



**HAL**  
open science

# Cycle de vie de nanoparticules dans l'organisme : biotransformations et biodégradation.

Jeanne Volatron

► **To cite this version:**

Jeanne Volatron. Cycle de vie de nanoparticules dans l'organisme : biotransformations et biodégradation.. Physique [physics]. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCC102 . tel-02308211

**HAL Id: tel-02308211**

**<https://theses.hal.science/tel-02308211v1>**

Submitted on 8 Oct 2019

**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 de doctorat**  
**de l'Université Sorbonne Paris Cité**  
**Préparée à l'Université Paris Diderot**

École Doctorale: Physique en Ile-de-France (ED 564)

**Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057**

**Cycle de vie de nanoparticules dans l'organisme**  
**Biotransformations et biodégradation**

Présentée par

**Jeanne VOLATRON**

Thèse de doctorat de Physique

Dirigée par

**Florence Gazeau**

**Présentée et soutenue publiquement le 1<sup>er</sup> juin 2018 devant le jury composé de :**

M. Marc Benedetti  
Mme Maria Del Puerto Morales  
M. Raphaël Levy  
M. Elias Fattal  
Mme Carole Peyssonnaud  
Mme Florence Gazeau  
Mme Gaëlle Charron  
M. Damien Alloyeau

Président du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Examinatrice  
Directrice de thèse  
Co-Encadrante  
Co-Encadrant







L'avènement des nanotechnologies engendre une exposition accrue de l'homme aux nanomatériaux, représentant un risque d'un genre nouveau. Néanmoins, les questions de dégradation et transformation des nanoparticules dans l'organisme sont encore peu abordées. Des études effectuées au laboratoire ont montré qu'après injection de nanoparticules d'oxyde de fer *in vivo*, celles-ci sont confinées dans les lysosomes où elles sont dégradées.

Une partie de mes travaux de thèse se sont concentrés sur une voie possible de métabolisation des produits de dégradation issus de nanoparticules d'oxydes de fer par l'intermédiaire d'une protéine intervenant dans le métabolisme du fer, la ferritine. Ces travaux ont permis de mettre en évidence un processus de prise en charge des produits de dégradation des nanoparticules d'oxyde de fer à l'échelle moléculaire.

Une seconde partie de mes travaux a été consacrée au suivi des produits issus de la dégradation des nanoparticules d'oxyde de fer à l'échelle de l'organisme. La haute concentration endogène en fer rendant impossible ce suivi, une stratégie consistant à marquer les nanoparticules de fer avec un isotope du fer, le  $^{57}\text{Fe}$ , a permis de suivre les dynamiques de circulation des produits de dégradation *in vivo* sur une période de six mois. Nous avons également effectué un double marquage des nanoparticules, du cœur inorganique ainsi que de leur enrobage afin de caractériser leur intégrité *in vivo*.

## Abstract

---

With the advent of nanotechnology, the exposure of humans to nanomaterials increased, representing a risk of a new kind. Their long term fate, biotransformation and degradation in the organism are still poorly understood. It was demonstrated earlier in the laboratory, that after intravenous injection, iron oxide nanoparticles undergo local intracellular degradation within lysosomes. In this context, we are interested in the fate of by products from iron oxide nanoparticles.

Part of my thesis has focused on a possible pathway for metabolizing these degradation products through a protein involved in iron metabolism, the ferritin. We first studied, in solution, the degradation processes of iron oxide nanoparticles in the presence of these proteins as well as the iron transfer processes from nanoparticles to ferritin. The difficulty is the high concentration of endogenous iron which makes impossible to demonstrate these *in vivo* transfers. Thus, we have developed a strategy, using doped iron oxide nanoparticles with a scarce element in the organism, to track these phenomena *in vivo*. This work highlighted a possible mechanism of biological recycling, remediation and detoxification of nanoparticles mediated by endogenous proteins at the molecular scale.

A second part of my work was devoted to develop a multi-scale method to study the life cycle of metal oxide nanoparticles and their by products in organism. The main challenge is to differentiate iron stemming from the nanoparticles from the endogeneous iron. This specific tracking problem is routinely encountered in geochemical studies and solved by labelling the target material with minor stable isotopes. Therefore, iron oxide nanoparticles enriched in the minor stable isotope  $^{57}\text{Fe}$  were synthesised and injected intravenously in mice to follow dynamic circulations of iron oxide nanoparticles and their by products. We have also labelled the coating to track the nanoparticles integrity in mice over a period of six month.



## Remerciements

---

Chimiste de formation, mon arrivée au laboratoire Matière et Systèmes Complexes, laboratoire de physique, n'a pas été sans une certaine appréhension. Je me souviens d'un appel téléphonique avec Florence juste avant le début de mon stage de M2, lui demandant si je pourrais faire de la chimie dans ce laboratoire de physique. Je ne connaissais alors pas encore le MSC. Aujourd'hui je suis consciente du privilège que j'ai eu de pouvoir passer quatre ans dans ce laboratoire où le maître-mot est l'interdisciplinarité. Ces quatre années passées au laboratoire MSC ont été un véritable plaisir tant scientifique que humain. Je tiens ici à remercier les différentes personnes qui m'ont accompagnée durant ce chemin.

Je souhaite remercier en premier lieu ma directrice de thèse, **Florence Gazeau**, qui est véritablement une incroyable directrice de thèse. J'ai pris énormément de plaisir à travailler avec toi sur ce sujet passionnant pendant ces années. J'admire ta curiosité scientifique et surtout ta passion pour les sujets interdisciplinaires, qui je pense a été contagieuse pour beaucoup d'entre nous. Je voudrais également te remercier de la formation exceptionnelle dont j'ai bénéficié en travaillant à tes côtés, et également de l'environnement riche en collaborations que tu as su m'offrir. Merci également de la confiance précieuse que tu m'as accordée pour mener à bien différents projets dans le cadre de nombreuses collaborations. Au-delà de tes qualités scientifiques, j'aimerais également te remercier de ton infaillible soutien. Déjà en 2007 les doctorants te surnommaient « maman Gazeau », bien qu'aujourd'hui nous préférons employer « maman Floflo », ces surnoms illustrent bien ton écoute, ta disponibilité et ta bienveillance. Merci pour tous ces moments au laboratoire et en dehors, qui ont participés à mon épanouissement tant scientifique que personnel.

J'aimerais exprimer ma reconnaissance à **Gaëlle Charron** qui a suivi et encadré mes travaux depuis pas mal d'années. Ma passion pour le monde nano s'est développée lors de mon premier stage de recherche en L3, que j'ai effectué avec Gaëlle. J'aimerais te remercier de ton encadrement et ta rigueur scientifique qui ont disciplinés mes premiers pas (de bébé ours) dans la recherche scientifique. Je voudrais également te remercier de la confiance que tu m'as témoignée en me présentant à Florence, c'est en partie grâce à toi que j'ai eu la chance d'intégrer le MSC. Et c'est avec un grand plaisir que j'ai pu retravailler avec toi sur ce joli projet du marquage au fer 57. Au-delà de l'excellence scientifique dont tu fais preuve, j'aimerais souligner que, malgré des moments pas toujours faciles (calcul d'⊗ !?!@!! incertitudes), c'est quand même vachement cool de travailler avec toi.

J'aimerais également remercier **Damien Alloyeau**, **Florent Carn** et **Myriana Hemadi** pour leur accompagnement et les nombreuses conversations scientifiques que nous avons partagées.

Je remercie **Nathalie Luciani** de m'avoir initié aux mystères de la biologie, et pour sa relecture attentive d'une partie de mon manuscrit.

Je remercie également les directeurs du laboratoires MSC qui m'ont accueillie, j'ai une pensée particulière pour **Loic Auvray**, et je remercie **Laurent Limat**.

Merci à tous les collaborateurs avec qui j'ai pu travailler. Merci à **Yves Gossuin** et **Lam Vuong** pour leurs mesures magnétiques et surtout pour leur sérénité devant nos caisses d'échantillons. Merci également de leur bonne humeur et de leur générosité. Merci à toute l'équipe de l'Institut Cochin, **Gilles Renault**, **Franck Lager**, **Carmen Marchiol** et **Isabelle Lagoutte** de nous avoir accueilli pour les expériences *in vivo*. Merci à Franck de m'avoir enseigné l'anatomie murine et pour sa bonne humeur contagieuse. Merci à **Gwenhael Autret** pour le suivi IRM à l'HEGP, merci également de ta patience et de tes précieuses explications sur le fonctionnement de l'IRM. Merci à **Sonia Lajnef** pour les mesures RFM, merci en particulier pour ces agréables petites pauses lors de ces longues journées de solitude enfermées dans la salle de RFM. Merci à **Christine Longin** pour les images de microscopie électronique, merci de ta patience et de ton aide précieuse à la fin de la rédaction de mon manuscrit pour l'analyse des images de MET. Merci à **Christine Ménager** et **Sophie Neuveu** pour la synthèse des nanoparticules. Merci enfin à toute l'équipe de l'IPGP pour les mesures ICP, en particulier un grand merci à **Mickaël Tharaud** pour ta patience et ta bonne humeur malgré le nombre de cabas d'échantillons en constante augmentation.

Je voudrais également remercier **Elliott Teston** avec qui j'ai eu la chance de travailler à plusieurs reprises sur différents projets. Merci de ta disponibilité, de ta bonne humeur et de ton soutien. Merci également pour ta relecture exhaustive et précise de mon manuscrit.

