amené à interagir avec plusieurs laboratoires bordelais : l'institut de Chimie et Biologique des Membranes et des Nano-objets (CBMN), le laboratoire de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques (RMSB) et le Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO).

Au CBMN, je souhaite adresser mes sincères remerciements à Alain Brisson pour l'accueil dans son équipe, pour les discussions scientifiques et pour les conseils qu'il m'a donnés, à Céline Gounou pour son efficacité, ainsi qu'à Romain Linares, Nicolas Arraud, et Sisareuth Tan. Merci également à Olivier Lambert pour les discussions scientifiques.

Au sein du RMSB, je voudrais remercier Gisèle Cloufent-Sanchez pour l'accueil dans son équipe, Marie-Josée Jacobin Valat et Jeanny Laroche-Traineau pour leur bonne humeur inoxydable, ainsi que Mélusine Larivière, Audrey Hemadou et Cyril Lorenzato. Merci également à Franck Couillaud pour les éclaircissements sur les tumeurs, à Coralie Germain-Genevois, ainsi qu'à Claire Marozzo et Cyril Masante

Au LCPO, merci à Olivier Sandre et Christophe Schatz pour les discussions scientifiques, Anne-Laure Wirotius pour la RMN et Gauvin Hemery pour l'accès aux mesures de DLS.

Merci également à Laurent Azéma de l'équipe « ARNA : Régulation Naturelle et Artificielle » pour m'avoir enseigné l'électrophorèse d'aptamères.

Je remercie Geoffrey Prévot, Romain Melich, Kadiali Bodiang et Marine Delgado, les différents stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer, pour le travail de qualité qu'ils ont fourni, ainsi que pour les petites expériences de dépannage sur la fin. J'en profite pour leur souhaiter une bonne continuation.

Bien entendu, je n'oublie pas les membres du groupe V pour les discussions scientifiques, l'accueil et la bonne humeur. Ils ont contribué à faire de ces 3 années un moment inoubliable. Ma reconnaissance va à Marie-Hélène Delville, Graziella Goglio (*que devient Jamal ?*), Jérôme Majimel, Mona Treguer-Delapierre, et Lydia Roudier. Merci à Nora avec qui j'ai fait mon stage de Master 2. Je remercie les post-docs du groupe pour les discussions et leurs conseils : Hélène, Noelia et Sergio. Merci aux anciens : Hakim, Thomas, Aurélie et Quentin. Merci également à Cyril et Stéphanie avec qui j'ai commencé et fini cette thèse, je repense à la bonne ambiance et l'entraide qu'il y avait entre nous. Je voudrais également souhaiter bon courage aux « thésards » actuels : Uli, Arnaud, Magali, Alexandra, Véronique, Bai, Weiya et Cécilia.

Merci également à mes amis et, en particulier, à Cécile à qui j'exprime ma profonde reconnaissance pour le grand soutien qu'elle m'a apporté tout au long de cette thèse. Je voudrais également marquer le courage dont mes colocos ont dû faire preuve pour me supporter au quotidien, notamment David, avec qui, je partage une vision différente des programmes TV de l'été, mais également à Alex et Salla, arrivés pendant la période de rédaction.

Enfin, je remercie mes parents pour m'avoir transmis cet esprit de curiosité et m'avoir toujours donné les moyens de faire les études de mon choix. Merci également à mon « p'tit » frère d'avoir, en quelque sorte, ouvert le chemin.

# Table des matières

---

<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>V</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
RÉFÉRENCES .....	5
<b>CHAPITRE I. GESTION DES INTERACTIONS ENTRE LA SURFACE DES NANOPARTICULES ET LEUR MILIEU BIOLOGIQUE D'APPLICATION .....</b>	<b>7</b>
A. INTERACTIONS ENTRE LES NANOPARTICULES ET L'ENVIRONNEMENT BIOLOGIQUE.....	10
A.1 <i>Stabilité colloïdale des nanoparticules dans un milieu simple.....</i>	<i>11</i>
A.2 <i>Comportement des nanoparticules dans un milieu biologique .....</i>	<i>12</i>
A.2.1 Mécanisme de formation de la couronne biomoléculaire .....	12
A.2.2 Dynamique de la couronne biomoléculaire .....	13
A.2.3 Interactions entre le complexe nanoparticule-couronne biomoléculaire et le milieu biologique.....	15
A.2.4 Conclusion .....	17
A.3 <i>Gestion des interactions non spécifiques.....</i>	<i>18</i>
A.3.1 Les polymères anti-adsorption.....	18
A.3.2 Etude conformationnelle des chaînes linéaires de PEG à la surface d'une nanoparticule .....	22
A.4 <i>Conclusion .....</i>	<i>26</i>
B. BIOFONCTIONNALISATION DE NANOPARTICULES PAR CONJUGAISON DE BIOMOLECULES.....	26
B.1 <i>Modification chimique de la surface des nanoparticules .....</i>	<i>27</i>
B.2 <i>Stratégies de bioconjugaison .....</i>	<i>30</i>
B.2.1 Bioconjugaison par liaison chimique.....	31
B.2.2 Bioconjugaison par reconnaissance spécifique entre deux biomolécules.....	35
B.3 <i>Conclusion .....</i>	<i>36</i>
C. DESCRIPTION DU PROJET D'ETUDE.....	37
C.1 <i>Extraction de vésicules extracellulaires d'un fluide biologique.....</i>	<i>37</i>
C.2 <i>Diagnostic de l'athérosclérose par imagerie par résonance magnétique .....</i>	<i>40</i>
C.3 <i>Marquage in vivo du cancer de la prostate pour l'imagerie de fluorescence dans le proche infrarouge. ....</i>	<i>45</i>
C.4 <i>Stratégie générale.....</i>	<i>47</i>
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	49
<b>CHAPITRE II. DEVELOPPEMENT D'UNE STRATEGIE DE PEGYLATION COVALENTE DE SURFACES DE NANOPARTICULES D'OXYDES METALLIQUES.....</b>	<b>55</b>
A. FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE DE NANOPARTICULES PAR DES MACROMOLECULES DE PEG .....	58
A.1 <i>Voie directe : Modification chimique de la surface de nanoparticules de silice par des agents de couplage silanique portant un bras macromoléculaire de PEG.....</i>	<i>58</i>

A.1.1	Couplage du mPEG-silane à la surface des nanoparticules de silice dans un milieu hydro-alcoolique acide.....	60
A.1.2	Caractérisation de la surface des nanoparticules de silice modifiées par le mPEG-silane .....	61
A.1.3	Conclusion .....	64
A.2	<i>Voie indirecte : Greffage covalent de macromolécules de PEG par ancrage sur des sites fonctionnels présents à la surface de la nanoparticule.</i> .....	65
A.1.1	Modification chimique de la surface de nanoparticules de silice avec un agent de couplage silanique aminé.....	66
A.1.1.1	Greffage de l'aminosilane à la surface des nanoparticules de silice.....	66
A.2.1.1	Caractérisations de la modification de surface .....	67
A.2.1.2	Conclusion .....	71
A.2.2	Conversion des extrémités du PEG en fonctions aldéhyde.....	71
A.2.2.1	Synthèse de PEG-al par oxydation de Pfitzner-Moffatt .....	71
A.2.2.2	Caractérisation des macromolécules modifiées .....	72
A.2.3	PEGylation de surfaces aminés de nanoparticules de silice.....	76
A.2.3.1	Greffage covalent du PEG-al sur les nanoparticules aminées.....	77
A.2.3.2	Extension du procédé de greffage du PEG-al sur les nanoparticules aminées .....	83
A.2.4	Discussion .....	86
A.3	<i>Etude de la conformation des macromolécules de PEG greffées à la surface des nanoparticules et estimation de l'épaisseur de la couronne polymère</i> .....	87
A.4	<i>Conclusion</i> .....	89
B.	FONCTIONNALISATION DE LA COURONNE DE PEG .....	90
B.1	<i>Amination de macromolécules de PEG libres</i> .....	91
B.1.1	Synthèse du PEG-4k-Cl <sub>2</sub> .....	91
B.1.2	Synthèse du PEG-4k-(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> .....	94
B.2	<i>Application à l'amination de la couronne polymère greffée autour des nanoparticules de silice</i> .....	96
B.3	<i>Conclusion</i> .....	99
C.	ÉTUDE DES PROPRIETES DES NANOPARTICULES CŒUR-COURONNE .....	100
C.1	<i>Stabilité colloïdale des nanoparticules</i> .....	100
C.2	<i>Propriété antiadhésive envers les protéines</i> .....	100
D.	CONCLUSION .....	102
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	104

**CHAPITRE III. SYNTHÈSE ET BIOFONCTIONNALISATION DE NANOPARTICULES INORGANIQUES DESTINÉES À DES APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES OU BIOMÉDICALES.....107**

A.	SYNTHÈSE ET BIOFONCTIONNALISATION DE SUPRAPARTICULES COLLOÏDALES DESTINÉES À L'EXTRACTION PAR MAGNETOPHORESE DE VÉSICULES EXTRACELLULAIRES CIRCULANTES .....	109
A.1	<i>L'extraction par magnétophorèse d'objets biologiques</i> .....	109
A.2	<i>Synthèse de supraparticules colloïdales superparamagnétiques</i> .....	113

A.2.1	Assemblage de nanoparticules magnétiques sous forme de supraparticules colloïdales induit par évaporation d'une émulsion.....	114
A.2.1.1	Formulation d'un ferrofluide hydrophobe.....	115
A.2.1.2	Assemblage des nanoparticules magnétiques.....	117
A.2.2	Consolidation des SPC50 dans une matrice de silice.....	121
A.2.2.1	Transfert des SPC50 en milieu hydro-alcoolique.....	121
A.2.2.2	Encapsulation dans une matrice de silice par voie sol-gel.....	125
A.2.3	Caractérisation magnétique des SPC.....	130
A.2.4	Conclusion.....	131
A.3	<i>Biofonctionnalisation des SPC@SiO<sub>2</sub> par une protéine de reconnaissance et de capture des vésicules lipidiques</i> .....	132
A.3.1	Formation d'une couronne de macromolécules de PEG à la surface des SPC fonctionnalisées par des amines.....	133
A.3.2	Greffage de l'annexine A5.....	135
A.4	<i>Conclusion</i> .....	139
B.	MARQUAGE PAR DES SONDAS FLUORESCENTES DANS LE PIR ET BIOFONCTIONNALISATION D'UN AGENT DE CONTRASTE DESTINE AU DIAGNOSTIC DE L'ATHEROSCLEROSE PAR IRM.....	140
B.1	<i>Marquage de l'agent de contraste avec un fluorophore dans le proche infrarouge.</i> .....	140
B.1.1	Fonctionnalisation de l'agent de contraste par des fonctions thiol.....	141
B.1.2	Greffage du fluorophore.....	143
B.2	<i>Biofonctionnalisation de l'agent de contraste par greffage régiosélectif d'un fragment d'anticorps</i> .....	145
B.2.1	Activation des fragments d'anticorps.....	145
B.2.2	Greffage des fragments d'anticorps.....	147
B.3	<i>Conclusion</i> .....	149
C.	ÉLABORATION ET CHIMIE DE SURFACE DE NANOPARTICULES DE SILICE FLUORESCENTES DESTINEES AU MARQUAGE <i>IN VIVO</i> DE TUMEURS.....	151
C.1	<i>Synthèse des nanoparticules bi-fluorescentes</i> .....	151
C.2	<i>Conclusion</i> .....	161
D.	CONCLUSION.....	162
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	163

## **CHAPITRE IV. EVALUATION DES NANO-OBJETS DANS LE CADRE DE LEUR APPLICATION**

### **BIOLOGIQUE.....165**

A.	EXTRACTION DE VESICULES EXTRACELLULAIRES PAR MAGNETOPHORESE.....	167
A.1	<i>Etude des interactions entre les SPC biofonctionnalisées et les bicouches lipidiques par QCM-D</i> .....	167
A.2	<i>Tests d'extraction d'objets membranaires</i> .....	176
A.2.1	Tests préliminaires d'extraction de vésicules lipidiques fluorescentes.....	178
A.2.2	Extraction d'objets membranaires d'origine biologique.....	180
A.3	<i>Conclusion</i> .....	183

B. LES VUSPIO BIOFONCTIONNALISES POUR LA DETECTION MULTIMODALE DE ZONES PATHOLOGIQUES <i>IN VIVO</i> .....	184
<i>B.1 Marquage de plaques d'athérome vulnérables</i> .....	184
B.1.1 Etude des propriétés de reconnaissance des VUSPIO dirigés contre la cible intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ .....	184
B.1.1.1 Etude de la reconnaissance biomoléculaire par résonance plasmonique de surface .....	184
B.1.1.2 Mise en évidence du marquage spécifique des zones pathologiques par immunohistochimie.....	189
B.1.1.3 Conclusion .....	190
B.1.2 Etude <i>in vivo</i> du marquage des plaques d'athérome.....	190
<i>B.2 Test de ciblage <i>in vivo</i> de tumeurs avec des VUSPIO fonctionnalisées par des ligands acides foliques</i> .....	192
<i>B.3 Conclusion</i> .....	194
C. MARQUAGE DE TUMEURS PAR DES NANOPARTICULES HYBRIDES DE SILICE FLUORESCENTES PEGYLEES.....	194
D. CONCLUSION .....	197
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	199
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>201</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>I</b>
ANNEXE N° 1 : STABILITE COLLOÏDALE DES NANOPARTICULES DANS UN MILIEU SIMPLE .....	III
ANNEXE N° 2 : SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES DE SILICE MODELES.....	X
ANNEXE N° 3 : DETERMINATION DE LA DENSITE SURFACIQUE DES MOLECULES GREFFEES .....	XVII
ANNEXE N° 4 : SYNTHÈSE ET CARACTERISATION DE NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER SUPERPARAMAGNETIQUES PAR CO-PRECIPITATION .....	XX
ANNEXE N° 5 : DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DES IONS $Fe^{3+}$ DANS LES FERROFLUIDES PAR COMPLEXATION AVEC LE THIOCYANATE DE POTASSIUM .....	XXIV
ANNEXE N° 6 : MISE AU POINT DES CONDITIONS DE BIOCONJUGAISON SUR LES VUSPIO AVEC UNE PROTEINE MODELE (ANX-A5) .....	XXVI
ANNEXE N° 7 : LA MICROBALANCE A CRISTAL DE QUARTZ AVEC MESURE DE DISSIPATION (QCM-D) .....	XXIX

# Liste des abréviations

---

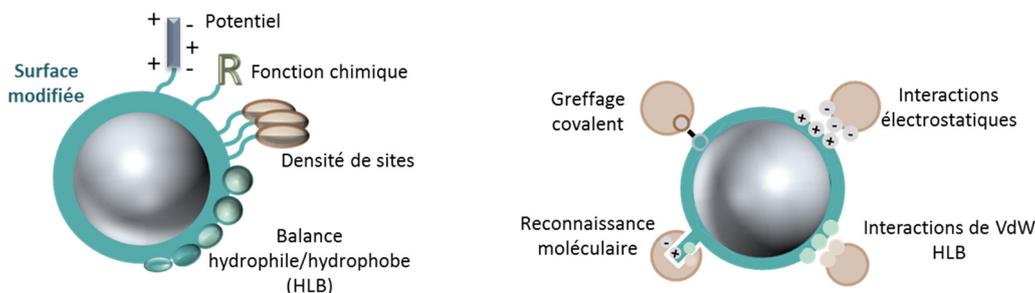
APTES	(3-aminopropyl)triéthoxysilane
AcOH	Acide acétique
Anx-A5	Annexine-A5
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messagé
ARNmi	micro ARN interférant
ATG	Analyse thermogravimétrique
BSA	Bovine Serum Albumine
CBMN	Laboratoire de Chimie et de Biologie des Membranes et des Nano-objets de Bordeaux
CDCl <sub>3</sub>	Chloroforme deutéré
CTAB	Bromure de cetyltriméthylammonium
Cy 7.5	Cyanine 7.5
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DLS	Dynamic Light Scattering
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOPC	Dioléoylphosphatidylcholine
DOPS	Dioléoylphosphatidylsérine
DRIFT	Diffuse reflectance infrared fourier transform
DTNB	Dithionitrobenzoic acid; 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EDPS	N-[3-(Triméthoxysilyl)propyl]éthylènediamine
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EPR	Enhanced Permeability and Retention
ET <sub>3</sub> N	Triéthylamine
EtOH	Ethanol
FDA	Food Drug Administration
FITC	Isothiocyanate de fluoescéine
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
GNP	Nanoparticule d'or
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
ICMCB	Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux
ICP	Inductive Coupled Plasma
IECB	Institut Européen de Chimie et de Biologie
Ig	Immunoglobuline
IR	Infrarouge
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
KSCN	Thiocyanate de potassium
LDL	Low Density Lipoprotein
MeOH	Méthanol
MET	Microscopie électronique à transmission
MLV	MultiLamellar Vesicle
MMP	Métalloprotéase matricielle

mPEG	Poly(éthylène glycol) méthyl éther
NCM	Nanocluster magnétique
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NP	Nanoparticule
NTA	Acide nitrilotriacétique
OHP	Plan externe de Helmholtz
PC	Phosphatidylcholine
PCB	Poly(méthacrylate de carboxybetaïne)
PDI	Indice de polydispersité
PEG	Poly(éthylène glycol)
PIR	Proche InfraRouge
POE	Poly(oxyde d'éthylène)
PS	Phosphatidylsérine
PVP	Polyvinylpyrrolidone
Py	Pyridine
QCM-D	Microbalance à Cristal de Quartz avec mesure de Dissipation
QD	Quantum dot
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMSB	Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques
SAM	Monocouche auto-assemblée
scFv	Single chain Fragment variable
SDS	Sodium dodecylsulfate
SOCl <sub>2</sub>	Chlorure de thionyle
SPC	Supraparticule colloïdale
SPIO	SuperParamagnetic Iron Oxide
SPR	Surface plasmon resonance
SRE	Système Réticulo-Endothélial
SUV	Small Unilamellar Vesicle
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
T <sub>E</sub>	Température d'ébullition
TEOS	Tetraethylorthosilicate
TFAA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TNB	3-thio-6-nitrobenzoic acid
USPIO	Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide
vdW	van der Waals
VE	Vésicule extracellulaire
VUSPIO	Versatile ultrasmall superparamagnetic iron oxide

# Introduction générale



Le développement de nano-objets pour des applications biomédicales constitue un domaine de recherche qui a connu depuis les deux dernières décennies un fort essor. Cette recherche intensive a fait naître de nombreuses plateformes pour la délivrance de médicament,<sup>1</sup> le marquage en bio-imagerie,<sup>2,3</sup> ou encore, la bio-détection.<sup>4-6</sup> Ce grand intérêt pour les nanomatériaux en biologie s'explique par les nouvelles propriétés physiques que présentent les matériaux divisés à l'échelle nanoscopique, telles que des propriétés magnétiques, ou optiques. Sous cette forme, la matière présente une surface développée considérable. La notion de gestion de l'interface devient donc un domaine d'étude à part entière, tant elle est importante pour ces applications. La surface est le lieu de rencontre entre le matériau et l'environnement biologique complexe, et les propriétés physico-chimiques de cette interface vont diriger le comportement des nano-objets. Selon les spécificités de l'application en biologie et de la nature chimique du matériau, des stratégies de modifications chimiques sont mises en places. Celles-ci ont pour but principalement d'adresser la problématique de la gestion des interactions entre les nanoparticules et leur environnement. Un des principaux problèmes à traiter concerne l'adsorption spontanée des biomolécules à leur surface via des interactions multiples (van der Waals, électrostatiques...), pouvant provoquer la perte du contrôle des propriétés recherchées des nanoparticules dans leur milieu d'application, et donc de potentiels problèmes.<sup>7,8</sup> La maîtrise de la chimie de surface élargit, également, les champs d'applications potentiels en biologie, en rendant possible le couplage entre les propriétés physiques intrinsèques des nanoparticules avec des fonctions biologiques apportées par la conjugaison de biomolécules.<sup>9</sup> La biofonctionnalisation fait appel à des stratégies complexes prenant en compte les spécificités de la biomolécule ainsi que celles de l'application (**Figure 1**). Le greffage de la biomolécule ainsi que la conservation de son activité biologique ne peuvent ainsi être réalisés que si la chimie, ainsi que les propriétés physico-chimiques de surface sont parfaitement maîtrisées.



**Figure 1 :** Schéma résumant les principaux paramètres de surface à considérer pour la fonctionnalisation de nanoparticules par des molécules biologiques.

Les travaux présentés dans ce mémoire sont focalisés sur la mise en place de nano-systèmes biofonctionnalisés développée, en étroite collaboration avec des équipes de biologistes, dans le cadre des applications suivantes :

- L'extraction magnétique de vésicules extracellulaires d'un fluide biologique.
- Le diagnostic de l'athérosclérose par imagerie *in vivo*.
- Le marquage de tumeurs pour l'imagerie *in vivo* dans le proche infrarouge.

Ces applications, qui seront détaillées au cours de ce manuscrit, semblent certes à première vue différentes, mais présentent toutefois une problématique commune du point de vue de la chimie de surface des nano-objets. De plus, elles possèdent un objectif commun portant sur l'adressage de nano-objets par reconnaissance moléculaire en milieu biologique que ce soit pour cibler sélectivement une zone pathologique ou pour extraire des objets biologiques.

Dans le but de développer les systèmes dans le cadre de ces applications biologiques et de répondre à cette problématique commune, les objectifs de l'étude étaient de :

- 1) Développer les nano-objets portant la propriété physique adaptée à l'application ;
- 2) Gérer la stabilité colloïdale de ces nano-objets à chaque étape de leur élaboration jusqu'au milieu biologique d'application ;
- 3) Contrôler leur propriétés physico-chimiques de surface afin de limiter l'adsorption non spécifique de biomolécules ;
- 4) Contrôler la chimie de surface pour mieux maîtriser les étapes ultérieures de greffage des éléments de ciblage tout en conservant la fonction de reconnaissance biomoléculaire ;
- 5) Promouvoir la propriété de reconnaissance moléculaire en cherchant à apporter un grand degré de liberté à la biomolécule greffée, en réalisant des greffages régiosélectifs et en contrôlant le nombre de biomolécules greffées par nano-objet.

Ce mémoire est divisé en quatre chapitres :

- Le premier présente la problématique générale de l'étude. L'accent est principalement mis sur la description des interactions entre les nanoparticules et l'environnement biologique ainsi que sur les moyens disponibles pour gérer ces interactions. Les problématiques propres aux différentes applications seront par la suite présentées.

- La seconde partie est consacrée au développement de greffages covalents haute densité de macromolécules de poly(oxyde d'éthylène) sur des surfaces de silice

nanométriques. Les nanoparticules cœur-couronne ainsi obtenues servent, par la suite, de base pour l'étude de bioconjugaison.

- Le troisième expose la construction des différents nano-objets au regard de leur application biologique.
- Enfin le quatrième chapitre présente les premiers résultats biologiques obtenus avec les nano-systèmes développés au cours du chapitre précédent dans le cadre de leur application respective.

## Références

- (1) Li, Z.; Barnes, J. C.; Bosoy, A.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2590–2605.
- (2) De, M.; Ghosh, P. S.; Rotello, V. M. *Adv. Mater.* **2008**, *20* (22), 4225–4241.
- (3) Lee, D.-E.; Koo, H.; Sun, I.-C.; Ryu, J. H.; Kim, K.; Kwon, I. C. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2656–2672.
- (4) Swierczewska, M.; Liu, G.; Lee, S.; Chen, X. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2641–2655.
- (5) Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V. M. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (5), 2739–2779.
- (6) Jans, H.; Huo, Q. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2849–2866.
- (7) Monopoli, M. P.; Åberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K. A. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7* (12), 779–786.
- (8) Walkey, C. D.; Chan, W. C. W. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2780–2799.
- (9) Sapsford, K. E.; Algar, W. R.; Berti, L.; Gemmill, K. B.; Casey, B. J.; Oh, E.; Stewart, M. H.; Medintz, I. L. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (3), 1904–2074.



Chapitre I. Gestion des interactions  
entre la surface des nanoparticules et  
leur milieu biologique d'application



Les nanoparticules trouvent actuellement de nombreuses applications en biologie, que cela soit dans le domaine biomédical, ou biotechnologique. Cela s'explique par les propriétés physiques singulières remarquables qu'elles présentent à l'échelle nanométrique (1-100 nm) par rapport au matériau massif. La matière ainsi finement divisée possède également une surface spécifique très élevée. Ce domaine de recherche, actuellement très actif, fait régulièrement l'objet de revues dans lesquelles les différentes propriétés des nanoparticules sont abordées ainsi que les applications pour lesquelles elles sont envisagées.<sup>1-5</sup> Depuis plus de vingt ans, les chimistes développent de nouvelles synthèses de nanoparticules afin d'améliorer le contrôle de la morphologie et des propriétés. En dehors de leurs propriétés physiques qui ont fait l'objet de nombreuses publications et ouvrages, il est également pertinent, dans le contexte biotechnologique de s'intéresser au comportement des nanoparticules dans l'environnement biologique. L'interface nanoparticule-milieu biologique est le lieu où se concentrent toutes les interactions qui conditionneront le rôle que peuvent jouer les nanoparticules dans le cadre d'applications en biologie. Du fait de la surface spécifique élevée développée par les nanoparticules, la gestion de ces interactions se résume en un travail d'ingénierie de surface de matériaux divisés et dispersés en milieu liquide.

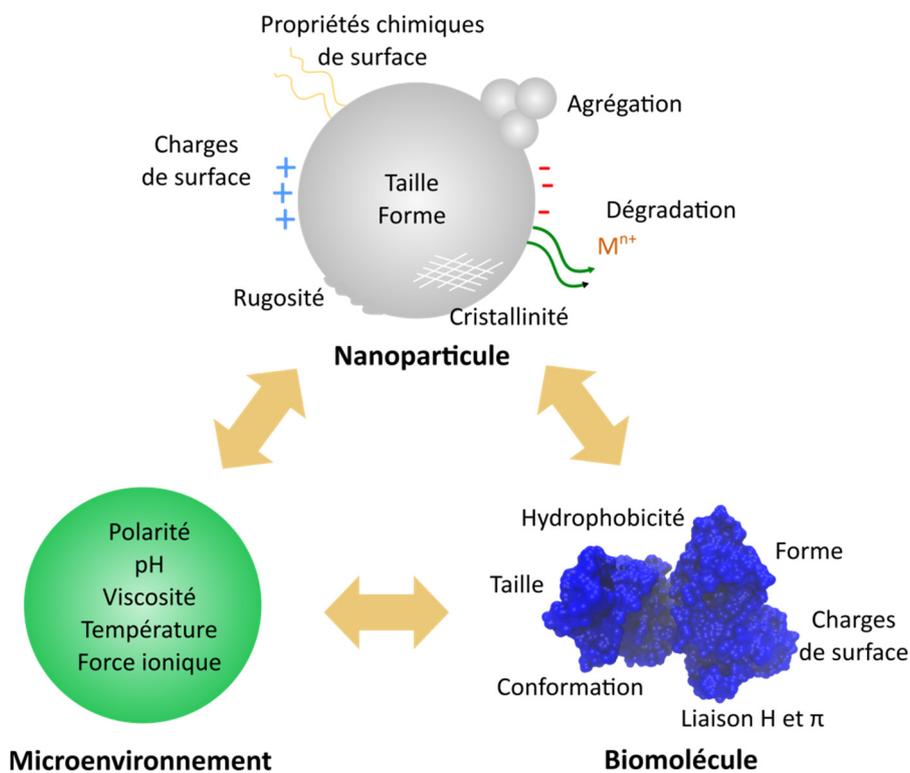
L'environnement biologique au sens large est un système complexe, que cela soit à l'échelle d'un organisme entier ou à l'échelle d'un fluide biologique. C'est un milieu caractérisé par une très grande diversité de molécules, allant de simples sels, à des (macro)molécules complexes tels que les protéines, les acides nucléiques ou encore les lipides. Certaines de ces (macro)molécules sont-elles-mêmes capables de s'auto-assembler. C'est un milieu dynamique au sein duquel des réactions chimiques s'y produisent constamment, et où la matière est en mouvement. Les organismes vivants sont compartimentés et hiérarchisés par des barrières biologiques et donnent lieu à des compositions variables entre les compartiments.

Dans le cadre d'applications biologiques, la notion d'adressage est très importante. En effet, pour présenter un rôle biologique, une nanoparticule doit avoir un impact sur une cible particulière (molécules, cellule, etc...). Il est donc nécessaire que la nanoparticule puisse reconnaître sa cible dans cet environnement complexe. Pour intégrer cette notion de ciblage, la nanoparticule doit répondre idéalement aux deux critères suivants : une grande affinité et qu'une grande spécificité pour sa cible. Alors que l'affinité traduit la force avec laquelle se forme un complexe ligand-cible, la spécificité représente quant à elle la capacité du ligand à se lier préférentiellement à sa cible plutôt qu'à d'autres objets. Afin d'optimiser ses deux

propriétés, il est capital de connaître et de comprendre le comportement des nanoparticules dans un milieu biologique.

## A. Interactions entre les nanoparticules et l'environnement biologique

Le comportement des nanoparticules dans un milieu biologique est fonction d'une multitude de facteurs, tels que leur taille, leur forme, ou la nature de leur surface (charge, balance hydrophile/hydrophobe), mais également de la composition en biomolécule et de l'environnement physiologique (**Figure I.1**).<sup>6</sup>



**Figure I.1** : Schématisation des différents facteurs physico-chimiques influençant les interactions entre les nanoparticules et les biomolécules. Adaptée de la référence.<sup>6</sup>

Cette multitude de paramètres physico-chimiques explique la grande difficulté pour prédire avec précision le comportement des nanoparticules dans un milieu biologique. Il est cependant actuellement possible de décrire les comportements généraux.

Avant de nous intéresser aux interactions des nanoparticules dans le milieu d'application réel, nous allons dans un premier temps poser les bases de la stabilisation colloïdale décrivant leur comportement dans un milieu simple.

## A.1 Stabilité colloïdale des nanoparticules dans un milieu simple

Une suspension colloïdale est, par définition, un système composé d'au moins une phase dispersée (colloïde) dans une phase dispersante. La gravité a un effet négligeable sur les colloïdes par rapport à ceux de l'agitation thermique. Le système ne sédimente généralement donc pas sur des temps courts, et de nouvelles forces gouvernent la stabilité colloïdale. La notion de stabilité colloïdale permet de décrire la capacité des nanoparticules à rester ou non en suspension dans leur environnement.

Une des principales caractéristiques des nanoparticules est leur très grande surface spécifique comparée au matériau massif. Ceci a pour conséquence d'augmenter l'interface, ce qui nécessite de l'énergie. En effet, une interface correspond à une discontinuité entre deux milieux, et donc à des liaisons chimiques non compensées. Un nanomatériau de grande surface spécifique est donc souvent moins stable que le même matériau à l'échelle macroscopique, ce qui peut entraîner la coalescence des nanoparticules pour minimiser cette énergie de surface. Cette perte de compensation de liaisons chimiques se retrouve également au niveau du milieu dispersant. Lorsque des nanoparticules sont dispersées dans un solvant, les molécules de celui-ci entrent en interaction avec la surface des nanoparticules, or, si cette interaction perturbe la structure du solvant, alors l'énergie libre de Gibbs augmente. En effet, le gain d'entropie engendré par la dispersion des nanoparticules au sein du milieu ne suffit pas à compenser la perte d'entropie subie par les molécules de solvant. Ainsi le système est moins stable à l'état dispersé qu'agrégé.<sup>7</sup> Les nanoparticules entrent en permanence en collision à cause du mouvement brownien, ce qui aboutit dans ces conditions à la déstabilisation de la dispersion. Il existe également des forces attractives entre les nanoparticules, contribuant à la formation d'agrégats. Ce sont les forces de van der Waals. D'autres forces attractives peuvent également entrer en jeu, comme par exemple les forces dipolaires magnétiques, ou électrostatiques dans le cas d'un système hétérogène. Une dispersion colloïdale stable n'est donc possible uniquement que s'il existe des forces de répulsions entre les nanoparticules afin de contrebalancer les contributions présentées précédemment.

Le choix ici a été de se focaliser sur le comportement des dispersions de nanoparticules placées dans l'environnement biologique. Toutes les notions de stabilité en milieu simple, certes essentielles, mais très basiques sont présentées en annexe n° 1.

## A.2 Comportement des nanoparticules dans un milieu biologique

Lorsque les nanoparticules entrent dans un milieu physiologique, celles-ci se trouvent dans un environnement très concentré en molécules variées. Par exemple, le plasma sanguin est composé de plus de 3 000 protéines différentes<sup>8</sup> représentant une concentration globale de 60 g/l.<sup>9</sup> La surface de la nanoparticule est alors rapidement saturée par l'adsorption non spécifique de biomolécules provoquée par différents effets (interactions de vdW, interactions électrostatiques, effet hydrophobe, par exemple).<sup>10-12</sup> Cette couche se formant à la surface des nanoparticules est nommée « couronne biomoléculaire ». Elle est composée principalement de protéines, de lipides et de glucides.<sup>10</sup> C'est finalement cette couronne qui forme l'interface entre la nanoparticule et l'environnement biologique.

### A.2.1 Mécanisme de formation de la couronne biomoléculaire

Pour que l'adsorption d'une biomolécule à la surface d'une nanoparticule soit spontanée, celle-ci doit être thermodynamiquement favorable. Cela veut dire que :

$$\Delta G_{ads} = \Delta H_{ads} - T\Delta S_{ads} < 0$$

où  $\Delta G_{ads}$ ,  $\Delta H_{ads}$ , et  $\Delta S_{ads}$  sont respectivement les variations de l'énergie libre de Gibbs, de l'enthalpie et de l'entropie et  $T$  la température.<sup>13</sup>

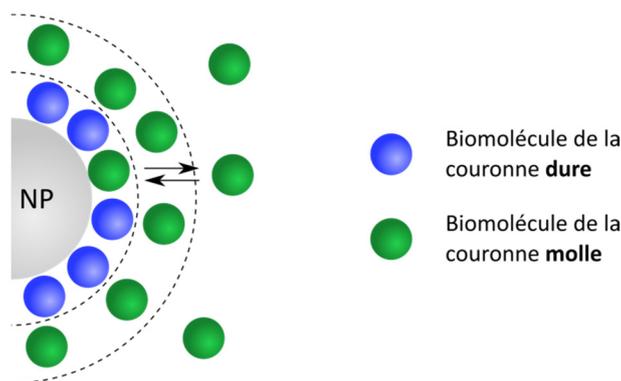
La perte en énergie du système peut provenir de différents paramètres tels que la formation de nouvelles liaisons non covalentes, de la libération des molécules d'eau interfaciales ou encore d'un changement de conformation des biomolécules.

La stabilité du complexe biomolécule-nanoparticule est déterminée par  $\Delta G_{ads}$ . Dans le cas où cette valeur est élevée alors la probabilité de rupture du complexe est faible, et inversement. Les surfaces chargées promouvant la formation de liaisons électrostatiques formeront des complexes plus stables avec les biomolécules que les particules neutres. Il en est de même pour les nanoparticules hydrophobes car l'adsorption de biomolécules à leur surface libère les molécules d'eau à l'interface. Des études avec des nanoparticules présentant des surfaces différentes ont montré que la composition de la couronne est fortement influencée par les propriétés de surface des nanoparticules.<sup>14-17</sup>

Il est possible qu'une protéine s'adsorbant à la surface de la nanoparticule subisse des changements conformationnels si ces changements conformationnels permettent l'exposition d'une séquence d'acide aminé enfouie hydrophobe ou chargée pour former de nouvelles liaisons.<sup>18</sup> Etant donné que les charges d'une protéine sont généralement en surface, c'est avec les surfaces hydrophobes que cet effet est le plus important.<sup>19</sup>

Les propriétés physicochimiques de la surface ne sont pas les seules à présenter un impact sur la composition de la couronne, le rayon de courbure est également un paramètre à prendre en compte. Par exemple, Tenzer *et al.* ont observé des différences de composition de la couronne entre des nanoparticules de silice de 8 nm, 20 nm et 125 nm.<sup>20</sup> En effet, le rayon de courbure impacte la surface de contact entre la nanoparticule et la biomolécule, ce qui induit des différences d'affinité. Le rayon de courbure impacte également le niveau de modifications conformationnelles des protéines adsorbées.<sup>13</sup>

Les biomolécules constituant la couronne peuvent être classées en deux groupes différents. D'un point de vue général, les protéines s'adsorbent soit fortement, soit faiblement à la surface de la nanoparticule.<sup>16,21</sup> Le premier groupe constitue ce qui est nommé « couronne dure » alors que le second groupe est décrit par le terme de « couronne molle ». <sup>11,13</sup> La couronne dure serait composée de biomolécules directement et fortement liées à la surface, alors que la couronne molle serait composée de biomolécules, soit faiblement liées à la surface de la nanoparticule soit à la couronne dure via des interactions faibles (**Figure I.2**).



**Figure I.2 :** Représentation schématique des couronnes dure et molle.

### ***A.2.2 Dynamique de la couronne biomoléculaire***

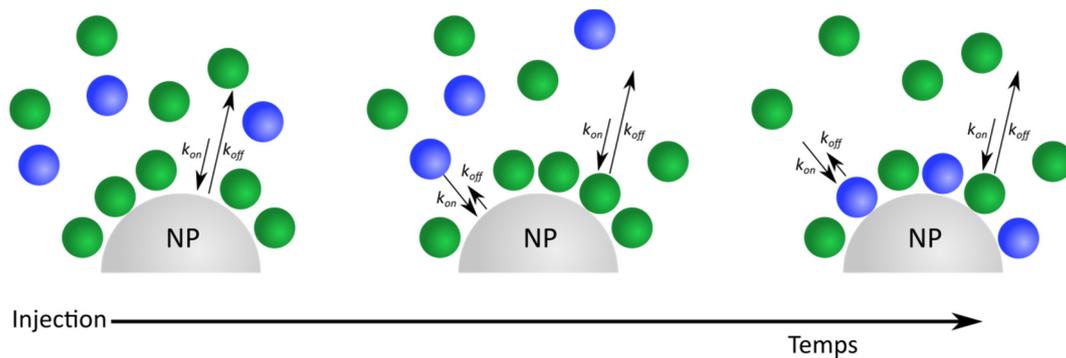
Bien que l'environnement soit très riche en biomolécules, toutes ne participent pas à la formation de la couronne. Lorsque les particules sont mises en contact avec le plasma sanguin, seulement quelques dizaines de protéines sont détectées dans la couronne. Par exemple, Tenzer *et al.* ont détecté 125 protéines à la surface de nanoparticules de silice après un contact avec le plasma.<sup>20</sup> De plus, ils observent que l'abondance des protéines présentes dans la couronne n'est pas directement dictée par l'abondance dans le plasma. En effet, comme il a été abordé auparavant, la liaison de certaines biomolécules peut être favorisée par rapport à d'autres. La couronne biomoléculaire doit également être vue comme une interface dynamique et non figée dans l'état le plus rapidement atteint, c'est-à-dire une couronne composée par les biomolécules les plus abondantes.

L'adsorption de biomolécules et leur désorption se produisent en permanence. Les vitesses d'association et dissociation sont définies par les constantes  $k_{on}$  et  $k_{off}$  respectivement et la constante d'équilibre de dissociation  $K_D$  est définie par :

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

A l'heure actuelle, cette valeur, déterminée pour quelques couples nanoparticules-protéines, varie entre  $10^{-4}$  M et  $10^{-9}$  M.<sup>22-25</sup>

Bien qu'une biomolécule soit en grande concentration et s'adsorbe rapidement avec un  $k_{on}$  élevé, si celle-ci se désorbe également rapidement ( $k_{off}$  élevé), alors, elle sera remplacée au cours du temps par une biomolécule possédant un  $K_D$  plus faible (**Figure I.3**).



**Figure I.3** : Représentation schématique de la dynamique de la couronne biomoléculaire.

Les biomolécules sont donc en compétition permanente. Les différences entre leur  $k_{off}$  font que les biomolécules se désorbant le plus rapidement sont remplacées par les biomolécules présentant des cinétiques de désorption plus lentes. La concentration de chaque biomolécule joue également un rôle. Par exemple, lorsque des nanoparticules sont injectées dans le sang, rapidement une couronne composée par l'albumine ou le fibrinogène, deux biomolécules très présentes dans le plasma, sera constituée. Ces protéines seront par la suite échangées par des protéines possédant une plus grande affinité, comme certaines apolipoprotéines dans le cas de nanoparticules hydrophobes.<sup>16</sup> A l'opposé, quand les nanoparticules se retrouvent dans un environnement pauvre en biomolécules, alors même celles présentant une faible affinité resteront adsorbées sur la particule. Ces cinétiques sont fortement dépendantes des types de surfaces mis en jeu et ne peuvent pas être généralisées car dans le cas où les biomolécules concentrées présentent également une affinité élevée, le second processus n'a pas lieu d'être.

La première adsorption se produit très rapidement et permet dans certains cas de stabiliser les nanoparticules d'un point de vue colloïdal. Les fluides biologiques présentent une force ionique équivalente à 150 mM de NaCl, or comme il a été présenté auparavant, dans

le cas de nanoparticules chargées, l'augmentation de la force ionique comprime la couche de contre-ions, ce qui diminue les forces de répulsion et provoque l'agrégation des nanoparticules. Lorsque la couronne se forme suffisamment rapidement, celle-ci apporte une stabilité stérique aux nanoparticules. Ce phénomène a été observé par exemple pour des particules d'or citratées ainsi que des nanoparticules de silice et d'argent après ajout dans du plasma.<sup>26-28</sup> A l'opposée, cette couronne peut être à l'origine de formation d'agrégats si celle-ci forme un pont entre plusieurs particules.

Le phénomène d'échange et d'atteinte de l'équilibre sont quant à eux plus long, pouvant durer sur plusieurs heures.<sup>29</sup> Les durées sont telles que dans le cas où la nanoparticule est dans un milieu biologique dynamique, comme un organisme, alors la couronne n'atteindra jamais l'équilibre. En effet, le temps que l'équilibre soit atteint, la particule aura changé de compartiment. La couronne sera alors influencée par la nouvelle composition du compartiment. De plus, lorsque les nanoparticules changent de compartiment biologique, ou traversent des barrières, comme les cinétiques de désorption des biomolécules de la couronne dure sont lentes, alors celles-ci ne seront que partiellement remplacées. Cette couronne représente alors l'historique de la nanoparticule. Par exemple, des nanoparticules inhalées atteignent le sang en emmenant également des protéines pulmonaires, ce qui peut engendrer une réponse physiologique totalement différente de celle obtenue avec des nanoparticules directement injectées en intraveineuse.<sup>30</sup>

### ***A.2.3 Interactions entre le complexe nanoparticule-couronne biomoléculaire et le milieu biologique.***

Il est communément admis, étant donné les différences de cinétiques entre la couronne dure et la couronne molle, que c'est la couronne dure qui définit l'identité biologique des nanoparticules.<sup>10,13</sup>

Si la couronne biomoléculaire est reconnue par des récepteurs biologiques, que cela soit par des interactions spécifiques ou non, celle-ci sera à l'origine du déclenchement d'un processus physiologique.

Pour les applications biomédicales *in vivo*, la problématique de l'élimination des nanoparticules par le système immunitaire doit être prise en compte. Lorsqu'une nanoparticule est injectée chez un animal, celle-ci est considérée comme un objet étranger à l'organisme. Les opsonines sont des biomolécules plasmatiques ayant pour fonction d'induire la phagocytose des antigènes auxquels elles se fixent par les macrophages. L'un des membres

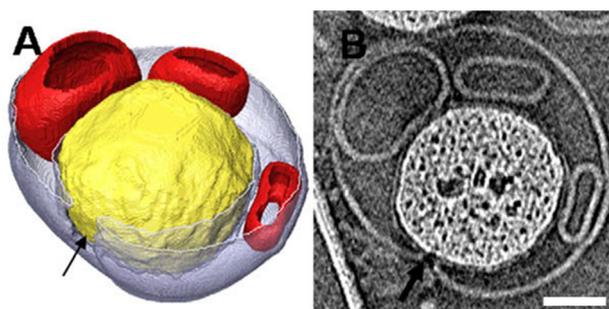
les plus présents est la protéine du complément C3. Cette protéine peut dans certains cas correspondre à plus de 30 % en masse de la totalité des protéines adsorbées sur les nanoparticules, ce qui déclenche la phagocytose des nanoparticules par les macrophages.<sup>31</sup> Les immunoglobulines G (IgG) font également partie des opsonines et sont présentes en grande quantité dans le plasma. Lorsque celles-ci sont liées à l'antigène, ils activent également la phagocytose de l'antigène. L'orientation de l'anticorps adsorbé est importante car pour qu'il puisse promouvoir la phagocytose, sa région Fc doit rester accessible. La dénaturation de l'albumine provoquée par son adsorption à la surface de nanoparticules de silice fait apparaître un épitope normalement absent. Cet épitope reconnu par les phagocytes mononucléaires favorise l'élimination des nanoparticules.<sup>32</sup> D'un point de vue général, les opsonines adsorbées à la surface des nanoparticules sont reconnues par les cellules du système réticulo-endothélial (SRE) et les nanoparticules sont éliminées de la circulation sanguine. Le SRE est composé de macrophages, libres ou fixés, répartie dans de nombreux tissus, dont le foie qui contient les cellules de Kupffer, représentant 90 % des cellules macrophagiques de l'organisme.<sup>33</sup> Sans contrôle des interactions entre la surface de la nanoparticule et le milieu biologique, les nanoparticules sont rapidement captées par le foie.

La couronne biomoléculaire n'a pas seulement un rôle dans l'opsonisation des nanoparticules. Par exemple, Kreuter *et al.* suggèrent que l'adsorption d'apolipoprotéines à la surface de nanoparticules facilite le passage de la barrière hémato-encéphalique par imitation des lipoprotéines.<sup>34</sup> La couronne biomoléculaire est également capable d'interagir avec les processus de signalisation. Deng *et al.* ont montré que l'adsorption du fibrinogène à la surface de nanoparticules d'or modifiées par des macromolécules de poly(acide acrylique) provoque une modification conformationnelle de la protéine. Cette dénaturation fait apparaître un nouvel épitope reconnu par l'intégrine Mac-1, ce qui a pour conséquence d'amplifier la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, et donc de déclencher le processus d'inflammation.<sup>35</sup>

Un autre phénomène plus inquiétant lié à la dénaturation des protéines s'adsorbant a également été observé. Certaines nanoparticules augmentent le taux de nucléation de la fibrillation de protéines.<sup>36,37</sup> La fibrillation de protéines est impliquée dans des maladies telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Creutzfeld-Jacob, ou autres maladies neurodégénératives à plaques amyloïdes.

Les cellules peuvent interagir avec les nanoparticules via la reconnaissance de biomolécules présentes dans la couronne, où directement par reconnaissance de la surface de la nanoparticule. Dans le second cas, les mécanismes d'internalisation peuvent être variés, dépendant du type d'interaction mis en jeu entre la cellule et la nanoparticule.<sup>6,13</sup> Le second

phénomène de reconnaissance est plus probable dans le cas d'études *in vitro* sur des cultures cellulaires sans plasma, car *in vivo* la surface de la nanoparticule n'est généralement pas accessible. La capture est alors dite « sérum-indépendante ». Cependant ces mécanismes sont également observés en présence de plasma lorsque la surface n'adsorbe que très faiblement les biomolécules.<sup>31</sup> Les nanoparticules peuvent interagir directement avec la membrane plasmique. Par exemple, il a été montré que les nanoparticules de silice au contact d'une membrane lipidique provoque sa courbure par formation d'interactions favorables débouchant sur l'internalisation de la nanoparticule (**Figure I.4**).<sup>38</sup>



**Figure I.4** : Reconstruction en tomographie électronique et micrographie cryo-électronique d'une nanoparticule de silice internalisée dans un liposome. Barre d'échelle : 50 nm. Adapté de <sup>38</sup>

La surface de la nanoparticule ainsi que la couronne biomoléculaire adsorbée ne sont pas les seuls paramètres influençant le devenir des nanoparticules dans un milieu biologique. Les biomolécules volontairement greffées à la surface pour apporter la fonction biologique à la nanoparticule peuvent également avoir un impact. Beduneau *et al.* ont montré que le greffage d'IgG à la surface de nanoparticules d'oxydes de fer permettait d'augmenter leur capture par les macrophages après reconnaissance de la région Fc des IgG.<sup>39</sup> Dans cette étude, les macrophages sont les cellules ciblées, donc l'effet est bénéfique, cependant les IgG sont également intéressantes pour leur capacité à reconnaître spécifiquement un antigène, et sont utilisées en tant que fonction de ciblage. Dans ce cas, la reconnaissance des nanoparticules par les macrophages est à éviter.

#### **A.2.4 Conclusion**

Cette partie permet d'apprécier l'étendue de la complexité des interactions entre les nanoparticules et l'environnement biologique. La grande complexité du système d'étude rend celles-ci délicates et difficilement comparables. De plus, le manque de connaissance dans ce domaine rend difficile la prédiction du devenir ainsi que de l'impact des nanoparticules dans le milieu biologique. Les nanoparticules peuvent simplement ne pas remplir leur rôle car elles sont mises hors service via de nombreux mécanismes possibles ou induire une modification

du milieu biologique en provoquant la dénaturation de protéines par exemple, ou en initiant des processus débouchant sur des pathologies (inflammations, plaques amyloïdes...).

### A.3 Gestion des interactions non spécifiques

Apporter une fonction biologique contrôlée à une nanoparticule consiste à la fois à promouvoir les interactions désirées et limiter les interactions non souhaitées avec l'environnement (passivation des surfaces d'un point de vue biologique).

A notre connaissance, il existe deux grandes stratégies afin de limiter l'adsorption non désirée de biomolécules aux surfaces. La première stratégie consiste à former une interface basée sur des biomolécules spécifiques. La formation d'une couronne fixe composée de biomolécules choisies permet de limiter l'adsorption d'autres biomolécules par gêne stérique. Par exemple, Peng *et al.* montrent qu'en formant *ex vivo* une couronne d'albumine à la surface de nanoparticules, le temps de circulation dans le système sanguin est augmenté par rapport à des liposomes nus.<sup>40</sup> Les auteurs expliquent cette observation par une diminution de la liaison des opsonines. Dans la même idée, Nooney *et al.* augmentent la stabilité colloïdale de nanoparticules de silice en adsorbant de la BSA à leur surface.<sup>41</sup> Cette stratégie nécessite une purification de l'objet biologique désiré. Or la purification de biomolécules peut provoquer leur dénaturation partielle, ce qui nous le rappelons peut être à l'origine d'interactions non spécifiques.<sup>32,35</sup> Afin de s'affranchir de cette étape de purification, une solution consiste à développer des surfaces de nanoparticules présentant une grande affinité pour une protéine cible présente dans le milieu biologique d'étude. La surface de la nanoparticule est alors spontanément recouverte par une couronne composée de la biomolécule désirée.<sup>42</sup> L'adsorption spontanée de la protéine d'intérêt sur la nanoparticule nécessite un contrôle élevé de la surface ainsi que de l'origine des interactions mises en jeu, afin d'éviter les adsorptions non spécifiques.

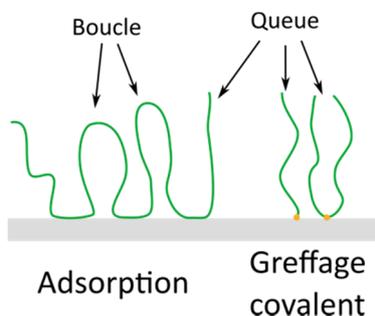
La seconde stratégie, bien plus commune, pour limiter les interactions non spécifiques consiste à former une barrière énergétique artificielle grâce à la présence de macromolécules polymère fortement hydrophiles.

#### A.3.1 Les polymères anti-adsorption

La stratégie la plus répandue pour empêcher les interactions non spécifiques consiste à greffer des macromolécules polymères hydrophiles électriquement neutres sur la surface des nanoparticules.<sup>13,43,44</sup> L'origine principale de l'effet antiadhésif réside dans la capacité de la

macromolécule à générer des répulsions stériques vis-à-vis des biomolécules rendant leur rapprochement de la surface énergétiquement défavorable (voir également l'annexe n° 1 à propos de la répulsion stérique).<sup>45,46</sup>

Les macromolécules polymères peuvent être soit simplement adsorbées<sup>47</sup> soit greffées de façon covalente à la surface,<sup>48</sup> mais dans les deux cas celle-ci doivent former des boucles ou des queues afin d'apporter la répulsion stérique (**Figure I.5**).

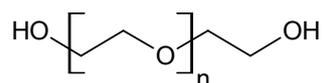


**Figure I.5** : Représentation schématique de macromolécules adsorbé ou greffées de façon covalente à une surface apportant de la répulsion stérique.

Pour les applications en biologie, il est préférable que les macromolécules polymères soient greffées de façon covalente car les macromolécules adsorbées risquent de se désorber en milieu physiologique,<sup>13</sup> par compétition avec des biomolécules par exemple. L'obtention de surfaces recouvertes de polymères greffés covalamment peut être obtenue via deux voies :<sup>44,48</sup>

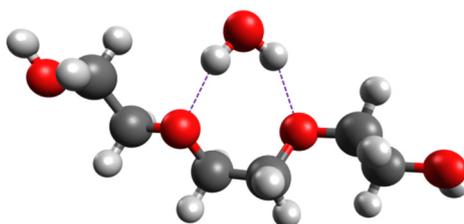
- « Grafting to » : les chaînes de polymères pré-synthétisées sont greffées à la surface par des points d'ancrage.
- « Grafting from » : la polymérisation est initiée à partir des fonctions chimiques portées par la surface.

Le poly(oxyde d'éthylène) (POE) également nommé poly(éthylène glycol) (PEG) (formule en **Figure I.6**) est considéré comme le « gold standard » des polymères destinés à prévenir l'adsorption des biomolécules.<sup>44</sup> La modification de la surface d'un objet par des macromolécules de PEG est désignée par le terme « PEGylation ». Il a été reconnu dans de nombreuses études que la PEGylation de nanoparticules permet de diminuer l'adsorption de protéines et d'augmenter leur temps de circulation.<sup>49-52</sup> Le premier système de délivrance de principes actifs, basé sur des liposomes PEGylés encapsulant la doxorubicine, date de 1995.<sup>53</sup> L'utilisation du PEG s'est depuis largement répandue.



**Figure I.6 :** formule du poly(oxyle d'éthylène).

Le PEG présente plusieurs avantages expliquant son grand intérêt. Il est très soluble dans l'eau, contrairement au poly(méthylène glycol) et au poly(propylène glycol). Cela s'explique par le fait que dans sa conformation gauche, il offre deux accepteurs de liaisons hydrogène avec une seule molécule d'eau (**Figure I.7**). Cette conformation est à l'origine de sa propension à former des boucles.<sup>54</sup> Le PEG est également soluble dans de nombreux solvants organiques, ce qui facilite la modification chimique au niveau de ses fonctions alcool.

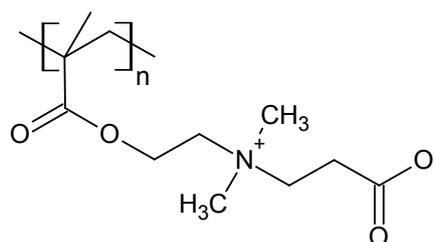


**Figure I.7 :** Structure 3D du PEG en conformation gauche, et liaisons hydrogènes avec une molécule d'eau. Structure réalisée avec le logiciel libre Avogadro 1.1.0,<sup>55</sup> et le champ de force MMFF94s. Blanc : hydrogène ; Gris : carbone ; Rouge : oxygène.

Bien que la PEGylation réduise l'adsorption des biomolécules à la surface des nanoparticules, elle ne permet pas de la supprimer en totalité, même avec des densités de greffage élevées.<sup>31</sup> Ceci est probablement dû à l'adsorption non spécifique des biomolécules directement sur les macromolécules de PEG.<sup>56</sup> De plus, les nanomatériaux PEGylés pourraient induire une réponse immunitaire.<sup>57</sup> Il a notamment communément été observé une diminution du temps de circulation de nanoparticules PEGylées à la seconde injection.<sup>58</sup> Ce phénomène est accompagné de la présence d'IgM anti-PEG dans le sérum. Cependant cette réponse immunitaire semble très dépendante de la composition de l'objet PEGylé.<sup>59</sup>

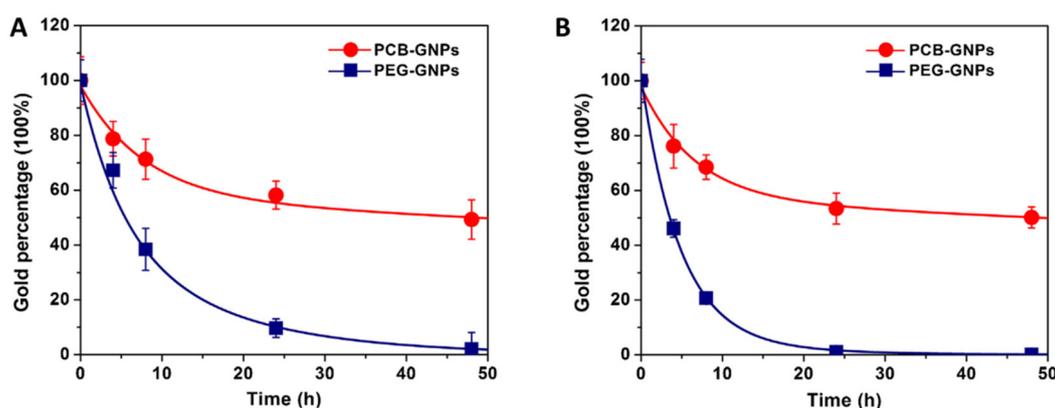
Afin de pallier les lacunes du PEG, d'autres polymères ont récemment été étudiés pour leur capacité à prévenir l'adsorption de biomolécules.<sup>44</sup> Parmi les potentielles alternatives à l'utilisation du PEG il existe notamment les poly(2-oxazoline), les peptides et peptoïdes (polymères synthétique mimétique des peptides), ainsi que les polymères zwitterioniques. Ces derniers sont électriquement neutres, mais l'unité monomère possède à la fois une fonction chargée positivement et une fonction chargée négativement. Ces polymères sont fortement hydratés, ce qui peut être à l'origine de leur efficacité dans la répulsion des biomolécules.

Parmi cette famille de polymère, le poly(méthacrylate de carboxybétaine) (PCB) est très prometteur (formule chimique en **Figure I.8**).



**Figure I.8** : Formule du poly(méthacrylate de carboxybétaine).

En 2008, Ladd *et al.* montrent sur un substrat d'or que le PCB présente une capacité à prévenir l'adsorption de protéines supérieure au PEG, alors même que l'épaisseur de la couche polymère est plus faible.<sup>60</sup> Récemment, l'étude réalisée avec des nanoparticules d'or (GNP) modifiées par des macromolécules de PEG ou de PCB par Yang et ces collaborateurs montre que les GNP-PCB présentent un temps de demi-vie de circulation ( $t_{1/2}$ ) de 56 h contre un  $t_{1/2}$  d'environ 9 h pour les GNP-PEG (**Figure I.9**).<sup>61</sup> De plus ce temps de demi-vie est identique à la seconde injection pour les GNP-PCB, alors qu'il chute à environ 5 h avec les particules PEGylées comme il a déjà été observé.<sup>58</sup>



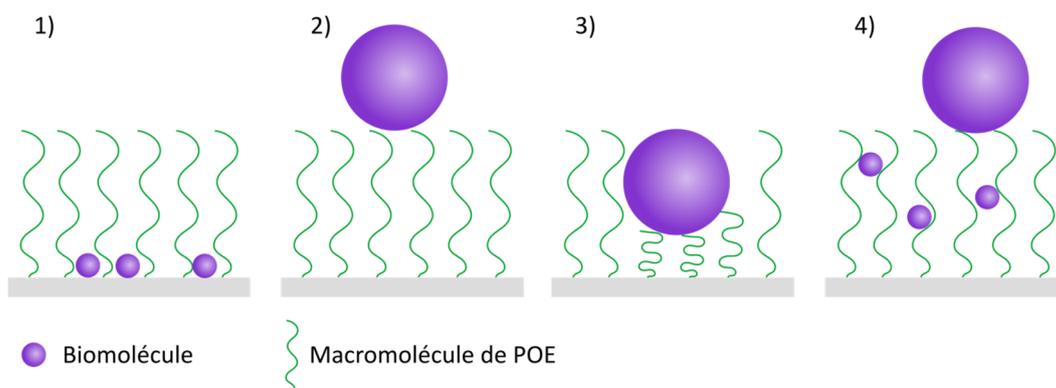
**Figure I.9** : Suivi de la quantité de nanoparticules dans le sang après la première (**A**) et la seconde injection (**B**). Adapté de la réf.<sup>61</sup>

Au vu des résultats, l'utilisation des alternatives aux dérivés du poly(oxyde d'éthylène) devrait se développer dans les années à venir. Le PEG reste cependant actuellement le plus employé grâce à sa facilité de production, mais également du fait des savoir-faire développés au cours des décennies précédentes. De plus, ce polymère est intégré dans des nanomatériaux approuvés par la FDA.<sup>52</sup> C'est pourquoi nous allons plus particulièrement nous intéresser aux surfaces PEGylées.

### A.3.2 Etude conformationnelle des chaînes linéaires de PEG à la surface d'une nanoparticule

Pour que la couche de PEG présente la capacité à prévenir l'adsorption des biomolécules, il a été montré, dans un premier temps d'un point de vue théorique, que la densité de greffage ainsi que la longueur du polymère étaient deux paramètres importants.<sup>45,46,62</sup> Quatre modes d'adsorption différents sont proposés (**Figure I.10**):

- 1) La biomolécule diffuse au sein de la couche polymère et s'adsorbe directement à la surface du matériau. Ce cas peut se produire quand l'espace entre les polymères est supérieur aux dimensions de la biomolécule.
- 2) La biomolécule s'adsorbe à la surface de la couche de polymère du fait de l'établissement d'interactions de vdW ou électrostatiques avec la surface.
- 3) La biomolécule comprime la couche de polymère. Ce cas peut se produire si la compression des macromolécules ne contrebalance pas les interactions à longues portées (vdW, électrostatiques).
- 4) La biomolécule s'adsorbe sur le polymère par des interactions favorables entre les deux.



**Figure I.10** : Modes d'adsorption de biomolécules à une surface PEGylée : 1) Adsorption à la surface par diffusion, 2) Adsorption par interactions à longue portée, 3) Adsorption par compression, 4) adsorption par interactions entre la biomolécule et le PEG.

Une densité de macromolécule polymère greffée élevée permet de diminuer l'espace disponible entre les macromolécules, limitant de ce fait la possibilité de diffusion des biomolécules au sein de la couche de polymère. Cette densité permet également d'impacter la compressibilité de la couche polymère. En effet, la compression des chaînes de PEG provoque une élévation de la concentration en motif monomère et donc une élévation de la pression osmotique, phénomène qui est d'autant plus important pour une couche dense en macromolécules. L'épaisseur de la couche permet, quant à elle, de maintenir à distance les

protéines de la surface et de diminuer ainsi la contribution des interactions de vdW et électrostatiques.

La conformation des macromolécules polymères greffées à la surface d'une nanoparticule est fonction de la densité de greffage à la surface et de la taille des macromolécules greffées, caractérisée par le rayon de Flory  $R_F$ .

$$R_F = aN^{\frac{3}{5}}$$

Avec :

a : longueur d'une unité monomère, a = 0,358 nm pour le PEG. <sup>63</sup>

N : degré de polymérisation

La distance moyenne  $D$  entre deux points d'ancrage peut être exprimée par la relation suivante : <sup>64,65</sup>

$$D = 2(\pi\sigma)^{-\frac{1}{2}} \quad \text{Équation I.1}$$

Avec :  $\sigma$  la densité de greffage (molécules/nm).

En fonction du rapport entre  $D$  et  $R_F$  il est possible de distinguer différents régimes (Figure I.11) :<sup>66</sup>

- 1) Pour les faibles densités de surface où  $D/R_F > 2$ , les chaînes sont suffisamment espacées pour ne pas rentrer en interaction. Les macromolécules adoptent alors une conformation en pelote. C'est le régime en « champignon ».
- 2) Pour les fortes densités de surface où  $D/R_F < 1$ , la distance moyenne entre deux points d'ancrage étant inférieur au rayon de Flory, les macromolécules polymères développent de fortes interactions entre elles. Un équilibre se crée entre la pression osmotique, tendant à étirer les polymères, et l'élasticité des chaînes qui s'oppose à cet étirement. Les chaînes sont sous une conformation étirée, c'est le régime en « brosse ».
- 3) Si  $1 < D/R_F < 2$ , c'est un régime intermédiaire nommé « champignons en interaction »

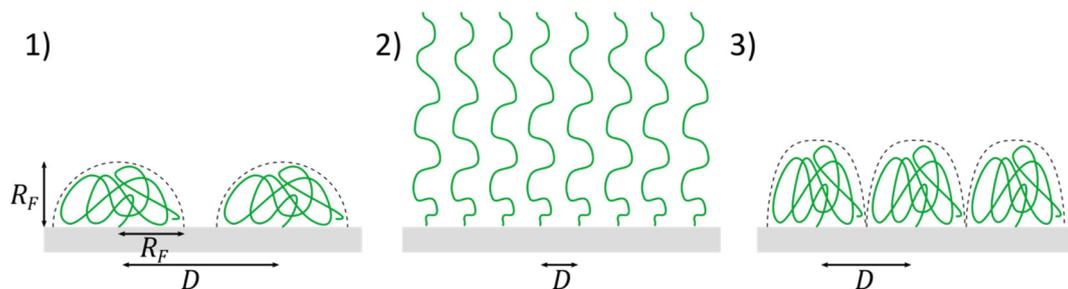


Figure I.11 : Représentation schématique des différents régimes en fonction de  $D$ .

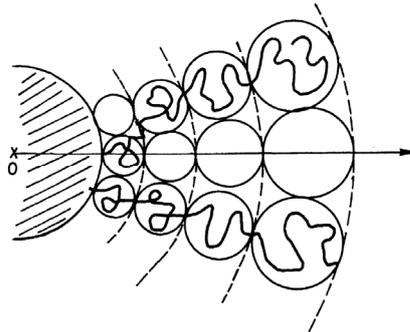
En régime « champignon », l'épaisseur de la couche de polymère  $L$  correspond au rayon de Flory du polymère. Cette conformation ne permet pas de limiter l'adsorption des biomolécules à la surface car celle-ci reste accessible. En régime « brosse », la répulsion mutuelle des polymères les force à s'étirer perpendiculairement à la surface. Sur une surface plane,  $L_p$  est défini par l'expression :<sup>67</sup>

$$L_p \approx aN\sigma^{*\frac{1}{3}}$$

Avec :

$\sigma^*$  : densité de greffage sans dimension ;  $\sigma^* = \sigma \cdot s$  où  $s$  est la surface projetée d'une unité monomère.  $s = v/a$  avec  $v$  le volume occupé par une unité monomère.  $s = 0,236 \text{ nm}^2$  pour le PEG

Cependant le rayon de courbure des nanoparticules étant élevé, il n'est pas possible de le négliger. En effet sur une surface courbe, la densité de monomères décroît au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la surface. La force des interactions diminue donc avec la distance par rapport à la surface. Les segments de polymères loin de la surface ne sont donc pas autant étirés que ceux proches de celle-ci (**Figure I.12**).



**Figure I.12** : Représentation schématique du modèle de Daoud et Cotton. Adapté de la réf.<sup>68</sup>

Daoud et Cotton ont développé un modèle permettant de prédire le rayon d'un polymère en étoile.<sup>68</sup> Cette théorie a été étendue pour des polymères greffés sur des particules par Vagberg *et al.*. L'épaisseur  $L_s$  de la couronne de polymère en régime brosse sur une particule de rayon  $R$  est approchée par la relation :<sup>69</sup>

$$L_s = \left( \frac{8N_k f^{\frac{1-\nu}{2\nu}}}{3 \times 4\nu\nu} L_k^{\frac{1}{\nu}} + R^{\frac{1}{\nu}} \right)^\nu - R \quad \text{Équation I.2}$$

où  $N_k$  est le nombre de segments de Kuhn dans la macromolécule ;  $\nu$ , l'exposant de Flory ( $\nu = 3/5$  en condition de bon solvant) ;  $f$ , le nombre de chaînes greffées sur la nanoparticule, et  $L_k$ , la longueur de Kuhn.

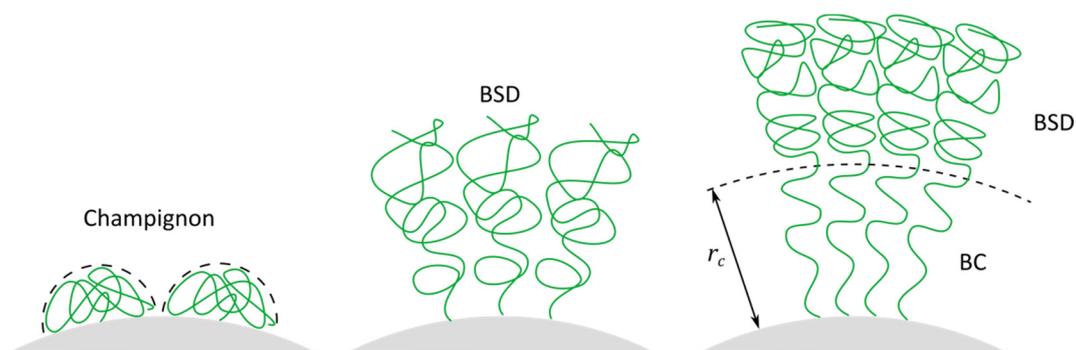
$$N_k = n/c_\infty$$

$$L_k = c_\infty l_0$$

$$f = 4\pi R^2 \sigma$$

où  $c_\infty$  est le ratio caractéristique (4,1 pour le PEG d'après le Polymer Handbook) ;  $l_0$ , la longueur moyenne d'une liaison (0,147 nm pour le PEG), et  $n$ , le nombre de liaisons dans la macromolécule ( $3 \times$  degré de polymérisation pour le PEG)

Des modèles plus fins ont été développés afin de décrire plus précisément la conformation des macromolécules de polymère sur des surfaces sphériques. Ces modèles prennent en compte deux sous régimes différents au sein du régime en brosse (B) : un sous régime semi-dilué (BSD), et un sous régime concentré (BC).<sup>70,71</sup> La transition entre le régime BC et le régime BSD est définie par le rayon critique  $r_c$ . Au sein du régime BC, les interactions entre les chaînes polymères sont très fortes, ce qui fait que celles-ci sont fortement étirées contrairement au régime BSD (**Figure I.13**). Ces modèles intègrent donc différents régimes en même temps.



**Figure I.13 :** Représentation schématique de la conformation des macromolécules de polymère sur une nanoparticule en fonction de la densité de greffage.

Expérimentalement, pour des masses de macromolécules de PEG variant de 750 g.mol<sup>-1</sup> à plus de 20 kg.mol<sup>-1</sup>, des densités de greffages comprises entre 0,1 macromolécules/nm<sup>2</sup> ou moins et 1 macromolécules/nm<sup>2</sup> ont été obtenues.<sup>31,65,72-75</sup> Ces valeurs peuvent largement fluctuer en fonction de la taille des macromolécules employées ainsi que de la stratégie de greffage mise en place. Ces études confirment la théorie en montrant que la conformation brosse des macromolécules linéaires de PEG présente les meilleures propriétés anti-adsorption. A titre d'exemple, Walkey *et al.* montrent que l'adsorption de protéines est minimale sur des nanoparticules d'or de 15 nm à partir de 0,5 macromolécules/nm<sup>2</sup> pour des PEG de 5 000 g.mol<sup>-1</sup>.<sup>31</sup> Dans une autre étude, Gref *et al.* ont observé que l'adsorption de protéines sur une surface PEGylée avec des macromolécules de 5 000 g/mol était réduite de plus de 50 % par rapport à celle mesurée avec des chaînes linéaires de 2 000 g/mol.<sup>73</sup> Puis, au-delà de 5 000 g/mol, l'effet de l'augmentation de la masse

moléculaire des macromolécules sur la diminution de l'adsorption des protéines est fortement réduit.

Pour résumer, l'épaisseur de la couronne polymère permet de diminuer la contribution des interactions à longues portées. La densité de greffage conditionnera la possibilité de diffusion des biomolécules au sein de la couronne ainsi que l'épaisseur de la brosse et la compressibilité de celle-ci. Enfin, pour une densité de greffage donnée, la longueur de la macromolécule linéaire jouera sur l'épaisseur de la brosse. Une faible densité de greffage peut donc être compensée par l'utilisation d'une longue macromolécule.

#### **A.4 Conclusion**

A l'heure actuelle, la prédiction exacte du comportement des nanoparticules ainsi que leurs conséquences dans un milieu biologique (échantillon ou organisme) est impossible du fait de la complexité du système d'étude. D'un point de vue général, les nanoparticules sont rapidement recouvertes par une couronne biomoléculaire qui lui apporte son identité biologique. Le manque de contrôle des interactions à l'origine de la formation de cette couronne biomoléculaire peut engendrer la dégradation de l'échantillon biologique alors que pour les applications biomédicales *in vivo*, cette couronne est principalement responsable de l'élimination des nano-objets par le système réticulo-endothéliale.

La passivation de la surface des nanoparticules consiste, idéalement, à supprimer toute sorte d'interaction entre la nanoparticule et les biomolécules. Cette passivation peut être obtenue en modifiant la surface avec des macromolécules polymère hydrophiles. Dans le cas de l'utilisation de chaînes linéaires de PEG, pour que la réduction de l'adsorption des biomolécules à la surface soit optimale, les macromolécules doivent adopter une conformation en brosse, et la couronne polymère formée doit être suffisamment épaisse pour écranter les interactions à longue portée.

Une fois la surface passivée, il est possible d'apporter les fonctions souhaitées à la nanoparticule.

## **B. Biofonctionnalisation de nanoparticules par conjugaison de biomolécules.**

La conjugaison de biomolécules à la surface de nanoparticules est devenue une discipline à part entière à l'interface de la chimie des matériaux, de la chimie organique et de

la biochimie.<sup>76</sup> Le contrôle de la fonctionnalisation d'une nanoparticule par bioconjugaison fait appel à différentes notions :

- Il doit être possible de former un lien entre la surface de la nanoparticule et la biomolécule. Cette notion évidente sous-entend de maîtriser la chimie de surface de la nanoparticule.
- La mobilité de la biomolécule liée à la nanoparticule ainsi que son orientation doivent être prise en compte. Par exemple la mauvaise orientation d'une protéine peut bloquer l'accès à son site de fixation (site actif, paratope, etc...).
- La fonctionnalité de la biomolécule doit être conservée après conjugaison. La fonction d'une macromolécule biologique (peptides, protéines, acides nucléiques...) est fortement liée à sa structure. Cette structure est maintenue par la présence de liaisons faibles (interactions de vdW, interactions électrostatiques, liaisons hydrogènes) au sein de la molécule. Elle peut donc facilement être perturbée (dénaturation de la biomolécule) dans le cas où la surface de la nanoparticule n'est pas correctement préparée pour son accueil.

La stratégie de bioconjugaison est dictée par de nombreux facteurs tels que la chimie de surface de la nanoparticule, le type de biomolécule, ou encore, l'application finale. Une vision très détaillée du domaine est rapportée par Sapsford *et al.*,<sup>76</sup> ainsi que dans l'ouvrage *Bioconjugate Technique*.<sup>77</sup> Nous allons, ici, nous attacher à donner une vision d'ensemble de cette vaste discipline en présentant dans un premier temps différentes modifications chimiques de surface à l'origine du lien entre la nanoparticule et la biomolécules. Nous nous intéresserons ensuite aux différentes voies de bioconjugaison à proprement parler.

## **B.1 Modification chimique de la surface des nanoparticules**

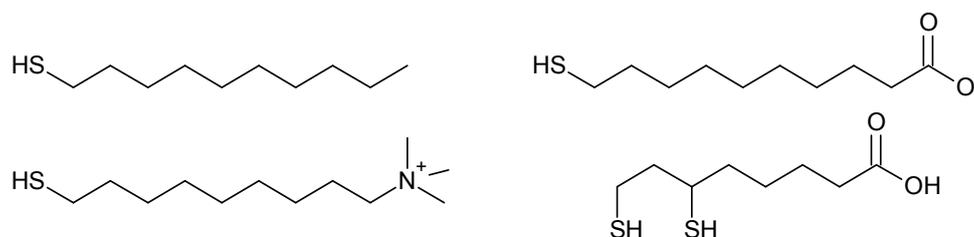
La fonctionnalisation d'une nanoparticule peut être réalisée à l'aide deux grandes classes de molécules : les ligands qui sont des molécules possédant une ou des fonctions chimiques présentant une affinité pour la surface (ancres), et les agents de couplage silaniques organofonctionnels.

### **a. Le cas des ligands**

Les nanoparticules métalliques, telles que les nanoparticules d'or, sont très étudiées et employées pour leurs propriétés physiques remarquables, notamment en optique. La surface

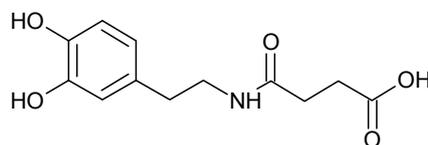
des métaux nobles à la capacité de former des liaisons covalentes de coordination avec les thiols. Ces métaux se lient également aux phosphines, et aux amines.<sup>78</sup> L'utilisation de thioalcanes permet de former des monocouches denses auto-assemblées (SAM) à la surface de ces nanoparticules métalliques.<sup>76</sup> Le thioalcanes peut également présenter une fonction chimique à l'autre extrémité, apportant ainsi une nouvelle fonction de surface à la nanoparticule (**Figure I.14**).

Les liaisons covalentes de coordination ne sont cependant pas aussi fortes que les liaisons covalentes. La liaison entre la surface métallique et le ligand est sensible au potentiel oxydo-réducteur de l'environnement. De plus, les ligands peuvent être échangés par des molécules présentant également des thiols. La perte des ligands de surface peut conduire à la déstabilisation des nanoparticules, mais également à la perte des biomolécules greffées à la nanoparticule via le ligand. L'utilisation de ligands multidentates permet d'augmenter leur affinité pour la surface et ainsi de limiter l'échange.<sup>79,80</sup>



**Figure I.14** : Exemple de ligands permettant de fonctionnaliser les surfaces métalliques.

Pour les surfaces d'oxydes, les atomes métalliques agissent comme des acides de Lewis et forment des liaisons de coordination avec des atomes capable de donner une paire d'électron libre. Des ligands riches en électron sont donc capable de se lier aux surfaces d'oxydes métalliques, comme par exemple les acides carboxyliques, sulfoniques et phosphoriques.<sup>81</sup> Xu *et al.* présentent également la dopamine comme une ancre très stable lorsqu'il s'agit de l'oxyde de fer (**Figure I.15**).<sup>82</sup>



**Figure I.15** : Exemple de ligand basé sur la dopamine.

Parmi les ligands, nous retrouvons également les peptides poly-histidines ( $\text{His}_n$ ) qui ont la capacité de se lier fortement aux surfaces des quantum dots (QD) riches en cadmium ou zinc. Liu *et al.* ont montré que la modification de surface de QD avec des ligands possédant une ancre constituée de 6 histidines est plus stable chimiquement qu'avec des thiols ce qui limite notamment les phénomènes d'échange.<sup>83</sup>

Le **Tableau 1** résume les différentes ancres disponibles en fonction du matériau.

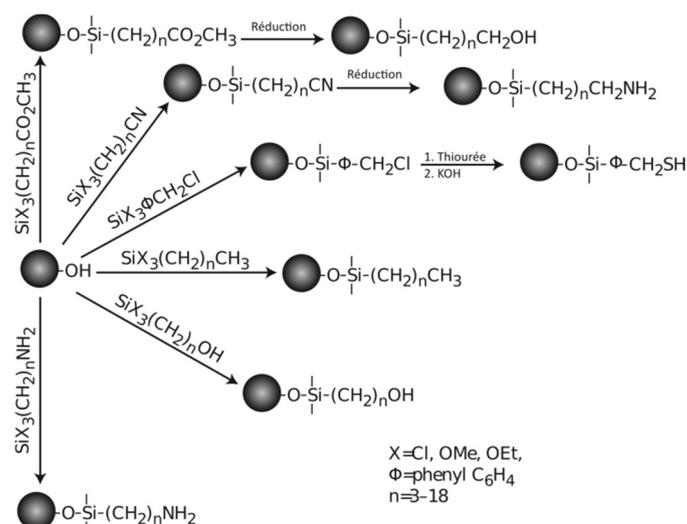
**Tableau 1** : Exemples d'ancres disponibles en fonction du matériau.

Matériau	Métaux nobles	Oxydes métalliques	Semi-conducteurs du groupe II-VI
<b>Ancres</b>	Thiols <sup>84,85</sup>	Carboxylates <sup>81,84</sup>	Phosphines <sup>81</sup>
	Amines et ammonium <sup>84,85</sup>	Phosphonates <sup>81,84</sup>	Thiols <sup>81</sup>
	Carboxylates <sup>84,85</sup>	Sulfonates <sup>81</sup>	His <sub>n</sub> <sup>83</sup>
	Phosphines <sup>84,85</sup>	dopamine <sup>82</sup>	Amine <sup>76</sup>

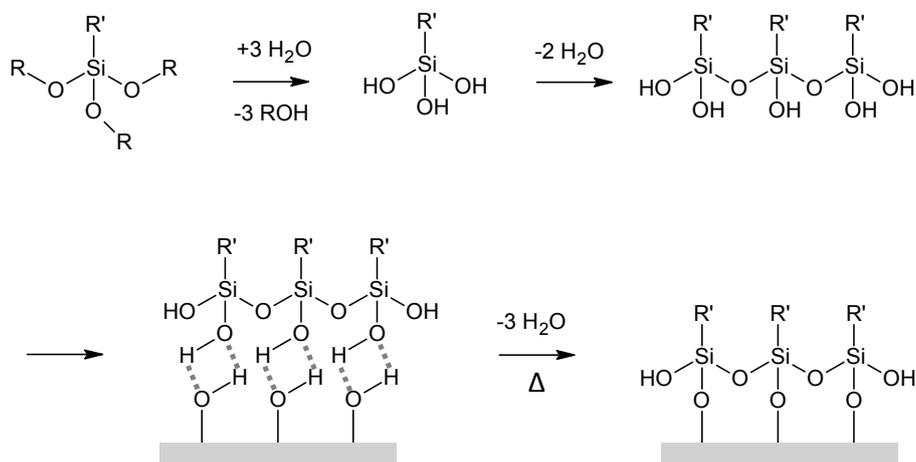
### b. Le cas des agents de couplage silaniques organofonctionnels

Les agents de couplage silaniques organofonctionnels forment une famille de molécule ayant pour formule générale  $R_nSiX_{4-n}$ , où X est un groupement hydrolysable, comme les halogènes, ou les alkoxyles, et R est un groupement non hydrolysable pouvant porter une fonction chimique. Un large choix d'agents de couplage silaniques est disponible commercialement, ce qui permet d'apporter une grande variété de fonctions organiques à la surface des oxydes métalliques, facilitant par la suite la bioconjugaison (**Figure I.16**).

La silanisation des surfaces, désignant la modification chimique des surfaces par un silane organofonctionnel, peut être réalisée en milieu aqueux ou en solvant organique et le mécanisme réactionnel est légèrement différent entre les deux cas. Dans le milieu aqueux, les groupements alkoxyles des monomères de silanes s'hydrolysent puis se condensent pour former des oligomères de polysiloxanes. Les surfaces d'oxydes métalliques hydratés est recouverte de molécules d'eau chimisorbées et présentent donc de nombreux groupements hydroxyles.<sup>86</sup> Les oligomères formés par les silanes s'adsorbent à la surface de l'oxyde par formation de liaisons hydrogènes avec les groupements hydroxyles de surface. La condensation du film, qui nécessite plus d'énergie est réalisée lors d'une dernière étape pour former des liaisons covalentes M-O-Si (**Figure I.17**). Dans le cas de l'oxyde de fer, cette dernière étape n'a pas été mise en évidence, et le greffage du film est principalement attribué à la formation des liaisons Si-O-Si au sein du film, encapsulant ainsi la nanoparticule.<sup>81</sup>



**Figure I.16 :** Représentation de la diversité des fonctions chimiques accessibles à l'aide des agents de couplage silaniques organofonctionnels. Extrait de la réf.<sup>81</sup>



**Figure I.17 :** Mécanisme réactionnel de modification chimique de surface d'un oxyde métallique par un agent de couplage silanique organofonctionnel en milieu aqueux.

En milieu organique anhydre, l'hydrolyse des groupements alkoxydes ne peut s'amorcer qu'au niveau de la surface de l'oxyde ou se trouvent des molécules d'eau chimiquement et physiquement adsorbées.<sup>81</sup> Cependant la modification de surface de nanoparticules d'oxydes métalliques est très délicate dans les solvants anhydres apolaires comme le toluène car ce type de milieu n'est pas adapté à la stabilité colloïdale électrostatique des nanoparticules avant modification chimique.

## B.2 Stratégies de bioconjugaison

Comme il a été montré dans la première partie de ce chapitre, les biomolécules s'adsorbent spontanément à la surface des nanoparticules du fait de l'établissement d'interactions telles que les interactions de vdW ou les interactions électrostatiques. La

formation de la couronne biomoléculaire est donc une première forme de bioconjugaison. Celle-ci est, cependant, pas ou très peu contrôlable.

En fonctionnalisant la surface de nanoparticules d'or par des ligands portant des ammoniums quaternaires Goodman *et al.* ont été capable de biofonctionnaliser les nanoparticules avec de l'ADN. Afin d'optimiser l'adsorption et d'augmenter l'affinité, ils ont combiné les interactions électrostatiques avec l'effet hydrophobe en jouant sur la longueur des chaînes alcanes portées par les ammoniums.<sup>87</sup> Simplement par ces interactions, ils annoncent un  $K_D$  inférieur à 5 nM. L'adsorption contrôlée de biomolécules sur les nanoparticules est une voie relativement simple ne faisant pas intervenir la chimie, cependant, dans un milieu complexe, si l'affinité entre la nanoparticule et la biomolécule est insuffisante, alors celle-ci peut être échangée par d'autres biomolécules.

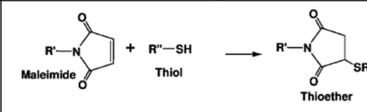
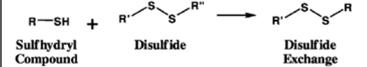
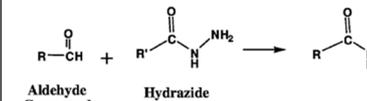
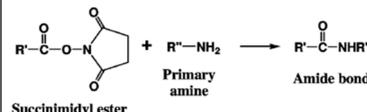
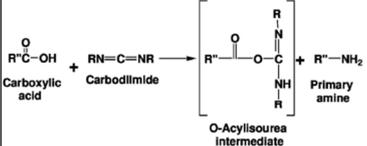
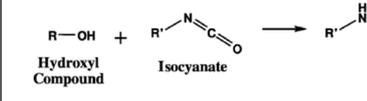
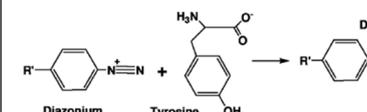
La formation de bioconjugués peut également être obtenue par formation de liaisons chimiques, ou à l'aide d'une reconnaissance spécifique entre deux biomolécules.

### ***B.2.1 Bioconjugaison par liaison chimique***

#### **a. Bioconjugaison par greffage covalent**

Le greffage covalent permet de former des bioconjugués très stables, ce qui est un atout dans les milieux complexes. Cette voie utilise les fonctions chimiques réactives présentes sur la biomolécule pour former une liaison covalente avec un agent de couplage. Les fonctions disponibles sur les biomolécules sont très limitées en termes de diversité. Les fonctions les plus fréquentes sont les amines, les acides carboxyliques, les thiols, les aldéhydes ou cétones, et les hydroxyles.<sup>76</sup> Pour réaliser un greffage covalent avec une biomolécule, il faut garder à l'esprit que sa fonction biologique est généralement intimement liée à sa structure. Les conditions de réaction ne doivent donc pas provoquer la dénaturation de la biomolécule. Les milieux aqueux sont donc préférés aux milieux organiques, ce qui limite le nombre de réactions chimiques utilisables pour former des liaisons covalentes. Le **Tableau 2** présente un résumé des réactions chimiques les plus employées.

**Tableau 2 :** Fonctions chimiques disponibles sur les biomolécules, et réactifs utilisables. D'après la réf.<sup>76</sup>

Target	Reactive Group	Product	Example Mechanism
Free Thiol	Maleimide Haloacetyl/Alkyl Halide Arylating agents Aziridine Acryloyl derivatives Disulfide Exchange – pyridyl disulfides, 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)	Thioether Thioether Thioether Thioether Mixed disulfides	 
Aldehyde/ Ketone	Hydrazine Amines	Hydrazone Schiff's base (imine)	
Free Amine	N-hydroxysuccinimide ester (NHS) Acyl azides Isocyanates, Isothiocyanates Sulfonyl chlorides Aldehydes, Glioxals Epoxides, Oxiranes Carbonates Arylating agents Imidoesters Carbodiimides, anhydrides	Amide Amide Urea, thiourea Sulfonamide Imine, secondary amine Secondary amine Carbamate Arylamine Amidine Amine	 
Carboxylate	Carbodiimides, Carbonyldiimidazole Diazoalkanes, Diazoacetyl	Amides Ester	
Hydroxyl	Epoxides, Alkyl halogens Periodate Isocyanates, Carbonyldiimidazole, N,N'-disuccinimidyl carbonate, N-hydroxysuccinimidyl chloroformate	Ether Aldehyde Carbamate or urethane	
Reactive Carbon (On a phenol)	Diazonium	Diazo bond	

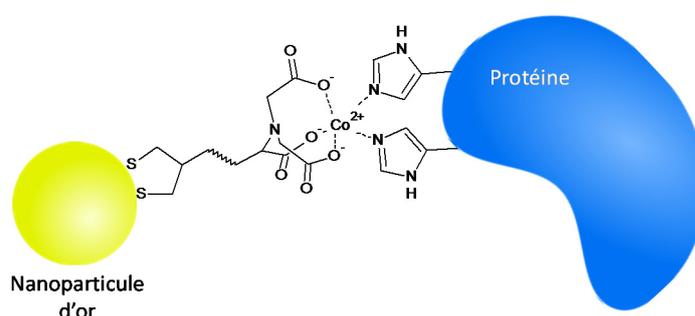
La formation d'une liaison amide entre une fonction carboxylique et une fonction amine est une des méthodes les plus employées pour le greffage de protéines. Cette réaction peut être réalisée dans l'eau après activation de l'acide carboxylique par le carbodiimide hydrosoluble EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide). L'efficacité de couplage peut être améliorée en convertissant l'intermédiaire O-acylisourée peu stable en un ester de succinimide par ajout de NHS (N-hydroxysuccinimide).<sup>88</sup> Cet ester reste cependant sensible à l'hydrolyse et les conditions de pH doivent être parfaitement contrôlées durant la réaction.<sup>77</sup> Le second inconvénient de cette réaction est le manque de contrôle sur l'orientation des protéines, car celles-ci exposent généralement plusieurs amines et/ou acides carboxyliques.

La réaction entre un thiol et un maléimide est intéressante dans le sens où le maléimide est moins sensible à l'hydrolyse qu'un ester de NHS.<sup>89</sup> De plus, la cystéine, qui ne représente en moyenne que 2,8 % des acides aminés totaux,<sup>90</sup> est le seul acide aminé composant les protéines à porter une fonction thiol. Sa rareté permet un meilleur contrôle de la régiosélectivité du greffage. Ce contrôle est encore amélioré car il est maintenant possible, par génie génétique, de positionner une cystéine à l'endroit désiré dans les protéines.<sup>91</sup>

L'apport de fonctions chimiques inexistantes à l'état naturel dans les biomolécules permet d'augmenter la sélectivité du greffage. Pour cela, les fonctions chimiques naturelles peuvent être converties dans la fonction désirée. Par exemple les amines portées par une protéine peuvent être convertie en aldéhyde à l'aide du glutaraldéhyde.<sup>77</sup> Des fonctions azotures peuvent également être introduite pour réaliser une chimie click.<sup>76</sup> Cependant, par cette voie, le contrôle de la position de la fonction chimique sur la biomolécules est perdu. Une autre voie consiste à introduire volontairement la fonction chimique durant la synthèse de peptides ou d'acides nucléiques à l'aide d'un acide aminé ou d'un nucléotide synthétique. Les protéines ne peuvent pas, à l'heure actuelle, être produites par synthèse organique. L'incorporation d'un acide aminé synthétique est, dans ce cas, beaucoup plus délicat, car elle nécessite une reprogrammation du système d'expression de la cellule productrice.<sup>92</sup>

### b. Bioconjugaison par chimie de coordination

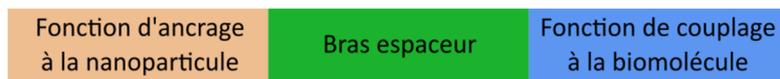
Les séquences poly-histidines ont la capacité de se lier fortement aux ions divalents tels que Ni(II), Co(II), ou Cu(II) chélatés par le groupement NTA (acide nitrilotriacétique). Les séquences  $his_n$  sont très rares naturellement mais peuvent être ajoutées par génie génétique, ce qui en fait un atout d'un point de vue sélectivité.<sup>76</sup> L'étiquette poly-histidine est également souvent ajoutée aux protéines clonées afin de faciliter leur purification par chromatographie d'affinité. C'est donc une voie très générale, souvent utilisée pour l'immobilisation sur des surfaces pour des caractérisations biophysiques. Abad *et al.* ont mis à profit cette interaction afin d'immobiliser des protéines à la surface de nanoparticules d'or fonctionnalisées par des fonctions NTA chélatant du Co(II) (**Figure I.18**).<sup>93</sup>



**Figure I.18** : Immobilisation d'une protéine présentant une étiquette  $His_n$  sur une nanoparticule d'or fonctionnalisée par des fonctions NTA.

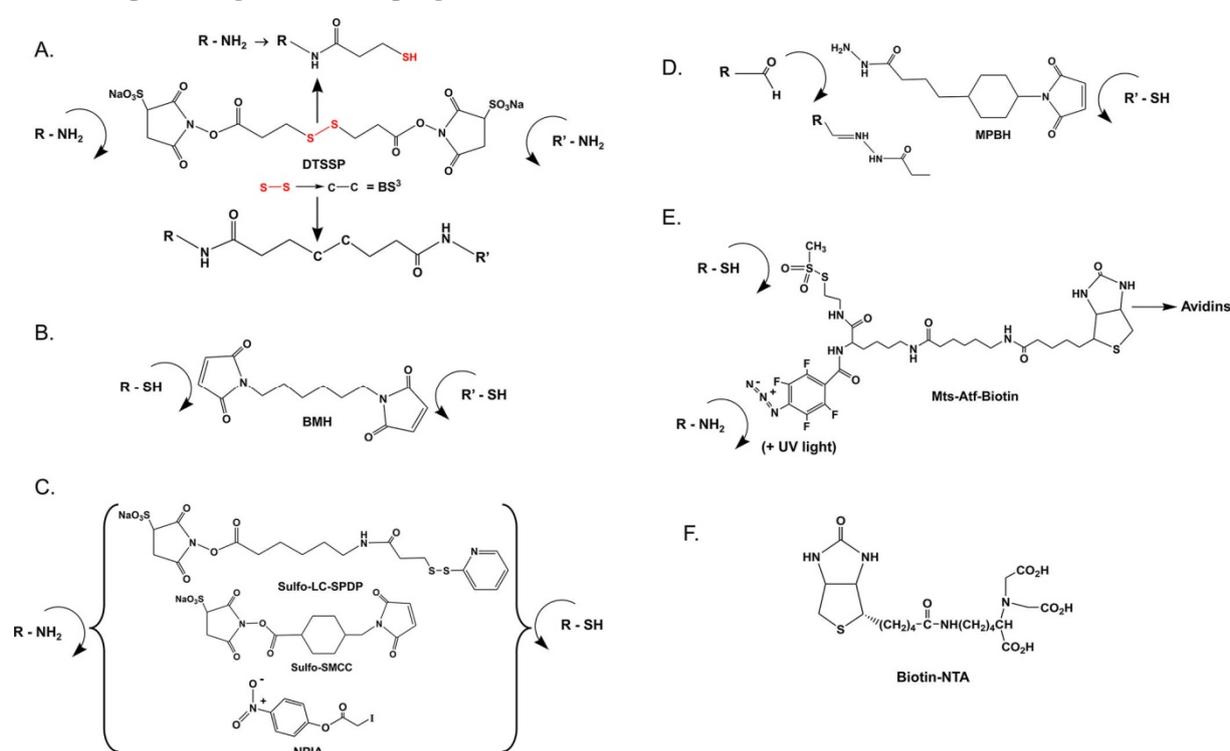
### c. Les agents de couplage entre la nanoparticule et la biomolécule

Les bioconjugaisons par liaison chimiques se font à l'aide de molécules formant une liaison entre la nanoparticule et la biomolécules. Ces molécules présentent toutes la même structure générale (**Figure I.19**).



**Figure I.19** : Représentation schématique de la structure générale d'un agent de couplage bifonctionnel.

La fonction de liaison à la nanoparticule peut être, comme nous l'avons vu auparavant, une ancre présentant une grande affinité pour la surface de la nanoparticule, ou une fonction chimique réactive envers les fonctions présentes sur la nanoparticule. La fonction de couplage à la biomolécule est une des fonctions chimiques qui viennent d'être présentées. Dans le cas où les deux fonctions sont identiques, nous parlons d'agents de couplages homobifonctionnels, et hétérobifonctionnels dans le cas contraire.<sup>76</sup> La **Figure I.20** présente des exemples d'agents de couplages commerciaux.



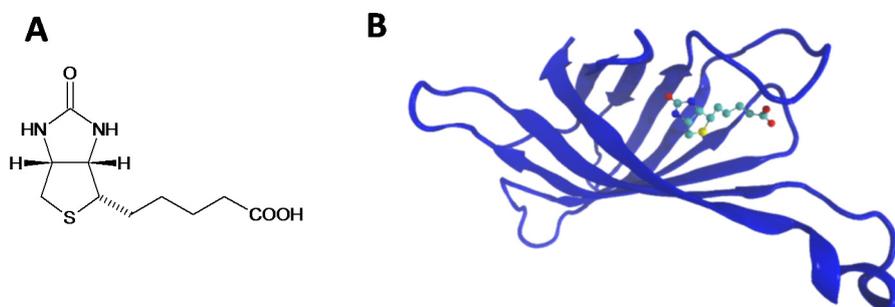
**Figure I.20** : Exemples d'agents de couplage commerciaux; Extrait de la réf.<sup>76</sup>

Le bras espaceur correspond à la chaîne d'atomes permettant de relier les deux fonctions. Il est formé par une chaîne alcane ou une chaîne linéaire de PEG.<sup>76,77</sup> Ce dernier est préféré pour leur utilisation comme longs bras espaceurs du fait de la bonne solubilité dans l'eau de l'agent de couplage. Dans certains cas, le bras espaceur peut également comporter

une liaison clivable comme une liaison disulfure par exemple (**Figure I.20-A**). La longueur de ce bras espaceur est le paramètre qui permet de contrôler la distance entre la surface de la nanoparticule et la biomolécule, mais également d'apporter la mobilité à cette molécule.

### ***B.2.2 Bioconjugaison par reconnaissance spécifique entre deux biomolécules***

Il existe dans la nature des couples de biomolécules présentant une grande affinité ainsi qu'une grande spécificité. L'exemple le plus connu est le couple avidine/biotine (**Figure I.21**). Ces deux biomolécules forment l'un des plus forts complexes non covalent, avec un  $K_D$  de l'ordre de  $10^{-15}$  M.<sup>94</sup> Ces propriétés de liaison et de reconnaissance remarquables peuvent être mise à profit pour immobiliser une biomolécule sur une nanoparticule.



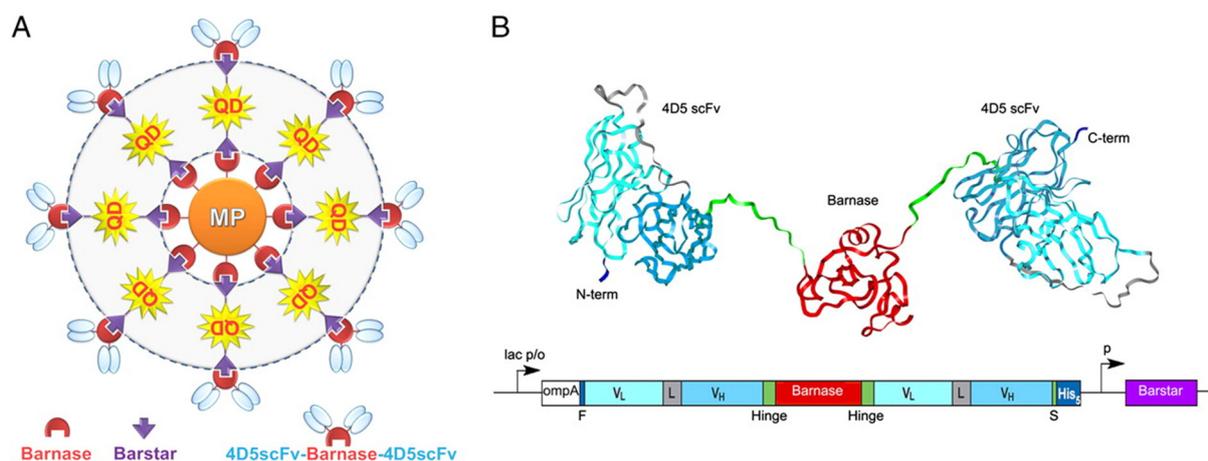
**Figure I.21** : Structure chimique de la biotine (**A**) et représentation de la structure 3D du complexe entre un monomère d'avidine et une biotine (**B**) (PDB ID : 2AVI).

La biotine est une biomolécule relativement simple, également connue sous le nom de vitamine B<sub>7</sub> (**Figure I.21-A**). Elle est, de nos jours, commercialement disponible sous sa forme fonctionnalisée chimiquement pour son greffage sur les biomolécules ou les nanoparticules.<sup>76</sup> La biotinylation d'une protéine peut également être réalisée de façon régiosélective par voie enzymatique. Pour cela, une séquence peptidique reconnue par la biotine ligase est fusionnée à la protéine d'intérêt par génie génétique.<sup>95</sup>

L'avidine est quant à elle une glycoprotéine d'environ 67 kDa sous sa forme tétramérique. Initialement employée sous sa forme glycosylée, elle était responsable de la formation de liaisons non spécifiques. L'avidine est maintenant produite sous sa forme déglycosylée pour augmenter la spécificité. La streptavidine, d'origine bactérienne, est une protéine analogue non glycosylée qui est également largement employée.

L'avidine sous sa forme tétramérique peut lier 4 biotines. Elle peut donc être utilisée pour former des structures sandwich afin de lier une nanoparticule et une biomolécule, toutes les deux biotinylées.

D'autres couples de  $K_D$  élevés peuvent être employés, comme par exemple le couple barnase/barstar. Ces deux protéines ne sont pas exprimées chez les mammifères, et présentent une affinité élevée avec un  $K_D$  de l'ordre de  $10^{-14}$  M.<sup>96</sup> Ces deux protéines, de par leur petite taille, peuvent être fusionnées à la protéine d'intérêt par génie génétique sans engendrer de perturbations sur son repliement et donc sur sa fonction. La régiosélectivité peut être donc très bien contrôlée. Nikitin *et al.* ont rapporté l'assemblage puis la biofonctionnalisation d'objet nano- et micrométriques grâce à cette stratégie intégrée (**Figure I.22**).<sup>97</sup>



**Figure I.22** : A : assemblage couche par couche grâce au couple barnase/barstars composé d'une microparticule au cœur, entourés par des quantum dots eux-mêmes biofonctionnalisés par des fragments d'anticorps. Extrait de la réf.<sup>97</sup>

### B.3 Conclusion

Pour que la biofonctionnalisation d'une nanoparticule par conjugaison d'une biomolécule soit réussie, plusieurs facteurs doivent être réunis. Tout d'abord, la surface de la nanoparticule doit être adaptée à l'accueil des biomolécules afin d'éviter l'adsorption non désirée ou la dénaturation et donc la perte de la fonction. Ceci est rendu possible à par la fonctionnalisations de la surface à l'aide de ligands, ou la modification chimique de surface avec des agents de couplage silaniques organofonctionnels. Ensuite, la structure de la biomolécule ne doit pas être modifiée par la conjugaison, et l'orientation de la biomolécule doit être prise en compte. La stratégie d'immobilisation (covalent ou non, conditions de réaction, régiosélectivité...) doit prendre en compte ces différents besoins. La stratégie mise en place doit également tenir compte de l'application visée (adressage par reconnaissance biomoléculaire,<sup>98</sup> catalyse enzymatique,<sup>99</sup> études structurales,<sup>100</sup> etc...).

## C. Description du projet d'étude

Trois applications des nanoparticules en biologie seront abordées durant ces travaux. Ces projets sont réalisés en étroite collaboration avec des équipes de biologistes ou de biochimistes afin de répondre à des besoins précis dans le cadre de problématiques différentes en biologie.

➤ **L'extraction magnétique de vésicules extracellulaires d'un fluide biologique** à partir de nanoparticules magnétiques à des fins diagnostiques. Ce projet est réalisé en collaboration avec l'équipe « Vésicules Extracellulaires et Réparation Membranaire » animée par le Pr. Alain Brisson au sein du laboratoire de Chimie et de Biologie des Membranes et des Nano-objets de Bordeaux (CBMN-UMR5248).

➤ **Le diagnostic de l'athérosclérose par imagerie par résonance magnétique (IRM)** par des agents de contraste ciblant les plaques d'athérome vulnérables. Ces agents de contraste sont développés en collaboration avec l'équipe du Dr. Gisèle Clofent-Sanchez au sein du centre de « Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques » (RMSB-UMR5536) ainsi que le Dr. Majid Nouhban et le Dr. Xavier Santarelli de l'équipe « biotechnologie des protéines recombinantes à visée santé » de l'ENSTBB-EA4135.

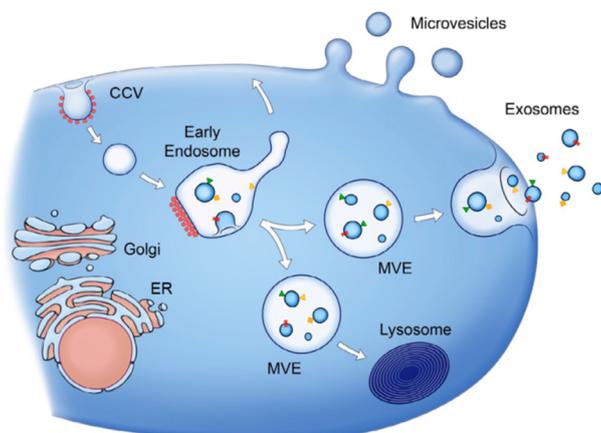
➤ **L'imagerie optique de tumeurs *in vivo***. Cet outil est développé en collaboration avec l'équipe du Dr. Franck Couillaud du centre de « Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques » (RMSB-UMR5536) ainsi que le Dr. Laurent Azéma de l'équipe « ARN, régulation naturelle et artificielle » (UMR869).

Ces trois applications comportent bien entendu des problématiques propres à chaque sujet, mais la problématique du contrôle des interactions entre les nanoparticules et l'environnement biologique dans lequel elles se trouvent est commun aux trois applications décrites ici. Avant de présenter la stratégie globale appliquée durant ces travaux de thèse, les problématiques des différents sujets d'étude seront introduites.

### C.1 Extraction de vésicules extracellulaires d'un fluide biologique

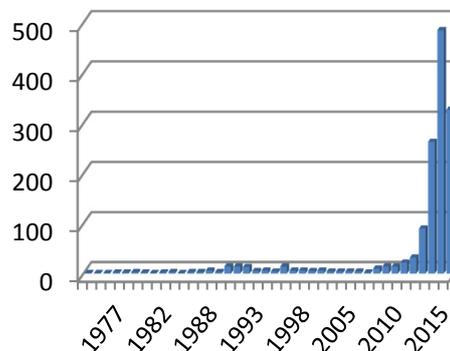
Les vésicules extracellulaires (VE) sont des vésicules membranaires libérées dans les liquides biologiques (plasma, urine, liquide céphalo-rachidien...) par les cellules. Ces vésicules sont regroupées en deux grandes catégories : les exosomes, sécrétés après fusion avec la membrane plasmique de corps multivésiculaires (MVE en anglais) d'origine endosomale, présentent une taille comprise entre 50 et 100 nm ; et les microvésicules

(également nommées microparticules), provenant du bourgeonnement de la membrane plasmique, avec une taille allant de 0,1 à 1  $\mu\text{m}$  (**Figure I.23**).<sup>101,102</sup>



**Figure I.23** : Biogénèse des vésicules extracellulaires. Extrait de la réf.<sup>101</sup>

Dans un premier temps, ces objets ont été considérés comme des débris cellulaires, mais actuellement il est montré qu'ils interviennent dans de nombreuses fonctions biologiques telles que la coagulation, l'inflammation ou la communication intercellulaire. Il est également montré que les VE peuvent être impliqués dans des processus pathologiques tels que le développement de tumeurs.<sup>101,103</sup> Du fait de la découverte récente de ces nouvelles propriétés, l'intérêt pour ces objets a rapidement pris de l'importance (**Figure I.24**). De plus, les découvertes faites dans ce domaine laisse entrevoir de potentielles applications biomédicales des VE en tant que biomarqueurs ou de cargos pour la délivrance de principes actifs.<sup>104,105</sup> En effet, comme les VE se retrouvent dans de nombreux fluides biologiques dont le sang, et comme ce sont des compartiments fermés, protégeant leur contenu de la dégradation par l'environnement extracellulaire, cela en fait potentiellement de bons candidats en tant que biomarqueurs.



**Figure I.24** : Evolution du nombre annuel de publications au sujet des vésicules extracellulaires. Données obtenues sur SciFinder en juin 2015 avec les mots clés : extracellular vesicle.

La diversité de tailles, leur caractère sporadique et leur diversité phénotypique sont des freins qui rendent délicate leur étude. Ces objets sont constitués d'une membrane, composée de lipides et de protéines, contenant dans le compartiment formé des protéines mais également des ARNm\* et des ARNmi\*. De plus, la nature de ces protéines, lipides et ARN est

fonction de la cellule d'origine.<sup>101</sup> Actuellement, un gros travail sur la purification et la standardisation de ces méthodes de purification doit être effectué car cette étape clé est en partie à l'origine de la variabilité rencontrée dans ce domaine de recherche.<sup>101,106</sup> A titre d'exemple, différentes équipes ont trouvé que la façon dont l'échantillon biologique est prélevé, une prise de sang, par exemple, et stocké apporte une variabilité sur les résultats de l'analyse des VE.<sup>106</sup>

Actuellement, 3 grandes méthodes permettent de purifier les VE : la (ultra)centrifugation différentielle, l'immuno-adsorption sur des microbilles magnétiques ou non, et la chromatographie d'exclusion de taille.<sup>106</sup>

- *Centrifugation/ultracentrifugation différentielle* : C'est la méthode la plus utilisée. Elle consiste à éliminer les composants non désirés en centrifugeant l'échantillon à des forces centrifuges différentes. Cependant, c'est une méthode non sélective. En effet, la séparation est basée sur la taille des objets et sur leur densité. Il est donc difficile de récupérer la population entière de VE présente dans l'échantillon tout en éliminant les contaminants. Les VE récupérées peuvent également être contaminées par des agrégats protéiques. Afin d'améliorer la purification, l'utilisation de gradients de densité est possible. Cependant ceux-ci imposent des modifications de la pression osmotique, provoquant des modifications de la morphologie des VE.

- *Chromatographie d'exclusion de taille* : les VE sont séparées en fonction de leur taille. Les gros objets sont moins retenus dans la colonne et sont élués rapidement alors que les petits objets sont retenus par la phase stationnaire et élués avec des volumes plus importants. Cette technique est rapide, cependant, le fait de forcer les VE à passer à travers le gel d'exclusion peut engendrer leur rupture et la formation de plus petites vésicules.

- *Immuno-adsorption* : Cette technique consiste à capter de façon sélective les VE présentant des marqueurs spécifiques à leur surface en utilisant des microbilles ou des surfaces fonctionnalisées avec des protéines de reconnaissance telles que des anticorps. L'utilisation de microbilles magnétiques permet l'extraction des VE simplement en appliquant un gradient magnétique avec un aimant. Cette méthode permet donc de purifier les VE en fonction de leurs marqueurs de surface, et non plus en fonction de leur taille.

**ARNm** : Un acide ribonucléique messager est une copie d'une séquence ADN codant une protéine. Il est synthétisé dans le noyau cellulaire et exporté dans le cytoplasme pour être traduit en protéine par les ribosomes.

**ARNmi** : Un microARN est un court ARN jouant un rôle dans la régulation de l'expression des gènes par hybridation aux ARNm

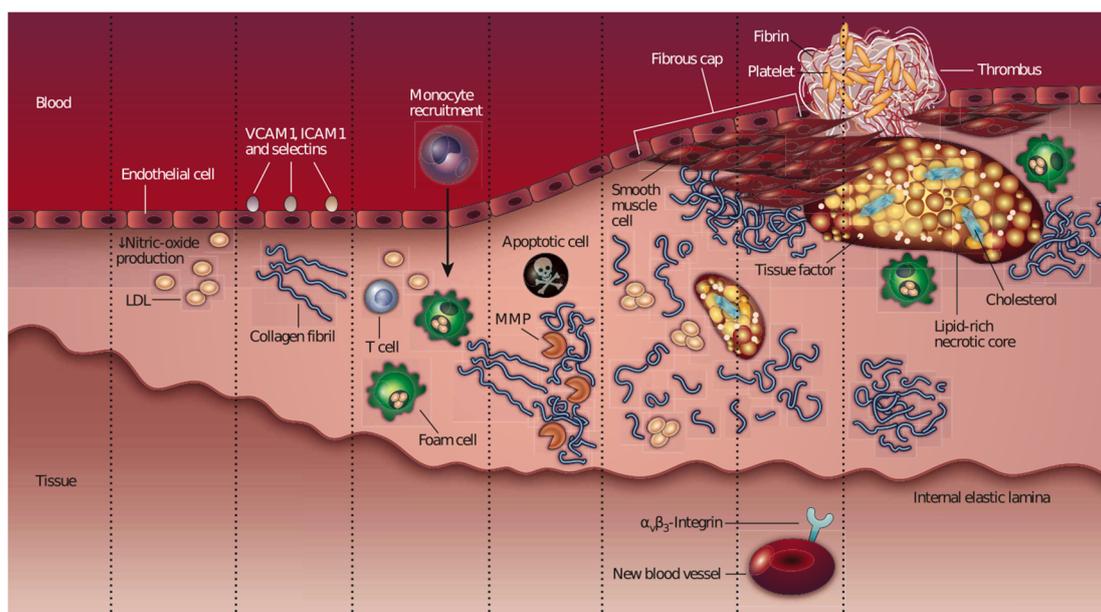
Cependant, comme la quantité de surface mise en jeu est limitée, il est possible que cette méthode ne permette pas de récupérer la totalité des VE.

Dans cette partie, nous proposons de développer un outil d'extraction magnétique basé sur le principe de l'immuno-adsorption, mais disposant d'une grande surface développée afin d'augmenter la capacité de fixation. En contrepartie, le fait de présenter une grande quantité de surface implique la nécessité de limiter au maximum les interactions non-spécifiques afin de garantir la sélectivité de la purification des VE.

## **C.2 Diagnostic de l'athérosclérose par imagerie par résonance magnétique**

Les maladies cardiovasculaires sont une des principales causes de mortalité dans les pays industrialisés. L'organisation mondiale pour la santé estime que 18 millions de personnes meurent de ces maladies à travers le monde chaque année, et que ce chiffre pourrait s'élever à 24 millions en 2030.<sup>107</sup>

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique qui atteint les vaisseaux sanguins. Les plaques d'athérome associées à cette maladie sont formées par une accumulation de cholestérol et de lipides à la suite d'un complexe jeu d'activation et de remodelage tissulaire et remettent en cause la résistance de la paroi vasculaire (**Figure I.25**). La fissuration de la plaque d'athérome expose les constituants thrombogènes de la matrice extracellulaire à la circulation sanguine. Cela provoque l'agrégation plaquettaire ainsi que l'activation des mécanismes de coagulation, débouchant sur la formation d'un thrombus qui pourra obstruer un vaisseau. La fragilisation de la paroi vasculaire peut quant à elle être responsable de sa rupture. Les principaux risques liés à l'athérosclérose sont les infarctus ainsi que les accidents vasculaires cérébraux.<sup>108</sup>



**Figure I.25** : Schématisation du développement de l'athérosclérose. Extrait de la réf.<sup>109</sup>

Le développement d'outils de diagnostic non-invasifs permettant de détecter les plaques d'athérome vulnérables précocement permettrait aux médecins d'intervenir avant que les risques soient élevés et présente donc un intérêt public évident.<sup>109</sup>

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie non invasive, ne nécessitant pas l'utilisation de rayonnements ionisants et peut donc être utilisée fréquemment afin de suivre l'évolution de la maladie. Cette technique est basée sur l'acquisition des signaux de résonance magnétique nucléaire (RMN) des protons de chaque volume élémentaire d'un échantillon, appelés voxels. Le signal RMN est notamment caractérisé par deux temps de relaxations : le temps de relaxation longitudinal (T1) et le temps de relaxation transversal (T2). La présence de nanoparticules superparamagnétique perturbe le temps de relaxation T2 des protons des molécules d'eau au voisinage en créant des hétérogénéités de champ. Ces effets induisent donc un contraste sur l'image enregistrée.<sup>3</sup>

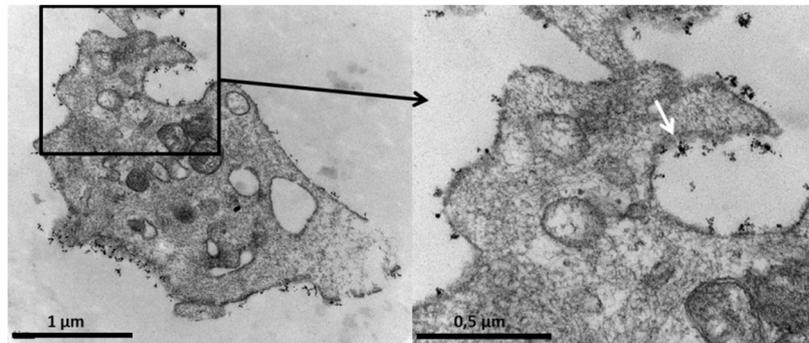
L'utilisation d'agents de contrastes pour l'IRM dirigés vers une cible moléculaire permettrait d'accéder à la composition de la plaque d'athérome, ce qui rendrait possible la détection des plaques vulnérables *in vivo*.

Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (USPIO pour Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide) sont largement employées en tant qu'agents de contrastes pour l'IRM.<sup>110</sup> Au sein du laboratoire, un agent de contraste basé sur l'utilisation de nanoparticules de maghémite superparamagnétiques a déjà été développé.<sup>111,112</sup> Ce nano-objet est constitué d'une vingtaine de nanoparticules de maghémite reliées par des macromolécules de dextrane greffées covalamment par l'utilisation d'un agent de couplage silanique. La

synthèse multi-étapes de cet agent de contraste permet de l'adapter afin de répondre le mieux possible au cahier des charges du contexte de l'étude biologique, c'est pourquoi cette plateforme est nommée VUSPIO pour Versatile Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide. Ces VUSPIO ont déjà montré leur biocompatibilité et ont été employées *in vitro* lors de différentes applications allant du « cell tracking »<sup>113,114</sup> au ciblage cellulaire.<sup>115</sup>

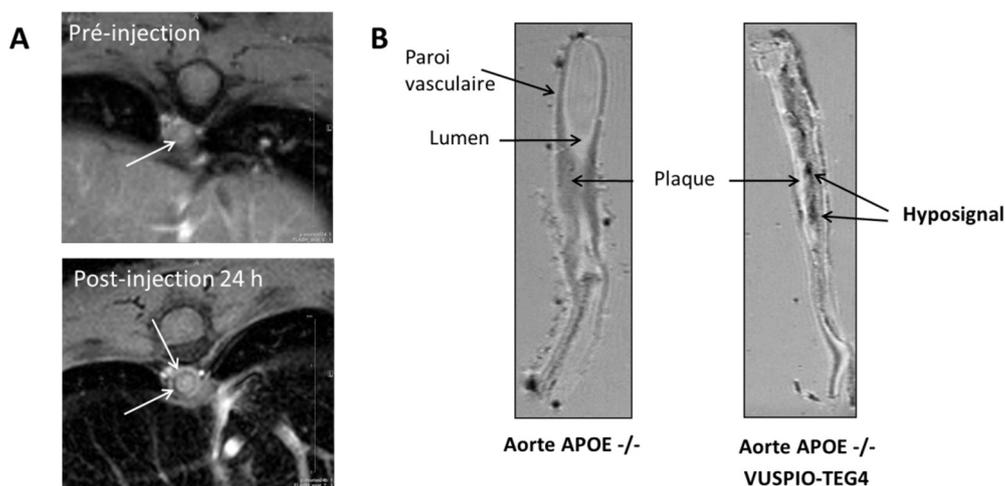
Au cours de travaux antérieurs, le développement d'un agent de contraste pour IRM basé sur la technologie des VUSPIO pour le marquage des plaques d'athérome vulnérables a été réalisé.<sup>116</sup> Les nano-objets ont été biofonctionnalisés par des demi-anticorps dirigés contre l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  exprimées par les plaquettes activées. Cet anticorps avait été sélectionné parmi une banque aléatoire par la technologie « phage display » sur des plaquettes activées.

La reconnaissance des plaquettes activées par ces agents de contrastes (nommés VUSPIO-TEG4) a été montrée par microscopie électronique à transmission (**Figure I.26**).



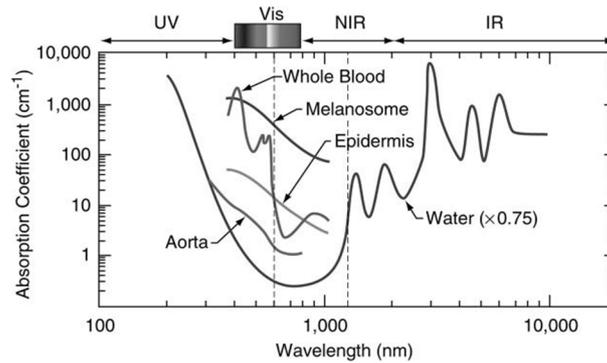
**Figure I.26** : Micrographie en transmission électronique d'une section de plaquette activée marquée par le VUSPIO-TEG4. La flèche blanche indique les VUSPIO-TEG4.

Des tests de marquage *in vivo* de la plaque d'athérome ont également été entrepris sur des souris modèles APOE<sup>-/-</sup> ayant suivi un régime hyperlipidémiant (**Figure I.27**). Les images IRM *in vivo* (**Figure I.27-A**) présentent un très faible hyposignal pouvant être attribué à la présence des VUSPIO-TEG4. Ces résultats, bien que confortés par des observations *ex vivo* à 9,4 T (**Figure I.27-B**), montrent les limites de la sensibilité de l'IRM. Il est difficile de confirmer aisément que le contraste observé est attribuable à la présence des VUSPIO.



**Figure I.27** : **A** : Image en IRM présentant une section de l'aorte thoracique de souris APOE-/- , avant et 24 h après l'injection des VUSPIO-TEG4. IRM réalisée à 4,7 T avec une séquence FLASH. **B** : IRM *ex vivo* d'aorte de souris APOE-/- ayant été perfusées ou non après dissection avec le VUSPIO-TEG4. IRM réalisée à 9,4 T avec une séquence FLASH.

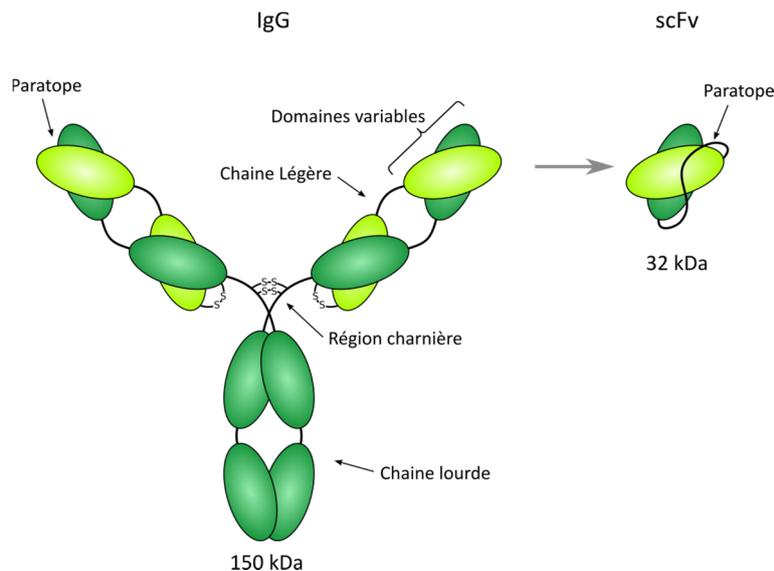
D'un point de vue général, la mise en place d'outils diagnostique pour l'homme débute généralement sur les petits animaux comme la souris. Or la taille des plaques d'athérome présentes sur ces animaux est bien inférieure à celle trouvée chez l'homme. La taille réduite de la zone de marquage limité également la quantité d'oxyde de fer et les possibilités de contraste. Bien que l'IRM présente une résolution élevée, celle-ci est peu sensible.<sup>117</sup> La poursuite du développement de cet agent de contraste par cette seule modalité sur le petit animal peut s'avérer compliqué comme l'a montré l'étude sur le développement du VUSPIO-TEG4. A l'opposé, l'imagerie de fluorescence est une modalité très sensible dans la fenêtre de transparence des tissus biologiques.<sup>118</sup> Cette fenêtre d'observation *in vivo* est limitée à la fois par l'absorption des différents composants biologiques (**Figure I.28**) et par la diffusion de la lumière plus intense à faible longueur d'onde. Il est communément admis que cette zone appelé « fenêtre de transparence biologique » s'étend de 600 à 1300 nm,<sup>119</sup> correspondant à la région du rouge lointain - proche infrarouge (PIR). Du fait de la diffusion de la lumière au sein des tissus, l'imagerie de fluorescence souffre cependant d'une faible résolution.



**Figure I.28** : Spectres d'absorption de différents constituants des tissus biologiques; Extrait de la réf. <sup>119</sup>

Il semble donc intéressant dans ce contexte de marquer les VUSPIO par des sondes fluorescentes dans le PIR afin de pallier les inconvénients de l'IRM.

Dans le cadre de ces travaux, l'objectif sera de développer un agent de contraste bimodal (IRM, Imagerie de fluorescence PIR), dirigé contre les plaques d'athérome. Lors de l'étude précédente, le ciblage de la zone pathologique fut réalisé à l'aide d'un anticorps, faisant appel à des techniques lourdes pour la production ainsi qu'une longue étude de biochimie pour mettre en place les conditions de greffage afin de ne pas endommager la structure de la protéine (**Figure I.29**). Ici, nous proposons de réaliser le ciblage des plaques d'athérome vulnérables à l'aide de fragments d'anticorps scFv (**Figure I.29**), présentant les avantages d'une production plus aisée et de présenter une structure moins complexe. Ces protéines seront greffées sur les VUSPIO fluorescents, et seront nommées scFv-TEG4 en référence au clone sélectionné.



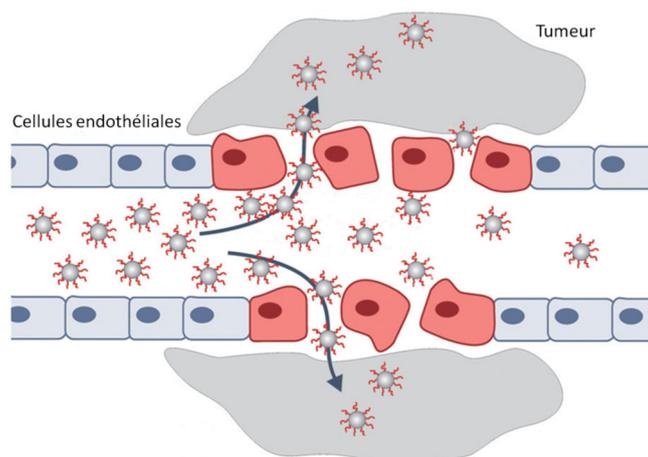
**Figure I.29** : Représentation schématique de la structure d'une immunoglobuline G (IgG) et d'un scFv.

### C.3 Marquage *in vivo* du cancer de la prostate pour l'imagerie de fluorescence dans le proche infrarouge.

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme. En 2005 plus de 62 000 cas ont été diagnostiqués et ce cancer a causé 9 202 décès la même année. Ces chiffres le classe au 4<sup>ème</sup> rang des décès dans l'ensemble de la population. Actuellement, son diagnostic peut être réalisé par dosage de l'antigène spécifique de prostate ou PSA (Prostate Specific Antigen) dans le sérum. Cependant, cette technique peut engendrer de faux positifs, ou des diagnostics tardifs.<sup>120</sup>

Contrairement à l'athérosclérose, où les cibles sont directement exprimées au niveau de la paroi vasculaire, les tumeurs ne sont pas aussi accessibles pour le marqueur. Leur marquage demande donc un long temps de circulation des nanoparticules. Pour cela, leur opsonisation doit être limitée au maximum. Toutefois, la surface n'est pas le seul critère à prendre en considération. En effet il a également été observé que la taille des objets injectés est un paramètre influençant leur temps de circulation. Les grandes particules (>50 nm) seront plus rapidement éliminées par le SRE, et concentrées dans le foie que celles de plus faible diamètre.<sup>3</sup> Quant aux particules de très grande taille (de l'ordre du micromètre), leur utilisation *in vivo* est très déconseillée car elles peuvent être responsables d'embolies. A l'inverse, des nanoparticules inférieures à 5 nm de diamètre sont rapidement éliminées par voie rénale.<sup>121</sup>

Dans le cas des tumeurs, un temps de circulation prolongé des nanoparticules injectées peut permettre à celles-ci d'atteindre la zone pathologique par extravasation passive liée à l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) (**Figure I.30**). Cet effet est la résultante de deux facteurs : d'un côté, l'angiogenèse élevée et anarchique au niveau des tumeurs provoque la formation d'un épithélium discontinu rendant la paroi vasculaire perméable avec des pores de plusieurs centaines de nanomètres de diamètres.<sup>121</sup> D'un autre côté, l'absence d'un drainage lymphatique efficace au niveau de la tumeur favorise l'accumulation des particules ou de macromolécules au niveau de la matrice extracellulaire de la tumeur.<sup>122</sup>

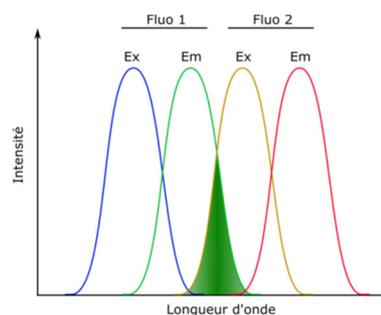


**Figure I.30** : Représentation schématique du ciblage passif des tumeurs par effet EPR. Adapté de la réf.<sup>3</sup>

La biofonctionnalisation des nanoparticules par une biomolécule d'adressage permet d'augmenter l'accumulation au niveau des tumeurs et d'améliorer la sélectivité du marquage. Dans ce projet, le ciblage actif de la tumeur doit être assuré par des aptamères\* reconnaissant spécifiquement la métalloprotéase matricielle 9 (MMP9). La MMP9 est une enzyme fortement présente dans la matrice extracellulaire des tumeurs.<sup>123</sup> Le marqueur fluorescent choisit est une nanoparticule hybride constituée de silice et de fluorophores organiques. Si cette nanoparticule est suffisamment furtive vis-à-vis du système immunitaire, alors le temps de circulation de l'aptamère devrait être augmenté par rapport à l'aptamère libre qui est rapidement éliminé par voie rénale. La nanoparticule doit permettre ainsi de modifier la bio-distribution de l'aptamère mais également de protéger et d'améliorer les performances de la sonde fluorescente.<sup>124</sup>

**Aptamère** : C'est un oligonucléotide synthétique ayant la particularité de se fixer à un ligand spécifique. La séquence à l'origine de cette propriété est sélectionnée parmi un grand nombre de séquences aléatoires à l'aide de la méthode SELEX.

Dans le cadre du développement de cet outil, il est important de pouvoir suivre les marqueurs à différentes échelles, c'est pourquoi l'objectif est de co-localiser au sein du même objet deux types de sondes fluorescentes pour la microscopie confocale dans le visible et l'imagerie de fluorescence dans le PIR *in vivo*. Dans le cas où deux fluorophores sont proches dans l'espace, il est important que la longueur d'onde d'émission du premier fluorophore soit éloignée de la longueur d'onde d'excitation du second



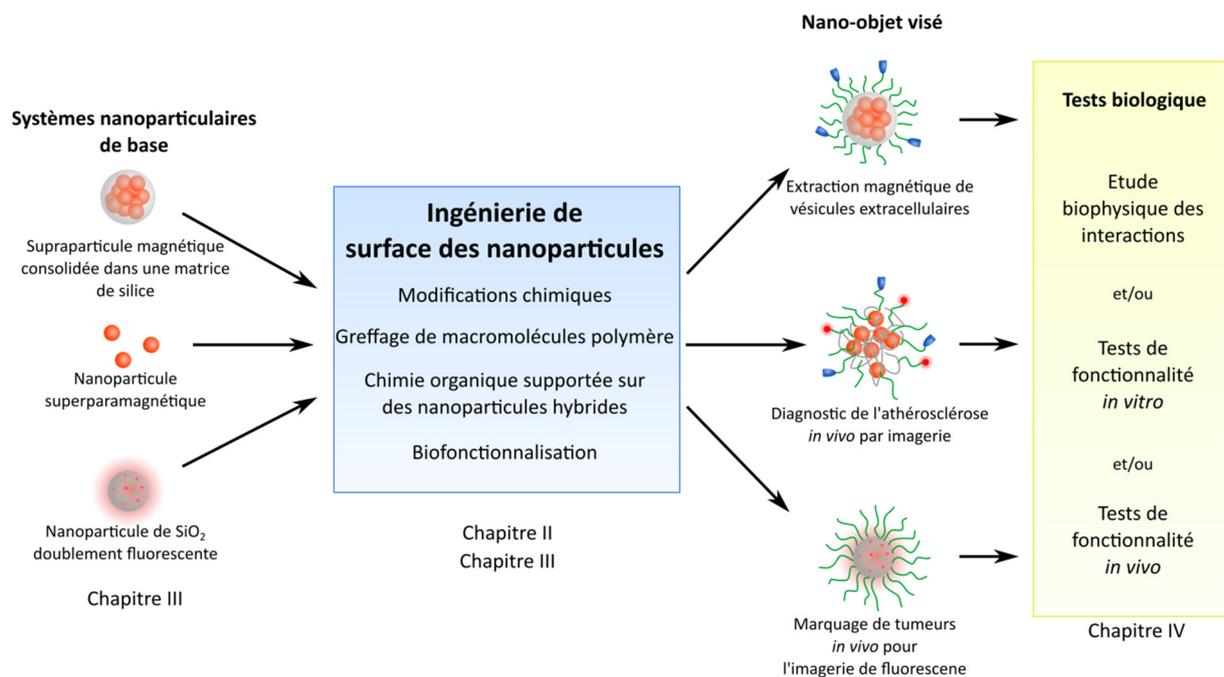
**Figure I.31** : Spectre de fluorescence (Ex/Em) montrant le recouvrement des bandes nécessaire à l'établissement du phénomène de FRET entre 2 fluorophores.

afin d'éviter le phénomène de FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Celui-ci se produit lorsqu'il existe un recouvrement entre la bande d'émission du premier fluorophore avec la bande d'excitation du second (**Figure I.31**).

Etant donné que l'effet EPR est observée avec des particules présentant de long temps de circulation, leur propriétés physico-chimiques de surface doivent être parfaitement contrôlées afin d'assurer leur furtivité vis-à-vis du système immunitaire. Le diamètre de la nanoparticule doit également être le plus faible possible afin de limiter la capture rapide par les organes du SRE.

## C.4 Stratégie générale

La stratégie globale appliquée dans ce travail de thèse est décrite en **Figure I.32**.



**Figure I.32** : Présentation générale de ces travaux de thèse. Après synthèse des nanoparticules, celles-ci sont préparées pour leur application par ingénierie de surface.

Après le développement des nano-objets permettant d'apporter les propriétés physiques souhaitées pour leur application respective, leur surface sera préparée pour accueillir des biomolécules apportant la fonctionnalité biologique au nano-objet. Cette étape essentielle consistera dans un premier temps à greffer des macromolécules polymères afin d'assurer à la fois la stabilité colloïdale des nano-objets en milieu biologique, et de limiter les interactions non spécifiques des biomolécules avec la surface du nano-objet. A cet effet, une nouvelle voie de greffage de macromolécules de PEG sera décrite dans le chapitre II. Par la suite, des biomolécules de ciblage seront greffées de façon contrôlée et régiosélective de

manière à optimiser l'adressage des nano-objets à leur cible. Une fois ces nano-objets biofonctionnalisés, leur propriété biologique ainsi que leur capacité à répondre à l'application visée seront examinées.

## Références bibliographiques

- (1) De, M.; Ghosh, P. S.; Rotello, V. M. *Adv. Mater.* **2008**, *20* (22), 4225–4241.
- (2) Doane, T. L.; Burda, C. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2885–2911.
- (3) Reddy, L. H.; Arias, J. L.; Nicolas, J.; Couvreur, P. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (11), 5818–5878.
- (4) Yao, J.; Yang, M.; Duan, Y. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (12), 6130–6178.
- (5) Liu, G.; Gao, J.; Ai, H.; Chen, X. *Small* **2013**, *9* (9-10), 1533–1545.
- (6) Mu, Q.; Jiang, G.; Chen, L.; Zhou, H.; Fourches, D.; Tropsha, A.; Yan, B. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (15), 7740–7781.
- (7) Hunter, R. J. (Robert J. *Foundations of colloid science*, 2nd ed.; Oxford ; New York : Oxford University Press, 2001.
- (8) Anderson, N. L.; Anderson, N. G. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1* (11), 845–867.
- (9) *Blood, plasma and plasma proteins: a unique contribution to modern healthcare*; Valverde, J. L., Ed.; Pharmaceuticals policy and law; IOS Press: Amsterdam, 2006.
- (10) Monopoli, M. P.; Åberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K. A. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7* (12), 779–786.
- (11) Nel, A. E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. *Nat. Mater.* **2009**, *8* (7), 543–557.
- (12) Lynch, I.; Dawson, K. A. *Nano Today* **2008**, *3* (1–2), 40–47.
- (13) Walkey, C. D.; Chan, W. C. W. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2780–2799.
- (14) Lück, M.; Paulke, B.-R.; Schröder, W.; Blunk, T.; Müller, R. H. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *39* (3), 478–485.
- (15) Lundqvist, M.; Stigler, J.; Elia, G.; Lynch, I.; Cedervall, T.; Dawson, K. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (38), 14265–14270.
- (16) Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggård, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (7), 2050–2055.
- (17) Gessner, A.; Lieske, A.; Paulke, B. R.; Müller, R. H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2002**, *54* (2), 165–170.
- (18) Deng, J.; Sun, M.; Zhu, J.; Gao, C. *Nanoscale* **2013**, *5* (17), 8130–8137.
- (19) Buijs, J.; Vera, C. C.; Ayala, E.; Steensma, E.; Håkansson, P.; Oscarsson, S. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (15), 3219–3225.
- (20) Tenzer, S.; Docter, D.; Rosfa, S.; Wlodarski, A.; Kuharev, J.; Rekić, A.; Knauer, S. K.; Bantz, C.; Nawroth, T.; Bier, C.; Sirirattanapan, J.; Mann, W.; Treuel, L.; Zellner, R.; Maskos, M.; Schild, H.; Stauber, R. H. *ACS Nano* **2011**, *5* (9), 7155–7167.
- (21) Walczyk, D.; Bombelli, F. B.; Monopoli, M. P.; Lynch, I.; Dawson, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (16), 5761–5768.
- (22) Lindman, S.; Lynch, I.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S. *Nano Lett.* **2007**, *7* (4), 914–920.
- (23) Lacerda, S. H. D. P.; Park, J. J.; Meuse, C.; Pristiniski, D.; Becker, M. L.; Karim, A.; Douglas, J. F. *ACS Nano* **2010**, *4* (1), 365–379.
- (24) Maffre, P.; Nienhaus, K.; Amin, F.; Parak, W. J.; Nienhaus, G. U. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2011**, *2*, 374–383.
- (25) Wang, G.; Liu, X.; Yan, C.; Bai, G.; Lu, Y. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *135*, 261–266.
- (26) Dobrovolskaia, M. A.; Patri, A. K.; Zheng, J.; Clogston, J. D.; Ayub, N.; Aggarwal, P.; Neun, B. W.; Hall, J. B.; McNeil, S. E. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2009**, *5* (2), 106–117.
- (27) Monopoli, M. P.; Walczyk, D.; Campbell, A.; Elia, G.; Lynch, I.; Baldelli Bombelli, F.; Dawson, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (8), 2525–2534.

- (28) Gebauer, J. S.; Malissek, M.; Simon, S.; Knauer, S. K.; Maskos, M.; Stauber, R. H.; Peukert, W.; Treuel, L. *Langmuir* **2012**, *28* (25), 9673–9679.
- (29) Casals, E.; Pfaller, T.; Duschl, A.; Oostingh, G. J.; Puentes, V. *ACS Nano* **2010**, *4* (7), 3623–3632.
- (30) Sund, J.; Alenius, H.; Vippola, M.; Savolainen, K.; Puustinen, A. *ACS Nano* **2011**, *5* (6), 4300–4309.
- (31) Walkey, C. D.; Olsen, J. B.; Guo, H.; Emili, A.; Chan, W. C. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (4), 2139–2147.
- (32) Mortimer, G. M.; Butcher, N. J.; Musumeci, A. W.; Deng, Z. J.; Martin, D. J.; Minchin, R. F. *ACS Nano* **2014**, *8* (4), 3357–3366.
- (33) Saba TM. *Arch. Intern. Med.* **1970**, *126* (6), 1031–1052.
- (34) Kreuter, J.; Shamenkov, D.; Petrov, V.; Ramge, P.; Cychutek, K.; Koch-Brandt, C.; Alyautdin, R. *J. Drug Target.* **2002**, *10* (4), 317–325.
- (35) Deng, Z. J.; Liang, M.; Monteiro, M.; Toth, I.; Minchin, R. F. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6* (1), 39–44.
- (36) Linse, S.; Cabaleiro-Lago, C.; Xue, W.-F.; Lynch, I.; Lindman, S.; Thulin, E.; Radford, S. E.; Dawson, K. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (21), 8691–8696.
- (37) Mahmoudi, M.; Quinlan-Pluck, F.; Monopoli, M. P.; Sheibani, S.; Vali, H.; Dawson, K. A.; Lynch, I. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4* (3), 475–485.
- (38) Le Bihan, O.; Bonnafous, P.; Marak, L.; Bickel, T.; Trépout, S.; Mornet, S.; De Haas, F.; Talbot, H.; Taveau, J.-C.; Lambert, O. *J. Struct. Biol.* **2009**, *168* (3), 419–425.
- (39) Beduneau, A.; Ma, Z.; Grotepas, C. B.; Kabanov, A.; Rabinow, B. E.; Gong, N.; Mosley, R. L.; Dou, H.; Boska, M. D.; Gendelman, H. E. *PLoS ONE* **2009**, *4* (2).
- (40) Peng, Q.; Zhang, S.; Yang, Q.; Zhang, T.; Wei, X.-Q.; Jiang, L.; Zhang, C.-L.; Chen, Q.-M.; Zhang, Z.-R.; Lin, Y.-F. *Biomaterials* **2013**, *34* (33), 8521–8530.
- (41) Nooney, R. I.; White, A.; O'Mahony, C.; O'Connell, C.; Kelleher, S. M.; Daniels, S.; McDonagh, C. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *456*, 50–58.
- (42) Kim, H. R.; Andrieux, K.; Gil, S.; Taverna, M.; Chacun, H.; Desmaële, D.; Taran, F.; Georgin, D.; Couvreur, P. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (3), 793–799.
- (43) Tonga, G. Y.; Saha, K.; Rotello, V. M. *Adv. Mater.* **2014**, *26* (3), 359–370.
- (44) Lowe, S.; O'Brien-Simpson, N. M.; Connal, L. A. *Polym. Chem.* **2015**, *6* (2), 198–212.
- (45) Jeon, S. I.; Lee, J. H.; Andrade, J. D.; De Gennes, P. G. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142* (1), 149–158.
- (46) Jeon, S. I.; Andrade, J. D. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142* (1), 159–166.
- (47) Bellmann, C. In *Polymer Surfaces and Interfaces*; Stamm, M., Ed.; Springer Berlin Heidelberg, 2008; pp 235–259.
- (48) Minko, S. In *Polymer Surfaces and Interfaces*; Stamm, M., Ed.; Springer Berlin Heidelberg, 2008; pp 215–234.
- (49) Amoozgar, Z.; Yeo, Y. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2012**, *4* (2), 219–233.
- (50) Owens III, D. E.; Peppas, N. A. *Int. J. Pharm.* **2006**, *307* (1), 93–102.
- (51) Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54* (5), 631–651.
- (52) Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2010**, *49* (36), 6288–6308.
- (53) Barenholz, Y. (Chezy). *J. Controlled Release* **2012**, *160* (2), 117–134.
- (54) Wattendorf, U.; Merkle, H. P. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97* (11), 4655–4669.
- (55) Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. *J. Cheminformatics* **2012**, *4*, 17.
- (56) Halperin, A.; Kröger, M. *Langmuir* **2009**, *25* (19), 11621–11634.
- (57) Schellekens, H.; Hennink, W. E.; Brinks, V. *Pharm. Res.* **2013**, *30* (7), 1729–1734.

- (58) Abu Lila, A. S.; Kiwada, H.; Ishida, T. *J. Controlled Release* **2013**, *172* (1), 38–47.
- (59) Tagami, T.; Nakamura, K.; Shimizu, T.; Yamazaki, N.; Ishida, T.; Kiwada, H. *J. Controlled Release* **2010**, *142* (2), 160–166.
- (60) Ladd, J.; Zhang, Z.; Chen, S.; Hower, J. C.; Jiang, S. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (5), 1357–1361.
- (61) Yang, W.; Liu, S.; Bai, T.; Keefe, A. J.; Zhang, L.; Ella-Menye, J.-R.; Li, Y.; Jiang, S. *Nano Today* **2014**, *9* (1), 10–16.
- (62) Halperin, A. *Langmuir* **1999**, *15* (7), 2525–2533.
- (63) Rixman, M. A.; Dean, D.; Ortiz, C. *Langmuir* **2003**, *19* (22), 9357–9372.
- (64) Zdyrko, B.; Klep, V.; Luzinov, I. *Langmuir* **2003**, *19* (24), 10179–10187.
- (65) Louguet, S.; Kumar, A. C.; Guidolin, N.; Sigaud, G.; Duguet, E.; Lecommandoux, S.; Schatz, C. *Langmuir* **2011**, *27* (21), 12891–12901.
- (66) de Gennes, P. G. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1987**, *27* (3–4), 189–209.
- (67) de Gennes, P. G. *Macromolecules* **1980**, *13* (5), 1069–1075.
- (68) Daoud, M.; Cotton, J. P. *J. Phys.* **1982**, *43* (3), 531–538.
- (69) Vagberg, L. J. M.; Cogan, K. A.; Gast, A. P. *Macromolecules* **1991**, *24* (7), 1670–1677.
- (70) Ohno, K.; Morinaga, T.; Takeno, S.; Tsujii, Y.; Fukuda, T. *Macromolecules* **2007**, *40* (25), 9143–9150.
- (71) Dukes, D.; Li, Y.; Lewis, S.; Benicewicz, B.; Schadler, L.; Kumar, S. K. *Macromolecules* **2010**, *43* (3), 1564–1570.
- (72) Sofia, S. J.; Premnath, V.; Merrill, E. W. *Macromolecules* **1998**, *31* (15), 5059–5070.
- (73) Gref, R.; Lück, M.; Quellec, P.; Marchand, M.; Dellacherie, E.; Harnisch, S.; Blunk, T.; Müller, R. H. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2000**, *18* (3–4), 301–313.
- (74) Unsworth, L. D.; Sheardown, H.; Brash, J. L. *Langmuir* **2008**, *24* (5), 1924–1929.
- (75) He, Q.; Zhang, J.; Shi, J.; Zhu, Z.; Zhang, L.; Bu, W.; Guo, L.; Chen, Y. *Biomaterials* **2010**, *31* (6), 1085–1092.
- (76) Sapsford, K. E.; Algar, W. R.; Berti, L.; Gemmill, K. B.; Casey, B. J.; Oh, E.; Stewart, M. H.; Medintz, I. L. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (3), 1904–2074.
- (77) Hermanson, G. T. *Bioconjugate techniques*, 2. ed.; Elsevier Acad. Press: Amsterdam, 2008.
- (78) Nam, J.; Won, N.; Bang, J.; Jin, H.; Park, J.; Jung, S.; Jung, S.; Park, Y.; Kim, S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (5), 622–648.
- (79) Susumu, K.; Uyeda, H. T.; Medintz, I. L.; Pons, T.; Delehanty, J. B.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (45), 13987–13996.
- (80) Stewart, M. H.; Susumu, K.; Mei, B. C.; Medintz, I. L.; Delehanty, J. B.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (28), 9804–9813.
- (81) *Nanoscience*; Boisseau, P., Houdy, P., Lahmani, M., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2009.
- (82) Xu, C.; Xu, K.; Gu, H.; Zheng, R.; Liu, H.; Zhang, X.; Guo, Z.; Xu, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (32), 9938–9939.
- (83) Liu, W.; Greytak, A. B.; Lee, J.; Wong, C. R.; Park, J.; Marshall, L. F.; Jiang, W.; Curtin, P. N.; Ting, A. Y.; Nocera, D. G.; Fukumura, D.; Jain, R. K.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (2), 472–483.
- (84) Neouze, M.-A.; Schubert, U. *Monatshefte Für Chem. - Chem. Mon.* **2008**, *139* (3), 183–195.
- (85) Sperling, R. A.; Parak, W. J. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.* **2010**, *368* (1915), 1333–1383.
- (86) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (6), 2064–2110.

- (87) Goodman, C. M.; Chari, N. S.; Han, G.; Hong, R.; Ghosh, P.; Rotello, V. M. *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67* (4), 297–304.
- (88) Thanh, N. T. K.; Green, L. A. W. *Nano Today* **2010**, *5* (3), 213–230.
- (89) Shan S. Wong. *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*; CRC Press, 1991.
- (90) Klapper, M. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *78* (3), 1018–1024.
- (91) Bérat, R.; Rémy-Zolghadry, M.; Gounou, C.; Manigand, C.; Tan, S.; Saltó, C.; Arenas, E.; Bordenave, L.; Brisson, A. R. *Biointerphases* **2007**, *2* (4), 165–172.
- (92) Hohsaka, T.; Sisido, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6* (6), 809–815.
- (93) Abad, J. M.; Mertens, S. F. L.; Pita, M.; Fernández, V. M.; Schiffrin, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (15), 5689–5694.
- (94) Green, N. M. *Biochem. J.* **1963**, *89* (3), 585–591.
- (95) de Boer, E.; Rodriguez, P.; Bonte, E.; Krijgsveld, J.; Katsantoni, E.; Heck, A.; Grosveld, F.; Strouboulis, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (13), 7480–7485.
- (96) Hartley, R. W. In *Methods in Enzymology*; Nicholson, A. W., Ed.; Ribonucleases - Part A; Academic Press, 2001; Vol. 341, pp 599–611.
- (97) Nikitin, M. P.; Zdobnova, T. A.; Lukash, S. V.; Stremovskiy, O. A.; Deyev, S. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (13), 5827–5832.
- (98) Biju, V. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (3), 744–764.
- (99) Pengo, P.; Baltzer, L.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (3), 400–404.
- (100) Sarkar, R.; Narayanan, S. S.; Pålsson, L.-O.; Dias, F.; Monkman, A.; Pal, S. K. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (42), 12294–12298.
- (101) Raposo, G.; Stoorvogel, W. *J. Cell Biol.* **2013**, *200* (4), 373–383.
- (102) van der Pol, E.; Böing, A. N.; Harrison, P.; Sturk, A.; Nieuwland, R. *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64* (3), 676–705.
- (103) Gangoda, L.; Boukouris, S.; Liem, M.; Kalra, H.; Mathivanan, S. *Proteomics* **2015**, *15* (2-3), 260–271.
- (104) Boukouris, S.; Mathivanan, S. *Prot. Clin. Appl.* **2015**, *9* (3-4), 358–367.
- (105) van der Meel, R.; Fens, M. H. A. M.; Vader, P.; van Solinge, W. W.; Eniola-Adefeso, O.; Schiffelers, R. M. *J. Controlled Release* **2014**, *195*, 72–85.
- (106) Szatanek, R.; Baran, J.; Siedlar, M.; Baj-Krzyworzeka, M. *Int. J. Mol. Med.* **2015**.
- (107) Psarros, C.; Lee, R.; Margaritis, M.; Antoniadou, C. *Maturitas* **2012**, *73* (1), 52–60.
- (108) Naghavi, M.; Libby, P.; Falk, E.; Casscells, S. W.; Litovsky, S.; Rumberger, J.; Badimon, J. J.; Stefanadis, C.; Moreno, P.; Pasterkamp, G.; Fayad, Z.; Stone, P. H.; Waxman, S.; Raggi, P.; Madjid, M.; Zarrabi, A.; Burke, A.; Yuan, C.; Fitzgerald, P. J.; Siscovick, D. S.; Korte, C. L. de; Aikawa, M.; Airaksinen, K. E. J.; Assmann, G.; Becker, C. R.; Chesebro, J. H.; Farb, A.; Galis, Z. S.; Jackson, C.; Jang, I.-K.; Koenig, W.; Lodder, R. A.; March, K.; Demirovic, J.; Navab, M.; Priori, S. G.; Reekhter, M. D.; Bahr, R.; Grundy, S. M.; Mehran, R.; Colombo, A.; Boerwinkle, E.; Ballantyne, C.; Insull, W.; Schwartz, R. S.; Vogel, R.; Serruys, P. W.; Hansson, G. K.; Faxon, D. P.; Kaul, S.; Drexler, H.; Greenland, P.; Muller, J. E.; Virmani, R.; Ridker, P. M.; Zipes, D. P.; Shah, P. K.; Willerson, J. T. *Circulation* **2003**, *108* (14), 1664–1672.
- (109) Sanz, J.; Fayad, Z. A. *Nature* **2008**, *451* (7181), 953–957.
- (110) Gupta, A. K.; Gupta, M. *Biomaterials* **2005**, *26* (18), 3995–4021.
- (111) Mornet, S. Synthèse et modification chimique de la surface de nanoparticules de maghémite à des fins d'application biomédicales, Thèse soutenue à l'université Bordeaux I: Bordeaux, 2002.
- (112) Mornet, S.; Portier, J.; Duguet, E. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293* (1), 127–134.

- (113) Lalande, C.; Miraux, S.; Derkaoui, M.; Mornet, S.; Bareille, R.; Fricain, J.-C.; Franconi, J.-M.; Visage, C. L.; Letourneur, D.; Amédée, J. V.; Bouziers-Sore, A.-K. *Eur. Cells Mater. ECM* **2011**, *21*, 341–354.
- (114) Bouziers-Sore, A.-K.; Ribot, E.; Bouchaud, V.; Miraux, S.; Duguet, E.; Mornet, S.; Clofent-Sanchez, G.; Franconi, J.-M.; Voisin, P. *NMR Biomed.* **2010**, *23* (1), 88–96.
- (115) Sonvico, F.; Mornet, S.; Vasseur, S.; Dubernet, C.; Jaillard, D.; Degrouard, J.; Hoebeke, J.; Duguet, E.; Colombo, P.; Couvreur, P. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16* (5), 1181–1188.
- (116) Jacobin-Valat, M.-J.; Laroche-Traineau, J.; Larivière, M.; Mornet, S.; Sanchez, S.; Biran, M.; Lebaron, C.; Boudon, J.; Lacomme, S.; Cérutti, M.; Clofent-Sanchez, G. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2015**, *11* (4), 927–937.
- (117) Rudd, J. H. F.; Hyafil, F.; Fayad, Z. A. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2009**, *29* (7), 1009–1016.
- (118) Lee, D.-E.; Koo, H.; Sun, I.-C.; Ryu, J. H.; Kim, K.; Kwon, I. C. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2656–2672.
- (119) Vo-Dinh, T. *Biomedical Photonics Handbook*; CRC Press, 2003.
- (120) Haute Autorité de Santé. *Dépistage du cancer de la prostate. Analyse critique des articles issus des études ERSPC et PLCO publiés en mars 2009*; 2010.
- (121) Barreto, J. A.; O'Malley, W.; Kubeil, M.; Graham, B.; Stephan, H.; Spiccia, L. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (12), H18–H40.
- (122) Bertrand, N.; Wu, J.; Xu, X.; Kamaly, N.; Farokhzad, O. C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *66*, 2–25.
- (123) Ferrantini, M.; Belardelli, F. *Semin. Cancer Biol.* **2000**, *10* (2), 145–157.
- (124) Ow, H.; Larson, D. R.; Srivastava, M.; Baird, B. A.; Webb, W. W.; Wiesner, U. *Nano Lett.* **2005**, *5* (1), 113–117.



## Chapitre II. Développement d'une stratégie de PEGylation covalente de surfaces de nanoparticules d'oxydes métalliques



Il a été expliqué au cours du chapitre précédant que la stabilité électrostatique de dispersions colloïdale est très sensible aux conditions du milieu dispersant. Une force ionique trop élevée comprime la couche diffuse de contre-ions, ce qui diminue la portée des répulsions électrostatiques et provoque la floculation des particules. Or le milieu biologique impose ses conditions de force ionique qui sont au moins équivalentes à 150 mM en NaCl, sans compter la présence de sels divalents ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ). Dans ces conditions, la longueur de Debye est de l'ordre de grandeur du nanomètre, ce qui ne permet pas d'assurer la stabilité de nanoparticules. La stabilisation stérique des dispersions de nano-objets est donc un passage obligé vers le milieu d'application.

Il a également été montré que les possibilités d'interactions non spécifiques entre les surfaces des nanoparticules et les biomolécules sont très élevées. Ces interactions rendent le contrôle de la fonctionnalité des nanoparticules délicat. L'étape greffage de macromolécules de PEG à la surface, appelée également PEGylation, permet de limiter ces interactions non spécifiques. Cependant pour que cette PEGylation soit efficace, la densité surfacique en macromolécules doit être élevée.

Ce chapitre s'intéresse au développement d'une stratégie de fonctionnalisation de surfaces de nanoparticules d'oxyde métallique par des macromolécules de PEG greffées à haute densité. Le matériau modèle employé est la silice. En plus d'être un matériau facile à produire en grande quantité pour l'étude, la silice est également largement employée pour les applications biomédicales car c'est un matériau biologiquement inerte. La silice est utilisée en tant que matrice hôte, dans laquelle il est possible d'inclure des fluorophores, grâce à sa transparence dans le domaine du visible, mais également différents types de nanoparticules, ou encore des principes actifs.

Le développement de cette stratégie de PEGylation de surface de nanoparticules d'oxydes métalliques est réalisé sur des nanoparticules de silice modèles. Afin de déterminer les densités de greffage le plus précisément possible, il est nécessaire de travailler avec des lots monodisperses pour connaître avec précision la surface développée mise en jeu durant les modifications et les caractérisations. Le choix de la taille des nanoparticules résulte d'un compromis entre l'utilisation de nanoparticules de diamètre élevé afin de faciliter les manipulations et l'utilisation de nanoparticules de faible diamètre présentant une surface développée élevée afin de faciliter les caractérisations. L'occupation d'une macromolécule de PEG de 5 000 g/mol sur une surface est de l'ordre de grandeur de 10 nm<sup>2</sup>/molécules, soit 0,7 mg/m<sup>2</sup>. Pour que la masse des molécules greffées en surface représente au moins quelques pourcents de la masse totale (valeur acceptable pour les caractérisations par perte de masse,

ou dosages élémentaires par exemples) la surface spécifique doit être d'au moins 50 m<sup>2</sup>/g. D'autre part, il est nécessaire de se rapprocher le plus possible de la taille des nanoparticules imposée par les applications visées afin de conserver un rayon de courbure comparable. Nous avons donc choisi de travailler avec des nanoparticules monodisperses en taille d'environ 60 nm de diamètre. Le procédé de synthèse qui utilise une approche sol-gel de croissance ensemencée ainsi que la caractérisation des nanoparticules obtenues est présenté en annexe n° 2.

## **A. Fonctionnalisation de la surface de nanoparticules par des macromolécules de PEG**

Il a été montré lors du chapitre précédant que la modification de surface inorganique par des dérivés du poly(oxyde l'éthylène) pouvait permettre de limiter l'adsorption des protéines présentes en grande quantité dans les milieux biologiques. Ces propriétés répulsives et antiadhésives sont cependant obtenues sous réserve d'atteindre des densités de greffage suffisantes, limitant ainsi la diffusion des protéines à travers la couronne polymère.

Nous nous proposons ici d'étudier des voies de PEGylation de surface de nanoparticules de silice et d'étudier leurs propriétés vis-à-vis de la stabilité colloïdale ainsi que de l'adsorption de protéines. Deux voies de PEGylation sont envisageables. La première est une voie directe utilisant un silane organofonctionnel présentant une macromolécule de PEG. La seconde est une voie indirecte dans laquelle la surface est d'abord modifiée par un silane organofonctionnel apportant des fonctions chimiques réactives utilisées par la suite pour le greffage des macromolécules de PEG.

### **A.1 Voie directe : Modification chimique de la surface de nanoparticules de silice par des agents de couplage silanique portant un bras macromoléculaire de PEG**

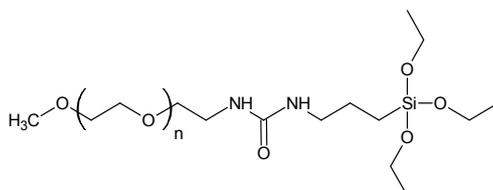
Les silanes organofonctionnels constituent une famille de molécules dont la structure générale est représentée par la formule  $R_nSi(OR')_{4-n}$  où  $OR'$  est un groupement hydrolysable (methoxy, éthoxy...), et  $R$  est un groupe organofonctionnel non hydrolysable. Les silanols obtenus après hydrolyse peuvent se condenser avec des groupes hydroxyles de surface ou avec d'autres silanols portés par des silanes hydrolysés voisins pour former un film

polysiloxane. La fonctionnalité de l'organosilane est apportée par le groupement R. Ce groupement peut présenter des fonctions chimiques réactives permettant la formation de liaisons covalentes, ou possédant des propriétés intrinsèques (charges électrostatiques, hydrophobicité...). La modification chimique des surfaces d'oxydes métalliques est obtenue par l'hydrolyse des groupements alcoxy du silane organofonctionnel suivie de la condensation des silanols avec les groupements OH présents à la surface de l'oxyde. Les vitesses d'hydrolyse et de condensation du silane, comme pour le TEOS, sont fortement dépendante du pH et peuvent être catalysées en milieu acide ou basique. Alors que l'hydrolyse peut se dérouler en quelques minutes seulement, la condensation nécessite souvent plusieurs heures. Ce n'est cependant pas une règle générale étant donné que la cinétique d'hydrolyse est ralentie avec l'allongement de la chaîne carbonée de l'alkoxysilane, la liaison étant stabilisée par effet donneur.<sup>1</sup>

Des silanes organofonctionnels portant une macromolécule de mPEG (methoxy-PEG-R) sont disponibles commercialement. Plusieurs voies de modifications de surfaces de nanoparticules d'oxydes métalliques par les PEG silanes sont décrites dans la littérature.<sup>2-8</sup> Kohler et al. rapportent un procédé de modification de surface de nanoparticules d'oxyde de fer dans le toluène sous sonication continue.<sup>3</sup> Bien que ce procédé soit bien adapté pour la modification de substrats de silice,<sup>9</sup> il ne convient pas aux systèmes colloïdaux car il n'intègre pas la gestion de la stabilité colloïdale. En outre, les diamètres hydrodynamiques des objets obtenus ne sont pas mentionnés. D'autres procédés réalisés dans un milieu aqueux basique,<sup>2,4</sup> hydro-alcoolique basique,<sup>7</sup> ou hydro-alcoolique acide,<sup>6,8</sup> sont plus adaptés à la modification chimique de surface de nanoparticules. Après silanisation de nanoparticules d'oxyde de fer en milieu aqueux basique, Butterworth *et al.* observent une indépendance vis-à-vis du pH de la stabilité colloïdale suggérant un passage à un régime stérique après modification de la surface de nanoparticules d'oxyde de fer avec un mPEG-silane.<sup>2</sup> Un résultat intéressant est que la stabilité colloïdale est améliorée avec les chaînes de bas et de haut poids moléculaire (< 350 g/mol et > 5000 g/mol). Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les petites chaînes ayant un faible encombrement stérique permettent d'obtenir des couches de PEG denses alors que les chaînes longues permettent d'obtenir des couronnes de PEG peu denses mais épaisses. Cela met en évidence la complexité d'obtenir des densités de greffage élevée avec des PEG de haute masse moléculaire.

### A.1.1 Couplage du mPEG-silane à la surface des nanoparticules de silice dans un milieu hydro-alcoolique acide.

Le milieu hydro-alcoolique est choisi pour le greffage du mPEG-silane (**Figure II.1**) à la surface des nanoparticules de silice car celles-ci sont stables d'un point de vue colloïdal dans ce milieu. L'hydrolyse puis la condensation du silane sera catalysée par la présence d'acide acétique (AcOH).



**Figure II.1** : formule chimique du mPEG-silane.

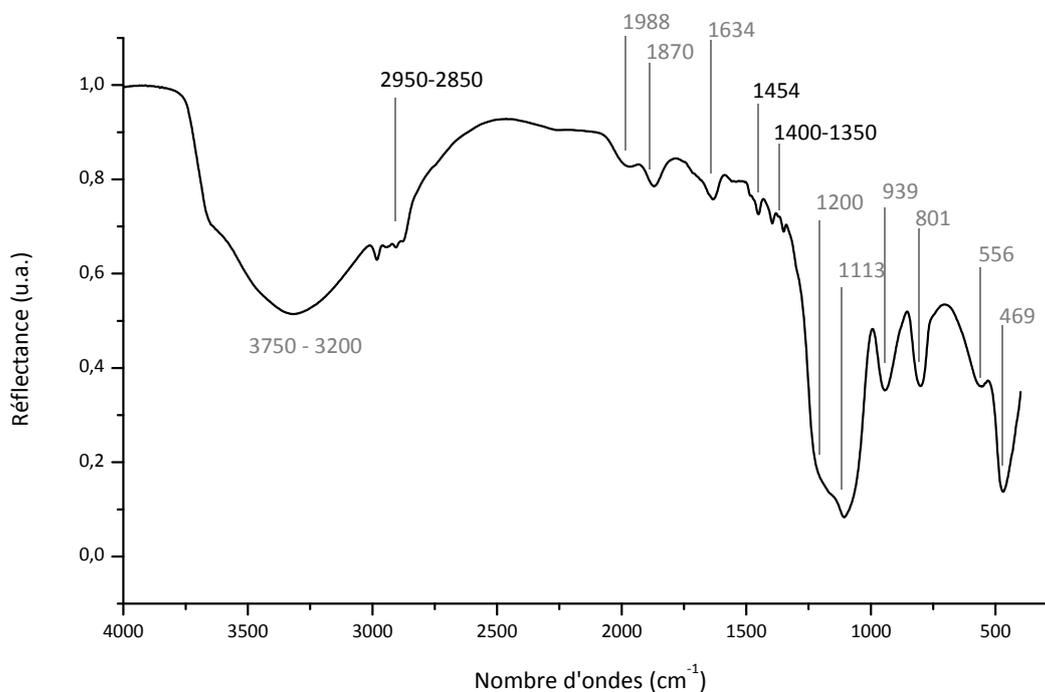
#### **Mode opératoire II-1 : Modification de la surface de nanoparticules de silice avec un mPEG 5k silane**

*Une masse de 300 mg de mPEG-silane (5000 g/mol, Laysan Bio) est solubilisée dans 5 ml d'EtOH anhydre sont ajoutés à 120 mg de nanoparticules de silice de 60 nm de diamètre dispersés dans 15 ml d'un mélange d'EtOH et d'H<sub>2</sub>O (2:1) sous agitation, puis 2 ml d'acide acétique (AcOH) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux à 90°C durant 50 h. Les nanoparticules sont lavées par centrifugation à 12 000 g durant 15 min dans un mélange EtOH/DCM (6:1) afin d'éliminer l'excès de mPEG-silane. Deux autres cycles de centrifugations dans l'EtOH sont réalisés avant de stocker les nanoparticules à l'état dispersé dans l'EtOH.*

Les nanoparticules obtenues par ce protocole sont nommées NP-Si-mPEG-5k. Leur diamètre hydrodynamique en DLS dans l'eau est de 193 nm avec un PDI de 0,11. Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules augmente après modification du fait de la présence de la couronne polymère tout autour des nanoparticules. Cependant, une augmentation aussi élevée ne peut pas être uniquement attribuée à la formation d'une couronne de PEG à la surface des nanoparticules car celle-ci devrait faire environ 60 nm d'épaisseur pour correspondre à la différence de diamètre observé, alors qu'une macromolécule de PEG de 5000 g/mol ne mesure que 41 nm dans la conformation la plus étirée, en considérant un indice de polymérisation de 113 et une longueur du monomère de 0,358 nm.<sup>10</sup> Cette valeur excessivement élevée témoigne de la présence d'une proportion d'agrégats dans l'échantillon. De plus, le PDI a également augmenté par rapport aux nanoparticules initiales, indiquant un élargissement de la distribution en taille de la population, ce qui est en accord avec la présence d'agrégats. Pour autant, le sol ne semble macroscopiquement pas déstabilisé car le diamètre mesuré ainsi que la distribution en taille sont constants dans le temps.

### A.1.2 Caractérisation de la surface des nanoparticules de silice modifiées par le mPEG-silane

Le spectre infrarouge de réflexion diffuse des NP-Si-mPEG-5k permet de confirmer la modification de surface des nanoparticules par le mPEG-silane (**Figure II.2**). Les pics compris entre 2850 et 2950  $\text{cm}^{-1}$  sont attribués aux modes de vibrations de liaisons C-H des motifs oxyde d'éthylène. La bande à 1454  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée à la fois au mode de déformation des liaisons C-H et au mode d'élongation des liaisons N-H. Les faibles bandes comprises entre 1400 et 1350  $\text{cm}^{-1}$  sont attribuées aux modes de déformations des liaisons C-C.<sup>5</sup> Les autres modes de vibrations des liaisons C-C ainsi que l'élongation des liaisons C-O-C sont cachés par la large bande intense liée à la silice entre 1250  $\text{cm}^{-1}$  et 1000  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figure II.2** : Spectre infrarouge des nanoparticules de silice modifiées avec le mPEG-silane. En gris sont reportées les bandes attribuées à la silice.

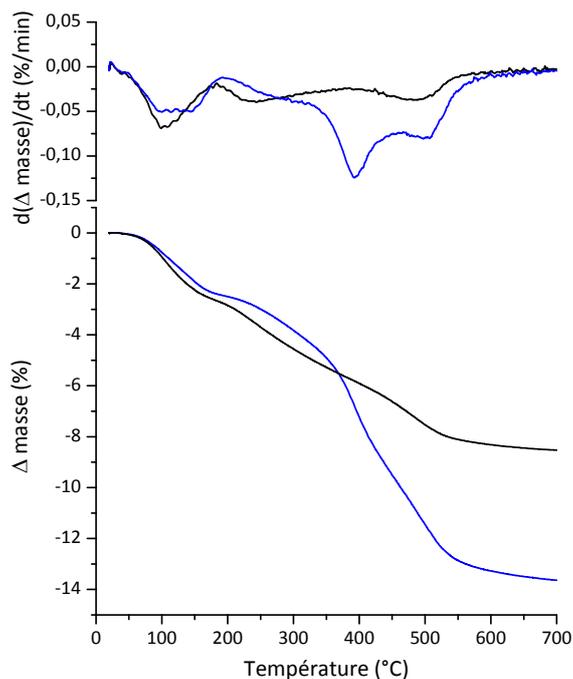
L'étude en spectroscopie infrarouge met en évidence qualitativement la présence des macromolécules de PEG, sans permettre, toutefois, de quantifier la densité de greffage obtenue. Celle-ci est déterminée par analyse élémentaire ainsi que par analyse thermogravimétrique (ATG). Ces deux techniques de mesures ainsi que les calculs permettant de déterminer les densités de greffage sont présentées dans l'annexe n° 3.

La composition des échantillons en carbone ainsi qu'en azote estimée par analyse élémentaire permet de déterminer une densité de greffage de  $0,14 \pm 0,02$  molécules/ $\text{nm}^2$ .

**Tableau 3** : Composition élémentaire des nanoparticules de silice avant et après fonctionnalisation avec le PEG silane.

	Composition (% massique)		
	N	C	H
<b>NP silice</b>	0	0,625	1,24
<b>NP-SiO<sub>2</sub>-Si-mPEG-5k</b>	0,019	3,52	1,55

Dans le but de comparer et discuter les résultats obtenus par analyse élémentaire, une analyse thermogravimétrique (ATG) est réalisée également. L'analyse thermogravimétrique consiste à suivre l'évolution de la masse d'un échantillon en fonction de la température. Sur un matériau tel que la silice préparée par voie sol-gel, il est cependant délicat d'attribuer avec exactitude le phénomène à l'origine de la perte de masse. En effet, bien que l'échantillon soit préalablement déshydraté à 90 °C sous vide primaire, il subsiste une quantité non négligeable d'eau physisorbée qui est éliminée à plus haute température. Enfin une dernière proportion d'eau contenue dans l'échantillon à l'état chimisorbé est éliminée à des températures encore plus élevées. Ces différentes formes d'eau provoquent une perte de masse répartie sur une large gamme de température. La mesure de pertes de masse attribuée aux molécules greffées à la surface est donc entachée d'erreur. Afin d'estimer la perte de masse attribuée à l'eau contenue dans la silice, les mesures sont réalisées à la fois sur les nanoparticules modifiées NP-Si-mPEG-5k et les nanoparticules de silice nues comme référence. La première perte de masse élevée mesurée sur la silice vers 100 °C correspond au départ de molécules d'eau physisorbées. Les pertes de masse à plus haute température (pertes élevées à 225 °C et 480 °C) seraient liées à la condensation de groupements silanols présents à la surface et au sein de la silice, ainsi qu'au départ de groupements éthoxy résiduels.<sup>11</sup> Ces pertes de masse se retrouvent dans l'échantillon NP-Si-mPEG-5k, mais un nouvel évènement se produit à partir de 320 °C. Celui-ci est lié à la dégradation et au départ du PEG-silane. Le fait de réaliser les ATG sous argon permet à la fois d'augmenter la température de dégradation du PEG par rapport à la dégradation en présence d'oxygène mais également de réduire l'intervalle de température sur lequel la dégradation se produit. Ceci a pour effet de diminuer l'erreur liée à la perte d'eau durant la mesure. En revanche, le fait de travailler sans oxygène, et donc dans un milieu non oxydant, peut engendrer une légère sous-estimation des pertes de masses liées au PEG du fait de la présence potentielle de résidus de carbones.



**Figure II.3** : Courbes d'analyse thermogravimétrique des nanoparticules modifiées par le PEG silane. (Noir : NP-SiO<sub>2</sub> ; Bleu : NP-SiO<sub>2</sub>-Si-mPEG-5k).

L'analyse des résultats nous a permis d'estimer une densité de surface en greffon PEG de  $0,13 \pm 0,02$  macromolécules/nm<sup>2</sup>.

Les deux techniques de caractérisation convergent vers une densité de greffage de  $0,14 \pm 0,02$  molécules de PEG par nm<sup>2</sup>. Cette valeur est bien inférieure à la densité de groupements silanol disponibles à la surface de la silice qui est d'environ 5 /nm<sup>2</sup>,<sup>12</sup> ou encore à la densité obtenue avec des silanes peut encombrés, c'est donc l'encombrement stérique élevé de la macromolécule de PEO porté par le PEG-silane qui limite l'accès à la surface d'autres molécules de PEG-silane. En effet, cet encombrement stérique contraint la conformation des macromolécules se greffant à la surface. Ces contraintes peuvent être apparentées à une perte de liberté, et donc à une diminution de l'entropie du système, ce qui rend le greffage de nouvelles macromolécules défavorable.