Merci à tous les membres du laboratoire MSC passés et présents pour leur accueil, leur sympathie, leur bonne humeur qui m'ont donné chaque jour l'envie de venir au laboratoire et ont rendu le quotidien de la thèse agréable et léger.

Je voudrais témoigner toute ma reconnaissance à **Iris Marangon** qui a rendu mon quotidien tellement simple et agréable, merci pour ton soutien, ton écoute, ta générosité, ta bienveillance, ta disponibilité et pour toutes nos danses de la victoire !!!!

Merci à tous mes co-bureaux du 828 A qui ont partagé les bons mais aussi les mauvais moments pendant ces quatre années, merci à **François Mazuel**, **Fanny Mousseau**, **Evi Oikonomou**, **Ana Espinosa**, **Iris Marangon**, **Solène Song**, **Alba Nicolas-Bodula**, **Gaëtan Mary**, **Alexandre Souchaud**, **Valentin Busson**, **Nathalie Bridonneau** et **Alberto Curcio**.

Merci également à tous mes co-paillasse du 604 A et du 832 A: **Ana Espinoza**, **François Mazuel**, **Iris Marangon**, **Max Piffoux**, **Alberto Curcio**, **Anouchka Plan**, **Aurore Van de Walle**, **Vladimir Mulens**, **Alba Nicolas-Bodulas**, **Alice Balfourier**, **Shony Lemieux** et **Gwenhael Brackx**.

Je voudrais également remercier les doctorants et post-doctorants du laboratoire MSC pour les moments passés en dehors du labo, pour ces parties de Molky enflammées, pour les soirées au Caminito

et au Track. Merci à **François Mazuel, Thomas Auger, Gwennhael Brackx, David Peireira, Mourtaza Kourbane** et tous les autres.

Merci également à **Alain Richert** pour sa bonne humeur et ses petites blagounettes dans les couloirs.

Je voudrais remercier **Claire Wilhelm** et **Amanda Brun** pour les différentes conversations scientifiques précieuses et d'avoir partagé leur savoir-faire. Je voudrais également les remercier ainsi que **Florence Gazeau** et **Max Piffoux** pour la confiance qu'ils m'accordent pour notre nouvelle aventure de création de startup.

Je voudrais remercier également les personnes m'ayant entourée et encouragée pendant ces quatre années. Merci à mes amis qui ont toujours été à l'écoute.

Merci à ma famille, merci à mes deux sœurs **Louise** et **Florence**, à mon frère **Jules** et à **Yoann** qui m'ont toujours encouragée, merci également à la petite **Lisasouille** qui avec son sourire et son air malicieux fait disparaître tous les tracassés. Merci à **mes parents** de m'avoir transmis leur goût pour la recherche et de m'avoir toujours soutenue et encouragée. Merci à ma grand-mère **Maddy** pour son soutien et son écoute précieuse.

Je termine en remerciant celui qui m'a accompagnée et supportée pendant ces années, mon doux **Clément**, merci pour ton soutien indéfectible.



## Table des matières

---

<b>Avant-propos</b>	<b>15</b>
<b>Introduction</b>	<b>19</b>
<b>1. Intérêt des nanoparticules d'oxydes de fer</b>	21
1.1 Propriétés magnétiques des NPOFs	22
1.2 Applications des NPOFs	26
<b>2. Cycle de vie des nanoparticules</b>	33
2.1 Echelle tissulaire	33
2.2 Echelle cellulaire	34
<b>3. Nano-toxicologie des NPOFs</b>	37
3.1 Cytotoxicité : échelle cellulaire	38
3.2 Nano-toxicité : études <i>in vivo</i>	38
<b>4. Comment détecter les NPOFs <i>in vivo</i> ?</b>	42
4.1 L'imagerie par résonance magnétique	42
4.2 La résonance ferromagnétique	46
4.3 L'approche multi-échelle	48
<b>5. Devenir des NPOFs</b>	50
5.1 Etudes <i>in vivo</i>	50
5.2 Modélisation de la dégradation	53

---

### Partie I : Suivi du devenir des NPOFs à l'échelle moléculaire

---

<b>Chapitre 1 : Transfert de métaux vers la ferritine</b>	<b>65</b>
<b>1. La ferritine : élément essentiel du métabolisme du fer</b>	67
1.1 Le cycle de vie du fer	67
1.2 La ferritine	70
<b>2. Prise en charge du fer issu des NPs à l'échelle nanométrique</b>	74
2.1 Méthodologie	74
2.2 Synthèse des principaux résultats	78
2.3 Publication associée à l'étude	84
<b>3. Prise en charge de métaux issus de nanoparticules</b>	99
3.1 Description du modèle étudié : les ferrites de cobalt	100
3.2 Méthodologie	101
3.3 Synthèse des principaux résultats	102
3.4 Publication associée à l'étude	104
<b>4. Conclusion</b>	115

**Chapitre 2 : Stratégie de marquage du cœur inorganique et de l'enrobage des NPs 123**

<b>1.</b>	<b>Suivi de l'intégrité des nanoparticules – état de l'art</b>	127
	1.1 Suivi de la couronne de protéines	127
	1.2 Suivi de l'enrobage	130
	1.3 Suivi du cœur inorganique	132
	1.4 Stratégie de marquage	133
<b>2.</b>	<b>Marquage du cœur inorganique</b>	135
	2.1 Marquage isotopique	135
	2.2 Principe de l'ICP-MS	137
	2.3 Synthèse des NPOFs	140
	2.4 Conclusion	144
<b>3.</b>	<b>Marquage de l'enrobage</b>	145
	3.1 Stratégie du double marquage par des complexes de lanthanides	145
	3.2 Méthodes	147
<b>4.</b>	<b>Conclusion</b>	148

**Chapitre 3 : Détection des <sup>57</sup>NPOFs 155**

<b>1.</b>	<b>Synthèse des nanoparticules marquées avec l'isotope <sup>57</sup>Fe</b>	157
	1.1 Taille des NPOFs	157
	1.2 Enrobage des NPOFs	159
	1.3 Composition isotopique	163
	1.4 Propriétés magnétiques	164
	1.5 Conclusion	165
<b>2.</b>	<b>Suivi élémentaire des <sup>57</sup>NPOFs – matrices de validation</b>	168
	2.1 Exemple de la matrice complexe « foie »	169
	2.2 Résultats des matrices de validation	172
<b>3.</b>	<b>Détection <i>in vivo</i> – Etude pilote</b>	174
	3.1 Méthodologie	174
	3.2 Biodistribution	176
	3.3 Quantification du fer exogène provenant des <sup>57</sup> NPOFs par HR-ICP-MS	181
	3.4 Dégradation des <sup>57</sup> NPOFs	186
<b>4.</b>	<b>Conclusion</b>	195

<b>Chapitre 4 : Suivi in vivo des <math>LT^{57}NPOFs</math></b>	<b>203</b>
<b>1. Résultats du marquage du cœur inorganique et de l'enrobage</b>	205
1.1 Marquage du cœur inorganique	205
1.2 Marquage de l'enrobage	206
1.3 Greffage du polymère sur les $^{57}NPOFs$	208
1.4 Propriétés magnétiques des $LT^{57}NPOFs$	210
1.5 Design de l'expérience	212
<b>2. Devenir du cœur inorganique – résultats</b>	215
2.1 Quantification du fer exogène des $LT^{57}NPOFs$ par HR-ICP-MS	215
2.2 Dégradation des $LT^{57}NPOFs$	221
2.3 Discussion	250
<b>3. Devenir de l'enrobage</b>	256
3.1 Efficacité du marquage du polymère avec les complexes de lanthanides	256
3.2 Intégrité des $LT^{57}NPOFs$	259
3.3 Discussion	273
<b>4. Conclusion</b>	276
<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>283</b>
<b>Partie expérimentale</b>	<b>291</b>
<b>Annexes</b>	<b>311</b>



## Avant-propos

---

« *What I want to talk about is the problem of manipulating and controlling things on a small scale* », ce dont je veux discuter est le problème de la manipulation et le contrôle des choses à très petite échelle. C'est lors de ce discours visionnaire du 29 décembre 1959 intitulé *There is Plenty of Room at the Bottom* que Richard Feynman introduit la science nanométrique et ses applications potentielles.<sup>1</sup> Ce n'est qu'en 1974 que le terme « nanotechnologie » apparaît grâce au physicien Norio Taniguchi qui le définit comme la production de technologies dont « la précision et la finesse sont de l'ordre de grandeur du nanomètre ». <sup>2</sup> D'un point de vue expérimentale, l'ère des nanotechnologies débutera en 1981 avec la découverte du microscope à effet tunnel par Gerd Binnig et Heinrich Rohrer, ce qui leurs vaudra le prix Nobel de physique en 1986. En 1985, les chercheurs Richard Smalley, Robert Curl et Harold Kroto découvrent une nouvelle famille de composés carbonés : les fullerènes, des molécules composées d'atomes de carbone constituant une cage fermée.<sup>3</sup> En 1986, l'ingénieur Eric Drexler publie un ouvrage sur les nanotechnologies intitulé *Engines of Creation : The Coming Era of Nanotechnology*, décrivant un monde où les nanotechnologies feraient parties du quotidien.<sup>4</sup> La révolution des nanotechnologies est alors en marche.

Les nanotechnologies sont définies par l'*US National Nanotechnology Initiative* comme des matériaux et systèmes présentant de nouvelles propriétés physiques, chimiques et biologiques dues à leurs tailles nanométriques.<sup>5</sup> L'exploitation de ces nouvelles propriétés a permis leur implémentation dans des domaines variés, allant du stockage de l'information aux crèmes solaires. En particulier, les nanotechnologies sont désormais des candidates crédibles pour supplanter la médecine traditionnelle au profit de la *nanomédecine*. Celle-ci est définie par la *Plateforme Technologique Européenne de Nanomédecine* comme l'utilisation des nanotechnologies pour la santé.<sup>6</sup> Le défi est d'exploiter les nouvelles propriétés physiques, chimiques et/ou biologiques des nanomatériaux pour conduire à la construction, la réparation, la défense et à l'amélioration de tout système biologique humain.<sup>7</sup>

Aujourd'hui l'utilisation des nanotechnologies à des fins médicales promet de nouvelles méthodes thérapeutiques et de diagnostic. Un grand nombre de recherches porte sur le *design* de nanoparticules comme agents polyvalents combinant thérapie et diagnostic, dans une stratégie dite *théranostique*, afin de localiser, combattre et suivre l'évolution de certaines pathologies.<sup>5</sup> Il existe aujourd'hui plus de deux cents essais cliniques exploitant les propriétés des nanoparticules.<sup>8</sup> A titre d'exemple l'entreprise *Nanospectra Biosciences, Inc.* propose l'utilisation de nanoparticules d'or pour l'ablation de tumeur par photothermie.<sup>9</sup> Cette thérapie fait l'objet de plusieurs essais cliniques pour le traitement de tumeurs localisées dans les poumons, la prostate, le cerveau et le cou.<sup>10</sup>

Du fait de leurs propriétés intermédiaires entre la molécule et le matériau, les nanoparticules sont porteuses d'espoir dans le cas de nombreuses applications, mais engendrent également des risques

d'un genre nouveau. L'avènement des nanotechnologies dans le domaine industriel implique une exposition accrue de l'homme aux nanomatériaux, créant ainsi de nouveaux enjeux de santé publique, sociétaux, éthiques, juridiques et environnementaux. A titre d'exemple, dans l'ouvrage *La nanomédecine – Enjeux éthiques, juridiques et normatifs*, Michèle Stanton-Jean, présidente du Comité international de bioéthique de l'Unesco de 2003 à 2005, s'interroge sur les risques de toxicité et de biopersistance des nanomatériaux.<sup>11</sup> Les instances nationales de régulation telles que l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), l'Agence Française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (ANSES), mais aussi l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA), et l'Union Européenne avec le règlement REACH, établissent actuellement une réglementation concernant l'utilisation des nanomatériaux ainsi que leurs effets sur l'homme et l'environnement. L'évaluation de la toxicité des nanomatériaux dépend d'un ensemble de paramètres complexes et souvent interdépendants. On pourra notamment se référer au rapport de *l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail* publié en 2006 qui synthétise les différents paramètres à prendre en compte afin d'estimer la toxicité des nanomatériaux.<sup>12</sup> D'après ce dernier, les effets toxicologiques dépendent des caractéristiques définissant la nanoparticule, mais également de l'organisme étudié et du mode d'exposition/administration. Des nanoparticules polymériques pour la vectorisation de principe actif aux nanoparticules d'or pour la photothermie, il existe un large éventail de nanoparticules pour des applications en nanomédecine, qui diffèrent par leur composition, leur taille, leur forme, leur état de surface ou leurs propriétés. L'INRS pointe une difficulté majeure sur la pertinence du choix du modèle pour estimer la toxicité des nanoparticules.<sup>13</sup> La plupart des tests de toxicité sont réalisés sur des types cellulaires variés *in vitro* et sont, en outre, difficilement reproductibles et extrapolables à l'homme. Il est donc nécessaire de définir et d'effectuer des tests systématiques normalisés afin de prédire au mieux la toxicité de chaque nanomatériau.

Un aspect complémentaire à prendre en compte, qui reste encore peu exploré, est le cycle de vie des nanoparticules dans l'organisme. Comparées à la plupart des molécules, les nanoparticules sont des objets robustes qui, *a priori*, ne sont pas éliminées ou métabolisées par l'organisme quelques heures voire quelques jours après administration. Une fois entrées dans le corps, elles sont en contact avec les éléments endogènes et au-delà de leur toxicité à court terme, leurs interactions avec les constituants biologiques, leur persistance, leur transformation, leur dégradation, leur élimination et leur éventuel recyclage restent mal connus. De même que la toxicité, le suivi du devenir des nanoparticules dans l'organisme dépend de leur nature et nécessite le développement de nouvelles méthodes propres à chaque type de nanoparticules afin de localiser et suivre en temps réel leur transformation au cours du temps.

Ce travail de thèse a pour objectif d'étudier le devenir et les effets à long terme de nanoparticules inorganiques dans l'organisme et propose le développement de différentes méthodes de nanométrie pour suivre un type de nanoparticules dans l'organisme, celui des oxydes de fer.

Ce manuscrit comporte deux parties :

Partie I : Devenir des NPOFs à l'échelle moléculaire (chapitre 1).

Partie II : Devenir des NPOFs à l'échelle de l'organisme (chapitre 2,3 & 4).

Ces parties sont divisées en chapitres dont le contenu est brièvement exposé ci-dessous.

L'introduction a pour objectif d'une part de donner un aperçu des différentes applications des nanoparticules d'oxyde de fer pour la nanomédecine et, d'autre part, d'exposer les problématiques associées à l'utilisation de celles-ci dans le cadre médical. Nous aborderons également l'étude du devenir des nanoparticules et les enjeux associés à celle-ci.

Le premier chapitre a porté sur la prise en charge des nanoparticules d'oxyde de fer à l'échelle moléculaire. Nous avons mis en évidence la possibilité d'un transfert de fer entre les nanoparticules et une protéine impliquée dans le métabolisme du fer, la ferritine. Nous avons également caractérisé ce transfert *in vivo* chez la souris.

Le deuxième chapitre présente dans un premier temps les problématiques associées au suivi du devenir de NPOFs dans un milieu biologique complexe. Puis nous présenterons la stratégie envisagée pour ce suivi, à savoir l'enrichissement isotopique des NPOFs avec un isotope stable du fer, le  $^{57}\text{Fe}$ , et le marquage de l'enrobage des NPOFs avec des lanthanides.

Le troisième chapitre se focalise sur l'évaluation de la méthode analytique d'enrichissement isotopique du cœur magnétique, présentée dans le chapitre 2, dans des matrices biologiques complexes et à travers une étude *in vivo* pilote.

Enfin, le dernier chapitre de cette thèse présente le suivi du devenir de NPOFs et de leur enrobage *in vivo* sur une période de six mois. Grâce à un double suivi élémentaire et magnétique, nous avons pu caractériser les dynamiques temporelles et spatiales de circulation des NPOFs, de leurs produits de dégradation et de leur enrobage.



# Introduction

---

## Table des matières

---

- 1. Intérêt des nanoparticules d'oxydes de fer**
  - 1.1 Propriétés magnétiques des NPOFs
  - 1.2 Applications des NPOFs
- 2. Cycle de vie des nanoparticules**
  - 2.1 Echelle tissulaire
  - 2.2 Echelle cellulaire
- 3. Nano-toxicologie des NPOFs**
  - 3.1 Cytotoxicité : échelle cellulaire
  - 3.2 Nano-toxicité : études *in vivo*
- 4. Comment détecter les NPOFs *in vivo* ?**
  - 4.1 L'imagerie par résonance magnétique
  - 4.2 La résonance ferromagnétique
  - 4.3 L'approche multi-échelle
- 5. Devenir des NPOFs**
  - 5.1 Etudes *in vivo*
  - 5.2 Modélisation de la dégradation



# 1. Intérêt des nanoparticules d'oxydes de fer (NPOFs)

Les oxydes de fer,  $Fe_xO_y$ , sont des composés constitués de fer à l'état d'oxydation (II) et (III) et d'oxygène. Ce terme regroupe également les hydroxydes de fer,  $Fe_x(OH)_y$  et les oxyhydroxydes de fer  $Fe_xO_y(OH)_z$ . Il existe au total seize oxyde de fer, recensés dans le Tableau 1.<sup>14,15</sup>

Oxydes	Hydroxydes	Oxyhydroxydes
Hématite : $\alpha$ - $Fe_2O_3$ Magnétite : $Fe_3O_4$ Maghémite : $\gamma$ - $Fe_2O_3$ $\beta$ - $Fe_2O_3$ $\delta$ - $Fe_2O_3$ $\epsilon$ - $Fe_2O_3$ Wüstite : $FeO$	« White rust » : $Fe(OH)_2$ Bernalite : $Fe(OH)_3$	Goethite : $\alpha$ - $FeOOH$ Lepidocrocite : $\gamma$ - $FeOOH$ Akaganéite : $\beta$ - $FeOOH$ Schwertmannite $Fe_{16}O_{16}(OH)_y(SO_4)_z \cdot nH_2O$ Feroxyhyte : $\delta$ - $FeOOH$ Ferrihydrite : $5Fe_2O_3 \cdot 9H_2O$ Fougèrite – « Green Rusts » : $[Fe^{2+}_4Fe^{3+}_2(OH)_{12}][CO_3] \cdot 2H_2O$

Tableau 1 : Liste des oxydes de fer<sup>14,15</sup>

Selon leur composition, les oxydes de fer sont aujourd'hui utilisés dans des domaines variés allant de la sidérurgie à l'art en passant par la médecine. Dans le cadre de la nanomédecine, les oxydes de fer les plus utilisés sont la magnétite  $Fe_3O_4$  et la maghémite  $\gamma$ - $Fe_2O_3$  de taille nanométrique.<sup>16,17</sup> Ainsi, dans la suite de ce manuscrit, nous nous limiterons à la description de nanoparticules d'oxyde de fer de maghémite et de magnétite (NPOFs).