A notre connaissance, peu de groupes se sont intéressés à déterminer la densité de greffage de PEG-silane, quelques valeurs ont cependant été trouvées dans la littérature. La densité de  $0,14 \pm 0,02$  macromolécules/nm<sup>2</sup> déterminée est supérieure à celle obtenue par Butterworth *et al.* annonçant  $0,07 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  soit  $0,04$  macromolécules/nm<sup>2</sup> pour un PEG-5k silane.<sup>2</sup> La densité de greffage obtenue dans notre étude reste cependant relativement faible. En effet, Gref *et al.* observent que pour obtenir une surface non adhésive envers les protéines avec un PEG-5k, une densité de surface de  $2,1 \text{ nm}^2/\text{macromolécules}$ , soit  $0,48$  macromolécules/nm<sup>2</sup> doit être atteinte.<sup>13</sup> Ce résultat est similaire à celui obtenu par Walkey *et*

*al.*<sup>14</sup> Il existe cependant une variabilité élevée entre les résultats obtenus par les différentes équipes. Par exemple Sofia *et al.* montrent qu'ils suppriment l'adsorption de protéines sur une surface à partir de 0,17 macromolécules/nm<sup>2</sup> pour un PEG de 3,4 kDa.<sup>15</sup> Ces variations s'expliquent par la différence entre les études engagées à proprement parler, ainsi qu'aux techniques de caractérisation utilisées. Sofia *et al.* s'intéressent à l'adsorption de protéines unique (cytochrome C, albumine, fibronectine) alors que Walkey *et al.* proposent une étude nettement plus intégrative en étudiant l'adsorption à partir du plasma et en s'intéressant à la capture par les macrophages.

### **A.1.3 Conclusion**

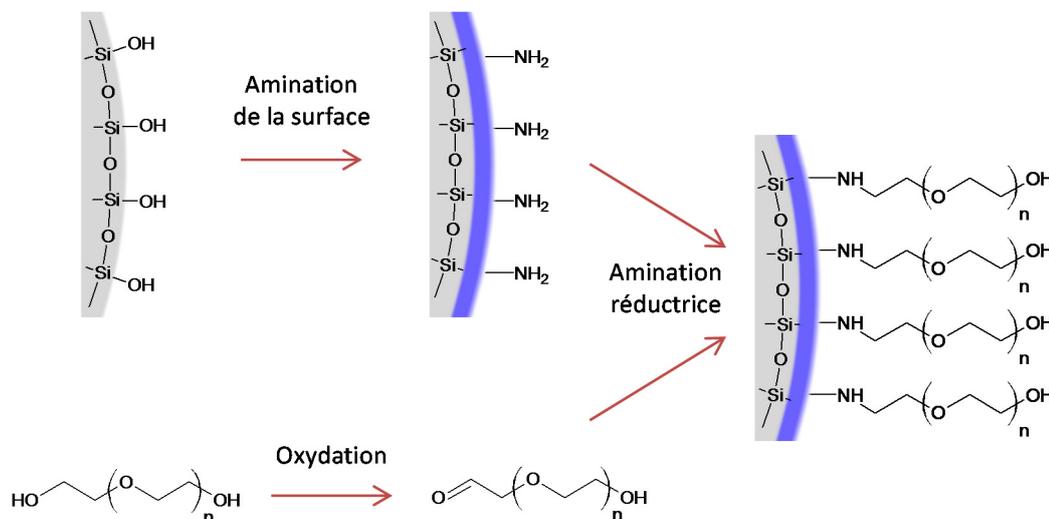
Nous venons de montrer que l'utilisation d'un PEG-silane pour PEGyler une surface de nanoparticules de silices permet de d'obtenir une densité de 0,14 macromolécules/nm<sup>2</sup>. C'est un moyen rapide à mettre en œuvre qui, cependant, ne permet pas d'atteindre des densités de greffage élevées du fait du fort encombrement stérique généré par les greffons macromoléculaires de PEG. De plus, dans le commerce, les PEG-silanes disponibles portent en réalité des bras macromoléculaires de type methoxy-PEG. La terminaison des macromolécules par des groupements méthyles hydrophobes peut être un inconvénient. En effet, Unsworth *et al.* ont montré que des surfaces PEGylées perdent leur pouvoir de répulsion de protéines au-delà d'une certaine densité de greffage de « mPEG » du fait de l'exposition élevée des groupements terminaux, alors que cet effet n'est pas observé avec des PEG terminés par des fonctions alcool.<sup>16</sup>

Etant donné la faible densité de greffage obtenue, nous nous sommes intéressé à développer une nouvelle voie de PEGylation à partir de PEG commerciaux réalisée en deux étapes indépendantes afin de dissocier les contraintes chimiques, liées à la modification chimique de surface par les silanes organofonctionnels, des problèmes d'encombrement des macromolécules greffées par la suite.

## A.2 Voie indirecte : Greffage covalent de macromolécules de PEG par ancrage sur des sites fonctionnels présents à la surface de la nanoparticule.

Le PEG étant une molécule très encombrante, il est difficile d'atteindre des densités de greffage élevées sur une surface par greffage direct. Une stratégie de greffage en deux étapes peut sembler plus attractive. En effet, dans un premier temps, des fonctions chimiques réactives peu encombrantes seront d'abord générées en grande quantité à la surface de l'oxyde métallique. Ces fonctions seront ensuite mises à profit pour greffer les macromolécules de PEG grâce à une réaction de couplage efficace.

Le greffage d'agents de couplages silaniques organofonctionnels à la surface d'oxydes métalliques a été optimisé lors de travaux antérieurs au sein du groupe, et ce procédé est à ce jour bien maîtrisé.<sup>17-19</sup> D'autre part, la présence de fonctions alcool à chaque extrémité des macromolécules de PEG donne la possibilité de les convertir en fonction aldéhyde. Ces macromolécules pourront par la suite être greffées sur les amines de surface par amination réductrice (**Figure II.4**).

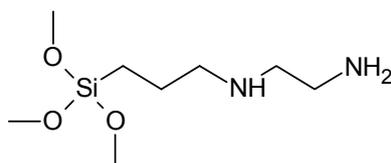


**Figure II.4** : Stratégie de PEGylation de surface de silice, proposée dans le cadre de l'étude, utilisant des macromolécules de PEG commerciales.

### ***A.1.1 Modification chimique de la surface de nanoparticules de silice avec un agent de couplage silanique aminé***

#### ***A.1.1.1 Greffage de l'aminosilane à la surface des nanoparticules de silice***

La singularité des aminosilanes par rapport aux autres silanes organofonctionnels réside dans le fait que l'hydrolyse et la condensation du silane est autocatalysée par la présence de la fonction amine basique (exemple en **Figure II.5**). Le stockage de ces réactifs doit donc impérativement être réalisée dans des conditions anhydre afin d'éviter toute initiation de ces réactions.

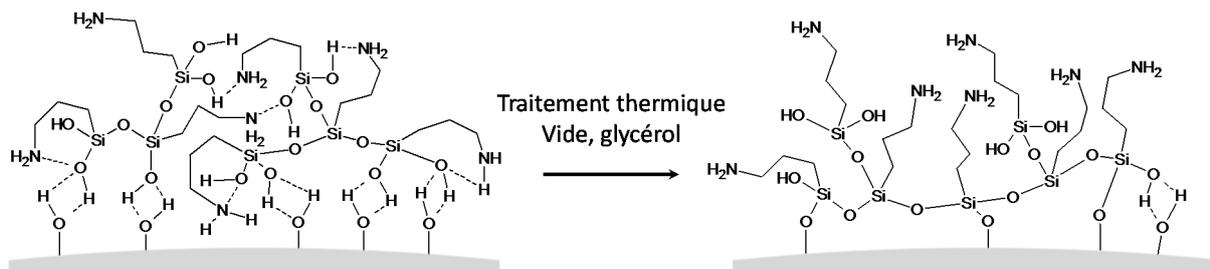


**Figure II.5** : Formule chimique de l'aminosilane N-[3-(triméthoxysilyl)propyl]éthylène-diamine.

#### ***Mode opératoire II-2 : Modification de la surface de nanoparticules de silice par le N-[3-(Triméthoxysilyl)propyl]éthylènediamine (EDPS) par autocatalyse basique.***

200 ml d'EtOH sont ajoutés à 200 ml d'une dispersion dans l'eau de nanoparticules de silice de 60 nm à 12 g/l. Sous agitation, 3,89 ml d'EDPS sont ajoutés au milieu réactionnel. L'ensemble est laissé sous agitation durant 12 h, puis 100 ml de glycérol sont ajoutés. L'EtOH ainsi que l'eau sont éliminés par évaporation sous pression réduite. Les nanoparticules dispersées dans le glycérol sont alors chauffées à 100°C durant 2 h sous vide. Après le traitement sous vide, 100 d'éthanol sont ajoutés puis l'ensemble est versé dans 200 ml d'acétone. Les nanoparticules sont séparées par centrifugation à 5 000 g durant 5 min. Le culot est redispersé dans l'éthanol puis centrifugé à 12 000 g durant 15 min. Après redispersion du culot dans l'éthanol, quelques gouttes d'AcOH sont ajoutés afin de protoner les amines de surface. Deux autres lavages dans l'éthanol sont réalisés afin d'éliminer les traces de silane non greffé ainsi que l'excès d'AcOH. Les nanoparticules nommées NP-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> sont stockées dans l'EtOH à l'état dispersé.

Afin de modifier la surface des nanoparticules et de la saturer, l'EDPS est ajouté en large excès (150 µmol/m<sup>2</sup>). Dans un premier temps, le film polysiloxane est adsorbé à la surface de la nanoparticule par formation de liaisons hydrogènes entre les silanols du film et les silanols présents à la surface des nanoparticules. Le chauffage sous vide dans le glycérol permet ensuite la condensation de ces silanols ainsi que la libération des amines formant des liaisons hydrogènes avec ces silanols<sup>17</sup> (**Figure II.6**).

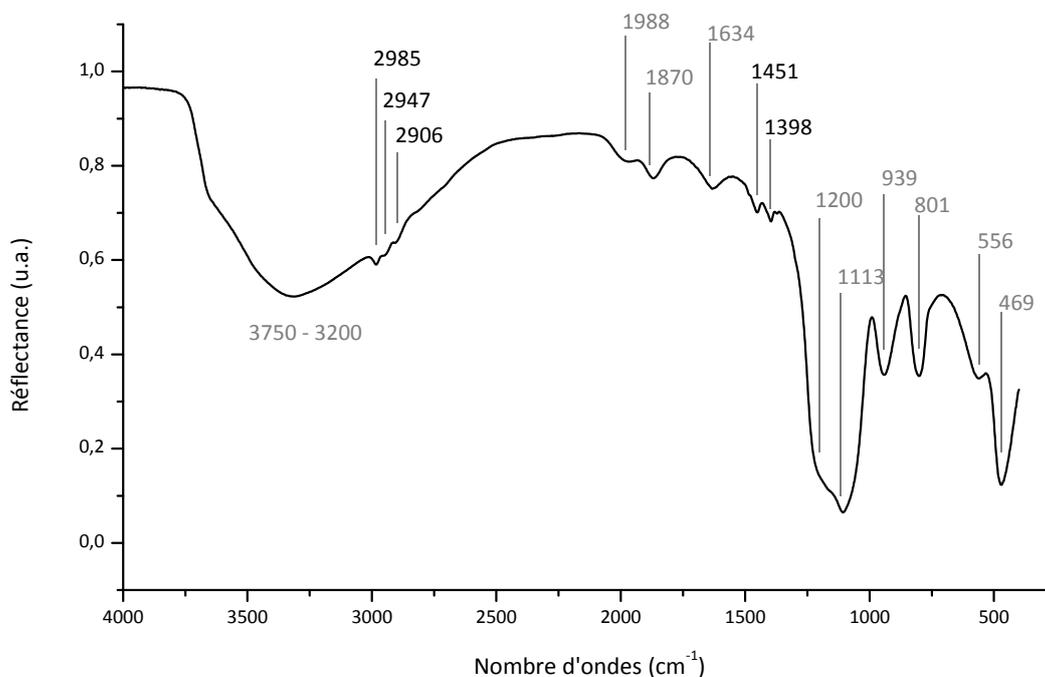


**Figure II.6 :** Conformations possibles du film polysiloxane à la surface des nanoparticules de silice avant et après traitement thermique.

Après modification de surface, les nanoparticules présentent un diamètre hydrodynamique mesuré en DLS de 82 nm avec un PDI de 0,05. Ces valeurs sont très proches des valeurs mesurées pour les nanoparticules de silice initiales (78 nm, PDI 0,03), la modification de surface par l'EDPS n'a donc pas altéré la stabilité colloïdale du sol.

### A.2.1.1 Caractérisations de la modification de surface

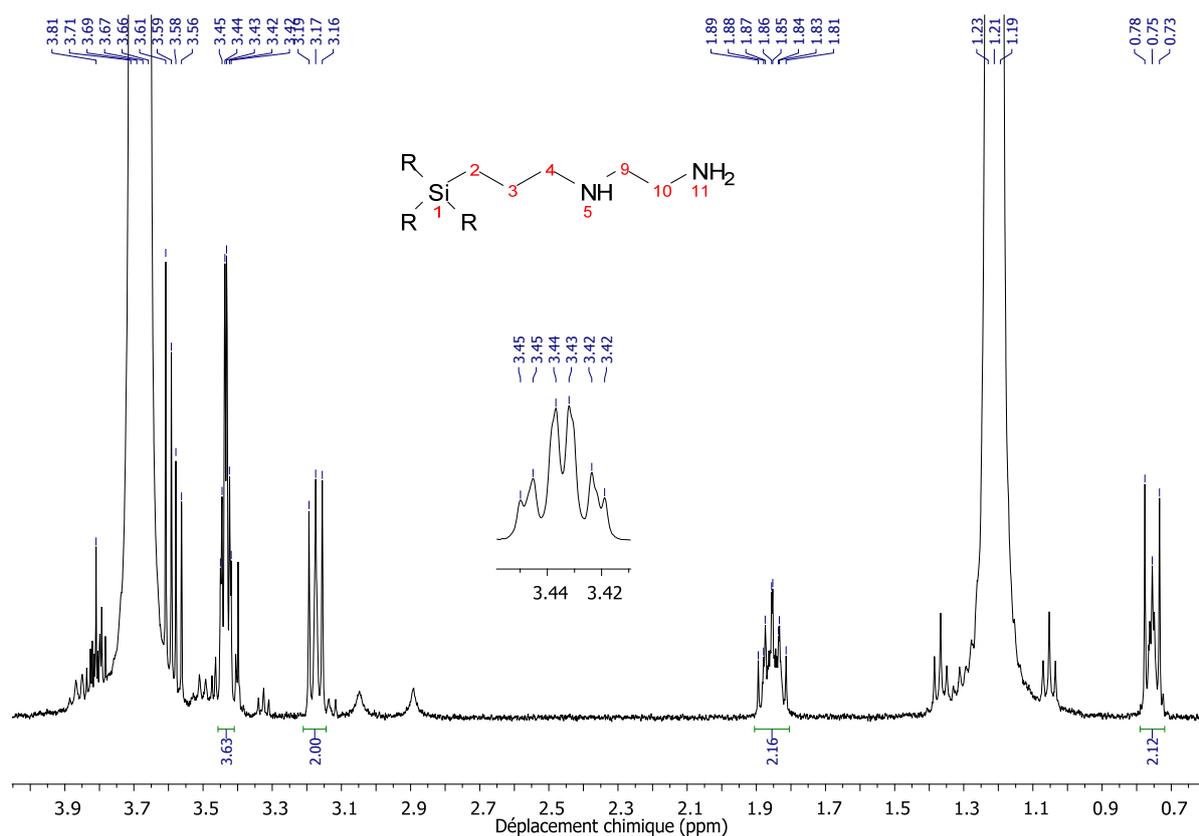
Les nanoparticules de silice modifiées par l'EDPS sont analysées en spectroscopie infrarouge (**Figure II.7**). Les différents modes d'élongation des liaisons C-H des chaînes hydrocarbonées aliphatiques sont visibles dans la région comprise entre  $2985\text{ cm}^{-1}$  et  $2906\text{ cm}^{-1}$ . Le mode de déformation des liaisons C-H à  $1451\text{ cm}^{-1}$  est également présent. Il faut également noter la présence d'une bande à  $1398\text{ cm}^{-1}$  pouvant être attribuée au mode de déformation des liaisons C-N.



**Figure II.7 :** Spectre infrarouge des nanoparticules de silice modifiées par l'EDPS. En gris sont reportées les bandes attribuées à la silice.

Le spectre en RMN du proton des particules de silice après modification de surface est mesuré sur un spectroscope Bruker à 9,4 Teslas (400 MHz) dans le D<sub>2</sub>O (**Figure II.8**). Le triplet à 1,21 ppm ainsi que le quadruplet à 3,68 ppm sont attribués aux protons de l'éthanol liés à la préparation de l'échantillon et aux groupements éthoxy non hydrolysés au sein de la silice.<sup>18</sup> Le doublet dédoublé compris entre 3,56 et 3,61 ppm ainsi que le multiplet à 3,81 ppm sont attribués aux protons portés par des résidus de glycérol provenant de l'étape de traitement thermique.<sup>18</sup>

Le spectre possède également les pics caractéristiques du groupe 3-(2-aminoéthylamino)propyl apporté par la modification de surface. Le triplet à 0,75 ppm est attribué aux protons portés par le carbone 2. Le multiplet à 1,86 ppm est attribué aux protons du carbone 3. Le triplet à 3,17 ppm est attribué aux protons du carbone 4. Les protons des carbones 9 et 10 sont à l'origine du multiplet à 3,43 ppm. En réalité ce multiplet est composé de 2 triplets se superposant (Insert **Figure II.8**). Les protons du carbone 9 et 10 possèdent un environnement très proche mais pas identique, c'est pourquoi leurs signaux respectifs se superposent et il est difficile d'attribuer les protons des carbones 9 et 10 à leur triplet correspondant. Les protons des carbones 4, 9 et 10 présentent des déplacements chimiques élevés pour des protons portés par des carbones adjacents à des amines primaires ou secondaires. Ceci s'explique par le fait que les amines sont sous la forme ammonium. En effet, afin d'enregistrer le spectre en RMN du liquide, il est nécessaire que le milieu soit isotrope et donc, les dispersions de nanoparticules doivent se trouver à leur état stable. Les amines ont donc été protonées par l'ajout d'acide trifluoroacétique (TFAA) (non visible en RMN du proton) afin de provoquer des répulsions électrostatiques entre les particules. Les ammoniums ont un pouvoir attracteur envers les électrons supérieurs à celui des amines, ce qui déblindé les protons portés par les carbones adjacents et augmente leur déplacement chimique.



**Figure II.8 :** Spectre <sup>1</sup>H-RMN des nanoparticules de silice modifiées par l'EDPS. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm) 0,75 (t, *J* = 8,4 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 1,86 (m, 2H, H<sub>3</sub>) 3,17 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H<sub>4</sub>), 3,43 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H, H<sub>9</sub> ou 10), 3,44 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H, H<sub>9</sub> ou 10).

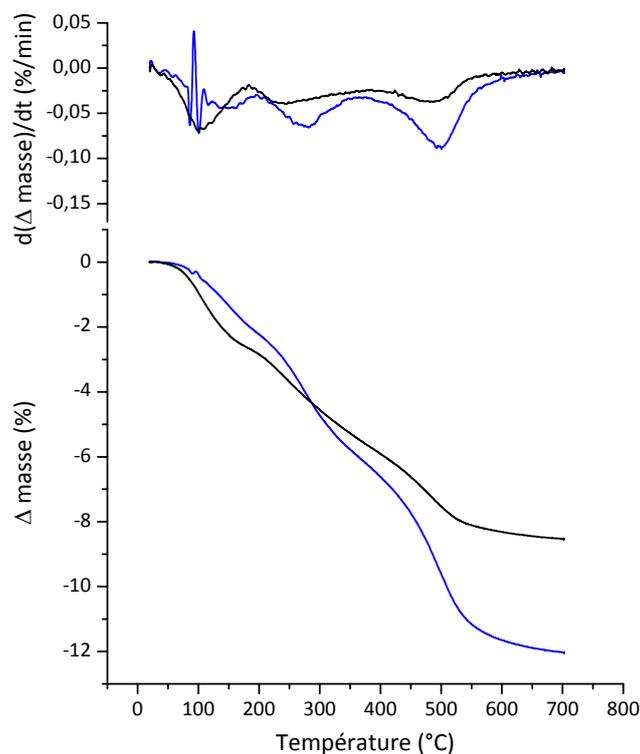
La quantité de groupements ammoniums présents à la surface des nanoparticules peut être estimée indirectement en dosant leurs contre-ions. Pour cela, le contre-ion acétate est échangé par le chlorure en réalisant deux lavages dans une solution d'acide chlorhydrique à 100mM, suivi de plusieurs lavages à l'eau afin d'éliminer l'excès d'ions chlorure. Cet halogène est ensuite facilement dosé en conductimétrie avec du nitrate d'argent. Il faut prendre en considération qu'il y a en toute logique 2 ions chlorure par molécule d'EDPS greffée à la surface. La densité de greffage déterminée est de 3,4 μmol/m<sup>2</sup>.

La densité de greffage est également déterminée par analyse élémentaire de l'échantillon. Le **Tableau 4** donne la composition élémentaire des nanoparticules de silice ainsi que celle des nanoparticules de silice aminées par le Mode opératoire II-2. A partir de la quantité d'azote mesurée et en considérant que ces molécules proviennent uniquement de l'aminosilane greffé, il est possible d'estimer une densité surfacique de (3,5 ± 0,4) μmol/m<sup>2</sup> ce qui correspond à 2,1 ± 0,2 greffons/nm<sup>2</sup>.

**Tableau 4** : Composition élémentaire des nanoparticules de silice et de silice aminées.

	Composition (% massique)		
	N	C	H
NP silice	0	0,625	1,24
NP-SiO <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	0,471	3,12	1,56

De nouveau, afin d'estimer les pertes de masse liées au départ d'eau contenue dans la silice colloïdale, l'échantillon est comparé à la mesure réalisée sur les nanoparticules de silice. Il semble que le départ d'eau autour de 100 °C soit moins élevé pour les particules NP-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> que pour les particules de silice. Cela laisse penser que la quantité d'eau physisorbée sur les nanoparticules NP-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> est moins élevée que sur les nanoparticules de silice. Cette eau de surface a pu être en partie déplacée par la condensation du film polysiloxane. Deux pertes de masse élevées autour de 270 °C et 500 °C sont observées avec l'échantillon aminé. Ils peuvent être attribués à la dégradation du groupe 3-(2-aminoéthylamino)propyl présents en surface. Les contre-ions acétate ont été échangés pour cette expérience avec des ions chlorure. La masse molaire du groupement 3-(2-aminoéthylamino)propyl sous sa forme acide est donc de 174 g/mol. La densité de greffage mesurée par cette technique est de  $4,1 \pm 0,4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ .

**Figure II.9** : Courbes d'analyse thermogravimétrique des nanoparticules modifiées avec l'EDPS. (Noir : NP-SiO<sub>2</sub> ; bleu : NP-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>).

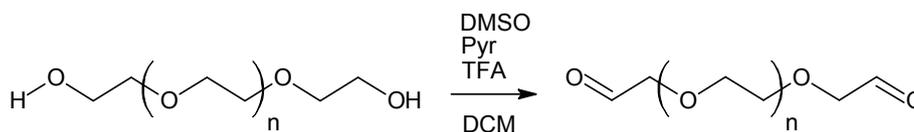
### A.2.1.2 Conclusion

Dans cette partie, la synthèse ainsi que la caractérisation de la modification de surface de nanoparticules de silice par des aminosilanes organofonctionnels a été d'être détaillée. Le procédé de modification permet d'obtenir des nanoparticules parfaitement stables après protonation des amines. La densité de greffage déterminée par différentes techniques varie entre  $3,3 \pm 0,4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  et  $4,1 \pm 0,4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ . Aux incertitudes de mesure près, ces valeurs sont semblables et en accord avec les valeurs déterminées au cours des travaux précédents.<sup>17-19</sup>

## A.2.2 Conversion des extrémités du PEG en fonctions aldéhyde

### A.2.2.1 Synthèse de PEG-al par oxydation de Pfitzner-Moffatt

Par oxydation ménagée d'un alcool primaire, il est possible d'obtenir une fonction aldéhyde. Il est cependant nécessaire de bien choisir l'oxydant afin d'éviter le risque de suroxydation en acide carboxylique. La famille des oxydants basées sur les sels de chrome est très utilisée,<sup>20</sup> mais, celle-ci n'est pas adaptée à l'oxydation des extrémités des PEG car il a été observé que le PEG forme des complexes avec le sel métallique.<sup>21</sup> La purification de tels complexes reste délicate et le caractère toxique du chrome rend ce procédé inadapté pour des applications biologiques. Le choix de la réaction s'est donc porté sur l'oxydation de Pfitzner-Moffatt.<sup>22</sup> Les conditions douces de cette réaction permettent de conserver l'intégrité du polymère tout en oxydant les extrémités en aldéhyde. Cette réaction est basée sur l'activation du DMSO par réaction avec le DCC en présence d'un acide faible (**Figure II.10**). Le DMSO activé est une espèce oxydante réagissant avec les groupements hydroxyles sans risque de suroxydation en acide carboxylique. Le mode opératoire est inspiré des travaux de Park *et al.*<sup>23</sup> Le produit obtenu est nommé PEG-xk-al, avec x correspondant à la masse molaire du PEG en kg/mol.



**Figure II.10** : Oxydation de Pfitzner-Moffatt appliquée aux extrémités du PEG.

### **Mode opératoire II-3 : Conversion des alcools terminaux en aldéhyde sur un PEG commercial**

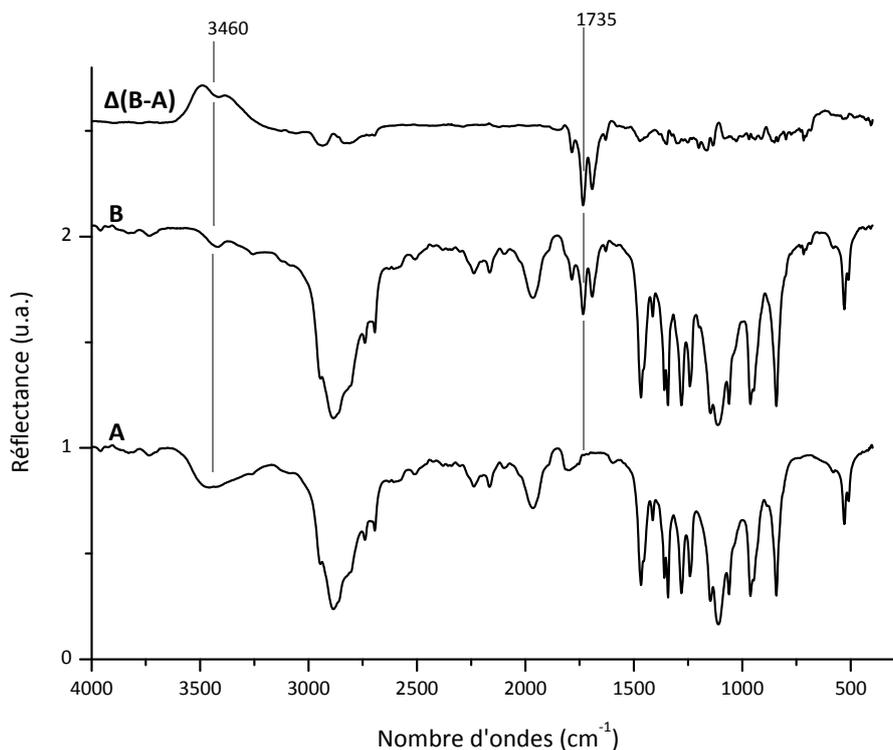
Oxydation des extrémités hydroxyles d'un PEG commercial en aldéhyde : Le PEG ( $\bar{M}_n = 4000 \text{ g.mol}^{-1}$ , Fluka) (50 g, 12.5 mmol, 1 eq.) est dissout dans 65 ml de DMSO. 20 ml de DMSO sont éliminés par distillation sous pression réduite à 80°C afin d'éliminer les traces d'eau contenues dans le solvant ainsi que dans le PEG. Après refroidissement, 50 ml de DCM anhydre sont ajoutés puis le milieu réactionnel est placé sous agitation à 0-4°C dans un bain de glace. La pyridine (2.01 ml, 25 mmol, 2 eq.) puis le TFAA (960  $\mu\text{l}$ , 12.5 mmol, 1 eq.) sont ajoutés au milieu et laissés sous agitation durant 30 min. Le DCC (15.5 g, 75 mmol, 6 eq.) est ensuite ajouté. La réaction se poursuit durant 20 h sous agitation et tout en la maintenant dans le bain de glace. La température est ensuite laissée revenir à l'ambiante.

Purification du PEG-aldéhyde (PEG-4k-al) : La réaction finie, le milieu est placé à nouveau à 0-4°C dans un bain de glace durant quelques minutes afin de faire précipiter toute la dicyclohexylurée formée par le DCC. Le mélange est ensuite filtré sous vide afin d'éliminer la dicyclohexylurée. Un volume de 30 ml de DCM froid est utilisé pour rincer le retentât. Le filtrat est ajouté à 600 ml d'un mélange d'éther de pétrole (PE 60-80°C) / propan-2-ol (4:1) froid afin de précipiter le PEG-4k-al. Celui-ci est récupéré par filtration sous vide. Le PEG-4k-al est à nouveau solubilisé dans 50 ml de DCM avant d'ajouter 200 ml d'éther de pétrole. Le mélange est chauffé à 50-60°C dans un bain d'eau pour faciliter la solubilisation du PEG-4k-al puis laissé à refroidir jusqu'à température ambiante et enfin placé dans un bain de glace avant filtration. Le PEG-4k-al est de nouveau repris dans 100 ml de DCM et le mélange est filtré sous vide afin d'éliminer les traces de dicyclohexylurée potentiellement formés durant la première étape de purification (présence d'eau dans les solvants). Le filtrat est ajouté à 500 ml d'éther diéthylique. Le mélange est placé brièvement dans un bain d'eau à 60°C pour faire fondre le PEG-4k-al puis laissé à nouveau refroidir jusqu'à température ambiante puis finalement placé dans un bain de glace. Le PEG-4k-al est récupéré par filtration sous vide. Après séchage sous vide, le PEG-4k-al est stocké à -20°C (Pesée = 45,5 g, pour un rendement final de 91%).

#### *A.2.2.2 Caractérisation des macromolécules modifiées*

##### **a. Spectrophotométrie infrarouge**

La comparaison entre le spectre infrarouge du PEG-4k et celui du PEG-4k-al permet de mettre en évidence l'apparition d'une bande à 1735  $\text{cm}^{-1}$  pour le PEG-4k-al correspondant au mode d'élongation de la liaison  $\text{C}=\text{O}^{24}$  (**Figure II.11**). L'apparition de cette bande s'accompagne par une grande perte d'intensité de la bande large à 3400  $\text{cm}^{-1}$ , attribuée aux fonctions alcool des extrémités du PEG.



**Figure II.11 :** Spectres infrarouge mesurés en DRIFT du **A** : PEG-4k, **B** : PEG-4k-al,  $\Delta(\mathbf{B-A})$  : Spectre différence B-A.

Cette première caractérisation permet de mettre en évidence qualitativement l'oxydation des groupements hydroxyle en aldéhyde par le Mode opératoire II-3.

### **b. Spectroscopie RMN**

Le spectre en RMN du proton du PEG-4k-al est mesuré sur un spectroscope Bruker à 9,4 Teslas (400 MHz) dans le  $\text{CDCl}_3$  (**Figure II.12**). La présence de fonctions aldéhyde est mise en évidence par le triplet à 9.73 ppm ainsi que le doublet à 4.16 ppm, correspondant respectivement au proton  $\text{H}_3$  et aux protons  $\text{H}_2$ . L'intégration des pics permet d'estimer le rendement de l'oxydation en prenant le signal du squelette à 3,64 ppm en référence. Le signal des protons  $\text{H}_3$  correspond à 1,39 protons au lieu de 2. L'oxydation de l'alcool en aldéhyde se fait donc avec un rendement de 70%. Ce chiffre est confirmé par l'intégration du signal des protons  $\text{H}_2$  donnant 2,86 protons au lieu de 4.

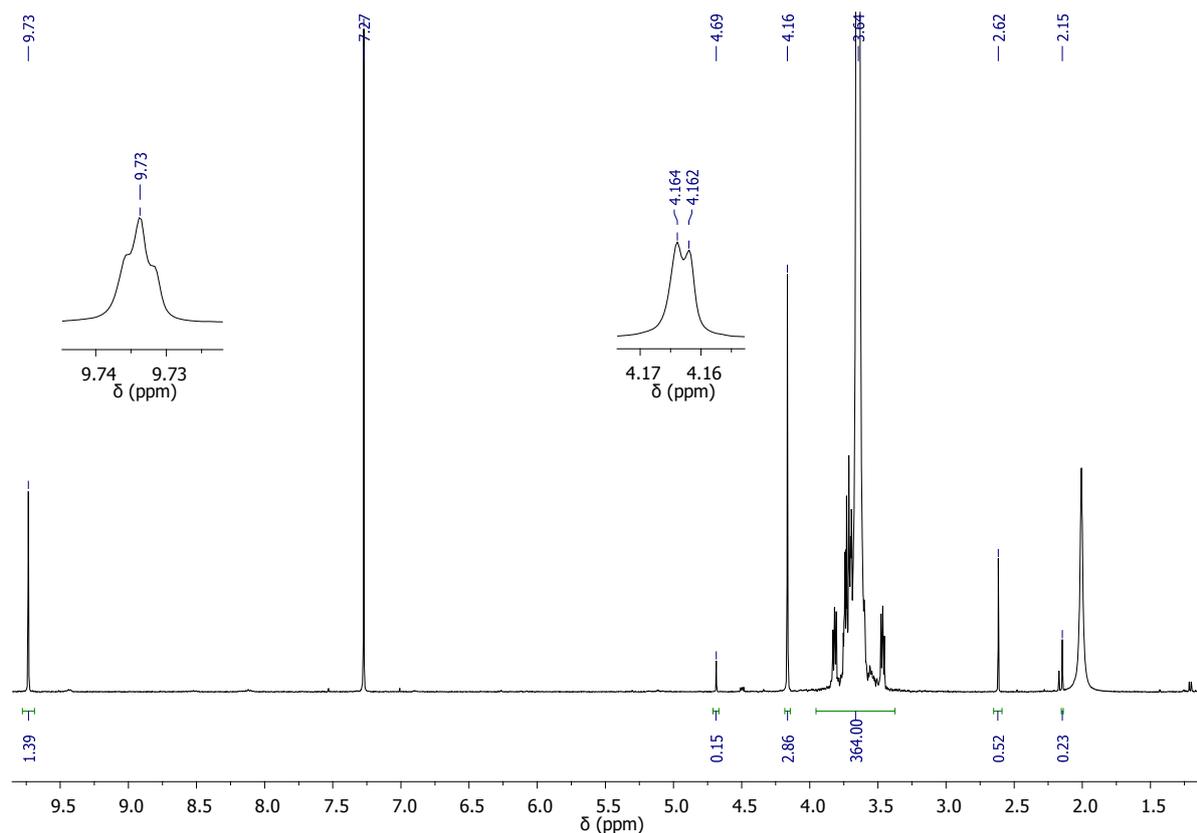


Figure II.12 : Spectre  $^1\text{H}$ -RMN du PEG-4k-al.

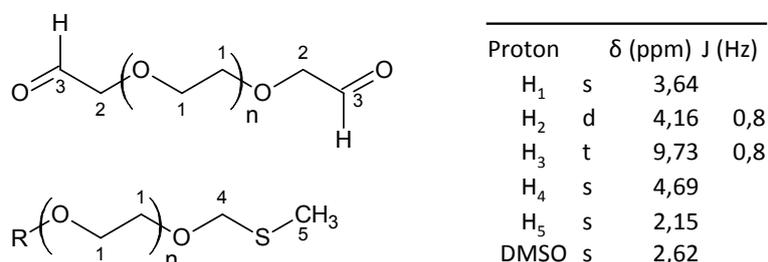
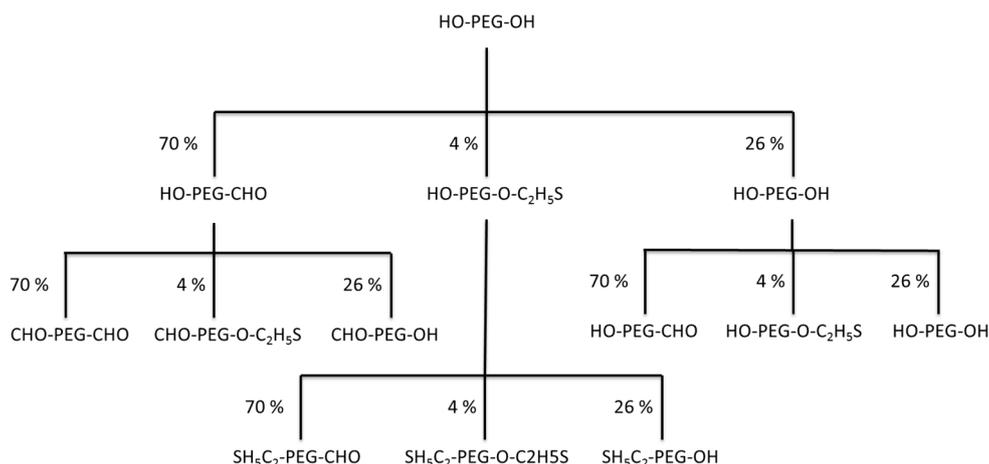


Figure II.13 : Structure des produits obtenus d'après l'analyse RMN.

Une des réactions parallèle à l'oxydation de Pfitzner-Moffatt est la formation de l'éther de methylthiomethyle<sup>20</sup> comme présenté dans la **Figure II.13**. Cette fonction est détectée sur le spectre RMN par la présence d'un singulet à 4,69 ppm et d'un singulet à 2,15 ppm correspondant respectivement aux protons H<sub>4</sub> et H<sub>5</sub>. D'après l'intégration des pics, cette réaction touche 4% des extrémités.

En faisant l'hypothèse que les deux extrémités du PEG réagissent de façon indépendante, il est possible d'estimer la proportion des différentes populations obtenues après l'oxydation (voir **Figure II.14**).



**Figure II.14** : Répartition statistique des différentes populations de PEG fonctionnalisés obtenues.

**Tableau 5** : Répartition statistique des familles de PEG obtenues par l'oxydation de Pfitzner-Moffatt.

Famille de PEG	Proportion (%)
CHO-PEG-CHO	49
HO-PEG-OH	6,76
CHO-PEG-OH	36,4
CHO-PEG-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> S	5,6
HO-PEG-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> S	2,08
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> S-PEG-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> S	0,16

Finalement, malgré un rendement de seulement 70 %, plus de 90 % des macromolécules de PEG mis en jeu pour l'oxydation possèdent au moins une fonction aldéhyde. Quant à la proportion de PEG possédant une extrémité méthylthiométhyl éther pouvant se greffer à la surface de la nanoparticule, celle-ci représente moins de 6 % de la totalité des PEG possédant un aldéhyde.

Cette oxydation a également été réalisée sur des PEG de masses moléculaires différentes, et sur un PEG méthyléther (mPEG). Les différents dérivés de PEG obtenus sont répertoriés dans le **Tableau 6**.

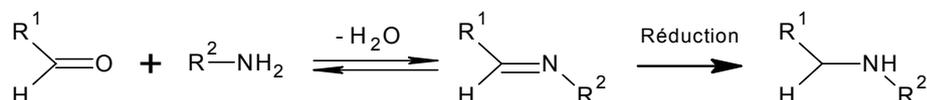
**Tableau 6** : Rendements d'oxydation et de purification obtenue pour les différents PEG étudiés.

	Information fournisseur sur la polydispersité	R oxydation (%)	R purification (%)
PEG-1k	950-1050 g/mol	66	51
PEG-4k	3500-4500 g/mol	70	91
PEG-4,6k	4400-4800 g/mol	72	86
mPEG-5k	$\bar{M}_n = 5000$ g/mol	77	87

Le taux d'oxydation est globalement similaire pour les différents PEG. Le rendement d'oxydation supérieur pour mPEG s'explique par le fait que celui-ci ne possède qu'une fonction alcool par macromolécules alors que les réactifs ont été ajoutés dans les mêmes proportions que pour un PEG classique. Le rendement de la purification du PEG-1k est inférieur à celui obtenu pour les PEG de plus haute masse moléculaire. Ceci s'explique par le fait que la purification et la séparation du PEG se font par précipitation dans un mauvais solvant. Or le PEG-1k à l'état brut se comporte comme une cire du fait de la diminution de la température de fusion du polyéther autour de l'ambiante pour des PEG de bas poids moléculaire (< 1kDa). Il est par conséquent plus difficile à précipiter et filtrer. Afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles, il est nécessaire de travailler avec des milieux concentrés et à basse température (4 °C).

### A.2.3 PEGylation de surfaces aminées de nanoparticules de silice

Le greffage du PEG-al sur les nanoparticules aminées est réalisé par amination réductrice. Le mécanisme de cette réaction entre une amine primaire et un aldéhyde se définit en deux étapes indépendantes (**Figure II.15**). Dans un premier temps, l'amine s'additionne à l'aldéhyde pour former une fonction imine. Puis, cette fonction imine est réduite en amine secondaire par la présence d'un réducteur. La formation de l'imine est une réaction réversible, l'imine est donc en général un composé instable quand les substituants sur le carbone et l'azote sont des hydrogènes ou des chaînes alkyles, limitant de ce fait le rendement de réaction.<sup>25</sup> Le cyanoborohydrure de sodium est un réducteur qui permet la réduction des imines mais pas celle des aldéhydes dans le cas où le pH est compris entre 6 et 8.<sup>26</sup> Son utilisation permet donc une réduction en continue des imines au fur et à mesure de leur formation, ce qui permet de déplacer l'équilibre de formation de l'imine. Cependant ce réactif est très toxique à utiliser car son utilisation libre dans le milieu des produits tels que le HCN ou le NaCN.



**Figure II.15** : Réactions mises en jeu lors de l'amination réductrice.

Afin de s'affranchir de l'emploi du NaCNBH<sub>3</sub>, Abdel-Magid *et al.* ont décrit un procédé d'amination réductrice dans lequel la formation de l'imine puis sa réduction sont dissociées dans le temps.<sup>27</sup> Ce procédé permet l'utilisation du NaBH<sub>4</sub>, peu toxique, qui réduirait les aldéhydes dans la réaction monotope. La réaction réalisée dans le méthanol

présente des rendements comparables à l'amination réductrice réalisée avec le  $\text{NaCNH}_3$ . C'est ce procédé que nous retenons pour greffer les PEG-xk-al à la surface des nanoparticules aminées. De plus, les dispersions de  $\text{NP-SiO}_2\text{-NH}_3^+$  sont stables dans le méthanol.

### A.2.3.1 Greffage covalent du PEG-al sur les nanoparticules aminées

#### **Mode opératoire II-4 : Greffage du PEG-4k-al à la surface des nanoparticules de silice aminées**

*Le PEG-4k-al (1,68 g, 0.42 mmol) est solubilisé dans 5 ml de MeOH anhydre. La dispersion de  $\text{NP-SiO}_2\text{-NH}_3^+$  dans l'éthanol (0,965  $\mu\text{l}$  à 124 g/l, 6  $\text{m}^2$  de surface développée) est ajoutée goutte à goutte sous vive agitation. Après 5 min, 24  $\mu\text{l}$  de  $\text{Et}_3\text{N}$  (172  $\mu\text{mol}$ ) sont ajoutés. Le mélange est laissé sous agitation durant 12 h (soit à température ambiante, soit à reflux à 70°C). 40 mg de  $\text{NaBH}_4$  (1,1 mmol) sont ajoutés et l'agitation se poursuit à température ambiante durant 10 min. 1,1 ml d'HCl 1M (1,1 mmol) sont alors ajoutés. Les nanoparticules subissent un premier lavage par centrifugation à 12 000g durant 30 min dans un mélange EtOH/DCM (5:1) puis 2 lavages par centrifugation dans l'éthanol à 40°C. A la fin des lavages, le culot de particules nommées  $\text{NP-SiO}_2\text{-PEG}$  est redispersé dans 5 ml d'éthanol.*

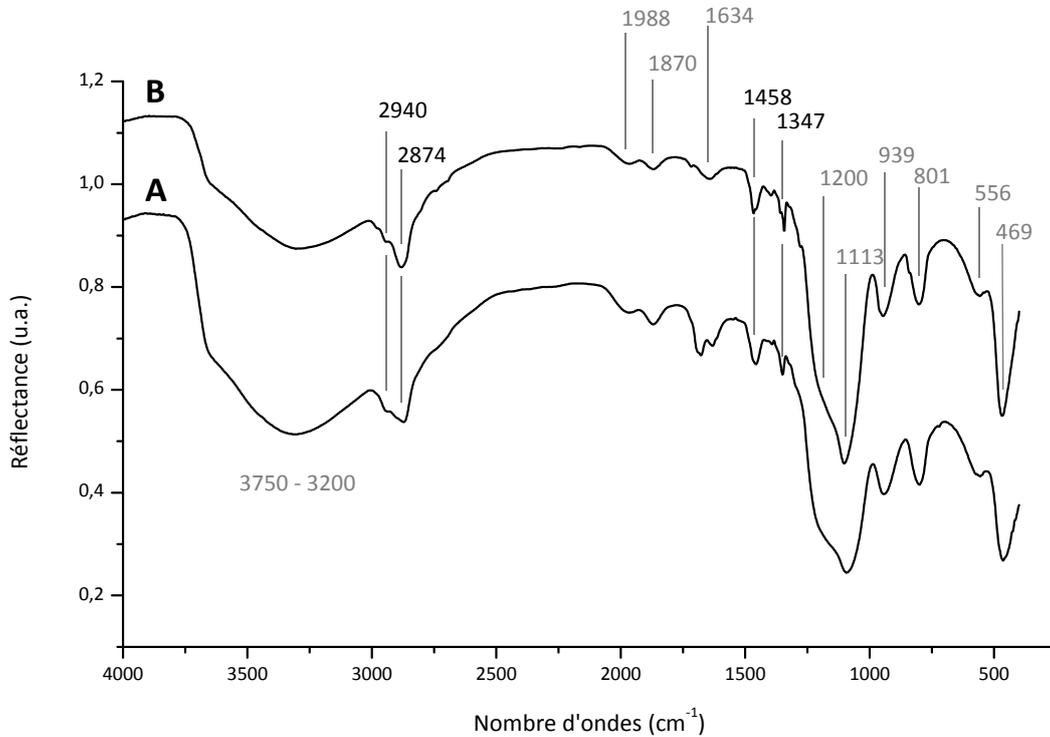
Afin d'éviter la réticulation des nanoparticules, un large excès de PEG-4k-al est ajouté (70  $\mu\text{mol.m}^{-2}$ ). Cette quantité peut faire l'objet d'une optimisation dans le cadre d'études ultérieures. Il est important de ne pas laisser les nanoparticules trop longtemps en présence du  $\text{NaBH}_4$  car il a déjà été observé que la silice pouvait être dissoute par ce composé<sup>28</sup>. L'ajout d'HCl après la réduction des imines permet à la fois de dégrader l'excès de  $\text{NaBH}_4$  et de protoner les fonctions alcoolate obtenues après réaction des aldéhydes avec le  $\text{NaBH}_4$  afin d'obtenir des groupements alcool à l'extrémité des PEG.

Les deux lots de  $\text{NP-SiO}_2\text{-PEG}$  réalisés à température ambiante et à 70°C présentent respectivement un rayon hydrodynamique de 116 nm et 133 nm et un PDI de 0,01 et 0,04. L'augmentation de leur rayon hydrodynamique par rapport aux  $\text{NP-SiO}_2\text{-NH}_2$  est en accord avec le greffage de macromolécules de PEG à leur surface. De plus, les échantillons ont conservé une dispersion en taille étroite, ce qui montre qu'il n'y a pas eu d'agrégation. Cette voie de modification de surface permet de conserver la stabilité colloïdale durant et après la synthèse.

#### **a. Caractérisation du greffage sur les nanoparticules de silice**

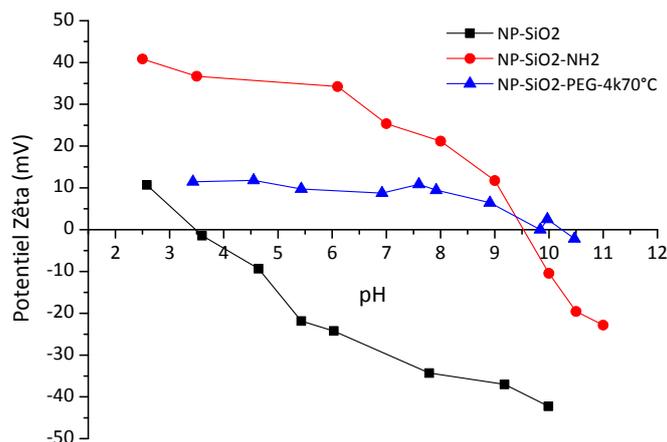
Les spectres infrarouge (**Figure II.16**) de réflexion diffuse des nanoparticules de silice obtenues avec le Mode opératoire II-4 à température ambiante (TA) ou en chauffant à 70°C, montrent deux bandes intenses à 2940 et 2874  $\text{cm}^{-1}$  étant respectivement attribuées aux modes

d'élongation asymétrique et symétrique des liaisons C-H de la chaîne de polymère. Le mode de déformation asymétrique à  $1458\text{ cm}^{-1}$  accompagné du mode de déformation symétrique à  $1347\text{ cm}^{-1}$  de ces liaisons sont également présents.<sup>24</sup> La spectroscopie infrarouge n'est pas suffisamment sensible pour détecter les extrémités sous forme de méthylthiométhyl éther qui sont minoritairement présents.



**Figure II.16** : Spectres infrarouge DRIFT des nanoparticules de silice modifiées avec le PEG-4k-al à **A** : température ambiante, **B** : 70 °C. En gris sont représentés les bandes attribuées à la silice.

Les mesures de zétamétrie sont réalisées sur NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70 °C</sub> et comparées à la silice aminée ainsi qu'à la silice à l'aide d'un zétamètre WALLIS (Cordouan Technologies). La **Figure II.17** montre que le potentiel zêta des nanoparticules aminées est bien inférieur à celui des nanoparticules avant PEGylation.



**Figure II.17 :** Graphe montrant l'évolution du potentiel Zêta en fonction du pH des nanoparticules de silice, silice aminées et PEGylées. Les points sont reliés dans un souci de lisibilité mais n'ont pas de sens physique.

Il est tout à fait cohérent que les particules PEGylées possèdent un potentiel zêta positif dans les conditions acides et neutres car l'amination réductrice aboutie à la formation d'une amine secondaire. La différence de potentiel entre les particules aminées et les particules PEGylées s'explique par le fait que la couronne de macromolécules de PEG éloigne le plan de cisaillement de la surface de la nanoparticule. Ainsi, bien que la surface soit chargée du fait de la présence des amines secondaires formées durant l'amination réductrice, ainsi que de la présence d'amines primaires résiduelles à l'intérieure de la couronne, le potentiel a fortement diminué dans la zone où la mesure est effectuée. Les mesures de potentiel ont été réalisées à des forces ioniques très faibles, car seulement l'acide ou la base ont été ajoutés. A une force ionique physiologique, cette diminution du potentiel zêta sera d'autant plus élevée du fait de la diminution de la longueur de Debye.

En déterminant la composition élémentaire en carbone des NP-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> et des NP-SiO<sub>2</sub>-PEG (TA et 70°C), il est possible d'estimer la densité de greffage en macromolécules de PEG. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 7**.

**Tableau 7 :** Composition élémentaire des NP-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> et des NP-SiO<sub>2</sub>-PEG (TA et 70 °C).

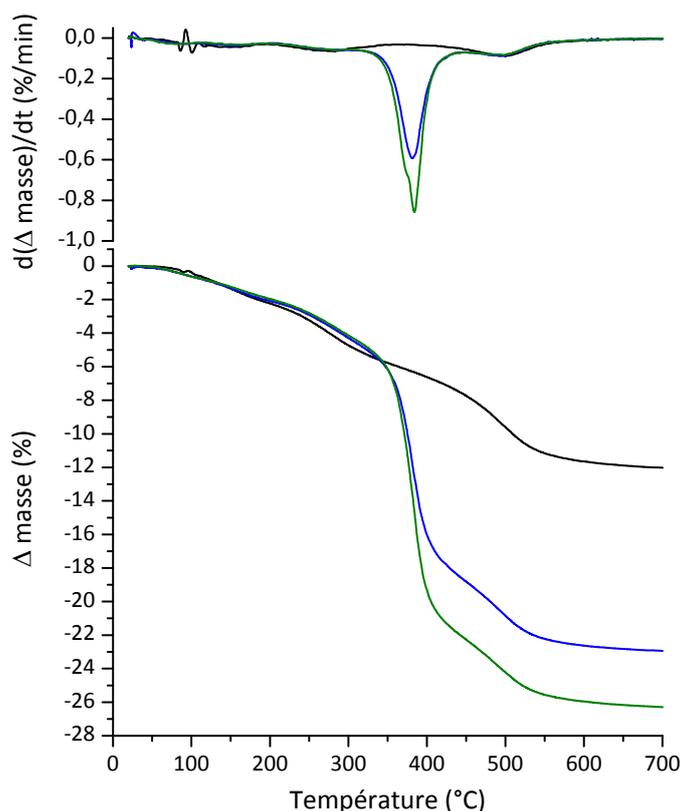
	Composition (% massique)			
	N	C	H	S
NP-SiO <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	0,47	3,12	1,56	0
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4k <sub>TA</sub>	0,40	9,16	2,41	0
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4k <sub>70°C</sub>	0,37	11,6	2,76	0

La densité de greffage du PEG sur les nanoparticules aminées par le Mode opératoire II-4 à température ambiante est estimée autour de  $0,70 \pm 0,07 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ , soit

$0,43 \pm 0,04$  molécules/nm<sup>2</sup>, alors que celle-ci est estimée à  $1,1 \pm 0,1$   $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ , soit  $0,64 \pm 0,07$  molécules/nm<sup>2</sup> pour les particules modifiées à 70 °C.

L'analyse élémentaire ne détecte pas la présence de soufre. Les groupements méthylthiométhyl éther sont présents en trop faible quantité pour être visibles.

La comparaison de la dérivée des pertes de masse en analyse thermogravimétrique entre les nanoparticules NP-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> et les nanoparticules PEGylées permet de montrer que le PEG est dégradé entre 320°C et 440 °C (**Figure II.18**). En effet, les autres évènements sont identiques entre les nanoparticules de silice aminées et les nanoparticules de silice PEGylées. La perte de masse liée à la dégradation du PEG correspond à la différence entre la masse mesurée à 440 °C et celle mesurée à 320 °C à laquelle est retranchée la contribution de la silice aminée sur le même intervalle. Cette contribution est pondérée par le rapport entre les masses mesurées à 700 °C de l'échantillon étudié et la silice aminée.



**Figure II.18** : Courbe d'analyse thermogravimétrique des nanoparticules PEGylées à température ambiante et à 70°C (Noir : NP-SiO<sub>2</sub> ; Bleu : NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>TA</sub> ; Vert : NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub>).

Les densités de greffage pour les échantillons NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>TA</sub> ainsi que NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub> sont respectivement de  $0,40 \pm 0,04$  macromolécules/nm<sup>2</sup> et  $0,51 \pm 0,05$  macromolécules/nm<sup>2</sup>.

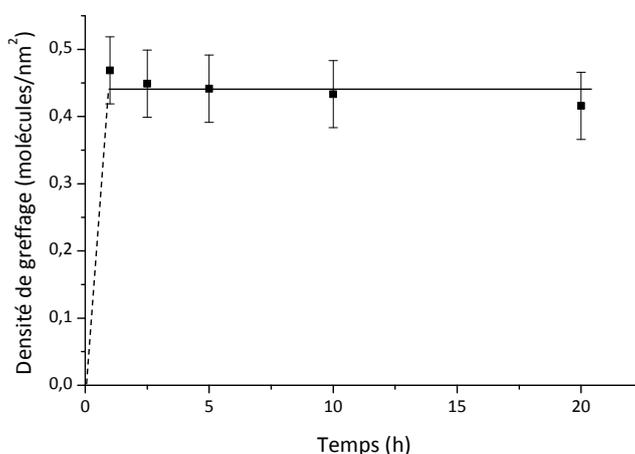
## b. Discussion

Suivant la technique de caractérisation utilisée, les densités de greffage obtenues varient entre  $0,38 \pm 0,04$  molécules/nm<sup>2</sup> et  $0,43 \pm 0,04$  molécules/nm<sup>2</sup> pour les nanoparticules PEGylées à température ambiante et entre  $0,51 \pm 0,05$  molécules/nm<sup>2</sup> et  $0,64 \pm 0,07$  molécules/nm<sup>2</sup> pour les nanoparticules PEGylées à 70 °C. Les résultats obtenus en ATG sont cohérents avec ceux obtenus par analyse élémentaire bien qu'il soit probable que l'ATG soit moins précise du fait des potentiels résidus carbonés après dégradation, ou encore du départ simultané de molécules d'eau. Les deux techniques révèlent que la densité de greffage obtenue à 70 °C est supérieure à celle obtenue à température ambiante. Cette différence est également cohérente avec les résultats de DLS indiquant que les NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70 °C</sub> ont un diamètre hydrodynamique supérieur aux nanoparticules PEGylées à température ambiante (se référer au chapitre I pour la relation entre la densité de greffage et l'épaisseur de la couronne polymère). Les densités de greffage obtenues sont dans les deux cas élevées. Par comparaison, Hamilton-Brown *et al.* ont obtenu sur un substrat de silice aminé par polymérisation plasma par une densité de greffage de 0,26 macromolécules/nm<sup>2</sup> pour des mPEG de 5000 g/mol en utilisant l'amination réductrice dans l'eau en présence de NaCNBH<sub>3</sub> et en se plaçant au point trouble du PEG.<sup>29</sup> L'intérêt de se placer dans des conditions de mauvaise solvation du PEG a été montré par Kingshott *et al.* en 2001.<sup>30</sup> Ils expliquent que le PEG faiblement solvato est plus condensé sur lui-même que le PEG dans un bon solvant, ce qui diminue l'encombrement stérique au niveau de la surface et permet donc d'atteindre des densités de greffages supérieures.

La température  $\Theta$  pour un couple polymère/solvant correspond à la température à laquelle les forces entre les segments moléculaires du polymère, responsables du repliement des chaînes polymère, sont équilibrées par les interactions entre le polymère et le solvant. Cela constitue le stade limite entre la solubilité et la précipitation du polymère. L'augmentation de la température diminue la force des interactions entre le polymère et le solvant.

Le méthanol étant considéré comme moyen à bon solvant du PEG selon les méthodes de détermination utilisées,<sup>31</sup> le polymère se trouve à température ambiante majoritairement sous forme de pelote statistique avec quelques chaînes en hélice.<sup>32</sup> La capacité du méthanol à solubiliser le PEG vient principalement de sa capacité à former des liaisons hydrogènes avec le polymère.<sup>33</sup> La température  $\Theta$  du PEG dans le méthanol est donnée à  $59 \pm 3$  °C.<sup>34</sup> En se plaçant à cette température ou au-delà, la solubilité du polymère diminue ce qui provoque la contraction de la pelote statistique. Le polymère étant plus replié dans ces conditions,

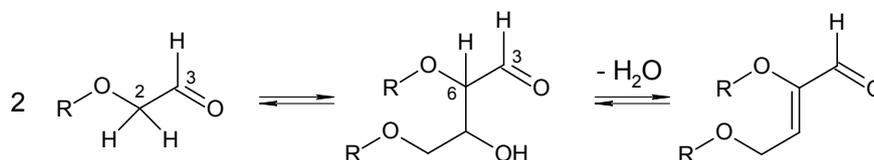
l'encombrement stérique du polymère à la surface est moins élevé. Cet effet permet d'expliquer que la densité de greffage du PEG à 70°C est supérieure à celle obtenue à température ambiante. Cette différence pourrait également être liée à une réaction favorisée par une température élevée. Une dernière hypothèse pourrait être que la chaleur augmente la mobilité des extrémités du polymère au sein de la pelote statistique augmentant ainsi la probabilité de rencontre entre l'aldéhyde du PEG et la surface aminée. Cependant, ces deux dernières hypothèses auraient plus un effet sur la cinétique de greffage que sur la saturation, or les temps de réactions appliqués sont long afin d'atteindre cet état de saturation. Pour s'en assurer, un suivi dans le temps de la densité de greffage est réalisé dans les conditions où la cinétique est la plus lente, c'est à dire à température ambiante. La **Figure II.19** montre que la saturation est atteinte dès la première mesure réalisée à 1 h. La réaction est donc très rapide, et la différence de densité de greffage entre l'échantillon réalisée à température ambiante et celui réalisé à 70 °C ne sont pas liés à des effets cinétiques. Il semble dans la **Figure II.19** que la densité de greffage mesurée décroît de façon monotone avec le temps. Etant donné les incertitudes sur les mesures, aucune conclusion n'est faite à partir de cette observation qui pourrait tout de même indiquer une légère dégradation des macromolécules de PEG dans ces conditions de greffage.



**Figure II.19** : Suivi cinétique du greffage du PEG-4k-al à la surface des nanoparticules aminées à température ambiante.

Kingshott *et al.* observent que le greffage de PEG di-aldéhydes sur des surfaces permet d'obtenir des couches plus épaisses qu'avec des mPEG mono-aldéhyde.<sup>30</sup> Ils expliquent cette observation comme la conséquence d'une condensation aldolique entre un PEG greffé et un PEG en solution (**Figure II.20**). Afin d'étudier ce phénomène dans nos conditions, nous avons fait subir au PEG-4k-al un traitement à 70°C dans le méthanol durant 12 h, similaire aux conditions de greffage. Le spectre <sup>1</sup>H-RMN de ce PEG-4k-al chauffé ne

révèle pas de différence avec le produit avant traitement (spectre non présenté). Ce résultat permet d'écarter la condensation aldolique dans nos conditions. En effet, si celle-ci avait lieu, alors, sur le spectre RMN, le signal des protons nommés H<sub>2</sub> diminuerait, voir disparaîtrait, or expérimentalement, celui-ci conserve la même intensité par rapport au signal de H<sub>3</sub> qu'avant traitement.



**Figure II.20** : Condensation aldolique à partir de PEG-al (La numérotation des atomes est reliée à celle employé en **Figure II.13**).

Cependant, il a été montré que la silice aminée pouvait être un catalyseur de la condensation aldolique.<sup>35,36</sup> Le test effectué ne représente donc pas les conditions réelles. Nous avons donc réalisé la PEGylation sur des nanoparticules de silice aminées à 70°C à partir de deux dérivés du PEG différents de masse moléculaire proche, soit un PEG de 4,6 kDa, soit un mPEG de 5 kDa, tous les deux ayant subi l'oxydation de Pfitzner-Moffatt. Les densités de greffages mesurées pour les deux échantillons sont respectivement de  $0,56 \pm 0,06$  macromolécules/nm<sup>2</sup> et  $0,52 \pm 0,06$  macromolécules/nm<sup>2</sup>. Il n'y a donc pas de différence significative entre les deux dérivés de PEG.

La quantité de PEG dosée correspond donc au PEG greffé directement sur la surface, via les amines et non à du PEG greffé sur des macromolécules de PEG de la couronne via une condensation aldolique, les conditions étant trop douces pour que la réaction se produise.

### A.2.3.2 Extension du procédé de greffage du PEG-al sur les nanoparticules aminées

La formation de l'imine est une réaction réversible. En éliminant un des produits formés, il est possible de déplacer l'équilibre de réaction vers la formation du produit. Il est donc intéressant de pouvoir éliminer les molécules d'eau formées au fur et à mesure de la réaction. Pour cela, la formation d'un azéotrope entre l'eau et un co-solvant, couplée à l'utilisation d'un appareil de Dean Stark pourrait permettre de réaliser cela. Toutefois, le choix du solvant est délicat, car il ne doit pas former d'azéotrope avec le méthanol. L'azéotrope avec l'eau doit également avoir un point d'ébullition plus faible que celui du méthanol. Nous avons donc choisi d'explorer une autre stratégie. Le PEG-4k étant liquide à partir de 50°C environ, nous pouvons envisager de nous en servir à la fois de réactif et de

solvant. Celui-ci ayant un point d'ébullition très élevé, il est possible alors d'éliminer l'eau formé par évaporation sous vide durant la réaction. Cette stratégie a également l'avantage de présenter le PEG dans sa conformation la plus dense.

**Mode opératoire II-5 : Greffage du PEG-4k-al à la surface des nanoparticules de silice aminées en absence de solvant.**

*Le PEG-4k-al (1,68 g, 0,42 mmol) est solubilisé dans 3 ml de MeOH anhydre. La dispersion de NP-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> dans l'éthanol (0,965 ml à 124 g/l, 6 m<sup>2</sup> de surface développée) est ajoutée goutte à goutte sous vive agitation. Après 5 min, 24 µl d'Et<sub>3</sub>N (172 µmol) sont ajoutés. Le méthanol ainsi que l'éthanol sont évaporés sous pression réduite. Le mélange est laissé sous agitation durant 12 h à 70°C sous vide. Une masse de 40 mg de NaBH<sub>4</sub> (1,1 mmol) dissoute dans 1 ml de méthanol anhydre est ajoutée, suivi d'une agitation pendant 10 min supplémentaires. Un volume de 1,1 ml d'HCl 1M (1,1 mmol) est alors ajouté. Les nanoparticules subissent un premier lavage par centrifugation à 12 000g durant 30 min dans un mélange EtOH/DCM (5:1) puis 2 lavages par centrifugation dans l'éthanol à 40°C. A l'issue des lavages, le culot de particules nommées NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>∅ solvant</sub> est redispersé dans 5 ml d'éthanol.*

La principale limitation de ce système se situe au niveau de la viscosité du PEG-4k-al. Ce procédé sera donc difficilement applicable au greffage de PEG de plus haut poids moléculaire. Afin de remédier à ce problème expérimental sans pour autant augmenter l'encombrement stérique du polymère par solvatation des macromolécules, l'ajout d'un PEG de faible poids moléculaire non fonctionnalisé a également été exploré.

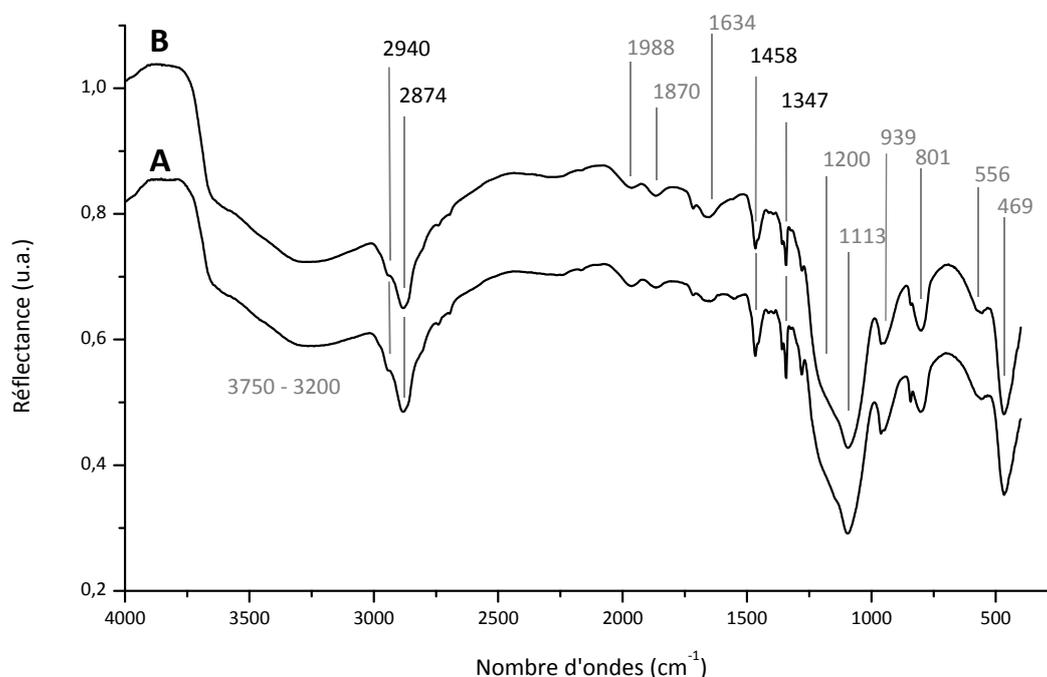
**Mode opératoire II-6 : Greffage du PEG-4k-al à la surface des nanoparticules de silice aminées en présence de PEG liquéfiant (PEG200).**

*Le PEG-4k-al (1,68 g, 0,42 mmol) est solubilisé dans 3 ml de MeOH anhydre. Un volume de 2 ml de PEG (200 g/mol) est ajouté. La dispersion de NP-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> dans l'éthanol (0,965 ml à 124 g/l, 6 m<sup>2</sup> de surface développée) est ajoutée goutte à goutte sous vive agitation. Après 5 min, 8 µl d'Et<sub>3</sub>N (172 µmol) sont ajoutés. Le méthanol ainsi que l'éthanol sont évaporés sous pression réduite. Le mélange est laissé sous agitation durant 12 h à 70°C sous vide. Une masse de 40 mg de NaBH<sub>4</sub> (1,1 mmol) dissoute dans 1 ml de méthanol anhydre est ajoutée et l'agitation se poursuit durant 10 min. Une solution d'HCl à 1 M (1,1 mmol) est alors ajoutée. Les nanoparticules subissent un premier lavage par centrifugation à 12 000g durant 30 min dans un mélange EtOH/DCM (5:1) puis 2 lavages par centrifugation dans l'éthanol à 40°C. A la fin des lavages, le culot de particules nommées NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>PEG200</sub> est redispersé dans 5 ml d'éthanol.*

Les nanoparticules NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>∅ solvant</sub> et NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>PEG200</sub> présentent respectivement des rayons hydrodynamiques de 157 nm et 138 nm avec des indices de polydispersité de 0,01 et 0,04.

Les spectres infrarouge des nanoparticules obtenues après le greffage du PEG sans solvant ou en présence de PEG-0,2k présentent deux bandes intenses à 2940 et 2874 cm<sup>-1</sup> qui

nous le rappelons, correspondent respectivement aux modes d'élongation asymétrique et symétrique des liaisons C-H de la chaîne de polymère. Sont également présents, les modes de déformation asymétrique à  $1458\text{ cm}^{-1}$  et symétrique à  $1347\text{ cm}^{-1}$  de ces liaisons. Cela met en évidence la présence d'une quantité élevée de macromolécules de PEG greffées pour les deux modes opératoires.



**Figure II.21** : Spectres infrarouge DRIFT des nanoparticules de silice modifiées avec le PEG-4k-al **A** : sans solvant, **B** : PEG200. En gris sont représentés les bandes attribuées à la silice.

L'analyse élémentaire révèle une composition riche en carbone pour les nanoparticules modifiées en absence de solvant ainsi que pour celles modifiées en présence de PEG200 (**Tableau 8**). Les densités de greffage du PEG-4k dans ces deux conditions donnent respectivement  $1,4 \pm 0,2$  molécules/nm<sup>2</sup> et  $0,78 \pm 0,08$  molécules/nm<sup>2</sup>.

**Tableau 8** : Composition élémentaire des NP-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, des NP-SiO<sub>2</sub>-PEG<sub>Ø</sub> solvant et NP-SiO<sub>2</sub>-PEG<sub>PEG200</sub>.

	Composition (% massique)			
	N	C	H	S
NP-SiO <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	0,471	3,12	1,56	0
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4k <sub>Ø solvant</sub>	0,306	18,5	3,93	0
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4k <sub>PEG200</sub>	0,361	13,1	2,97	0

Bien que l'ajout de PEG de 0,2 kDa en tant que solvant permette de liquéfier légèrement le milieu réactionnel, nous remarquons que la densité de greffage obtenue est bien

inférieure à celle obtenue sans solvant. Ceci peut être lié à un effet de dilution (d'un facteur de 2,5) du PEG-4k-al par le PEG-0,2k. Cependant, la concentration devrait théoriquement impacter la cinétique de greffage plus que l'état de saturation. Hors il a été montré auparavant que la réaction était rapide par rapport au temps de réaction appliqué. Cette observation peut cependant avoir pour origine un phénomène entropique. En effet, bien que les interactions entre les molécules de PEG-0,2k et les molécules de PEG-4k ne soient pas plus favorables que les interactions entre deux molécules de PEG-4k, la création d'un volume (couronne polymère autour de la particule) dans lequel les molécules de PEG-0,2k sont exclues n'est entropiquement pas favorable. Ces molécules de PEG-0,2k contribuent donc à l'encombrement stérique au sein de la couronne polymère. Ainsi, la densité de greffage obtenue est plus faible que dans le cas où il n'y a seulement que du PEG-4k.

#### A.2.4 Discussion

Dans le **Tableau 9**, les différents échantillons réalisés sont présentés avec leur densité de greffage respectif, déterminé par analyse élémentaire.

**Tableau 9** : Récapitulatif des densités de greffages obtenues en analyse élémentaire pour les différentes conditions.

	Densité de Greffage (macromolécules/nm <sup>2</sup> )	Densité de Greffage (unité monomère/nm <sup>2</sup> )
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-1k <sub>70°C</sub>	1,1±0,1	25
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-1k <sub>∅ solvant</sub>	2±0,2	45
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4k <sub>TA</sub>	0,43±0,04	39
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4k <sub>70°C</sub>	0,63±0,07	57
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4k <sub>∅ solvant</sub>	1,4±0,2	127
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4k <sub>PEG200</sub>	0,78±0,08	71
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4,6k <sub>70°C</sub>	0,56±0,06	59
NP-SiO <sub>2</sub> -mPEG-5k <sub>70°C</sub>	0,52±0,06	59
NP-SiO <sub>2</sub> -mPEG-5k <sub>∅ solvant</sub>	1±0,1	114

Nous remarquons que pour un même mode opératoire, la densité de greffage décroît avec l'augmentation de la masse molaire du polymère greffé. En exprimant les densités de greffage en unité monomère/nm<sup>2</sup>, il est évident de constater que ces valeurs sont très proches pour un même mode opératoire. Ceci est révélateur que ce sont bien les répulsions stériques entre macromolécules de PEG qui limitent la densité de greffage. L'emploi d'une macromolécule de PEG-1k peu encombrante permet d'ailleurs d'atteindre une densité de

greffage de  $2 \pm 0,2$  macromolécules/nm<sup>2</sup> proche de celle des molécules d'EDPS ( $2,1 \pm 0,2$  molécules/nm<sup>2</sup>). Cela laisse penser que le point limitant est, dans ce cas, le nombre de fonctions disponibles et non plus la répulsion stérique entre les macromolécules de PEG.

A notre connaissance, la densité de greffage la plus élevée obtenue par voie covalente sur des surfaces pour des macromolécules de cette taille est de 1,2 molécules/nm<sup>2</sup>. Elle est rapportée par Zdyrko *et al.*<sup>37</sup> Ostaci *et al.* obtiennent également une densité de greffage élevée réalisée par chimie click.<sup>38</sup> Ils obtiennent 0,86 macromolécules/nm<sup>2</sup> avec un dérivé du PEG de 5 kDa. Ces deux résultats ont été obtenus sur les substrats de silicium. Dans la littérature, nous n'avons pas trouvé de densités de greffage élevées sur des surfaces de nanoparticules autre que des nanoparticules métalliques.<sup>14</sup>

### A.3 Etude de la conformation des macromolécules de PEG greffées à la surface des nanoparticules et estimation de l'épaisseur de la couronne polymère

Comme il a été présenté dans le chapitre I, la conformation de macromolécules greffées à une surface est dépendante à la fois de la densité de greffage et de la taille des macromolécules.

La conformation des polymères greffés pour les différents échantillons est rapportée dans le **Tableau 10**.  $D$ , la distance moyenne entre deux points d'ancrage, est déterminé d'après l'Équation I.1. Tous les échantillons obtenus présentent une conformation en brosse.

**Tableau 10:** Résumé des propriétés physico-chimiques des surfaces obtenues pour les différents échantillons.

Echantillon	$\sigma$ (molécules/nm <sup>2</sup> )	$R_f$ du PEG utilisé (nm)	$D$ (nm)	$D/R_f$	Régime
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-1k <sub>70°C</sub>	1,1	2,29	1,08	0,47	Brosse
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-1k <sub>∅ solvant</sub>	2	2,29	0,8	0,35	Brosse
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4k <sub>TA</sub>	0,43	5,33	1,72	0,32	Brosse
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4k <sub>70°C</sub>	0,63	5,33	1,42	0,27	Brosse
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4k <sub>∅ solvant</sub>	1,4	5,33	0,95	0,18	Brosse
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4k <sub>PEG200</sub>	0,78	5,33	1,28	0,24	Brosse
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4,6k <sub>70°C</sub>	0,56	5,81	1,51	0,26	Brosse
NP-SiO <sub>2</sub> -mPEG-5k <sub>70°C</sub>	0,52	6,11	1,56	0,26	Brosse
NP-SiO <sub>2</sub> -mPEG-5k <sub>∅ solvant</sub>	1	6,11	1,13	0,18	Brosse
NP-SiO <sub>2</sub> -Si-mPEG-5k	0,14	6,11	3,02	0,49	Brosse

L'épaisseur de la couche de polymère est déterminée expérimentalement en considérant la différence de diamètres hydrodynamiques, mesurée en DLS, entre les particules avant et après greffage. Cette épaisseur est comparée à la valeur théorique déterminée d'après le modèle de Vagberg *et al.*<sup>39</sup> et l'Équation I.2.

**Tableau 11** : Diamètre hydrodynamique des différents échantillons PEGylés dispersés dans l'eau.

Echantillon	$D_{hydrodynamique}$ (nm)	$PDI = \mu/\Gamma^2$	$LS_{expérimental}$ (nm)	$LS_{théorique}$ (nm)
NP-SiO <sub>2</sub>	78	0,03	/	/
NP-SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	82	0,053	/	/
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-1k <sub>70°C</sub>	113	0,026	15,6	4,2
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-1k <sub>∅ solvant</sub>	114	0,014	15,9	5,1
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG <sub>TA</sub>	116	0,01	16,9	11,7
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG <sub>70°C</sub>	133	0,04	25,3	13,1
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG <sub>∅ solvant</sub>	157	0,012	37,4	16,7
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG <sub>PEG200</sub>	138	0,038	28,1	14,0
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4,6k <sub>70°C</sub>	134	0,034	25,8	15,9
NP-SiO <sub>2</sub> -mPEG-5k <sub>70°C</sub>	113	0,009	15,3	15,2
NP-SiO <sub>2</sub> -mPEG-5k <sub>∅ solvant</sub>	112	0,022	14,5	18,3
NP-SiO <sub>2</sub> -Si-mPEG-5k	193	0,108	55,5	10,2

Comme il a été dit précédemment, les nanoparticules NP-SiO<sub>2</sub>-Si-mPEG-5k présentent une augmentation de leur diamètre qui ne peut pas être uniquement expliqué par la présence de la couronne de polymère. Cette augmentation de diamètre s'accompagne également par une augmentation de l'indice de polydispersité. Les conditions de modification de surface doivent donc être optimisées afin de garantir la stabilité colloïdale durant et après la synthèse.

Pour les autres échantillons, l'augmentation de la densité de greffage s'accompagne également d'une augmentation de l'épaisseur de la couronne de polymère, bien que les valeurs expérimentales déterminées par DLS ne soient pas toujours proches des valeurs théoriques. Les indices de polydispersité mesurés sont semblables à ceux mesurés pour les nanoparticules aminées, ce qui laisse penser que l'état de dispersion n'a pas été perturbé par l'étape de PEGylation. Les épaisseurs expérimentales mesurées ne représentent sûrement pas l'épaisseur réelle car pour les échantillons PEGylés avec le PEG-1k-al, l'épaisseur mesurée est supérieure à la longueur du PEG dans sa conformation la plus étirée, à savoir 8,1 nm.

Les mesures d'épaisseur de couronne réalisées avec le PEG dialdéhyde semblent surévaluées par rapport aux mêmes mesures effectuées avec le mPEG-5k-al. Il est possible que quelques particules soient réticulées par les PEG dialdéhydes malgré l'excès appliqué, ce qui augmenterait alors le diamètre mesuré en DLS. Afin d'éviter cela, il serait intéressant de

travailler à une plus faible concentration en nanoparticule au début du greffage (Pour cela, il serait nécessaire de transférer les particules aminées dans le MeOH et d'utiliser des sols moins concentrés. Les particules sont très stables dans le MeOH, cependant il n'a pas été choisi pour le stockage car il est plus volatil et plus toxique que l'éthanol). Après le début de la réaction, il serait alors possible de reconcentrer l'échantillon par évaporation d'une partie du solvant. Cependant, PDI n'est pas modifiée significativement par rapport aux particules aminées donc la proportion de particules réticulées doit être faible.

Il a été expliqué au cours du premier chapitre que l'adsorption de protéines pouvait avoir lieu, soit directement sur la surface de la nanoparticule (adsorption primaire) soit à travers la couronne polymère (adsorption secondaire) du fait de la présence d'interactions à longue portée, comme les interactions de vdW ou les interactions électrostatiques. Le premier type d'adsorption est limité par la densité de greffage alors que la seconde est réduite avec l'augmentation de l'épaisseur de la couronne polymère. L'épaisseur de cette couronne de l'ordre de la dizaine de nanomètre permet de maintenir les biomolécules à une distance où les interactions électrostatiques sont faibles car il a été dit précédemment que la longueur de Debye en condition physiologique est de l'ordre du nanomètre. Les interactions de vdW sont elles aussi très affaiblies (l'énergie des interactions de vdW entre la nanoparticule et une molécule d'albumine à cette distance est de l'ordre de  $0,01k_B T$ ).<sup>40</sup>

#### A.4 Conclusion

La voie directe permettant de « PEGyler » des surfaces d'oxydes métalliques en une seule étape à partir de produits commerciaux présente le seul avantage d'être rapide et facile à mettre en œuvre. Cependant la densité de greffage obtenue ( $0,14$  macromolécules/nm<sup>2</sup>) est faible pour limiter l'adsorption non spécifique de biomolécules d'après Walkey *et al.*<sup>14</sup> Ceci s'explique par le fait que la surface est rapidement saturée par l'encombrement élevé des macromolécules de PEG. De plus, les PEG silanes commerciaux sont principalement vendus sous la forme de PEG méthylés en bout de chaîne, ce qui limite leur fonctionnalisation ultérieure. La voie indirecte que nous avons développée se révèle, quant à elle, être une voie intéressante et polyvalente bien qu'elle nécessite plus d'étapes. En effet, l'oxydation des extrémités hydroxyles en aldéhydes est compatible avec différentes masses molaires de PEG commerciaux facilement disponibles. Nous avons montré qu'en jouant avec les paramètres de solubilité du polymère mais également en déplaçant l'équilibre de formation de l'imine, il était possible d'atteindre des densités de greffage élevées allant de  $0,4$  à  $1,4$  molécules/nm<sup>2</sup>

pour des macromolécules de 4000 g/mol. De plus, cette stratégie permet d'obtenir des surfaces PEGylées présentant des groupements hydroxyles en extrémité de chaîne. Ces groupements peuvent être mis à profit par la suite pour réaliser une fonctionnalisation ultérieure.

Les macromolécules de polymère greffées à la surface des nanoparticules adoptent une conformation en brosse, ce qui est une condition nécessaire à la répulsion des biomolécules. La voie de modification de surface en deux étapes permet d'obtenir des nanoparticules dispersées, l'état de dispersion ayant été conservé tout au long du procédé.

## **B. Fonctionnalisation de la couronne de PEG**

Cette partie est dédiée à la fonctionnalisation de l'extrémité des macromolécules polymère, étape nécessaire pour le couplage covalent de biomolécules. Cela aura pour avantage de présenter la biomolécule à l'environnement tout en l'éloignant de la surface de la nanoparticule. Les risques de perte d'activité, liés à une dénaturation ou une adsorption irréversible sur la surface de la nanoparticule par exemple, seront donc limités.

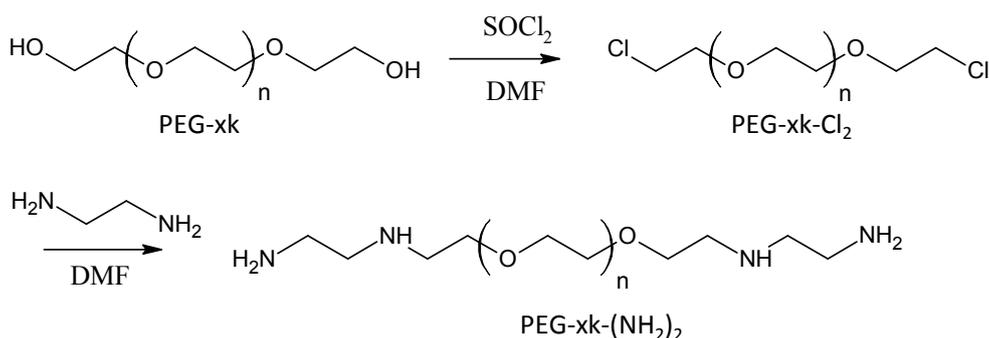
A la suite de l'étape de greffage des macromolécules de PEG, les extrémités sont constituées de fonctions alcools. La chimie sur les alcools en milieu aqueux n'est pas évidente car l'eau est très souvent un réactif compétitif de l'alcool. A l'opposé, la chimie sur les amines en milieu aqueux est très développée, notamment dans le domaine de la biochimie. Nous avons donc choisi de convertir la fonction alcool à l'extrémité du PEG greffé à la surface des nanoparticules en amine primaire.

Afin de réaliser cette fonctionnalisation, il est important de garder à l'esprit qu'elle doit être appliquée sur des terminaisons de macromolécules elles-mêmes supportées par des nanoparticules. Même si, d'un point de vue théorique, cela facilitera les étapes de purification, les conditions de réactions ne devront en aucun cas dégrader les nanoparticules et leur couronne. Il sera également nécessaire de conserver la stabilité colloïdale durant la réaction afin que toute la surface soit accessible. Cela limite donc le choix à des solvants plutôt polaires, mais en condition anhydre car la chimie des alcools est très majoritairement sensible à l'eau.

Afin de faciliter la caractérisation, la validation des conditions de synthèse optimales est dans un premier temps réalisée sur des macromolécules de PEG-4k libres.

## B.1 Amination de macromolécules de PEG libres

La conversion de l'extrémité alcool en amine est réalisée en deux étapes. Dans un premier temps, l'alcool est remplacé par un bon groupe partant : un atome de chlore. Ce chlore est ensuite converti en amine par substitution nucléophile (**Figure II.22**). Ces deux réactions sont réalisées dans le DMF car les nanoparticules sont stables dans ce solvant et qu'il peut facilement être séché afin de répondre aux conditions anhydres des réactions mises en jeu.



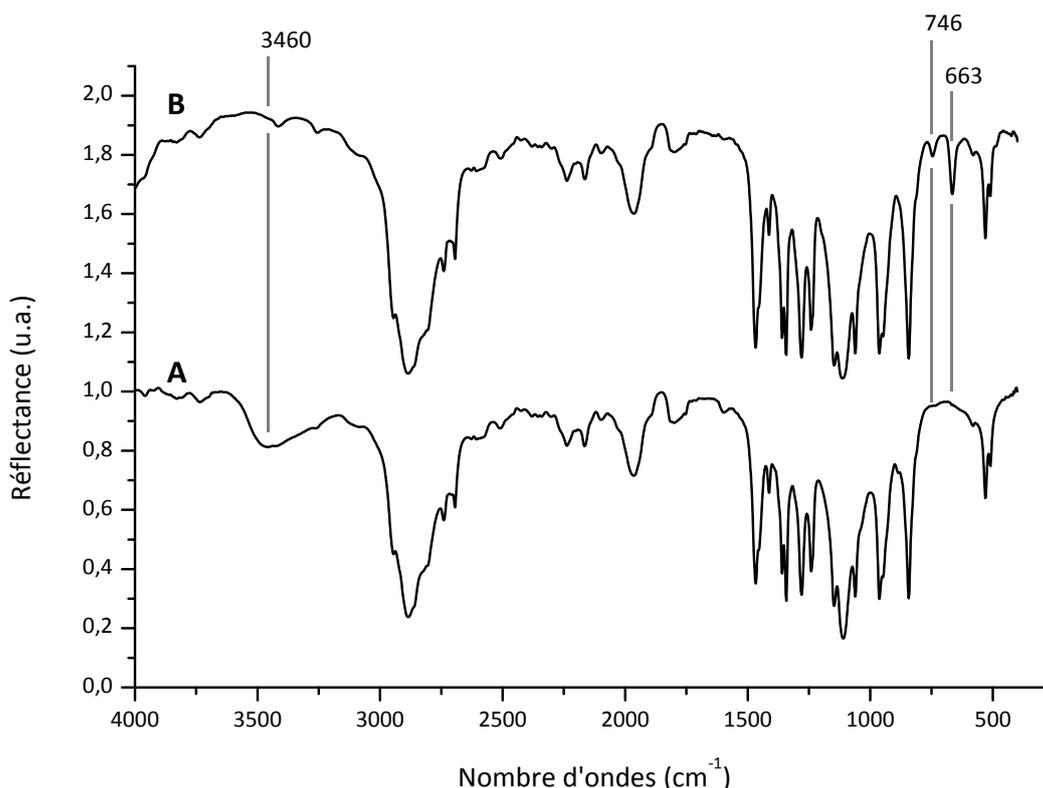
**Figure II.22** : Conversion de l'extrémité alcool de macromolécules de PEG en amine.

### B.1.1 Synthèse du PEG-4k-Cl<sub>2</sub>

La conversion de l'alcool en chlorure d'alkyle est réalisée grâce au chlorure de thionyle dans le DMF à 75°C durant 3 h. Le DMF ne sert pas uniquement de solvant, il permet également de catalyser la réaction.<sup>41</sup>

#### Mode opératoire II-7 : Synthèse du PEG-4k-Cl<sub>2</sub> à partir du PEG-4k

Le PEG-4k-al (5 g, 1,25 mmol, 1 eq.) est solubilisé dans 75 ml de DMF. Un volume de 10 ml de DMF est éliminé par distillation sous vide à 50°C afin d'emporter les traces d'eau contenues dans le solvant et dans le PEG. Le mélange est placé sous agitation dans un bain de glace, puis 0,90 ml de SOCl<sub>2</sub> (12,5 mmol, 10 eq.) sont ajoutés, suivi de 1,0 ml de pyridine (12,5 mmol, 10 eq.). Après 5 min d'agitation, l'ensemble est porté à 75°C durant 3 h. Après refroidissement, le PEG est précipité dans l'éther diéthylique puis récupéré par filtration sous vide. Le retentât est repris dans 20 ml de DCM puis précipité à nouveau dans l'éther diéthylique. Après filtration sous vide, le PEG est séché sous pression réduite afin d'éliminer les résidus d'éther. Un volume de 5 ml de DCM est alors ajouté au PEG puis l'ensemble est filtré sur gel de silice (15 g) en utilisant le DCM comme éluant. Le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. Afin d'obtenir le PEG-4k-Cl<sub>2</sub> sous forme de poudre, celui-ci est fondu en présence de cyclohexane puis laissé refroidir à température ambiante. Le PEG-4k-Cl<sub>2</sub> est récupéré par filtration, puis séché sous pression réduite (Pesée : 2,35 g, rendement : 47 %).



**Figure II.23** : Spectre infrarouge mesuré en DRIFT de A : PEG, B : PEG-Cl<sub>2</sub>.

Le spectre infrarouge présenté en **Figure II.23** montre l'apparition de deux bandes d'absorption dans l'échantillon de PEG-Cl<sub>2</sub>. Ces deux bandes à 746 cm<sup>-1</sup> et 663 cm<sup>-1</sup> sont attribuées aux modes de vibrations de la liaison C-Cl.<sup>24,42,43</sup> De plus, la large bande des liaisons OH à 3460 cm<sup>-1</sup> tend à disparaître, ce qui est en accord avec la conversion des alcools en composé chloré.

Le spectre en RMN du carbone du PEG-4k-Cl<sub>2</sub> présenté en **Figure II.24** confirme la conversion de l'alcool en groupement chlorure. Les pics sont attribués aux différents carbones de la structure du PEG-4k-Cl<sub>2</sub> (**Figure II.25**). Afin d'avoir une idée de l'ordre de grandeur du rendement de la réaction, l'intégration des pics est effectuée. Celle-ci ne peut pas donner un chiffre précis étant donné la faible intensité du signal des carbones d'intérêt par rapport au bruit de la mesure. Le taux de conversion des extrémités alcool en groupements chlore serait d'environ 80 %.

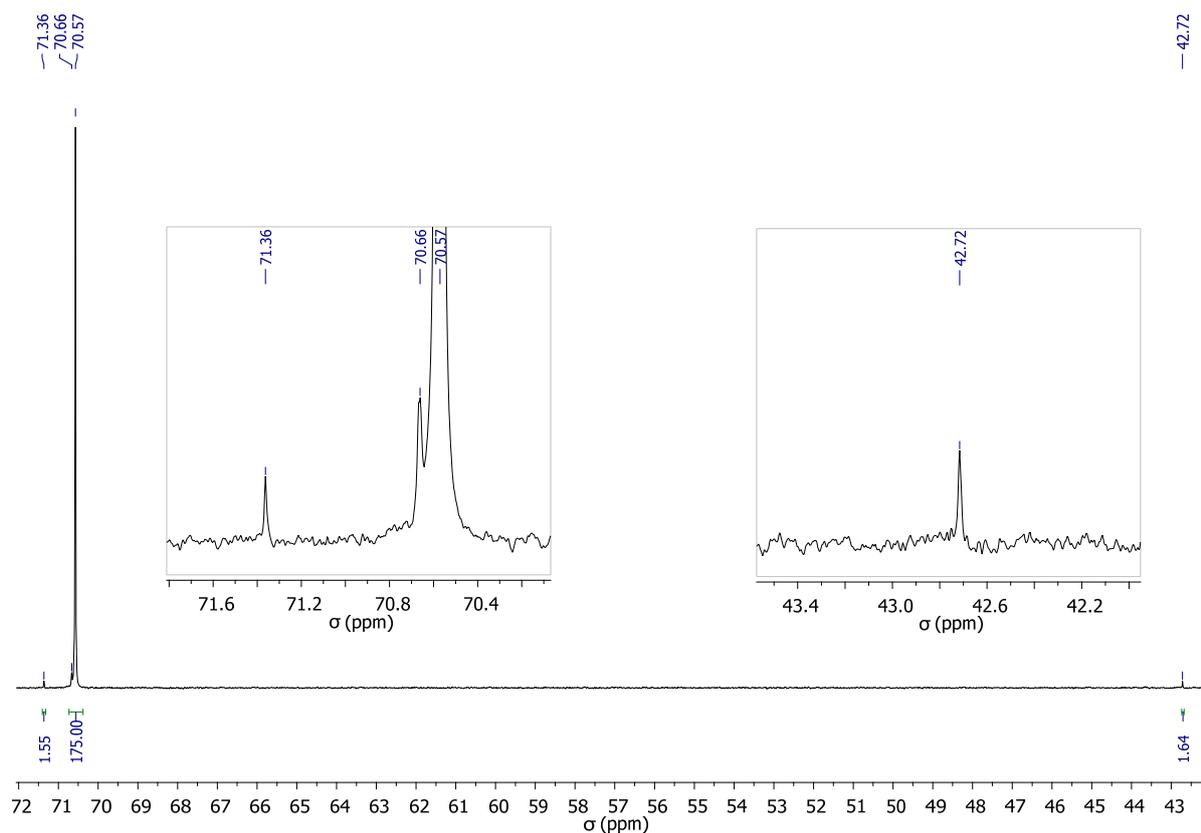


Figure II.24 : Spectre  $^{13}\text{C}$  RMN du PEG-4k-Cl<sub>2</sub>.

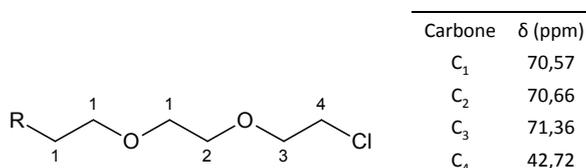


Figure II.25 : Attribution des signaux de  $^{13}\text{C}$  RMN à la structure du PEG-4k-Cl<sub>2</sub>.

La RMN du proton laisse également penser que les extrémités de la macromolécule présentent des chlores (**Figure II.26**). En effet, un double triplet est observé à 3,758 ppm et 3,759 ppm avec une constante de couplage  $J = 6\text{Hz}$ . Ces deux triplets peuvent être attribués aux protons du carbone C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub>.

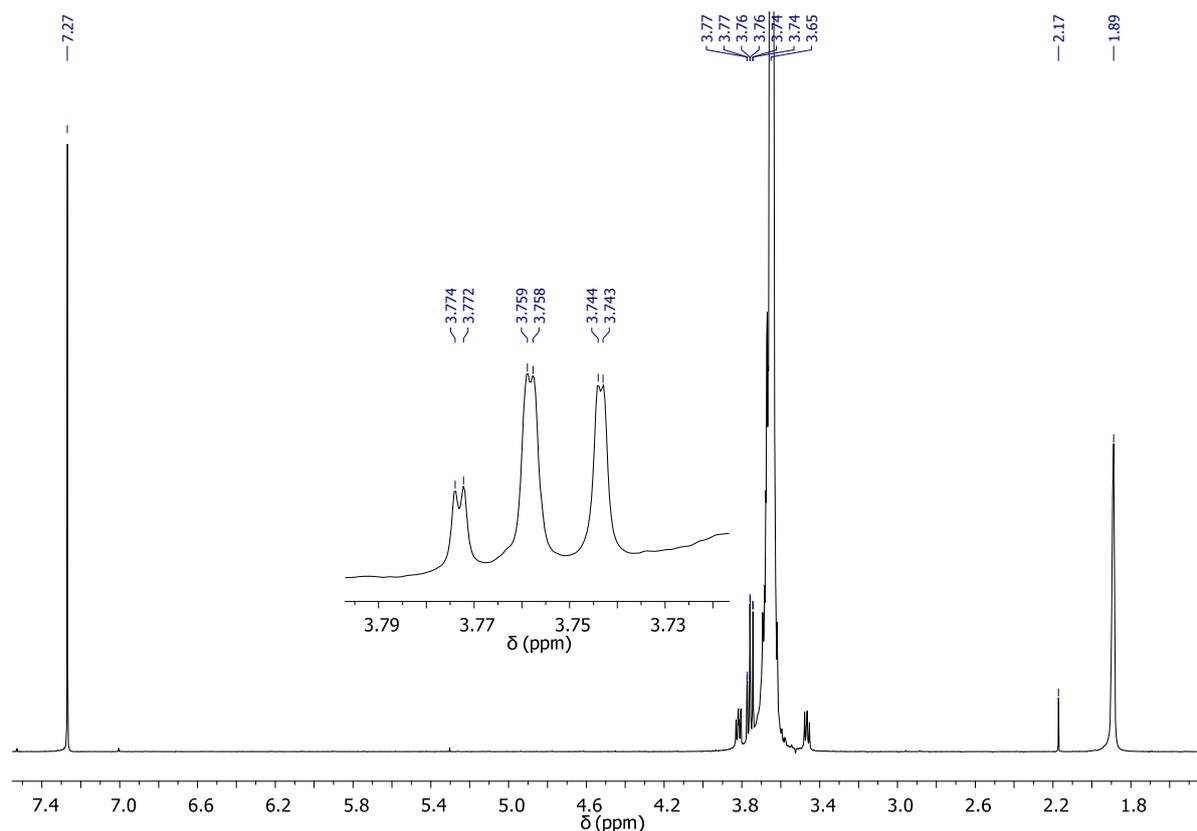
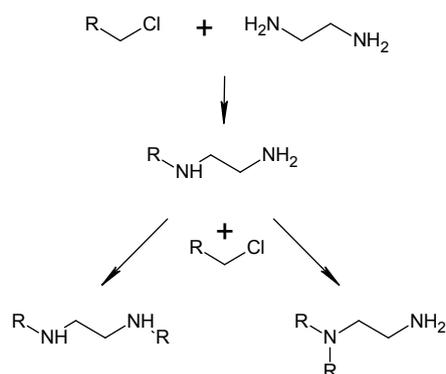


Figure II.26 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du PEG-4k-Cl<sub>2</sub>.

Les différents résultats obtenus avec les caractérisations réalisées sur le PEG-Cl<sub>2</sub> suggèrent que les groupements hydroxyle terminaux sont effectivement remplacés par des chlores.

### B.1.2 Synthèse du PEG-4k-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>

Les macromolécules de PEG bis(amine) sont obtenues par substitution nucléophile du groupement chlore par une molécule d'éthylènediamine dans le DMF. Durant la réaction, l'éthylènediamine doit être ajouté en large excès afin de limiter la réticulation entre deux macromolécules polymères. Cette réticulation peut être due à deux réactions présentées en Figure II.27.



**Figure II.27** : Réactions aboutissant à la réticulation de deux macromolécules de PEG-Cl.

#### **Mode opératoire II-8 : Synthèse du PEG-4k-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> à partir du PEG-4k-Cl<sub>2</sub>**

Le PEG-4k-Cl<sub>2</sub> (500 mg, 0,125 mmol, 2 eq.) est solubilisé dans 10 ml de DMF. La solution est ensuite ajoutée à l'éthylènediamine (334  $\mu$ l, 5 mmol, 40 eq.) sous agitation à température ambiante. Le milieu réactionnel est porté à 70°C durant 12 h sous agitation. A la suite du refroidissement, le PEG-4k-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> est récupéré par filtration après précipitation dans l'éther. Deux cycles de solubilisation dans 2 ml de DCM suivie d'une précipitation dans l'éther sont de nouveau réalisés. Le produit récupéré est séché sous pression réduite. Sur les 0,303 g de produit récupérés, 100 mg sont dissouts dans 2 ml de DCM puis filtrés sur gel de silice (3 g) avec le DCM comme éluant. Le produit est ensuite séché sous vide (Pesée : 23 mg, rendement total 14 %).

Les rendements de purification annoncés dans cette partie peuvent sembler faibles, mais nous rappelons que l'objectif de cette étude n'est pas de mettre au point la purification des dérivés de PEG, mais d'obtenir suffisamment de produit pur pour le caractériser.

Le spectre infrarouge présenté en **Figure II.28** montre l'apparition d'une bande d'absorption à 1673 cm<sup>-1</sup> avec le PEG-4k-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> comparé au PEG-4k-Cl<sub>2</sub>. Cette bande peut être attribuée au mode de cisaillement de la liaison N-H des amines. Cette valeur légèrement élevée laisse penser que les amines sont liées,<sup>24</sup> ce qui peut être expliqué par le fait que le squelette du PEG est un très bon accepteur de liaison H. Cependant malgré la filtration sur silice, il n'est pas impossible que ce signal provienne également de résidus d'éthylènediamine entraînés par le PEG via la formation de liaisons H durant la purification. En revanche, la disparition des modes de vibration des liaisons C-Cl à 663 cm<sup>-1</sup> et 746 cm<sup>-1</sup> suggère que la substitution nucléophile a bien eu lieu. L'étude en RMN-<sup>1</sup>H n'a pas permis de conclure, car malgré la purification sur gel de silice, des impuretés rendaient l'exploitation de la région comprise entre 2 et 3,5 ppm très délicate. Cette caractérisation nécessiterait une purification plus aboutie. Cependant, tout comme avec l'infrarouge, le signal attribué à la présence du chlore sur le spectre RMN du PEG-4k-Cl<sub>2</sub> (double triplet à 3,76 ppm) disparaît sur le spectre RMN du PEG-4k-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.

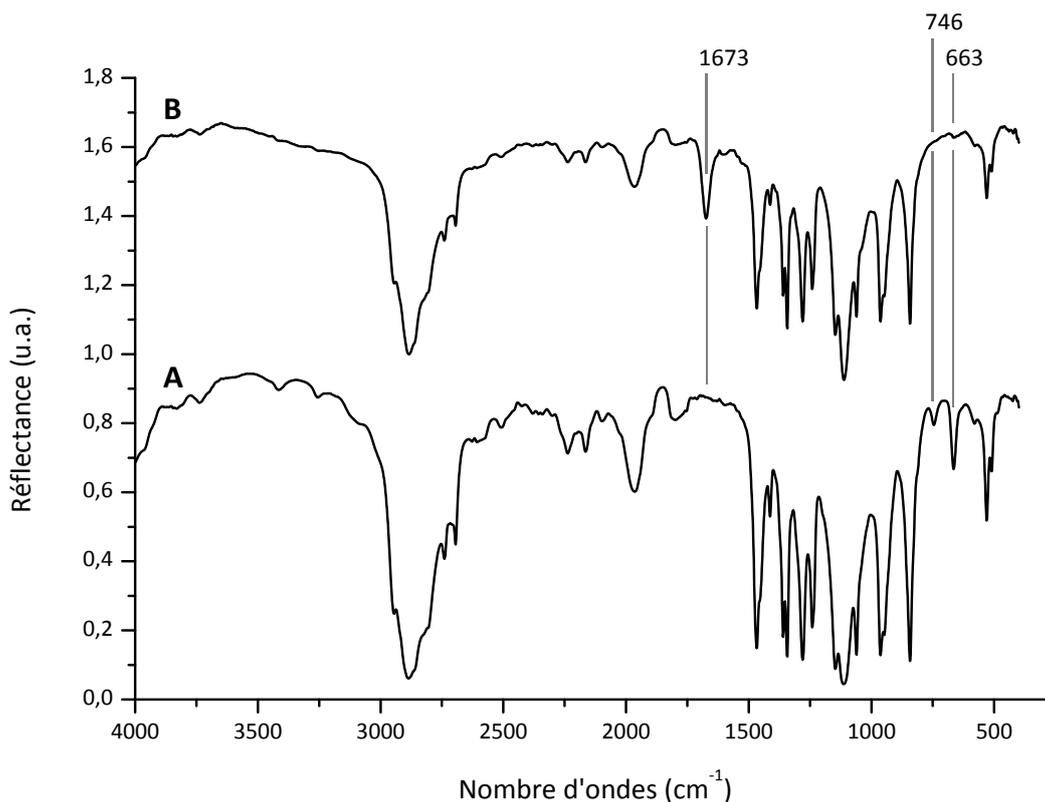


Figure II.28 : Spectres infrarouges mesurés en DRIFT de A : PEG-Cl<sub>2</sub>, B : PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.

## B.2 Application à l'amination de la couronne polymère greffée autour des nanoparticules de silice

Les conditions d'amination mises en place ont ensuite été adaptées aux nanoparticules cœur-couronne précédemment développées. La quantité de fonctions alcools portée par les nanoparticules étant faible, un plus large excès de réactif est ajouté afin de travailler avec des volumes manipulables. De plus, lorsqu'une réaction chimique est réalisée sur une surface, la diffusion des molécules est plus lente que pour celle réalisée dans un volume, ce qui diminue les probabilités de rencontre des molécules devant réagir. L'excès plus élevé de réactif permet de compenser cet état de fait. La purification, quant à elle, est réalisée de façon très simple puisqu'il suffit de centrifuger les nanoparticules pour récupérer le produit. L'excès de réactifs ainsi que les co-produits seront facilement éliminés à la fin de la réaction.

### **Mode opératoire II-9 : Fonctionnalisation par des fonctions amine de la couronne de PEG greffée sur des nanoparticules de silice.**

*Après centrifugation d'une dispersion de NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70</sub>°C (100 mg, 5 m<sup>2</sup>) dans l'éthanol, le surnageant est éliminé et les particules sont redispersées dans 15 ml de DMF. Ensuite, 5 ml*

de solvant sont éliminés par distillation sous pression réduite à 50°C afin de sécher le DMF et d'éliminer les traces d'éthanol. Le milieu réactionnel est placé dans un bain de glace à 4°C puis 30 µl de SOCl<sub>2</sub> (83 µmol/m<sup>2</sup>) sont ajoutés sous agitation, suivi de 8,4 µl de pyridine (21 µmol/m<sup>2</sup>). Après 5 min, l'ensemble est placé à 75°C sous agitation durant 3 h. Après refroidissement, les nanoparticules sont séparées par centrifugation (20 min, 13 000 g) puis lavées une fois avec du DMF par centrifugation. Les nanoparticules sont redispersées dans 10 ml de DMF puis 28 µl d'éthylènediamine (83 µmol/m<sup>2</sup>) sont ajoutés rapidement sous vive agitation. L'ensemble est placé à 70 °C durant 12 h. Après refroidissement, les nanoparticules sont lavées 3 fois dans l'éthanol puis 2 fois dans l'eau par centrifugation à 13 000 g durant 20 min. Les nanoparticules nommées NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub>-NH<sub>2</sub> sont redispersées dans 10 ml d'eau.

Les mesures en analyse élémentaire présentées dans le **Tableau 12** montrent une augmentation de la quantité d'atomes d'azote. En considérant que cette quantité d'azote est apportée par les motifs éthylènediamine greffés à l'extrémité du PEG-Cl, il est possible d'estimer une quantité de PEG-4k-NH<sub>2</sub> par unité de surface, après avoir retranché la fraction apportée par les motifs d'EDPS greffés à la surface de la silice. La densité de PEG-4k-NH<sub>2</sub> serait de 0,6 ± 0,2 fonctions/nm<sup>2</sup> de surface, développée par les nanoparticules de silice. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle déterminée pour le dérivé du PEG-4k dans ces mêmes conditions (0,63 molécules/nm<sup>2</sup>). Ceci montre le succès de cette voie de fonctionnalisation, et renforce également les valeurs de taux de greffage obtenus sur les NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub>.

**Tableau 12** : Composition élémentaire des NP-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, des NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub> et NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub>-NH<sub>2</sub>.

	Composition (%)		
	N	C	H
NP-SiO <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	0,471	3,12	1,56
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4k <sub>70°C</sub>	0,368	11,6	2,76
NP-SiO <sub>2</sub> -PEG-4k <sub>70°C</sub> -NH <sub>2</sub>	0,532	8,95	2,33

En revanche, après amination de la couronne polymère, la composition en carbone a diminuée. Cela sous-entend qu'une partie de la couronne polymère a été légèrement dégradée durant cette fonctionnalisation. Cette diminution de la quantité de PEG en surface est également observée avec les mesures de DLS. En effet après amination des macromolécules de PEG greffées, le diamètre hydrodynamique mesurée est de 115 nm (PDI = 0,05) alors qu'il était de 133 nm (PDI 0,04) avant amination. Des études supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer l'origine de cette dégradation observée. Il serait intéressant dans un premier temps de déterminer si la dégradation a lieu durant la chloration ou durant l'amination. Ensuite, cette dégradation peut avoir différentes origines. Soit le polymère est

clivé, soit il se détache du film polysiloxane, soit encore le film polysiloxane se détache de la nanoparticule. Un début de réponse pourrait être trouvé en déterminant en chromatographie la masse molaire du PEG-Cl<sub>2</sub> ainsi que celle du PEG-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.

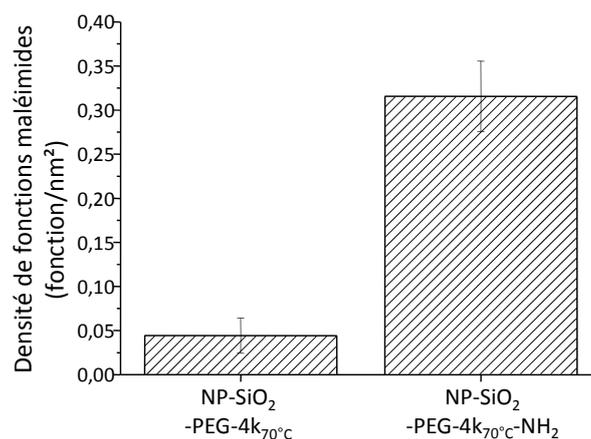
Si cette dégradation était vérifiée, il serait nécessaire, dans le cadre d'une optimisation, de chercher à adoucir les conditions en changeant les paramètres, ou bien en changeant les réactions mises en jeu. Il serait par exemple possible de remplacer l'utilisation du chlorure de thionyle par l'utilisation du chlorure de 4-toluènesulfonyle, qui implique des conditions plus douces.

Afin de vérifier la présence des amines à l'extrémité des macromolécules de la couronne de polymère et de vérifier leur accessibilité pour le greffage ultérieur de biomolécules, le greffage d'un PEG hétérobifonctionnel commercial, comprenant un ester d'NHS et un maléimide (NHS-PEG-3,4k-mal) en position téléchélique, a été réalisé sur les greffons PEG-4k<sub>70°C</sub>-NH<sub>2</sub>. L'ester de NHS est largement utilisé en biologie pour former des liaisons amides avec des biomolécules possédant des amines primaires accessibles. Ce greffage est suivi d'un dosage simple des fonctions maléimides directement accessibles à la surface des NP. Celui-ci est réalisé en retour en utilisant une quantité de β-mercaptoéthanol connue grâce au réactif d'Ellman (ou DTNB pour acide dithionitrobenzoïque).

**Mode opératoire II-10 : Greffage du NHS-PEG-3,4k-mal sur les NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub>-NH<sub>2</sub> et dosage des fonctions maléimide.**

*Une masse de 4,0 mg (en silice) de nanoparticules (NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub> et NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub>-NH<sub>2</sub>) dispersée dans 600 µl de tampon HEPES 20 mM, pH 7,8, est ajouté à 5,6 mg de NHS-PEG-3,4k-mal (Maleimide-PEG-Succinimidyl Valerate, MW 3400 Laysan Bio). Le mélange est laissé sous agitation à l'abri de la lumière durant 2 h. Un volume de 1,2 ml de tampon HEPES 10 mM, pH 7,2, 0,5 mM EDTA dégazé (Tp 2) est ajouté puis l'ensemble est centrifugé 10 min à 17 800 g. 2 autres lavages dans 1,8 ml de Tp 2 sont réalisés puis le culot de particules est redispersé dans 450 µl de Tp 2. Un volume de 50 µl d'une solution de β-mercaptoéthanol à 10 mM dans le Tp 2 est ajouté puis l'ensemble est laissé sous agitation durant 3 h. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 17 800 g afin d'éliminer la silice. Deux fois 150 µl de surnageant sont récupérés afin de doser le β-mercaptoéthanol au DTNB. Un volume de 800 µl de tampon borate 100 mM, pH 8, dégazé, est ajouté aux 150 µl de surnageant puis 50 µl d'une solution de DTNB à 10 mM dans le tampon borate. L'ensemble est laissé à l'abri de la lumière durant 15 min. L'absorbance des échantillons est réalisée à 412 nm en prenant comme référence une solution de 950 µl de tampon borate plus 50 µl de solution de DTNB. Le coefficient d'extinction molaire du sous-produit du DTNB (TNB') a été déterminé dans le tampon borate 100 mM, pH 8, à 13 800 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.*

Comme la **Figure II.29** le montre, la densité de fonctions maléimide présents à la surface des nanoparticules PEGylées et aminées après greffage du NHS-PEG-3,4k-mal est bien supérieure à celle obtenue avec les nanoparticules PEGylées avant amination ( $0,32 \pm 0,04$  contre  $0,04 \pm 0,02$  fonction/nm<sup>2</sup>). Ce résultat met en évidence la présence d'amines accessibles à la surface des nanoparticules PEGylées après amination. Le fait que des maléimides aient été également détectés à la surface des nanoparticules PEGylées avant amination peut avoir deux origines. Une première hypothèse serait que des macromolécules de NHS-PEG-3,4k-mal ont pu se greffer sur les amines primaires résiduelles toujours présentes après la PEGylation en dessous de la couronne de polymère. Cependant, la densité de PEG dans la couronne étant élevée, la probabilité pour qu'une macromolécule de NHS-PEG-3,4k-mal ait réussi à diffuser à travers cette couronne de polymère reste faible. La deuxième explication, plus plausible, découle du fait que les esters de NHS peuvent également réagir avec les fonctions hydroxyle dans une plus faible mesure pour former un ester.<sup>44</sup>



**Figure II.29** : Quantification des maléimides après greffage du NHS-PEG-3,4k-mal sur les nanoparticules PEGylées avant et après amination.

### B.3 Conclusion

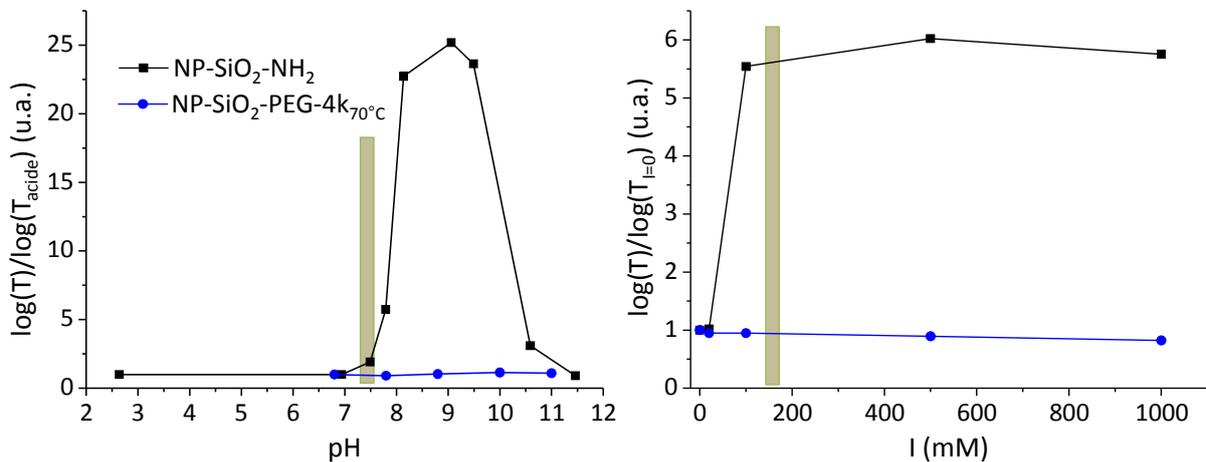
La conversion des groupements hydroxyles présents à l'extrémité des macromolécules de PEG est réalisée en deux étapes. Les conditions réactionnelles ont dans un premier temps été validées sur des macromolécules de PEG libre avant d'être appliquées aux nanoparticules cœur-couronne. Cette réaction délicate à caractériser à la surface des nanoparticules a cependant été indirectement validée à partir du greffage de macromolécules de PEG hétérobifonctionnelles. Cette stratégie de fonctionnalisation de la couronne macromoléculaire de PEG est donc applicable à la conjugaison de biomolécules pour différentes applications.

## C. Etude des propriétés des nanoparticules cœur-couronne

### C.1 Stabilité colloïdale des nanoparticules

La stabilité colloïdale est une condition indispensable pour l'emploi de nanoparticules dans un milieu biologique. La PEGylation doit permettre d'apporter une stabilisation stérique à la dispersion, permettant de rendre la stabilité colloïdale insensible au pH et à la force ionique du milieu, contrairement à des nanoparticules simplement aminées en régime électrostatique.

La stabilité colloïdale des nanoparticules est évaluée en suivant la turbidité de l'échantillon par mesure de transmission à 400 nm afin de se placer à une longueur d'onde fortement diffusée.



**Figure II.30 :** Evolution de la stabilité colloïdale en fonction du pH et de la force ionique (à pH 7,4) suivie par mesure de turbidité. Le cadre vert indique les conditions physiologiques standards.

La **Figure II.30** montre que la stabilité des NP-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70</sub>°C est insensible à la fois au pH et à la force ionique du milieu contrairement aux NP-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> qui s'agrègent à partir de pH 7,5 et au-delà de 20 mM en NaCl. Ces résultats confirment la stabilisation stérique des nanoparticules PEGylées dans les conditions physiologiques.

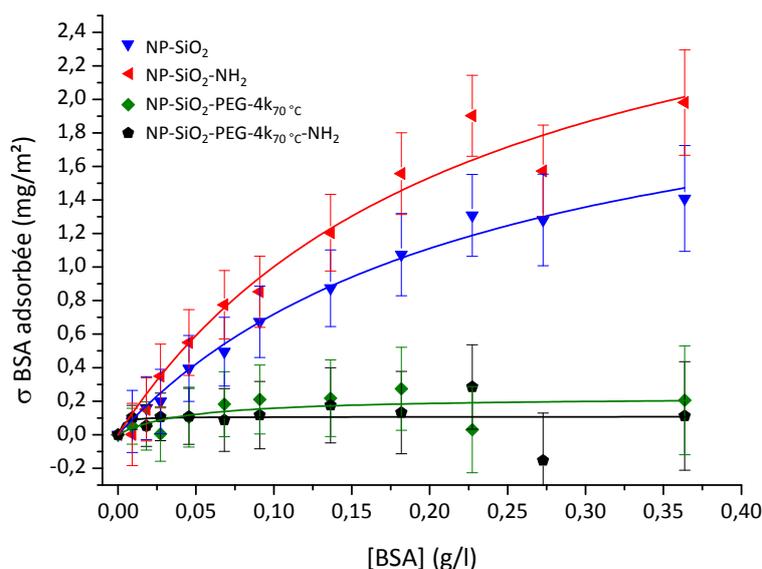
### C.2 Propriété antiadhésive envers les protéines

La passivation des surfaces PEGylées est évaluée en étudiant l'adsorption d'une protéine modèle, la BSA (Bovine Serum Albumin), sur les différentes surfaces de nanoparticules de silice modifiées.

**Mode opératoire II-11 : Adsorption de la BSA à la surface des nanoparticules :**

Un volume de 100  $\mu\text{l}$  d'une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) est préparé à différentes concentrations dans un tampon PBS (phosphate buffered saline). Un volume de 1 ml d'une dispersion de nanoparticules à 1 g/l fraîchement réparée est rapidement ajouté aux solutions de protéines. Après 2 h d'incubation, les nanoparticules sont centrifugées à 25 000 g durant 15 min, puis l'absorbance du surnageant est enregistrée à 280 nm.

La quantité de BSA adsorbée à la surface des nanoparticules est déterminée en mesurant la quantité de BSA restant dans le surnageant (Mode opératoire II-11). La **Figure II.31** présente les isothermes d'adsorption pour les différentes particules testées. Un modèle d'isotherme de Langmuir est appliqué aux résultats expérimentaux. L'adsorption à la surface des nanoparticules de silice aminées est plus importante que sur les nanoparticules de silice. Ceci est cohérent avec le fait que la BSA présente un point isoélectrique à pH 4,7, elle est donc négative à pH 7,4.<sup>45</sup> L'adsorption maximale déterminée par le modèle de Langmuir est d'environ 3 mg/m<sup>2</sup> pour les particules aminées. D'un point de vue théorique, une monocouche de BSA correspondrait à 3,2 mg/m<sup>2</sup>, ce qui conforte les résultats obtenus. L'adsorption sur les nanoparticules PEGylées est quant à elle presque nulle. Alors que l'apport des fonctions amine présentes (majoritairement sous la forme  $-\text{NH}^{3+}$  à pH 7,4) à l'extrémité des macromolécules de PEG aurait pu augmenter l'adsorption à la surface des nanoparticules par la présence de charges positives exposées, la PEGylation conserve en réalité la capacité de répulsion. Ceci peut s'expliquer par le fait que les charges portées par les extrémités sont très mobiles. La surface de la couronne polymère doit être vue comme une interface très diffuse qui ne favorise pas les interactions.



**Figure II.31** : Isotherme d'adsorption de la BSA sur les nanoparticules présentant différentes surfaces dans un tampon PBS.

La méthode de déplétion employée pour déterminer l'adsorption manque de précision du fait de la soustraction entre deux valeurs expérimentales, et ne permet pas de travailler à de fortes concentrations au risque de ne pas distinguer la proportion adsorbée. Cependant, cette méthode a été employée afin de ne pas réaliser de lavages qui déplaceraient la couronne de protéines. En effet, comme il a été dit dans le premier chapitre, la couronne dure présente des temps de désorption longs alors que pour la couronne molle, ces temps sont plus courts et le lavage aurait pour conséquence d'éliminer cette couronne protéique.

## D. Conclusion

Il a été montré lors de la modification de surface par un silane organofonctionnel portant un greffon macromoléculaire de PEG que le greffage était limité à de faibles densités du fait de l'encombrement stérique élevé des macromolécules.

Une nouvelle voie de PEGylation a donc été développée dans l'objectif d'obtenir des densités de greffage plus élevées à la surface de nanoparticules de silice. Cette stratégie en deux étapes permet de dissocier les difficultés liées au greffage du silane, des difficultés liées à l'encombrement stérique des macromolécules. La première étape repose sur les compétences développées au sein du groupe sur la modification de surface d'oxydes métalliques par des silanes organofonctionnels aminés avec une densité d'amine disponible élevée. L'amination réductrice se révèle être une réaction efficace pour le greffage des macromolécules de PEG fonctionnalisées aux extrémités avec des fonctions aldéhydes. De plus, durant cette étape, il est possible de moduler la conformation des macromolécules de polymère et ainsi de diminuer l'encombrement stérique. L'oxydation de l'extrémité des macromolécules commerciales de PEG permet d'obtenir le dérivé aldéhyde en grande quantité et ainsi de travailler avec de larges excès. Les densités de greffage obtenues grâce à cette stratégie en deux étapes sont, à notre connaissance, supérieures à celles rapportées jusqu'à présent sur des nanoparticules d'oxyde métallique pour une stratégie « grafting to ».

Afin de biofonctionnaliser les nanoparticules par greffage covalent, les fonctions alcool présentes à l'extrémité des macromolécules greffées à la surface ont été converties en fonctions amine. Il a été montré que ces fonctions sont disponibles pour réagir en milieu aqueux par amidification avec l'ester d'NHS porté par des macromolécules de PEG bifonctionnelles NHS/mal.

Les premiers tests l'adsorption de protéine réalisés sur la surface des nanoparticules montrent que la PEGylation permet de diminuer largement les interactions entre la

nanoparticule et la BSA utilisée comme protéine modèle. De plus, cette passivation de surface est conservée après amination de l'extrémité des macromolécules. Même si l'étude des interactions entre nanoparticules et biomolécules mériterait à l'avenir d'être poursuivie avec des méthodes biophysiques plus précises, ainsi qu'avec d'autres protéines modèles, la propriété antiadhésive nécessaire au développement de nos applications a été démontrée.

## Références bibliographiques

- (1) Plueddemann, E. P. *Silane Coupling Agents*; Springer US: Boston, MA, 1991.
- (2) Butterworth, M. D.; Illum, L.; Davis, S. S. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2001**, *179* (1), 93–102.
- (3) Kohler, N.; Fryxell, G. E.; Zhang, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (23), 7206–7211.
- (4) Bourlinos, A. B.; Chowdhury, S. R.; Jiang, D. D.; Zhang, Q. *J. Mater. Sci.* **2005**, *40* (18), 5095–5097.
- (5) Cauda, V.; Argyo, C.; Bein, T. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (39), 8693–8699.
- (6) He, Q.; Zhang, J.; Shi, J.; Zhu, Z.; Zhang, L.; Bu, W.; Guo, L.; Chen, Y. *Biomaterials* **2010**, *31* (6), 1085–1092.
- (7) Graf, C.; Gao, Q.; Schütz, I.; Noufele, C. N.; Ruan, W.; Posselt, U.; Korotianskiy, E.; Nordmeyer, D.; Rancan, F.; Hadam, S.; Vogt, A.; Lademann, J.; Haucke, V.; Rühl, E. *Langmuir* **2012**, *28* (20), 7598–7613.
- (8) Baù, L.; Selvestrel, F.; Arduini, M.; Zamparo, I.; Lodovichi, C.; Mancin, F. *Org. Lett.* **2012**, *14* (12), 2984–2987.
- (9) Jo, S.; Park, K. *Biomaterials* **2000**, *21* (6), 605–616.
- (10) Rixman, M. A.; Dean, D.; Ortiz, C. *Langmuir* **2003**, *19* (22), 9357–9372.
- (11) Perro, A. Synthèse et valorisation de particules colloïdales de morphologie et de fonctionnalité de surface contrôlées, Thèse soutenue à l'université Bordeaux I: Bordeaux, 2006.
- (12) Zhuravlev, L. T. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2000**, *173* (1–3), 1–38.
- (13) Gref, R.; Lück, M.; Quellec, P.; Marchand, M.; Dellacherie, E.; Harnisch, S.; Blunk, T.; Müller, R. H. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2000**, *18* (3–4), 301–313.
- (14) Walkey, C. D.; Olsen, J. B.; Guo, H.; Emili, A.; Chan, W. C. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (4), 2139–2147.
- (15) Sofia, S. J.; Premnath, V.; Merrill, E. W. *Macromolecules* **1998**, *31* (15), 5059–5070.
- (16) Unsworth, L. D.; Sheardown, H.; Brash, J. L. *Langmuir* **2008**, *24* (5), 1924–1929.
- (17) Mornet, S. Synthèse et modification chimique de la surface de nanoparticules de maghémite à des fins d'application biomédicales, Thèse soutenue à l'université Bordeaux I: Bordeaux, 2002.
- (18) Reinhardt, N. M. E. Chemical surface modification of silica nanoparticles for the labeling of DNA in lipoplexes, Thèse soutenue à l'université Bordeaux I: Bordeaux, 2013.
- (19) Reinhardt, N.; Adumeau, L.; Lambert, O.; Ravaine, S.; Mornet, S. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (21), 6401–6411.
- (20) Tojo, G.; Fernández, M. *Oxidation of alcohols to aldehydes and ketones a guide to current common practice*; Springer: New York, NY, 2006.
- (21) Harris, J. M.; Struck, E. C.; Case, M. G.; Paley, M. S.; Yalpani, M.; Van Alstine, J. M.; Brooks, D. E. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1984**, *22* (2), 341–352.
- (22) Pfitzner, K. E.; Moffatt, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (19), 3027–3028.
- (23) Park, P.-U.; Kim, S.-N.; Choi, W.-H.; Jang, H.-S.; Lee, G.-S.; Kwon, S.-C. Method for preparing high-purity polyethyleneglycol aldehyde derivatives. US8349969 B2, January 8, 2013.
- (24) Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. *Spectrometric identification of organic compounds*, 7th ed.; John Wiley & sons: New York, NY, 2005.
- (25) Lowry, T. H.; Richardson, K. S. *Mechanism and theory in organic chemistry*; Harper & Row: New York, 1976.
- (26) Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (12), 2897–2904.

- (27) Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (11), 3849–3862.
- (28) Zhang, T.; Ge, J.; Hu, Y.; Zhang, Q.; Aloni, S.; Yin, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (31), 5806–5811.
- (29) Hamilton-Brown, P.; Gengenbach, T.; Griesser, H. J.; Meagher, L. *Langmuir* **2009**, *25* (16), 9149–9156.
- (30) Kingshott, P.; Thissen, H.; Griesser, H. J. *Biomaterials* **2002**, *23* (9), 2043–2056.
- (31) Özdemir, C.; Güner, A. *Eur. Polym. J.* **2007**, *43* (7), 3068–3093.
- (32) Sung, J. H.; Lee, D. C.; Park, H. J. *Polymer* **2007**, *48* (14), 4205–4212.
- (33) Hezaveh, S.; Samanta, S.; Milano, G.; Roccatano, D. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136* (12), 124901.
- (34) Dinç, C. Ö.; Kibarar, G.; Güner, A. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *117* (2), 1100–1119.
- (35) Lauwaert, J.; De Canck, E.; Esquivel, D.; Van Der Voort, P.; Thybaut, J. W.; Marin, G. B. *Catal. Today* **2015**, *246*, 35–45.
- (36) Brunelli, N. A.; Venkatasubbaiah, K.; Jones, C. W. *Chem. Mater.* **2012**, *24* (13), 2433–2442.
- (37) Zdyrko, B.; Klep, V.; Luzinov, I. *Langmuir* **2003**, *19* (24), 10179–10187.
- (38) Ostaci, R.-V.; Damiron, D.; Akhrass, S. A.; Grohens, Y.; Drockenmuller, E. *Polym. Chem.* **2011**, *2* (2), 348–354.
- (39) Vagberg, L. J. M.; Cogan, K. A.; Gast, A. P. *Macromolecules* **1991**, *24* (7), 1670–1677.
- (40) Louguet, S.; Kumar, A. C.; Guidolin, N.; Sigaud, G.; Duguet, E.; Lecommandoux, S.; Schatz, C. *Langmuir* **2011**, *27* (21), 12891–12901.
- (41) Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A. R. *Vogel's Textbook of practical organic chemistry.*, Fifth edition.; Longman Scientific & Technical ; Wiley: London; New York, 1989.
- (42) Liu, W.; Howarth, M.; Greytak, A. B.; Zheng, Y.; Nocera, D. G.; Ting, A. Y.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (4), 1274–1284.
- (43) Wang, P.; Tan, K. L.; Kang, E. T.; Neoh, K. G. *J. Mater. Chem.* **2001**, *11* (12), 2951–2957.
- (44) Miller, B. T.; Collins, T. J.; Rogers, M. E.; Kurosky, A. *Peptides* **1997**, *18* (10), 1585–1595.
- (45) Salgin, S.; Salgin, U.; Bahadir, S. *Int J Electrochem Sci* **2012**, *7*, 12404–12414.



Chapitre III. Synthèse et  
biofonctionnalisation de nanoparticules  
inorganiques destinées à des  
applications biotechnologiques ou  
biomédicales



Ce chapitre est consacré au développement d'outils nanométriques pour les applications biologiques suivantes :

- Extraction par magnétophorèse de vésicules extracellulaires contenues dans un fluide biologique.
- Diagnostic de l'athérosclérose *in vivo* par imagerie à l'aide de marqueurs multimodaux.
- Marquage de tumeurs par imagerie de fluorescence à différentes échelles (de la cellule au petit animal).

Ces différents sujets d'étude ont pour objectif commun l'établissement d'une stratégie de modification chimique de surface des nanoparticules. Comme il a été dit dans le premier chapitre, bien que les propriétés physiques de la nanoparticule soit dictées par l'application (magnétisme ou fluorescence), c'est l'interface entre la nanoparticule et l'environnement qui gouverne les propriétés biologiques des nano-objets. La surface doit être préparée afin d'accueillir les biomolécules dans les meilleures conditions possibles afin d'optimiser la propriété de reconnaissance des cibles biologiques.

## **A. Synthèse et biofonctionnalisation de supraparticules colloïdales destinées à l'extraction par magnétophorèse de vésicules extracellulaires circulantes**

### **A.1 L'extraction par magnétophorèse d'objets biologiques**

L'extraction magnétique consiste à mettre à profit la mobilité magnétophorétique d'objets possédant un moment magnétique suffisant sous l'effet d'un gradient de champ magnétique afin de les isoler du milieu d'extraction. Cette technique apparue dans les années 1970 et qui permet de séparer sélectivement des biomolécules et est largement utilisée de nos jours pour l'extraction de cellules, de protéines et d'acides nucléiques.<sup>1</sup>

Pour séparer un objet biologique magnétiquement, il est nécessaire que la force magnétique exercée par la ou les particule(s) fixé(es) à l'objet soit suffisante pour contrebalancer les forces opposées liées à la viscosité du milieu, mais également à la gravité ainsi qu'à la diffusion (**Figure III.1**).

La force exercée par une particule magnétique sous un champ magnétique est donnée par la relation suivante :<sup>1,2</sup>

$$F_m = \frac{V_p \Delta\chi}{\mu_0} (B \cdot \nabla) B$$

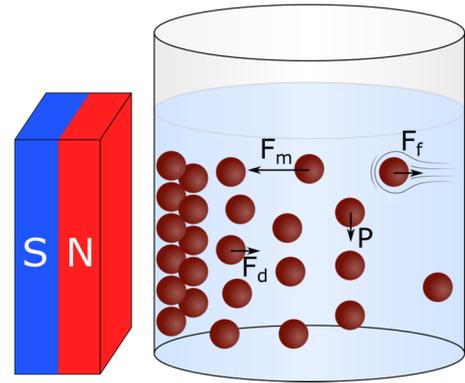
Avec :

$\mu_0$  : perméabilité du vide ( $4\pi \cdot 10^{-7}$  T.m.A<sup>-1</sup>)

$V_p$  : volume de la particule magnétique (m<sup>3</sup>)

$\Delta\chi$  : différence entre la susceptibilité de la particule et celle du milieu (sans dimension)

$B$  : champ magnétique appliqué (T)



**Figure III.1** : Représentation schématique des forces exercées sur les particules magnétiques dispersées sous un champ magnétique.  $F_m$  : force magnétique,  $F_f$  : force de friction,  $F_d$  : force de diffusion,  $P$  : Poids.

Le facteur  $(B \cdot \nabla) B$  indique que la force magnétique exercée par la particule est proportionnelle à l'intensité du champ magnétique mais également au gradient de champ que la particule subit. Pour un matériau donné, il existe donc trois moyens de jouer sur la force magnétique exercée par la particule : soit en faisant varier le volume de la particule, soit en jouant sur la force du champ magnétique, soit en jouant sur le gradient de champ.

Dans un milieu visqueux, le déplacement de la particule engendre une force de friction s'opposant au déplacement. Cette force est définie par la relation suivante :<sup>3</sup>

$$F_f = -6\pi r \eta v$$

Avec :

$r$  : rayon de l'objet en mouvement (objet biologique + particules magnétiques) (m)

$\eta$  : viscosité du milieu (Pa.s)

$v$  : vitesse de déplacement de la particule en mouvement (m.s<sup>-1</sup>)

Quand  $F_m + F_f = 0$ , la vitesse de déplacement de l'objet à extraire est constante. Cette vitesse critique nommée  $v_c$  est définie par la relation suivante :

$$v_c = \frac{V_p \Delta\chi}{6\pi r \eta \mu_0} (B \cdot \nabla) B$$

Dans le cas de particules de diamètre nanométrique, les effets de diffusion deviennent importants. En effet, la séparation magnétique implique une concentration locale des objets

extraits pouvant provoquer une force de diffusion s'opposant à la force magnétique. Il est possible de faire une analogie avec les équilibres de sédimentation observés en centrifugation analytique. Ce phénomène est à éviter dans le cas des séparations magnétiques car si un équilibre est atteint entre la force magnétique et les forces de diffusion alors l'opérateur ne sera pas capable de réaliser une séparation correcte étant donné qu'une partie des objets ciblés reste en suspension dans le milieu.

Pour que les particules magnétiques puissent être séparées puis redispersées dans un milieu d'élution, ou si plusieurs cycles de séparation sont nécessaires, alors elles ne doivent pas présenter de « mémoire magnétique ». En effet, après exposition des matériaux ferro- ou ferrimagnétiques à un champ magnétique, ceux-ci conservent une aimantation rémanente après la disparition de ce champ. Ces matériaux sont de fait difficiles à utiliser pour l'extraction car après exposition à un champ magnétique, les particules restent attirées les unes aux autres par les interactions dipolaires magnétiques, les rendant difficiles à redisperser. Afin d'éviter cela, le matériau ne doit pas présenter d'aimantation rémanente. Les matériaux paramagnétiques présentent cette propriété car ils possèdent une aimantation directement proportionnelle au champ magnétique appliqué, cependant leur réponse au champ demeure très faible ( $10^{-6} < \chi < 10^{-1}$ ) les rendant inutilisables pour l'extraction magnétique.<sup>2</sup> Les matériaux ferro- ou ferrimagnétiques possèdent quant à eux des susceptibilités magnétiques élevées, mais présentent également un moment magnétique rémanent. Cependant, en diminuant la taille de particules ferro- ou ferrimagnétiques en dessous d'un diamètre critique, leur moment magnétique est constamment réorienté par l'agitation thermique  $kT$ , ce qui donne d'un point de vue macroscopique des particules ne possédant pas d'aimantation rémanente. Pour expliquer sommairement ce phénomène, il est nécessaire de revenir sur l'origine de l'aimantation rémanente présente dans les matériaux ferro- ou ferrimagnétiques. Ces matériaux sont constitués de domaines magnétiques séparés par les parois de Bloch au sein desquelles après aimantation le moment magnétique à l'échelle du domaine reste orienté dans une direction de facile aimantation de par la présence d'une énergie d'anisotropie  $E_a$ . Cette énergie est définie par la relation  $E_a = KV$ , avec  $V$  le volume du domaine magnétique et  $K$  la constante d'anisotropie. Si l'énergie thermique est supérieure à cette énergie d'anisotropie, alors le moment magnétique du domaine est réorienté constamment de façon aléatoire. Il est possible d'atteindre cette condition pour une particule monodomaine d'un matériau donné si le volume de la particule est suffisamment petit pour que  $E_a$  devienne inférieure à  $kT$ . Ce comportement est nommé superparamagnétisme de Néel. Le terme « superparamagnétisme » provient du fait que le matériau présente la propriété du

paramagnétisme en absence de champ, mais possède une réponse au champ magnétique beaucoup plus élevé que les matériaux paramagnétiques. Cette propriété étant fonction du rapport entre  $KV$  et  $kT$ , il est possible de trouver une température, dite de blocage, en dessous de laquelle la particule retrouve ces propriétés ferro- ou ferrimagnétique. Le diamètre critique de la particule est fonction de la composition chimique du matériau et varie entre 1 et 30 nm.<sup>2</sup>

Dans le cas où les particules sont dispersées dans un fluide, un autre phénomène peut être à l'origine d'une suspension colloïdale présentant des propriétés superparamagnétiques alors que  $KV > kT$ , c'est le superparamagnétisme extrinsèque. Celui-ci s'explique par le fait que les particules en suspension subissent le mouvement brownien et notamment la diffusion rotationnelle, réorientant de façon aléatoire les moments magnétiques permanents des particules.

Pour résumer les notions de magnétisme abordées, dans un champ magnétique donné, la force magnétique exercée par la particule est proportionnelle à son volume, alors que les propriétés de superparamagnétisme sont observées pour des particules présentant un faible volume.

Pour extraire un l'objet biologique avec des nanoparticules superparamagnétiques de petite taille, celui-ci doit offrir une grande quantité de site de liaison afin de compenser le faible volume de la nanoparticule magnétique par le nombre de particule sur l'objet. Dans le cas contraire, la force magnétique serait trop faible pour contrebalancer les forces opposées à l'extraction (**Figure III.1**). A l'opposé, les nanoparticules de grand diamètre offrent une faible surface développée, rapidement saturée par les objets à extraire. De plus, pour une même quantité de matériau magnétique, la probabilité que les grandes particules rencontrent les objets biologique est plus faible d'avec de petites particules car la matière est moins bien répartie dans le milieu et les diffusions sont plus lentes. Le choix de la taille de la particule d'extraction est le résultat d'un compromis entre ces deux classes d'objets.

Une solution permettant d'obtenir des particules superparamagnétiques tout en présentant grand diamètre consiste à assembler des nanoparticules unitaires superparamagnétiques en une supraparticule colloïdale (SPC).<sup>1,2</sup> Pour optimiser le rapport entre la surface développée et le volume de matériau magnétique, il est nécessaire de posséder des supraparticules avec une composition élevée en matière magnétique. Actuellement, les supraparticules disponibles pour l'extraction magnétique utilisent des polymères en tant que matrice pour maintenir les nanoparticules entre elles. Selon les techniques utilisées, des supraparticules de 80 nm à plusieurs micromètres avec des compositions en matière magnétique de 7 % à 85 % en masse sont obtenues.<sup>1</sup> Etant donnée la densité élevée des

matériaux magnétiques (4,87 pour la maghémite) comparée à celle des polymères, le pourcentage volumique n'est pas si élevé. Récemment, Grass *et al.* ont développé des nanoparticules de cobalt d'environ 40 nm de diamètre stabilisées chimiquement par une écorce de carbone et stabilisées colloïdalement par des polyélectrolytes.<sup>4,5</sup> Elles sont maintenant disponibles commercialement pour l'extraction.

Dans le cadre de l'extraction de vésicules extracellulaires, qui sont des objets très hétérogènes dans les milieux variés, nous choisissons de développer un système totalement modulable afin de pouvoir facilement l'adapter en cas de besoin, sans avoir à redévelopper tout un nouveau système.

Actuellement différentes stratégies sont à disposition pour la préparation de SPC magnétiques.<sup>6-9</sup> Celles-ci peuvent être réparties en deux voies générales : une voie dans laquelle la synthèse et l'assemblage se font simultanément, et une voie où les nanoparticules sont dans un premier temps synthétisées, puis assemblées par la suite. Bien que la synthèse directe de SPC magnétiques soit une voie rapide, elle permet difficilement d'optimiser à la fois le diamètre des particules et les propriétés magnétiques de la particule. Nous avons donc choisi dans un premier temps de synthétiser les nanoparticules magnétiques puis de les assembler dans un second temps à l'aide d'une stratégie permettant de faire varier facilement le diamètre des SPC.

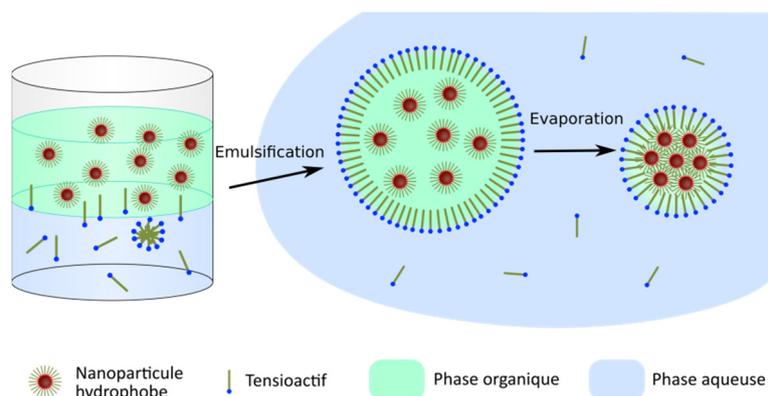
Cet assemblage doit être robuste, et résister à différents milieux, notamment pour faciliter la mise en place des modifications chimiques nécessaires à sa fonctionnalisation. Afin de répondre aux problématiques de stabilité colloïdale, de gestion des interactions non spécifique ainsi que pour réaliser la biofonctionnalisation des SPC, le greffage de macromolécules de PEG à la surface des colloïdes développée dans le chapitre précédant sera transféré sur ces nano-objets.

## A.2 Synthèse de supraparticules colloïdales superparamagnétiques

Les nanoparticules de maghémite sont synthétisées d'après la méthode mise au point par Massart,<sup>10</sup> et maîtrisée au sein du laboratoire.<sup>11</sup> Cette synthèse ainsi que la caractérisation ferrofluide sont présentée en annexe n° 4.

### A.2.1 Assemblage de nanoparticules magnétiques sous forme de supraparticules colloïdales induit par évaporation d'une émulsion

La stratégie retenue pour l'assemblage des nanoparticules magnétiques unitaires est l'assemblage induit par évaporation d'une émulsion, initialement développée par Li *et al.*<sup>12</sup> Celle-ci est basée sur la formation d'une émulsion huile-dans-eau. Dans un premier temps, les nanoparticules à assembler doivent être dispersées dans un solvant organique de bas point d'ébullition. La phase organique est à son tour dispersée dans une phase aqueuse en présence de tensioactif par agitation ou sonication. Les nanoparticules contenues dans les gouttes de quelques micromètres de diamètre sont alors forcées à se regrouper sur elles-mêmes par évaporation du solvant organique. Les SPC obtenues sont stabilisées dans la phase aqueuse par la présence de tensioactif à leur surface, la nature hydrophobe des nanoparticules assurant la cohésion de l'édifice (**Figure III.2**).



**Figure III.2** : Principe de l'assemblage par évaporation d'une émulsion d'une phase huileuse contenant des nanoparticules hydrophobes dispersées dans une phase aqueuse.

Cette voie permet d'obtenir des SPC de taille modulable en adaptant les conditions d'émulsification, et de composition variable simplement en contrôlant les propriétés physico-chimiques de surface des nanoparticules unitaires. La flexibilité de cette technique est un argument de choix quand il s'agit de mettre au point des particules pour une application donnée comme l'extraction magnétique. En effet avec la même stratégie d'assemblage, il est possible de faire varier la taille des SPC, mais également leur composition, ce qui signifie que l'amélioration des systèmes d'après les premiers résultats ne nécessitera pas de repenser totalement l'ensemble des synthèses.

Avant toute tentative d'assemblage, les nanoparticules doivent être dispersées dans un solvant apolaire. Les nanoparticules obtenues par co-précipitation sont stabilisées en milieu

aqueux par la présence de charges électrostatiques. Il est donc nécessaire de modifier cette surface pour la rendre compatible avec les solvants organiques.

#### A.2.1.1 Formulation d'un ferrofluide hydrophobe

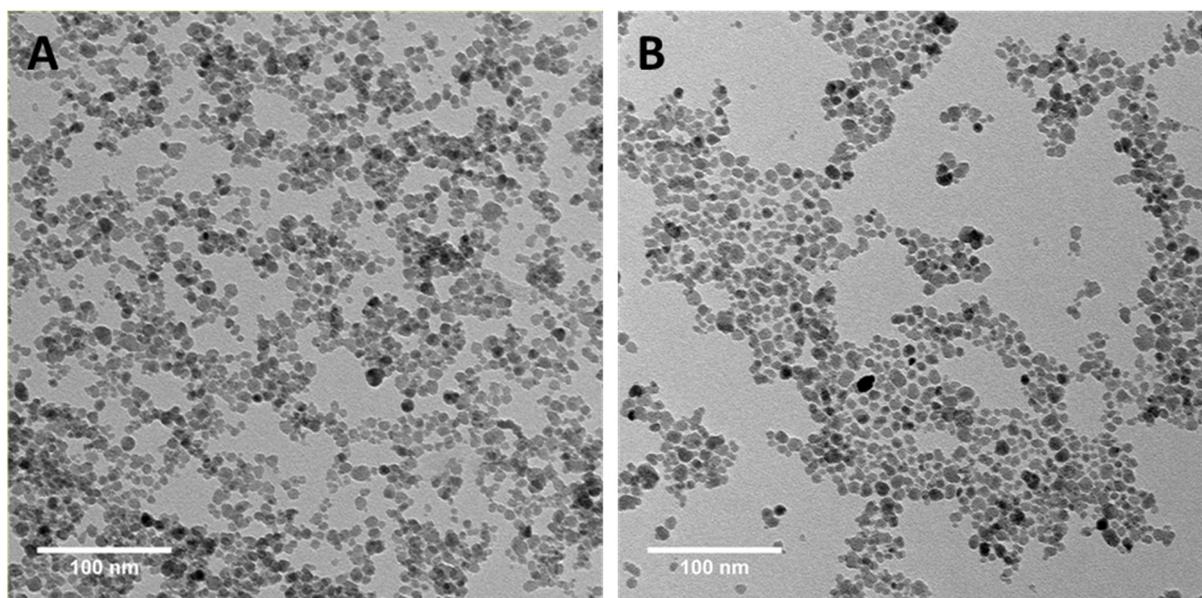
Par chimisorption de molécules d'acide gras à la surface des nanoparticules d'oxyde de fer, il est possible de les stabiliser dans un solvant apolaire. Van Ewijk *et al.* présentent une voie de modification de la surface de nanoparticules d'oxyde de fer par complexation d'acide oléique sur les sites de surface permettant de les disperser dans un solvant organique.<sup>13</sup> Ce procédé est également adaptable à d'autres acides gras comme l'acide stéarique. Les auteurs ont estimé l'aire occupée par une molécule d'acide oléique à la surface des nanoparticules égale à 0,28 nm<sup>2</sup>.<sup>13</sup> Ici, la quantité d'acide gras à ajouter est calculée de façon à apporter un excès de 20 par rapport à cette valeur, soit 0,12 mmol/m<sup>2</sup>.

##### **Mode opératoire III-1 : Modification de surface des nanoparticules de maghémite obtenues par co-précipitation avec de l'acide stéarique**

*Une solution d'ammoniaque concentré (30% m/m) est ajoutée goutte à goutte dans 250 ml de ferrofluide à 26,4 g.l<sup>-1</sup> en maghémite jusqu'à observer la déstabilisation totale du sol. Le surnageant est éliminé après sédimentation magnétique du floculat. Le floculat est lavé deux fois à l'eau. Ensuite, 200 ml d'eau sont ajoutés ainsi que 36,5 g d'acide stéarique. Sous agitation à 80 °C, des gouttelettes en suspension de ferrofluide hydrophobe se forment au bout de quelques minutes. Après 20 min d'agitation, les deux phases sont séparées magnétiquement et la phase aqueuse est éliminée. L'excès d'acide stéarique est éliminé par quatre lavages à 80 °C avec de l'éthanol durant lesquels les nanoparticules restent à l'état floculé. Un dernier lavage à l'acétone est réalisé avant de sécher les nanoparticules sous flux d'azote. 25 ml de cyclohexane sont ajoutés afin de peptiser les nanoparticules et obtenir un ferrofluide hydrophobe. Les nanoparticules se dispersent spontanément. Le ferrofluide obtenu est dosé d'après le Mode opératoire A-4 présenté en annexe n° 5 après évaporation du cyclohexane de la prise d'essai.*

La première étape consiste à désorber les ions nitrates de la surface de l'oxyde de fer en neutralisant celle-ci avec l'ammoniaque afin que les groupements carboxyliques puissent se complexer à la surface. Au fur et à mesure que leur surface devient hydrophobe, les nanoparticules sont transférées dans les gouttes d'acide gras. Les lavages à l'éthanol permettent de solubiliser l'excès de ligand tout en conservant les nanoparticules floculées, et ainsi permettre leur sédimentation magnétique. La redispersion spontanée des nanoparticules dans le cyclohexane après évaporation de l'éthanol est un bon indicateur de la modification de surface. Le diamètre hydrodynamique mesuré dans le cyclohexane est de 43 ± 21 nm, ce qui est équivalent au diamètre mesuré sur les particules avant modification de la surface par

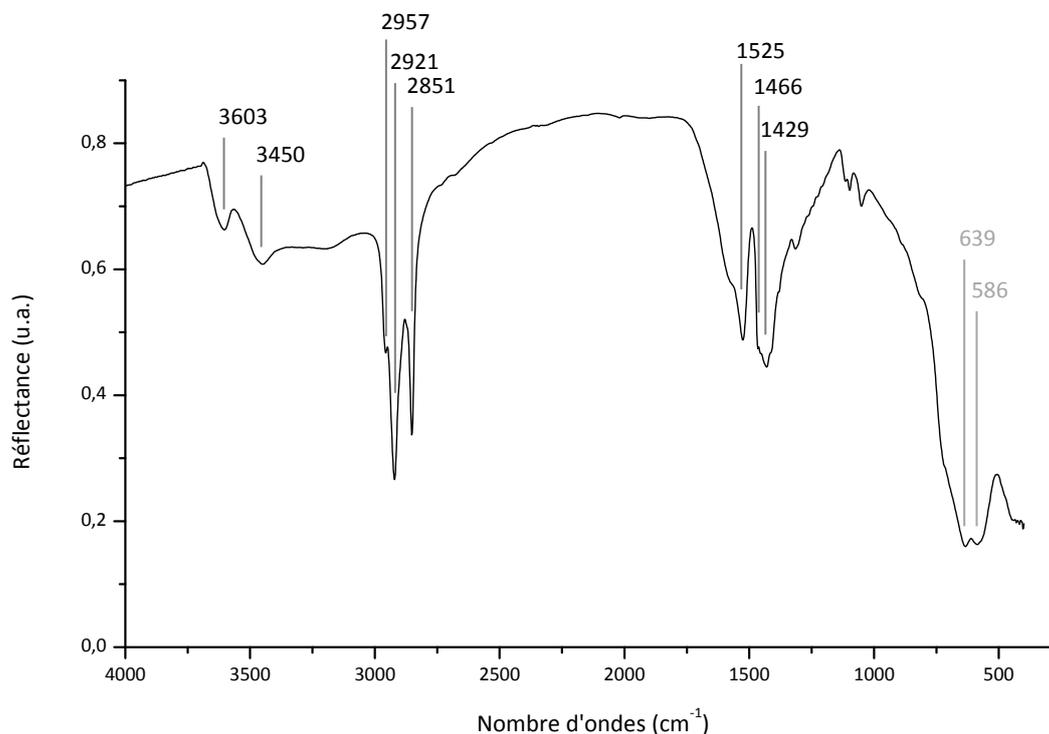
l'acide stéarique. De plus, sur la **Figure III.3-B**, les nanoparticules apparaissent séparées les unes des autres contrairement aux nanoparticules avant modification à l'acide stéarique, (**Figure III.3-A**), ce qui semble indiquer la présence d'acide stéarique à leur surface.



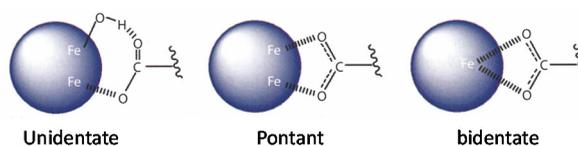
**Figure III.3** : Micrographie en transmission électronique de nanoparticules de maghémite obtenues par co-précipitation avant (A) ou après adsorption d'acide stéarique à leur surface (B).

Le spectre infrarouge est présenté en **Figure III.4**. Les deux pics importants à 2921 et 2851  $\text{cm}^{-1}$  sont respectivement attribués aux modes d'élongation asymétrique  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  et symétrique  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$  de la chaîne aliphatique de l'acide stéarique. Il est également possible de discerner un pic à 2957  $\text{cm}^{-1}$  correspondant au mode  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ .<sup>14</sup> Le léger épaulement à 1466  $\text{cm}^{-1}$  est attribué au mode de déformation  $\delta(\text{CH}_2)$ . L'absence du mode d'élongation symétrique des liaisons C=O des acides carboxyliques vers 1710  $\text{cm}^{-1}$  indique que les lavages ont bien éliminé l'acide gras libre. La présence des modes d'élongation symétrique et asymétrique du groupement  $\text{COO}^-$  respectivement à 1525 et 1429  $\text{cm}^{-1}$  confirme que les acides stéariques sont chimisorbés à la surface de la maghémite majoritairement par chélation bidentate car l'intervalle entre ces deux bandes est inférieure 110  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>15</sup> Cependant l'épaulement vers 1579  $\text{cm}^{-1}$  peut indiquer que les modes de coordination pontant et unidentate sont également présents (**Figure III.5**). La bande à 3603  $\text{cm}^{-1}$  indique la présence de groupements OH libres. Celui peut s'expliquer par le fait qu'une partie des OH présents à la surface de la maghémite sont remplacés par la chimisorption de l'acide stéarique, les groupements OH restant étant plus espacés, ils ne peuvent plus former de liaisons hydrogènes entre eux. Enfin, une autre preuve de la modification de la surface des nanoparticules de

maghémite est la disparition des bandes attribuées aux ions nitrates adsorbés à la fin de la synthèse des nanoparticules (voir **Figure A.10**).



**Figure III.4** : Spectre infrarouge des nanoparticules de maghémite avec un revêtement d'acide stéarique.



**Figure III.5** : Illustration des différents types de coordinations possibles entre une surface de nanoparticule d'oxyde de fer et un acide carboxylique. Adapté de la ref.<sup>16</sup>

### A.2.1.2 Assemblage des nanoparticules magnétiques

L'assemblage induit par évaporation d'une émulsion a été étudié par Paquet *et al.* afin de déterminer l'impact des différents paramètres sur le résultat de l'assemblage.<sup>17</sup> Les conditions d'émulsification sont adaptées de ces travaux. Le cyclohexane est choisi à la place du toluène car sa viscosité est légèrement plus élevée, or, les auteurs ont observé que la faible viscosité des gouttes formées avec le toluène pouvait permettre la formation de gouttelettes satellites durant l'émulsification engendrant une large distribution en taille. La sonication permet de former l'émulsion en provoquant des forces de cisaillement dans le milieu. Ces forces de cisaillement déforment les gouttes et provoquent leur rupture pour former des gouttes plus petites. La tension interfaciale des gouttes augmente au fur et à mesure que les

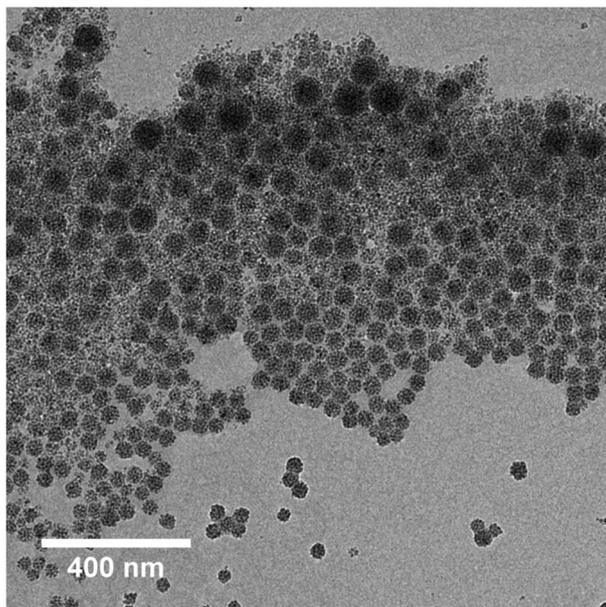
gouttes diminuent jusqu'à ce que l'énergie apportée par la sonication ne soit pas suffisante pour contrebalancer l'énergie interfaciale. Il est donc important, pour obtenir une population monodisperse, que la sonication soit puissante et suffisamment longue pour que les gouttes atteignent leur état d'équilibre et ainsi obtenir une population homogène en taille.

#### **Mode opératoire III-2 : Formulation des supraparticules magnétiques**

*Le ferrofluide hydrophobe (5 ml à 50 g.l<sup>-1</sup>) est placé au fond d'un ballon conique. Un volume de 20 ml d'une solution de dodecylsulfate de sodium (SDS) (Sigma Aldrich, 99%) à 50 mM est ajouté. Le mélange biphasique est émulsifié grâce à un sonicateur Vibra-cell™ 75042 (Bioblock Scientific, 500 W, 20 kHz) (temps : 20 min ; amplitude : 40% ; pulse : 2 s on , 3 s off). L'énergie fournie dans ces conditions est de 5100 joules. La sonication est réalisée dans un bain de glace afin de limiter l'élévation de la température et l'évaporation prématurée du cyclohexane. Le cyclohexane est ensuite éliminé en plaçant l'émulsion dans un ballon de 50 ml à 75°C sous flux d'azote durant 2 h sans agitation magnétique. Les échantillons obtenus par ce mode opératoire sont nommés SPCx avec x correspondant à la concentration du ferrofluide utilisé.*

A pression atmosphérique, le point d'ébullition du cyclohexane étant de 81 °C, celui-ci est facilement évaporé sans élimination de la phase aqueuse. Après son évaporation, une dispersion turbide est récupérée, indiquant la présence de particules de bien plus grande taille que les nanoparticules initiales de 7,5 nm.

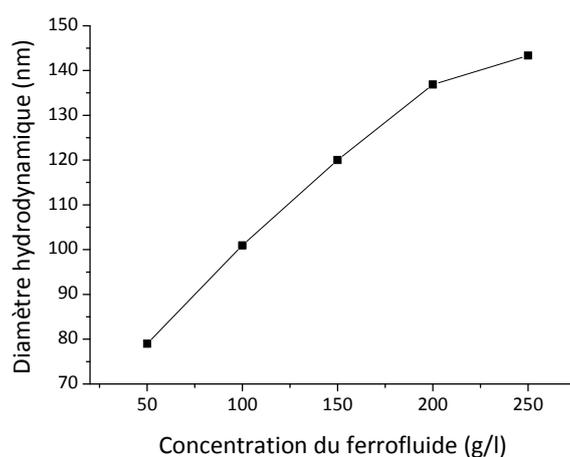
Le diamètre des SPC50 obtenues avec le Mode opératoire III-2 déterminé par DLS est de  $79 \pm 34$  nm. L'observation en MET révèle la présence de SPC de diamètre compris entre 40 et 100 nm (**Figure III.6**). La micrographie montre également un tapis continu de nanoparticules assemblé en monocouche ne semblant pas appartenir à des SPC. Ces nanoparticules isolées sont également présentes dans la dispersion car une centrifugation à 10 000 g durant 30 min ne permet pas de faire sédimenter la totalité de l'échantillon. L'origine de ces particules isolées est très probablement liée à la faible solubilité du SDS dans le cyclohexane permettant la stabilisation de ces particules après évaporation de la phase organique.



**Figure III.6** : Micrographie en transmission électronique des SPC50 stabilisées par le SDS.

La présence de particules isolées n'est pas problématique pour la suite de l'étude car elles présentent une mobilité magnétophorétique bien plus faible que les SPC50, un tri est donc tout à fait envisageable. Cependant il serait intéressant de mener une étude entière visant à limiter la présence de particules isolées, et améliorer la monodispersité des échantillons.

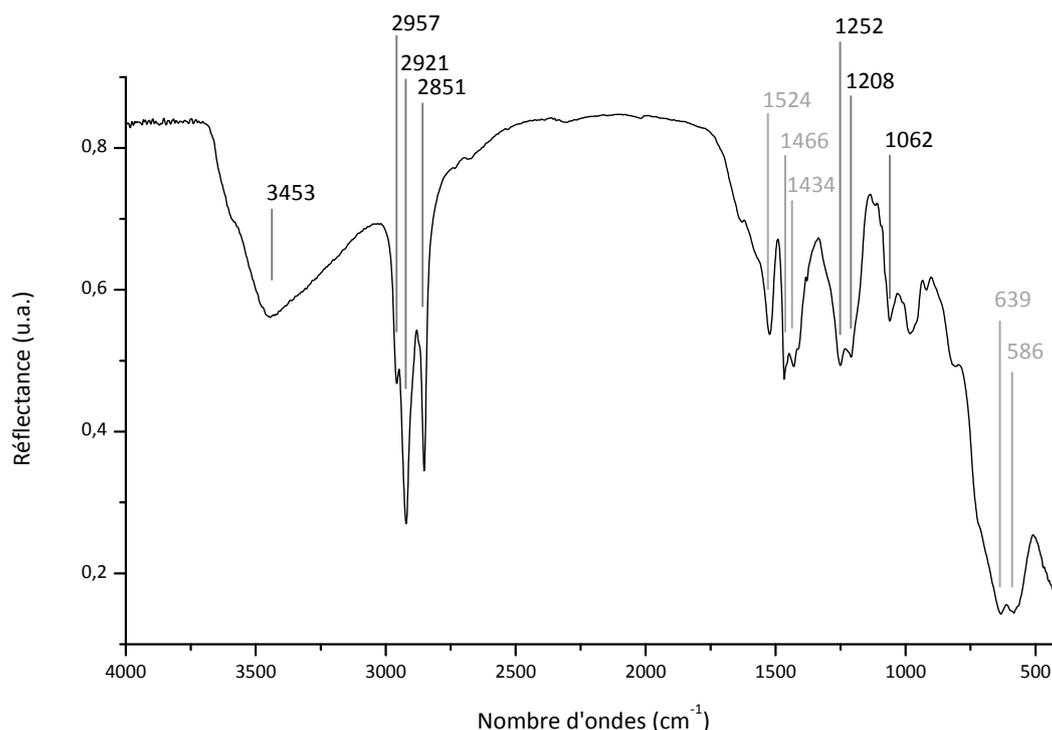
Comme le montre la **Figure III.7**, le diamètre moyen des SPC augmente simplement avec l'augmentation de la concentration en maghémite de la phase organique. Il est donc aisé d'obtenir différentes familles de taille. Ceci est lié au fait que le nombre de nanoparticules contenues dans une goutte de l'émulsion est plus grand pour les concentrations élevées, ce qui aboutit à des SPC de plus grand diamètre, contenant plus de nanoparticules.



**Figure III.7** : Effet de la concentration du ferrofluide sur le diamètre hydrodynamique des SPC.

L'échantillon est centrifugé afin d'éliminer le surnageant contenant le SDS libre avant d'être séché pour l'analyse en spectroscopie infrarouge. Le spectre présenté en **Figure III.8**

met en évidence la présence des bandes déjà attribuées aux nanoparticules de maghémite enrobées par l'acide stéarique (présenté en gris) mais présente également des bandes mettant en évidence la présence de SDS. En effet, la double bande à  $1252\text{ cm}^{-1}$  et  $1208\text{ cm}^{-1}$  est attribuée au mode d'élongation asymétrique  $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)$ , et la bande à  $1062\text{ cm}^{-1}$  est attribuée au mode d'élongation symétrique.<sup>14</sup> Les modes d'élongation asymétrique  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ , symétrique  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$  et le mode de déformation  $\delta(\text{CH}_2)$  de la chaîne aliphatique ainsi que le mode  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  se superposent avec ceux de l'acide stéarique.

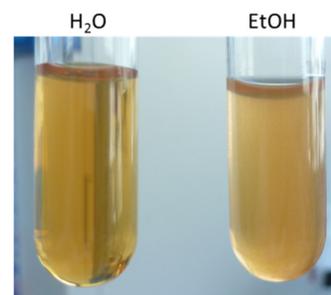


**Figure III.8 :** Spectre infrarouge des SPC50 stabilisées par le SDS.

Les nanoparticules de maghémite présentent donc toujours un comportement hydrophobe les maintenant sous forme agrégée. Le cluster de particules hydrophobes est quant à lui stabilisé en milieu aqueux grâce à la présence de SDS en surface. Ces assemblages sont donc très sensibles aux propriétés physico-chimiques du milieu dans lequel ils sont dispersés. Les SPC nécessitent une consolidation avant de pouvoir envisager leur utilisation pour l'extraction magnétique.

## A.2.2 Consolidation des SPC50 dans une matrice de silice

Une manière de conserver ces assemblages, quelque soit le milieu dans lequel ils se trouvent, est de former une matrice de silice autour des SPC. Les liaisons faibles à l'origine de la cohésion de l'assemblage sont ainsi remplacées par des liaisons covalentes au sein de la matrice de silice. Comme il a été montré au chapitre précédent, la synthèse de la silice est réalisée dans un milieu hydro-alcoolique basique à partir du TEOS. Les SPC doivent donc conserver leur morphologie dans ce nouveau milieu, or le SDS est soluble dans l'éthanol. Cela sous-entend que le tensioactif présent à la surface des SPC se solubilise dans l'éthanol et que les assemblages se déstabilisent (**Figure III.9**). La première étape d'enrobage par la silice consiste donc à stabiliser les SPC dans le milieu hydro-alcoolique.



**Figure III.9** : Photographie des SPC50 stabilisés par le SDS dans l'eau ou dans l'éthanol.

### A.2.2.1 Transfert des SPC50 en milieu hydro-alcoolique

Les SPC étant stables uniquement en milieu aqueux en présence de tensioactif, il est nécessaire d'utiliser une modification chimique de surface dans ce milieu afin de les rendre compatible avec le milieu hydro-alcoolique. Dans la littérature, des exemples d'encapsulation en milieu aqueux ont été décrits. Par exemple, des synthèses de silice mésoporeuse ont été réalisées autour de nanoparticules d'oxyde de fer,<sup>18</sup> ou d'or.<sup>19</sup>

L'encapsulation est réalisée dans un milieu aqueux rendu basique par l'ajout d'ammoniaque et contenant du SDS. Le SDS permet de conserver la stabilité des SPC au début de la synthèse, mais il permet également de disperser le TEOS hydrophobe sous forme de gouttes dans le milieu. Au fur et à mesure que les groupements éthoxy du TEOS s'hydrolysent, celui-ci devient hydrophile et se transfère dans la phase aqueuse.

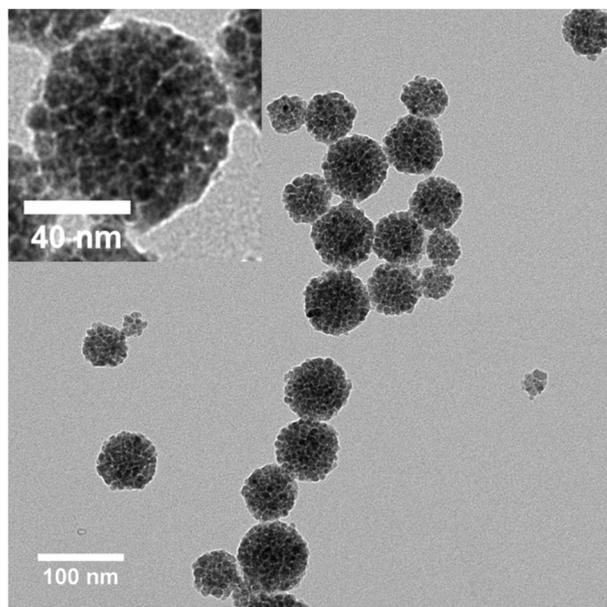
#### **Mode opératoire III-3 : Formation d'une pré-couche de silice en milieu aqueux basique**

*Un volume de 30 ml d'eau est ajouté à 250 mg (en Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) de SPC50 dispersés dans 20 ml d'une solution de SDS à 50 mM afin d'obtenir une concentration en SDS de 20 mM. Sont ensuite ajoutés, 2,5 ml d'ammoniaque à 30 % massique puis 250 µl de TEOS. Après 2 h d'agitation à 40°C, 200 ml d'eau sont ajoutés et les SPC50 sont séparés par centrifugation à 10 000 g durant 15 min. le surnageant est éliminé et les culots sont redispersés dans l'eau. Après avoir regroupé tous les culots, le volume est ajusté à 20 ml avec de l'eau. La concentration en maghémite est ensuite dosée.*

Durant l'étape de lavage, une proportion massique de maghémite d'environ 30 % reste en suspension dans le surnageant après la centrifugation. Cette fraction correspond aux nanoparticules isolées observées en MET après la formation des SPC50 dans la partie A.2.1.2.

Le diamètre hydrodynamique des particules après ce traitement est de  $78 \pm 28$  nm, ce qui est tout à fait comparable au diamètre mesuré sur l'échantillon stabilisé par le SDS. Ces valeurs montrent également la limite de la DLS pour visualiser les particules de faible diamètre dans un échantillon polydisperse, car, bien que la majorité des particules isolées ait été éliminée avec le surnageant du lavage par centrifugation, le diamètre moyen mesuré en DLS n'a pas augmenté (du fait d'une plus grande diffusion par les particules de plus grande taille).

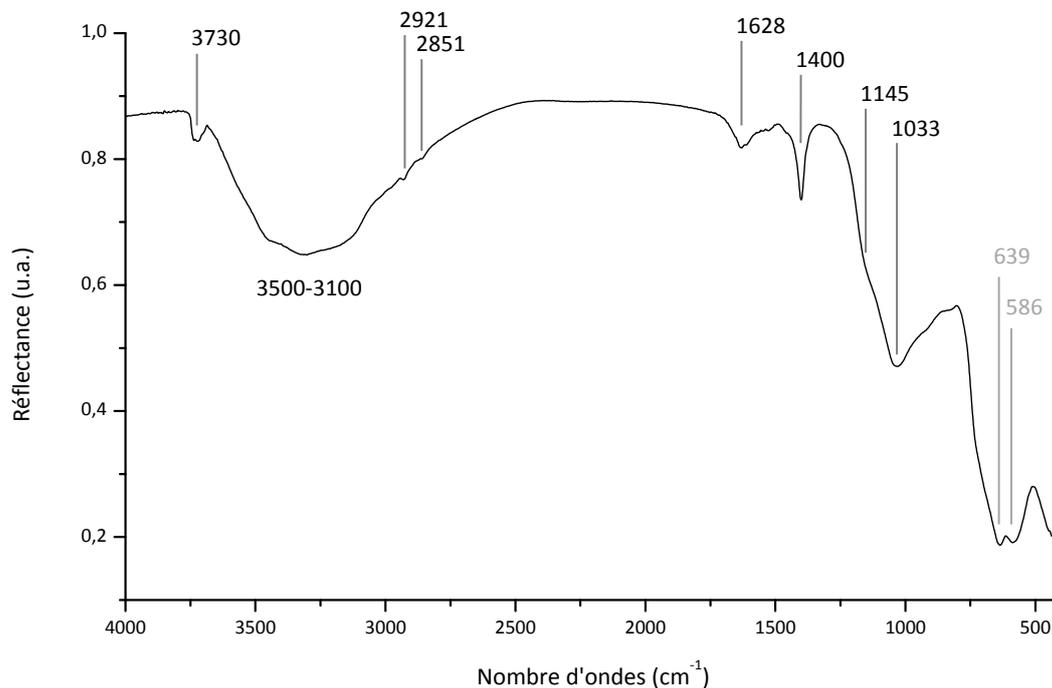
L'observation en MET montre que les nanoparticules conservent leur état d'agrégation sous forme de SPC après la formation de la pré-couche de silice (**Figure III.10**).