Grâce à leurs propriétés physiques singulières les nanoparticules inorganiques suscitent un intérêt croissant dans le domaine de la nanomédecine. Contrairement à la majorité des nanoparticules inorganiques, les nanoparticules d'oxydes de fer (NPOFs) sont considérées comme biocompatibles, biodégradables, non-toxiques et déjà testées en clinique.<sup>18</sup> Les NPOFs testées en cliniques le sont majoritairement pour traiter les carences en fer, ou pour l'imagerie médicale. A ce titre, nous pouvons mentionner les NPOFs Ferumoxytol ont été approuvées par la FDA en 2009 pour traiter les carences en fer, et les NPOFs Ferumoxtran font l'objet de plusieurs essais cliniques en tant qu'agent de contraste pour l'IRM. Grâce à leurs propriétés magnétiques, les NPOFs se comportent comme des nano-aimants et peuvent combiner à la fois des fonctions thérapeutiques et diagnostiques. Un des intérêts majeurs est qu'elles peuvent être stimulées à distance par un champ magnétique extérieur. Pour toutes ces raisons, un effort conséquent de recherche porte sur l'exploitation de leurs propriétés magnétiques pour des applications biomédicales (précliniques et cliniques). Avant de dresser un aperçu des nombreuses utilisations des NPOFs en nanomédecine, revenons en premier lieu sur leurs propriétés magnétiques.

## 1.1 Propriétés magnétiques des NPOFs

Les oxydes de fer sont constitués d'un ensemble de moments magnétiques atomiques  $\vec{\mu}_{at}$  résultant de la combinaison du moment cinétique orbitale et du moment cinétique de spin de l'ensemble des électrons de chaque atome de fer. L'aimantation macroscopique  $\vec{M}$  du matériau est la somme de l'ensemble des moments magnétiques telle que  $\vec{M} = \sum_i \vec{\mu}_i$ . On définit également la susceptibilité magnétique  $\chi$  comme la capacité d'un matériau à s'aimanter sous l'action d'un champ magnétique extérieur  $\vec{H}$  tel que  $\vec{M} = \chi \vec{H}$ . Selon l'interaction entre les différents moments magnétiques, on distingue deux comportements magnétiques, le magnétisme non-coopératif et le magnétisme coopératif. Dans le premier cas, les interactions entre les moments magnétiques sont faibles voire nulles. Ainsi, leur aimantation est nulle en l'absence de champ magnétique extérieur, c'est le cas des composés paramagnétiques. Soumis à un champ magnétique extérieur, les moments magnétiques s'alignent dans le sens du champ conférant une aimantation non nulle au matériau (Figure 1.1).

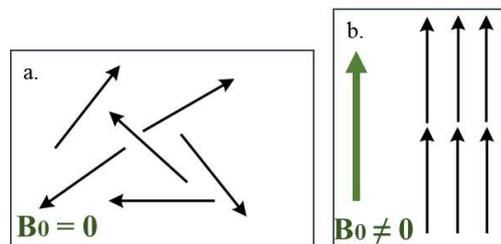


Figure 1.1 : Comportement paramagnétique en l'absence de champ magnétique extérieur (a) et soumis à un champ magnétique extérieur  $B_0$  (b).

Les matériaux paramagnétiques sont caractérisés par une susceptibilité magnétique comprise entre 0 et 0,1.

Dans le second cas, la forte interaction entre les moments magnétiques au sein du matériau tend à développer un ordre magnétique à longue distance, pouvant conduire à une aimantation spontanée en l'absence de champ magnétique extérieur. C'est le cas des matériaux ferromagnétiques et ferrimagnétiques. Plusieurs interactions sont à l'origine du comportement magnétique coopératif d'un matériau :

- L'interaction d'échange correspondant au couplage électronique entre deux spins voisins. Cette interaction à courte portée est responsable de l'alignement des différents moments magnétiques entre eux. L'énergie de cette interaction est telle que :

$$\varepsilon = -J_{ij} \cdot \vec{S}_i \cdot \vec{S}_j$$

avec  $J_{ij}$  la constante de couplage, et  $\vec{S}_i \cdot \vec{S}_j$  le produit scalaire des moments cinétiques de spin des atomes  $i$  et  $j$ . Selon le signe de la constante de couplage, les moments magnétiques sont

orientés parallèlement (phase ferromagnétique (Figure 1.2a)) ou antiparallèlement (phase antiferromagnétique (Figure 1.2b.) ou ferrimagnétique (Figure 1.2c.)).

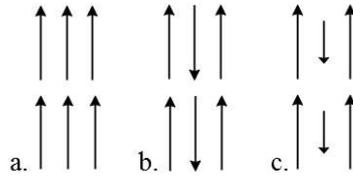


Figure 1.2: Alignement ferromagnétique (a), antiferromagnétique (b) et ferrimagnétique (c) des moments magnétiques au sein d'un matériau.

On observe que pour les matériaux antiferromagnétiques, les moments magnétiques sont antiparallèles et d'amplitude identique, ainsi l'aimantation résultante est nulle, contrairement aux composés ferromagnétiques et ferrimagnétiques.

- L'interaction magnétostatique qui correspond au couplage dipolaire entre les différents moments magnétiques.
- L'anisotropie magnéto-cristalline qui résulte du couplage entre les moments magnétiques et le champ cristallin et qui contraint les moments magnétiques à s'orienter selon un ou plusieurs axes cristallins, dits axes de facile aimantation.

L'optimisation de l'énergie résultante de ces différentes interactions est à l'origine de la création de domaines, appelés domaines de Weiss séparés par des parois : les parois de Bloch. Au sein de chaque domaine, les spins sont tous alignés sous l'effet de l'interaction d'échange, leur direction étant déterminée par l'anisotropie magnéto-cristalline (axe de facile aimantation) et par des interactions dipolaires avec les domaines voisins. En l'absence de champ, les moments magnétiques résultant dans chaque domaine peuvent être orientés aléatoirement, l'aimantation du matériau est alors nulle. Sous l'action d'un champ magnétique externe, les moments magnétiques s'alignent dans la direction du champ magnétique extérieur jusqu'à ce que l'aimantation du matériau atteigne une valeur maximale appelée aimantation à saturation notée  $M_s$ . Dans le cas des matériaux ferromagnétiques et ferrimagnétiques, une aimantation subsiste suite à l'arrêt du champ magnétique extérieur, appelée aimantation rémanente et notée  $M_r$ . On appelle le champ coercitif  $H_c$  le champ nécessaire à appliquer pour annuler la valeur de l'aimantation. Ces composés sont caractérisés par un cycle d'hystérésis présenté ci-dessous :

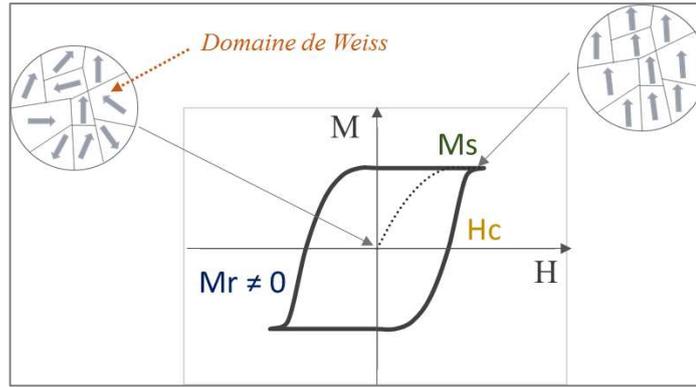


Figure 1.3 : Cycle d'hystérésis des composés ferromagnétiques et ferrimagnétiques. Sans champ magnétique extérieur les moments magnétiques au sein des domaines de Weiss sont distribués aléatoirement. Suite à l'application d'un champ magnétique externe H, les moments magnétiques s'alignent, conférant au matériau une aimantation M, jusqu'à atteindre une aimantation à saturation Ms. Suite à l'arrêt du champ H, une aimantation rémanente Mr persiste. L'application d'un champ coercitif Hc permet d'annuler cette dernière.

En dessous d'une certaine taille, de l'ordre de la taille du domaine magnétique, l'énergie nécessaire à la création des parois de Bloch devient trop coûteuse comparativement au gain énergétique obtenu par la division en domaines de Weiss. Ainsi, la création d'un seul domaine est favorable, les particules sont alors appelées monodomaines. Il est possible de définir un diamètre critique Dc correspondant à la transition d'un régime multi-domaines vers un régime monodomaine, et calculé pour des nanoparticules sphériques tel que :<sup>19</sup>

$$D_c = \frac{18\sqrt{AK_{\text{eff}}}}{\mu_0 M_s^2} \quad (\text{Eq.1.1})$$

Avec A la constante d'échange ( $\text{J}\cdot\text{m}^{-1}$ ),  $K_{\text{eff}}$  la constante d'anisotropie ( $\text{kJ}\cdot\text{m}^{-3}$ ),  $\mu_0$  la perméabilité du vide ( $\text{kg}\cdot\text{m}\cdot\text{A}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ ) et  $M_s$  l'aimantation à saturation du matériau considéré ( $\text{A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

En diminuant encore la taille des particules, l'énergie d'anisotropie, proportionnelle au volume de la particule, devient de l'ordre de l'énergie thermique à température ambiante. Ainsi au-dessus d'une certaine température, appelée température de blocage  $T_b$ , les moments magnétiques passent d'une orientation de facile aimantation à une autre de manière spontanée pendant le temps de l'expérience. Ce comportement, observé pour des particules monodomaines ferro ou ferrimagnétiques est le superparamagnétisme. La taille en dessous de laquelle on observe une transition vers un régime superparamagnétiques dans une mesure d'aimantation statique est définie par :<sup>20</sup>

$$r_0 = \left( \frac{6k_B T_b}{K} \right)^{1/3} \quad (\text{Eq.1.2})$$

Avec  $k_B$  la constante de Boltzmann ( $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}$ ),  $T_b$  la température de blocage (T) et  $K_{\text{eff}}$  la constante d'anisotropie ( $\text{kJ}\cdot\text{m}^{-3}$ ).

Louis Néel découvrit ce comportement au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle et introduisit le temps moyen nécessaire pour permettre l'inversion de l'aimantation. Ce temps est appelé temps de relaxation de Néel  $\tau_N$  tel que :

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{K_{\text{eff}}V}{K_B T}} \quad (\text{Eq.1.3})$$

Avec  $\tau_0$  le temps de relaxation limite (de l'ordre de  $10^{-9}$  secondes),  $K_{\text{eff}}$  la constante d'anisotropie,  $V$  le volume de la nanoparticule,  $K_B$  la constante de Boltzmann et  $T$  la température.

En dessous de la température de blocage, le temps de relaxation  $\tau_N$  devient long devant le temps de l'expérience ( $\tau_N > \tau_m$ ) alors le renversement de l'aimantation n'est plus observé et le moment magnétique de la particule apparaît bloqué selon un axe de facile aimantation (Figure 1.4).

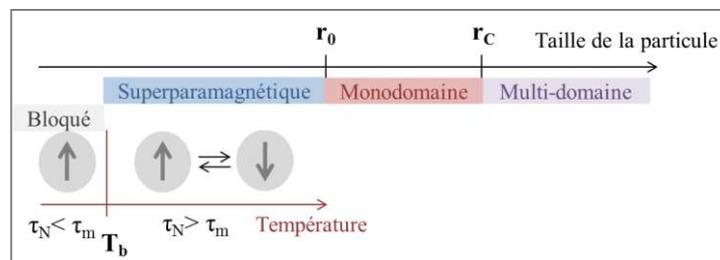


Figure 1.4 : Comportement magnétique d'une particule en fonction de la taille et de la température. La transition d'un régime multi-domaine vers un régime monodomaine est observée pour une taille critique  $r_c$  et vers un régime superparamagnétique à  $r_0$ . Le comportement superparamagnétique est observé pour une température supérieure à  $T_b$  pour laquelle le temps de relaxation de Néel  $\tau_N$  est bien inférieur au temps de la mesure  $\tau_m$ .

La taille en dessous de laquelle la transition superparamagnétique devient observable dépend de la composition des NPOFs et de son énergie d'anisotropie. A titre d'exemple, pour la maghémite  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ , le rayon  $r_0$  pour lequel la transition est observée, est égal à 17,5 nm et égal à 12,2 nm pour la magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ <sup>21</sup>. Les propriétés magnétiques des NPOFs dépendent également de la taille et de la forme de ces dernières (Tableau 2).<sup>20,22</sup> Les nanoparticules de ferrites de cobalt, qui ont une forte anisotropie en comparaison à la maghémite seront ferromagnétiques à température ambiante pour des tailles comparables.

	Taille (nm)	Ms (emu/g)	Tb (K)
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>			
sphère	6,6	71	203
sphère	17,8	83	>300
sphère	8,5	31	100
Cube	8	40	60
<b>γFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>			
sphère	14,5	75	235
Cube	12	75	190
<b>CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	2,8	109	51
	6,7	78	126
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	9,3	57,1	397,7
	59,5	35,2	96,6

Tableau 2 : Influence de la taille, de la forme et de la composition sur les propriétés magnétiques des NPOFs.

L'efficacité des NPOFs en tant qu'agent de contraste est également directement liée à l'aimantation à saturation. Pour des NPOFs de magnétite, l'aimantation à saturation est de 71 emu/g et de 83 emu/g pour des NPOFs de 6,6 nm et 17,8 nm respectivement. Il semblerait donc que les NPOFs de magnétite d'une taille de 17,8 nm, et ne présentant donc pas de comportement superparamagnétique, soient plus efficace en IRM. Or les NPOFs superparamagnétiques possèdent l'avantage de ne pas présenter d'aimantation rémanente ce qui évite l'agrégation des nanoparticules en suspension due aux interactions magnétiques entre celles-ci et sont donc les NPOFs les plus utilisées dans le cadre de la nanomédecine. Ainsi, un compromis entre ces différents paramètres permet d'optimiser l'efficacité des NPOFs pour une application donnée.

## 1.2 Applications des NPOFs

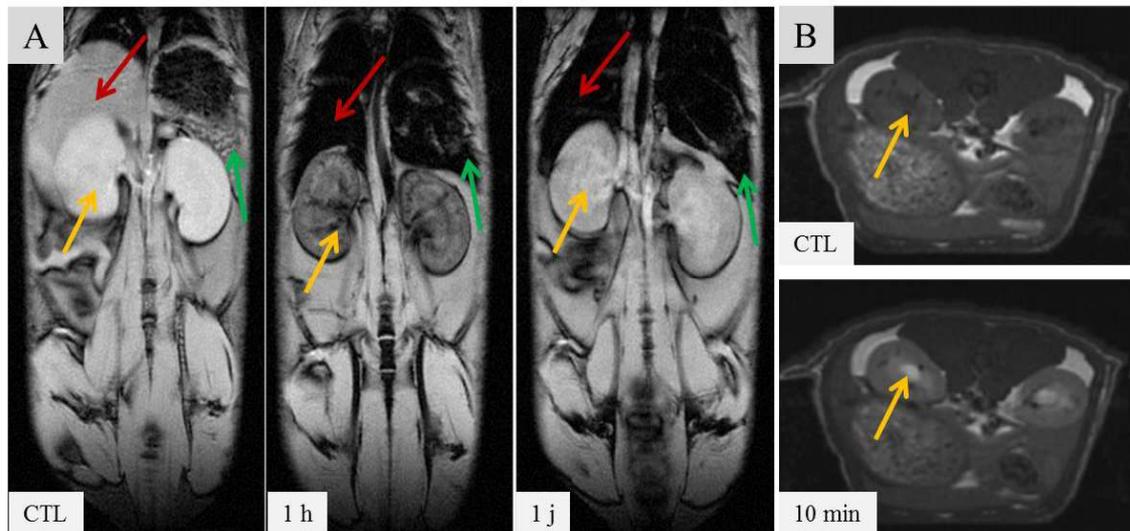
Les NPOFs sont majoritairement exploitées pour diverses applications biomédicales que l'on peut classer en trois catégories décrites ci-dessous : l'augmentation de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'augmentation de chaleur par hyperthermie magnétique et la manipulation magnétique.

### 1.2.1 Agents de contraste

Les NPOFs sont des agents de contraste pour l'IRM (voir section 4), c'est-à-dire qu'elles permettent d'augmenter la sensibilité de l'IRM en modifiant le contraste dans les zones où elles s'accumulent. Les agents de contraste sont dits négatifs lorsqu'ils assombrissent la zone dans laquelle ils s'accumulent à l'inverse des agents de contrastes positif qui l'éclaircissent (Figure 1.5).

En effet, grâce à leurs propriétés magnétiques, elles modifient les temps de relaxation des protons contenus dans l'organisme et permettent i) d'augmenter le contraste des images IRM facilitant ainsi la

distinction des différents tissus et ii) le suivi de leur biodistribution *in vivo* (voir section 5). Les NPOFs agissent sur les temps de relaxation transversaux ( $T_2$ ) et longitudinaux ( $T_1$ ) des protons et sont définies comme agents de contraste négatif (Figure 1.5 (A) et positif (Figure 1.5 (B), respectivement.



**Figure 1.5 :** Image IRM en écho de gradient pondérée  $T_2^*$  ( $T_R/T_E = 300/10$  ms) d'une souris avant injection de NPOFs de 10 nm, une heure et un jour après injection de NPOFs (A). On observe un contraste rémanent dans le foie et la rate (flèches rouge et verte respectivement) et un contraste transitoire dans les reins (flèche jaune). Image IRM pondérée en  $T_1$  des reins avant et 10 minutes après injection intraveineuse de NPOFs de 3,8 nm (B). On observe l'éclaircissement des reins (flèches jaune). Image extraite de [23].