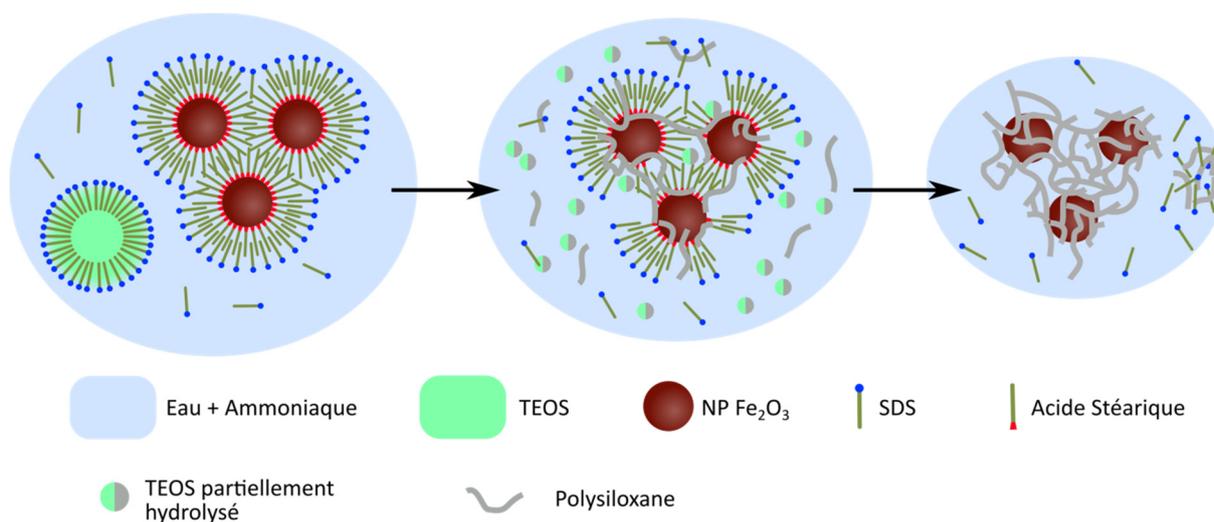
**Figure III.10** : Micrographie en transmission électronique des SPC50 après formation d'une pré-couche de silice. Insert : zoom sur une SPC50.

L'analyse en spectroscopie infrarouge présente un spectre très différent par rapport aux SPC50-SDS (**Figure III.11**). En effet, avec surprise, les bandes à  $2921$  et  $2851$   $\text{cm}^{-1}$  attribuées aux modes de vibration  $\nu(\text{CH}_2)$  ont pratiquement disparu. Cela sous-entend que la majorité de l'acide stéarique adsorbé à la surface des nanoparticules et du SDS a été éliminé. La bande à  $1033$   $\text{cm}^{-1}$  accompagné de l'épaule à  $1145$   $\text{cm}^{-1}$  attribuées au modes de vibration des liaisons Si-O-Si indique que les molécules de TEOS ajoutées se sont hydrolysées puis en partie condensées pour former des polysiloxanes.<sup>20,21</sup> En effet ces bandes sont trop décalées vers les faibles fréquences pour être attribuées à  $\nu_{\text{as}}(\text{Si-O-Si})$  de la silice.<sup>22</sup>

La bande à  $1628\text{ cm}^{-1}$  serait liée au mode de déformation de molécules d'eau de solvation des polysiloxanes, alors que la bande à  $1400\text{ cm}^{-1}$  est attribué à l'ion  $\text{NH}_4^+$ .<sup>23,24</sup>



**Figure III.11** : Spectre infrarouge des SPC50 après formation d'une pré-couche de silice.

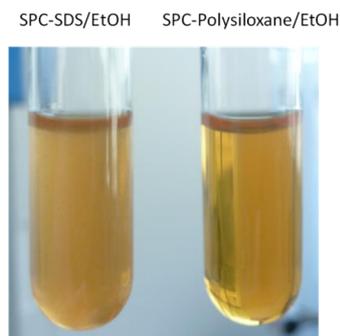


**Figure III.12** : Schéma montrant une proposition de mécanisme de formation de macromolécules de polysiloxane autour et au sein des SPC permettant leur transfert en milieu alcoolique.

Le mécanisme se produisant durant cette étape semble identique au mécanisme proposé par Koole *et al.* à propos de l'incorporation de quantum dots dans des sphères de silice par microémulsion inverse.<sup>25</sup> Les molécules de TEOS partiellement hydrolysées sont amphiphiles et échangent les ligands à la surface des nanoparticules. La cohésion des

nanoparticules au sein des SPC est garantie par des macromolécules de polysiloxanes en partie réticulées (**Figure III.12**).

L'échange des molécules d'acide stéarique adsorbées à la surface par le TEOS partiellement hydrolysé et les polysiloxanes formés est mis en évidence par leur disparition observée en spectroscopie infrarouge. A la suite de cette étape, les SPC sont stabilisés dans l'éthanol par des macromolécules de polysiloxanes réticulés adsorbés à la surface des nanoparticules, comme le montre la **Figure III.13**, bien qu'il ne soit pas encore possible de parler de matrice de silice.



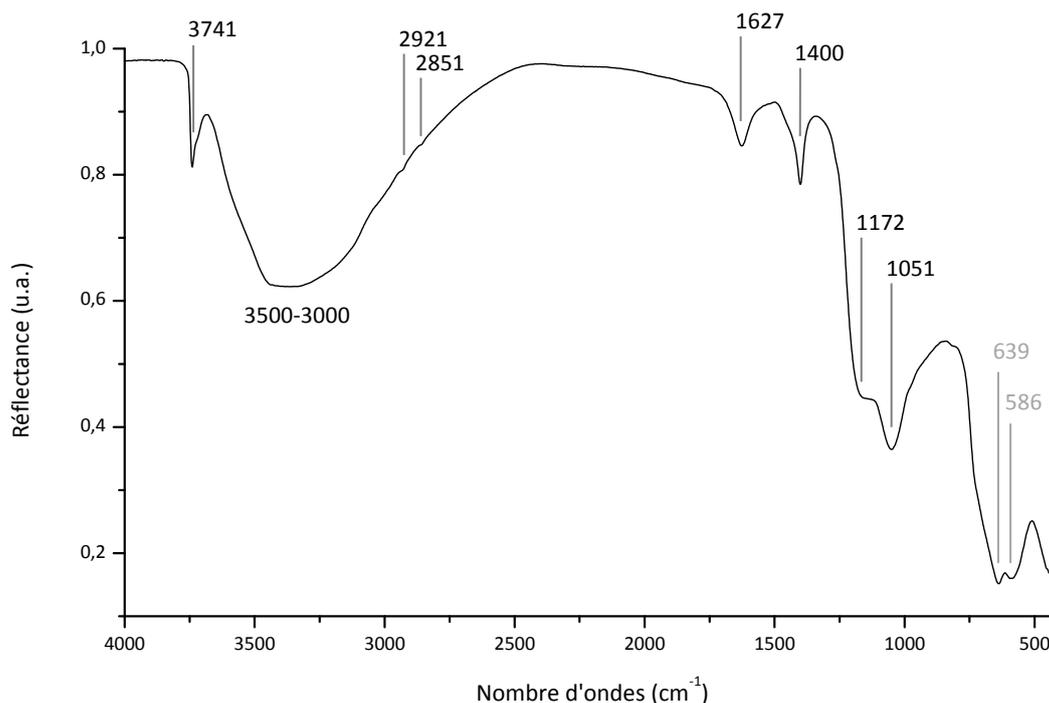
**Figure III.13** : Photographie des SPC50 stabilisées par le SDS ou par les polysiloxanes dans l'éthanol. La turbidité indique la présence d'agrégats

Afin de mettre en évidence la matrice composée de macromolécules de polysiloxanes, les SPC50 stabilisées par les macromolécules de polysiloxane sont incubées dans un milieu hydro-alcoolique basique sans ajouter de TEOS. Le milieu hydro-alcoolique favorise ainsi par catalyse basique la condensation des silanols pour former de nouvelles liaisons Si-O-Si. La signature infrarouge des macromolécules polysiloxanes doit donc se rapprocher de la signature infrarouge de la silice colloïdale.

#### **Mode opératoire III-4 : Mise en évidence de la matrice polysiloxane**

*Un volume de 5 ml contenant 40 mg de SPC50 stabilisées par les polysiloxanes (Mode opératoire III-3) est ajouté à un milieu contenant 18 ml d'éthanol et 1,1 ml d'ammoniaque (30% m/m). Après 12 h, les particules sont récupérées par centrifugation puis séchées avant d'être analysées par spectroscopie infrarouge.*

Après incubation dans le milieu hydro-alcoolique, les bandes initialement présentes à 1033 et 1145  $\text{cm}^{-1}$  sont décalées respectivement à 1051 et 1172  $\text{cm}^{-1}$  (**Figure III.14**). De plus, la bande à 1172  $\text{cm}^{-1}$  est bien plus intense que la bande initiale à 1145  $\text{cm}^{-1}$ . Cette signature est similaire à la signature infrarouge de la silice présentant une bande à 1113  $\text{cm}^{-1}$  avec un épaulement intense à 1200  $\text{cm}^{-1}$ . Ce dernier traitement a donc bien favorisé la condensation des silanols présents sur les polysiloxanes. Cette expérience confirme également l'attribution des bandes aux polysiloxanes en **Figure III.11**.



**Figure III.14 :** Spectre infrarouge des SPC50 après formation de la matrice de polysiloxane et incubation dans le milieu hydro-alcoolique basique.

#### A.2.2.2 Encapsulation dans une matrice de silice par voie sol-gel

Une matrice de silice est formée autour des SPC afin de les consolider, mais également de façon à disposer d'une surface connue dans l'objectif de réaliser des modifications chimiques de surfaces. Les SPC étant stables en milieu hydro-alcoolique après interpénétration de macromolécules de polysiloxane, il est possible de faire croître une matrice de silice en milieu de type Stöber par ajout de TEOS.

##### **Mode opératoire III-5 : Croissance de la matrice de silice en milieu hydro-alcoolique basique**

*Un milieu hydro-alcoolique constitué de 72 ml d'éthanol et 4,4 ml d'ammoniaque (30% m/m) est préparé. Un volume de 100 µl de TEOS est ajouté et immédiatement après, 20 ml de la dispersion de SPC50 (11,7 g.l<sup>-1</sup> en maghémite) sont ajoutés sous agitation. Après 1 h, 150 µl de TEOS sont ajoutés, puis 200 µl 1 h après. La réaction se poursuit durant minimum 4 h puis l'ammoniaque ainsi qu'une partie de l'éthanol sont éliminés par évaporation sous pression réduite avant de centrifuger l'échantillon à 10 000g durant 15 min. Le culot est redispersé dans un mélange eau/EtOH 1:1, puis l'échantillon est à nouveau centrifugé à 10 000 g durant 15 min. Le culot est ensuite redispersé dans l'eau. Afin de réduire la dispersion en taille, un tri par centrifugation est réalisé. Typiquement, une première centrifugation à 8000g durant 15 min permet d'éliminer les particules de faible diamètre avec le surnageant et une seconde centrifugation à 500 g durant 15 min permet d'éliminer les grandes particules se retrouvant dans le culot. Les particules obtenues sont nommées SPC50@SiO<sub>2</sub>.*

Une rapide étape de tri par centrifugation différentielle est réalisée afin d'éliminer les particules présentant des diamètres en dehors de la population de taille majoritaire, montrés par une flèche sur la **Figure III.15**. Ces particules sont facilement séparées par centrifugation car elles présentent des vitesses de sédimentation très différentes. En effet, la vitesse de sédimentation  $v$  d'une particule de volume  $V_{part}$  est définie par l'équation suivante :

$$v = \frac{V_{part}(\rho_{part} - \rho_{solvant})\omega^2 r}{f}$$

Avec :

$V_{part}$  : volume de la particule

$\rho_{part}$  : masse volumique de la particule

$\rho_{solvant}$  : masse volumique du solvant

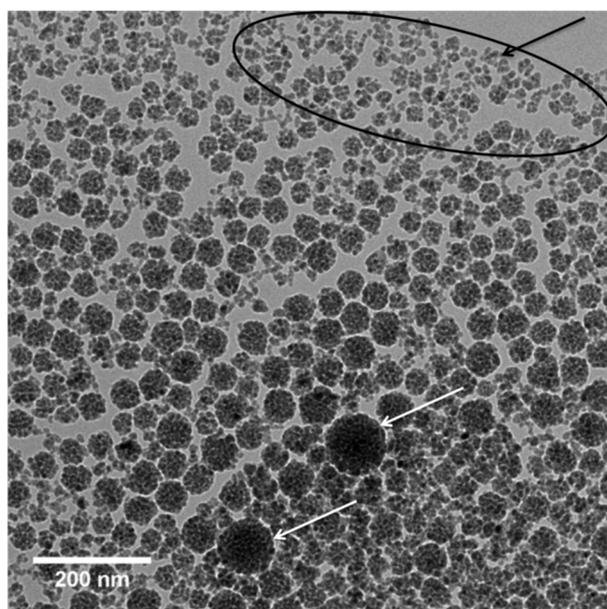
$\omega$  : vitesse angulaire

$r$  : distance par rapport à l'axe de rotation

$f$  : coefficient de friction

Cela sous-entend que cette vitesse de sédimentation varie avec le rayon de la particule au cube et avec l'accélération centrifuge  $\omega^2 r$ . Ainsi, les particules présentant un diamètre élevé sédimentent rapidement à basse vitesse alors que les particules de faible diamètre nécessitent un temps plus long ainsi qu'une accélération centrifuge plus élevée pour sédimenter.

Comme il a été suggéré auparavant, un tri magnétique serait également envisageable.



**Figure III.15** : Micrographie en transmission électronique des SPC50@SiO<sub>2</sub> présentant un échantillon de la population avant le tri par centrifugation.

L'observation de l'échantillon en MET de SPC50@SiO<sub>2</sub> montre que la structure supracolloïdale soutenue par la matrice de silice des nanoparticules formant les SPC est

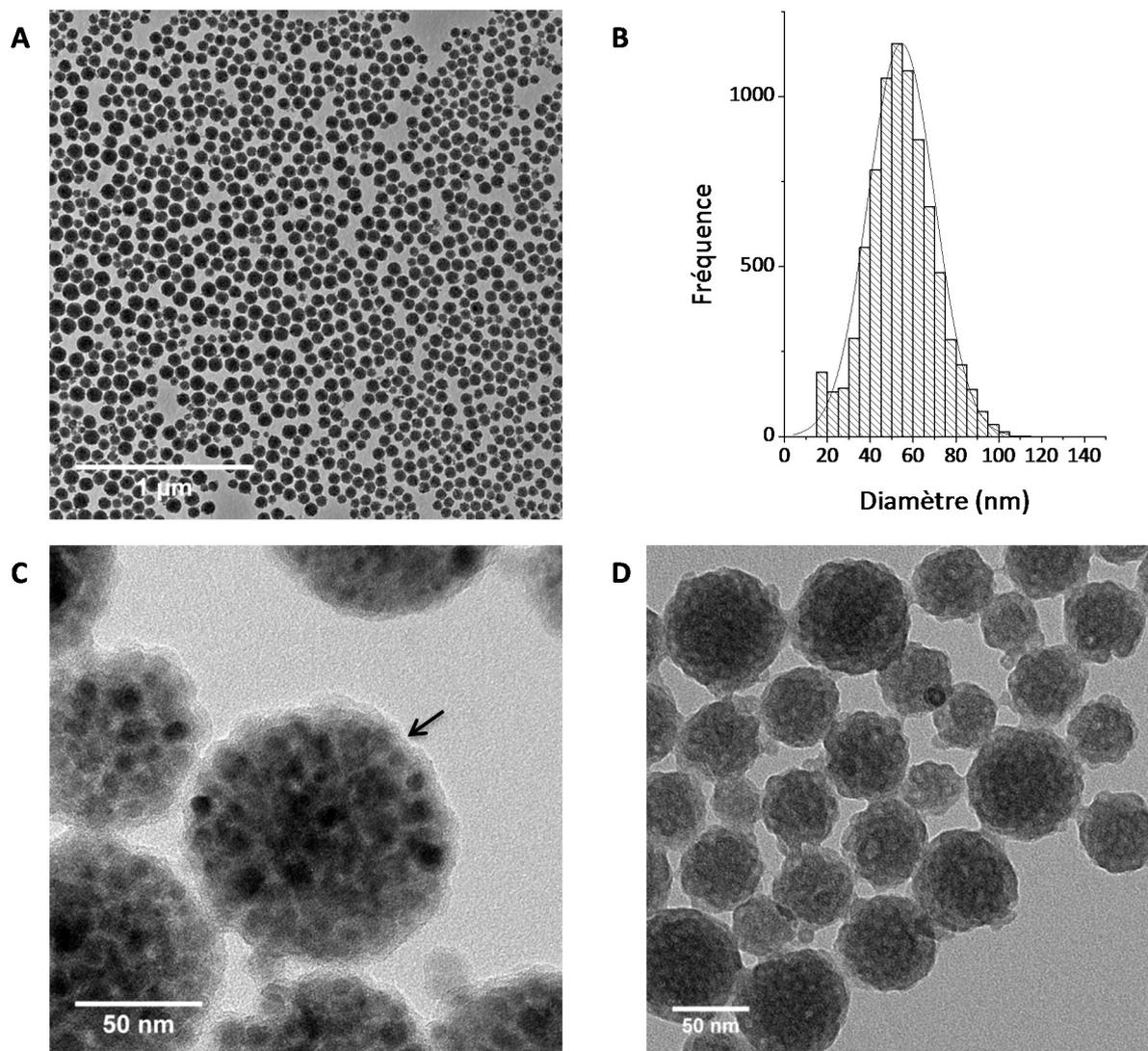
conservée (**Figure III.16-A**) et que le tri réalisé en fin de synthèse permet d'éliminer la majorité des nanoparticules présentant un diamètre éloigné de la moyenne de la population. La distribution en taille des SPC50@SiO<sub>2</sub> déterminée en MET sur 8000 particules indique que celles-ci mesurent  $54 \pm 16$  nm (**Figure III.16-B**). La mesure en DLS montre, quant à elle, que le diamètre hydrodynamique est de  $105 \pm 38$  nm. L'augmentation du diamètre mesuré par rapport aux particules stabilisées par les polysiloxanes est en accord avec la formation d'une écorce de silice à la surface des SPC, bien que la différence de diamètre soit surévaluée par rapport à l'observation en microscopie électronique. Le point important à retenir est que la DLS montre que l'échantillon n'a pas formé d'agrégats dans le milieu hydro-alcoolique, comme cela aurait pu être avec les particules stabilisées par le SDS.

Le nombre  $N_{NP/SPC}$  de nanoparticules de rayon  $r_{NP}$  constituant une SPC de rayon  $R_{SPC}$  est estimé en considérant un assemblage désordonné de compacité 0,64<sup>26</sup> avec la relation suivante :

$$N_{NP/SPC} = \frac{V_{SPC}}{V_{NP}} \times 0,64 = \left( \frac{R_{SPC}}{r_{NP}} \right)^3 \times 0,64$$

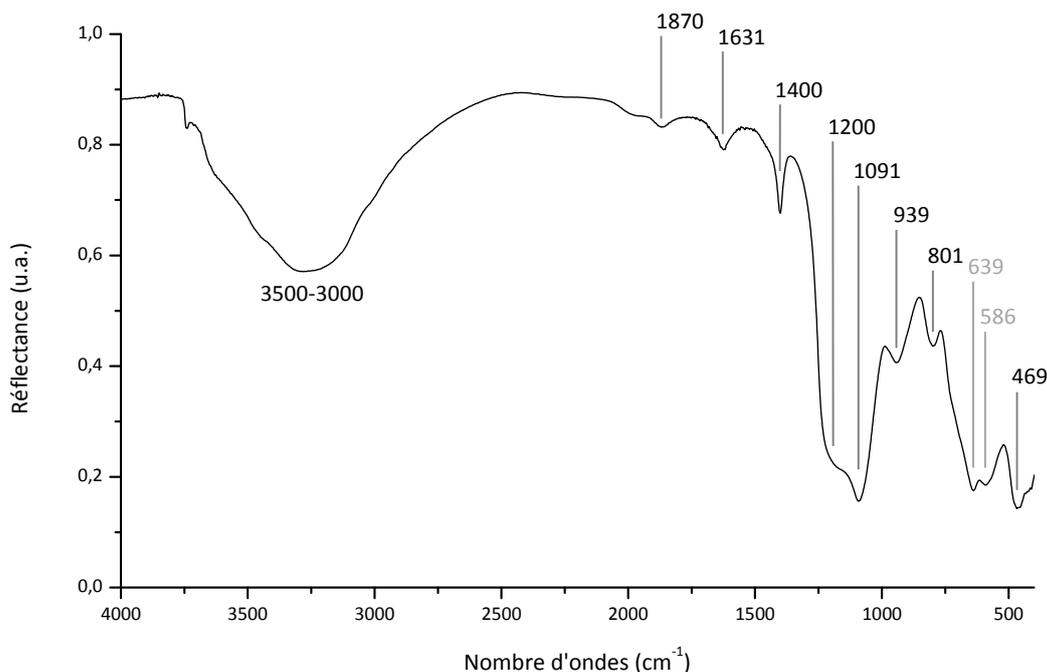
Il est nécessaire de prendre en compte dans le calcul du rayon des nanoparticules unitaires l'épaisseur de l'acide stéarique présent initialement à leur surface. Cette épaisseur qui a été estimée à 0,5 nm. Cette épaisseur a un fort impact sur le résultat final. En effet ce résultat varie de 164 à 118 nanoparticules de 7,5 nm par SPC50 de 54 nm lorsque l'on fait varier cette épaisseur de 0,5 à 1 nm. Ce calcul n'a donc pour seul objectif que de donner un ordre de grandeur du nombre de nanoparticule par SPC50 (54 nm) que nous choisirons arbitrairement autour de 150.

Une couche de silice d'épaisseur homogène d'environ 4 nm entourant les SPC50 est également observée tout autour de ces SPC50 (**Figure III.16-C**).



**Figure III.16 :** A : Micrographie en transmission électronique des SPC50@SiO<sub>2</sub>, B : Distribution en taille des SPC50@SiO<sub>2</sub> déterminée en MET après le tri, C : Zoom sur une SPC50@SiO<sub>2</sub>, D : Micrographie en transmission électronique de la matrice de silice après dissolution des nanoparticules de maghémite par le HCl.

La spectroscopie infrarouge réalisée sur les SPC50@SiO<sub>2</sub> confirme bien la présence de silice colloïdale grâce aux modes de vibration  $\nu_{as}(\text{Si-O-Si})$  à 1091  $\text{cm}^{-1}$  avec les modes de vibration suivants : l'épaule à 1200  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_s(\text{Si-O-Si})$  à 939  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\delta(\text{Si-O-Si})$  à 801  $\text{cm}^{-1}$ , balancement de Si-O-Si à 469  $\text{cm}^{-1}$  (**Figure III.17**).



**Figure III.17** : Spectre infrarouge des SPC50@SiO<sub>2</sub>.

Après dissolution des nanoparticules de maghémite avec de l'acide chlorhydrique, la matrice de silice est plus facilement révélée en MET. Cette dissolution est possible car la silice colloïdale obtenue par voie sol-gel est poreuse. Les ions hydronium ont ainsi la possibilité de diffuser à travers la matrice et de dissoudre la maghémite. La **Figure III.16-D** présente des nanoparticules de silice contenant des cavités correspondant à l'emplacement des nanoparticules de maghémite. Cette image montre que la silice n'est pas uniquement présente à la surface des nanoparticules, mais se forme également au cœur des SPC, formant ainsi un « mortier » assurant la cohésion entre les nanoparticules.

Le procédé général de formation des SPC@SiO<sub>2</sub> développé ici est résumé en **Figure III.18**. Un procédé d'encapsulation de SPC par la silice a également été rapporté récemment.<sup>27</sup> Après échange du SDS par un tensioactif non ionique présentant des fonctions alcools, les SPC sont introduites dans un milieu de type Stöber préhydrolysé. Les nucléi de silice présents dans le milieu s'adsorbent par liaison hydrogène sur le tensioactif et constituent l'écorce de silice. Une différence par rapport à la procédure d'encapsulation développée au cours de notre étude réside dans le fait que la silice ne peut se trouver qu'en surface et non pénétrer au sein même des SPC. Cette stratégie d'encapsulation n'utilise pas, en effet, d'étape préliminaire qui permet d'échanger les ligands au sein de la structure par des polysiloxanes amphiphiles.

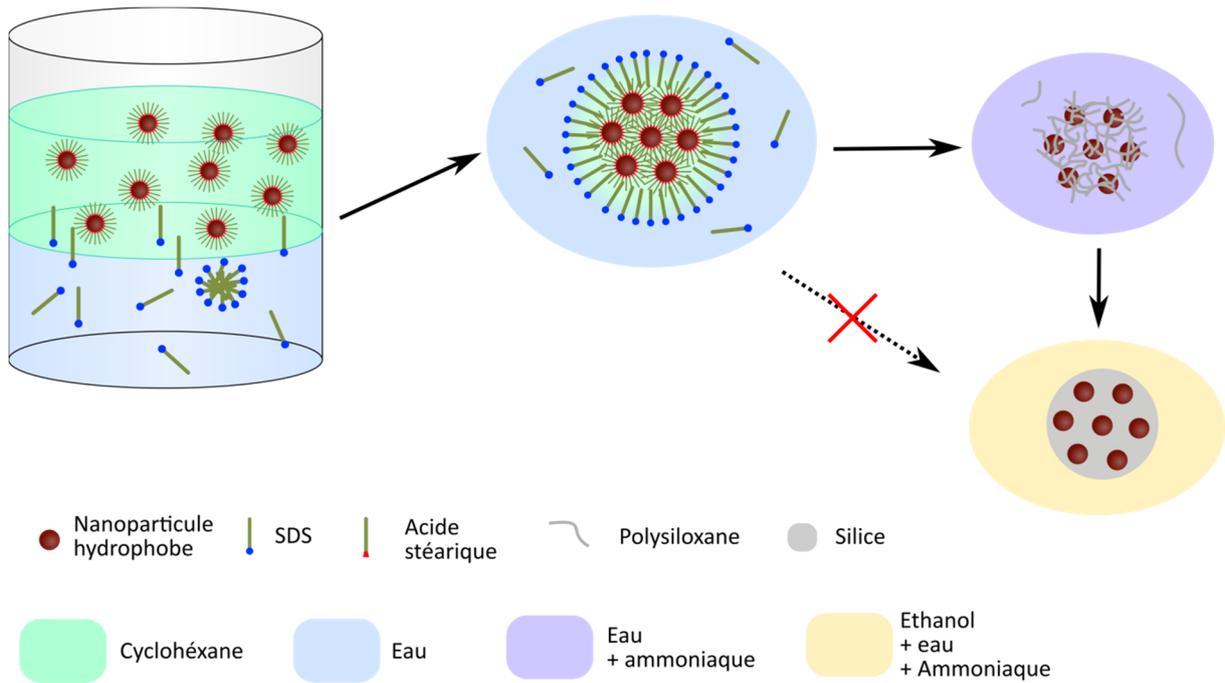


Figure III.18 : Procédé de synthèse des SPC@SiO<sub>2</sub>.

### A.2.3 Caractérisation magnétique des SPC

Les mesures d'aimantation sur les particules obtenues par co-précipitation puis sur les SPC50 sont réalisées à 300 K avec un VSM (Vibrating Sample Magnetometer) (VSM EZ7, MicroSense) sur des dispersions de particules (2,5 g/l en maghémite) afin de les maintenir isolées et d'observer d'éventuels effets de couplage dipolaires magnétiques qui pourraient se produire au sein des SPC. Ainsi les potentielles différences sur les propriétés magnétiques pourront être attribuées à l'agrégation des nanoparticules au sein des SPC et non à un effet coopératif d'ensemble qui pourrait se produire sur une poudre séchée.

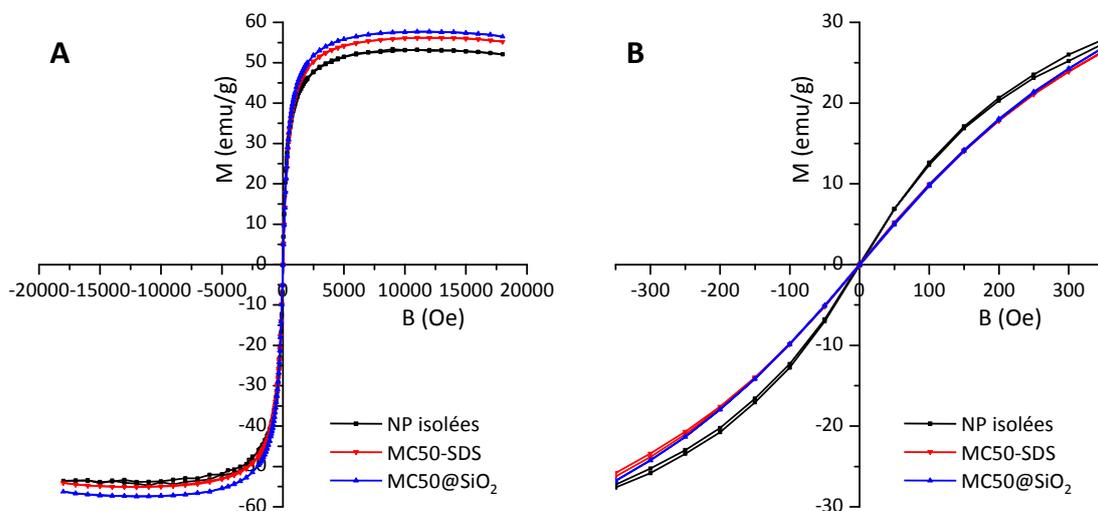


Figure III.19 : **A** : Mesures d'aimantation des nanoparticules magnétiques au VSM. **B** : Agrandissement de la zone à bas champ.

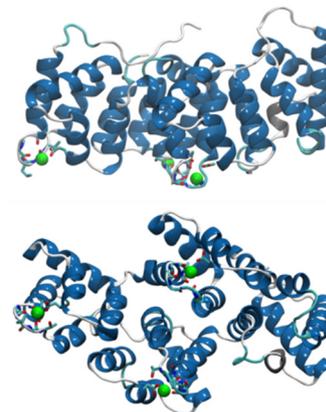
Les mesures présentées en **Figure III.19-A** montrent que les échantillons présentent des propriétés magnétiques très proches. Les légères différences observées à saturation peuvent être expliquée par l'incertitude sur le dosage de la maghémite ainsi que le volume contenu dans le porte échantillon lors de la mesure. La **Figure III.19-B** montre quant à elle l'absence d'aimantation rémanente pour tous les échantillons. La propriété de superparamagnétisme des nanoparticules obtenues par co-précipitation est donc bien conservée dans les SPC50-SDS ainsi que les SPC50@SiO<sub>2</sub>. La susceptibilité des SPC est inférieure à celle des nanoparticules isolées indiquant que ceux-ci s'aimantent plus difficilement en fonction du champ que les nanoparticules isolées. Ce comportement pourrait être le résultat de la présence d'interactions dipolaires entre les nanoparticules au sein des SPC. Une étude en champ alternatif permettrait de les mettre en évidence.

#### **A.2.4 Conclusion**

L'extraction magnétique nécessite des particules possédant une mobilité magnétophorétique et donc une susceptibilité magnétique ainsi qu'un volume élevé, tout en étant superparamagnétiques de manière à faciliter leur dispersion nécessaires aux étapes de capture, d'élution et de recyclage de l'application envisagée. Pour cela, des nanoparticules superparamagnétiques ont été assemblées sous forme de grappes appelées supraparticules colloïdales dont la taille est modulable entre 50 et 140 nm. Ces SPC étant sensibles au milieu dans lequel elles se trouvent, une consolidation de l'édifice a été mise en place par formation d'une matrice de silice en deux étapes. L'objet final est composé uniquement maghémite et de silice, les constituants organiques ayant été échangés par les polysiloxanes au cours de la formation de la matrice. Les mesures magnétiques montrent que les SPC obtenues demeurent superparamagnétiques. Cette stratégie entièrement modulable répond parfaitement aux besoins d'adaptation et d'optimisation rencontrés lors du développement d'outils pour la biologie, alors que la surface de silice rend ces objets compatibles avec les modifications chimiques de surface déjà très largement étudiées pour ce matériau.

### A.3 Biofonctionnalisation des SPC@SiO<sub>2</sub> par une protéine de reconnaissance et de capture des vésicules lipidiques

Comme il a été dit dans le chapitre I § C.1, certaines vésicules extracellulaires (VE) jouent un rôle dans les mécanismes de coagulation sanguine. Cette fonction est apportée aux VE par la présence de phosphatidylserine (PS), un phospholipide, au niveau du feuillet externe de leur bicouche lipidique. Or, ce phospholipide est reconnu par les annexines. Les annexines constituent en effet une famille de protéines ayant la capacité de se lier sélectivement aux membranes biologiques en présence d'ions calcium.<sup>28</sup> Cette liaison aux membranes se fait par leur fixation aux phospholipides négativement chargés, dont la PS. Étant donné que la liaison des annexines aux membranes est dépendante du Ca<sup>2+</sup>, celle-ci est réversible. Les annexines sont donc de bons candidats pour servir de protéines de capture spécifique des VE exposant de la PS en surface. La structure des annexines humaines (de type A) peut être décrite en distinguant deux régions : La région N-terminale, variable entre les annexines, et la région C-terminale, comportant la fonction de liaison aux membranes, au contraire très conservée. Cette région est constituée de 4 domaines formés par des hélices alpha. Les sites de fixation des ions Ca<sup>2+</sup> sont localisés sur ces domaines.<sup>29</sup> L'annexine A5 est constituée uniquement de la région de liaison aux membranes, ce qui en fait l'annexine A la plus simple structuralement (**Figure III.20**). Cette protéine, qui, à ce jour, est bien caractérisée, possède d'un point de vue général une forte affinité pour les membranes lipidiques négatives en présence de calcium.



**Figure III.20** : Structure de l'Anx-A5 déterminée par cristallographie des rayons X (PDB ID : 1AVH). En vert sont représentés les ions Ca<sup>2+</sup>. Seulement 3 des 4 sites de liaison du Ca<sup>2+</sup> sont résolus sur cette structure.

La grande affinité de la protéine pour sa cible à laquelle il faut ajouter la réversibilité de la liaison en fait un très bon candidat pour la capture de VE exposant la PS. En greffant cette protéine à la surface des SPC, ceux-ci devraient acquérir la capacité de se fixer aux membranes lipidiques négativement chargées. Pour cela, la surface des particules doit être adaptée pour accueillir la protéine. Cela sous-entend qu'elle doit permettre le greffage covalent de la protéine tout en conservant l'annexine fonctionnelle et disponible pour la fixation des membranes. L'annexine ne doit donc pas s'adsorber à la surface de la particule,

au risque de se dénaturer et/ou de ne pas exposer le site de fixation aux membranes. Pour limiter ces interactions néfastes, la surface des SPC doit être PEGylée. En plus du fait qu'elle garantira la stabilisation des colloïdes dans les milieux biologiques, cette PEGylation permettra également de limiter l'adsorption non spécifique de biomolécules présentes dans l'échantillon, améliorant ainsi la qualité de l'extraction.

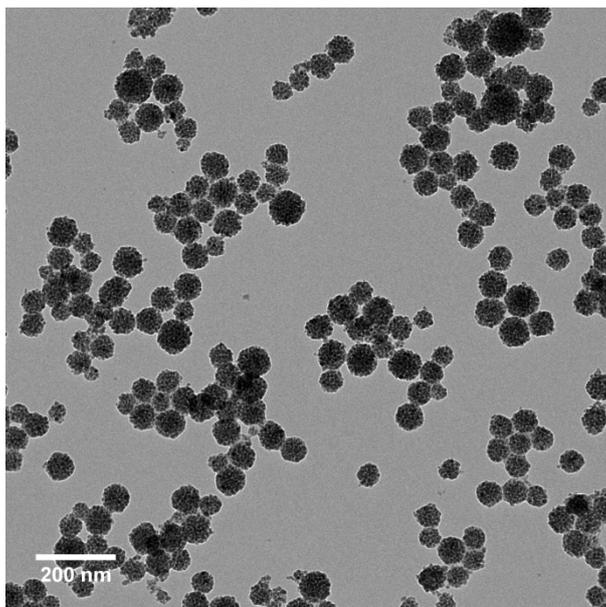
### ***A.3.1 Formation d'une couronne de macromolécules de PEG à la surface des SPC fonctionnalisées par des amines***

Les SPC@SiO<sub>2</sub> présentant une surface de silice, le procédé décrit dans le chapitre précédent qui vise à former une couronne dense de macromolécules de PEO peut leur être directement transféré.

#### ***Mode opératoire III-6 : Modification de surface des SPC@SiO<sub>2</sub> par l'EDPS***

*Un volume de 3 ml d'éthanol est ajouté aux 3 ml de la dispersion de SPC@SiO<sub>2</sub> à 25 g/l en Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- $\gamma$  afin d'obtenir un milieu EtOH/H<sub>2</sub>O (1:1) dans lequel est réalisée la modification de surface par l'aminosilane, puis un volume de 171  $\mu$ l d'EDPS est ajouté sous agitation à la dispersion contenant environ 5,3 m<sup>2</sup> de surface développée. Après 12 h d'agitation, 3 ml de glycérol sont ajoutés afin d'éliminer l'éthanol et l'eau par évaporation sous pression réduite. La dispersion de SPC@SiO<sub>2</sub> dans le glycérol est ensuite portée à 100°C durant 2 h sous vide. Un lavage à l'éthanol est réalisé par centrifugation à 10 000 g durant 15 min, puis le culot est dispersé dans l'éthanol en présence de 100  $\mu$ l d'AcOH. Trois lavages sont réalisés dans l'éthanol par centrifugation à 10 000 g durant 15 min afin d'éliminer l'excès de silane et d'AcOH. A l'issue des lavages, les nanoparticules sont stockées dans 1 ml d'EtOH. Les particules obtenues sont nommées SPC@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.*

L'observation de l'échantillon en MET permet de confirmer que la structure des SPC n'a pas été dégradée par le traitement thermique appliqué durant l'étape de modification de surface par le silane organofonctionnel aminé (**Figure III.21**). Cette observation est confirmée par la mesure en DLS donnant un diamètre hydrodynamique de  $116 \pm 37$  nm ce qui est comparable aux valeurs mesurées sur les SPC50@SiO<sub>2</sub>.



**Figure III.21 :** Micrographie en transmission électronique des SPC@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

Les macromolécules de PEG (PEG-4k-al) sont ensuite greffées à la surface des SPC@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> selon les mêmes modes opératoires présentés dans le chapitre II. Les conditions sont simplement adaptées aux surfaces développées mises en jeu.

**Mode opératoire III-7 : Greffage du PEG-4k-Al à la surface des SPC@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>**

*Le PEG-4k-al (2 g, 0,5 mmol) est solubilisé dans 5 ml de MeOH anhydre. La dispersion de SPC@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> dans l'éthanol (1 ml à 70 g/l en maghémite, 5 m<sup>2</sup> de surface développée) est ajoutée goutte à goutte sous vive agitation. Après 5 min, 16 µl de Et<sub>3</sub>N (114 nmol) sont ajoutés. Le mélange est chauffé à 70°C à reflux durant 12 h sous agitation. Une masse de 40 mg de NaBH<sub>4</sub> (1,1 mmol) est ajoutée et l'agitation se poursuit à température ambiante durant 10 min. Un volume de 1,1 ml d'HCl 1M (1,1 mmol) est alors ajouté. Les nanoparticules subissent un premier lavage par centrifugation à 12 000 g durant 30 min dans un mélange EtOH/DCM (5:1) puis 2 lavages dans l'éthanol à 40 °C. A la suite des lavages, le culot de SPC@SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70 °C</sub> est redispersé dans 5 ml de DMF.*

**Mode opératoire III-8 : Décoration de la couronne de PEG par des fonctions amine**

*Conversion de l'alcool en chlorure d'alkyle : Un volume de 2 ml de solvant est éliminé aux 5 ml de dispersion de SPC@SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70 °C</sub> (5 m<sup>2</sup> de surface développée) dans le DMF par distillation à 50 °C sous pression réduite afin d'éliminer les traces d'EtOH ainsi que les traces d'eau contenues dans le solvant. La dispersion est ensuite placée dans un bain de glace à 4 °C et 30 µl de SOCl<sub>2</sub> (83 µmol/m<sup>2</sup>) sont ajoutés sous agitation, puis 8,4 µl de pyridine (21 µmol/m<sup>2</sup>). Après 5 min, l'ensemble est placé à 75°C sous agitation durant 3 h. Après refroidissement, les nanoparticules sont séparées par centrifugation (15 min, 10 000 g) puis lavées une fois avec du DMF par centrifugation. Le milieu réactionnel est porté à 75 °C sous agitation durant 3 h. Les SPC@SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70 °C</sub>-Cl sont lavées par centrifugation dans le DMF puis le culot est dispersé dans 5 ml de DMF.*

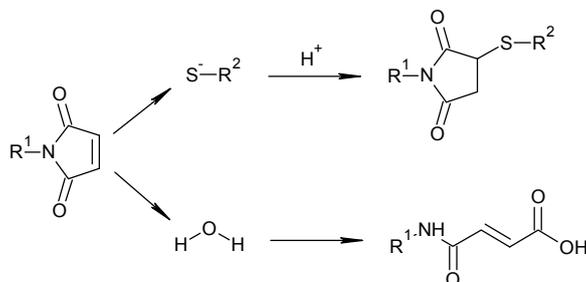
Conversion des chlorures d'alkyle en amine : 28  $\mu\text{l}$  d'éthylènediamine (83  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) sont ajoutés rapidement sous vive agitation aux 5 ml de la dispersion de  $\text{SPC@SiO}_2\text{-PEG-4k}_{70^\circ\text{C}}\text{-Cl}$  dans le DMF. Le mélange est chauffé à  $70^\circ\text{C}$  durant 12 h sous agitation. Après refroidissement les nanoparticules sont lavées 3 fois dans l'éthanol puis 2 fois dans l'eau par centrifugation à 10 000 g durant 15 min. Les nanoparticules nommée  $\text{SPC@SiO}_2\text{-PEG-4k}_{70^\circ\text{C}}\text{-NH}_2$  sont redispersées et stockées dans 2 ml d'eau.

La variation du diamètre hydrodynamique en DLS est similaire à celle observée dans le chapitre II dans les mêmes conditions. En effet, à l'issue du greffage des macromolécules de PEG, le diamètre mesuré est d'environ 160 nm. Cela correspond à une épaisseur d'environ 20-25 nm, indiquant une valeur de densité de greffage en PEG assez proche.

### A.3.2 Greffage de l'annexine A5

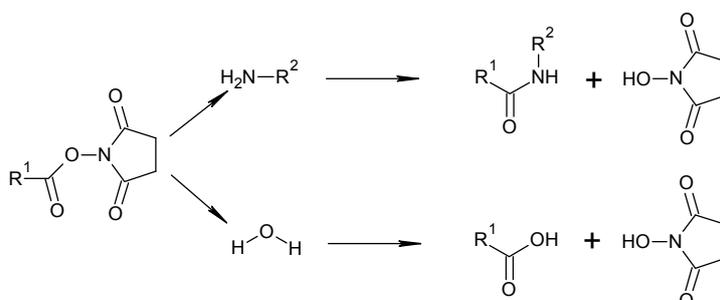
L'annexine A5 (Anx-A5) greffée sur les SPC est une protéine ayant subi une mutation dirigée afin qu'elle exprime une cystéine dans une boucle sur la face opposée aux sites de fixation du calcium.<sup>30</sup> Les fonctions thiols font partie des fonctions chimiques les plus réactives sur une protéine pour réaliser des greffages en milieu aqueux. En effet, avec un pKa d'environ 8,6, plus bas que celui des amines, les thiols réagissent plus rapidement que les amines avec de nombreux réactifs à pH neutre ou proche.<sup>31</sup> La cystéine ajoutée par génie génétique sur la protéine est mise à profit pour réaliser son greffage orienté à la surface des  $\text{SPC@SiO}_2\text{-PEG-4k}_{70^\circ\text{C}}\text{-NH}_2$ .

Le maléimide est une fonction chimique qui est considérée comme spécifique des thiols aux valeurs de pH proches de 7 pour former des liaisons covalentes par addition de Michael (**Figure III.22**). A ces pH, la réaction d'un maléimide avec un thiol est 1000 fois plus rapide qu'avec une amine. Le maléimide devient réactif envers les amines avec l'augmentation du pH. La réaction du maléimide avec le thiol est en compétition avec son hydrolyse en acide maléique. Cette hydrolyse est négligeable à pH neutre comparée à la réaction avec les thiols mais augmente avec l'élévation du pH.<sup>32</sup>



**Figure III.22** : Réaction entre un maléimide et un thiol et hydrolyse d'un maléimide en acide maléique.

L'utilisation d'une macromolécule de POE hétérobifonctionnelle possédant un ester de N-hydroxysuccinimide (NHS) et un maléimide permet de créer le lien entre la surface PEGylée de la particule et l'Anx-A5. L'ester de NHS, réactif envers les amines (**Figure III.23**), étant plus sensible à l'hydrolyse, le PEG hétérobifonctionnel est dans un premier temps greffé à la surface des SPC@SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub>-NH<sub>2</sub>, avant que la protéine soit à son tour greffée via son thiol libre sur la fonction maléimide.



**Figure III.23** : Réaction de l'ester de NHS avec l'amine primaire et hydrolyse de l'ester de NHS.

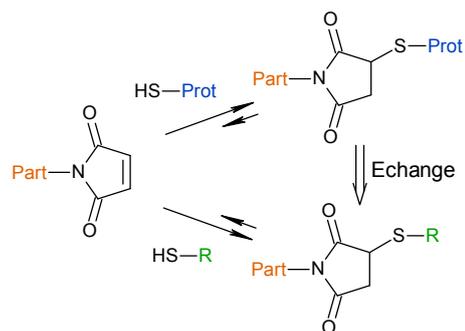
#### **Mode opératoire III-9 : Greffage de l'annexine V sur les SPC@SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub>-NH<sub>2</sub>**

Greffage du NHS-PEG-3,4k-mal sur les SPC@SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub>-NH<sub>2</sub> : Un volume de 55  $\mu$ l de tampon 1 (Tp 1) constitué d'HEPES 200 mM, pH 7,8 est ajouté à 500  $\mu$ l d'une dispersion de SPC@SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub>-NH<sub>2</sub> à 30 g/l en maghémite dans l'eau. L'ensemble est ensuite ajouté à 30 mg de NHS-PEG-3,4k-mal (maleimide-PEG-succinimidyl valerate, 3400 g/mol Laysan Bio). Le mélange est laissé sous agitation à l'abri de la lumière durant 2 h. Un volume de 1 ml de Tp 2 (HEPES 10 mM, pH 7,2, 0,5 mM EDTA) dégazé est ajouté puis l'ensemble est centrifugé 10 min à 10 000 g. Deux autres lavages à l'aide de 1,5 ml du Tp 2 sont réalisés. Les nanoparticules sont ensuite redispersées dans 500  $\mu$ l de Tp 2 puis la concentration en maghémite est déterminée d'après le Mode opératoire A-4. Le greffage de la protéine doit être réalisé immédiatement après. Les particules sont nommées SPC@SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub>-PEG-mal.

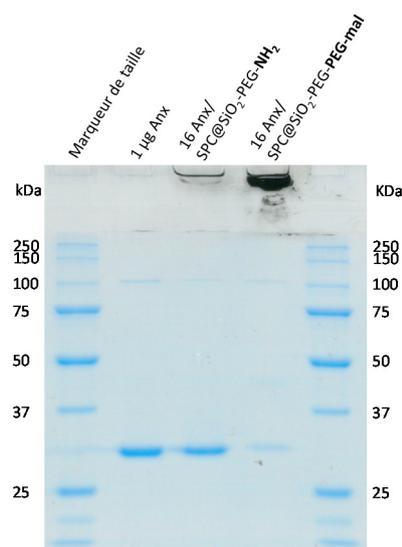
Greffage de l'annexine V mutante (Anx-A5-SH) : Le volume approprié d'Anx-A5-SH (35 kDa, 1,41 mg/ml, dans le Tp 2) est ajouté à la dispersion de nanoparticules obtenue après greffage du NHS-PEG-3,4k-mal. L'ensemble est laissé à réagir durant 12 h à 4 °C. Un prélèvement est réalisé afin de vérifier le greffage par électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante non réductrice (SDS-PAGE). Le reste de l'échantillon est lavé par centrifugation à 10 000 g durant 10 min à l'aide de tampon HEPES 10 mM, pH 7,4.

Le greffage des protéines à la surface des SPC est vérifié par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10 % (SDS-PAGE). Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leur masse, par migration à travers un gel grâce à l'application d'une différence de potentiel électrique. Seules les protéines libres migrent car celles greffées sur les nanoparticules forment des objets trop volumineux. Par comparaison de l'intensité des bandes des échantillons avec celle d'une bande correspondant à un dépôt de 1  $\mu\text{g}$  d'Anx-A5, il est possible d'estimer la quantité de protéine qui a migré et donc de remonter à la quantité de protéines greffées. Cette analyse est très peu consommatrice en échantillon car un dépôt de 1  $\mu\text{g}$  de protéine par puits est suffisant pour obtenir des intensités exploitables après coloration au bleu de Coomassie. L'électrophorèse est réalisée en condition dénaturante (en présence de SDS) afin à la fois de faciliter la migration des protéines dans le gel, mais également de limiter l'adsorption non spécifique des protéines sur les particules, et ainsi limiter le risque de faux positifs. L'addition de réducteur, comme le  $\beta$ -mercaptoéthanol, généralement utilisé pour couper les ponts disulfures ou empêcher l'oxydation des thiols des biomolécules est à éviter. En effet, la réaction de Michael formant le succinimidyl thioéther est en équilibre avec la réaction inverse appelée rétro-Michael, et en présence d'un autre thiol, une réaction d'échange se produirait (**Figure III.24**).<sup>33</sup> Cet échange se traduirait alors par la dissociation de la protéine et de la particule. Il ne serait alors pas possible d'observer le greffage par cette technique.

La **Figure III.25** présente le gel d'électrophorèse réalisé après le greffage de la protéine. L'intensité de la bande correspondant à l'annexine ayant été incubée avec les SPC@SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub>-PEG-mal est très faible par rapport à celle de l'annexine libre, alors que la quantité de protéine déposée correspond à 1  $\mu\text{g}$  pour chaque échantillon. Il

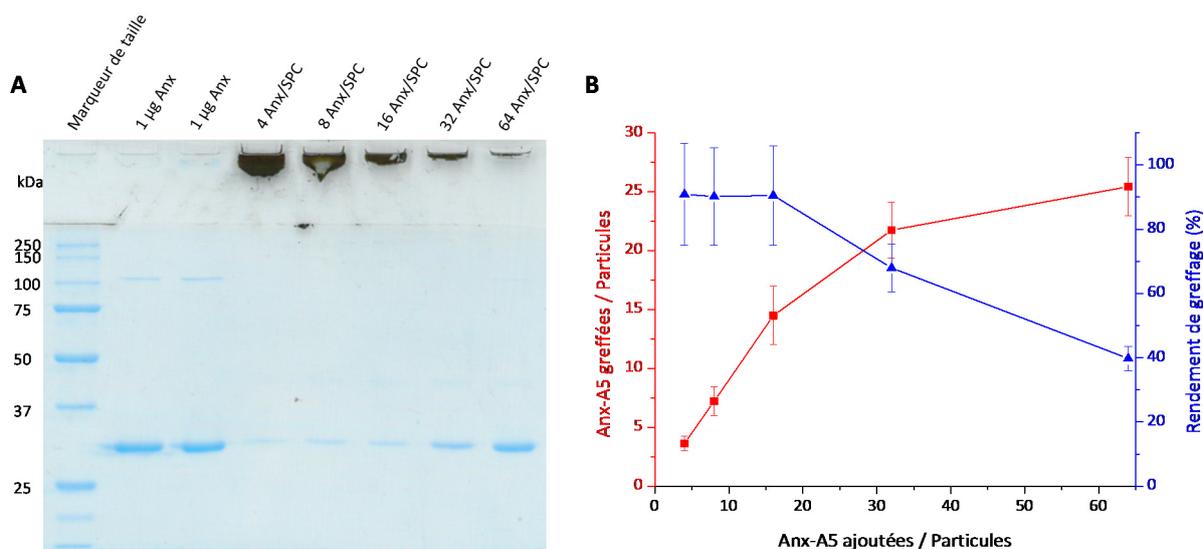


**Figure III.24** : Réactions d'échange de la protéine greffée sur la particule en présence de thiols libres.



**Figure III.25** : SDS-PAGE de 1  $\mu\text{g}$  d'Anx-A5 après incubation avec des particules fonctionnalisées ou non par le NHS-PEG-3,4k-mal.

faut remarquer également, comme attendu, que les Anx-A5 incubées avec les particules SPC@SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub>-NH<sub>2</sub>, sans maléimide, n'ont pas été retenues dans le puit car l'intensité de la bande est très proche de celle de la référence. Cette expérience met en évidence que l'Anx-A5 est greffée sur les SPC grâce à la présence des fonctions maléimide avec un rendement élevé. Le rendement peut être estimé par quantification de l'intensité des bandes avec ImageJ. La linéarité de la coloration a été vérifiée jusqu'à 1 µg de protéine déposée. Le rendement estimé par cette technique est de 90 % pour le ratio appliqué de 16 Anx-A5/SPC.



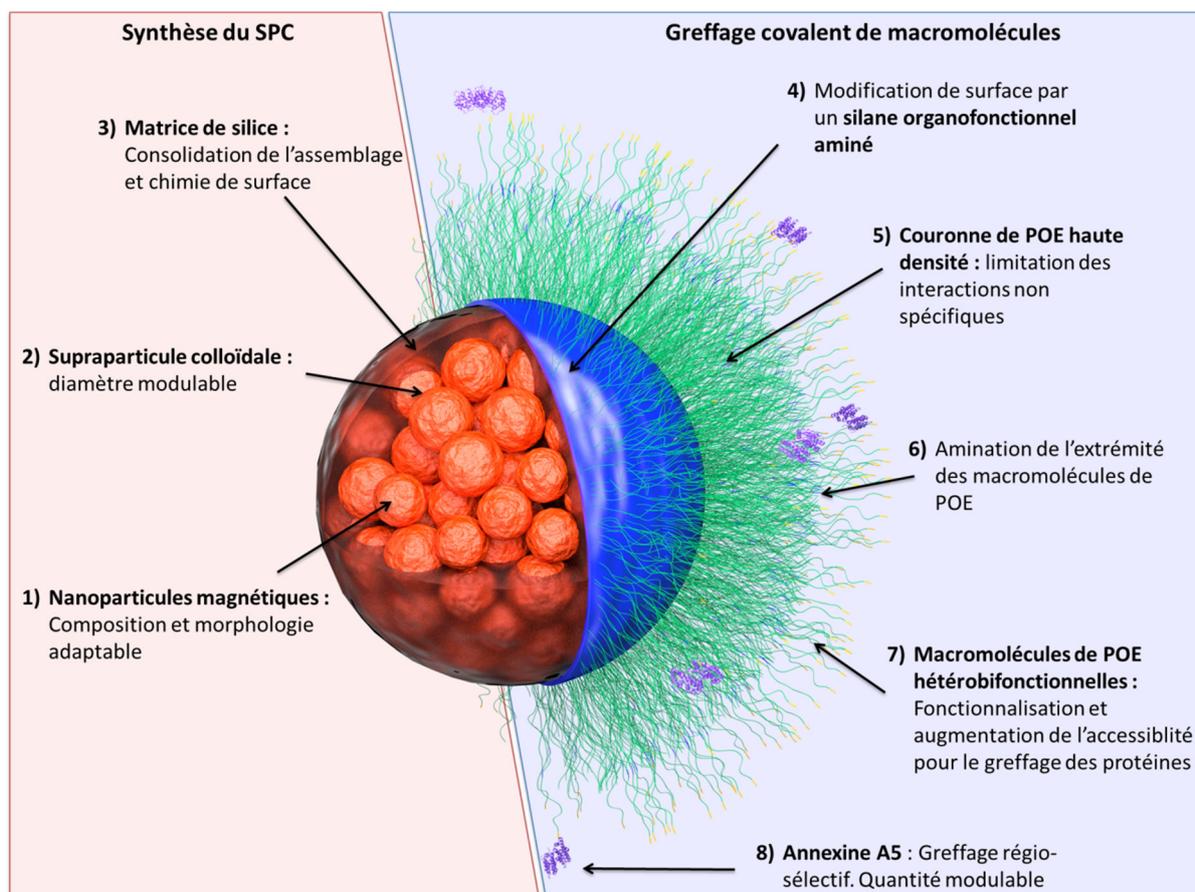
**Figure III.26 : A :** SDS-PAGE de 1 µg d'Anx-A5 après incubation avec différentes quantités de SPC@SiO<sub>2</sub>-PEG-4k<sub>70°C</sub>-PEG-mal (SPC dans la figure). **B :** Quantification des Anx-A5-SH greffées sur les SPC.

Fort de ce résultat, différents ratios d'Anx-A5/SPC ont été testés (**Figure III.26-A et B**) ce qui a permis d'obtenir des taux de fonctionnalisation allant jusqu'à environ 25 Anx-A5 par particules. Cependant, pour atteindre ce niveau de fonctionnalisation, l'excès de protéines à ajouter est élevé, alors que le rendement est très bon (proche de 90 %) pour les fonctionnalisations comprises entre 0 et 16 Anx-A5/SPC. Le nombre théorique d'Anx-A5 pouvant être mise à la surface d'une particule de 80 nm de diamètre (particule + couronne polymère) est d'environ 900, la limite observée n'est donc pas attribuable à une saturation de la surface. Ceci peut s'expliquer par le fait que durant le greffage du NHS-PEG-3,4k-mal sur les particules à pH 7,8 une partie des maléimides est perdue par hydrolyse, cependant il a été montré dans le chapitre II qu'il y avait environ 0,3 maléimides/nm<sup>2</sup> après le greffage du NHS-PEG-3,4k-mal, ce qui revient à environ 3 000 maléimides/SPC50. L'enfouissement d'une partie des fonctions maléimide dans la couronne polymère de PEG peut également être une

explication à la saturation observée. Cette limitation observée n'est pas problématique en soit pour l'application car il a été montré sur des liposomes qu'une seule annexine par objet était suffisante pour promouvoir l'adhésion à des membranes lipidiques.<sup>34</sup>

#### A.4 Conclusion

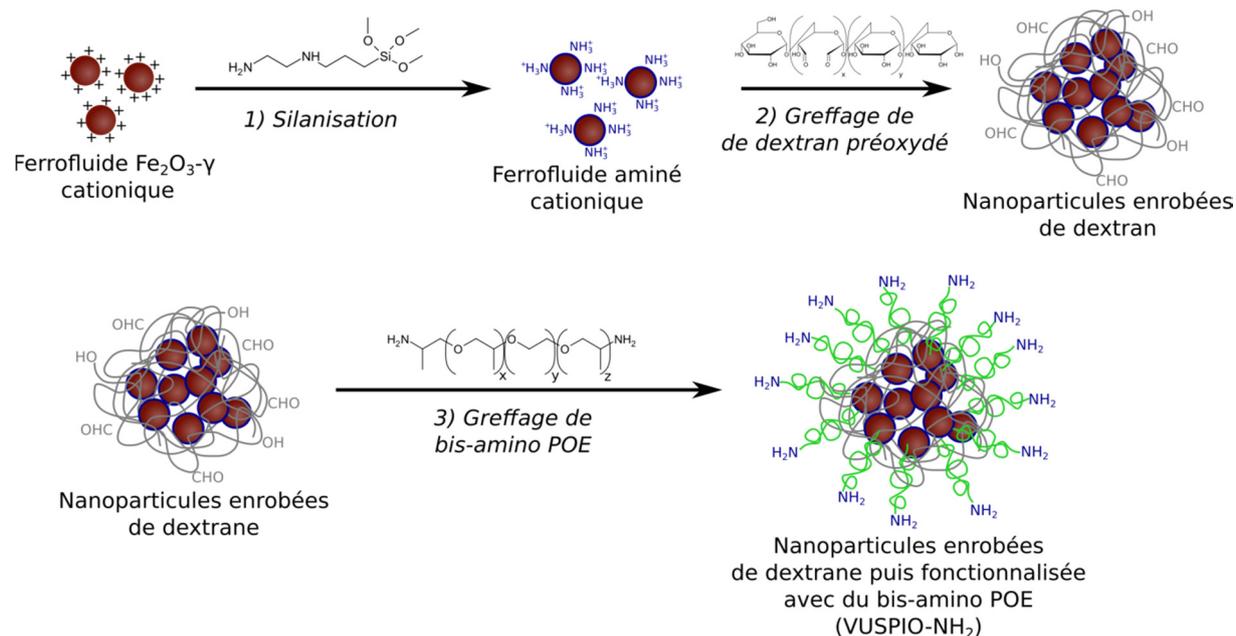
Au cours de cette étude, un nano-objet destiné à l'extraction magnétique de vésicules extracellulaire a été mis en place (**Figure III.27**). Celui-ci présente un volume magnétique élevé tout en restant superparamagnétique, ce qui a été obtenu en formant des supraparticules colloïdales à partir de nanoparticules de maghémite. Ces supraparticules ont été consolidées par une matrice de silice, les rendant compatibles avec de nombreux solvants. Afin de gérer les interactions avec l'environnement biologique dans lequel les particules seront utilisées, une couronne de PEG de haute densité est formée d'après l'étude présentée au cours du chapitre II. Après amination de cette couronne de polymère, il a été possible de greffer une protéine de capture, l'Anx-A5, sur les SPC. Les premiers essais d'extraction de VE grâce à ces particules seront présentés au chapitre suivant.



**Figure III.27** : Représentation à l'échelle d'une SPC@SiO<sub>2</sub> entourée par une couronne de PEG biofonctionnalisée par l'Anx-A5.

## B. Marquage par des sondes fluorescentes dans le PIR et biofonctionnalisation d'un agent de contraste destiné au diagnostic de l'athérosclérose par IRM.

La stratégie de synthèse de la plateforme de fonctionnalisation VUSPIO est décrite à l'aide de la **Figure III.28**. Pour le détail des modes opératoires, le lecteur est invité à se reporter aux travaux de Mornet *et al.*<sup>11,35</sup>



**Figure III.28** : Représentation schématique du VUSPIO-NH<sub>2</sub>. Nanoparticules enrobées de dextrane (gris) puis fonctionnalisées avec du bis-amino POE (vert).

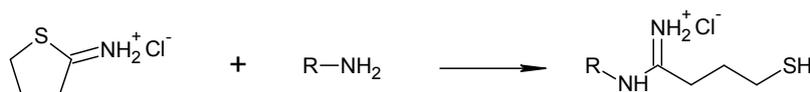
Afin de faciliter la détection de l'agent de contraste sur le petit animal, bien que la structure en grappe permette déjà de concentrer la matière magnétique au niveau de la cible, le premier travail de cette étude a consisté à les marquer par des sondes fluorescentes dans le proche infrarouge (PIR).

### B.1 Marquage de l'agent de contraste avec un fluorophore dans le proche infrarouge

Le greffage des sondes fluorescentes sur les VUSPIO est réalisé à partir des fonctions réactives disponibles, à savoir les amines terminales des chaînes macromoléculaires de PEG présentes à leur surface. L'objectif de cette étude est de contrôler la quantité de fonctions nécessaires au marquage de façon à autoriser les greffages ultérieurs de biomolécules.

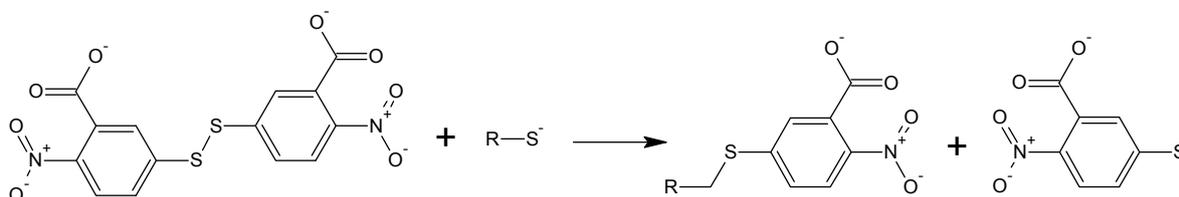
### B.1.1 Fonctionnalisation de l'agent de contraste par des fonctions thiol

La conversion contrôlée d'une partie des amines en thiols permet de gérer la quantité de fonctions amine résiduelles pour le greffage ultérieur de biomolécules. Cette étape est réalisée par réaction avec le 2-iminothiolane (réactif de Traut).<sup>36</sup> Celui-ci réagit avec les amines en milieu aqueux (pH 7-9) pour former une fonction thiol libre comme le montre la **Figure III.29**.



**Figure III.29** : Réaction entre le réactif de Traut et une amine primaire.

Afin de contrôler la quantité d'amines résiduelles après réaction avec le réactif de Traut, une gamme est réalisée. Pour chaque condition, les thiols sont quantifiés grâce à l'acide dithionitrobenzoïque (DTNB<sup>2-</sup>) également connu sous le nom de réactif d'Ellman. Les thiols réagissent avec le DTNB<sup>2-</sup> en clivant le pont disulfure pour donner le 3-thio-6-nitrobenzoate (TNB<sup>-</sup>) (**Figure III.30**). En milieu aqueux basique le TNB<sup>-</sup> est sous forme divalent anionique TNB<sup>2-</sup> possédant un coefficient d'extinction molaire élevé à 412 nm ( $\epsilon_{412\text{ nm}} = 13800\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  déterminé dans le tampon utilisé).



**Figure III.30** : Réaction entre le DTNB<sup>2-</sup> et un composé possédant un thiol libre.

#### Mode opératoire III-10 : Conversion des fonctions amine en fonctions thiol par le réactif de Traut

Un milieu contenant 200  $\mu\text{l}$  d'une suspension de VUSPIO à 19,3 g/l en maghémite auquel est ajouté 200  $\mu\text{l}$  de tampon borate 200 mM, pH 8,0, 10 mM EDTA, est mis à dégazer sous vide durant 5 min, puis placé sous bullage d'argon durant 15 min. Le réactif de Traut (1 eq. Life Technologies) est dissout dans 50  $\mu\text{l}$  d'eau puis immédiatement ajouté à la suspension de VUSPIO. Un équivalent de NaOH est ensuite ajouté en 2 fois. Après 2 h d'agitation, les VUSPIO sont lavés sur une colonne magnétique (Miltenyi biotec) à l'aide d'un tampon dégazé afin d'éviter l'oxydation des thiols (tampon borate 50 mM, pH8,0, 2,5 mM EDTA pour le dosage des thiols, ou tampon HEPES 10 mM, pH 7,2 pour le greffage des fluorophores). Les particules sont nommées VUSPIO-xSH, avec x correspondant aux nombre de fonctions thiol portées par les particules.

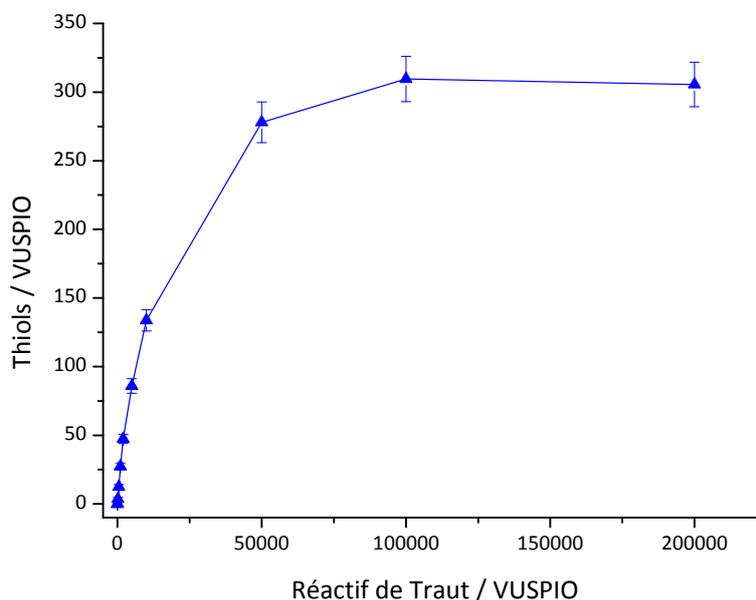
**Mode opératoire III-11 : Dosage des fonctions thiols avec le DTNB<sup>2-</sup>**

Une masse de 4 mg de réactif d'Ellman est solubilisée dans 1 ml de tampon borate 200 mM, pH 8,0, 10 mM EDTA. Un volume de 50  $\mu$ l de cette solution est ajouté aux VUSPIO-thiols dispersés dans 1 ml de tampon borate 50 mM, pH 8,0, 2,5 mM EDTA, dégazé. L'échantillon est laissé 15 min à l'abri de la lumière, puis centrifugé durant 15 min à 55 000 g. Le spectre d'absorbance dans le visible du surnageant est enregistré.

Le coefficient d'extinction molaire pour le TNB<sup>2-</sup> dans ce tampon a été déterminé à l'aide d'une droite étalon. Il est de 13 800 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> à 412 nm.

Le nombre de thiols dosé sur les VUSPIO augmente avec la quantité de réactif de Traut mise en jeu jusqu'à atteindre un plateau vers 300 thiols/VUSPIO (**Figure III.31**). Cette saturation est atteinte avec un large excès de réactif (excès de 300). Dans le cas d'une chimie supportée sur des colloïdes, l'emploi de larges excès de réactif n'est pas surprenant, car la probabilité de rencontre des molécules est moins importante que lorsque la chimie est réalisée en solution. De plus, la réaction entre l'iminothiolane et les amines est en compétition avec l'hydrolyse du réactif de Traut.

Cette valeur maximale de 300 thiols/VUSPIO indique la quantité d'amines disponibles sur le VUSPIO avant cette étape. L'utilisation des amines disponibles doit être partagée judicieusement entre le greffage des sondes fluorescentes et le greffage des biomolécules.



**Figure III.31 :** Graphe montrant l'évolution du nombre de thiols obtenus par VUSPIO en fonction de la quantité de réactif de Traut mise en jeu. Les points sont reliés dans un souci de lisibilité.

Ce travail préliminaire a permis de moduler le nombre de thiols présent sur le VUSPIO de 0 à 300 simplement en modulant l'excès de réactif de Traut mis en jeu durant la réaction. Ainsi, un nombre de thiol bien choisi pourra être généré sur le VUSPIO avant le

greffage des sondes fluorescentes fonctionnalisées par un maléimide, ce qui permettra de garantir la présence d'amines résiduelles pour le greffage ultérieur des biomolécules.

### **B.1.2 Greffage du fluorophore**

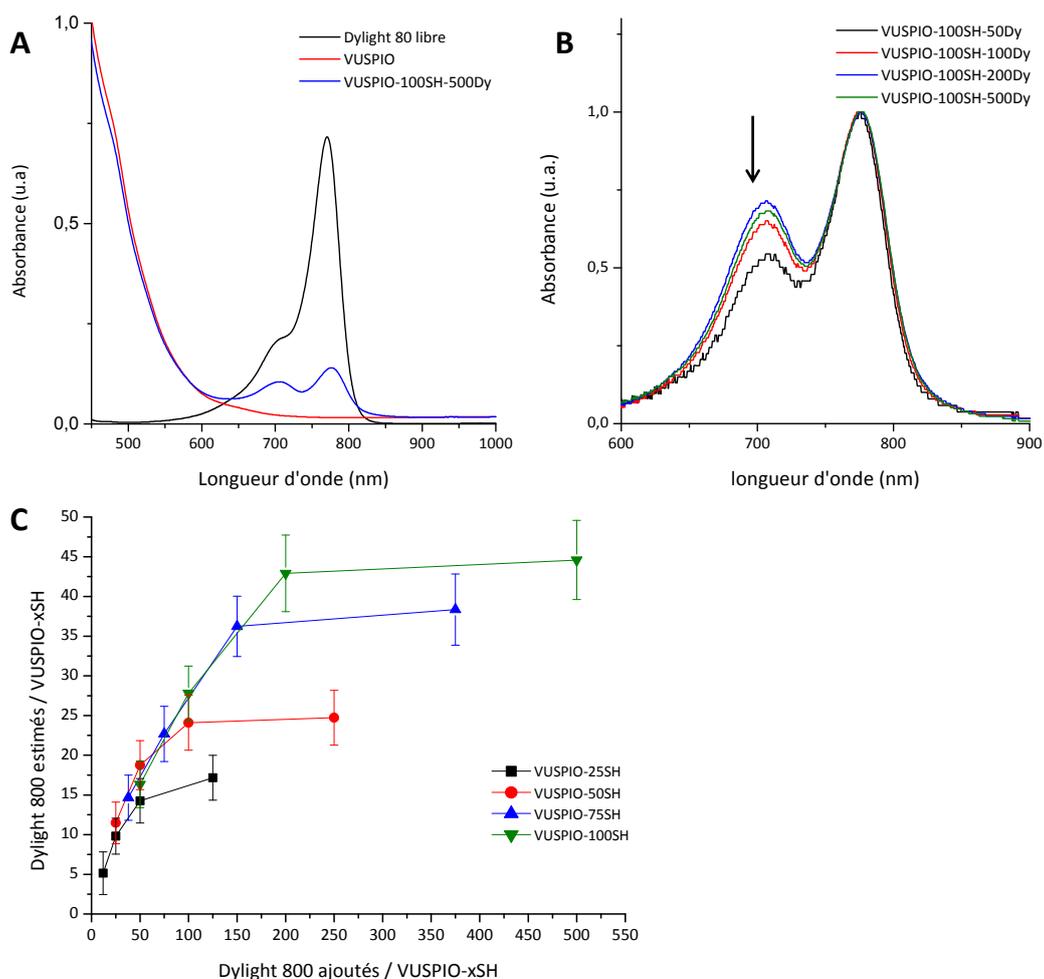
Le greffage du fluorophore est réalisé sur les VUSPIO après avoir converti une partie des amines en thiols grâce à la réaction déjà décrite entre un maléimide porté par la sonde fluorescente et un thiol.

A partir du Mode opératoire III-10, des VUSPIO possédant environ 25, 50, 75 et 100 thiols sont produits. Sur chacun de ces différents VUSPIO, une gamme de fluorophore doit être appliquée. Il est en effet important de s'assurer que tous les thiols ont réagi avec le groupe maléimide porté par les fluorophores. Dans le cas contraire, la présence de thiols résiduels pourrait perturber l'étape ultérieure de greffage de biomolécules.

#### **Mode opératoire III-12 : Greffage du fluorophore Dylight 800 maléimide sur les VUSPIO-xSH**

*Le stock de Dylight 800 maléimide (Thermo scientific) de 1 mg est solubilisé dans 1 ml de DMSO anhydre. Le volume désiré de la solution de fluorophore à 1 g/l est ajouté dans la dispersion de VUSPIO dans du tampon HEPES 10 mM, pH 7,2, précédemment thiolés au taux de conversion désiré. La réaction se poursuit durant 12 h à 4°C. Les particules nommées VUSPIO-xD sont ensuite lavées sur colonne magnétique (Miltenyi biotec) avec de l'eau.*

La quantité de sondes fluorescentes greffées est estimée par mesure de l'absorbance des échantillons après lavage sur colonne magnétique. La quantification des fluorophores greffés sur les particules impose cependant plusieurs limitations. Premièrement, l'environnement local du fluorophore une fois greffé sur la particule n'est pas identique à celui en solution ce qui peut modifier le coefficient d'extinction molaire. Ensuite, il a été observé qu'une contribution secondaire sur le spectre d'absorbance prend de l'importance avec l'augmentation du nombre de fluorophores par particule comme le montre les spectres d'absorbance en **Figure III.32 B**. Cette contribution pourrait être attribuée à l'absorbance de dimères de fluorophores, comme il a déjà été observé pour le bleu de méthylène.<sup>37</sup> La formation de dimères serait favorisée par la proximité des fluorophores une fois greffés sur la particule.



**Figure III.32 :** A : Spectres d'absorbance bruts, B : Contribution normalisée de la sonde fluorescente pour le VUSPIO-100SH présentant différents taux de marquage, C : Estimation du nombre de sondes fluorescentes par VUSPIO d'après l'absorbance à 775 nm.

Afin de s'affranchir de ces contraintes, il aurait été plus aisé de travailler par dosage indirect en quantifiant les fluorophores résiduels dans le surnageant. Cependant, dans le cas de l'utilisation d'un large excès de fluorophore, la quantification aurait été imprécise. Il est, de plus, difficile de garder le contrôle sur la concentration du surnageant avec les lavages sur colonne magnétique.

Le nombre de sondes fluorescentes greffées par VUSPIO est estimé par mesure de l'absorbance à 775 nm. Cette estimation montre que pour chaque VUSPIO-xSH, une saturation en sonde fluorescente est atteinte comme le montre la **Figure III.32 C**. Cette valeur de saturation augmente avec celle du nombre de thiols portés par les VUSPIO.

Cette étude permet ainsi d'utiliser la totalité des thiols présents sur la particule tout en appliquant un excès de fluorophores raisonnable (de l'ordre de 2 par rapport au nombre de thiols présents).

## B.2 Biofonctionnalisation de l'agent de contraste par greffage régiosélectif d'un fragment d'anticorps

Le greffage des fragments d'anticorps est réalisé à nouveau à l'aide de NHS-PEG-3,4k-mal. Cependant, les fragments d'anticorps sont produits en quantité limitée (stock de 2 mg) et sont coûteux à produire et purifier, or, il s'agit ici d'engager une étude de greffage sur de nouvelles particules et de nouvelles biomolécules. La mise au point de ces conditions de greffage avec une protéine modèle (Anx-A5) est présentée en annexe n° 6. Cette étude a permis en amont de valider le greffage de protéines sur les VUSPIO, que ce soit avant ou après le greffage des sondes fluorescentes.

Fort des résultats obtenus avec l'Anx-A5, l'objectif a donc été de transférer cette voie de greffage aux fragments d'anticorps.

### B.2.1 Activation des fragments d'anticorps

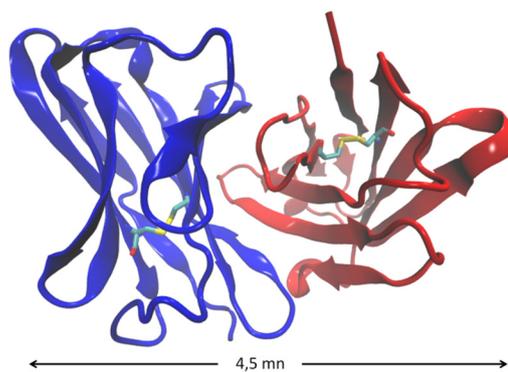
Les scFv-TEG4 ont été sélectionnés sur des plaquettes activées par la technique de « phage display ». A la fin de la séquence protéique, un motif hexa-histidine est ajouté afin de permettre la purification par chromatographie d'affinité sur les colonnes complexant les ions  $Ni^{2+}$ . Sont également ajoutées deux cystéines en fin de chaîne pour le greffage régiosélectif des fragments d'anticorps (**Figure III.33**). Cette étude a été réalisée au RMSB par l'équipe de Gisèle Clofent-Sanchez. Le fragment d'anticorps est ensuite produit chez la levure *Pichia pastoris* et purifié par Majid Nouhban et Xavier Santarelli au sein de l'ENSTBB-EA4135.



**Figure III.33** : Construction du scFv TEG4 produit par génie génétique. VH : domaine variable de la chaîne lourde, VL : domaine variable de la chaîne légère, His : histidine, Gly : glycine, Cys : cystéine.

Avant de réaliser le greffage des scFv-TEG4, il est nécessaire de prendre en considération la disponibilité des cystéines en C-terminal pour le greffage. Le fait que ces cystéines soient présentes en fin de séquence laisse penser qu'elles ne sont pas enfouies dans la structure, idée également appuyée par le fait qu'elles se trouvent en C-terminal du motif histidine utilisé pour la purification (**Figure III.33**).

Cependant, bien que les cystéines soient exposées à l'environnement, celles-ci peuvent se trouver sous forme de pont disulfure, les rendant inutilisables dans l'état. Du fait de la rigidité des liaisons amides, la formation de ponts disulfures entre deux cystéines adjacentes n'est pas favorable. Cependant, ces ponts existent tout de même au sein de certaines protéines et semblent jouer un rôle important dans leur régulation conformationnelle redox dépendante.<sup>38,39</sup> Il est donc probable que les deux cystéines adjacentes en C-terminal forment un pont disulfure intramoléculaire. De plus, ces cystéines peuvent former des ponts disulfures avec d'autres molécules possédant des thiols comme le glutathion, avant ou durant la purification. Il est également possible qu'il se forme des dimères de scFv. La probabilité pour que les thiols présents en C-terminal soit libres est donc très faible. Avant toute tentative de greffage des scFv sur les particules, il est donc nécessaire de procéder à une étape de réduction de ces cystéines. Cependant, la structure des immunoglobulines est connue pour reposer sur la présence d'un pont disulfure au sein des domaines afin de maintenir les deux feuillets  $\beta$  ensemble (**Figure III.34**). Les conditions de réduction doivent donc être adaptées pour activer les cystéines en C-terminal sans toucher aux ponts disulfures internes.

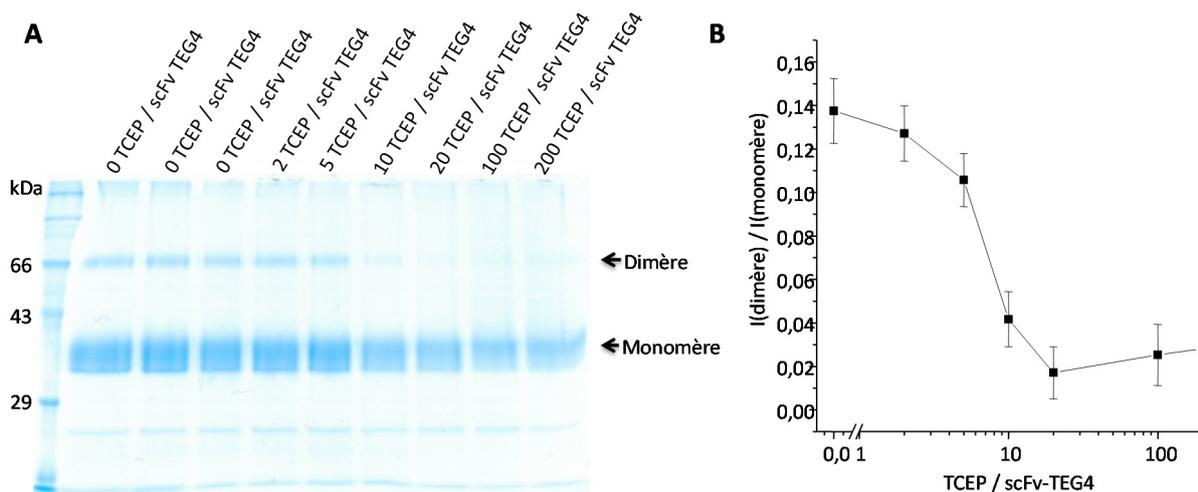


**Figure III.34** : Structure 3D d'un scFv représenté avec les ponts disulfures internes (pdb: 1P4I) (La boucle reliant les deux domaines n'est pas résolue).

Le tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) est un agent réducteur connu pour réduire les ponts disulfures accessibles sans toucher à ceux enfouis dans la structure en absence de dénaturation. De plus, ce réducteur est compatible avec l'utilisation de maléimides. Cela évite ainsi le lavage des biomolécules après la réduction contrairement aux réducteurs basés sur les thiols comme le dithiothréitol ou le  $\beta$ -mercapthoéthanol.<sup>32</sup>

La fraction de dimères naturellement présente après purification permet de suivre la réduction des cystéines présentes en C-terminal. Après incubation des scFv-TEG4 en présence d'un excès variable de TCEP en tampon MES 100 mM, pH 7,2 durant 30 min à 4 °C, les échantillons sont étudiés par SDS-PAGE en conditions non réductrices.

La **Figure III.35** montre que le dimère a presque totalement disparu à partir d'un excès de 20 molécules de TCEP par scFv-TEG4.



**Figure III.35 :** A : Suivi de la réduction des ponts disulfures en C-terminal par SDS-PAGE, B : Evolution du rapport des intensités des bandes en fonction de l'excès de TCEP.

D'un point de vue général, les ponts disulfures intramoléculaires sont censés être plus difficiles à réduire que les ponts disulfures intermoléculaires étant donné que la séparation des deux cystéines ne se traduit pas par la séparation de deux molécules, n'apportant ainsi pas un gain d'entropie au système contrairement à la réduction de ponts disulfures intermoléculaires. Le suivi de la disparition du dimère n'est donc pas un indicateur direct de la réduction des ponts disulfures intramoléculaires. Cependant, comme il a été dit auparavant, la formation d'un pont disulfure entre deux cystéines adjacentes n'est pas favorable, sa réduction est donc plus aisée que pour un pont disulfure classique. C'est pourquoi, dans cette étude, nous utilisons uniquement la disparition du dimère comme marqueur de réduction, bien que cela soit discutable.

### B.2.2 Greffage des fragments d'anticorps

Le greffage des fragments scFv-TEG4 sur les VUSPIO-50D est réalisé après réduction des cystéines présentes à l'extrémité C-terminale en présence d'un excès de 20 TCEP par scFv-TEG4.

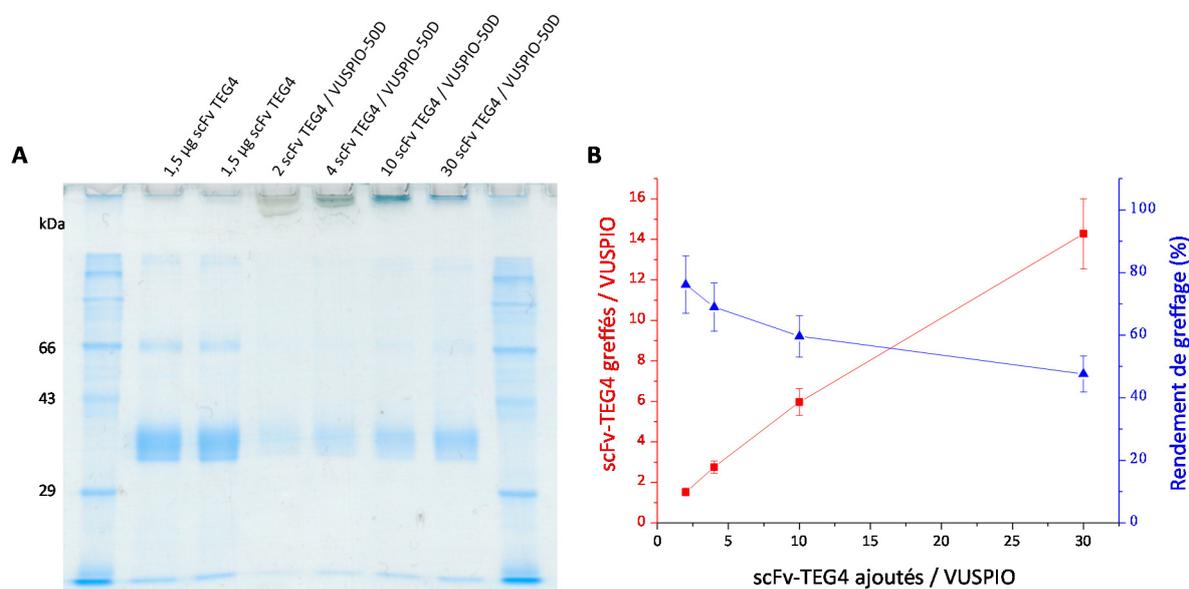
#### Mode opératoire III-13 : Biofonctionnalisation des VUSPIO avec les scFv-TEG4

Greffage du PEG hétérobifonctionnel ester de NHS-maléimide (NHS-PEG-3,4k-mal) via l'extrémité ester de NHS sur les amines : La quantité de NHS-PEG-3,4k-mal ( $M_w = 3400 \text{ g.mol}^{-1}$ , Laysan Bio) correspond à 10 fois la quantité d'amines présentes sur les VUSPIO. Cette quantité de PEG est directement solubilisée dans la suspension de VUSPIO dans un tampon HEPES 10 mM, pH 7,8. Après 2 h de réaction, la suspension de particules est lavée sur colonne magnétique avec du tampon HEPES 10 mM, pH 7,2. Il est important de rapidement passer au lavage et abaisser le pH à 7,2 afin de diminuer la vitesse d'hydrolyse des fonctions maléimide.