On observe sur la figure Figure 1.5 (A) ci-dessus, l'assombrissement du foie (flèche rouge), des reins (flèche jaune) et de la rate (flèche verte) une heure et un jour après injection de NPOFs de 10 nm, par voie intraveineuse. Bien que les NPOFs sont majoritairement utilisées en tant qu'agent de contraste négatif, celles-ci possèdent également des propriétés d'agent de contraste positif. En effet, d'après la Figure 1.5 (B), on constate un éclaircissement des reins (flèche jaune) dix minutes après injection de NPOFs de 3,8 nm.<sup>23</sup> Ces propriétés sont observées pour des NPOFs de taille inférieure à 5 nm. Aujourd'hui, le défi est de diriger les NPOFs vers des zones d'intérêt (organe, tumeur...) ou de suivre une population particulière de cellules marquées par ces nanoparticules. Ainsi, un nombre croissant de travaux de recherche porte sur l'enrobage (*coating*) des nanoparticules afin de modifier ou d'augmenter considérablement leur sélectivité pour un tissu donné. Par exemple, dans un modèle murin de tumeur neuroectodermique (tissus à l'origine de la formation et du développement du système nerveux), l'injection intraveineuse de NPOFs fonctionnalisées avec de la chlorotoxine (une neurotoxine connue pour avoir une affinité spécifique pour les tumeurs cérébrales) a permis d'observer une modification de la relaxivité dans la tumeur après injection des NPOFs fonctionnalisées (NP-PEG-CTX), signe de leur accumulation significativement augmentée dans la tumeur comparativement à des NPOFs non fonctionnalisées (NP-PEG-SIA) (Figure 1.6).<sup>24</sup>

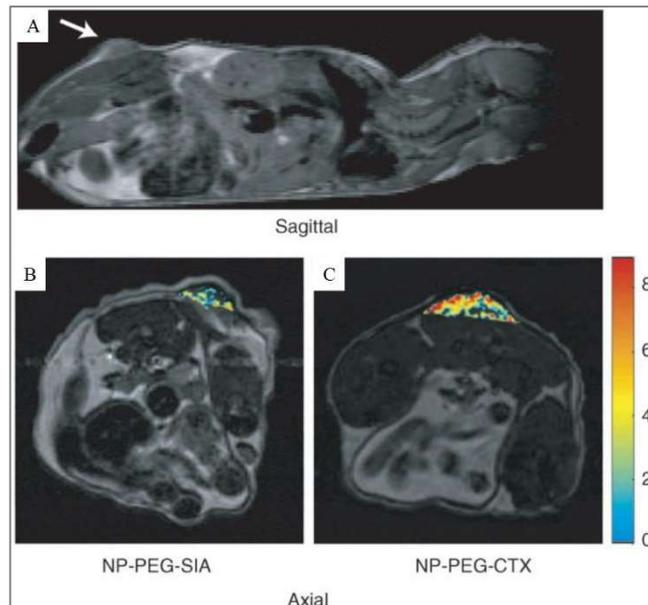


Figure 1.6 : Image IRM d'une souris ayant subi une greffe de tumeur neuroectodermique (flèche blanche) avant injection de NPOFs (A), image IRM de la tumeur après injection de NP-PEG-SIA (B) et après injection de NP-PEG-CTX (C). L'échelle de couleur représente la modification de la relaxivité  $r_2$  observée dans les tissus. Extrait de [24].

A terme, l'objectif est d'associer un type d'enrobage à une cible (organe, tissu, tumeur) pour l'utilisation clinique. En 1996, les nanoparticules Feridex I.V. (connues aussi sous le nom d'Endorem) et Lumirem obtinrent l'autorisation d'utilisation en clinique par la FDA en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie des lésions hépatiques (arrêtée en 2008) et des intestins (arrêtée en 2012), respectivement. Aujourd'hui la majorité des autorisations d'utilisation des NPOFs en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie IRM ont été suspendues, à l'exception des NPOFs Ferumoxtran, qui ne sont disponibles qu'en Hollande. Notons toutefois que de nombreux essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer de nouveaux produits incluant des NPOFs comme agent de contraste dans le cas d'indications variées<sup>25,26</sup>.

Dans le cadre de la médecine régénérative, l'utilisation de cellules marquées avec des NPOFs permet également de détecter et de suivre par IRM les cellules implantées<sup>27,28</sup>.

### 1.2.2 Hyperthermie magnétique

L'hyperthermie correspond à une élévation locale ou générale de la température d'un corps. Lorsque les nanoparticules sont soumises à un champs magnétique oscillant à haute fréquence (plusieurs centaines de kilohertz),<sup>29</sup> elles s'échauffent et permettent ainsi une augmentation locale de la température, c'est le phénomène d'hyperthermie magnétique. Dans le cas de nanoparticules superparamagnétiques, le transfert d'énergie magnétique en énergie thermique est principalement dû aux phénomènes de relaxation brownienne et de Néel.<sup>22,29</sup> Les processus physiques gouvernant la capacité de chauffage des nanoparticules magnétiques ainsi que les paramètres influençant cette dernière

ont été décrit par mes prédécesseurs Jean-Paul Fortin Ripoché et Mickaël Levy dans leurs manuscrits de thèse.\* L'utilisation de nanoparticules magnétiques pour l'hyperthermie permet ainsi de créer une source de chaleur interne contrôlée par un stimulus extérieur. Dans le cadre de la nanomédecine, l'hyperthermie magnétique est majoritairement étudiée comme thérapie pour le traitement des tumeurs ou pour le relargage contrôlé de médicaments.

### **1.2.2.1 Traitement des tumeurs**

Selon la valeur de la température locale atteinte après hyperthermie magnétique, on distingue, en clinique, deux traitements différents : l'hyperthermie et la thermoablation. Dans le cas de l'hyperthermie, la température atteinte dans les régions cibles ne dépasse pas 43°C. Les cellules ainsi chauffées entrent en apoptose, mécanisme de mort cellulaire programmée, entraînant l'autodestruction de la cellule ainsi que son élimination par phagocytose. Combinée avec d'autres thérapies telles que la chimiothérapie ou la radiothérapie, l'hyperthermie permet de fragiliser les cellules tumorales ou de moduler le microenvironnement tumoral<sup>30</sup> et augmenter ainsi l'efficacité des thérapies citées ci-dessus.<sup>31,32</sup> La thermoablation quant à elle nécessite une élévation de température supérieure à 47°C (et pouvant atteindre environ 56°C).<sup>33</sup> Les cellules entrent alors en nécrose, mort cellulaire prématurée, provoquant une réponse inflammatoire. Pour ces deux traitements, les NPOFs sont administrées par voie intraveineuse (pour les nanoparticules ayant un revêtement spécifique de la région cible) ou directement par voie intra-tumorale. Les avantages de l'utilisation de l'hyperthermie induite magnétiquement grâce aux NPOFs sont d'une part un meilleur ciblage des zones à traiter et d'autre part d'éviter une intervention chirurgicale risquée, en particulier dans le cas de tumeurs au cerveau ou de permettre une réduction de la masse tumorale avant l'ablation chirurgicale. La thérapie *Nano Therm* développée par l'entreprise allemande *Magforce* créée en 1997, est la première à utiliser l'hyperthermie magnétique comme thérapie des tumeurs solides chez l'homme. Elle consiste à injecter des NPOFs superparamagnétiques directement dans des glioblastomes (tumeur cérébrale maligne agressive), qui soumises à un champ magnétique généré par leur appareil *NanoActivator* induisent une élévation de la température au sein de la tumeur.<sup>34</sup> Seule ou combinée à d'autres traitements (radiothérapies ou chimiothérapies), la thérapie *NanoTherm* montre des résultats encourageant et a reçu une autorisation de mise sur le marché en 2011, délivrée par l'Union Européenne. Cette dernière est également testée sur des tumeurs de patients atteints de cancers de la prostate (essai sur 29 patients), de l'œsophage (essais sur 10 patients) et du pancréas (7 patients).<sup>35</sup> Nous pouvons également citer le projet NoCanTher, projet développé dans le cadre du programme européen Horizon 2020, dans lequel notre équipe est partenaire. Des nanoparticules d'oxyde de fer sont développées afin de combiner un traitement par hyperthermie magnétique à une chimiothérapie pour des tumeurs du pancréas localisées.<sup>36</sup> L'objectif est de mettre sur le marché les

---

\*Utilisation biomédicale des nanoparticules magnétiques : application à la vectorisation et à l'hyperthermie, Jean-Paul Fortin, septembre 2007. Nanostructure magnétique pour le diagnostic et la thérapie : hyperthermie, relaxation magnétique et devenir dans l'organisme, Mickaël Lévy, mars 2011.

nanoparticules comme dispositif médical, associé à un générateur portable de champ magnétique alternatif permettant de faire chauffer les nanoparticules et adapté à l'abdomen humain. Ce projet auquel je participe actuellement, mettra également en place, en plus des tests précliniques sur les animaux, un essai clinique sur des patients atteints de cancer du pancréas non métastaté.

#### **1.2.2.2 Relargage contrôlé de médicaments**

Lorsque des NPOFs sont encapsulées dans une matrice thermosensible, elles permettent après activation par un champ magnétique extérieur, une élévation locale de la température qui conduit à la modification des propriétés physiques de la matrice.<sup>37</sup> Sandrine Brulé et ses collaborateurs ont ainsi proposé la synthèse de microbilles d'alginate dans lesquelles étaient encapsulées des NPOFs ainsi que de la doxorubicine (médicament anticancéreux).<sup>38</sup> Lorsque ces billes sont soumises à un champ magnétique extérieur, leur température augmente entraînant ainsi la modification de la matrice en alginate et le relargage de la doxorubicine. De tels systèmes permettent d'envisager le contrôle temporel et spatial du relargage de principe actif dans l'organisme et d'augmenter ainsi le ciblage et *a fortiori* l'efficacité des traitements.

L'ensemble des possibilités qu'offre l'hyperthermie magnétique fait actuellement l'objet de nombreuses recherches. Récemment, des études ont montré la possibilité de contrôler l'activité cellulaire par hyperthermie magnétique. En couplant des nanoparticules magnétiques à des canaux thermosensibles *via* des anticorps spécifiques, il est possible de contrôler le flux entrant et sortant de certains éléments endogènes tels que le calcium. Ces études ont pu démontrer la possibilité d'activer des neurones<sup>39</sup> ou encore de contrôler la production de certaines protéines telles que l'insuline<sup>40</sup> par hyperthermie magnétique.