Activation des scFv par réduction des cystéines avec le TCEP : Le stock initial de scFv (32 kDa) est à une concentration de  $180 \text{ mg.l}^{-1}$  dans un tampon MES 100 mM, pH 7,2. Une solution de TCEP à 1 mM est fraîchement préparée et un volume de cette solution est ajouté afin d'obtenir un rapport  $n(\text{TCEP}) / n(\text{scFv}) = 20$ . La réduction se poursuit durant 30 min à 4°C.

Greffage des scFv sur les VUSPIO par thio-alkylation : Tout de suite après le lavage puis le dosage des VUSPIO, les scFv sont ajoutés à la dispersion. La réaction se poursuit à 4°C durant 12 h. Les nanoparticules sont ensuite dialysées (seuil de coupure 300 kDa) contre le tampon de travail.

Avant la dialyse, un prélèvement est effectué sur chaque échantillon afin de le déposer sur gel d'électrophorèse et de déterminer les quantités de protéines greffées.



**Figure III.36** : A : Gel SDS-PAGE (dépôt : 1,5 µg/puit), B : Quantification du greffage à partir de l'intensité des bandes présentes sur le gel.

La **Figure III.36** (A et B) montre que l'intensité des bandes des échantillons correspondant à différentes concentrations en scFv placés en présence des particules fonctionnalisées est plus faible que celle des références correspondant à la protéine seule. Cela permet de valider le greffage des fragments scFv-TEG4 sur les particules. Nous avons ainsi obtenu une gamme de particules possédant entre 1,5 et 14 scFv-TEG. Ces valeurs représentent le nombre moyen de protéines greffées par particules, mais en réalité le greffage étant aléatoire, la population est composée de particules possédant des nombres variables de protéines.

Une agrégation partielle de l'échantillon a été observée pour des VUSPIO présentant 22 scFv. En effet, les particules bioconjuguées possèdent un diamètre hydrodynamique pondéré en nombre autour de 50 nm, alors que le diamètre mesuré des VUSPIO possédant 22

scFv est de 108 nm. Cette agrégation est probablement due à la présence des fragments d'anticorps, ayant eux-mêmes tendance à s'agréger pour des concentrations élevées. Cette hypothèse est consolidée par le fait qu'il a été observé que les scFv-TEG4 formaient des agrégats durant le stockage pour un lot à 0,4 g/l. Ce comportement est bien identifié avec les fragments d'anticorps.<sup>40,41</sup> Bien qu'une nanoparticule soit colloïdalement stable, la prédisposition d'une protéine à s'agréger peut tout à fait entraîner l'agrégation des nanoparticules sur laquelle les protéines sont greffées.

Cette étude de bioconjugaison des VUSPIO par des fragments scFv montre une limite haute en terme de taux de greffage inhérente aux comportement de la protéine utilisée à des concentrations plus élevée. Afin d'améliorer encore ce taux de greffage, il serait nécessaire de chercher à limiter ces phénomènes d'agrégation en recherchant les régions promotrices d'agrégation dans la structure de la protéine, et modifier les acides aminés responsables, tout en conservant l'affinité pour la cible. Ce travail, certes lourd à mettre en place, aurait des répercussions positives sur le stockage mais également très certainement sur le niveau d'expression du fragment d'anticorps, deux points importants dans l'industrie des anticorps.

### B.3 Conclusion

Au cours de cette partie, la biofonctionnalisation d'un agent de contraste pour l'imagerie multimodale *in vivo* par IRM et imagerie de fluorescence dans le PIR sur le petit animal des plaques d'athérome a été abordée. Cette étude a permis de mettre en place une stratégie de greffage optimisée de sondes fluorescentes sur le VUSPIO représenté ici en **Figure III.37**. Par le jeu de fonctions orthogonales NH<sub>2</sub> / ester de NHS et SH / maléimide, et par la quantification de ces fonctions de surface, il a été possible de contrôler le marquage par des sondes fluorescentes tout en laissant suffisamment de fonctions disponibles en vue du greffage de protéines de ciblage. Le contrôle du nombre de biomolécules impliquant le jeu de couplage maléimide / thiol a été appliqué sur le VUSPIO. Une étude préliminaire a été réalisée pour mettre en place les conditions opératoires préalables de bioconjugaison des fragments d'anticorps via une protéine modèle de poids moléculaire équivalent (Anx-A5-SH) (Annexe n° 6). Le taux de greffage de protéines scFv obtenus varie de 1 à 14 par particules, ce qui constitue une bonne base pour l'étude des propriétés de liaison à la cible intégrine et de ciblage actif *in vivo* (présentées dans le chapitre suivant).

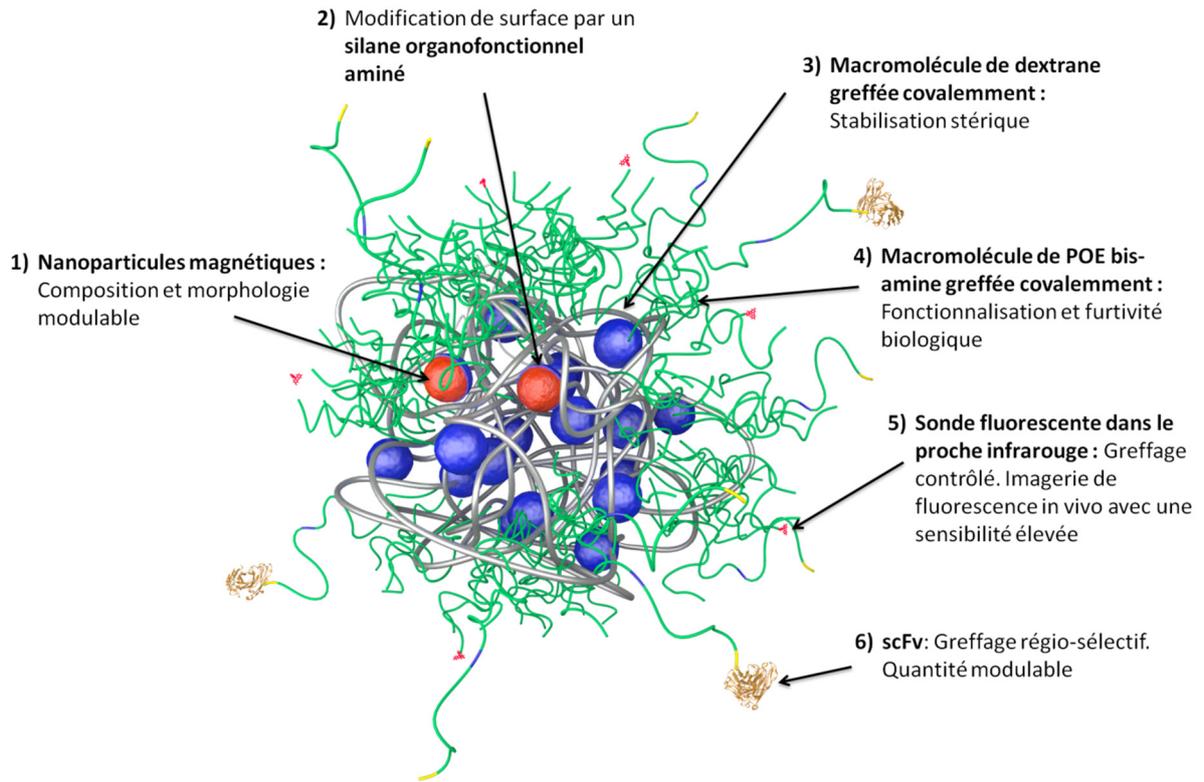
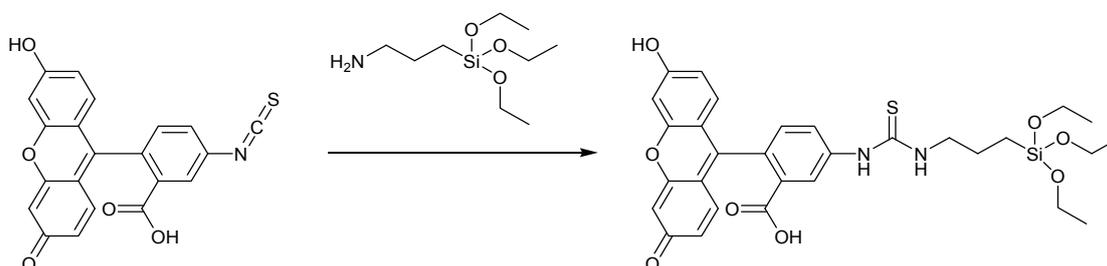


Figure III.37 : Représentation du VUSPIO et de ces différentes caractéristiques.

## C. Elaboration et chimie de surface de nanoparticules de silice fluorescentes destinées au marquage *in vivo* de tumeurs.

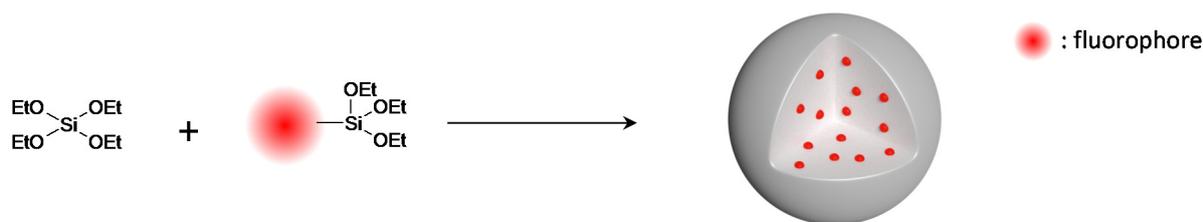
### C.1 Synthèse des nanoparticules bi-fluorescentes

L'équipe de van Blaaderen a été la première à présenter l'incorporation covalente de fluorophores organiques au sein de nanoparticules de silice.<sup>42</sup> Cette synthèse est basée sur le greffage covalent entre un fluorophore organique disposant d'une fonction isothiocyanate et un agent de couplage silanique organofonctionnel aminé (**Figure III.38**).



**Figure III.38** : Exemple de synthèse d'un organosilane fluorescent à partir de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et de l'APS pour la réalisation de nanoparticules hybrides.

Ce composé est par la suite co-condensé avec le TEOS durant la synthèse des nanoparticules par voie sol-gel (**Figure III.39**). L'équipe de Wiesner a poursuivi le développement de ces nanoparticules fluorescentes et propose des synthèses permettant de produire des objets présentant un diamètre modulable entre 10 et 30 nm de diamètre.<sup>43-45</sup>



**Figure III.39** : Procédé de synthèse de nanoparticules de silice fluorescentes.

La synthèse utilisée dans le cadre de cette étude est également adaptée des travaux de Stöber et van Blaaderen. Les fluorophores utilisés sont dérivés de la fluorescéine, pour les études à l'échelle cellulaire, et de la cyanine 7.5 (Cy 7.5) pour l'imagerie *in vivo* dans le proche infrarouge. Ces deux fluorophores sont suffisamment éloignés pour ne pas présenter de phénomène de FRET. Les deux organosilanes fluorescents découlant de la fluorescéine et de la Cy 7.5 sont co-condensés avec le TEOS dans un milieu hydro-alcoolique basique.

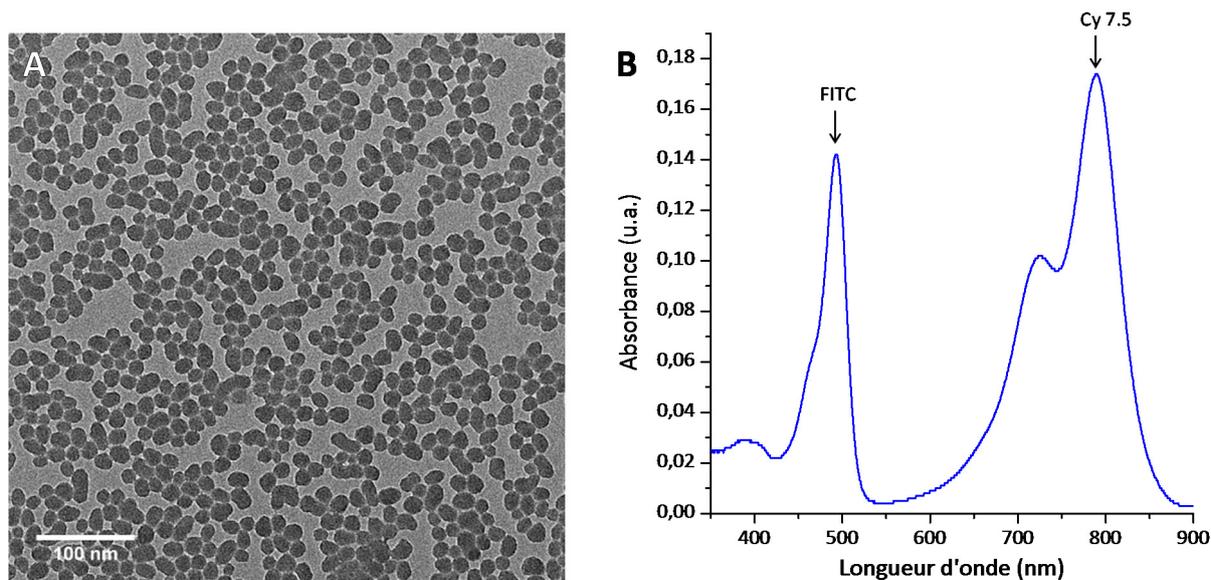
**Mode opératoire III-14 : Synthèse de nanoparticules de silice bi-fluorescentes de 15 nm de diamètre**

Synthèse de l'organosilane de fluorescéine (silane fluorescent 1) : Une masse de 4,66 mg d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, Thermo Scientific™,  $1,2 \cdot 10^{-5}$  mol, 1 eq.) est solubilisée dans 4,62 ml d'EtOH anhydre, puis 45  $\mu$ l de (3-aminopropyl)triéthoxysilane (Sigma Aldrich,  $2,4 \cdot 10^{-4}$  mol, 20 eq.) sont ajoutés. L'ensemble est laissé sous agitation à l'abri de la lumière durant 2 h avant d'être utilisé pour la synthèse des nanoparticules.

Synthèse de l'organosilane de cyanine 7.5 (Cy 7.5) (silane fluorescent 2) : Une masse de 6,33 mg de cyanine 7.5-maléimide (Lumiprobe,  $7,8 \cdot 10^{-6}$  mol, 1 eq.) est solubilisée dans 800  $\mu$ l de DMSO anhydre, puis la solution est ajoutée à 2 ml d'EtOH anhydre contenant 5,8  $\mu$ l de (3-mercaptopropyl)triméthoxysilane (Sigma Aldrich,  $3,4 \cdot 10^{-5}$  mol, 4 eq.). L'ensemble est laissé sous agitation à l'abri de la lumière durant 2 h avant d'être utilisé pour la synthèse des nanoparticules.

Synthèse des nanoparticules de silice bi-fluorescentes : Une solution A est composée de : 29,5 ml d'ammoniaque (30 % m/m), 2,9 ml d'H<sub>2</sub>O, et de 794 ml d'EtOH. La solution B est composée de 293 ml d'EtOH, 6,1 ml de TEOS, 3,06 ml de la solution de silane fluorescent 1 et 2,8 ml de la solution de silane fluorescent 2. La solution B est rapidement versée dans la solution A sous vive agitation. La réaction se poursuit durant 12 h avant d'éliminer l'ammoniaque par évaporation sous pression réduite à 50 °C. Les particules sont nommées NP-SiO<sub>2</sub>F.

Les nanoparticules obtenues à partir du Mode opératoire III-14 mesurent environ 15 nm de diamètre (**Figure III.40-A**). La présence des deux fluorophores est confirmée par la mesure du spectre d'absorbance de l'échantillon. En effet, le spectre présente la contribution de la fluorescéine avec un maximum d'absorbance vers 490 nm et la contribution de la Cy 7.5 avec un maximum d'absorbance à 790 nm (**Figure III.40-B**).



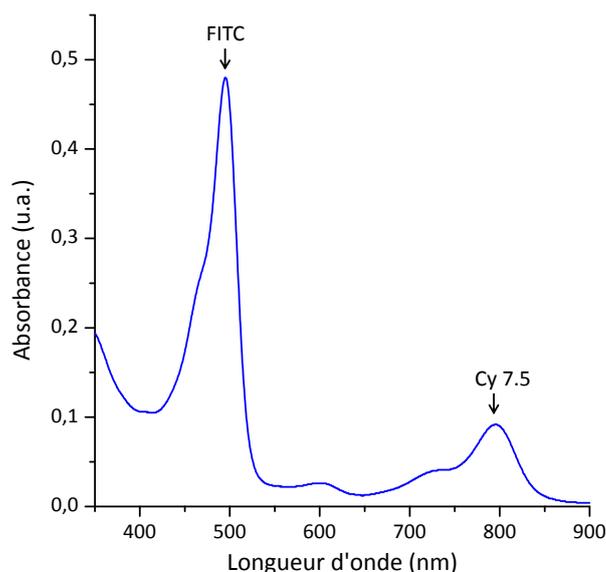
**Figure III.40** : A : Micrographie en MET des nanoparticules de silice bi-fluorescentes, B : Spectre d'absorbance des nanoparticules bi-fluorescentes.

Afin d'augmenter la demi-vie plasmatique des nanoparticules après injection, la modification de surface développée dans le chapitre II basée sur la PEGylation des nanoparticules est appliquée à ces particules. Pour cela, la surface doit dans un premier temps être modifiée chimiquement avec le silane organofonctionnel aminé par l'EDPS.

#### **Mode opératoire III-15 : Modification chimique de surface des nanoparticules de silice bi-fluorescentes avec l'EDPS**

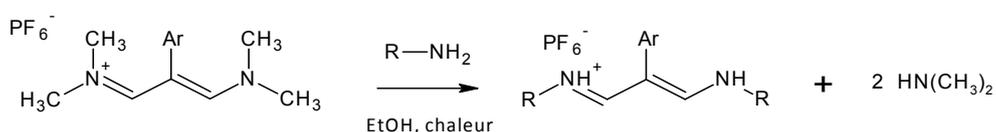
*Un volume de 5,3 ml d'EDPS est ajouté sous forte agitation à la moitié du sol obtenu à partir du Mode opératoire III-14, correspondant à 0,8 g de nanoparticules de silice de 15 nm de diamètre dispersé dans 500 ml. L'ensemble est laissé sous agitation durant 12 h, avant que 100 ml de glycérol soient ajoutés et que l'éthanol ainsi que l'eau soient évaporés sous pression réduite. Le milieu est ensuite placé sous vide à 100 °C durant 2 h. L'excès d'EDPS ainsi que le glycérol sont alors éliminés par ultrafiltration tangentielle à travers une membrane possédant un seuil de coupure de 300 kDa. Les nanoparticules sont nommées NP-SiO<sub>2</sub>F-NH<sub>2</sub>.*

Au cours du traitement thermique une modification de la couleur de l'échantillon est observée. Cette évolution aurait pu être simplement liée au changement de milieu, cependant le surnageant du premier lavage était également fortement coloré. Le spectre d'absorbance des nanoparticules aminées (**Figure III.41**), montre que la contribution de la Cy 7.5 est bien plus faible après la modification de surface par rapport à la contribution de la FITC. Les spectres sont enregistrés en milieu basique car la fluorescéine servant de référence est sensible aux variations de pH en milieu acide. La Cy 7.5 est donc partiellement dégradée durant le traitement thermique.



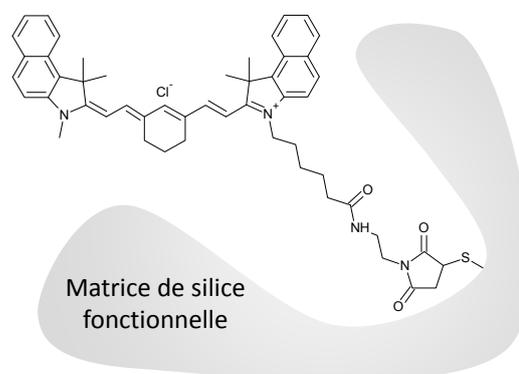
**Figure III.41** : Spectre d'absorbance des nanoparticules de silice bi-fluorescentes après la modification chimique de surface par l'EDPS.

Des essais sur le fluorophore seul ont montré que ce n'est pas le traitement thermique qui est la cause de la dégradation, mais la présence des amines primaires additionnée à la température élevée. Un contrôle sans silane avec de l'ammoniaque seul ne présentait aucun effet sur la Cy 7.5, alors que le même contrôle réalisé en présence d'éthylènediamine montrait la dégradation du fluorophore. La Cy 7.5 pourrait subir une réaction d'échange comme illustré en **Figure III.42**.<sup>46</sup>



**Figure III.42** : Réaction d'échange possible en présence d'un excès d'amines, adapté de la référence<sup>46</sup>. Ar : noyau aromatique.

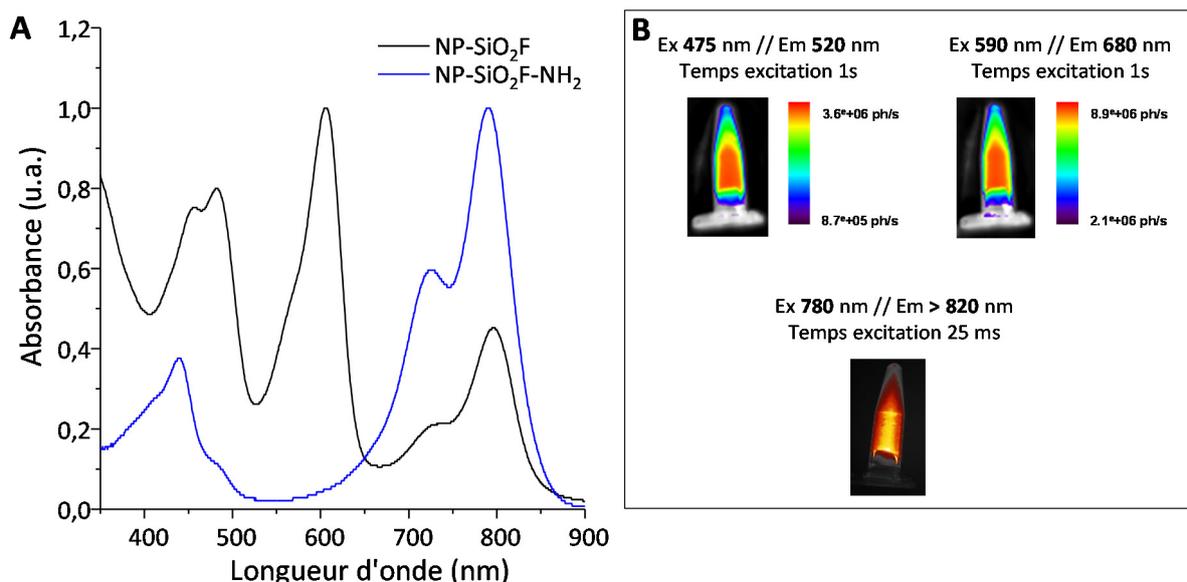
Cette réaction expliquerait à la fois le changement de couleur et la dissociation d'une partie du fluorophore de la matrice de silice se retrouvant dans le surnageant étant donné que la molécule est liée à la matrice de silice via un des azotes (**Figure III.43**). Ce résultat laisse penser que les molécules d'EDPS arrivent à diffuser au sein de la matrice de silice qui est très poreuse. Il faut également avoir à l'esprit que ces nanoparticules sont très réactives de par leur faible diamètre. La déstabilisation irréversible par



**Figure III.43** : Structure de la Cy 7.5 et lien à la matrice de silice.

coalescence simplement due au fait de les concentrer durant les lavages en est la preuve. Ces nanoparticules constituées de macromolécules de polysiloxanes réticulés pourraient donc présenter un certain comportement visqueux qui serait d'autant plus élevée que la modification chimique de surface est réalisée à 100 °C. Ce comportement pourrait également être responsable de l'exposition des fluorophores à l'environnement, et donc aux amines.

Il a été, de plus, observé que lorsque le spectre d'absorbance des particules modifiées est enregistré en condition acide, une nouvelle bande d'absorption est présente vers 607 nm après le traitement thermique (**Figure III.44-A**). Cette bande d'adsorption correspond également à un fluorophore comme le montre la **Figure III.44-B**. Ces observations confortent l'idée de la dégradation par la réaction présentée en **Figure III.42** car celle-ci aboutit à la formation d'un composé présentant une aromaticité moins étendue que la molécule initiale, et donc un décalage de l'absorbance-fluorescence vers les faibles longueurs d'onde. La molécule formée mériterait cependant une caractérisation plus poussée pour confirmer l'hypothèse.



**Figure III.44** : **A** : Spectres d'absorbance enregistrés en milieu acide. **B** : observation des NP-SiO<sub>2</sub>F-NH<sub>2</sub> en fluorescence (Ex 475 nm et Ex 590 nm : caméra NightOWL II LB 983 (Berthold Technologies) ; Ex 780 nm : Fluobeam (Fluooptics)), images réalisées par Coralie Genevois (RMSB, Vivoptic).

La PEGylation développée dans le chapitre II a été validée pour une modification chimique de surface optimisée. Cette surface présentant une densité élevée d'amines accessibles est à la base des bons résultats obtenus sur la densité de greffage des macromolécules de PEG. Il n'est donc pas question ici de changer le mode opératoire de cette étape pour limiter la dégradation du fluorophore.

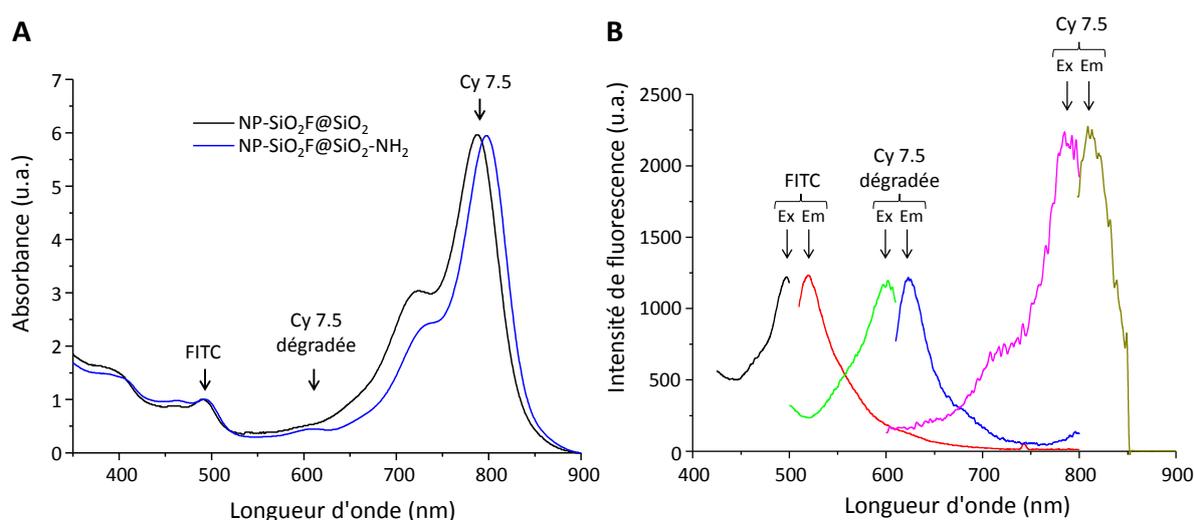
Une autre piste a consisté à faire croître une fine couche de silice à la surface des nanoparticules fluorescentes déjà formées afin de protéger le cœur hybride fluorescent.

#### **Mode opératoire III-16 : Encapsulation des nanoparticules de silice bi-fluorescentes dans une écorce de silice**

Une synthèse identique à la synthèse présentée dans le Mode opératoire III-14 est réalisée, à la différence près qu'après les 12 h de réaction, l'ammoniaque n'est pas éliminé, mais 329 ml d'eau sont ajoutés. Un volume de 4,4 ml de TEOS est ensuite introduit à un flux de 0,5 ml/h à l'aide d'un pousse seringue. La réaction se poursuit encore 4 h après la fin de l'ajout du TEOS, avant que l'ammoniaque soit éliminée par évaporation sous pression réduite. Les nanoparticules obtenues sont nommées NP-SiO<sub>2</sub>F@SiO<sub>2</sub>.

A partir d'une nouvelle synthèse ayant donnée des nanoparticules de 13 nm de diamètre, une couche de silice de  $2 \pm 0,5$  nm d'épaisseur est ajoutée par croissance ensemencée. Les nanoparticules ainsi obtenues mesurent finalement 18 nm de diamètre. Les spectres d'absorbance présentés en **Figure III.45-A** montrent que la présence d'une couche de silice supplémentaire protège la Cy 7.5 de la dégradation chimique. La couche supplémentaire empêcherait la diffusion des molécules d'EDPS jusqu'au cœur marqué, ou alors cette protection pourrait être liée à l'augmentation du diamètre des nanoparticules, et donc à la diminution de la réactivité des nano-cœurs de silice.

D'autre part, le marquage par la FITC a été moins efficace lors de cette synthèse, du fait de la sensibilité des fonctions isothiocyanate vis-à-vis de l'hydrolyse. De fait, la reproductibilité des synthèses est dépendante du niveau d'hydrolyse du précurseur et de la teneur en eau du solvant (EtOH).



**Figure III.45 : A :** Spectres d'absorbance des NP-SiO<sub>2</sub>F@SiO<sub>2</sub> avant (noir) et après modification chimique de surface (bleu) mesurés à pH basique, normalisés à 495 nm. **B :** Spectre d'excitation (Ex) et d'émission (Em) des sondes fluorescentes présentes dans les NP-SiO<sub>2</sub>F@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

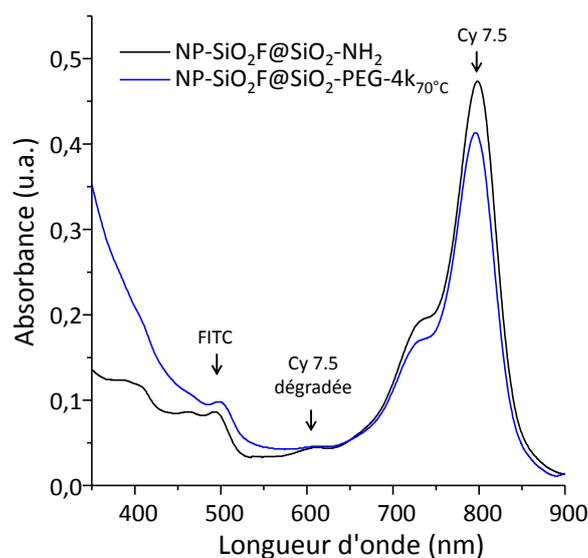
La **Figure III.45-B** confirme la présence des trois fluorophores au sein des nanoparticules.

Le greffage des macromolécules de PEG est réalisé d'après l'étude présentée dans le chapitre II. La présence du fluorophore est vérifiée à l'issue des différentes étapes de greffage et de la fonctionnalisation des macromolécules de PEG.

**Mode opératoire III-17 : Greffage du PEG-4k-al à la surface des nanoparticules bi-fluorescentes aminées**

Une masse de 12 g de PEG-4k-al est solubilisée dans 30 ml de MeOH anhydre, puis sous vive agitation, 3 ml d'une dispersion de nanoparticules bi-fluorescentes à 86 g/l dans l'éthanol sont ajoutés goutte à goutte. Après 5 min, 172  $\mu$ l d' $\text{Et}_3\text{N}$  sont ajoutés. Le mélange est laissé sous agitation durant 4 h à reflux à 70°C. Une masse de 290 mg de  $\text{NaBH}_4$  est ajoutée et l'agitation se poursuit à température ambiante durant 10 min. Un volume de 7,9 ml d' $\text{HCl}$  1M est alors ajouté. L'excès de PEG est éliminé par ultrafiltration tangentielle avec une membrane possédant un seuil de coupure de 300 kDa dans le méthanol. Après 4 lavages, chacun équivalent à un facteur de dilution de 15, les nanoparticules sont dispersées dans 17 ml de méthanol et nommées NP-SiO<sub>2</sub>-bifluo-PEG-4k<sub>70°C</sub>.

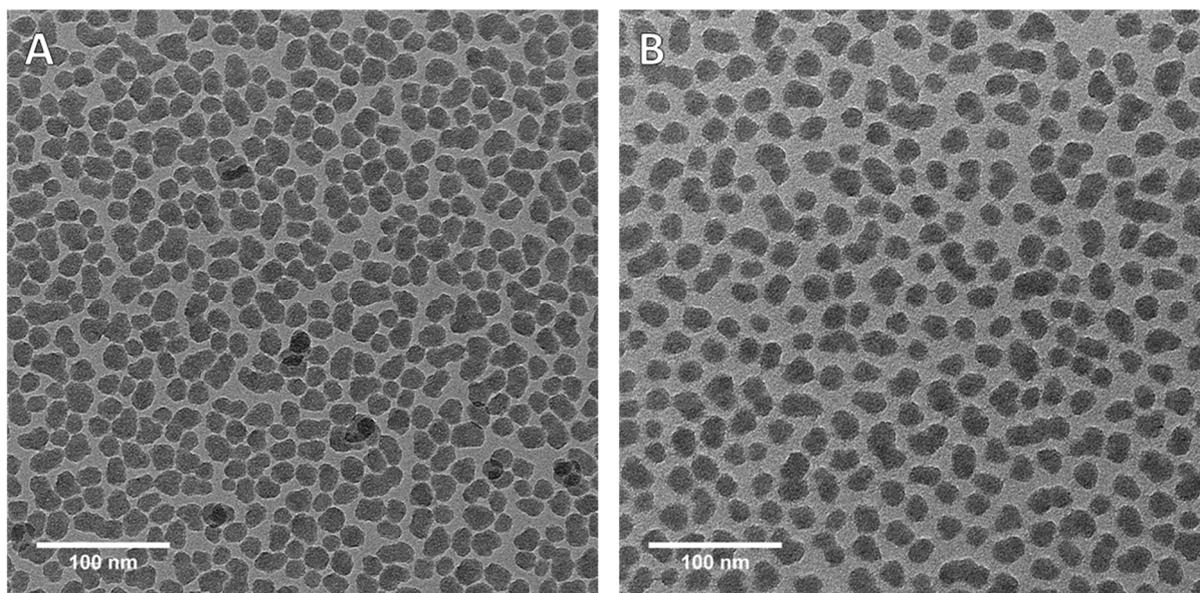
Lors de la réduction des imines formées par le greffage des macromolécules de PEG-4k-al par le  $\text{NaBH}_4$ , il est très important de rapidement détruire l'excès de réducteur pour limiter la dégradation du fluorophore. En effet, les cyanines présentent des groupements iminium, sensibles au réducteur. Cette réactivité est d'ailleurs utilisée dans la synthèse de fluorophores sensibles aux superoxydes à partir de cyanines commerciales.<sup>47</sup> La perte d'intensité de la bande de la Cy 7.5 après PEGylation peut être attribuée à cette réaction (**Figure III.46**).



**Figure III.46** : Spectres d'absorbance des nanoparticules avant et après PEGylation mesurés à une concentration identique en nanoparticules.

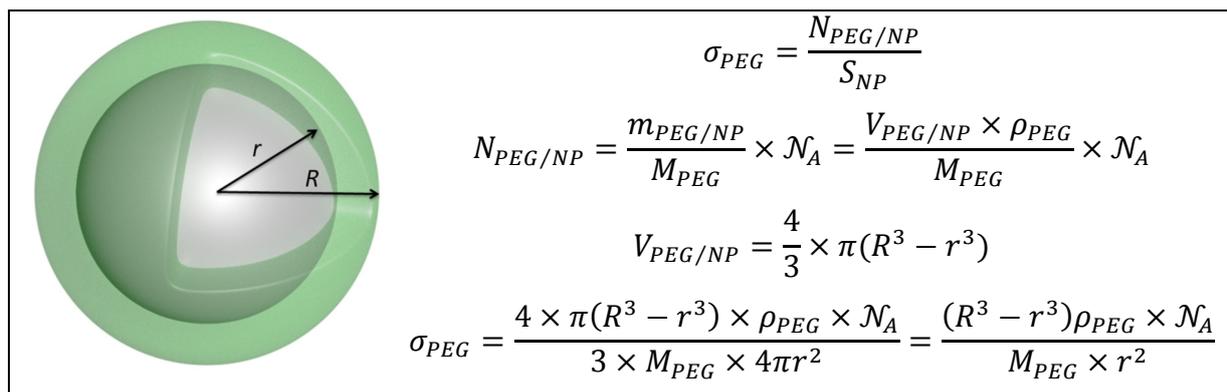
Il faut noter également que la contribution de la diffusion augmente pour les particules PEGylées, ce qui est tout à fait cohérent avec le fait que la couronne dense de PEG augmente le diamètre de la nanoparticule et avec elle, l'intensité diffusée. En toute rigueur, il n'est plus possible de considérer que le spectre mesuré est un spectre d'absorbance, du fait de cette contribution de l'intensité diffusée, et il serait plus rigoureux de raisonner en transmission ( $T$ ). Cependant, nous considérons en première approximation ici la valeur d'absorbance ( $Abs$ ) dans sa définition la plus simple, à savoir  $Abs = -\log T$  en sachant pertinemment que cette contribution de diffusion s'intègre dans la valeur mesurée.

Après séchage sur la grille de microscopie, comme le montre la **Figure III.47**, les nanoparticules PEGylées sont plus espacées les unes des autres que les particules avant PEGylation. Cet espacement est lié à la présence de la couronne de PEG non visible en microscopie électronique. Le fait que les nanoparticules se retrouvent isolées montre que la stabilité colloïdale est conservée tout au long de la modification chimique de surface.



**Figure III.47** : Micrographie en MET des nanoparticules de silice fluorescentes **A** : avant PEGylation, **B** : après PEGylation.

A partir de l'espacement moyen entre les nanoparticules séchées, il est possible d'estimer la densité surfacique de macromolécules de PEG. En effet celui-ci correspond environ à deux fois l'épaisseur de la couronne de PEG non solvatée entourant les nanoparticules. Avec la démonstration détaillée en **Figure III.48**, la densité de greffage des macromolécules de PEG de  $4\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  à la surface des nanoparticules de silice estimée est d'environ  $0,8\text{ macromolécules}/\text{nm}^2$ . Cette estimation est très proche des valeurs présentées dans le chapitre II.



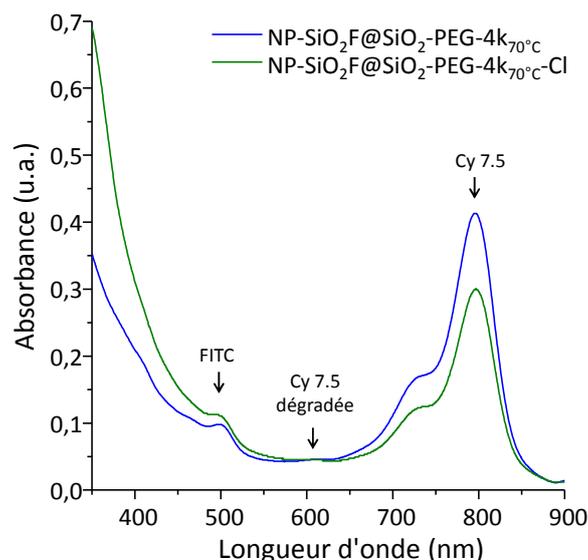
**Figure III.48** : Calcul de la densité surfacique de PEG à partir de l'observation en MET. Avec :  $\sigma_{PEG}$  densité surfacique du PEG;  $N_{PEG/NP}$  nombre de macromolécules par nanoparticules;  $S_{NP}$  surface d'une nanoparticule;  $m_{PEG/NP}$  masse de PEG par nanoparticule;  $V_{PEG/NP}$  volume de PEG par nanoparticule;  $\rho_{PEG}$  masse volumique du PEG,  $\rho_{PEG} \approx 1,2 \text{ g.cm}^{-3}$ .

L'amination de l'extrémité des macromolécules de PEG est réalisée d'après le procédé présenté dans le chapitre II.

#### **Mode opératoire III-18 : Fonctionnalisation de la couronne de PEG par des fonctions amine**

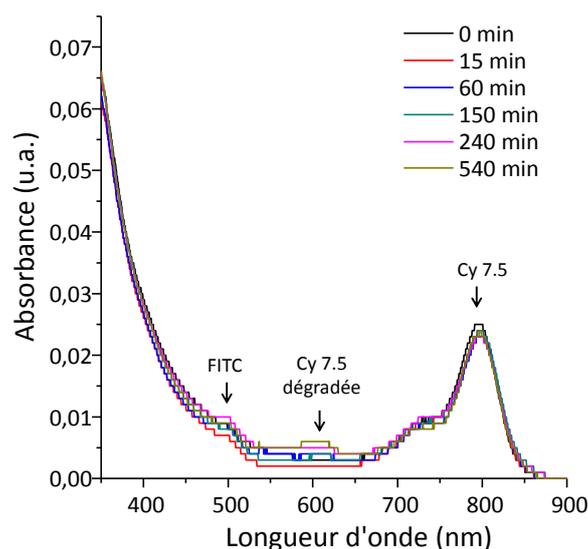
Sur le stock de 17 ml de la dispersion obtenue à la fin du Mode opératoire III-17, 12 ml sont prélevés et ajoutés à 15 ml de DMF. Puis le méthanol ainsi que 5 ml de DMF sont éliminés par distillation sous pression réduite. Dans un bain de glace et sous agitation, 185,3  $\mu\text{l}$  de  $\text{SOCl}_2$  puis 103  $\mu\text{l}$  de pyridine sont ajoutés. Après 5 min, le milieu réactionnel est placé à 70 °C durant 2 h. Les nanoparticules sont alors lavées par ultrafiltration tangentielle avec une membrane possédant un seuil de coupure de 300 kDa en présence de MeOH, la cellule d'ultrafiltration ne supportant pas le DMF. L'ensemble des particules est alors de nouveau introduit dans 20 ml de DMF puis le MeOH est évaporé sous pression réduite avant d'ajouter 170  $\mu\text{l}$  d'éthylènediamine. La dispersion est portée à la température de 70 °C puis laissée durant 9 h. Les nanoparticules, nommées NP-SiO<sub>2</sub>-bifluo-PEG-4k<sub>70°C</sub>-NH<sub>2</sub>, sont alors de nouveau lavées par ultrafiltration avec de l'éthanol puis de l'eau.

Après l'étape de conversion de l'hydroxyle terminal de la macromolécule de PEG en chlore, le fluorophore est de nouveau partiellement dégradé (**Figure III.49**). Il semble que l'utilisation du chlorure de thionyle implique des conditions trop sévères pour la sonde fluorescente. Dans un travail ultérieur, il serait nécessaire de travailler sur l'optimisation de cette étape, voire de mettre en place une voie de synthèse plus douce, comme il a été précisé dans le chapitre précédent avec l'utilisation du chlorure de 4-toluènesulfonyle.



**Figure III.49** : Spectres d'absorbance des nanoparticules PEGylées avant et après chloration mesurés à une concentration identique en nanoparticules.

Etant donné que la conversion du chlore en amine est réalisée à partir d'éthylènediamine, c'est-à-dire, de nouveau en présence d'amines primaires, un suivi de la cyanine a de nouveau été réalisé à partir d'un prélèvement durant la réaction. Bien que les spectres présentés en **Figure III.50** soient bruités, la Cy 7.5 ne semble pas être dégradée au cours du temps. Il semble que la modification chimique de surface (film polysiloxane + couronne de PEG) joue un rôle de barrière physique envers l'éthylènediamine, protégeant ainsi le fluorophore des amines.

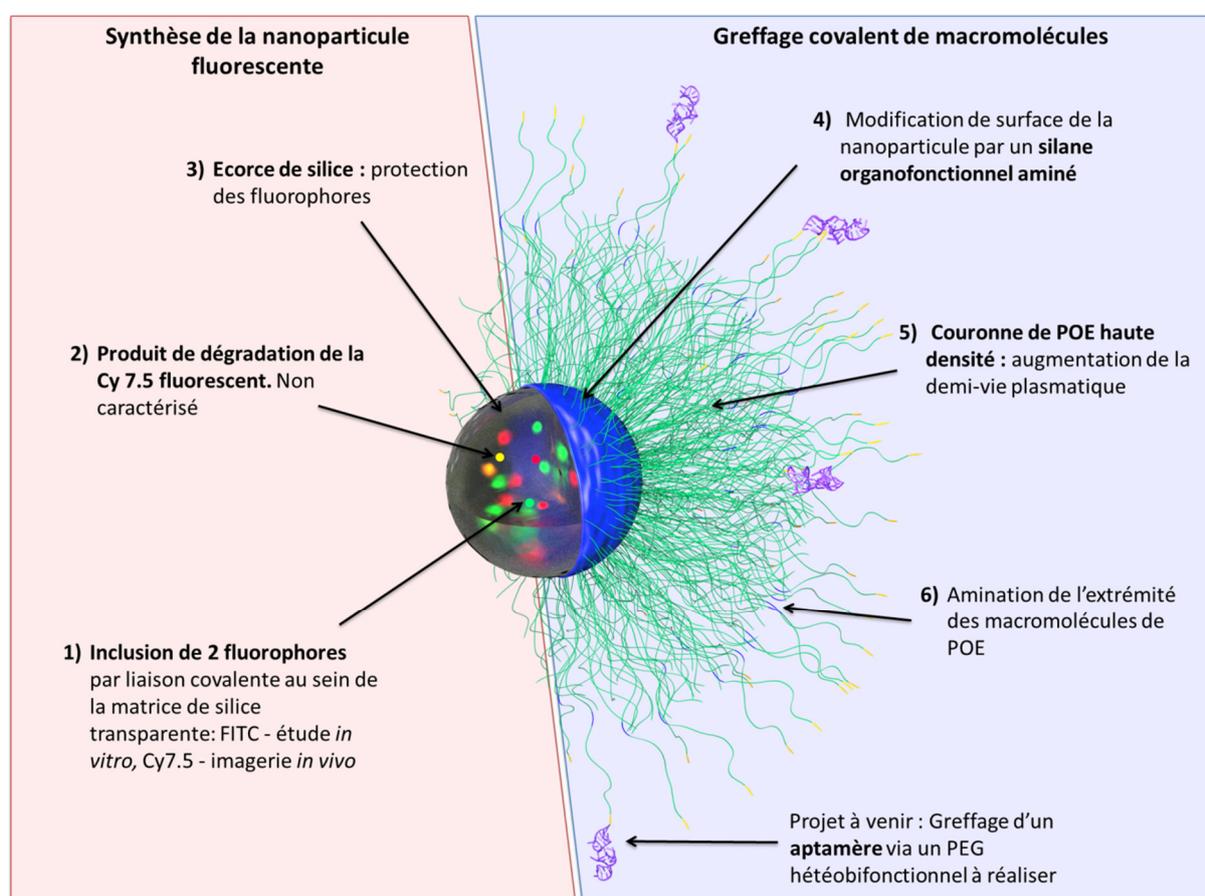


**Figure III.50** : Spectres d'absorbance des prélèvements réalisés durant l'amination de l'extrémité des macromolécules de PEG.

## C.2 Conclusion

L'étude présentée ici a permis de mettre en place la synthèse de nanoparticules de silice d'environ 18 nm de diamètre fluorescentes (**Figure III.51**). L'intégration de deux sondes fluorescentes organiques différentes au sein du même objet permet l'utilisation de ce dernier à la fois en microscopie confocale dans le visible et l'imagerie *in vivo* de fluorescence dans le PIR. La stratégie de PEGylation développée dans le chapitre II a été appliquée avec succès sur les nanoparticules, et la valeur estimée de la densité de greffage des macromolécules à partir des observations en MET est du même ordre de grandeur que celles estimées auparavant.

A l'heure actuelle, la bioconjugaison des nanoparticules avec l'aptamère utilisant un espaceur macromoléculaire hétérobifonctionnel de type NHS-PEG-3,4k-mal est à l'étude.



**Figure III.51** : Représentation à l'échelle des nano-marqueurs destinés au diagnostic du cancer de la prostate. (Structure de l'aptamère utilisé dans l'image : PDB ID : 1Q8N).

## D. Conclusion

Les différents travaux présentés dans ce chapitre ont pour dénominateur commun la chimie de surface de nanoparticules pour répondre aux différents cahiers des charges imposés par les applications en biologie. Dans un premier temps, nous avons développé une nouvelle voie d'encapsulation de supraparticules colloïdales magnétiques par la silice. Ces objets ont ensuite été rendus biocompatibles grâce au greffage de macromolécules de PEG selon les protocoles présentés dans le chapitre II. Par la suite, les conditions de greffage régiosélectif d'une protéine de capture ont été étudiées. Un second nano-système, appelé VUSPIO, constitué de nanoparticules magnétiques destinées à l'imagerie moléculaire des plaques d'athérome par IRM a fait l'objet d'une étude d'optimisation du marquage par des sondes fluorescentes, suivie d'une étude de biofonctionnalisation par des fragments d'anticorps. Enfin, le troisième système présenté dans ce chapitre consiste en des nanoparticules de silice de taille inférieure à 20 nm de diamètre présentant deux fluorophores incorporés dans la matrice et biofonctionnalisées par chimie sur les macromolécules de PEG. Il reste sur ce dernier système à étudier le greffage de la biomolécule d'adressage permettant le ciblage actif de tumeurs.

Tout au long de ce chapitre, la fonctionnalisation et la biofonctionnalisation de nano-objets ont été mises en lumière à travers le développement de ces différents outils nanométriques destinés à des applications biologiques. Que les particules soient destinées à des études *in vitro*, pour l'extraction, ou des études *in vivo* pour l'imagerie, les problématiques au niveau de la surface restent les mêmes. En effet, dans tous les cas traités ici, le challenge à relever est de promouvoir les interactions spécifiques de reconnaissance moléculaire avec la cible, à la fois par des jeux de greffage régiosélectif et orienté de biomolécules de ciblage tout en limitant les interactions non spécifiques délétères avec les constituants de l'environnement (protéines, sel, lipides, acides nucléiques...). C'est au prix de cette maîtrise de la chimie de surface qu'il devient alors possible d'optimiser le couple affinité/spécificité, deux notions capitales dans le domaine de la reconnaissance moléculaire utilisée pour des stratégies ciblées en nanomédecine et en biotechnologie.

Au cours du chapitre suivant, différentes études biophysiques ainsi que des tests *in vitro* et *in vivo* seront réalisés. Ces études ont pour objectif de caractériser le comportement des objets présentés ici. Cela permettra de valider leur utilisation pour l'application visée de révéler des points faibles qui pourront faire l'objet d'une amélioration grâce à la versatilité de leur approche (multi-étapes).

## Références bibliographiques

- (1) Borlido, L.; Azevedo, A. M.; Roque, A. C. A.; Aires-Barros, M. R. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31* (8), 1374–1385.
- (2) Hatch, G. P.; Stelter, R. E. *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, *225* (1–2), 262–276.
- (3) Lee, H.; Xu, L.; Ahn, B.; Lee, K.; Oh, K. W. *Microfluid. Nanofluidics* **2012**, *13* (4), 613–623.
- (4) Hofer, C. J.; Zlateski, V.; Stoessel, P. R.; Paunescu, D.; Schneider, E. M.; Grass, R. N.; Zeltner, M.; Stark, W. J. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (10), 1826–1829.
- (5) Zeltner, M.; Grass, R. N.; Schaetz, A.; Bubenhofer, S. B.; Luechinger, N. A.; Stark, W. J. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22* (24), 12064–12071.
- (6) Xia, Y.; Tang, Z. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (51), 6320–6336.
- (7) Lu, Z.; Yin, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (21), 6874–6887.
- (8) Wang, T.; LaMontagne, D.; Lynch, J.; Zhuang, J.; Cao, Y. C. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (7), 2804–2823.
- (9) Guo, J.; Yang, W.; Wang, C. *Adv. Mater.* **2013**, *25* (37), 5196–5214.
- (10) Massart, R. *IEEE Trans. Magn.* **1981**, *17* (2), 1247–1248.
- (11) Mornet, S. Synthèse et modification chimique de la surface de nanoparticules de maghémite à des fins d'application biomédicales, Thèse soutenue à l'université Bordeaux I: Bordeaux, 2002.
- (12) Bai, F.; Wang, D.; Huo, Z.; Chen, W.; Liu, L.; Liang, X.; Chen, C.; Wang, X.; Peng, Q.; Li, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (35), 6650–6653.
- (13) van Ewijk, G. A.; Vroege, G. J.; Philipse, A. P. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *201* (1–3), 31–33.
- (14) Viana, R. B.; da Silva, A. B. F.; Pimentel, A. S. *Adv. Phys. Chem.* **2012**, *2012*, e903272.
- (15) Bronstein, L. M.; Huang, X.; Retrum, J.; Schmucker, A.; Pink, M.; Stein, B. D.; Dragnea, B. *Chem. Mater.* **2007**, *19* (15), 3624–3632.
- (16) *Magnetic nanoparticles: from fabrication to clinical applications ; theory to therapy, chemistry to clinic, bench to bedside*; Thanh, N. T. K., Ed.; CRC Press, Taylor & Francis: Boca Raton, Fla., 2012.
- (17) Paquet, C.; Pagé, L.; Kell, A.; Simard, B. *Langmuir* **2009**, *26* (8), 5388–5396.
- (18) Kim, J.; Kim, H. S.; Lee, N.; Kim, T.; Kim, H.; Yu, T.; Song, I. C.; Moon, W. K.; Hyeon, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (44), 8438–8441.
- (19) Gorelikov, I.; Matsuura, N. *Nano Lett.* **2008**, *8* (1), 369–373.
- (20) Chazalviel, J.-N.; Rodrigues-Filho, U. P. *Thin Solid Films* **2012**, *520* (11), 3918–3921.
- (21) Smith, A. L. *Spectrochim. Acta* **1960**, *16* (1–2), 87–105.
- (22) Innocenzi, P. *J. Non-Cryst. Solids* **2003**, *316* (2–3), 309–319.
- (23) Lin, Y.-S.; Wu, S.-H.; Hung, Y.; Chou, Y.-H.; Chang, C.; Lin, M.-L.; Tsai, C.-P.; Mou, C.-Y. *Chem. Mater.* **2006**, *18* (22), 5170–5172.
- (24) Miller, F. A.; Wilkins, C. H. *Anal. Chem.* **1952**, *24* (8), 1253–1294.
- (25) Koole, R.; van Schooneveld, M. M.; Hilhorst, J.; de Mello Donegá, C.; Hart, D. C. 't; van Blaaderen, A.; Vanmaekelbergh, D.; Meijerink, A. *Chem. Mater.* **2008**, *20* (7), 2503–2512.
- (26) Scott, G. D.; Kilgour, D. M. *J. Phys. Appl. Phys.* **1969**, *2* (6), 863.
- (27) Fu, R.; Jin, X.; Liang, J.; Zheng, W.; Zhuang, J.; Yang, W. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21* (39), 15352–15356.
- (28) Gerke, V.; Creutz, C. E.; Moss, S. E. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6* (6), 449–461.
- (29) Gerke, V.; Moss, S. E. *Physiol. Rev.* **2002**, *82* (2), 331–371.

- (30) Bérat, R.; Rémy-Zolghadry, M.; Gounou, C.; Manigand, C.; Tan, S.; Saltó, C.; Arenas, E.; Bordenave, L.; Brisson, A. R. *Biointerphases* **2007**, 2 (4), 165–172.
- (31) Shan S. Wong. *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*; CRC Press, 1991.
- (32) Hermanson, G. T. In *Bioconjugate Techniques (Second Edition)*; Hermanson, G. T., Ed.; Academic Press: New York, 2008; pp 1–168.
- (33) Fontaine, S. D.; Reid, R.; Robinson, L.; Ashley, G. W.; Santi, D. V. *Bioconjug. Chem.* **2015**, 26 (1), 145–152.
- (34) Garnier, B.; Bouter, A.; Gounou, C.; Petry, K. G.; Brisson, A. R. *Bioconjug. Chem.* **2009**, 20 (11), 2114–2122.
- (35) Mornet, S.; Portier, J.; Duguet, E. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, 293 (1), 127–134.
- (36) Jue, R.; Lambert, J. M.; Pierce, L. R.; Traut, R. R. *Biochemistry (Mosc.)* **1978**, 17 (25), 5399–5406.
- (37) Lewis, G. N.; Goldschmid, O.; Magel, T. T.; Bigeleisen, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, 65 (6), 1150–1154.
- (38) Carugo, O.; Čemažar, M.; Zahariev, S.; Hudáky, I.; Gáspári, Z.; Perczel, A.; Pongor, S. *Protein Eng.* **2003**, 16 (9), 637–639.
- (39) Zimmermann, J.; Kühne, R.; Sylvester, M.; Freund, C. *Biochemistry (Mosc.)* **2007**, 46 (23), 6971–6977.
- (40) Lee, C. C.; Perchiacca, J. M.; Tessier, P. M. *Trends Biotechnol.* **2013**, 31 (11), 612–620.
- (41) Ewert, S.; Huber, T.; Honegger, A.; Plückthun, A. *J. Mol. Biol.* **2003**, 325 (3), 531–553.
- (42) Van Blaaderen, A.; Vrij, A. *Langmuir* **1992**, 8 (12), 2921–2931.
- (43) Ow, H.; Larson, D. R.; Srivastava, M.; Baird, B. A.; Webb, W. W.; Wiesner, U. *Nano Lett.* **2005**, 5 (1), 113–117.
- (44) Larson, D. R.; Ow, H.; Vishwasrao, H. D.; Heikal, A. A.; Wiesner, U.; Webb, W. W. *Chem. Mater.* **2008**, 20 (8), 2677–2684.
- (45) Burns, A. A.; Vider, J.; Ow, H.; Herz, E.; Penate-Medina, O.; Baumgart, M.; Larson, S. M.; Wiesner, U.; Bradbury, M. *Nano Lett.* **2009**, 9 (1), 442–448.
- (46) Gupton, J. T.; Telang, N.; Jia, X.; Giglio, B. C.; Eaton, J. E.; Barelli, P. J.; Hovaizi, M.; Hall, K. E.; Welden, R. S.; Keough, M. J.; Worrall, E. F.; Finzel, K. L.; Kluball, E. J.; Kanters, R. P. F.; Smith, T. M.; Smith, S. Q.; Nunes, S. R.; Wright, M. T.; Birnstihl, J. M. *Tetrahedron* **2010**, 66 (44), 8485–8493.
- (47) Kundu, K.; Knight, S. F.; Willett, N.; Lee, S.; Taylor, W. R.; Murthy, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48 (2), 299–303.

Chapitre IV. Evaluation des nano-objets  
dans le cadre de leur application  
biologique



Les chapitres précédents étaient consacrés au développement de stratégies de fonctionnalisation et de biofonctionnalisation de nanoparticules. Ces modifications chimiques de surface ont eu pour premier objectif de rendre les objets biocompatibles en limitant l'adsorption non spécifique de biomolécules et de préparer la surface à l'accueil de biomolécules portant la fonction de reconnaissance moléculaire. Leur greffage a été réalisé de façon régiosélective pour optimiser leur disponibilité et de promouvoir l'efficacité d'adressage à leur cible.

Ce dernier chapitre est consacré à l'évaluation des nano-objets précédemment développés dans le contexte de leur application respective. Ces évaluations permettront d'apprécier la pertinence de ces stratégies de modification de surface à la base de ces travaux.

## **A. Extraction de vésicules extracellulaires par magnétophorèse**

Différents lots de SPC présentant différents taux de bioconjugaison ont été préparés dans le but d'étudier l'effet du nombre d'Anx-A5 par objet sur la reconnaissance des vésicules lipidiques à extraire. Deux lots de SPC de diamètres différents (55 nm et 110 nm) ont également été produits afin d'évaluer l'impact de la taille des particules magnétiques sur l'efficacité d'extraction. Des études permettant de caractériser la liaison aux membranes ont dans un premier temps été effectuées avant de réaliser des tests d'extraction sur des objets lipidiques d'origine biologique.

### **A.1 Etude des interactions entre les SPC biofonctionnalisés et les bicouches lipidiques par QCM-D**

L'Anx-A5 est connue pour se lier fortement aux bicouches lipidiques contenant des lipides avec une tête phosphatidylsérine (PS) en présence de calcium. L'équipe du Pr. Alain Brisson a longuement étudié les mécanismes de formation de bicouches lipidiques supportées sur des substrats de silice et de mica à partir de vésicules unilamellaires.<sup>1</sup> La formation de ces bicouches lipidiques supportées est réalisée sur des capteurs de microbalance à cristal de quartz avec mesures de dissipation (QCM-D), dont le principe est décrit dans l'annexe n°7, afin d'étudier la liaison des SPC biofonctionnalisés par l'Anx-A5 sur les membranes lipidiques.

**Mode opératoire IV-1 : Formation de vésicules lipidiques unilamellaires (SUV)**

Une masse d'environ 50 mg de lipides (DOPC/DOPS 4:1), pesée exactement, est solubilisée dans du chloroforme. Puis, la solution est introduite dans un ballon de 5 ml avant évaporation du chloroforme à l'évaporateur rotatif. Le film lipidique est repris dans un volume d'éther avant d'être évaporé à nouveau. Cette opération est répétée une seconde fois de façon à retirer les traces de  $\text{CHCl}_3$ , puis 4 ml de tampon HEPES 10 mM, pH 7,4, 150 mM NaCl sont ajoutés et l'ensemble agité au vortex durant 1 min. Le ballon est ensuite plongé dans l'azote liquide jusqu'à congélation totale de l'échantillon puis plongé dans un bain marie à 40 °C jusqu'à décongélation totale. Ce cycle congélation/décongélation est répété 4 fois. La dispersion est plongée dans un bain de glace et soniquée à l'aide d'une micro-pointe (vibra-cell™ 75042, Bioblock scientifique). Des pulses de 2 s à 20 % d'amplitude sont appliqués pour une durée totale de 30 min de sonication. Afin d'éliminer les débris métalliques (Ti) produites par la pointe de sonication, l'échantillon est centrifugé à 17 000 g durant 10 min.

**Mode opératoire IV-2 : Mesures d'interactions entre les SPC biofonctionnalisées et les bicouches lipidiques**

Les mesures de QCM-D sont réalisées à l'aide d'un système Q-SENSE E4 couplé à une pompe péristaltique IPC4 (Ismatec). Les cristaux recouverts de silice (QX 303) sont nettoyés par immersion durant 2 h dans une solution à 2 % massique de SDS puis rincés abondamment à l'eau avant d'être séchés sous flux d'azote. Avant utilisation, la surface des cristaux est exposée 10 min à une lumière ultraviolette (UV/ozone cleaner, PSDP, Novascan). Après installation des cristaux dans les cellules de mesure et initialisation de la mesure, ceux-ci sont laissés équilibrer durant 2 h. Les mesures sont réalisées à 25 °C. Les tampons utilisés sont dégazés et filtrés sur filtre de 0,2  $\mu\text{m}$ . Le tampon, noté Tampon  $\text{Ca}^{2+}$ , à pH 7,4 est composé de 10 mM HEPES, 150 mM NaCl et 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Le tampon contenant 2 mM d'EDTA (noté Tampon EDTA) à pH 7,4 est composé également de 10 mM HEPES et 150 mM NaCl.

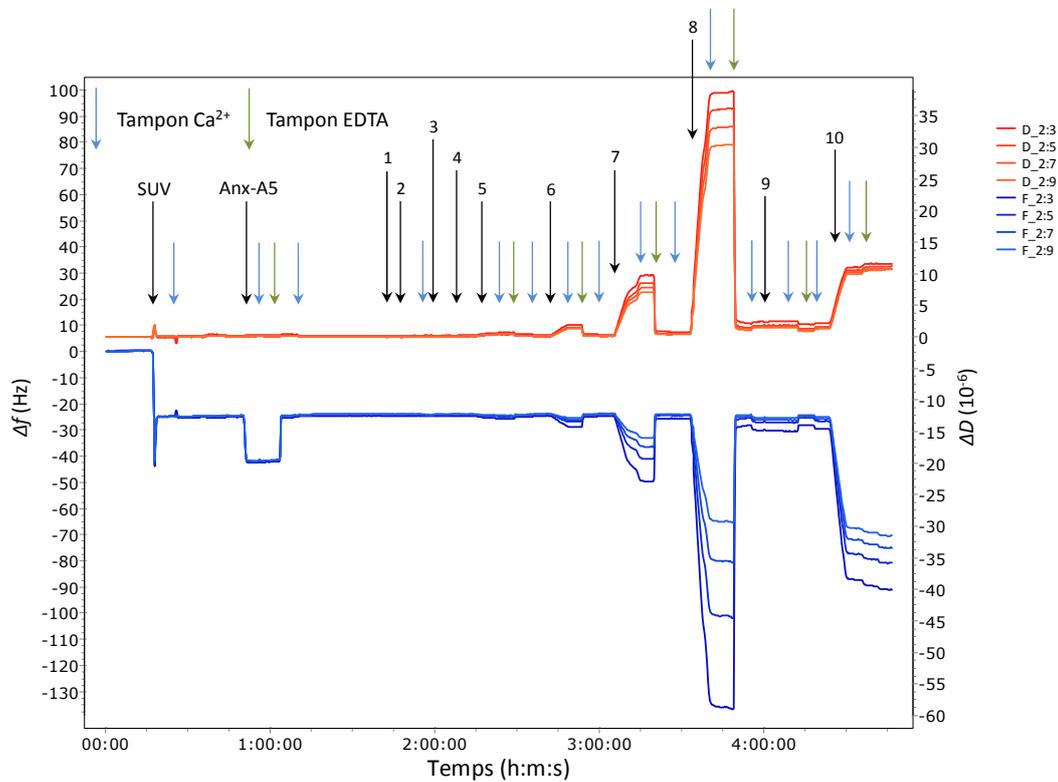
La formation de la bicouche supportée est réalisée par injection d'un volume de 1 ml d'une suspension de SUV à 100  $\mu\text{g/ml}$  obtenue par le Mode opératoire IV-1 avec un débit de 150  $\mu\text{l/min}$ .

La **Figure IV.1** présente la variation de fréquence de vibration du cristal, notée  $\Delta f$ , ainsi que la variation de la dissipation, notée  $\Delta D$ , pour les harmoniques 3, 5, 7 et 9.

La formation de la bicouche supportée composée de dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) et de dioleoylphosphatidylsérine (DOPS), dans une proportion en DOPC/DOPS de 4/1, produit une variation de fréquence de 25 Hz. La faible variation de la dissipation atteste de la rigidité de cette bicouche lipidique. La liaison de l'Anx-A5 sur des bicouches lipidiques supportées en fonction de la teneur en PS et de la concentration en calcium est à l'heure actuelle parfaitement connue.<sup>2</sup> Un test simple afin de valider l'intégrité de la bicouche formée consiste donc à suivre l'adsorption de l'Anx-A5 (injectée à 20  $\mu\text{g/ml}$ ) en présence de 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans ces conditions, celle-ci est caractérisée par une diminution de la fréquence de 17 Hz. L'injection d'un chélatant du calcium tel que l'acide éthylène diamine tétraacétique

(EDTA) entraîne spontanément la libération de l'Anx-A5, montrant ainsi la dépendance de la liaison à la présence du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces phénomènes sont bien distingués entre 0 et 1 h 30 dans la **Figure IV.1**.

La suite de l'expérience présentée en **Figure IV.1** est réalisée avec des SPC50@SiO<sub>2</sub>-PEG-4k-PEG-mal-16Anx-A5 qui seront nommées dans la suite du manuscrit SPC50-16A5 par souci de simplicité. Les mesures étant réalisées hors équilibre, seules les vitesses d'évolution sont à considérer. Plusieurs comportements remarquables sont observés. L'adsorption des SPC-16A5 devient visible, dans la durée de l'expérience, à partir d'une concentration en SPC (exprimée par rapport à la maghémite) de 800  $\mu\text{g/l}$  (équivalent à environ  $8 \cdot 10^{-12}$  M en SPC, et environ  $1 \cdot 10^{-10}$  M en Anx-A5). Cette interaction est ensuite libérée par injection d'EDTA, montrant le caractère calcium dépendant de la liaison, suggérant que l'interaction est bien gouvernée par l'Anx-A5.



**Figure IV.1** : Sensorgramme obtenu par QCM-D sur une bicouche DOPC/DOPS (4/1) pour différentes concentrations en SPC-16A5. **1** : 1,28  $\mu\text{g/l}$  en maghémite, **2** : 6,4  $\mu\text{g/l}$ , **3** : 32  $\mu\text{g/l}$ , **4** : 160  $\mu\text{g/l}$ , **5** : 800  $\mu\text{g/l}$ , **6** : 4 mg/l, **7** : 20 mg/l, **8** : 100 mg/l, **9** : SPC-SiO<sub>2</sub>-PEG-4k-NH<sub>2</sub> à 20 mg/l, **10** : SPC-SiO<sub>2</sub> à 20 mg/l.

La seconde observation importante est l'augmentation élevée de la dissipation accompagnant l'adsorption des nanoparticules à la surface. Cette dissipation traduit une grande viscoélasticité des objets adsorbés. Les macromolécules de PEG constituant la

couronne polymère relie de façon lâche le site de liaison à la bicouche et le point d'ancrage à la nanoparticule.

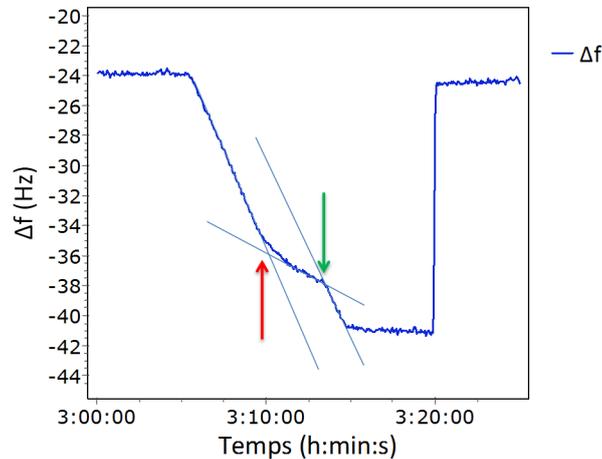
Deux contrôles ont été réalisés pour améliorer la compréhension des comportements observés: le premier (n°9 sur la **Figure IV.1**) consiste en l'injection de SPC50@SiO<sub>2</sub>-PEG-4k-NH<sub>2</sub>. Ce contrôle ne montre pas de variation dans la limite de détection du QCM (de l'ordre du ng/cm<sup>2</sup>). Il met en évidence qu'en absence de protéine, les nanoparticules ne forment pas de liaison à la bicouche lipidique. Quant au second contrôle (n°10) correspondant à l'injection de SPC50@SiO<sub>2</sub>, celui-ci se traduit par un  $\Delta f$  élevé. Cette interaction n'est pas dépendante du calcium car l'EDTA ne permet pas la libération des nanoparticules. Les nanoparticules présentant une surface de silice nue s'adsorbent à la bicouche lipidique par des interactions de vdW, du fait de la présence de sels dans le milieu (150 mM NaCl). L'augmentation de la dissipation par rapport à la masse adsorbée est moins élevée qu'avec les SPC50-16A5, ce qui s'explique par l'absence de la couronne polymère sur ces nanoparticules.

L'ensemble de ces observations montre que la présence de la couronne de macromolécules de PEG permet d'éviter l'adsorption non spécifique des nanoparticules sur la bicouche lipidique chargée négativement, et ce, même en présence de fonctions amine protonées aux extrémités des chaînes polymères. Cette observation est en adéquation avec l'étude de l'adsorption de BSA réalisée à la fois sur les surfaces PEGylées avant et après amination, et ne montrant pas de différence. Les groupements ammoniums sont probablement « camouflés » au sein de la couronne. De plus, la présence de sel écrante les charges (membrane : Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>; ammoniums : Cl<sup>-</sup>).

La grande variabilité entre les différents harmoniques indique que la couche formée sur le cristal est très viscoélastique. Dans ces conditions, le modèle de Sauerbrey ne peut pas être appliqué pour déterminer la masse adsorbée.

Une dernière observation à interpréter concerne l'injection n°7. Durant cette injection le flux a volontairement été arrêté. Comme le montre la **Figure IV.2** représentant un zoom sur la zone d'intérêt, l'arrêt du flux provoque une rupture de pente traduisant une diminution de la vitesse d'adsorption des nanoparticules à la surface. Lorsque le flux reprend, la pente initiale est retrouvée. Ce comportement met en évidence le phénomène connu sous le nom de « transport de masse ». Localement, le milieu à proximité de la surface lipidique est déplété en nanoparticules libres, leur diffusion permet alors de compenser cette perte. Cependant, si la vitesse de diffusion est inférieure à la vitesse d'adsorption alors la cinétique observée est limitée par la diffusion. Le flux permet d'accélérer le renouvellement des espèces adsorbantes

dans le milieu en contact avec la surface et de limiter l'impact du transport de masse. Dans la suite de ce manuscrit, nous emploierons le terme de cinétique initiale apparente pour désigner la pente initiale de  $\Delta f$ . Ces cinétiques apparentes ne peuvent être comparées entre elles uniquement que pour des flux constants ainsi que pour des particules présentant le même coefficient de diffusion (particules de même diamètre).

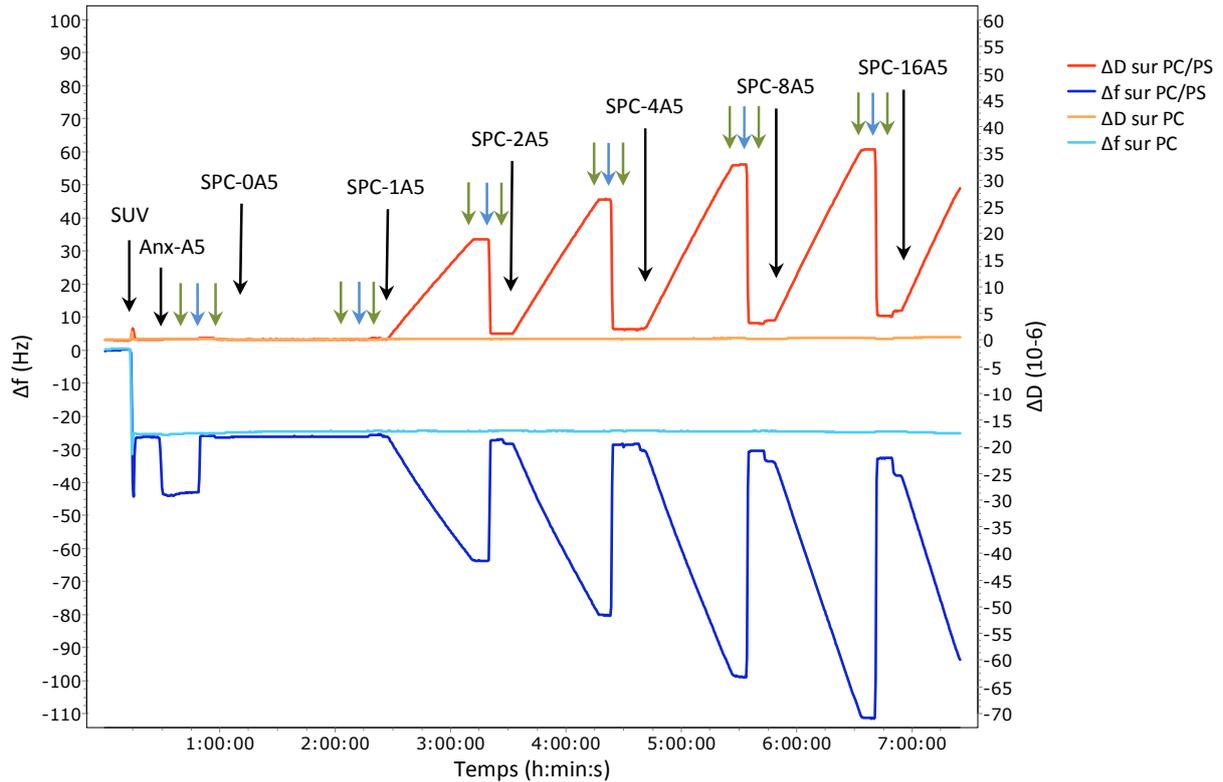


**Figure IV.2** : Grossissement de l'harmonique 5 du  $\Delta f$  sur la plage de temps allant de 3 h à 3 h 25. Flèche rouge : arrêt du flux, flèche verte : reprise du flux.

Cette première expérience a permis de mettre en évidence la liaison dépendante en calcium à la surface d'une bicouche lipidique présentant des fonctions PS. Cette adsorption est attribuée à la présence de l'annexine A5 greffée à la couronne de PEG. La couronne de PEG permet quant à elle d'éviter l'adsorption non spécifique des particules sur la bicouche par forces de vdW.

Une deuxième série d'expériences est réalisée pour étudier l'effet du nombre d'Anx-A5/SPC sur l'adsorption à la membrane lipidique de composition PC/PS (4/1). Un contrôle est également réalisé en parallèle sur les bicouches composées de PC afin d'apprécier la spécificité des interactions. Au cours de cette expérience différents lots de SPC biofonctionnalisés préparés avec différents taux de greffage en Anx-A5 sont testés. Le flux est fixé à 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  et les échantillons de SPC présentent la même concentration massique (20 mg/l). Ces mesures sont réalisées après le test de validation de la bicouche par l'adsorption/ désorption de l'Anx-A5.

Au cours de cette expérience, le flux est fixé à 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  après adsorption/validation de la bicouche, et les échantillons de SPC sont préparés à 20 mg/l. Les résultats sont présentés en **Figure IV.3**.



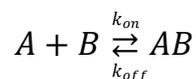
**Figure IV.3 :** Sensorgrammes obtenus par QCM-D sur une bicouche DOPC/DOPS (4/1) ou DOPC (flèche verte : tampon  $\text{Ca}^{2+}$ , flèche bleue : tampon EDTA).

Dans les conditions physiologiques, l'annexine n'a pas la capacité à se lier à la bicouche ne contenant que la PC car c'est une protéine connue pour se lier aux membranes négatives alors que la PC est zwitterionique. Les SPC-0A5 ne s'adsorbent ni sur la bicouche PC/PS ni sur la bicouche PC, alors que les autres SPC s'adsorbent spécifiquement sur la bicouche contenant la PS. Cette expérience apporte la preuve que l'Anx-A5 liée aux SPC biofonctionnalisées permet de cibler spécifiquement les membranes contenant de la PS.

La **Figure IV.4** représente les vitesses apparentes initiales de liaison en fonction du taux de greffage des SPC-xA5 utilisées. La vitesse apparente d'adsorption augmente avec l'augmentation du nombre d'Anx-A5 par particule, jusqu'à tendre vers un maximum autour de 8 Anx-A5 par SPC.

Pour discuter sur le profil de cette courbe, il faut considérer les notions suivantes sur les cinétiques :

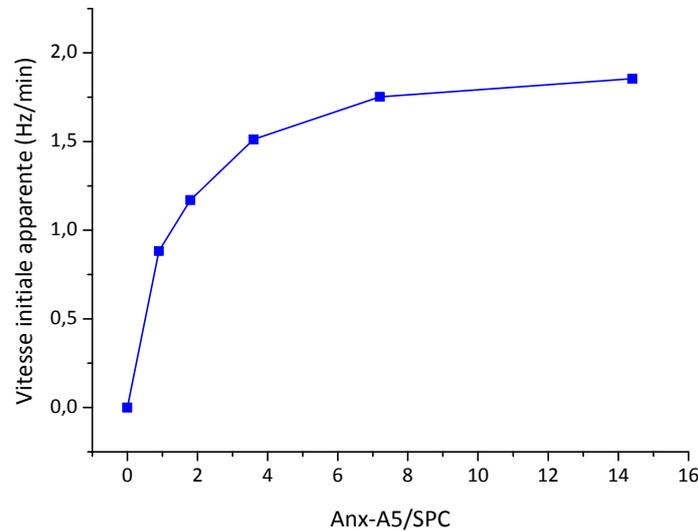
Soit une molécule A, et B un site libre d'une surface, interagissant pour former un complexe AB.



$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{on}[A][B] - k_{off}[AB]$$

En se plaçant dans les conditions initiales  $[AB]$  tend vers 0, l'expression se simplifie :

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{on}[A][B]$$

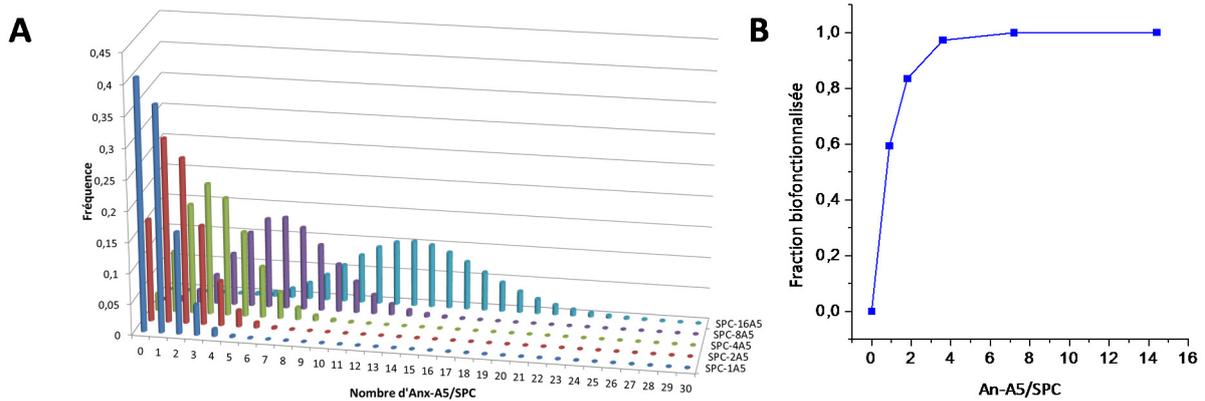


**Figure IV.4 :** Vitesse apparente initiale en fonction du degré de fonctionnalisation.

Dans le cadre de cette étude,  $k_{on}$  peut être remplacé par un  $k_{on}$  apparent ( $k_{on-app}$ ). Cette constante intègre la fréquence de rencontre des deux partenaires ainsi que la probabilité que la rencontre se traduise par la formation du complexe  $AB$ . L'étude a été réalisée à concentration en SPC constante, sur la même surface de bicouche, et à flux constant donc  $[A]$  et  $[B]$  sont supposées constantes. L'augmentation du nombre d'Anx-A5 par SPC augmente donc le  $k_{on-app}$ . Une étude cinétique de l'adsorption de l'annexine A5 libre sur les membranes lipidiques montre que la rencontre de la protéine avec la membrane mène très efficacement à la formation du complexe, et que le  $k_{on}$  de cette interaction est limité par les phénomènes de diffusion de la protéine.<sup>3</sup> L'augmentation du nombre de protéines greffées par SPC tend à uniformiser leur répartition à la surface de la particule. La contribution de la diffusion rotationnelle sur la cinétique apparente est donc réduite par l'augmentation du taux de greffage, car la probabilité qu'une protéine soit disponible pour former une liaison avec la surface à un instant  $t$  est également augmentée.

Il est également important de rappeler que le nombre d'annexines donné par particule correspond à un nombre moyen. Par exemple, dans le cas des SPC50-1A5, certaines particules possèdent 1 Anx-A5, mais d'autres en possèdent 2 ou plus et donc nécessairement, certaines n'en possèdent aucune. Ainsi, la concentration en particules susceptible de se lier à la membrane est inférieure à la concentration en particules totale. La répartition du nombre de

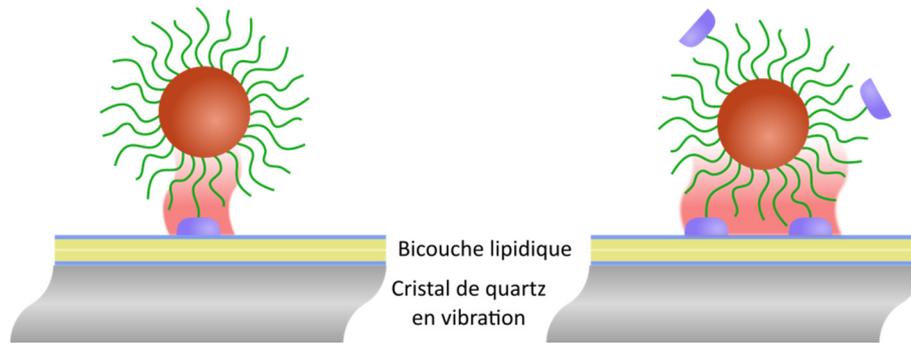
protéines par particules est décrite par une distribution de Poisson (**Figure IV.5-A**).<sup>4</sup> Ainsi, pour l'échantillon SPC50-1A5, la quantité de particules biofonctionnalisées ne représente que 60 % du total, l'écart entre la concentration totale et la concentration « active » n'est donc pas négligeable. La **Figure IV.5 B** représente la fraction de particules biofonctionnalisées en fonction du taux de bioconjugaison appliqué. L'évolution est très proche de celle observée en **Figure IV.4**.



**Figure IV.5: A :** Distribution du nombre d'Anx-A5 par particule d'après la loi de Poisson pour les différents taux de fonctionnalisation. **B :** Fraction de la population possédant au moins une protéine.

Afin de s'affranchir de cette contribution, il serait intéressant de réaliser la même expérience avec des échantillons dans lesquels la fraction non biofonctionnalisée aurait été éliminée grâce à une purification par affinité. Cette étude pourra être réalisée à l'avenir en préparant des lots de nanoparticules de silice biofonctionnalisées avec différents taux de greffage en Anx-A5. Les nanoparticules biofonctionnalisées seront extraites du milieu grâce à des SPC@SiO<sub>2</sub> magnétiques recouvertes d'une bicouche lipidique négativement chargée,<sup>5</sup> en présence de calcium.

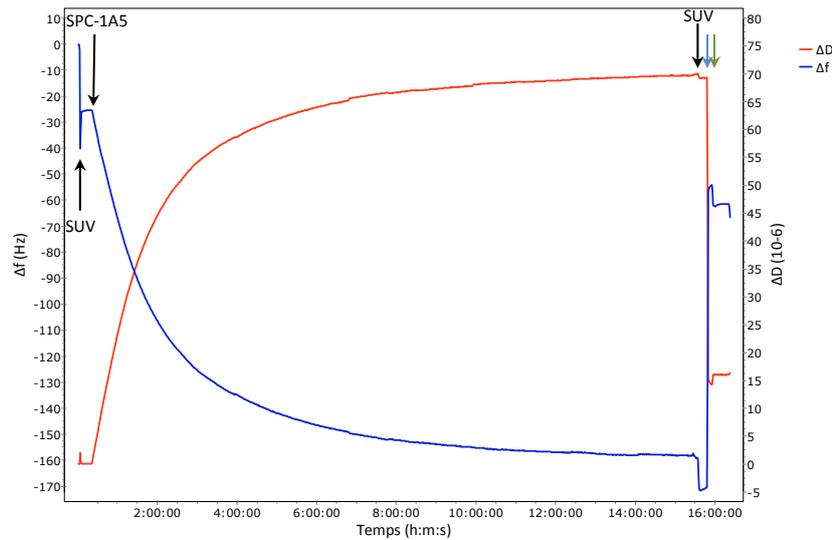
Une autre contribution peut également être à l'origine de la variation des cinétiques initiales apparentes. Dans le cas d'une couche viscoélastique, le QCM-D n'est pas sensible à la totalité de la masse adsorbée, mais simplement à la masse en déplacement. La liaison d'une nanoparticule à la surface à travers plusieurs Anx-A5 engendre probablement une plus grande masse en mouvement qu'une particule liée à la surface via une seule protéine (**Figure IV.6**). La variation de fréquence de vibration pour l'adsorption d'une particule n'est donc probablement pas constante entre les différents SPC biofonctionnalisées.



**Figure IV.6** : Représentation schématique de la masse en vibration après adsorption sur le cristal d'une particule monovalente et d'une particule multivalente.

Lorsque l'adsorption des SPC50-1A5 est prolongée jusqu'à la saturation de la surface, un  $\Delta f$  de -158 Hz est obtenu (**Figure IV.7**). L'expérience est réalisée dans les conditions de saturation, car la concentration en Anx-A5 dans l'expérience est d'environ  $10^{-10}$  M alors que le  $K_D$  de l'Anx-A5 pour les membranes lipidiques composées de PC/PS est de l'ordre de  $10^{-15}$  M.<sup>6</sup> Selon la loi de Sauerbrey, le  $\Delta f$  mesuré correspond à une masse adsorbée d'environ  $2800 \text{ ng/cm}^2$ . En considérant que les particules adsorbées à la surface sont immobiles, le taux de couverture maximal est alors de 55 %, <sup>7</sup> la masse théorique adsorbée à saturation serait de l'ordre de  $4\,000 \text{ ng/cm}^2$ . La différence entre la valeur expérimentale et la valeur théorique met en évidence la limite de cette loi pour des couches viscoélastiques. De plus, il est connu que les protéines d'Anx-A5 s'assemblent en cristaux 2D à la surface des membranes lipidiques négativement chargées. Cela indique donc que la protéine est mobile sur la membrane. Cette mobilité peut être due à un glissement de la protéine à la surface de la membrane, ou à la diffusion au sein de la membrane lipidique des phospholipides auxquels la protéine est liée. Dans ces conditions les particules pourraient adopter un empilement compact hexagonal, avec un taux de couverture de 91 %. La masse théorique adsorbée à saturation serait alors de plus de  $6\,000 \text{ ng/cm}^2$ , valeur bien supérieure à celle déterminée par la loi de Sauerbrey.

L'injection de SUV (DOPC/DOPS) sur la surface saturée en particules provoque une légère chute de la fréquence de vibration du cristal. Les SUV s'adsorbent sur la couche de particules grâce à la présence de particules présentant plus de 1 Anx-A5. Cependant, étant donné l'éloignement du lieu des événements par rapport à la surface du cristal, il est impossible de donner la quantité de SUV s'adsorbant, ou même de savoir si elles éclatent pour former une bicouche.

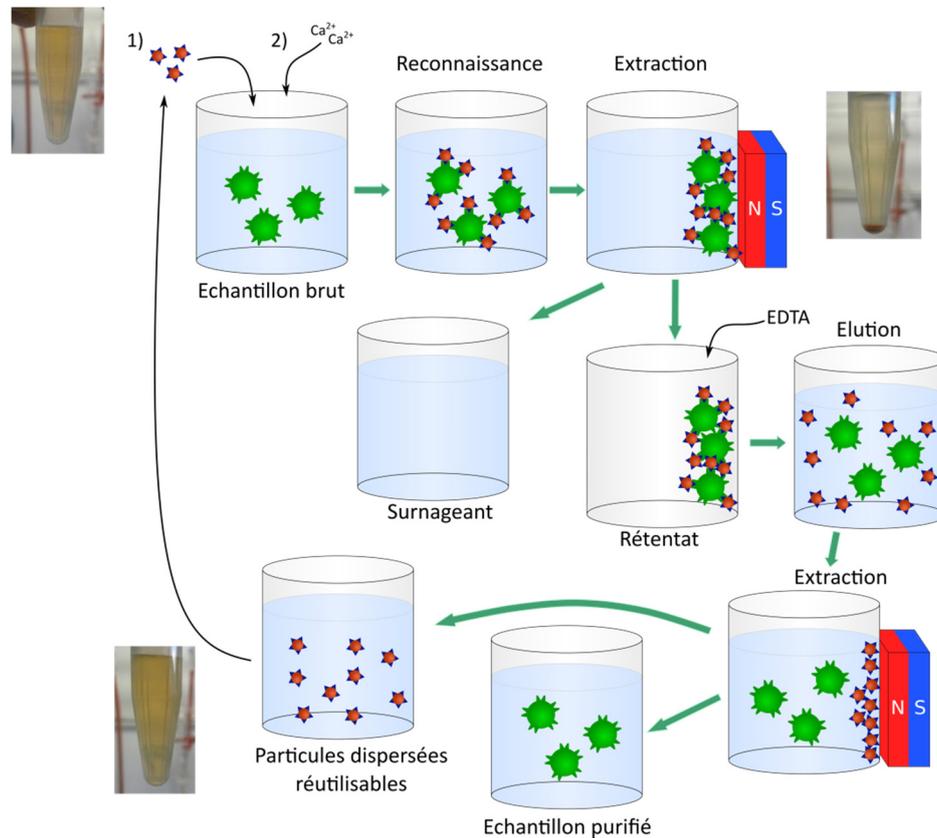


**Figure IV.7** : Sensorgrammes obtenus par QCM-D sur une bicouche DOPC/DOPS (4/1) avec les SPC50-1A5, (flèche verte : tampon  $\text{Ca}^{2+}$ , flèche bleue : tampon EDTA).

En résumé, l'étude en QCM-D sur les SPC biofonctionnalisées a montré que les nanoparticules reconnaissent spécifiquement les bicouches exposant la PS, grâce à l'Anx-A5 greffée. L'annexine a donc conservé sa fonctionnalité après greffage sur les particules. L'interaction est rompue grâce à un chélateur du calcium, la dissociation sera donc aisée après extraction des objets. Il a été montré que l'augmentation du nombre d'Anx-A5 par SPC augmentait la vitesse initiale apparente d'adsorption, mais que cet effet était en partie dû à la présence de SPC ne possédant pas de protéines pour les faibles taux de bioconjugaison engendrant ainsi une erreur sur l'estimation de la concentration en particules fonctionnelles. Une annexine par particules est suffisante pour que la particule se fixe à la bicouche lipidique mais l'augmentation du taux de greffage limite la proportion de nanoparticules non biofonctionnalisées. Au vu des résultats présentés, il n'est pas nécessaire de greffer plus de 16 Anx-A5/particule. L'augmentation du nombre d'Anx-A5 par particule peut être cependant un atout si la force de traction magnétique est supérieure à la force de l'interaction biomoléculaire.

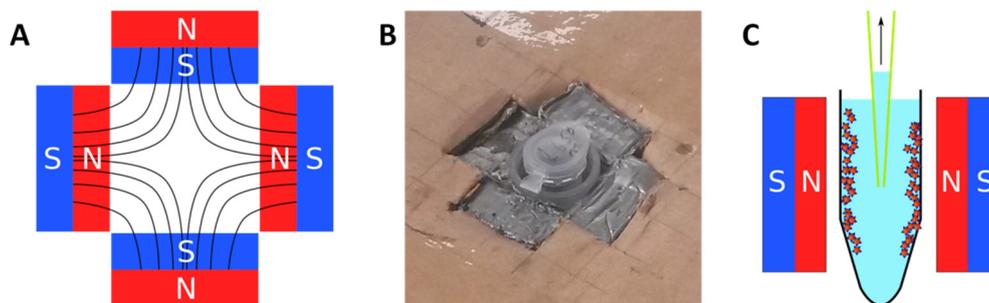
## A.2 Tests d'extraction d'objets membranaires

Le principe de l'extraction détaillé **Figure IV.8**, a été appliqué sur toutes les expériences d'extraction qui vont suivre. Les termes employés par la suite feront référence à ceux employés dans cette figure.



**Figure IV.8 :** Principe de l'extraction magnétique d'objets biologiques en suspension à partir de nanoparticules biofonctionnalisées.

Le dispositif magnétique employé est basé sur l'utilisation de 4 aimants durs au néodyme. Les aimants sont positionnés en quadripôle autour d'un tube cylindrique afin d'obtenir un gradient de champ élevé du centre vers la paroi du tube.<sup>8</sup> L'échantillon contenu dans un microtube (1,5 ou 2 ml) est inséré dans le cylindre de sorte que les particules magnétiques soient attirées vers la paroi et que le liquide soit retiré aisément au centre du tube par pipetage (**Figure IV.9**).



**Figure IV.9 :** A : Positionnement des aimants en quadripôle. B : Photographie du dispositif d'extraction. C : Vue en coupe du dispositif d'extraction magnétique.

### ***A.2.1 Tests préliminaires d'extraction de vésicules lipidiques fluorescentes***

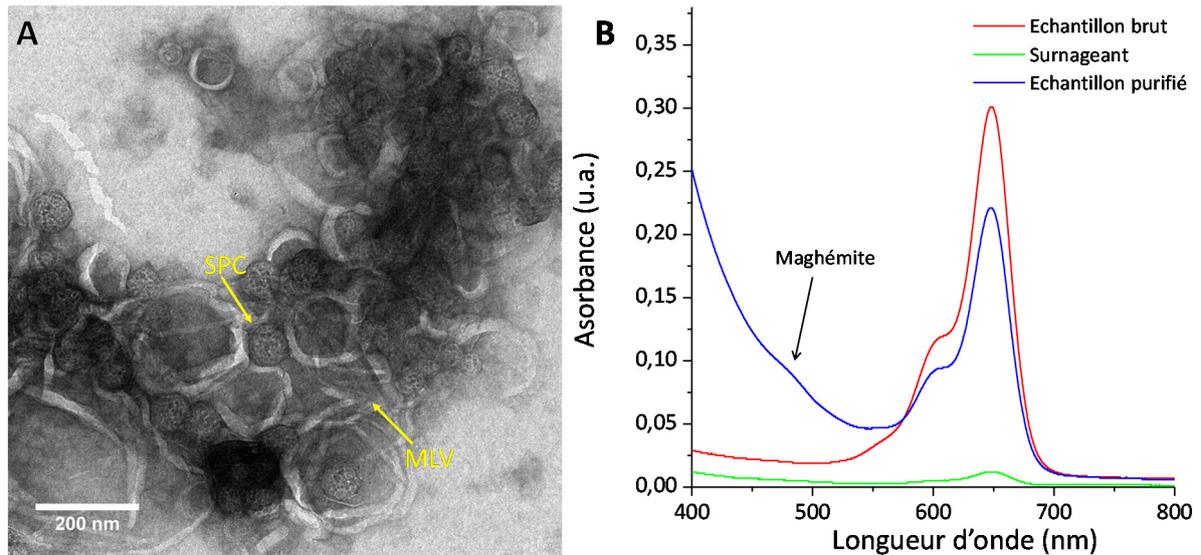
Des premiers tests d'extraction sont réalisés sur des objets biologiques artificiels mimant en première approximation les objets biologiques réels. Notre choix s'est porté sur les vésicules lipidiques multi-lamellaires (MLV) de composition PC/PS (4/1) qui présentent l'intérêt de pouvoir accueillir des fluorophore (DiD, ThermoFisher Scientific) ancrés dans la membrane lipidique. Ces MLV pourront donc être suivis par simple mesure d'absorbance du fait du coefficient d'extinction molaire élevé du fluorophore.

#### ***Mode opératoire IV-3 : Test d'extraction de vésicules lipidiques fluorescentes***

*Une suspension de MLV (10 µg, PC/PS/DiD 79/20/1) est dispersée dans 1 ml de tampon HEPES (10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4). Par la suite, 10 µl d'une dispersion de SPC50-16A5 à 1 g/l est ajoutée puis 2 µl d'une solution de calcium à 1 M. Après 5 min d'incubation, l'échantillon est placé au centre du quadripôle, et après de nouveau 5 min, le surnageant est prélevé. Les objets retenus sont dispersés dans le tampon HEPES contenant également 4 mM d'EDTA, puis les SPC sont extraits magnétiquement durant 5 min avant de prélever le surnageant. Avant la réutilisation des SPC biofonctionnalisées, celles-ci sont lavées à l'aide du tampon HEPES.*

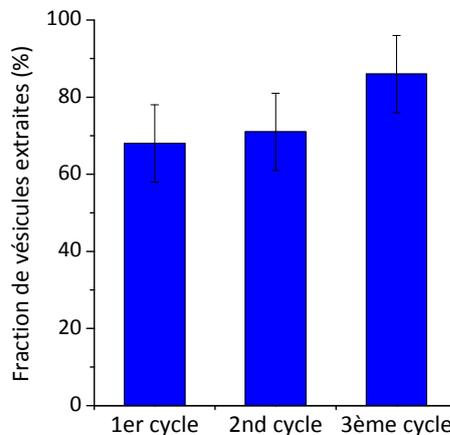
Lorsque le calcium est ajouté à l'échantillon contenant les MLV (10 µg/ml) et les SCP50-16A5 (10 µg/ml), la dispersion devient instantanément trouble. Cette observation montre que les particules ainsi que les MLV forment des complexes volumineux diffusant la lumière. L'observation en MET de cet échantillon après coloration à l'acétate d'uranyle met en évidence la co-localisation des SPC et des MLV sous forme d'amas (**Figure IV.10 A**). Après 5 min d'incubation, l'échantillon est placé au centre du quadripôle durant 5 min puis le surnageant est prélevé. L'échantillon purifié est dispersé dans un volume identique de tampon.

La comparaison de l'absorbance du surnageant avec celle de l'échantillon brut indique que 95 % des vésicules sont extraites du milieu avec les particules magnétiques SPC50-16A5 (**Figure IV.10 B**). La mesure après dissociation et retrait des SPC montre que les 2/3 des MLV sont récupérés. La bande d'adsorption de la maghémite met en évidence la présence de quelques SPC résiduelles dans l'échantillon purifié.



**Figure IV.10 :** **A :** Micrographie en transmission électronique après coloration négative à l'acétate d'uranyle du complexe MLV/SPC50-16A5 en présence de calcium. **B :** Spectres d'absorbance permettant de suivre les MLV lors des différentes étapes d'extraction.

Différents cycles d'extraction sont réalisés avec les mêmes SPC biofonctionnalisées dans le but d'évaluer leur cyclabilité. La **Figure IV.11** montre que la fraction de MLV récupérée est du même ordre de grandeur pour les 3 cycles d'extraction/élution réalisés.



**Figure IV.11 :** Evaluation de la cyclabilité des SPC par suivi de la fraction de MLV récupérée après extraction et élution.

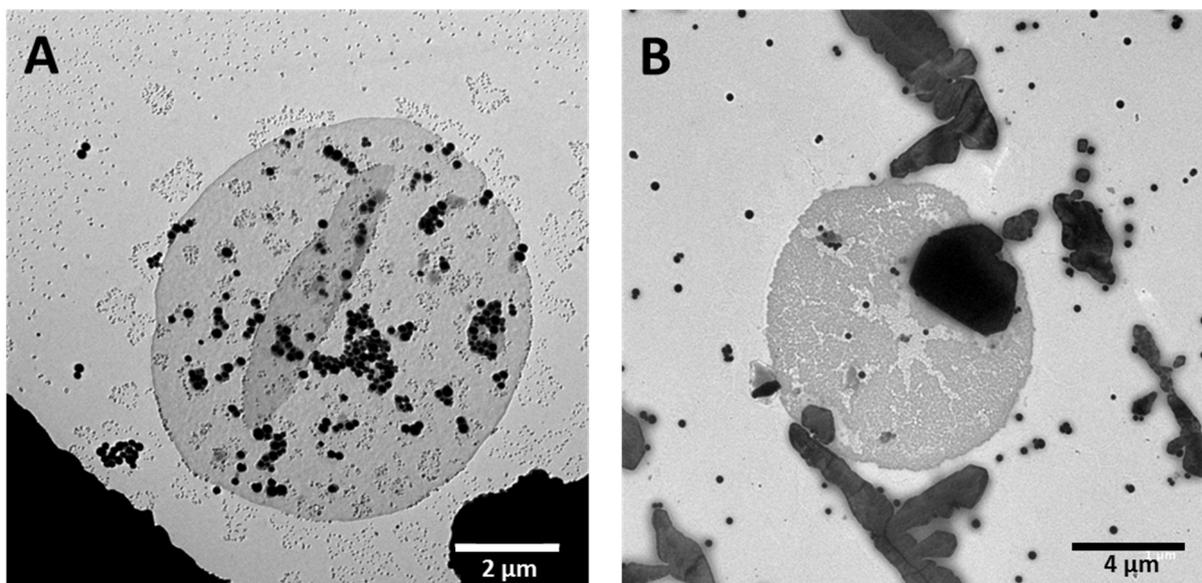
Les tests préliminaires d'extraction réalisés sur les MLV ont permis de valider la possibilité d'extraire des vésicules lipidiques contenant de la PS à partir des SPC biofonctionnalisées dans un milieu simple. Les interactions biomoléculaires sont suffisamment fortes pour résister à la force de traction. De plus, la cyclabilité des particules met en évidence la réversibilité de la liaison avec les MLV, ainsi que la réversibilité de l'agrégation engendrée par le gradient de champ magnétique.

### A.2.2 Extraction d'objets membranaires d'origine biologique

Jusqu'à présent, les membranes lipidiques utilisées, que cela soit en QCM-D, ou pour le premier test d'extraction, étaient des membranes modèles artificielles. L'idée est maintenant d'étudier l'extraction d'objets de différentes origines biologiques. Les fantômes d'érythrocytes sont des objets membranaires issus de la lyse d'érythrocytes qui ont subi un traitement dans un milieu hypo-osmotique. La PS est, en temps normal, confinée au niveau de la couche interne de la membrane plasmique. La rupture de la membrane après la lyse entraîne l'exposition de la PS sur le feuillet externe des membranes. De plus, lors de la lyse cellulaire, une grande quantité de microvésicules est produite. Comme cet échantillon est préparé par dilution du plasma dans l'eau, la concentration en biomolécules reste faible, c'est pourquoi il est utilisé en premier lieu pour étudier l'extraction d'objets d'origine biologique.

Les vésicules produites au cours de la lyse, ainsi que les fantômes d'érythrocytes ont été quantifiés avant et après extraction par cytométrie en flux. Comme les vésicules sont des objets de faible diamètre et d'indice de réfraction proche du milieu, elles ne diffusent que très peu la lumière. Elles ont donc été marquées par de l'Anx-A5 fluorescente afin de les détecter en cytométrie.<sup>9</sup>

De manière à évaluer l'intérêt de la taille des particules magnétiques pour l'extraction, deux tailles différentes de SPC biofonctionnalisées ont été produites, des SPC50 (55 nm de diamètre) et des SPC250 (110 nm de diamètre).



**Figure IV.12 :** Micrographie en transmission électronique de fantômes d'érythrocytes incubés 1 h en présence de SPC250-Anx-A5, avec (A) ou sans (B) de calcium.

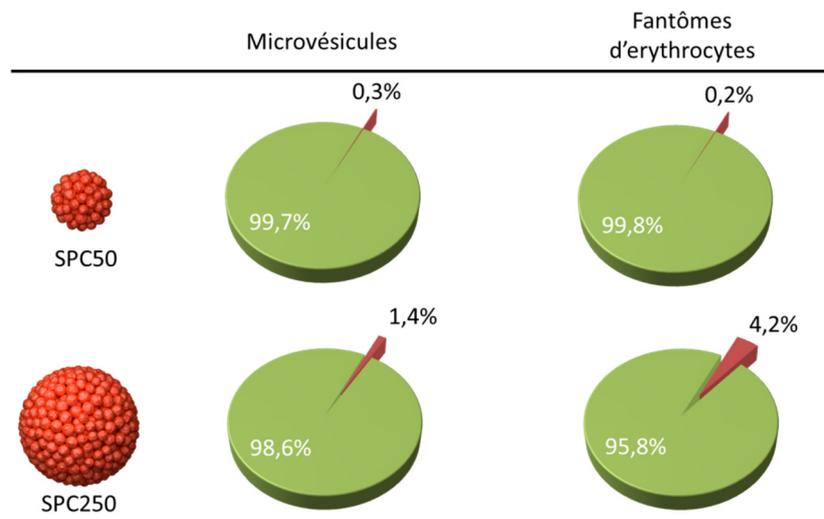
L'observation en transmission électronique d'échantillons de fantômes d'érythrocytes incubés avec des SPC250 bioconjugués montre la dépendance au calcium de la liaison des particules aux membranes lipidiques biologiques (**Figure IV.12**).

Les extractions sont réalisées après 3 h d'incubation de l'échantillon biologique avec les SPC (ajoutées à une concentration finale de  $4 \cdot 10^{13}$  SPC/l) en présence de 4 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Tableau 13** : Quantification par cytométrie en flux des objets membranaires obtenus par lyse d'érythrocytes avant et après extraction.

	Microvésicules/ $\mu\text{l}$	Fantômes d'érythrocytes/ $\mu\text{l}$
<b>Echantillon brut</b>	136025	37648
<b>Surnageant SPC50</b>	344	74
<b>Surnageant SPC250</b>	1969	1625

Le **Tableau 13** résume les résultats de la quantification des objets par cytométrie en flux (expériences réalisées au CBMN par l'équipe d'Alain Brisson (Céline Gounou) sur un cytomètre Gallios (Beckman Coulter)). Après extraction des nanoparticules, la quasi-totalité des événements détectés dans l'échantillon brut a disparu. Cela indique que la majorité des objets membranaires a été éliminé du surnageant avec les nanoparticules.



**Figure IV.13** : Représentation de fractions des objets extraits (vert) ou restants (rouge) déterminés par cytométrie en flux.

Comme le montre la **Figure IV.13**, l'extraction avec les SPC50 permet d'éliminer 99,7 % des microvésicules présentes dans l'échantillon, ainsi que 99,8 % des fantômes d'érythrocytes. Les résultats obtenus avec les SPC250 sont très légèrement inférieurs mais restent très corrects avec 98,6 % d'extraction pour les microvésicules et 95,7 % pour les érythrocytes lysés. En admettant que cette légère différence entre les SPC50 et les SPC250

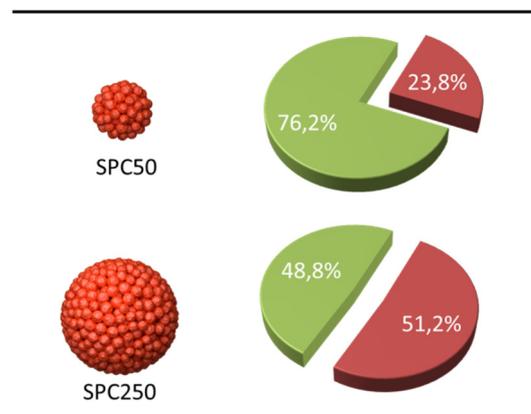
soit significative et reproductible avec un second lot, son interprétation serait que les SPC250 présentent une surface développée inférieure aux SPC50 et qu'elles diffusent plus lentement, ce qui diminuerait la probabilité de rencontre avec les membranes.

Fort de ces résultats, l'extraction d'objets contenus dans un plasma dépourvu de plaquette (PFP) est réalisée. Dans ce milieu, les cellules sanguines sont éliminées par centrifugation. Il ne reste donc dans le PFP plus que des protéines du plasma, ainsi que des vésicules extracellulaires naturellement présentes.

**Tableau 14** : Quantification par cytométrie en flux des vésicules extracellulaires contenues dans le PFP avant et après extraction.

	Vésicules extracellulaires/ $\mu$ l
<b>Echantillon brut</b>	28035
<b>Surnageant SPC50</b>	6668
<b>Surnageant SPC250</b>	14345

La quantification des vésicules extracellulaires après extraction montre que 76 % des vésicules initiales sont éliminées du surnageant grâce aux SPC50 (**Tableau 14** et **Figure IV.14**). L'extraction est de l'ordre de 49 % avec les SPC250.



**Figure IV.14** : Représentation des fractions de vésicules extracellulaires extraites (vert) ou restantes (rouge) déterminées par cytométrie en flux sur le PFP.

Ces premiers tests donnent des résultats très encourageants. L'extraction est cependant moins efficace que celle réalisée dans les milieux modèles précédemment. Cette perte d'efficacité pourrait être attribuée à la présence de protéines limitant les interactions spécifiques entre les nanoparticules et les vésicules. Cette hypothèse n'a cependant pas encore pu être vérifiée. Il serait intéressant d'étudier par QCM-D les interactions entre les deux partenaires en fonction de la concentration en protéine.

A notre connaissance, l'extraction de vésicules circulantes est jusqu'à présent réalisée à l'aide de microbilles magnétiques.<sup>10</sup> La principale limitation réside dans la faible surface développée disponible et donc la faible capacité d'extraction sur de grands volumes.<sup>11</sup> Très récemment, Arakeluan *et al.* ont présenté l'extraction de VE par immuno-capture à l'aide de nanoparticules magnétiques commerciales de 15 nm de diamètre.<sup>12</sup> La capacité d'extraction annoncée est supérieure à 90 %. Cette stratégie présente cependant deux inconvénients. Tout d'abord, à volume en matériau magnétique égal, la quantité de biomolécules nécessaire à la biofonctionnalisation est nettement bien plus élevée pour les particules isolées que pour les SPC, car il faut au minimum une biomolécule par nanoparticule. Le second point discutable est le fait que l'extraction magnétique d'un objet donné n'est possible que si une force magnétique suffisante peut être appliquée à cet objet. Un volume minimum de matériau magnétique est donc nécessaire. Ainsi, l'extraction de VE en fonction d'une cible faiblement exprimée à sa surface pourrait ne pas être possible avec l'emploi de nanoparticules isolées, car la quantité de matière magnétique liée à l'objet serait insuffisante.

### A.3 Conclusion

Il a été montré au cours de cette étude que la modification de surface développée dans le chapitre II appliquée aux SPC permet de prévenir les interactions non spécifiques avec les membranes lipidiques. La fonction biologique de reconnaissance moléculaire de l'Anx-A5 n'est pas altérée par le greffage de la biomolécule à la surface des SPC. De plus, une Anx-A5 par SPC en moyenne est suffisante pour promouvoir la liaison du nano-objet avec la membrane. Ceux-ci reconnaissent spécifiquement les membranes lipidiques contenant des têtes polaires phosphatidylsérine en présence de calcium et se dissocient de la membrane par élimination du calcium libre dans le milieu.

Les tests préliminaires d'extraction réalisés sur les érythrocytes lysés ainsi que sur les microvésicules formées montrent l'extraction de la quasi-totalité des objets biologiques. L'extraction des VE présentes dans le plasma est de l'ordre de 80 %. Pour un premier test, ce résultat est très encourageant. Il reste maintenant à comprendre le facteur limitant dans ces conditions afin d'égaliser les résultats obtenus sur les vésicules modèles.

## **B. Les VUSPIO biofonctionnalisés pour la détection multimodale de zones pathologiques *in vivo***

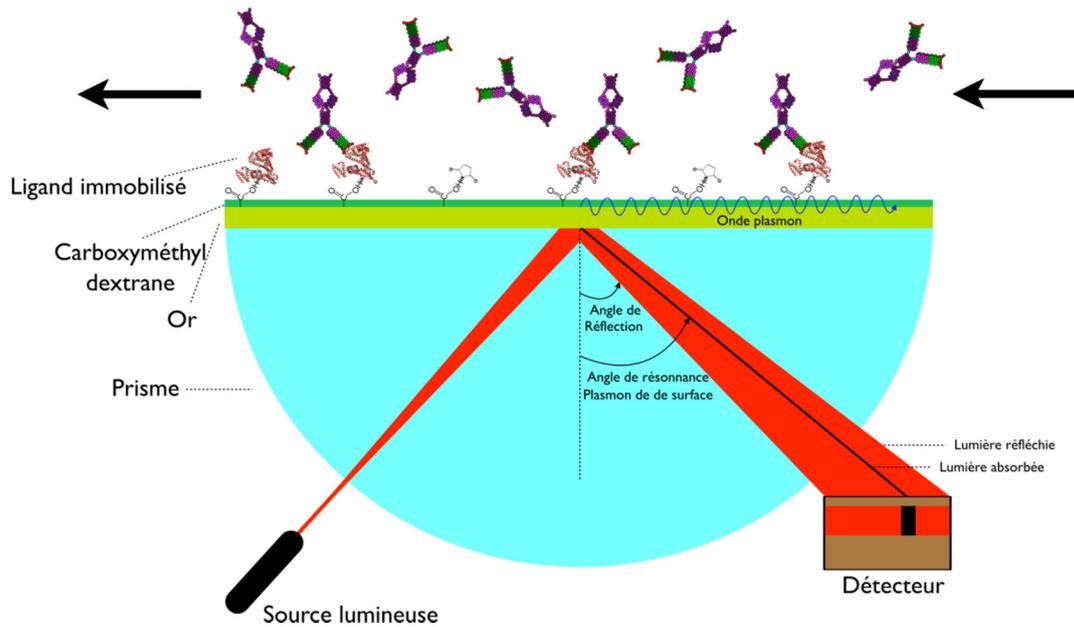
### **B.1 Marquage de plaques d'athérome vulnérables**

L'étude du marquage de plaques d'athérome par le VUSPIO biofonctionnalisé par des scFv dirigé contre l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  exprimée par les plaquettes activées présentes dans la zone pathologique a été conduite en deux étapes : Dans un premier temps, la propriété de reconnaissance biomoléculaire de la cible par les nano-objets a été étudiée. Ensuite, des tests de marquage *in vivo* ont été entrepris.

#### ***B.1.1 Etude des propriétés de reconnaissance des VUSPIO dirigés contre la cible intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$***

##### ***B.1.1.1 Etude de la reconnaissance biomoléculaire par résonance plasmonique de surface***

La résonance plasmon de surface (SPR) correspond à l'oscillation des électrons de conduction à l'interface entre un métal et un milieu diélectrique sous l'effet d'une lumière incidente. En condition de réflexion totale, pour un angle donné, l'énergie lumineuse est adsorbée et non reflétée. Cet angle d'absorption est fonction de l'indice de réfraction du milieu diélectrique à proximité de la surface. En réalité, la SPR est un phénomène physique bien plus complexe, mais il n'est pas nécessaire d'approfondir la théorie pour comprendre le principe des techniques biophysiques de caractérisation mettant à profit ce phénomène pour étudier les interactions biomoléculaires (**Figure IV.15**). Les cibles moléculaires sont immobilisées sur la surface d'or à l'aide de macromolécules de dextrane carboxyméthylées. L'analyte est mis en contact de la surface à l'aide d'un système microfluidique. En se liant à sa cible, celui-ci modifie l'indice de réfraction local et donc l'angle de résonance plasmon qui est suivi en temps réel. Les appareils BIAcore® sont basés sur ce principe. L'unité communément employé et le RU pour Resonance Unit. Un 1 RU représente 1 pg de protéine par mm<sup>2</sup>.

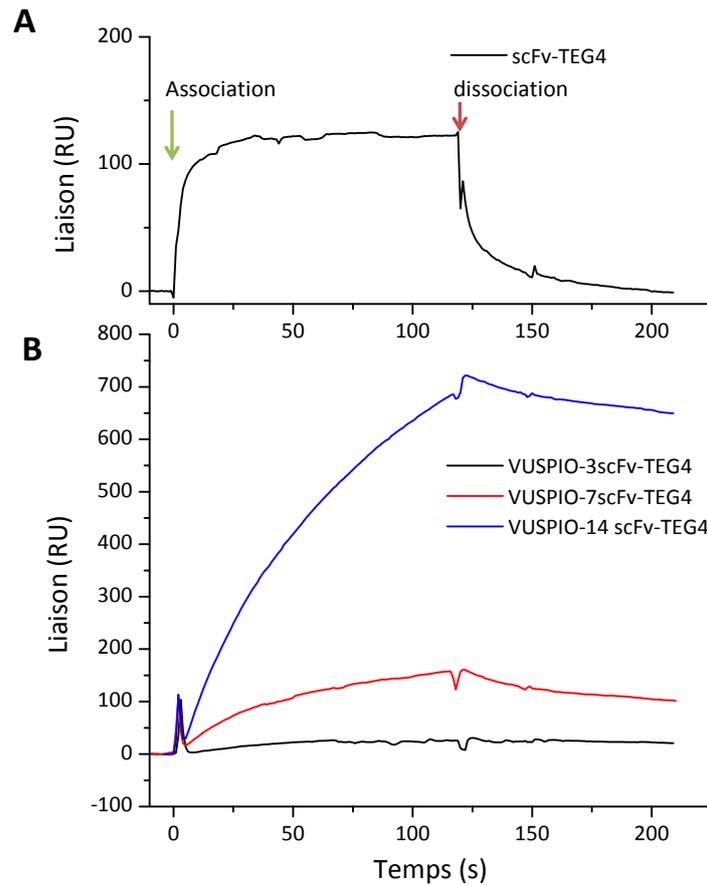


**Figure IV.15** : Schéma illustrant le principe simplifié des mesures d'interactions par SPR. Adapté de la réf.<sup>13</sup>

Les techniques basées sur la SPR permettent, en règle générale, d'accéder aux constantes d'affinités des interactions des biomolécules ainsi qu'à leurs constantes cinétiques.

Les expériences ont été réalisées par Laëtitia Minder au sein de la plateforme de biophysico-chimie structurale de l'Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB) sur le système Biacore™ 3000. La cible intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  est greffée covalentement aux macromolécules de dextrane carboxyméthylées portés par la puce (CM5, GE Healthcare) par formation d'une liaison amide par chimie EDC/NHS. L'échantillon contenant les scFv-TEG4 est ensuite injecté sur la puce par un système microfluidique. Les sensorgrammes obtenus sont présentés en **Figure IV.16**.

Le scFv-TEG4 reconnaît la cible immobilisée. Le sensorgramme montre également qu'il se dissocie rapidement de l'intégrine. En effet la quasi-totalité du signal est perdu après 2 min de dissociation (**Figure IV.16-A**).

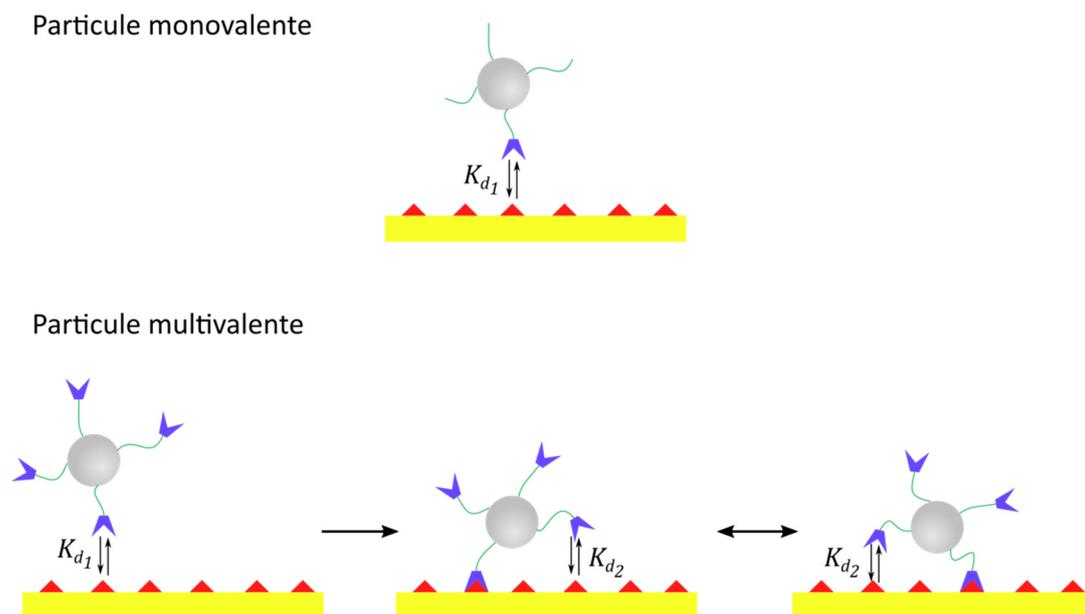


**Figure IV.16 :** Sensorgrammes obtenus par SPR sur une puce CM5 fonctionnalisée par l'intégrine  $\alpha_{11b}\beta_3$  (immobilisation : 2000 R.U.). **A :** le scFv-TEG4 est injecté à 3  $\mu\text{M}$ . **B :** Les particules sont injectées à 0,25  $\mu\text{M}$  (en particules).

La liaison des VUSPIO à la cible est de plus en plus élevée avec l'augmentation du nombre de scFv greffés par particule. Bien que des modèles d'études des systèmes multivalents monodisperses commencent à émerger,<sup>4,14,15</sup> il n'existe pas, à l'heure actuelle, de modèles permettant de déterminer les constantes cinétiques et définir la constante de dissociation sur un système aussi complexe. En effet, non seulement les interactions multivalentes sont délicates à modéliser mais le système est également très hétérogène étant donné la distribution en taille des VUSPIO, sans compter sur la répartition aléatoire des scFv entre les particules. En absence de modèle, il serait néanmoins possible de déterminer les constantes de dissociation apparentes ( $K_{d-app}$ ) en réalisant une étude à l'équilibre pour différentes concentrations. Une étude a été débutée dans ce sens, cependant elle demande encore un important travail d'optimisation. La constante de dissociation apparente, fait également référence à la notion d'avidité. Alors que le terme affinité est réservé à la force d'une liaison entre la biomolécule et sa cible, le terme avidité fait référence à la somme de toutes les liaisons entre les deux partenaires. Il est donc évident que la détermination de

l'avidité par une étude cinétique demanderait des modèles mécanistiques très complexes pour représenter la réalité. Sans chercher à donner des valeurs, il est cependant intéressant de discuter de l'origine de l'augmentation observée de l'avidité des particules pour la cible avec l'augmentation du nombre de scFv greffés. Il faut tout d'abord avoir à l'idée que la SPR ne détecte pas la liaison à proprement parlé (sauf cas très particuliers) mais la présence de la biomolécule ou de la nanoparticule dans un volume d'environ 200 nm d'épaisseur à partir de la surface d'or (propagation de l'onde évanescente du plasmon). Leur accumulation dans ce volume est quant à elle attribuée à leur liaison à la cible. Ainsi, un VUSPIO multivalent dans ce volume lié à une intégrine présentera le même signal que s'il est lié à plusieurs intégrines, cependant les cinétiques attribuées à ces deux situations seront différentes.

Prenons tout d'abord le cas d'une particule monovalente. Celle-ci se lie à la cible via un  $K_{d-app}$  correspondant au  $K_d$  du couple molécule de ciblage greffée/molécule ciblée (**Figure IV.17**).



**Figure IV.17** : Représentation schématique des interactions entre la surface de la puce SPR biofonctionnalisée et une particule monovalente ou multivalente.

Dans le cas d'une nanoparticule multivalente, le  $K_d$  de la première liaison est équivalent à celui d'une particule monovalente. Le  $k_{on}$  de la liaison de la nanoparticule multivalente à la cible est donc équivalent à celui d'une particule monovalente. La vitesse initiale d'association ne devrait donc pas être très différente entre des nanoparticules monovalentes et des particules multivalentes présentant un taux de bioconjugaison différent. Sur la **Figure IV.16** la vitesse initiale apparente d'association augmente avec l'augmentation

du nombre de fragments d'anticorps greffés. Ceci pourrait signifier que la fraction active du scFv (fraction ayant la capacité de reconnaître l'intégrine) est faible. En effet, si par exemple, la fraction active ne représente que 10 % de la totalité des protéines greffées, alors les VUSPIO présentant 3 scFv, n'en possèderaient en réalité que 0,3. Or, il a été expliqué dans la partie A.1 de ce chapitre que pour de faibles taux de bioconjugaison, la fraction de particules ne possédant aucune biomolécule est élevée et engendre une erreur sur la détermination des cinétiques.

A la suite de la première liaison entre la nanoparticule multivalente et une cible, le  $K_d$  des liaisons suivantes est différent car les biomolécules sont déjà confinées dans un volume réduit, la variation de l'entropie provoquée par la liaison n'est pas aussi élevée que dans le cas de la première liaison (**Figure IV.17**). Lorsque la particule est liée par plusieurs interactions « molécules de ciblage/cible », alors la probabilité pour que la nanoparticule se dissocie de la surface correspond à la probabilité que toutes les liaisons soient dissociées en même temps. Le taux de dissociation d'une particule liée par plusieurs interactions est donc bien inférieur à celui d'une particule liée à la surface via une seule interaction. Le  $k_{off}$  de la liaison d'une particule sur la surface est donc fortement impacté par la multivalence de la nanoparticule.<sup>4,15</sup> La **Figure IV.16** montre clairement que la vitesse de dissociation est grandement diminuée pour le VUSPIO présentant 14 scFv par rapport au scFv seul. Cette diminution de la dissociation augmente l'affinité apparente des nanoparticules pour une surface présentant des intégrines.

L'effet de la multivalence sur l'affinité est grandement lié à la capacité de la nanoparticule à pouvoir former plusieurs liaisons et ainsi diminuer la probabilité de dissociation, mais cet effet est également dépendant de la densité de cibles.<sup>14</sup> En effet, dans le cas où les intégrines sont trop espacées pour que la nanoparticule puisse former plusieurs liaisons alors la situation devient équivalente à une nanoparticule monovalente. Dans notre étude, le signal correspondant à l'immobilisation de l'intégrine est de 2000 RU ce qui correspond à  $5 \cdot 10^9$  intégrines/mm<sup>2</sup>, en considérant la masse molaire de 230 kDa pour l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$ .<sup>16</sup> Ces protéines sont réparties sur une épaisseur d'environ 200 nm. L'espacement moyen entre deux intégrines est donc d'environ 30 nm. Les nanoparticules quant à elles mesurent environ 50 nm de diamètre. Il leur est donc possible de former plusieurs liaisons. Cette problématique sera également valable dans une situation biologique où la densité d'intégrine doit être suffisamment élevée pour que la multivalence des nanoparticules permette de diminuer leur vitesse de dissociation et donc augmente l'avidité. Cette notion montre tout l'intérêt d'utiliser de longs bras espaceurs pour relier les

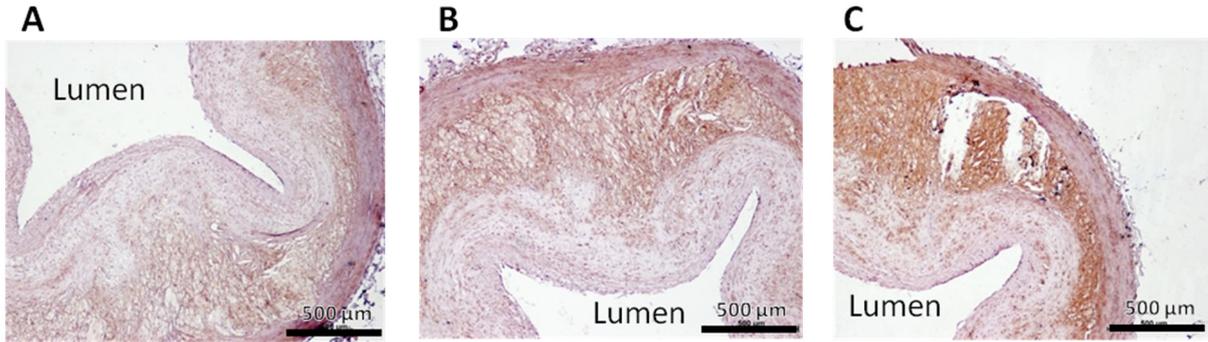
biomolécules de ciblage avec la nanoparticule car la possibilité de former plusieurs liaisons est augmentée.

### *B.1.1.2 Mise en évidence du marquage spécifique des zones pathologiques par immunohistochimie*

Afin d'étudier l'effet de la multivalence des nanoparticules en situation biologique, le marquage de plaques d'athérome est réalisé avec les trois mêmes lots de VUSPIO bioconjugués que ceux utilisés pour la SPR. La présence des nano-objets est révélée par immunohistochimie. Cette technique consiste à détecter la présence d'un antigène dans un échantillon de tissu biologique avec un anticorps dirigé contre cet antigène. L'anticorps est couplé à une enzyme, directement ou par l'intermédiaire d'un anticorps secondaire. La dégradation du substrat de l'enzyme donne lieu à une coloration brune permettant de mettre en évidence la localisation de l'anticorps et donc de son antigène dans le tissu. L'étude a été réalisée par l'équipe de Gisèle Clofent-Sanchez au RMSB (Marie-Josée Jacobin-Valat).

Après incubation de coupes d'aortes de souris modèle (APOE<sup>-/-</sup>) ayant subi un régime hyperlipidémiant avec les VUSPIO biofonctionnalisés, le marquage des plaques d'athérome est mis en évidence par l'apparition d'une coloration brune au sein du tissu.

Les résultats obtenus par immunohistochimie sont en adéquation avec les résultats obtenus en SPR. En effet, la **Figure IV.18** montre que le marquage de la plaque d'athérome est plus intense avec les nanoparticules possédant 14 scFv par rapport aux particules possédant 3 ou 6 fragments d'anticorps. Au sein de la plaque d'athérome, ces particules ciblent l'intégrine activée présente sur les plaquettes activées. Le nombre d'intégrines  $\alpha_{IIb}\beta_3$  par plaquette est estimé à 80 000.<sup>17</sup> En considérant un diamètre moyen de 3  $\mu\text{m}$  pour une plaquette, la distance moyenne entre deux intégrines est d'environ 20 nm. La densité à la surface des plaquettes est donc suffisante pour permettre aux nanoparticules de former plusieurs liaisons, et ainsi de retrouver l'effet bénéfique de leur multivalence.



**Figure IV.18** : Cliché d'immunohistochimie révélant la présence des scFv portés par les VUSPIO sur des coupes d'aorte de souris APOE<sup>-/-</sup> après incubation avec **A** : VUSPIO-50D-3scFv-TEG4, **B** : VUSPIO-50D-7scFv-TEG4, **C** : VUSPIO-50D-14scFv-TEG4. La coloration brune indique la présence des VUSPIO-xscFv après réaction du substrat avec la peroxydase.

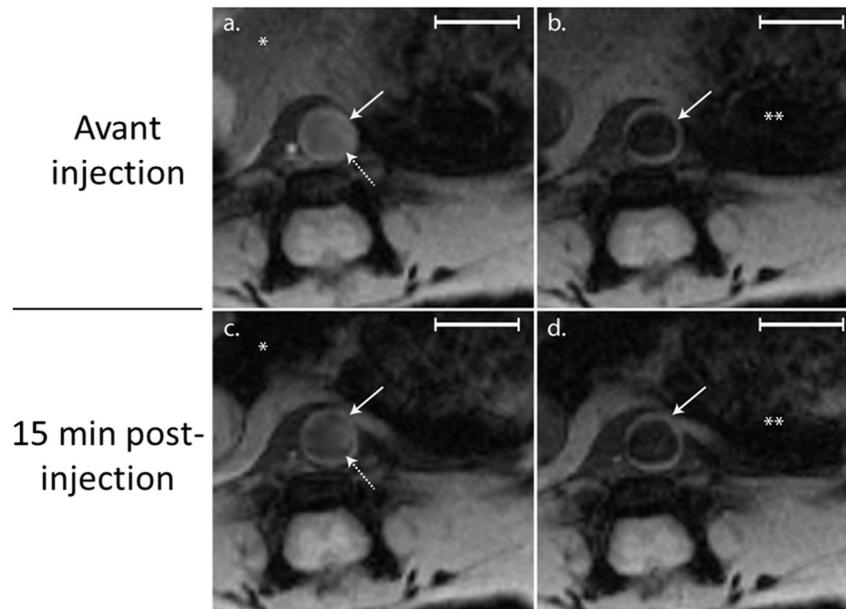
### B.1.1.3 Conclusion

Au cours de cette étude *in vitro*, l'intérêt de la multivalence des nanoparticules a été montré. En effet, bien que les constantes cinétiques ainsi que la constante d'équilibre n'aient pas été déterminées, il a été montré par SPR que l'avidité est augmentée avec le nombre de scFv par particules, et que cette augmentation est principalement liée à la diminution du phénomène de dissociation. Cette observation a été confirmée sur un tissu biologique par immuno-révélation sur coupes histologiques. Le VUSPIO possédant 14 scFv se révèle être le meilleur candidat pour le marquage de plaques d'athérome *in vivo*.

### B.1.2 Etude *in vivo* du marquage des plaques d'athérome

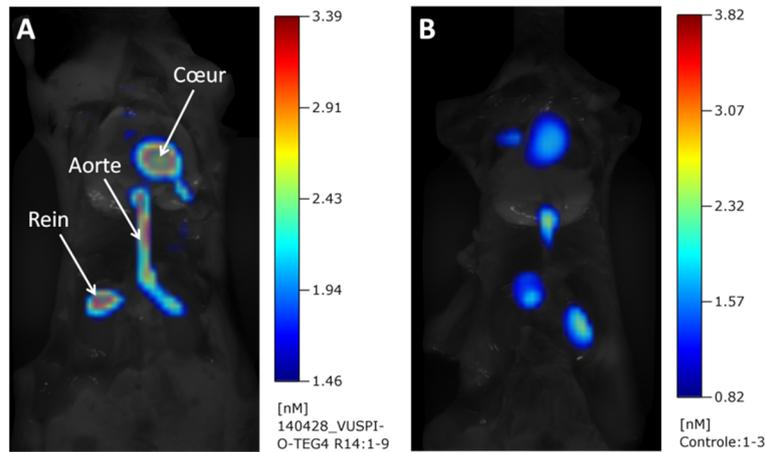
Le VUSPIO-50D-14scFv-TEG4 est injecté par voie intraveineuse dans une souris APOE<sup>-/-</sup> à une dose en maghémite de 10 mg/kg. Le marquage des plaques d'athérome est ensuite suivi à la fois par IRM et par imagerie de fluorescence dans le PIR. Les expériences sont réalisées par l'équipe de Gisèle Clofent-Sanchez au sein du RMSB et à la plateforme d'imagerie Vivoptic de l'université de Bordeaux.

Une première série d'expérience *in vivo* a été réalisée par IRM avant et après injection des VUSPIO biofonctionnalisés (**Figure IV.19**). Un léger hyposignal est observé au niveau de la plaque d'athérome. Celui-ci pourrait être attribué à la présence des nanoparticules d'oxyde de fer, cependant le signal est bien trop faible pour le confirmer. Les images montrent également un fort hyposignal au niveau du foie après 15 min, montrant une capture rapide des particules par le SRE.



**Figure IV.19** : Images d'IRM présentant une section de l'aorte thoracique d'une souris APOE<sup>-/-</sup>, avant ou après injection des VUSPIO-50D-14scFv-TEG4, sans (a, c) ou avec extinction du signal du sang (b, d). Flèche blanche : Plaque athéromateuse, flèche pointillée : Hyposignal, \* : Foie, \*\* : Estomac. Réalisé sur un scanner 4,7 Tesla Bruker Biospin (Billerica, MA), à l'aide d'une séquence FLASH. Barre d'échelle : 2 mm.

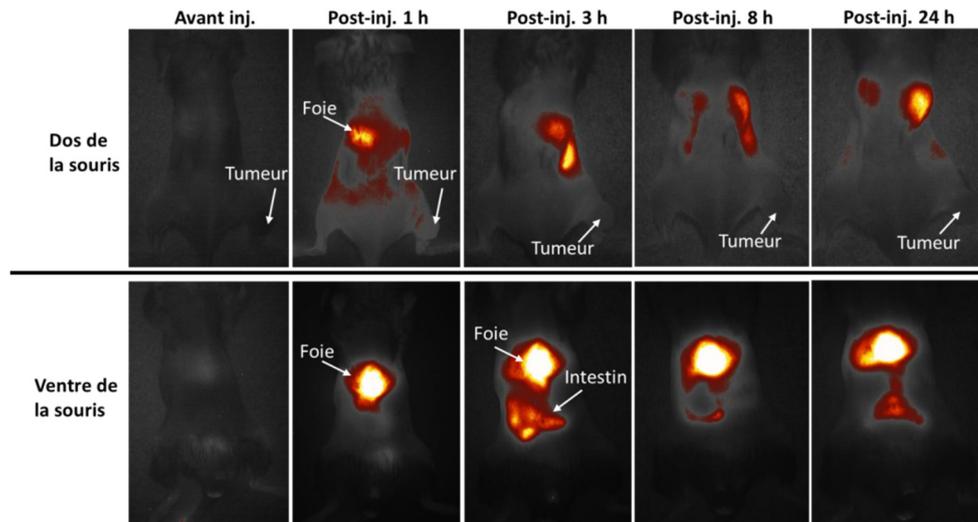
Fort de ce constat, des expériences d'imagerie de fluorescence *in vivo* sur ce même modèle animal ont été réalisées en complément de l'IRM. La **Figure IV.20** montre qu'avec les VUSPIO-50D-14scFv-TEG4, l'aorte, le cœur ainsi qu'un rein sont marqués alors qu'avec le VUSPIO-50D sans scFv-TEG4, les organes sont très faiblement marqués. Cela indique que les VUSPIO-50D-14scFv-TEG4 ciblent activement les plaques d'athérome. Ce ciblage est réalisé par la présence des fragments d'anticorps greffés sur la nanoparticule. Tout comme l'avait montré l'IRM, le foie avait capté un grand nombre de particules, et a dû être retiré avant l'enregistrement des images afin de ne pas saturer la caméra. Les cibles étant directement exprimées à la surface des vaisseaux sanguins, elles sont très accessibles, c'est pourquoi leur marquage est observable et ce, malgré une capture rapide des particules par le foie. Alors que l'IRM était trop peu sensible pour confirmer la présence des agents de contraste, celle-ci a été mise en évidence à l'aide de l'imagerie de fluorescence qui est une technique beaucoup plus sensible (de l'ordre du nM par rapport au mM en agent de contraste pour l'IRM). La prochaine étape sera de valider cet agent de contraste par IRM sur des modèles animaux de plus grande taille (lapin athéromateux).



**Figure IV.20** : Image de fluorescence dans le PIR de souris APOE<sup>-/-</sup> après injection de **A** : VUSPIO-50D-14scFv-TEG4, **B** : VUSPIO-0scFv-TEG4. Acquisition à l'aide d'un tomographe FMT4000 (Visen) (Vivoptic) sur animal ouvert après retrait du foie.

## B.2 Test de ciblage *in vivo* de tumeurs avec des VUSPIO fonctionnalisées par des ligands acides foliques.

Des VUSPIO biofonctionnalisés par des ligands d'acide folique ont été produits d'après le mode opératoire déjà mise en place durant des travaux antérieurs.<sup>18</sup> Ces travaux antérieurs avaient montré par SPR la reconnaissance des récepteurs de l'acide folique ainsi que le ciblage *in vitro* de cellules tumorales KB qui surexpriment des récepteurs de l'acide folique. Afin d'évaluer le ciblage *in vivo* de cellules tumorales par ces nanoparticules biofonctionnalisées, celles-ci ont été injectées par voie intraveineuse à une dose en maghémite de 15 mg/kg chez des souris présentant une tumeur cérébrale U87 (glioblastome) sous-cutanée. La biodistribution est ensuite suivie par fluorescence dans le proche infrarouge. L'étude a été réalisée à la plateforme d'imagerie Vivoptic par Franck Couillaud et Coralie Genevois du RMSB.



**Figure IV.21** : Suivi par fluorescence dans le proche infrarouge des VUSPIO folatés après injection intraveineuse dans des souris présentant des tumeurs sous cutanées U87. Temps d'exposition : 500 ms. Acquisition avec un Fluobeam® 800 (Fluoptics).

Les résultats de l'étude présentés en **Figure IV.21** révèlent que le foie est fortement marqué dès 1 h après injection, alors qu'aucun marquage de la tumeur n'est détecté. De plus, l'intensité de marquage du foie n'évolue plus au-delà de 3 h suggérant que tout se joue aux cours de ces 3 premières heures. Cela indique que les nanoparticules sont opsonisées, et éliminées de la circulation sanguine, ne laissant pas le temps de marquer la tumeur par effet EPR. La surface des nanoparticules ne permet pas la répulsion efficace des protéines plasmatiques. D'après la quantité maximale de fonctions thiol présentes sur le VUSPIO après réaction avec le réactif de Traut, le nombre de macromolécules de PEG est estimé à 300 par VUSPIO. En considérant un diamètre moyen de 50 nm pour les VUSPIO, la densité surfacique de PEG correspondante est de 0,04 macromolécules/nm<sup>2</sup>. Cette valeur est trop faible pour limiter l'adsorption des biomolécules, d'autant plus que le poids moléculaire des macromolécules de PEG employées n'était que de 2 000 g/mol (conformation champignon). De plus, parler de surface pour ce type de nanoparticules ne représente pas la réalité car celles-ci sont formées par des nanoparticules d'oxyde de fer reliées par des macromolécules de dextrane sur lesquelles les macromolécules de PEG sont greffées. Les macromolécules polymères sont donc réparties dans un volume et non sur une surface, la densité de PEG est donc inférieure à celle estimée auparavant. Les macromolécules de dextrane contribuent également à la répulsion des biomolécules, cependant, celles-ci ne forment très probablement pas de brosse polymère, car elles sont greffées à la surface via les résidus osidiques présents tout le long de la macromolécule.

### B.3 Conclusion

L'étude de la reconnaissance de l'intégrine  $\alpha_{11b}\beta_3$  par les nanoparticules biofonctionnalisées avec un fragment d'anticorps dirigé contre l'intégrine montre l'avantage de la multivalence des nanoparticules. Alors que le fragment scFv présente une dissociation rapide de la cible, limitant son utilisation pour des applications biomédicales, les nanoparticules possédant 14 scFv présentent une vitesse de dissociation bien plus lente. L'augmentation du nombre de scFv greffés permet d'améliorer la liaison avec la cible mais également d'augmenter la qualité du marquage sur des coupes d'aorte de souris. Le VUSPIO possédant 14 scFv-TEG4 a montré un ciblage actif des plaques d'athérome après injection en intraveineuse dans une souris modèle. Ce ciblage a été mis en évidence grâce à la présence des sondes fluorescentes sur la nanoparticule, permettant ainsi une détection avec une grande sensibilité dans le PIR, chose qui n'aurait pas forcément été possible par IRM à ce stade de l'étude.

Le marquage de tumeurs n'a cependant pas été observé avec les VUSPIO-acide folique. L'extravasation passive du système sanguin vers le tissu tumoral, bien qu'il soit favorisé par l'effet EPR nécessite de longs temps de circulation. Or les VUSPIO sont rapidement opsonisés et captés par le foie. Il faut rappeler que les VUSPIO fluorescents ont été mis au point pour la détection de la plaque d'athérome qui est une cible très accessible car les récepteurs sont exprimés au contact du flux sanguin.

## C. Marquage de tumeurs par des nanoparticules hybrides de silice fluorescentes PEGylées.

Afin de valider les propriétés de furtivité de la PEGylation développée dans le chapitre II, une tentative de marquage de tumeurs par effet EPR est entreprise avec les nanoparticules de silice fluorescentes PEGylées. Ces propriétés sont nécessaires avant de penser à utiliser ces nano-objets dans le cadre d'une stratégie de ciblage actif de tumeurs. L'étude porte sur deux types de tumeurs : une tumeur modèle du glioblastome implanté en sous-cutanée comme modèle de validation de l'effet EPR, et un deuxième modèle plus proche d'une situation clinique puisqu'il s'agit d'une tumeur de la prostate orthotopique.

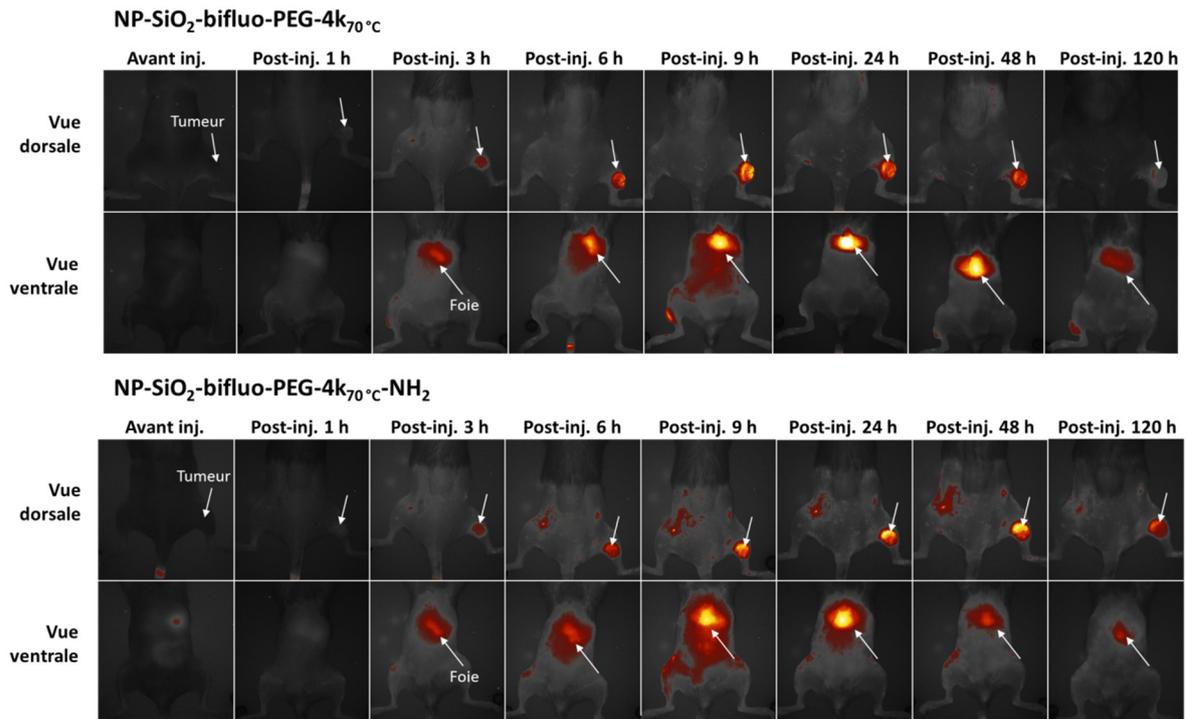
Les expériences ont été réalisées par l'équipe du Dr. Franck Couillaud au RMSB.

**Mode opératoire IV-4 : Suivi des nanoparticules in vivo par imagerie de fluorescence dans le proche infrarouge :**

*Les NP-SiO<sub>2</sub>-bifluo-PEG-4k<sub>70</sub> °C ainsi que les NP-SiO<sub>2</sub>-bifluo-PEG-4k<sub>70</sub> °C-NH<sub>2</sub> sont dispersées dans un tampon PBS à une concentration de 10 g/l. Ensuite, 100 µl de chaque dispersion sont injectés en intraveineuse à des souris possédant une tumeur sous cutanée U87 (modèle du glioblastome), soit une tumeur orthotopique de la prostate. La fluorescence des nanoparticules est alors suivie à l'aide d'un imageur Fluobeam® 800 de Fluoptics.*

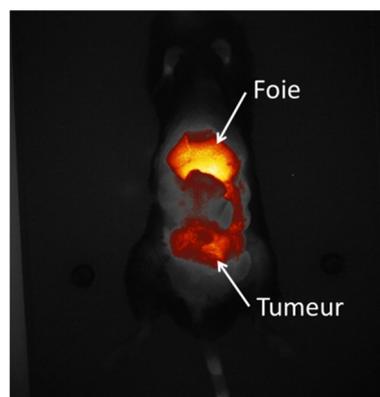
Après injection intraveineuse des nanoparticules à 50 mg/kg chez la souris, le suivi des nanoparticules est mené par imagerie de fluorescence dans le proche infrarouge (**Figure IV.22**). Contrairement aux VUSPIO, les images réalisées 1 h après injection ne montrent pas de capture hépatique. La tumeur est ciblée passivement par effet EPR, que cela soit avec les NP-SiO<sub>2</sub>-bifluo-PEG-4k<sub>70</sub> °C ou les NP-SiO<sub>2</sub>-bifluo-PEG-4k<sub>70</sub> °C-NH<sub>2</sub>. Les nanoparticules se concentrent dans la tumeur par effet EPR jusqu'à 9 h après injection, indiquant que les particules sont toujours en circulation. Bien qu'une capture hépatique soit également observée, la PEGylation permet de limiter grandement l'opsonisation des nanoparticules que cela soit avant ou après amination des extrémités des macromolécules. Ces observations sont en accord complet avec les résultats obtenus à la fin du chapitre II où il avait été montré que la PEGylation diminuait significativement l'adsorption de la BSA avant ou après amination des extrémités. Le marquage de la tumeur est toujours très intense après 2 jours, et décroît ensuite. Il semble que les NP-SiO<sub>2</sub>-bifluo-PEG-4k<sub>70</sub> °C-NH<sub>2</sub> résident plus longtemps dans la tumeur que les nanoparticules non aminées, cependant l'amplitude de l'effet EPR ne peut pas être comparée entre deux tumeurs. Cette perte du marquage peut s'expliquer d'une part, par le drainage lymphatique existant, bien que faible au niveau des tumeurs. Une autre explication serait que les nanoparticules de silice, ou les sondes fluorescentes, se dégraderaient en milieu biologique, notamment du fait de la présence élevée en sels,<sup>19</sup> d'autant que les coeurs de silice présentent un faible diamètre (18 nm). Dans le cadre du marquage d'une zone pathogène pour l'imagerie, il n'est pas nécessairement intéressant que le marquage persiste car un marquage vite éliminé permet une meilleure résolution dans le temps de l'évolution de la zone étudiée.

Le test témoin consistant à injecter les particules avant PEGylation n'a pas été réalisé car la probabilité que les particules s'agrègent et provoquent la mort de la souris est trop élevée et n'est pas acceptable d'un point de vue éthique.



**Figure IV.22** : Suivi par fluorescence dans le proche infrarouge des nanoparticules de silice bi-fluorescentes PEGylées après injection intraveineuse dans des souris présentant des tumeurs sous cutanées U87 (indiquée par la flèche blanche). Temps d'exposition : 1 s. Acquisition avec un Fluobeam® 800 (Fluoptics).

Un second test est réalisé sur une souris possédant une tumeur orthotopique. Des cellules d'un cancer de la prostate sont injectées au niveau de la prostate d'une souris. Deux semaines après l'implantation des cellules tumorales dans la prostate, les NP-SiO<sub>2</sub>-bifluo-PEG-4k<sub>70</sub>°C-NH<sub>2</sub> sont injectées par voie intraveineuse à une dose de 50 mg/kg. L'imagerie de fluorescence est réalisée vingt-deux heures plus tard. Le résultat est présenté en **Figure IV.23**.



**Figure IV.23** : Détection par fluorescence des NP-SiO<sub>2</sub>-bifluo-PEG-4k<sub>70</sub>°C-NH<sub>2</sub>, 22 h après injection intraveineuse dans une souris présentant une tumeur de la prostate (animal ouvert). Acquisition avec un Fluobeam® 800 (Fluoptics).

Comme auparavant, le foie a capté une partie des nanoparticules mais la tumeur orthotopique est également marquée par les nanoparticules. Ceci indique que ce type de tumeur présente également un effet EPR.

Contrairement aux VUSPIO présentant peu de macromolécules de PEG en surface, les nanoparticules PEGylées d'après la stratégie présentée dans le chapitre II circulent suffisamment longtemps pour s'accumuler au niveau des tumeurs. Le ciblage actif de la cible peu accessible est donc envisageable avec ce type de particules.

Les premiers résultats obtenus sont très encourageants quant à l'efficacité de la PEGylation pour rendre les particules biocompatibles et furtives. Il reste cependant encore des contrôles à réaliser avant de valider ces premiers résultats. Il serait notamment important de diminuer la quantité de nanoparticules injectées (environ 50 mg/kg dans l'étude) afin de s'assurer que le temps de circulation élevé n'est pas lié à une saturation du système hépatique. Cependant, l'intensité du marquage du foie augmente au cours des 9 premières heures (données non présentées), ce qui laisse penser que le système hépatique ne l'est pas au cours de cette première période.

Le greffage d'un agent de ciblage (aptamères) sur les nanoparticules pourrait permettre d'augmenter le temps de rétention au niveau de la zone à marquer. Il serait ainsi possible d'obtenir un meilleur marquage avec des doses inférieures.

## **D. Conclusion**

Au cours de ce chapitre, les nano-objets développés dans le chapitre III ont été testés dans le cadre de leur application.

L'adsorption spécifique des SPC biofonctionnalisées sur les membranes lipidiques présentant des fonctions phosphatidylsérine en présence de calcium a été montrée en QCM-D. L'extraction de vésicules lipidiques modèles présente de très bons résultats et les premiers tests réalisés sur des vésicules présentes naturellement dans le plasma sanguin sont très encourageants.

L'effet de la multivalence des VUSPIO a été observé par SPR. L'étude montre que cette multivalence permet de diminuer de façon significative le phénomène de dissociation, ce qui autorise un meilleur marquage des zones pathologiques. Les plaques d'athérome étant directement accessibles aux particules dans la circulation sanguine, celles-ci ont été marquées par les VUSPIO et ce, malgré une capture hépatique rapide des nano-objets. Cette élimination

par le système immunitaire représente cependant un gros handicap lorsque les cibles sont peu accessibles, comme avec les tumeurs. L'observation de l'effet EPR nécessite de plus longs temps de circulation pour augmenter la probabilité d'extravasation passive des marqueurs.

Une première étude de biodistribution des nanoparticules de silice fluorescente PEGylées montre un processus d'accumulation au niveau des tumeurs jusqu'à 9h après l'injection. Ces résultats indiquent que les particules échappent en partie au système immunitaire.

La mise à l'épreuve de la modification de surface par des macromolécules de PEG développée dans le chapitre II montre de très bons résultats quant à la gestion des interactions non spécifiques. En effet, cette couronne permet d'éviter l'adsorption non contrôlée des nanoparticules à la surface de membranes lipidiques. Elle permet également de rendre les nanoparticules relativement furtives vis-à-vis du système immunitaire car les nanoparticules fluorescentes présentent des temps de circulation élevés.

Dans l'objectif d'élargir le domaine d'application des VUSPIO en tant qu'agent de contraste, il est nécessaire d'améliorer le contrôle de l'adsorption des opsonines en augmentant la densité de macromolécules de PEG. Pour cela, l'utilisation de dendrons pourrait permettre d'augmenter le nombre de sites d'ancrage pour les macromolécules. Cette faible densité pour également être compensée en augmentant la masse moléculaire de la macromolécule qui pourrait être linéaire, ou même en étoile.

Les protéines greffées sur les nanoparticules, que cela soit l'Anx-A5 ou les scFv-TEG4, conservent leur activité biologique de reconnaissance de leur cible respective. La stratégie employée de greffage régiosélectif des biomolécules est donc en adéquation avec la conservation de l'intégrité des biomolécules ainsi qu'avec leur exposition optimale au milieu biologique. Cette stratégie permet de favoriser les interactions spécifiques.

## Références bibliographiques

- (1) Richter, R.; Mukhopadhyay, A.; Brisson, A. *Biophys. J.* **2003**, *85* (5), 3035–3047.
- (2) Richter, R. P.; Lai Kee Him, J.; Tessier, B.; Tessier, C.; Brisson, A. R. *Biophys. J.* **2005**, *89* (5), 3372–3385.
- (3) Arraud, N. Etude cinétique de la liaison élémentaire entre Annexine-A5 et membranes et mise au point d'un test de quantification des microparticules plasmatiques pro-coagulantes, par cytométrie en flux, Thèse soutenue à l'université Bordeaux 1, 2011.
- (4) Li, M.-H.; Choi, S. K.; Leroueil, P. R.; Baker, J. R. *ACS Nano* **2014**, *8* (6), 5600–5609.
- (5) Mornet, S.; Lambert, O.; Duguet, E.; Brisson, A. *Nano Lett.* **2005**, *5* (2), 281–285.
- (6) Tait, J. F.; Gibson, D. F.; Smith, C. *Anal. Biochem.* **2004**, *329* (1), 112–119.
- (7) Feder, J. J. *Theor. Biol.* **1980**, *87* (2), 237–254.
- (8) Hatch, G. P.; Stelter, R. E. *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, *225* (1–2), 262–276.
- (9) Arraud, N.; Gounou, C.; Linares, R.; Brisson, A. R. *J. Thromb. Haemost.* **2015**, *13* (2), 237–247.
- (10) Tauro, B. J.; Greening, D. W.; Mathias, R. A.; Ji, H.; Mathivanan, S.; Scott, A. M.; Simpson, R. J. *Methods* **2012**, *56* (2), 293–304.
- (11) Momen-Heravi, F.; Balaj, L.; Alian, S.; Mantel, P.-Y.; Halleck, A. E.; Trachtenberg, A. J.; Soria, C. E.; Oquin, S.; Bonebreak, C. M.; Saracoglu, E.; Skog, J.; Kuo, W. P. *Biol. Chem.* **2013**, *394* (10), 1253–1262.
- (12) Arakelyan, A.; Ivanova, O.; Vasilieva, E.; Grivel, J.-C.; Margolis, L. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2015**, *11* (3), 489–498.
- (13) Sabban, S. Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high-affinity FcεRI receptor., University of Sheffield, 2011.
- (14) Silpe, J. E.; Sumit, M.; Thomas, T. P.; Huang, B.; Kotlyar, A.; van Dongen, M. A.; Banaszak Holl, M. M.; Orr, B. G.; Choi, S. K. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (9), 2063–2071.
- (15) Kim, Y. E.; Kim, Y.; Kim, J. A.; Kim, H. M.; Jung, Y. *Nat. Commun.* **2015**, *6*.
- (16) Shattil, S. J. *Blood* **2004**, *104* (6), 1606–1615.
- (17) Wagner, C. L.; Mascelli, M. A.; Neblock, D. S.; Weisman, H. F.; Collier, B. S.; Jordan, R. E. *Blood* **1996**, *88* (3), 907–914.
- (18) Sonvico, F.; Mornet, S.; Vasseur, S.; Dubernet, C.; Jaillard, D.; Degrouard, J.; Hoebeke, J.; Duguet, E.; Colombo, P.; Couvreur, P. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16* (5), 1181–1188.
- (19) Mahon, E.; Hristov, D. R.; Dawson, K. A. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (64), 7970–7972.



## Conclusion générale et perspectives



Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit s'articulait autour du développement de nano-systèmes pensés pour répondre aux trois applications biologiques suivantes : l'extraction magnétique de vésicules lipidiques extracellulaires, le marquage *in vivo* de plaques d'athérome, et le marquage *in vivo* de tumeurs. Ces trois sujets d'études convergent vers une problématique commune de chimie de surface et de bioconjugaison de nanoparticules hybrides visant à promouvoir les fonctions de reconnaissance biomoléculaire nécessaires pour chaque application.

Dans un premier temps, à travers une étude bibliographique, nous nous sommes intéressés à comprendre le comportement général des nanoparticules dans les milieux biologiques. Il ressort de cette étude que leur surface doit être nécessairement modifiée de façon à limiter au maximum les interactions avec leur environnement très complexe. Cette étape de modification est également nécessaire pour accueillir dans les meilleures conditions les biomolécules de façon à bénéficier de leur fonction biologique. Une solution éprouvée consiste à former une couronne de macromolécules de poly(oxyde d'éthylène).

La première partie de ce travail de thèse portait sur le développement d'une voie de greffage covalent haute densité de macromolécules linéaires de PEG sur des surfaces de nano-objets à base de silice. Cela a permis d'obtenir des propriétés répulsives optimales, la diffusion des biomolécules au sein de la couronne polymère étant limitée par des effets stériques. De plus, dans l'idée d'utiliser les macromolécules greffées pour la conjugaison de biomolécules d'intérêt, cette haute densité de greffage a permis d'augmenter la disponibilité des fonctions chimiques terminales, tout en empêchant leur adsorption non spécifique. Cette voie de greffage a été réalisée en deux étapes : une première étape de modification chimique de surface permettant d'offrir une forte densité en fonction amine, suivie du greffage des macromolécules de PEG par amination réductrice. Pour cela, la conversion des fonctions alcool terminales de PEG commerciaux en aldéhyde a été réalisée par oxydation de Pfitzner-Moffatt. Cette oxydation a été appliquée sur des macromolécules de différentes masses moléculaires avec des rendements de conversion déterminés par RMN de l'ordre de 70 %.

En jouant sur les conditions de solvation des macromolécules polymère, faisant varier ainsi leur volume exclu, des densités de greffage allant jusqu'à 1,4 macromolécules/nm<sup>2</sup> pour des  $\bar{M}_n$  de 4 000 g/mol, et 2 macromolécules/nm<sup>2</sup> pour des  $\bar{M}_n$  de 1 000 g/mol ont ainsi été obtenues. A notre connaissance, ces valeurs de densité sont plus élevées que celles rapportées dans la littérature sur des surfaces de silice colloïdale. Des premiers tests d'adsorption de BSA montrent clairement les propriétés anti-adsorption des surfaces obtenues après PEGylation. La fonctionnalisation des nanoparticules PEGylées

nécessaire pour le couplage des biomolécules d'intérêt a été par la suite réalisée par conversion de la fonction alcool terminale en fonction amine, en deux étapes. Cette stratégie a montré qu'il était possible de conserver la propriété antiadhésive de la couronne polymère. A l'avenir, il sera intéressant de compléter cette étude en quantifiant les forces des interactions mises en jeu entre la couronne polymère et des biomolécules modèles. Cette étude pourra être réalisée par des mesures calorimétriques comme l'ITC (Isothermal Titration Calorimetry), de façon à déterminer les valeurs thermodynamiques et comparer ainsi les propriétés antiadhésives vis-à-vis des protéines pour les différentes surfaces obtenues.

Cette stratégie de modification chimique a ainsi été appliquée dans le cadre du développement de nano-objets pour l'extraction magnétique de vésicules extracellulaires contenues dans des fluides biologiques (**Figure 1-III** et **IV**). Ce nanomatériau devait présenter un grand volume magnétique tout en conservant des propriétés de superparamagnétisme. Pour cela, des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques ont été assemblées par évaporation d'émulsions pour former des supraparticules (SPC) de diamètre ajustable entre 50 et 110 nm (**Figure 1-I**). Nous avons, par la suite, mis en place une voie de consolidation de ces assemblages par une matrice de silice. Lors de cette encapsulation, la silice remplace totalement les ligands organiques initialement présents à la surface des nanoparticules en pénétrant au cœur même de la SPC pour former un véritable ciment entre les nanoparticules magnétiques (**Figure 1-II**). Après PEGylation de ce nano-objet, une bioconjugaison d'Annexine A5 mutée a été appliquée à ces surfaces (**Figure 1-V**). La voie de bioconjugaison utilisée nous a permis de contrôler la régiosélectivité et donc l'orientation de la protéine. Le nombre de protéines greffées est également ajustable entre 0 et 20 protéines/SPC50. L'utilisation d'un long bras espaceur garantit un certain degré de liberté à la protéine favorisant ainsi sa disponibilité nécessaire à sa fonction de reconnaissance moléculaire.

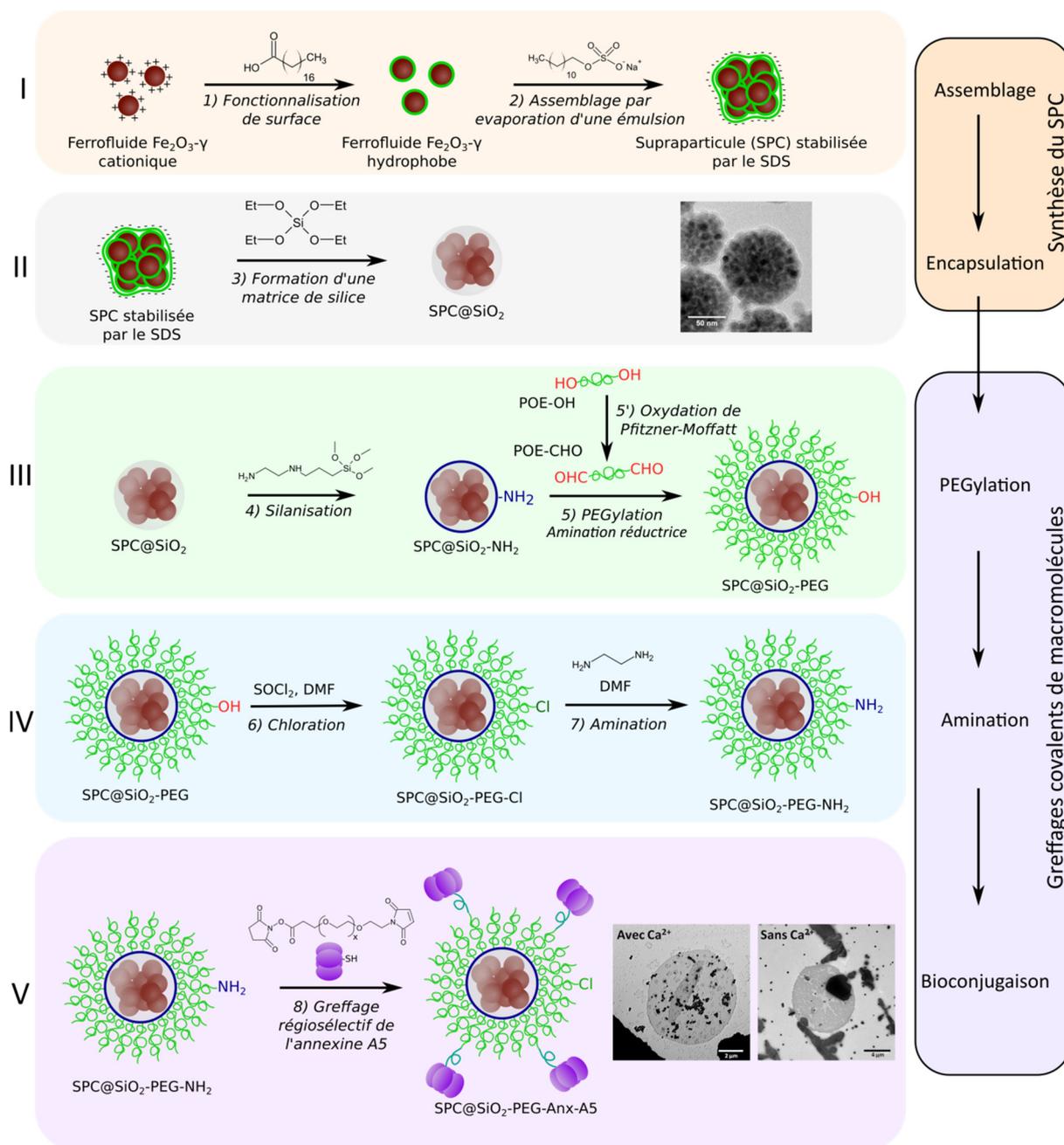
Une étude en QCM-D a permis de valider la reconnaissance spécifique des membranes lipidiques négativement chargées en présence de calcium. L'effet du nombre d'Anx-A5 sur la liaison a commencé à être évalué par QCM-D, cependant l'analyse devra être poursuivie car, pour l'heure, l'origine multifactorielle des variations observées ne permet pas de conclure. Il est d'ailleurs probable que la seule méthode de QCM-D ne soit pas suffisante pour obtenir des réponses sans ambiguïté.

Dans le futur, la caractérisation des interactions entre les SPC biofonctionnalisées et des membranes lipidiques supportées sur des microparticules dispersées (en opposition aux

membranes lipidiques supportées sur la surface du cristal du QCM-D) par cytométrie en flux, comme l'avait développé Nicolas Arraud durant sa thèse,<sup>1</sup> pourrait également apporter des éléments de réponse.

Les tests d'extraction préliminaires réalisés sur les érythrocytes lysés montrent l'extraction de la quasi-totalité des objets lipidiques. Enfin des premiers tests d'extraction de vésicules extracellulaires à partir de plasma présentent une extraction de plus de 80 % des objets présents dès le premier cycle. L'optimisation des conditions d'extraction devrait permettre, à l'avenir, d'améliorer cette valeur.

L'extension de cette méthode de bioconjugaison à des anticorps permettra à terme d'extraire de nouvelles classes de VE, qui associée à des outils bioanalytiques regroupés sous le terme de « omique » permettra l'ouverture vers des applications diagnostiques.



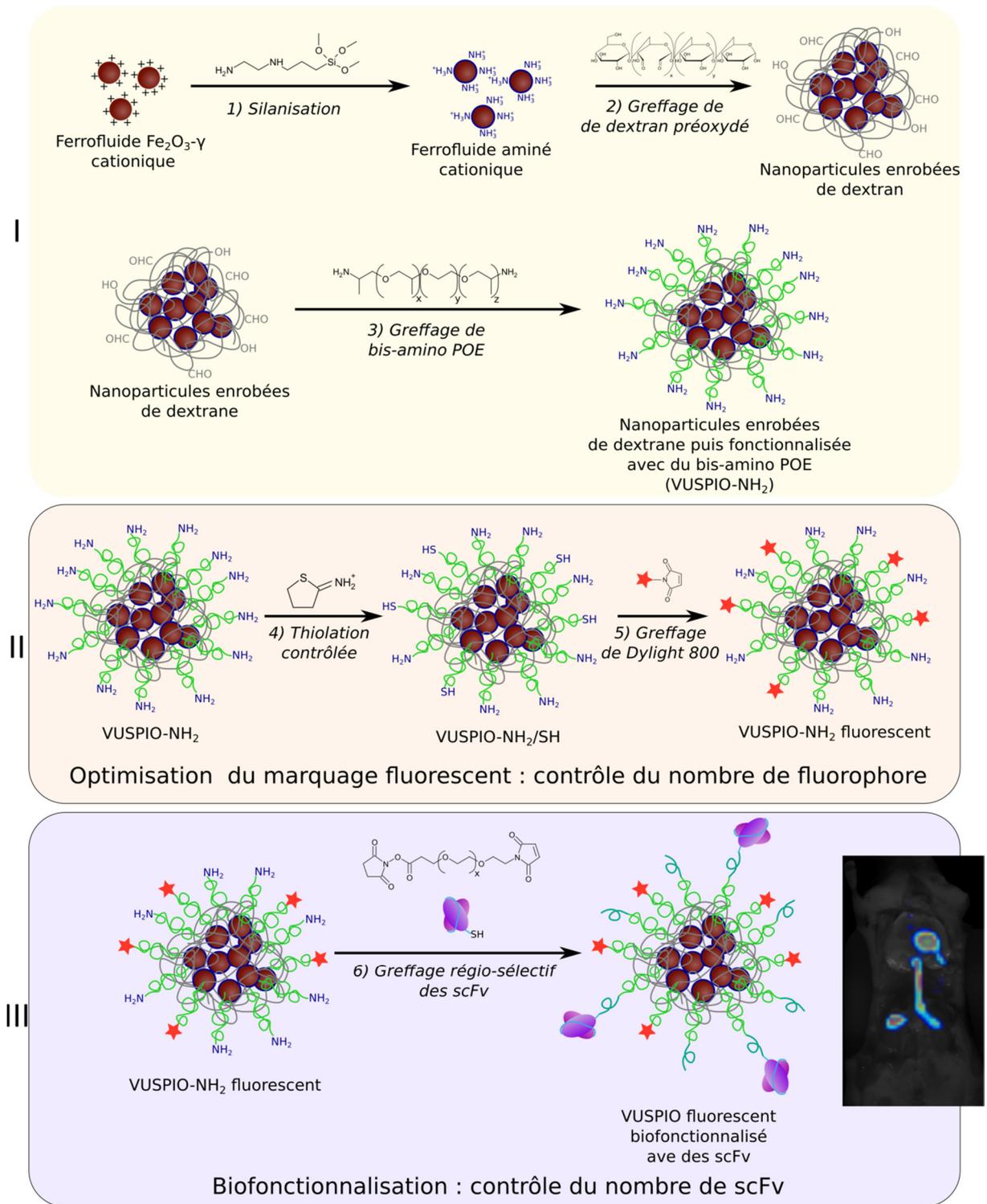
**Figure 1** : Stratégie de développement d'un nano-objet destiné à l'extraction de vésicule extracellulaire.

Dans le cadre de l'imagerie de l'athérosclérose *in vivo*, nous avons mis en place un deuxième type de nano-objet basé sur des clusters de nanoparticules superparamagnétiques utilisé comme agent de contraste en IRM. Un des objectifs de ce développement était d'offrir à ces nano-objets, appelés VUSPIO (**Figure 2-I**), une nouvelle voie de marquage basée sur l'imagerie de fluorescence *in vivo* sur le petit animal, plus sensible que l'IRM. Ce marquage a été réalisé en deux étapes afin de garantir un contrôle précis du nombre de sondes fluorescentes greffées et ainsi permettre la conjugaison ultérieure de biomolécules (**Figure 2-II**). Les fluorophores étant greffés à la surface du nano-objet, le contrôle du marquage permet également de gérer la balance hydrophile/hydrophobe de la surface du VUSPIO afin d'éviter à la fois des problèmes de déstabilisation colloïdale mais également l'adsorption trop rapide des opsonines.

La biofonctionnalisation des VUSPIO par des fragments d'anticorps a été réalisée en appliquant la même voie que celle présentée pour les supraparticules (**Figure 2-III**). Une caractérisation biophysique des interactions entre les particules présentant différents taux de greffage et les intégrines, basée sur la SPR, a mis en évidence l'intérêt de la multivalence sur l'avidité des particules. La diminution de la vitesse de dissociation est notamment un comportement très intéressant pour les applications biomédicales.

Le marquage des plaques d'athérome *in vivo* sur une souris modèle APOE<sup>-/-</sup> ayant suivi un régime hyperlipidémiant a été réalisé avec succès par imagerie de fluorescence dans le PIR. La grande sensibilité de l'imagerie de fluorescence a permis de détecter les plaques d'athérome, ce qui n'avait pas pu être confirmé par IRM. Les particules sont cependant rapidement captées par le foie du fait de la trop faible densité de greffage en macromolécules de PEG sur cet objet.