### **1.2.3 Manipulation magnétique**

Un autre atout des nanoparticules magnétiques largement exploité dans de nombreuses applications est la possibilité de les manipuler spatialement grâce à leurs propriétés magnétiques. Nous illustrerons cette caractéristique à travers trois exemples que sont la vectorisation magnétique, la dépollution et l'ingénierie tissulaire.

#### **1.2.3.1 Vectorisation magnétique**

Grâce à leur taille nanométrique, les nanoparticules présentent un rapport surface sur volume important et ainsi une haute surface spécifique. Il est possible de coupler des principes actifs aux nanoparticules, soit en surface par des méthodes de greffages soit à l'intérieur par encapsulation (méthode rencontrée majoritairement dans le cas de nanoparticules polymériques). Cette stratégie dite de vectorisation permettrait de contrôler la biodistribution des principes actifs grâce au revêtement spécifique des nanoparticules et/ou de les protéger dans le cas de l'encapsulation. Grâce à leurs

propriétés magnétiques, les NPOFs possèdent l'avantage de pouvoir être guidées magnétiquement à l'aide d'un champ magnétique extérieur et ainsi augmenter le ciblage et l'efficacité des traitements.<sup>41,42</sup>

### **1.2.3.2 Dépollution du sang**

Les NPOFs sont des candidates intéressantes pour la détoxification des fluides corporels comme le sang. Enrobées d'un revêtement spécifique aux entités toxiques, les NPOFs interagissent avec ces dernières et peuvent être retirées des fluides intoxiqués au moyen d'un aimant permanent. Inge K. Herrmann et ses collaborateurs ont utilisé cette stratégie chez une souris intoxiquée au plomb et à la digoxine (médicament traitant différentes pathologies cardiaques dont la dose thérapeutique est très proche de la dose toxique).<sup>43</sup> Les NPOFs utilisées ont été fonctionnalisées avec un ligand affiné du plomb ou avec un anticorps ciblant la digoxine. Ces nanoparticules sont mises en contact avec le sang et récupérées à l'aide d'un aimant permanent. L'analyse des résultats montre une diminution considérable de la quantité de plomb et de digoxine présentes dans le sang. L'inconvénient de cette méthode est que les nanoparticules sont injectées dans le sang *ex vivo* afin de pouvoir les récupérer avec un aimant, et nécessite la mise en place d'un système de dialyse.

### **1.2.3.3 Médecine régénérative**

La médecine régénérative a pour objectif de remplacer ou réparer des tissus endommagés. Un des principaux défis de cette dernière est d'assembler des cellules en 3D afin de créer un tissu cellulaire. Une stratégie en plein essor est d'internaliser des NPOFs dans des cellules pour les rendre magnétiques afin de former des agrégats à l'aide d'un champ magnétique extérieur.<sup>44 45</sup> Grâce à cette technique il est possible de contrôler la différenciation de cellules souches, de former des tissus et de contrôler leur forme ainsi que leur taille.

L'utilisation de NPOFs pour les différentes applications décrites ci-dessus nécessite une maîtrise parfaite de la synthèse de ces nanomatériaux. En effet, leurs performances dépendent fortement de nombreux paramètres tels que leur taille, leur forme ou leur revêtement. A titre d'exemple, des NPOFs sphériques de 12 nm sont plus efficaces en tant qu'agent de contraste pour l'IRM que des NPOFs sphériques de 4 nm<sup>46</sup> et des nanoparticules cubiques auront une capacité de chauffage plus importante en hyperthermie magnétique que leurs analogues sphériques.<sup>47</sup> Il existe aujourd'hui tout un éventail de voies de synthèse bien décrites (co-précipitation, décomposition thermique, polyol...) permettant de contrôler les paramètres qui influencent les performances des NPOFs.<sup>48</sup>

Les propriétés remarquables des NPOFs ainsi que le contrôle rigoureux de leur synthèse permettent de confectionner des objets performants pour la nanomédecine. Les NPOFs sont désormais des candidats très intéressants dans le cadre de la stratégie dite *théranostique*, évoquée plus haut, consistant à développer des agents polyvalents combinant thérapie et diagnostic.<sup>49</sup>

L'explosion récente des études consacrées aux NPOFs pour des applications biomédicales pose la question de leurs effets sur l'organisme. Constituées essentiellement de fer, qui est un élément endogène et donc bien toléré et métabolisé par l'organisme, les NPOFs ont longtemps été considérées comme biocompatibles (n'interférant pas avec le milieu biologique). Cependant leur taille nanométrique leur permet de circuler au sein de l'organisme et ce jusqu'aux entités cellulaires et les rendent d'autant plus réactives à leur environnement. Pour ces raisons, les études de toxicités sont devenues systématiques dans le cadre du développement de NPOFs pour des applications biomédicales.

## 2. Cycle de vie des nanoparticules

---

La diversité des protocoles de synthèse permet de moduler efficacement les propriétés des NPOFs selon l'application biomédicale. Cependant, s'il est possible de maîtriser leurs caractéristiques post-synthèse, il est plus difficile de prédire leur comportement dans un environnement biologique complexe. En effet, après injection intraveineuse les nanoparticules interagissent instantanément avec les substances endogènes, ce qui change drastiquement leurs caractéristiques intrinsèques (enrobage, charge, stabilité...) et *in fine* leur efficacité. Dans le cadre de la nanomédecine, l'étude du cycle de vie des nanoparticules dans l'organisme permet d'optimiser leur efficacité et leur ciblage et également d'appréhender leur toxicité.

### 2.1 Echelle tissulaire

Les nanoparticules peuvent être introduites dans l'organisme par plusieurs voies (inhalation, ingestion, passage percutané), cependant dans le contexte de leur utilisation pour des applications biomédicales, la voie parentérale est privilégiée et en particulier les voies intraveineuses et intratumorale.<sup>50</sup> Par la suite, nous nous limiterons ainsi à l'étude du comportement des nanoparticules *in vivo* injectées par voie intraveineuse.

Une fois dans le sang, les nanoparticules vont interagir avec les protéines endogènes, formant à leur surface une couronne de protéines.<sup>51 52 53</sup> La nature de ces interactions dépend des paramètres intrinsèques des nanoparticules (taille, forme, composition, charge, enrobage) et également de l'environnement dans lequel ces dernières évoluent (pH, nature et concentration des protéines).<sup>54</sup> Cette couronne protéique change les caractéristiques post-synthétiques des nanoparticules et influence également sur leur biodistribution. A cet égard, plusieurs auteurs ont introduit la distinction entre identité physique (paramètres physiques et morphologiques des nanoparticules, et en particulier les propriétés magnétiques dans le cas des NPOFs), identité synthétique (paramètres physico-chimiques dus à l'enrobage des nanoparticules) et identité biologique (interactions nanoparticules – protéines).<sup>55 56 52</sup> Selon la nature de la couronne protéique, les nanoparticules sont ensuite dirigées vers différents organes et tumeurs. Il est possible d'établir un lien entre identité synthétique et identité biologique et ainsi moduler la biodistribution des nanoparticules.<sup>57</sup>

L'interaction entre protéines plasmatiques et nanoparticules dépend de plusieurs paramètres tels que la nature chimique de l'enrobage des nanoparticules, leur taille et également leur rayon de courbure.<sup>58</sup> Par exemple, des nanoparticules ayant un enrobage chargé interagissent d'autant plus avec les protéines plasmatiques *via* des interactions électrostatiques locales. La formation d'une couronne de protéines favorise la reconnaissance des nanoparticules comme corps étrangers par le système immunitaire. Les protéines telles que les opsonines (fragments de protéines plasmatiques) induisent la capture des nanoparticules par les macrophages du système réticulo-endothélial. Ces dernières sont alors

éliminées de la circulation sanguine et capturées par les organes responsables de la prise en charge des corps étrangers : le foie et la rate. Une stratégie pour éviter l'opsonisation est de modifier chimiquement la surface des nanoparticules avec un enrobage de charge neutre.<sup>50</sup> Les interactions protéines – nanoparticules sont ainsi diminuées impliquant une durée de vie plasmatique des nanoparticules plus longue. Celles-ci pourront ainsi s'accumuler dans les tumeurs par effet EPR (*enhanced permeability and retention*) qui permet un ciblage passif des tumeurs grâce à la haute vascularisation et le faible drainage des tissus tumoraux.<sup>59</sup> Un candidat avéré pour enrober et augmenter le ciblage passif des nanoparticules vers les tumeurs est le polyéthylène-glycol (PEG).<sup>57,58</sup> Afin d'augmenter les performances de ciblage des nanoparticules, une stratégie dite de ciblage actif consiste à modifier leur enrobage pour favoriser certaines interactions nanoparticules – protéines. A cet égard, des auteurs ont montré que l'enrobage de nanoparticules polymériques avec un copolymère PEG-PHDCA (poly(éthylène glycol)-*co*-polyhexadécylcyanoacrylate) favorisait l'adsorption des alipoprotéines B et E (connues pour faciliter le passage de la barrière hémato-encéphalique)<sup>60</sup>, en surface des nanoparticules.<sup>61</sup>

Au même titre que l'enrobage, la taille des nanoparticules est un paramètre essentiel influant sur la biodistribution de ces dernières. Selon leur taille, les nanoparticules ne seront pas prises en charge par les mêmes organes. En effet, les nanoparticules d'un diamètre de plus de 100 nm seront internalisées et éliminées par le système hépatique, alors que des nanoparticules d'un diamètre inférieur à 10 nm seront éliminées par voie rénale.<sup>62</sup>

## 2.2 Echelle cellulaire

C'est dans les cellules cancéreuses que les propriétés magnétiques des NPOFs sont mises à profit dans le cadre de la thérapie et du diagnostic (sensibilisation/destruction de cellules cancéreuses, délivrance contrôlée de principes actifs par hyperthermie magnétique, suivi des tumeurs par IRM). Au sein des différents tissus, les nanoparticules sont internalisées dans les cellules (cancéreuses, macrophages) par endocytose. L'endocytose désigne deux processus distincts : la pinocytose (particules de taille inférieure à 1  $\mu\text{m}$ ) et la phagocytose (particules de taille comprise entre 100 nm et 10  $\mu\text{m}$ ) (Figure 2.1).<sup>63,64</sup> La phagocytose ne concerne que certains types de cellules appelés phagocytes tels que les macrophages ou les monocytes.