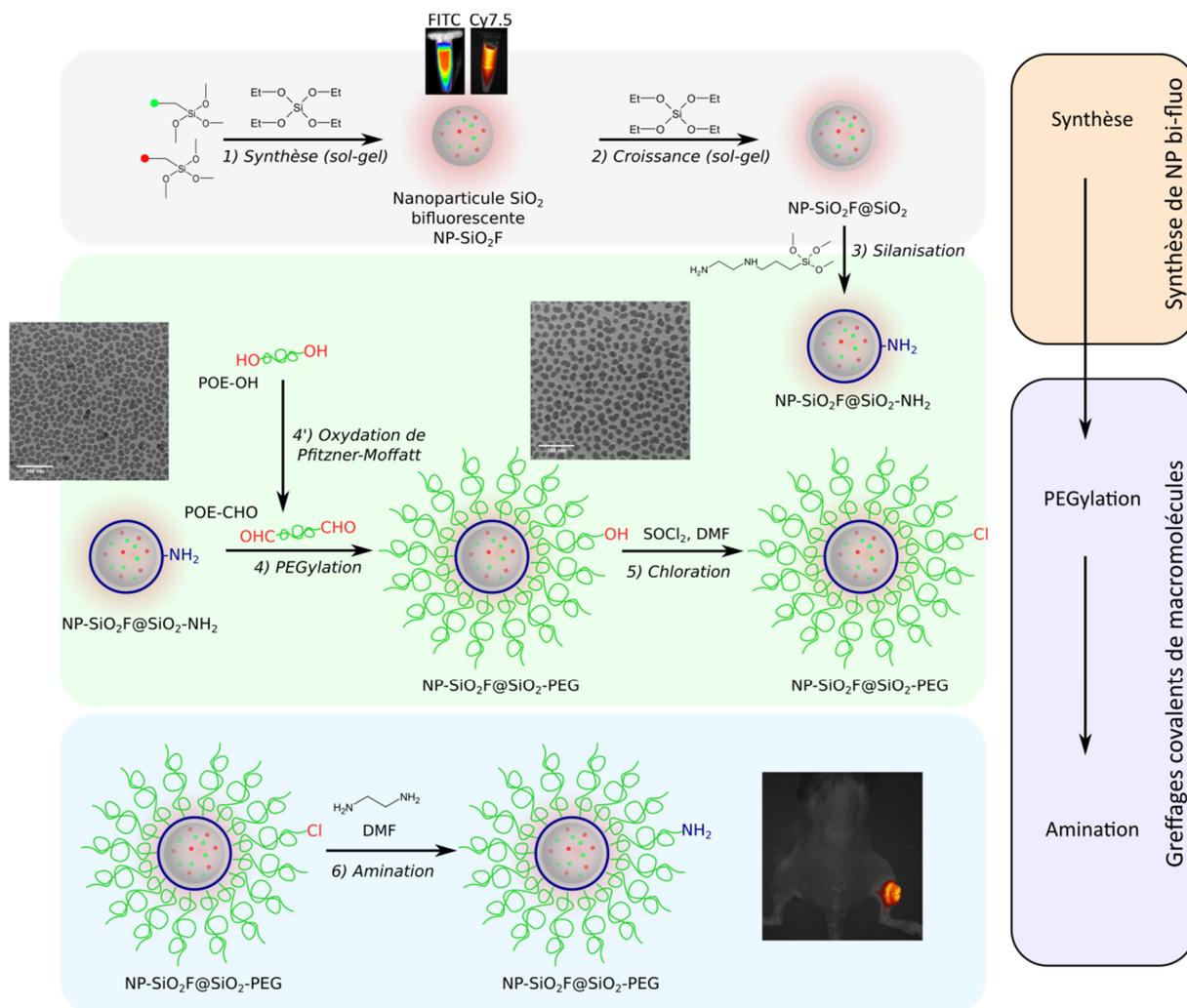
Dans un futur proche, il serait judicieux de chercher à augmenter cette densité de macromolécules de PEG, soit par exemple en employant des dendrons pour démultiplier le nombre de sites post-greffage, soit en augmentant leur longueur. Cette optimisation permettrait alors d'allonger le temps de circulation de l'agent de contraste, et d'améliorer ainsi la qualité du marquage des plaques d'athérome. Une autre piste consistera à travailler sur des modèles animaux plus grands que la souris, comme par exemple le lapin athéromateux. Ces modèles présentent en effet des plaques d'athérome de plus grande dimension, offrant la possibilité de cibler de plus grandes quantités d'agents de contraste plus facilement détectables par IRM.



**Figure 2** : Stratégie de développement d'un marqueur multimodal (IRM, imagerie PIR) pour le marquage de plaques d'athérome *in vivo*.

La stratégie de PEGylation développée a également été appliquée sur des nanoparticules fluorescentes doublement marquées de silice hybrides de 18 nm de diamètre développées à des fins de marquage de tumeurs *in vivo* ou *in vitro* par histologie (**Figure 3**). Ces nanoparticules ont été synthétisées par voie sol-gel en milieu hydro-alcoolique basique. Des agents de couplages silaniques organofonctionnels sont couplés à deux types de sondes fluorescentes avant d'être co-condensés avec le TEOS pour former les nanoparticules. Les sondes se trouvent donc au sein de la matrice de silice et non à la surface des nanoparticules. Ces nano-objets PEGylés doublement fluorescents ont été injectés par voie intraveineuse dans des souris présentant soit une tumeur U87 de glioblastome sous cutanée, soit une tumeur orthotopique de la prostate. Ces deux types de tumeurs ont été révélés par imagerie de fluorescence. Ce résultat indique que la PEGylation apporte suffisamment de furtivité aux nanoparticules vis-à-vis du système immunitaire pour permettre leur accumulation par effet EPR de la tumeur. Il a également été reproduit avec des nanoparticules PEGylées portant une amine à l'extrémité de la chaîne polymère. L'absence de différence entre les deux est en parfait accord avec les résultats de l'adsorption de la BSA sur les deux surfaces.

La prochaine étape consistera à greffer des agents de ciblage dirigés contre la MMP9 (aptamères, scFv...) afin d'espérer un ciblage actif des tumeurs et ainsi d'augmenter la sélectivité du marquage tout en diminuant les doses injectées.



**Figure 3 :** Stratégie de développement de nanoparticules doublement fluorescentes pour le marquage de tumeurs *in vivo*.

Il a été montré à travers ces différentes applications que la maîtrise de la chimie, ainsi que de la physicochimie de la surface des colloïdes est une étape préliminaire indispensable au succès des nano-systèmes développés dans le cadre d'applications biologiques.

## Référence

- (1) Arraud, N. Etude cinétique de la liaison élémentaire entre Annexine-A5 et membranes et mise au point d'un test de quantification des microparticules plasmatiques pro-coagulantes, par cytométrie en flux, Thèse soutenue à l'université de Bordeaux 1, 2011.

# Annexes



## Annexe n° 1 : Stabilité colloïdale des nanoparticules dans un milieu simple

### *Forces de van der Waals :*

Les forces de van der Waals (vdW) sont des forces à longue portée ayant des origines électromagnétiques. Celles-ci résultent des interactions au niveau atomique de dipôle induit-dipôle induit (force de London), dipôle permanent-dipôle induit (force de Debye) et dipôle permanent-dipôle permanent (force de Keesom).

Le modèle physique initialement développé pour expliquer les interactions entre les atomes, ou les molécules, a été étendu à des objets plus volumineux par Hamaker. Dans le cas de deux sphères de rayon  $r$ , dont les surfaces sont distantes de  $D$ , l'énergie potentielle d'interaction s'écrit :<sup>1</sup>

$$V_A = -\frac{A}{6D} \frac{r}{2}$$

Où  $A$  est la constante d'Hamaker. Cette constante, qui reflète la polarisabilité des sites présents à la surface des matériaux, est fonction de leur nature chimique et de celle du milieu dispersant (**Tableau 15**).

**Tableau 15** : Ordre de grandeur de la constante d'Hamaker pour différentes familles de matériaux immergés dans l'eau. D'après la réf.<sup>2</sup>

Famille de matériaux	Constante d'Hamaker ( $10^{-20}$ J)
Métaux	10 - 30
Oxydes, et halogènes	1 - 3
hydrocarbures	0,3

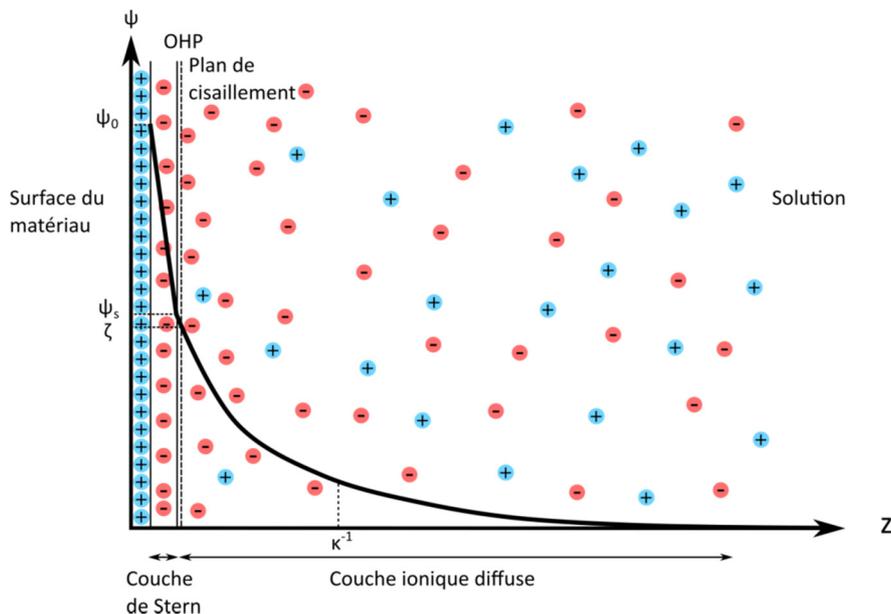
L'interaction de vdW a une portée de plusieurs dizaines d'Angström, et contribue donc au rapprochement et à la déstabilisation des suspensions colloïdales, tout comme le mouvement brownien.

Deux types de forces de répulsion permettent de contrebalancer des forces attractives. Ce sont les forces électrostatiques, et les forces liées à l'encombrement stérique.

## Stabilisation électrostatique

### Modèle de la double couche

En milieu aqueux, les charges portées par une surface sont en totalité contrebalancées par des contre-ions formant une seconde couche à la surface. Cependant, bien que l'idée proposée par Helmholtz du modèle d'une monocouche de contre-ions se formant à la surface pour contrebalancer les charges soit simple à visualiser, l'agitation thermique apporte du désordre dans cette couche, formant une couche diffuse (modèle de Gouy-Chapman). La combinaison du modèle de Helmholtz avec celui décrit par Gouy-Chapman connu également comme le modèle de Stern permet de décrire l'organisation des charges à proximité d'une surface chargée (**Figure A.1**).<sup>3</sup> Une première couche, la couche de Stern, est formée par l'adsorption de contre-ions à la surface du matériau chargé, écrantant partiellement la charge de surface. Au-delà de la couche de Stern, se trouve la couche diffuse décrite par Gouy-Chapman. La limite entre la couche de Stern et la couche diffuse est matérialisée par le plan externe de Helmholtz (OHP) également nommé plan de Stern.



**Figure A.1** : Représentation schématique de la variation du potentiel électrique en fonction de la distance à la surface d'après le modèle de Stern.

Au sein de la couche diffuse, le potentiel électrostatique  $\psi$  décroît exponentiellement en fonction de la distance par rapport à l'OHP d'après la relation suivante :<sup>4</sup>

$$\psi = \psi_s \exp(-\kappa z)$$

où  $\psi_s$  correspond au potentiel de Stern, c'est-à-dire le potentiel électrostatique au niveau de l'OHP, et où  $\kappa$  correspond à l'inverse de la longueur de Debye. Cette longueur de Debye dans l'eau à 25 °C est définie par :<sup>2</sup>

$$\kappa^{-1} = \left( \frac{RT \varepsilon_0 \varepsilon_r}{2000 F^2 I} \right)^{\frac{1}{2}}$$

$$\kappa^{-1} = \frac{1}{3,288 \sqrt{I}} \text{ (nm)}$$

où  $F$  est la constante de Faraday,  $T$  la température,  $\varepsilon_0$  la permittivité du vide,  $\varepsilon_r$  la constante diélectrique de l'eau, et  $I$ , la force ionique définie par :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i$$

où  $z_i$  est la valence de l'ion  $i$ , et  $c_i$  sa concentration exprimée en mol/l.

L'augmentation de la concentration en sels dans le milieu entraîne donc la diminution de  $\kappa^{-1}$  et donc une compression de la couche diffuse.

Les ions composant la couche de Stern étant adsorbés à la surface, c'est en réalité  $\psi_s$  et non  $\psi_0$  qui est approché expérimentalement. Lorsqu'une particule chargée se déplace dans un électrolyte, ou lorsque qu'une solution se déplace par rapport à une surface chargée, alors seulement la partie de la double couche au-delà de la couche de Stern est en mouvement. Le plan de cisaillement formé entre les parties mobile et immobile se situe juste au-delà de l'OHP.<sup>4</sup> Le potentiel mesuré au niveau de ce plan, nommé potentiel  $\zeta$  (Zêta) est donc légèrement inférieur à  $\psi_s$ .

L'énergie de répulsion engendrée par deux particules chargées identiques de rayon  $r$  peut être approchée dans le cas de faible potentiel et pour des distances entre particules grandes ( $d \gg \kappa^{-1}$ ) par :<sup>2</sup>

$$V_R \approx 2\pi\varepsilon r \psi_s^2 e^{-\kappa D}$$

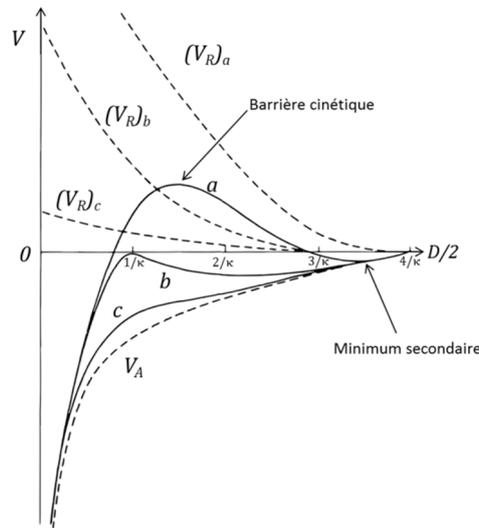
avec  $\varepsilon = \varepsilon_0 \varepsilon_r$

Cette énergie de répulsion est donc sensible à la force ionique du milieu car elle dépend de la longueur de Debye.

### *Théorie DLVO*

La théorie DLVO (Derjaguin et Landau, 1941 ; Verwey et Overbeek, 1948) décrit la stabilité colloïdale en s'intéressant à la somme des forces attractives et répulsives appliquées sur les particules en dispersion. Les deux forces prises en compte dans cette théorie sont les

forces attractives de van der Waals et les forces répulsives électrostatiques. La stabilité de la dispersion dépend donc de l'énergie potentielle totale  $V_T$  définie par :  $V_T = V_A + V_R$



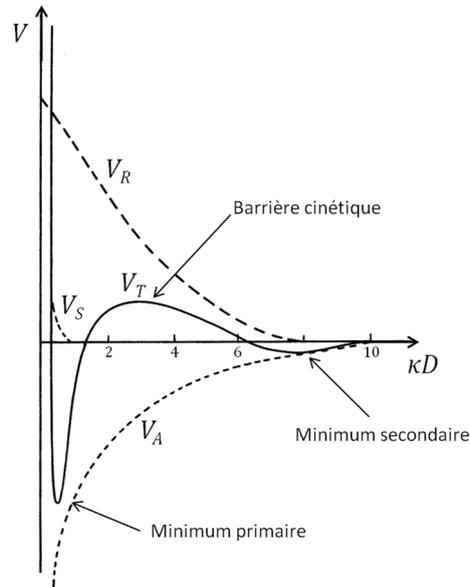
**Figure A.2** : Représentation de l'énergie potentielle d'interaction totale en fonction de la distance. (a) sol cinétiquement stable ; (b) limite de stabilité ; (c) sol instable. Adaptée de la réf.<sup>2</sup>

Le maximum de cette valeur correspond à la barrière d'énergie apportant ou non la stabilité cinétique de la dispersion (**Figure A.2**). Les forces de vdW étant toujours présentes, en fonction de  $V_R$ , la dispersion peut être stable ou non. La stabilité colloïdale est donc fortement dépendante de la force ionique  $I$  du milieu et du potentiel électrostatique de la surface des nanoparticules  $\psi_s$ .

Le fait que les forces de vdW dominent à longue distance fait apparaître un minimum secondaire pouvant atteindre quelques  $k_B T$ . Ce minimum secondaire peut alors être responsable d'une déstabilisation réversible.<sup>2</sup>

A partir de ce raisonnement, la **Figure A.2** montre que l'énergie d'attraction devient infiniment négative au contact des particules, ce qui sous-entend que les particules agrégées ne pourraient pas être redispersées. Ce n'est en réalité pas le cas, car bien que la redispersion puisse être parfois difficile, elle est généralement possible, par exemple en abaissant la force ionique du milieu dispersant. En réalité, le puits de potentiel primaire n'est pas infiniment profond, car il existe également une force répulsive à très courte portée entre les surfaces atomiques (répulsion de Born).<sup>2</sup> Enfin, une autre force répulsive peut également être présente, c'est la force répulsive de solvation à laquelle est attribuée l'énergie potentielle de solvation  $V_S$ .<sup>2,1,5</sup> Celle-ci a été mise en évidence par le fait que certains colloïdes ne flocculaient (déstabilisaient) pas même pour des forces ioniques très élevées. Cette force trouve son origine dans la présence d'une couche de solvation structurée autour de la surface.

La somme de ces différentes contributions, connue sous le nom de théorie DLVO étendue prend alors la forme présentée en **Figure A.3**.



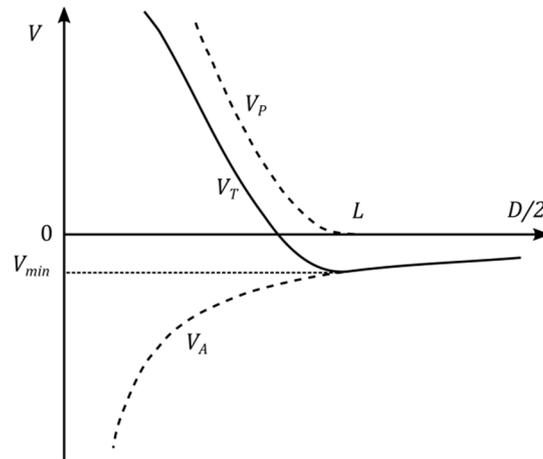
**Figure A.3** : Représentation des énergies d'interactions d'après la théorie DLVO étendue. Adaptée de la réf.<sup>2</sup>

### *Stabilisation stérique*

Dans le cas où la surface des nanoparticules est recouverte par un polymère, une nouvelle force de répulsion est présente. Lorsque deux particules se rapprochent, les couches de polymère s'interpénètrent, ce qui a deux conséquences : Un effet osmotique lié à l'augmentation locale de la concentration en polymère et un effet entropique dû à la perte de liberté des macromolécules en interaction. Alors que ces deux effets provoquent une baisse de l'entropie, l'effet osmotique peut également engendrer un effet enthalpique défavorable par la rupture de liaisons de solvation.<sup>4</sup> Ces effets ont pour conséquence de créer une barrière énergétique à la floculation en contrebalançant les forces de vdW. Tout comme avec la théorie DLVO, il est ici possible de dire que l'énergie potentielle totale correspond à la somme des potentiels attractif de vdW et répulsif stérique  $V_P$  :

$$V_T = V_A + V_P$$

Etant donné la longue portée des forces de vdW, comparé aux répulsions stériques, un potentiel minimum  $V_{min}$  est toujours présent (**Figure A.4**). Si l'épaisseur de polymère  $L$  est suffisamment élevée, alors  $V_{min}$  est de l'ordre de grandeur de  $k_B T$  et donc les nanoparticules sont stables.



**Figure A.4** : Energie potentielle totale entre deux particules présentant une stabilité stérique. Avec  $L$  l'épaisseur de la couche polymère. Adapté de la réf.<sup>3</sup>

Ce mécanisme de stabilisation ne faisant pas intervenir les interactions électrostatiques, la stabilité de la dispersion est ni sensible à la force ionique du milieu ni à la constante diélectrique du solvant. Cette stratégie permet donc de stabiliser des dispersions dans des solvants autres que l'eau dans lesquels la stabilisation électrostatique est peu efficace, mais elle est également bien adaptée à la stabilisation colloïdale de nanoparticules en milieux biologique (de force ionique élevée).

La stabilisation stérique dépend cependant fortement de plusieurs paramètres. Le polymère doit former des boucles ou des queues à la surface de la nanoparticule et non s'y adsorber complètement afin de former une épaisseur suffisante comme il a été dit. La couche de polymère doit contenir suffisamment de macromolécules afin que leur perturbation apporte suffisamment d'énergie pour contrebalancer les forces attractives. Enfin, pour que les phénomènes entropiques décrits précédemment soient présents, les macromolécules polymères doivent être solvatées et étendus. Ceci sous-entend que la nature du solvant a un fort impact sur la stabilité stérique. En cas de mauvais solvant du polymère, les macromolécules entrent en interaction avec elles-mêmes dans une configuration compacte, ce qui non seulement ne permet pas d'assurer la stabilité stérique des colloïdes, mais provoque en plus leur floculation par expulsion des nanoparticules du solvant.

### ***Conclusion***

Bien que l'état le plus stable thermodynamiquement d'un système colloïdale soit sous sa forme floculée, la stabilisation cinétique des dispersions est rendue possible par la présence de forces répulsives. Ces forces sont dépendantes à la fois des propriétés physico-chimiques de la surface des colloïdes et des propriétés physico-chimiques du milieu dispersant.

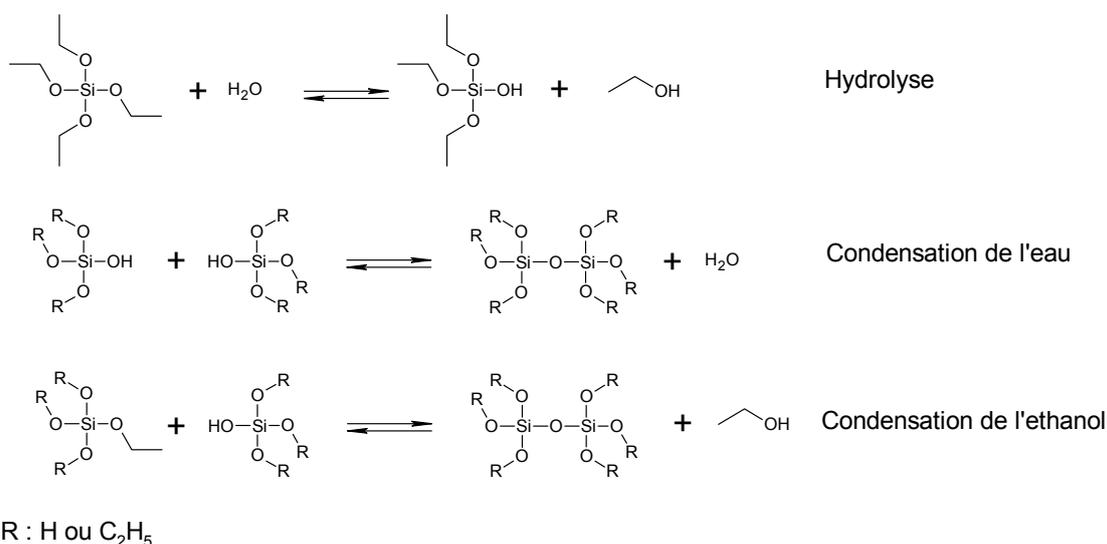
Les notions de stabilité colloïdales abordées ici dans des milieux modèles sont également vraies pour les milieux biologiques. Le milieu étant cependant plus complexe, un plus grand nombre de paramètres influence le comportement des nanoparticules.

## Références

- (1) Israelachvili, J. N. *Intermolecular and surface forces*, 2nd ed.; Academic Press London ; San Diego, 1991.
- (2) Hunter, R. J. (Robert J. *Foundations of colloid science*, 2nd ed.; Oxford ; New York : Oxford University Press, 2001.
- (3) Araki, J. *Soft Matter* **2013**, 9 (16), 4125.
- (4) Myers, D. *Surfaces, interfaces, and colloids: principles and applications*, 2. ed.; Wiley-VCH: New York, NY, 1999.
- (5) Yotsumoto, H.; Yoon, R.-H. *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, 157 (2), 434–441.

## Annexe n° 2 : Synthèse de nanoparticules de silice modèles

Ces nanoparticules de silice sont synthétisées par voie sol-gel dans un milieu hydro-alcoolique avec l'ammoniaque comme catalyseur et en utilisant l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS) en tant que précurseur. Ce milieu de synthèse a été mis au point avec les travaux de Stöber *et al* en 1968.<sup>1</sup> Le principe de ce procédé sol-gel implique, de façon générale, l'hydrolyse puis la condensation d'un alcoxyde métallique tel que le TEOS en présence d'un catalyseur acide ou basique (**Figure A.5**). L'utilisation d'un catalyseur acide favorise la formation de gels, alors que l'utilisation de bases permet d'obtenir des nanoparticules sphériques et monodisperses.<sup>2</sup> La formation de nanoparticules de silice peut être divisée en deux étapes : nucléation et croissance. Deux modèles différents sont proposés pour décrire le mécanisme de croissance des nanoparticules : l'addition de monomères<sup>3,4</sup> et l'agrégation contrôlée<sup>5</sup>. Le premier modèle décrit la croissance des nanoparticules par l'addition, à la surface de la nanoparticule en croissance, de monomères hydrolysés. Le second modèle décrit, quant à lui, la croissance des nanoparticules comme une agglomération de germes se formant tout au long de la croissance.



**Figure A.5** : Réactions chimiques mises en jeu lors de la formation de la silice.

Les différents paramètres de synthèse tels que la température, la force ionique, ou le solvant, gouvernent la taille mais également l'homogénéité en taille des nanoparticules obtenues. Depuis les travaux de Stöber et coll. de nombreuses études ont été réalisées afin d'optimiser les conditions de réaction en déterminant le rôle des différents paramètres.<sup>6-11</sup> Cependant d'un point de vue du procédé, pour atteindre des lots monodisperses de tailles contrôlées, la maîtrise de tous les paramètres du système est délicate. Par exemple, un écart de

la concentration en  $\text{OH}^-$  peut entraîner des problèmes de reproductibilité. Pour obtenir les nanoparticules monodisperses nécessaires pour l'étude, le procédé de croissanceensemencée permet de répondre à cette problématique. En effet, dans ce procédé, des nanoparticules de faible diamètre synthétisées au préalable, sont utilisées en tant que germe pour la croissance de nanoparticules monodisperses de diamètre choisi.<sup>12</sup> L'expérimentateur contrôle le nombre de nuclei mis en jeu ainsi que la vitesse d'addition du précurseur. La présence initiale des germes permet donc au système d'être dirigé vers la croissance plutôt que vers la nucléation.

Les nanoparticules utilisées dans ces travaux sont synthétisées en deux étapes par le procédé de croissanceensemencée. Ces conditions ont déjà été appliquées au cours de travaux antérieurs au sein du groupe.<sup>13</sup> Dans un premier temps, des nanoparticules d'environ 15 nm sont synthétisées à partir d'un procédé Stöber ré-adapté.<sup>14,15</sup> Ces nanoparticules servent ensuite de germes pour la croissance des nanoparticules d'environ 50 nm.

#### **Mode opératoire A-1 : Synthèse de petites nanoparticules de silice par voie sol-gel**

*Dans un ballon de 500 ml, 571  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  (18.2 M $\Omega$ ) et 5.79 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28-30 % massique) sont ajoutés à 108 ml d'éthanol (EtOH). Sous forte agitation magnétique, 1.2 ml de TEOS contenus dans 108 ml d'EtOH sont ajoutés rapidement. La réaction se poursuit durant 2 h à température ambiante sous agitation.*

Le diamètre des nanoparticules de silice obtenues doit être déterminé avec précision afin d'estimer correctement le nombre de nanoparticules à partir de la masse de silice en faisant l'approximation que les nanoparticules sont parfaitement sphériques, d'après l'équation suivante :

$$N_{NP} = \frac{m_{\text{SiO}_2}}{m_{NP}} = \frac{m_{\text{SiO}_2}}{V_{NP} \times \rho_{\text{SiO}_2}} = \frac{m_{\text{SiO}_2} \times 3}{4 \times \pi \times R_{NP}^3 \times \rho_{\text{SiO}_2}}$$

Avec :

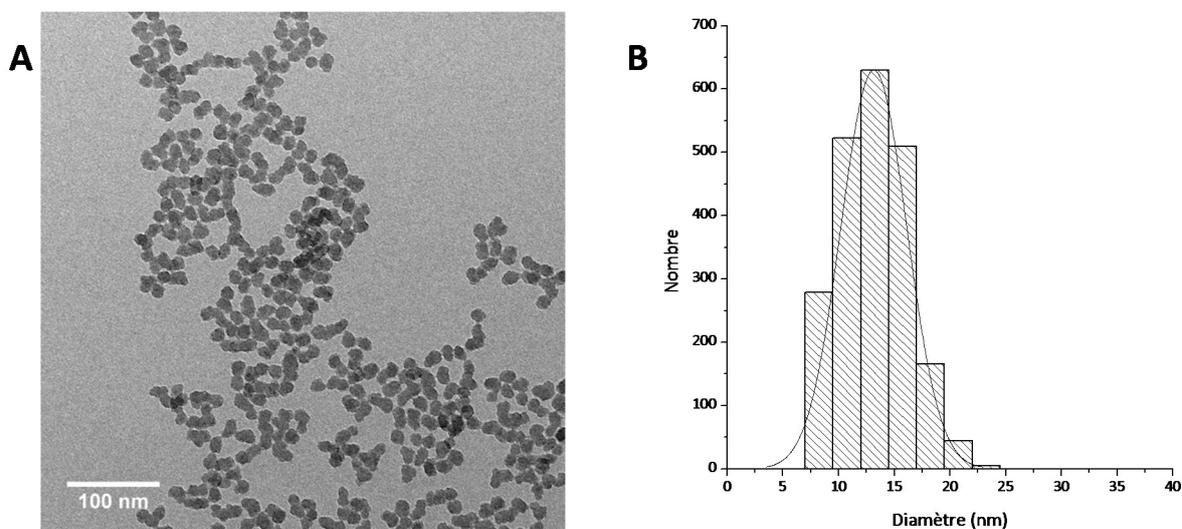
$N_{NP}$  : le nombre de nanoparticules de rayon R

$m_{\text{SiO}_2}$  : la masse de nanoparticules de silice

$\rho_{\text{SiO}_2}$  : la densité de la silice colloïdale synthétisée par le procédé de Stöber,  $\rho_{\text{SiO}_2} = 2 \text{ g.cm}^{-3}$  d'après van Blaaderen *et al.*<sup>6</sup>

Les nanoparticules synthétisées par le Mode opératoire A-1 ont un diamètre moyen de  $13,2 \pm 0,5$  nm. Ce diamètre est déterminé à partir de l'analyse de micrographie obtenues en microscopie en transmission électronique (MET) (**Figure A.6**) avec le logiciel libre ImageJ.<sup>16</sup> Les nanoparticules semblent être agglomérées sur la grille de microscopie. Cet état peut se retrouver dans la dispersion colloïdale ou être provoqué par le séchage de l'échantillon sur la grille. Les germes de silice présentent une surface très réactive favorisant leur coalescence. Le

diamètre hydrodynamique des nanoparticules est mesuré en DLS. Il comprend en plus du diamètre physique de la particule sa sphère de solvatation. Il est donc tout à fait commun de trouver des diamètres hydrodynamiques supérieurs aux diamètres déterminés par MET. Il faut également avoir à l'esprit que l'intensité diffusée par une particule de rayon  $r$  est proportionnelle à  $r^6$ . A titre d'exemple, une particule de 50 nm de diamètre diffusera un million de fois plus qu'une particule de 5 nm de diamètre. La présence d'agrégats au sein de la dispersion va donc conduire à une surestimation du diamètre hydrodynamique, ce qui fait de la DLS un très bon indicateur de l'état d'agrégation de la dispersion colloïdale bien que celle-ci ne permette pas de donner le diamètre exact de la nanoparticule. La théorie de Mie<sup>17</sup> permet de corriger la surestimation du diamètre due à la présence de plus grandes particules, mais pour cela il est nécessaire de connaître les indices de réfraction et le coefficient d'absorption du matériau de l'échantillon. Alors que ces données sont faciles à trouver pour des matériaux simples tels que la silice, ils deviennent plus difficilement accessibles pour des matériaux plus complexes, comme par exemple les matériaux hybrides développés à la suite de ces travaux. Il est donc volontairement choisi de ne pas appliquer cette correction. Les résultats de DLS seront présentés en donnant le « Z-average » ( $Z_{av}$ ) ainsi que l'indice de polydispersité ( $PDI = \mu/\Gamma^2$  où  $\mu$  et  $\Gamma$  sont des paramètres de la méthode des cumulants) après traitement des données par la méthode des cumulants. Le  $Z_{av}$  est une représentation du diamètre hydrodynamique moyen pondéré en intensité. Le  $Z_{av}$  mesuré pour les nanoparticules synthétisées est de 32 nm et le PDI est de 0,66. Ce résultat laisse penser que la majorité des nanoparticules sont isolées en solution. En effet le diamètre hydrodynamique est trop faible pour correspondre aux agrégats de nanoparticules observés en MET après séchage. La concentration massique en silice est déterminée par analyse gravimétrique.



**Figure A.6 : A :** Micrographie en transmission électronique des germes obtenus par le procédé de type Stöber. **B :** Distribution en taille des nanoparticules synthétisées par analyse des micrographies MET.

Les travaux de Cheng montrent, qu'une surface développée par unité de volume de l'ordre de  $5 \text{ m}^2/\text{l}$  est nécessaire pour éviter la nucléation secondaire lors de la croissance.<sup>18</sup>

Le diamètre final des nanoparticules est directement relié au volume de TEOS ajouté et au nombre initial de germe. Ce volume de TEOS ( $V_{TEOS}$ ) peut être facilement exprimé en fonction du diamètre des germes déterminé en MET ( $d_{MET}$ ), du diamètre final visé ( $D$ ) et du nombre de germes mis en jeu ( $N_{NP}$ ) en appliquant le raisonnement suivant :

$$\Delta V_{SiO_2} = (V_{NP \text{ final}} - V_{NP \text{ initial}}) \times N_{NP} = \frac{1}{6} \times \pi (D^3 - d_{MET}^3) \times N_{NP}$$

$$V_{TEOS} = \frac{n_{TEOS} \cdot M_{TEOS}}{\rho_{TEOS}}$$

Avec :  $n_{TEOS} = n_{SiO_2}$

$$V_{TEOS} = \frac{n_{SiO_2} \cdot M_{TEOS}}{\rho_{TEOS}} = \frac{\left( \frac{V_{SiO_2 \text{ ajoutée}} \cdot \rho_{SiO_2}}{M_{SiO_2}} \right) \times M_{TEOS}}{\rho_{TEOS}}$$

$$V_{TEOS} = \frac{(D^3 - d_{MET}^3) \cdot \pi \cdot \rho_{SiO_2} \cdot N_{NP} \cdot M_{TEOS}}{6 \times M_{SiO_2} \cdot \rho_{TEOS}}$$

Après calcul des constantes, le volume de TEOS peut être exprimé par le calcul suivant ( $V_{TEOS}$  en ml,  $D$  et  $d_{MET}$  en cm) :

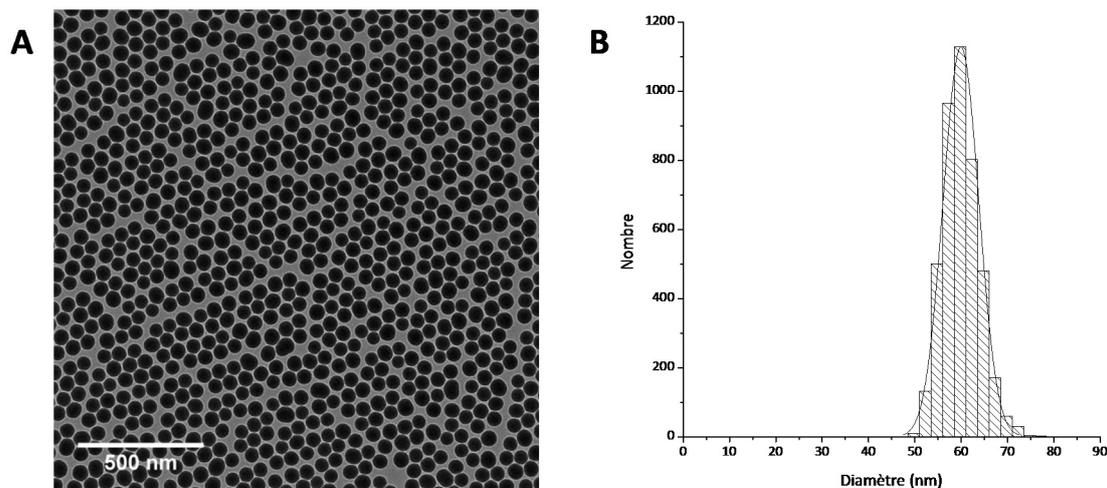
$$V_{TEOS} = 3,89 \times (D^3 - d_{MET}^3) \times N_{NP}$$

#### **Mode opératoire A-2 : Croissanceensemencée de nanoparticules de silice**

*Un volume de 200 ml du sol de germes fraîchement préparé est ajouté au milieu réactionnel composé de 729 ml d'EtOH, 279 ml d'H<sub>2</sub>O et 13.5 ml d'NH<sub>4</sub>OH (28-30% massique). Sous agitation, le volume de TEOS calculé est ajouté avec un débit de 3 ml/h grâce à un pousse-seringue. La réaction se poursuit durant 2 h sous agitation après la fin de l'ajout de TEOS. L'ammoniaque est ensuite éliminée à 40 °C sous pression réduite.*

L'auto-organisation hexagonale des nanoparticules observée sur le film de carbone de la grille de microscopie durant le séchage de l'échantillon est révélatrice d'une population homogène en taille (**Figure A.7**). Le diamètre moyen mesuré avec imageJ est de  $60 \pm 2 \text{ nm}$ .

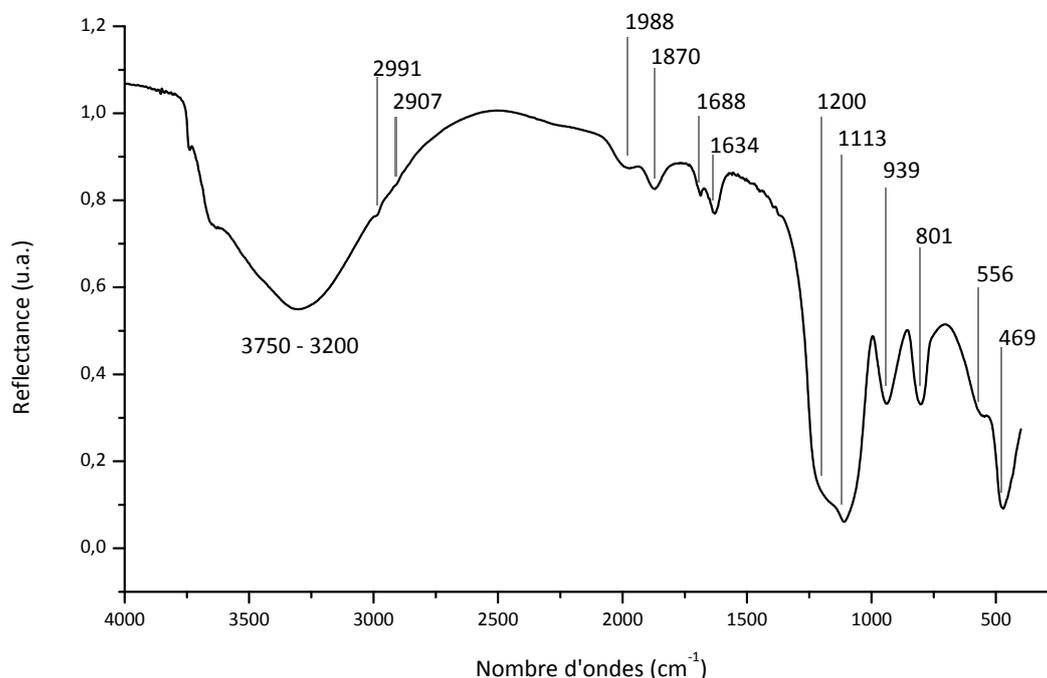
Le  $Z_{av}$  des nanoparticules est de 78 nm avec un PDI de 0,03. Les nanoparticules obtenues par cette synthèse en deux étapes sont sphériques et monodisperses.



**Figure A.7** : **A** : Micrographie en transmission électronique des nanoparticules obtenues par croissance ensemencée. **B** : Distribution en taille des nanoparticules synthétisées par analyse des micrographies MET.

La **Figure A.8** présente le spectre infrarouge mesuré en réflexion diffuse (DRIFT) des nanoparticules synthétisées par le Mode opératoire A-2. Etant donné qu'une partie de la caractérisation des modifications chimiques de surface sera réalisée par DRIFT, il est important de décrire précisément la signature de la matrice de silice amorphe. Le mode de vibration à  $469\text{ cm}^{-1}$  est assigné à la bascule de la liaison Si-O-Si,<sup>19,20</sup> celui à  $801\text{ cm}^{-1}$  correspond au mode de déformation de Si-O-Si dans le plan, celui à  $939\text{ cm}^{-1}$  est lié au mode d'élongation symétrique de Si-O-Si,<sup>19</sup> cependant, cette bande peut également être attribuée à l'élongation de la liaison Si-O des fonctions silanols.<sup>20</sup> La bande intense à  $1113\text{ cm}^{-1}$  est attribuée au mode d'élongation asymétrique des liaisons Si-O-Si. Celle-ci présente un épaulement à  $1200\text{ cm}^{-1}$  apportant une information sur la porosité de l'échantillon. En effet l'intensité de cet épaulement augmente avec la porosité de la silice.<sup>20</sup> La faible bande à  $556\text{ cm}^{-1}$  est liée à la présence de structures cycliques au sein de la matrice de silice.<sup>20</sup> La bande à  $1634\text{ cm}^{-1}$  serait liée au mode de déformation de molécules d'eau piégées dans la matrice de silice.<sup>21</sup> La bande à  $1870\text{ cm}^{-1}$  est connue comme étant une harmonique des liaisons Si-O-Si propres à la silice colloïdale.<sup>22,23</sup> Les deux bandes à  $2907$  et  $2991\text{ cm}^{-1}$  d'intensité très faibles sont attribuées respectivement aux modes d'élongation asymétrique et symétrique des liaisons C-H portées par des chaînes aliphatiques. Ces chaînes alcanes peuvent provenir à la fois du TEOS partiellement hydrolysé et de molécules d'éthanol piégées dans la matrice poreuse. En effet, la silice colloïdale obtenue par voie sol-gel est poreuse avec une densité de  $2\text{ g/cm}^3$ .<sup>24</sup>

La large bande comprise entre  $3200\text{ cm}^{-1}$  et  $3750\text{ cm}^{-1}$  est attribuée aux modes d'élongation des liaisons des groupements OH des silanols de surface et internes, ainsi que de l'éthanol capturé dans la matrice.<sup>20,21</sup>



**Figure A.8** : Spectre infrarouge de la silice colloïdale synthétisée par voie sol-gel.

Le procédé de croissanceensemencée par voie sol-gel permet de synthétiser des nanoparticules de silice avec une taille homogène. La grande quantité de nanoparticules de morphologie et de taille contrôlée pouvant être produites avec ce procédé est un réel atout pour le développement de nouvelles modifications de surface dans le but d'apporter la biocompatibilité et la biofonctionnalité aux nanoparticules.

## Références

- (1) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26* (1), 62–69.
- (2) Rahman, I. A.; Padavettan, V. *J. Nanomater.* **2012**, *2012*, e132424.
- (3) Matsoukas, T.; Gulari, E. *J. Colloid Interface Sci.* **1988**, *124* (1), 252–261.
- (4) Matsoukas, T.; Gulari, E. *J. Colloid Interface Sci.* **1989**, *132* (1), 13–21.
- (5) Bogush, G. H.; Zukoski IV, C. F. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142* (1), 19–34.
- (6) Van Blaaderen, A.; Van Geest, J.; Vrij, A. *J. Colloid Interface Sci.* **1992**, *154* (2), 481–501.
- (7) Tan, C. G.; Bowen, B. D.; Epstein, N. *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, *118* (1), 290–293.
- (8) Lindberg, R.; Sundholm, G.; Pettersen, B.; Sjöblom, J.; Friberg, S. E. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1997**, *123–124*, 549–560.

- (9) Rahman, I. A.; Vejayakumaran, P.; Sipaut, C. S.; Ismail, J.; Abu Bakar, M.; Adnan, R.; Chee, C. K. *Ceram. Int.* **2006**, 32 (6), 691–699.
- (10) Park, S. K.; Kim, K. D.; Kim, H. T. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2002**, 197 (1–3), 7–17.
- (11) Rahman, I. A.; Vejayakumaran, P.; Sipaut, C. S.; Ismail, J.; Bakar, M. A.; Adnan, R.; Chee, C. K. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2007**, 294 (1–3), 102–110.
- (12) Désert, A. Colloïdes hybrides silice/polystyrène de morphologie contrôlée, Bordeaux I, 2011.
- (13) Reinhardt, N. M. E. Chemical surface modification of silica nanoparticles for the labeling of DNA in lipoplexes, Thèse soutenue à l’université Bordeaux I: Bordeaux, 2013.
- (14) Vranic, S.; Boggetto, N.; Contremoulins, V.; Mornet, S.; Reinhardt, N.; Marano, F.; Baeza-Squiban, A.; Boland, S. *Part Fibre Toxicol* **2013**, 10 (2), 45.
- (15) George, I.; Naudin, G.; Boland, S.; Mornet, S.; Contremoulins, V.; Beugnon, K.; Martinon, L.; Lambert, O.; Baeza-Squiban, A. *Nanoscale* **2015**, 7 (10), 4529–4544.
- (16) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. *Nat. Methods* **2012**, 9 (7), 671–675.
- (17) Mie, G. *Ann. Phys.* **1908**, 330 (3), 377–445.
- (18) Chen, S.-L.; Dong, P.; Yang, G.-H.; Yang, J.-J. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, 180 (1), 237–241.
- (19) Guiton, T. A.; Pantano, C. G. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1993**, 74 (1), 33–46.
- (20) Innocenzi, P. *J. Non-Cryst. Solids* **2003**, 316 (2–3), 309–319.
- (21) Martínez, J. R.; Ruiz, F.; Vorobiev, Y. V.; Pérez-Robles, F.; González-Hernández, J. J. *Chem. Phys.* **1998**, 109 (17), 7511–7514.
- (22) Arenas, L. T.; Vagheti, J. C. P.; Moro, C. C.; Lima, E. C.; Benvenuti, E. V.; Costa, T. M. H. *Mater. Lett.* **2004**, 58 (6), 895–898.
- (23) Pavan, F. A.; Costa, T. M. H.; Benvenuti, E. V. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2003**, 226 (1–3), 95–100.
- (24) Green, D. L.; Lin, J. S.; Lam, Y.-F.; Hu, M. Z.-C.; Schaefer, D. W.; Harris, M. T. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, 266 (2), 346–358.

## Annexe n° 3 : Détermination de la densité surfacique des molécules greffées

La préparation de l'échantillon pour l'analyse thermogravimétrique est commune à celle pour le dosage élémentaire. Elle consiste au séchage des nanoparticules à l'étuve à 70 °C durant 4 h, puis dans une étuve sous vide primaire à 90 °C durant 12h.

### Détermination pas dosage élémentaire

Les dosages du carbone, de l'azote, de l'hydrogène ainsi que du soufre sont réalisés grâce à un analyseur élémentaire CHNS/O FlashEA 1112 series de Thermo Scientific™.

Une masse de 1,5 mg d'échantillon sec est pesée puis enfermée dans une capsule en étain. L'échantillon subit ensuite une combustion « flash » à 930 °C sous oxygène. Le carbone, l'azote l'hydrogène ainsi que le soufre sont recombinaés pour donner du diazote, du dioxyde de carbone, de l'eau ainsi que du dioxyde de soufre. Les gaz sont alors séparés par chromatographie en phase gazeuse.

### *Calcul de la densité de greffage surfacique en macromolécules de PEG après modification chimique avec le mPEG-silane :*

La densité de greffage en greffon mPEG  $\sigma_{mPEG-silane}$  est estimée par la relation suivante :

$$\sigma_{mPEG-silane} = \frac{n_{mPEG-silane}}{S}$$

Avec  $n_{mPEG-silane}$  la quantité de matière de mPEG-silane en mole et  $S$  la surface de l'échantillon.

$$n_{mPEG-silane} = \frac{m_C - m_{C(SiO_2)}}{12 \times 2} \times \frac{44}{5000}$$

Avec  $m_C$  la masse de carbone contenue dans l'échantillon et  $m_{C(SiO_2)}$  la masse d'atome de carbone contenu dans la silice colloïdale brute

$$S = \frac{m_{SiO_2}}{V_{NP} \rho_{SiO_2}} \times S_{NP}$$

Avec  $m_{SiO_2}$  la masse de silice dans l'échantillon,  $V_{NP}$  le volume d'une nanoparticule de silice,  $\rho_{SiO_2}$  la densité de la silice colloïdale préparée par voie sol-gel et  $S_{NP}$  la surface d'une nanoparticule.

$$m_{SiO_2} = m_{totale} - m_{molécules\ surface} = m_{totale} - n_{mPEG-silane} \times M_{mPEG-silane}$$

**Calcul de la densité surfacique en greffons (2-aminoéthylamino)propyl après modification chimique avec l'EDPS :**

La densité de greffage en greffons (2-aminoéthylamino)propyl  $\sigma_{EDPS}$  est estimée par la relation suivante :

$$\sigma_{EDPS} = \frac{n_{EDPS}}{S}$$

$$n_{EDPS} = \frac{m_N}{14 \times 2}$$

Il y a deux atomes d'azote par molécule d'EDPS

$$S = \frac{m_{SiO_2}}{V_{NP} \rho_{SiO_2}} \times S_{NP}$$

$$m_{SiO_2} = m_{totale} - m_{molécules\ surface} = m_{totale} - n_{EDPS} \times M_{gréffon\ EDPS}$$

$$M_{Résidu\ EDPS} = 2 \times M_N + 5 \times M_C + 3 \times M_O + M_{Si} + 15 \times M_H + 2 \times M_{Cl}$$

**Calcul de la densité surfacique en macromolécules de PEG sur les surfaces aminées :**

La densité de greffage en greffons PEG  $\sigma_{PEG}$  est estimée par la relation suivante :

$$\sigma_{PEG} = \frac{n_{PEG}}{S}$$

$$m_{C(PEG)} = m_C - m_{C(EDPS)}$$

La masse de carbone apportée par la modification à l'EDPS,  $m_{C(EDPS)}$ , correspond à la masse de carbone mesurée pour les particules modifiées à l'EDPS pondérée par le rapport entre les masses d'azotes mesurées dans l'échantillon PEGylé et dans les nanoparticules modifiées à l'EDPS.

$$m_{C(PEG)} = m_C - m_{C(SiO_2-EDPS)} \times \frac{m_N}{m_{N(SiO_2-EDPS)}}$$

$$n_{PEG} = \frac{m_C - m_{C(SiO_2-EDPS)} \times \frac{m_N}{m_{N(SiO_2-EDPS)}}}{12 \times 2} \times \frac{44}{M_{PEG}}$$

$$S = \frac{m_{SiO_2}}{V_{NP} \rho_{SiO_2}} \times S_{NP}$$

$$m_{SiO_2} = m_{totale} - m_{molécules\ surface} = m_{totale} - n_{EDPS} \times M_{Résidu\ EDPS} - n_{PEG} \times M_{PEG}$$

## Détermination de la densité surfacique des molécules greffées par analyse thermogravimétrique

L'analyse thermogravimétrique consiste à suivre la masse d'un échantillon en fonction de la température sous atmosphère contrôlée. Avec à cette technique, il est ainsi possible d'estimer la proportion de molécules organiques dans l'échantillon en suivant la perte de masse associée à la dégradation des composés organiques sous l'effet de la température.

Afin de déterminer la perte de masse correspondant aux molécules greffées, l'échantillon étudié est comparé à l'échantillon avant greffage des molécules. Par exemple, pour déterminer la densité de greffage des macromolécules de mPEG-silane, la perte de masse de cet échantillon est comparée à la perte de masse de la silice brute. La différence entre les deux correspond à la perte de masse liée à la dégradation des macromolécules de mPEG-silane. Les mesures sont réalisées sur 20 mg d'échantillon à l'aide d'une balance Tag2400 de Setaram.

Dans le cas des modifications avec le PEG sur les surfaces d'EDPS, l'évènement est bien identifié (**Figure II.18**), c'est pourquoi seulement la différence de masse dans l'intervalle de température dans lequel la dégradation se produit est considérée.

$$\sigma_{PEG} = \frac{n_{PEG}}{S}$$

$$n_{PEG} = \frac{m_{PEG}}{M_{PEG}}$$

$$m_{PEG} = \Delta m_{(320-440)NP-PEG} - \left( \Delta m_{(320-440)NP-EDPS} * \frac{100 - \% \Delta m_{(20-700)NP-EDPS}}{100 - \% \Delta m_{(20-700)NP-PEG}} \right)$$

$$S = \frac{m_{SiO_2}}{V_{NP} \rho_{SiO_2}} \times S_{NP}$$

$$m_{SiO_2} = m_{totale} - \Delta m_{PEG}$$

## Annexe n° 4 : Synthèse et caractérisation de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques par co-précipitation

### *Synthèse*

La co-précipitation alcaline est une voie de synthèse consistant à co-précipiter les différents cations métalliques, dans le cas présent  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , par ajout d'une base afin de former le matériau, ici la magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Bien que les nanoparticules obtenues par cette voie présentent généralement une large distribution en taille, la co-précipitation est facile à mettre en place et permet de produire facilement de grandes quantités. C'est pour ces raisons que cette voie de synthèse a été retenue dans le cadre de l'étude.

Les nanoparticules sont synthétisées d'après la méthode mise au point par Massart,<sup>1</sup> et maîtrisée au sein du laboratoire (Mode opératoire A-3).<sup>2</sup> La magnétite obtenue par co-précipitation étant en partie composée de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , elle n'est pas stable vis-à-vis de l'oxydation, c'est pourquoi elle est volontairement oxydée en maghémite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-}\gamma$ ) à l'aide du nitrate de fer afin d'être plus stables chimiquement vis-à-vis de l'oxydation.

#### **Mode opératoire A-3 : Synthèse des nanoparticules de maghémite par co-précipitation**

*Une masse de 31,41 g de chlorure ferreux tétrahydraté dissoute dans 170 ml d'acide chlorhydrique 1,5 M, est versée dans un bécher contenant 85,4 g de chlorure ferrique hexahydraté dissous dans 3,5 l d'eau (rapport stœchiométrique initial  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 0,5$ ). Sous forte agitation mécanique, 300 ml d'une solution d'ammoniaque (28-30% m/m) sont ajoutés rapidement. Le milieu est laissé sous agitation 15 min. Les flocculats de nanoparticules de magnétite sont décantés avec l'aide d'un aimant permanent, le surnageant est ensuite éliminé. Après 2 étapes successives de lavage à l'eau, la surface des nanoparticules est traitée à l'acide nitrique par ajout de 200 ml d' $\text{HNO}_3$  2 M puis laissé sous agitation durant 15 min. Après décantation et élimination du surnageant, le cœur des nanoparticules est oxydé en maghémite par ajout de 600 ml d'une solution de nitrate de fer à 0,33 M. Le milieu réactionnel est porté à ébullition durant 30 min. Après décantation et élimination du surnageant, 200 ml d'acide nitrique à 2 M sont ajoutés. Le flocculat est ensuite décanté magnétiquement et lavé 3 fois à l'acétone afin d'éliminer l'excès d'acide. Le flocculat est peptisé dans 200 ml d'eau. Les résidus d'acétone sont éliminés par évaporation sous vide à 45°C. Le ferrofluide est ensuite ramené à un volume de 1 l avec de l'eau.*

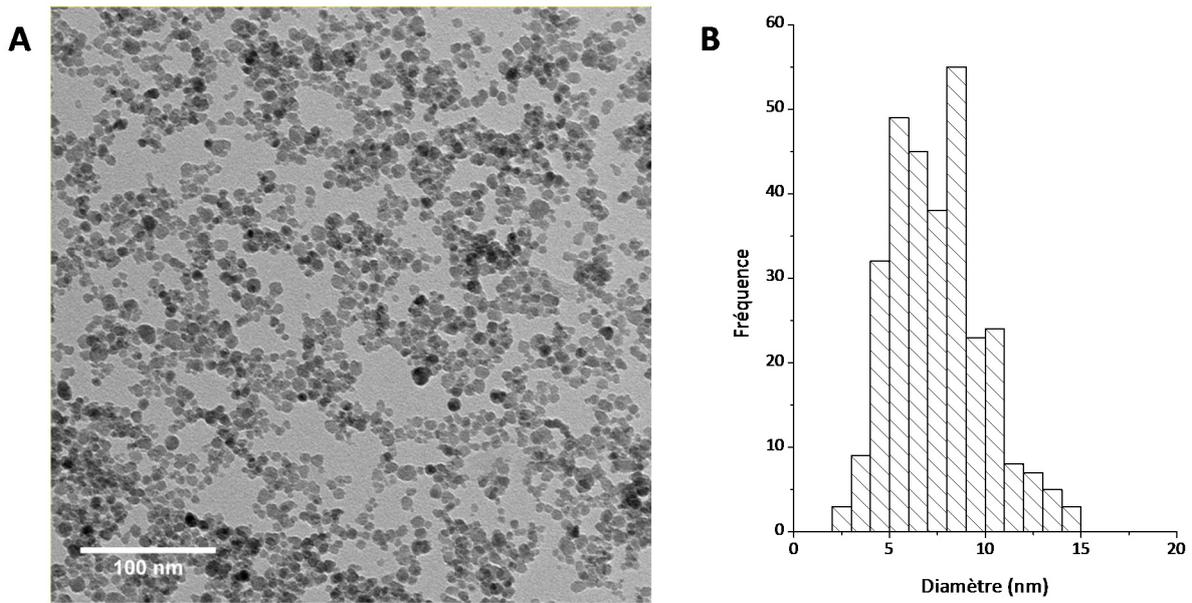
Le rapport molaire  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  doit être égal à 2 afin d'obtenir les meilleurs rendements. Cela correspond à la condition stœchiométrique pour la synthèse de magnétite. Une fois la co-précipitation réalisée, des ions  $\text{NH}_4^+$  se retrouvent adsorbés à la surface de la magnétite en milieu basique. Ces contre-ions flocculants sont remplacés par les contre-ions nitrate durant le

traitement en milieu acide. Au cours de cette étape, la surface des nanoparticules est également oxydée par solubilisation des ions ferreux superficiels. Le traitement au nitrate ferrique permet d'oxyder le cœur des nanoparticules en maghémite  $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-}\gamma$ . En effet le potentiel rédox du couple  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  en solution est supérieur à celui de ce même couple dans l'oxyde.

La surface des nanoparticules étant chargée positivement en milieu acide, celles-ci se redispersent spontanément (peptisation) dans l'eau si la force ionique est suffisamment faible pour ne pas écranter les charges. Cela est obtenu après une série de lavages à l'acétone ayant permis d'éliminer la majorité des ions nitrate en solution. Le pH du sol obtenu est de 2,5 et la concentration massique en maghémite du ferrofluide est typiquement d'environ 30  $\text{g.l}^{-1}$  en maghémite (voir Mode opératoire A-4 pour le dosage).

### ***Caractérisation***

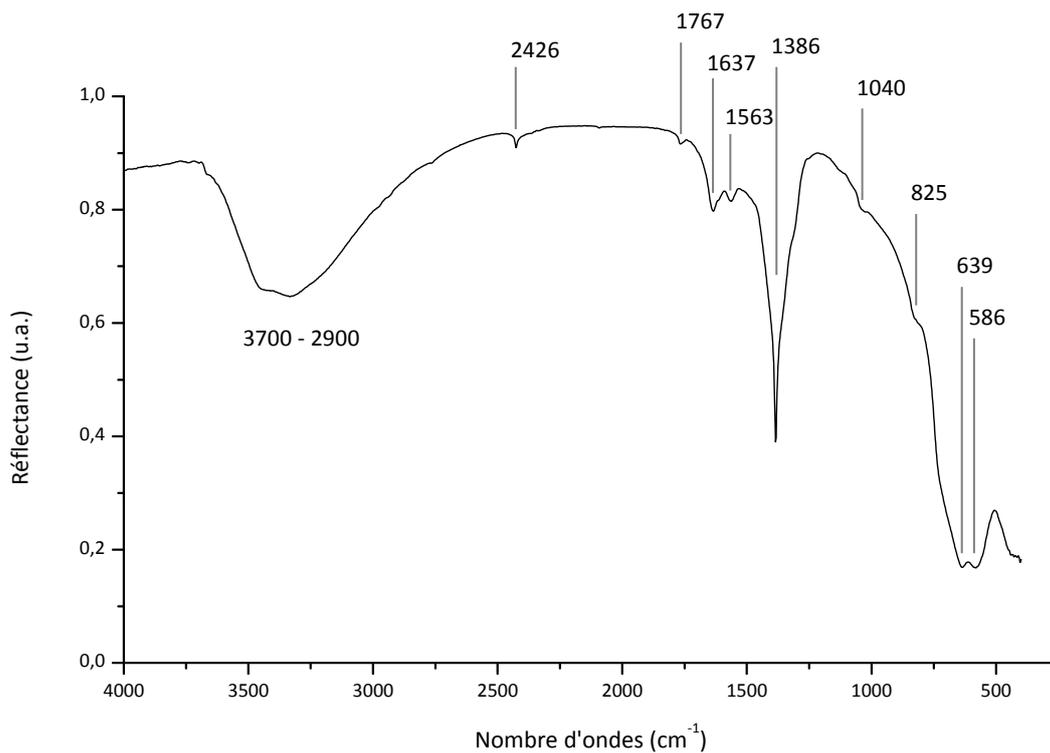
L'observation en MET montre que les nanoparticules synthétisées appartiennent à une population en taille unique bien que celle-ci s'étende de 2 à 15 nm (**Figure A.9**). Le fait que les nanoparticules soient agrégées sur la micrographie ne signifie pas que cet état est identique dans le milieu aqueux. Cette agrégation peut s'expliquer par l'élévation de la concentration des ions nitrate libres durant le séchage de l'échantillon sur la grille de microscopie. Cet agrégation rend délicate la détermination de la dispersion en taille par des outils informatiques comme ImageJ, c'est pourquoi, le diamètre est déterminé manuellement pour 300 particules aléatoires. Le diamètre moyen calculé pour cet échantillon de population est de 7,5 nm avec un écart type 2,4 nm. Le  $Z_{av}$  de l'échantillon déterminé en DLS (VASCO, CORDOUAN Technologies) à pH 3 est de  $38 \pm 17$  nm (l'incertitude correspond à la demi-largeur à mi-hauteur). Ce diamètre élevé par rapport aux objets observés indique qu'une fraction de la population s'agrège légèrement. A titre indicatif, le diamètre pondéré en nombre est de 19 nm, ce qui se rapproche du diamètre observé en MET en considérant la couche d'hydratation, bien que celle-ci n'explique pas en totalité cette différence.



**Figure A.9 :** **A :** Micrographie en transmission électronique de nanoparticules de maghémite obtenues par co-précipitation, **B :** Distribution en taille déterminée à partir de l'analyse en MET.

Le spectre infrarouge de la maghémite obtenue par le Mode opératoire A-3 est enregistré et présenté en **Figure A.10**. L'objectif ici n'est pas d'étudier les propriétés de la maghémite obtenue car celles-ci sont déjà connues,<sup>2</sup> mais principalement de présenter la signature infrarouge de ces nanoparticules au lecteur car une partie des caractérisations durant la suite de l'étude est réalisée avec cette technique.

Les deux bandes à 586 et 639  $\text{cm}^{-1}$  correspondent aux modes vibrationnels des liaisons Fe-O et sont caractéristiques des oxydes de structure spinelle désordonnée.<sup>3</sup> La bande observée à 825  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée au mode d'élongation des liaisons Fe-OH des groupements hydroxyle de surface. Les bandes à 1040, 1386, 1767 et 2426  $\text{cm}^{-1}$  sont attribuées aux ions nitrate.<sup>4</sup> La série de bande aux alentours de 1600  $\text{cm}^{-1}$  peut être attribuée à la présence d'eau physisorbée. La large bande entre 2900 et 3700  $\text{cm}^{-1}$  correspond au mode d'élongation de l'eau physisorbée.



**Figure A.10** : Spectre infrarouge en DRIFT des nanoparticules de maghémite obtenues par co-précipitation.

## Références

- (1) Massart, R. *IEEE Trans. Magn.* **1981**, 17 (2), 1247–1248.
- (2) Mornet, S. Synthèse et modification chimique de la surface de nanoparticules de maghémite à des fins d'application biomédicales, Thèse soutenue à l'université Bordeaux I: Bordeaux, 2002.
- (3) Mornet, S.; Portier, J.; Duguet, E. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, 293 (1), 127–134.
- (4) Miller, F. A.; Wilkins, C. H. *Anal. Chem.* **1952**, 24 (8), 1253–1294.

## Annexe n° 5 : Dosage spectrophotométrique des ions $\text{Fe}^{3+}$ dans les ferrofluides par complexation avec le thiocyanate de potassium

Un dosage rapide spectrophotométrique des ions  $\text{Fe}^{3+}$  après complexation avec le thiocyanate de potassium a été mis en place.

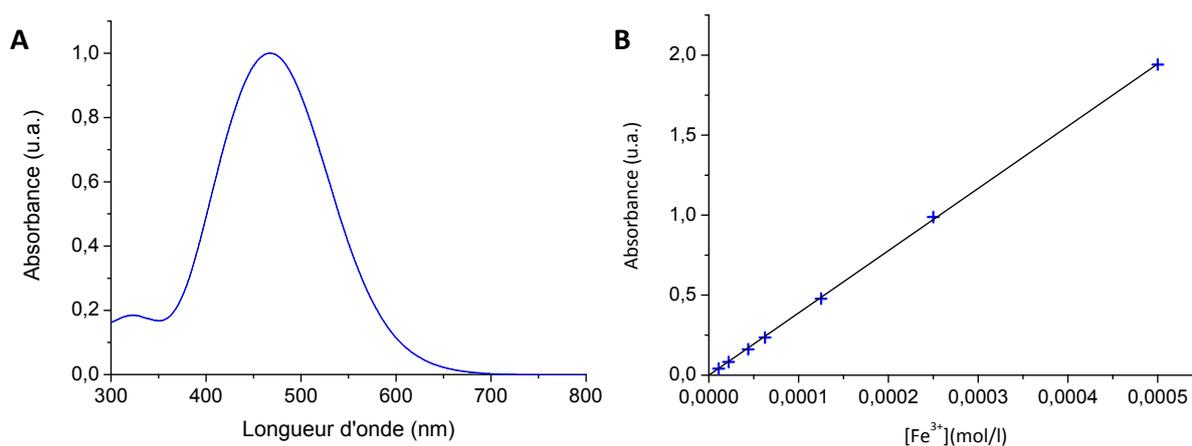
Dans un premier temps les nanoparticules de maghémite sont dégradées par l'ajout d'acide chlorhydrique concentré afin de libérer en solution les ions  $\text{Fe}^{3+}$ . L'ajout d'une solution de thiocyanate de potassium (KSCN) permet la formation du complexe  $[\text{Fe}(\text{SCN})_n]^{3-n}$  donnant une coloration rouge brique à la solution.



Le coefficient d'extinction molaire du complexe est fonction de  $n$ , et  $n$  est fonction de la quantité de thiocyanate ajouté par rapport au fer. Il convient donc de travailler en excès, afin de former le complexe  $[\text{Fe}(\text{SCN})_6]^{3-}$  dans tous les cas.<sup>1</sup>

Les mesures d'absorbance sont réalisées à 461 nm afin de disposer du coefficient d'extinction molaire le plus élevé (**Figure A.11-A**). Celui-ci est déterminé à chaque nouveau dosage à l'aide d'une solution de concentration en  $\text{Fe}^{3+}$  connue ( $\epsilon \approx 4000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), après avoir vérifié la loi de Beer Lambert grâce à une gamme étalon (**Figure A.11-B**).

Le dosage très sensible et rapide permet de ne consommer que quelques microlitres de l'échantillon à doser, même avec des concentrations inférieures à 2 g/l en maghémite.



**Figure A.11** : **A** : Spectre d'absorbance du complexe  $[\text{Fe}(\text{SCN})_6]^{3-}$ , **B** : Droite étalon du dosage du  $\text{Fe}^{3+}$  par le KSCN (mesure de l'absorption à 461 nm). Equation de la droite :  $y = 3890x$ ,  $R^2 = 0,9999$ .

**Mode opératoire A-4 : Exemple de dosage des ions  $Fe^{III}$  au thiocyanate de potassium**

3 solutions sont préparées en parallèle de la façon suivante : La première est composée de 10  $\mu$ l d'eau et 90  $\mu$ l d'HCl (37 % m/m). La seconde est composée de 10  $\mu$ l d'échantillon à doser et 90  $\mu$ l d'HCl. Enfin la dernière est composée de 10  $\mu$ l d'une solution de chlorure ferrique à 1,0 M et de 490  $\mu$ l d'HCl. Après dissolution totale des nanoparticules, Un prélèvement de 50  $\mu$ l de chacune des 3 solutions est introduit dans des cuves de spectroscopie de 4 ml, puis 50  $\mu$ l d'une solution de KSCN 2,0 M sont ajoutés. Enfin 3,900 ml d'eau sont ajoutés. La première solution est utilisée en tant que référence, puis l'absorbance des deux autres solutions sont mesurées. L'absorbance de la troisième solution permet de déterminer le coefficient d'extinction molaire.

**Références**

- (1) Perrier, R.; Auffret van der Kemp, T.; Zonszain, F. *Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques*; Doin éditeurs: Vélizy-Villacoublay (78-France), 1997.

## Annexe n° 6 : Mise au point des conditions de bioconjugaison sur les VUSPIO avec une protéine modèle (Anx-A5)

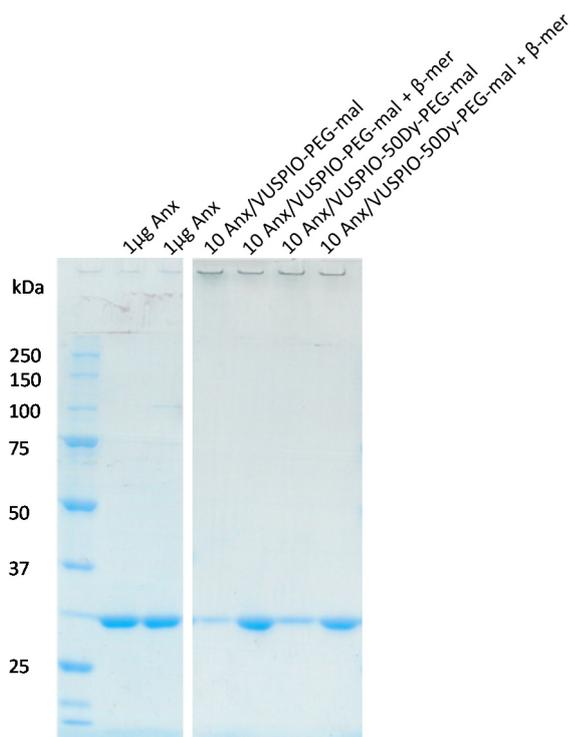
La mise au point de ces conditions de greffage sur les VUSPIO est réalisée avec l'annexine A5.

### *Mode opératoire A-5 : Biofonctionnalisation des VUSPIO avec une protéine modèle : l'Anx A5-SH :*

Greffage du PEG hétérobifonctionnel ester d'NHS-maléimide (NHS-PEG-3,4k-mal) via l'extrémité ester d'NHS sur les amines : La quantité de NHS-PEG-3,4k-mal ( $M_w = 3400 \text{ g.mol}^{-1}$ , Laysan Bio) correspond à 10 fois la quantité d'amines présentes sur les VUSPIO. Cette quantité de PEG est directement solubilisée dans la suspension de VUSPIO dans un tampon HEPES 10 mM, pH 7,8. Après 2 h de réaction, la suspension de particules est lavée sur colonne magnétique avec du tampon HEPES 10 mM, pH 7,2. Il est important de rapidement passer au lavage et abaisser le pH à 7,2 afin de diminuer la vitesse d'hydrolyse des fonctions maléimide.

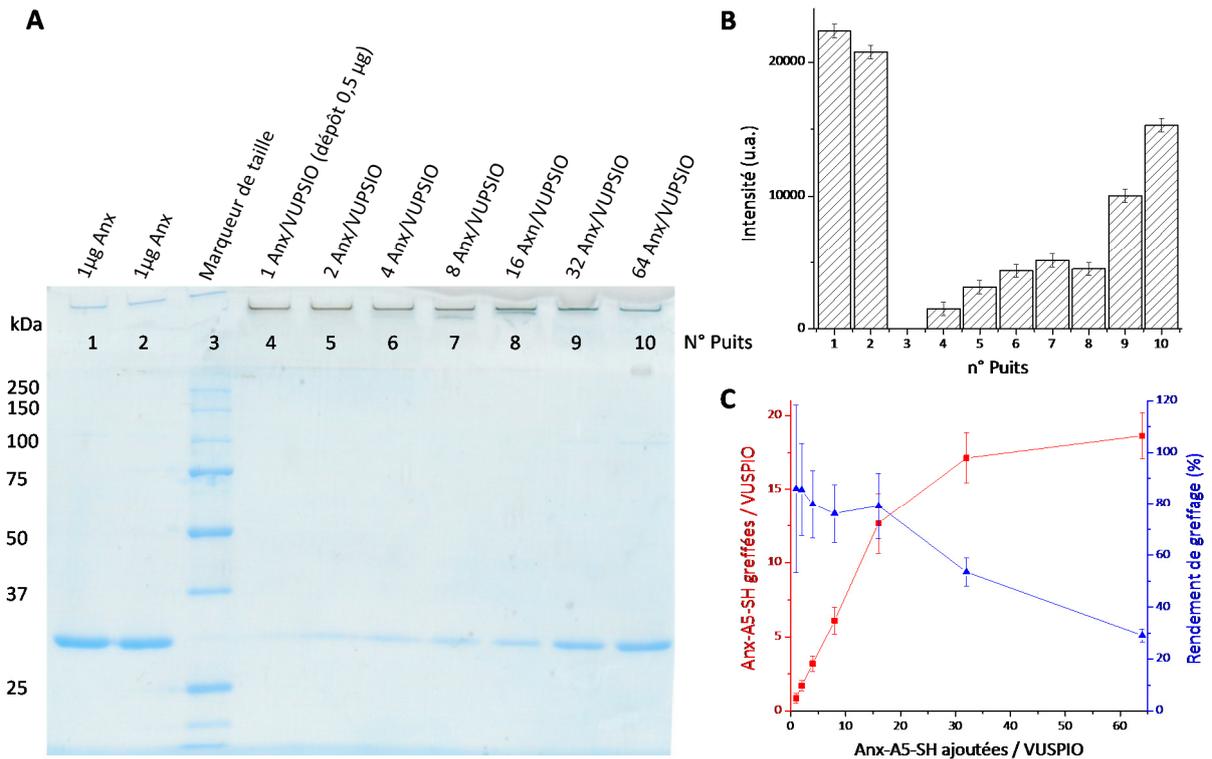
Greffage de l'Anx-A5 sur les VUSPIO par thio-alkylation : Tout de suite après le lavage puis le dosage des VUSPIO, la dispersion est répartie dans différents tubes puis l'Anx-A5-SH est ajoutée à chaque échantillon afin de faire varier les ratios Anx-A5-SH/VUSPIO. La réaction se poursuit à 4°C durant 12 h. Chaque échantillon est ensuite déposé sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE en condition non réductrice (1 µg A5-SH/puit). Pour les contrôles négatifs, un excès de 10 par rapport aux maléimides est ajouté aux VUSPIO-mal, l'A5-SH étant ajoutée 2 h après.

La **Figure A.12** montre que la quantité d'Anx-A5-SH migrant dans le gel est bien plus faible en présence des VUSPIO-PEG-mal que dans les puits références. De plus, les particules ayant été incubées avec le  $\beta$ -mercaptoéthanol afin d'inhiber les fonctions maléimide ont perdu la capacité à retenir les protéines dans le puit. Le greffage de l'Anx-A5-SH via les maléimides est bien validé. Ce test met également en évidence que les VUSPIO-50D (après greffage des sondes fluorescentes) ont également la capacité de greffer l'Anx-A5-SH, ce qui montre la maîtrise du contrôle du greffage des sondes fluorescentes mis en place.



**Figure A.12** : Gel SDS-PAGE. Dépôt de 1 µg d'Anx-A5-SH par puit.

L'étude par gel d'électrophorèse permet également d'estimer le nombre de protéines greffées. Ainsi en faisant varier le ratio  $n(\text{Protéines})/n(\text{Particule})$  durant le greffage, il est possible de faire varier le nombre de protéines greffées sur les particules. Comme le suggère la **Figure A.13**, il semblerait que l'efficacité de greffage décroît avec l'augmentation du ratio, pour atteindre un maximum entre 18 et 20 protéines/VUSPIO. La saturation de la surface des VUSPIO d'environ 50 nm de diamètre avec des protéines de 5 nm devrait théoriquement être atteinte pour environ 400 Anx-A5 par VUSPIO (valeur supérieure au nombre d'amines disponibles pour le greffage). Le plateau obtenu dans l'expérience est bien inférieur à cette valeur. Ce résultat est très semblable à celui obtenu avec le greffage de l'Anx-A5 sur les SPC50. L'enfouissement d'une partie des fonctions maléimide dans le nuage polymère formé de dextrane et de PEG peut être une explication à la saturation observée.



**Figure A.13** : **A** : Gel PAGE des échantillons VUSPIO-A5 (dépôt : 1  $\mu$ g/puit sauf indiqué), **B** : Quantification de l'intensité des bandes avec ImageJ, **C** : Anx-A5-SH greffée sur les VUSPIO en fonction du ratio initial.

Ces particules VUSPIO-Anx-A5 pourraient à l'avenir être utilisées comme marqueur d'objets biologiques exposant de la phosphatidylsérine au niveau de leur membrane externe (cellule ou corps apoptotique, plaquette activée, exosomes...). Cette étude a permis de mettre en place les conditions opératoires préalables nécessaires pour le greffage de protéines d'intérêt sur ces particules.

## Annexe n° 7 : La microbalance à cristal de quartz avec mesure de dissipation (QCM-D)

La mesure par microbalance à cristal de quartz (QCM) est basée sur les propriétés piézoélectriques des cristaux de quartz. Sous l'effet d'un champ électrique alternatif, celui-ci oscille. La fréquence de résonance du même cristal est fonction de la masse adsorbée à sa surface. Dans le cas d'une couche adsorbée rigide, la variation de fréquence de résonance ( $\Delta f$ ) et la variation de la masse ( $\Delta m$ ) adsorbée sont reliées par la relation de Sauerbrey :<sup>1</sup>

$$\Delta m = -C \frac{\Delta f_n}{n}$$

$\Delta m$  : variation de la masse adsorbée (ng/cm<sup>2</sup>)

$\Delta f_n$  : variation de la fréquence de résonance à l'harmonique n (Hz)

C : constante de sensibilité de masse (C = 17,7 ng.cm<sup>-2</sup>.Hz<sup>-1</sup> pour les cristaux standards de Q-Sense)

Lorsque la couche adsorbée n'est pas rigide, cette relation n'est plus applicable car la propagation de l'onde acoustique dans le milieu viscoélastique doit être prise en compte.<sup>2</sup>

Lorsque le cristal n'est plus excité par le champ électrique, il continue à vibrer et produit un champ électrique alternatif. L'amplitude d'oscillation décroît au cours du temps jusqu'à s'annuler. La variation dans le temps de cette amplitude est décrite par la relation suivante :

$$A(t) = A_0 e^{-\pi f D t} \sin(2\pi f t + \Phi)$$

$f$  : fréquence de résonance du cristal

$D$  : dissipation

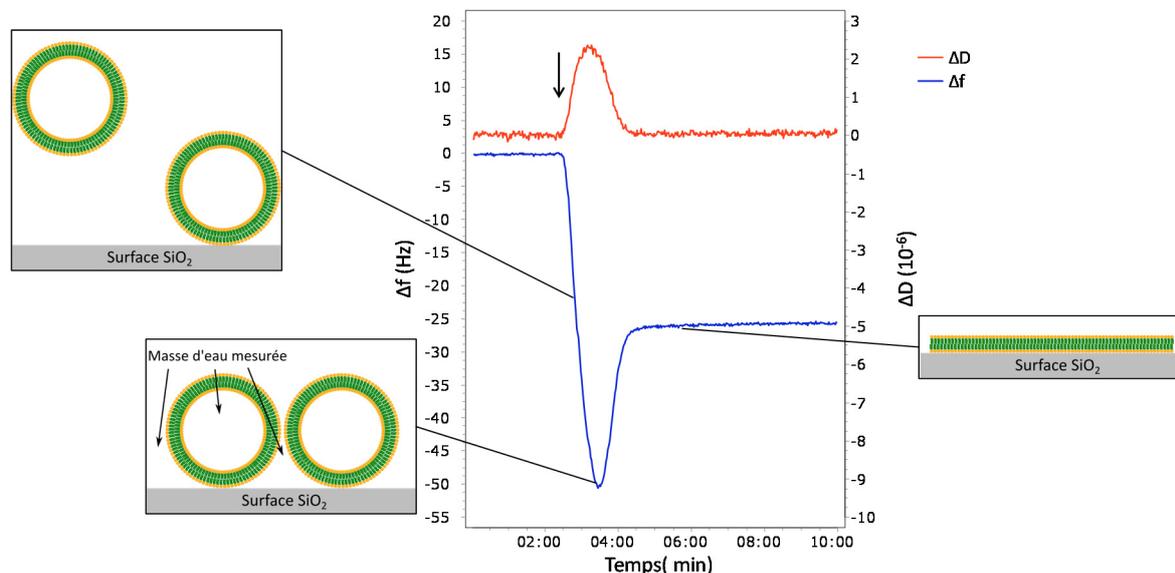
$A$  : amplitude initiale

$\Phi$  : phase initiale

L'énergie de vibration adsorbée par une couche souple est plus importante que celle adsorbée par une couche rigide. Cela se traduit par une plus grande dissipation ( $D$ ) dans le cas d'une couche souple que dans le cas d'une couche rigide.

La mesure par QCM-D permet de suivre à la fois la masse adsorbée ainsi que de suivre à l'aide d'un indicateur (la dissipation) la viscosité de la couche formée. La formation d'une bicouche lipidique à partir de SUV faiblement chargée négativement en présence de sel (150 mM NaCl) est un bon exemple pour illustrer les possibilités de cette méthode de caractérisation. Le QCM-D permet en effet d'observer en temps réel les différents mécanismes mis en jeu lors de l'établissement de bicouches lipidiques supportée (adsorption

de vésicules, éclatement et formation de la bicouche).<sup>3</sup> Le suivi dans le temps de  $\Delta f$  et de  $\Delta D$  sont présentés en **Figure A.14**.



**Figure A.14** : Evolution de  $\Delta f$  et de  $\Delta D$  en fonction du temps. La flèche indique l'injection de SUV de composition DOPC/DOPS (4/1) à 100  $\mu\text{g/ml}$  dans un tampon HEPES 10 mM, pH 7,4, 150 mM NaCl.

L'injection des SUV s'accompagne d'une diminution de la fréquence de résonance du cristal, ainsi que d'une augmentation de la dissipation. Cette observation traduit l'adsorption de vésicules lipidiques souples à la surface du cristal. Après 3 min 30 s, la fréquence de vibration du cristal augmente jusqu'à atteindre un  $\Delta f$  de -25 Hz. Au même instant, la dissipation diminue pour quasiment atteindre la valeur initiale. Cela signifie que la couche formée à la surface du cristal est de nouveau rigide, et que la masse adsorbée a diminué. Ceci est le résultat de l'éclatement des vésicules adsorbées à la surface pour former une bicouche lipidique supportée. La bicouche étant bien plus rigide que des vésicules, la dissipation diminue. La perte de masse adsorbée est, quant à elle, attribuée à la libération de l'eau comprise entre les vésicules adsorbées et contenue dans celles-ci. En effet, la masse adsorbée déterminée par QCM-D inclut les molécules d'eau déplacées par l'oscillation de l'échantillon. Etant donné que la couche formée est rigide, la relation de Sauerbrey est applicable. La variation de fréquence de 25 Hz correspond alors à l'adsorption de 440  $\text{ng/cm}^2$  ce qui est en accord avec la masse surfacique d'une double couche de phospholipide.<sup>4</sup>

Le QCM-D est donc une technique sensible (de l'ordre du  $\text{ng/cm}^2$ )<sup>2</sup> permettant également de suivre des modifications conformationnelles de la couche adsorbée à la surface du cristal, ou tout au moins d'apprécier la rigidité de celle-ci.

**Références :**

- (1) Höök, F.; Rodahl, M.; Brzezinski, P.; Kasemo, B. *Langmuir* **1998**, *14* (4), 729–734.
- (2) Höök, F.; Kasemo, B.; Nylander, T.; Fant, C.; Sott, K.; Elwing, H. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (24), 5796–5804.
- (3) Richter, R.; Mukhopadhyay, A.; Brisson, A. *Biophys. J.* **2003**, *85* (5), 3035–3047.
- (4) Keller, C. A.; Kasemo, B. *Biophys. J.* **1998**, *75* (3), 1397–1402.

## **Titre : Développement de stratégies de biofonctionnalisation de surface de nano-objets pour des applications biologiques**

**Résumé :** Cette étude porte sur le développement de nanoparticules pour différentes applications biologiques. Trois systèmes de nanoparticules ont été mis au point : des clusters de nanoparticules magnétiques pour l'extraction par magnétophorèse d'objets biologiques, des agents de contraste multimodaux (IRM, fluorescence dans le proche infrarouge) pour le diagnostic de l'athérosclérose et des nanoparticules de silice fluorescentes doublement marquées pour la détection de tumeurs *in vivo*. Au cours de cette étude, une stratégie de greffage de surface de silice par des macromolécules de poly(oxyde d'éthylène) (PEG) permettant d'atteindre de hautes densités de greffage. Cette PEGylation permet, d'annuler les interactions non spécifiques dans le cadre de l'extraction magnétique rendant ainsi ce système plus efficace, et de conférer aux nanoparticules des propriétés de furtivité vis-à-vis du système immunitaire dans le cadre du marquage de tumeurs. Le contrôle du nombre de biomolécules greffées régiosélectivement sur les nanoparticules (Annexine A5, ou fragments d'anticorps) ainsi que l'étude des interactions biomoléculaires par des techniques de biophysique (SPR, QCM-D) ont permis d'optimiser la propriété de reconnaissance des nano-objets pour leurs cible respective. Enfin, les nano-objets ont été évalués dans le cadre de leur application.

**Mots clés :** nanoparticules magnétiques, silice colloïdale, sol-gel, fonctionnalisation de surface, PEGylation, bioconjugaison, extraction magnétique, imagerie *in vivo*, Effet EPR, Athérosclérose

---

## **Title: Development of nano-objects surface biofunctionalization strategies for biological applications**

**Abstract:** The aim of this study was the design of nanoparticles for three different biological applications: magnetic nanoparticles cluster for magnetic extraction of biological materials, multimodal contrast agents (MRI and near infrared fluorescence imaging) for atherosclerosis diagnosis, and fluorescent silica nanoparticles with two different dyes for *in vitro* and *in vivo* tumor labeling. One part of the project dealt with the development of a new grafting method of poly(ethylene oxide) macromolecules onto nanoparticle's silica surfaces (PEGylation) in order to obtain a high grafting densities. The obtained results have shown that this PEGylation reduces the non-specific protein adsorption allowing a better extraction and sorting efficiency, and also permits nanoparticles to escape the surveillance of the immune system for *in vivo* tumor labeling. Therefore, the biomolecular recognition of the nanoparticles has been optimized by controlling the number of conjugated biomolecules and by studying this biomolecular recognition using biophysical methods (SPR, QCM-D). Finally, the different nano-objects were evaluated in the context of their respective application.

**Keywords:** magnetic nanoparticle, colloidal silica, sol-gel process, surface functionalization, PEGylation, bioconjugation, magnetic extraction, *in vivo* imaging, EPR effect, atherosclerosis

---

### **Unité de recherche**

ICMCB-CNRS, UPR 9048, 87 Avenue du Dr Albert Schweitzer, 33600 Pessac