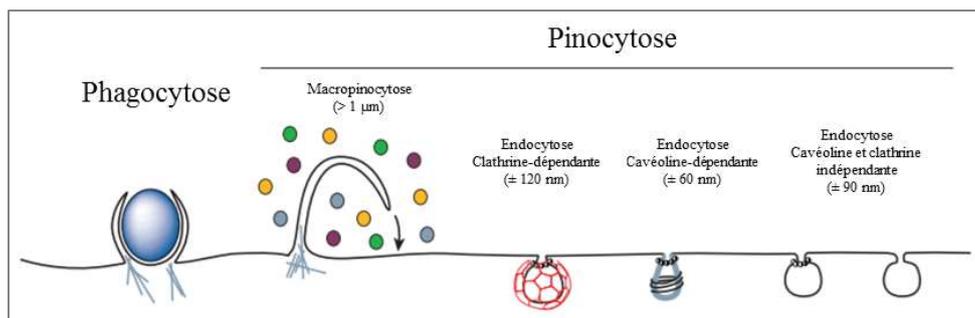


Figure 2.1: Différents processus d'endocytose. Ceux-ci diffèrent selon la nature et la taille des particules à internaliser dans les cellules. Adapté de [61]<sup>64</sup>

On distingue également la pinocytose non spécifique (invagination des nanoparticules à la membrane cellulaire) de la pinocytose spécifique (internalisation induite par interactions entre nanoparticules et récepteurs de la membrane cellulaire). Ainsi le mécanisme d'internalisation de particules dans les cellules dépend de la taille et de l'enrobage de celles-ci. Après endocytose et indépendamment du mécanisme d'internalisation, les nanoparticules sont généralement confinées dans des vésicules intracellulaires qui fusionnent avec les compartiments cellulaires responsables de la prise en charge des éléments exogènes : les endosomes.<sup>62</sup>

Plusieurs études ont montré que la modification de l'enrobage des nanoparticules avec des molécules spécifiques (protéines, anticorps) de récepteurs ou protéines exprimés à la membrane des cellules cancéreuses augmentait de manière efficace le ciblage des nanoparticules vers ces cellules. A cet égard, Kocbek *et al.* ont montré que des nanoparticules polymériques couplées à des anticorps monoclonaux spécifique de la cytokératine (protéine exprimée à la membrane des cellules cancéreuses d'origine épithéliales) ciblaient majoritairement les cellules cancéreuses épithéliales du sein en comparaison avec des cellules cancéreuses intestinales.<sup>65</sup> Le couplage de ligands spécifiques de récepteurs exprimés à la surface des cellules cancéreuses s'avère être également une stratégie efficace pour augmenter la distribution des nanoparticules au sein des cellules cancéreuses.<sup>66</sup>

La Figure 2.2 résume le cycle de vie des nanoparticules administrées par voie intraveineuse.

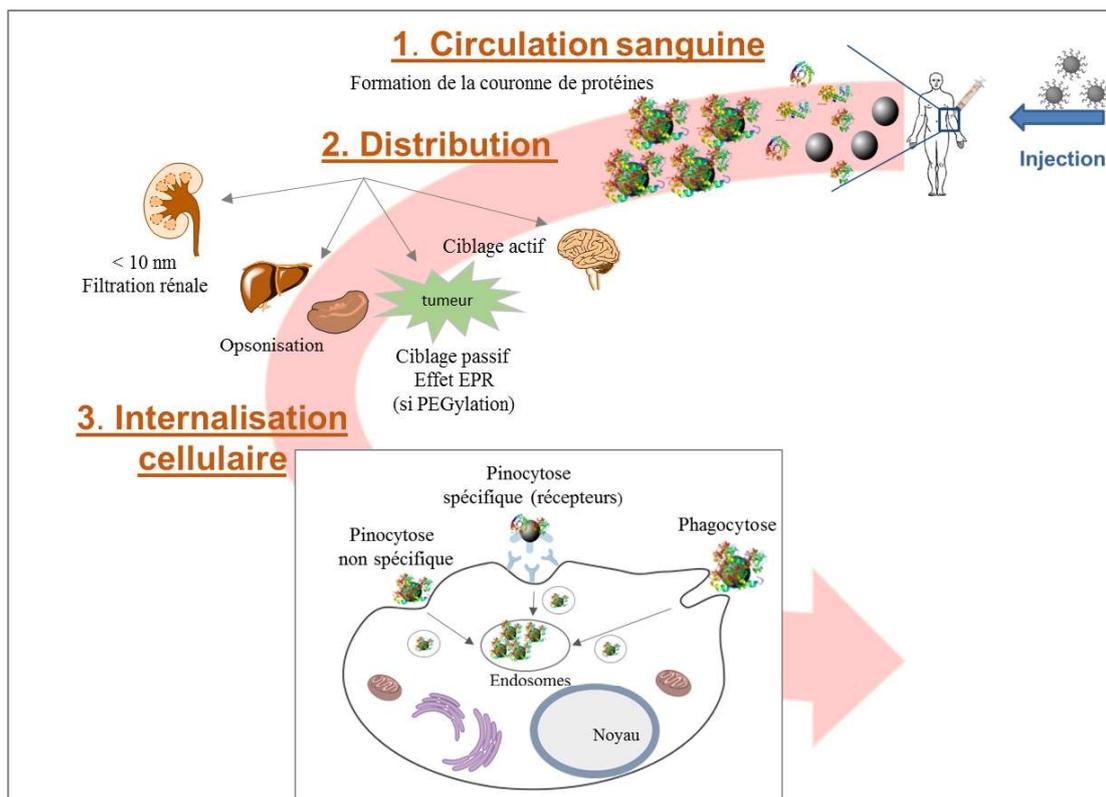


Figure 2.2 : Cycle de vie des nanoparticules dans l'organisme après internalisation par voie intraveineuse.

Suite à l'internalisation des nanoparticules dans les endosomes, trois scénarii peuvent avoir lieu, (i) la fusion des endosomes avec des lysosomes pour former des compartiments endo-lysosomaux, (ii) la libération des nanoparticules dans le cytoplasme (par diffusion ou perméabilisation de la membrane endosomale), celles-ci rentrent ainsi en contact avec les organites intracellulaires tels que les mitochondries, le noyaux, ou le réticulum endoplasmique,<sup>67</sup> (iii) libération des nanoparticules dans le milieu extracellulaire par exocytose.<sup>61,66</sup>

L'identité biologique des nanoparticules détermine ainsi la biodistribution des nanoparticules à l'échelle tissulaire et également la nature des cellules dans lesquelles celles-ci sont internalisées (macrophages, cellules cancéreuses ou, saines). La présence de nanoparticules au cœur des cellules pose la question de leur impact sur l'environnement biologique (interaction avec le noyau, l'ADN, la variation du stress oxydant...), leur métabolisation ainsi que leur devenir à long terme.

Le défi de l'étude de la toxicité des nanoparticules, la nanotoxicologie, est d'établir des liens entre identité synthétique, identité biologique et réponse physiologique de l'organisme.<sup>52</sup> L'objectif à terme étant de prédire et contrôler la toxicité des nanomatériaux à partir de leur identité synthétique.<sup>63,68</sup>

### 3. Nano-toxicologie des NPOFs

---

A la fin des années 1980, plusieurs études avaient déjà démontré l'efficacité de NPOFs de magnétite d'un diamètre de 70 nm (AMI-25), en tant qu'agent de contraste pour l'IRM.<sup>69,70</sup> En 1988, l'équipe de Joseph Ferruci a administré des NPOFs AMI-25 d'un diamètre de 80 nm chez 15 patients atteints de cancers du foie.<sup>71</sup> Les NPOFs sont préférentiellement internalisées dans les tissus sains, riches en macrophage comparativement aux tissus tumoraux. Ainsi le contraste dans les tissus sains augmente, ces dernières apparaissent sombres à l'inverse des tissus tumoraux, ce qui permet leur distinction. Ce n'est qu'en 1989 que Ralph Weissleder publia une étude sur leur pharmacocinétique chez le rat ; les résultats ne montrent aucune toxicité accrue de ces dernières.<sup>72</sup> Les NPOFs furent alors considérées comme biocompatibles, sûres pour des applications cliniques et présentant une toxicité similaire au fer non particulaire.<sup>73</sup>

Au début des années 2000, des études montrèrent qu'après internalisation de nanoparticules au sein de cellules fibroblastiques, une diminution de l'adhésion cellulaire et en conséquence une diminution de la viabilité cellulaire est observée.<sup>74 75</sup> Ces effets toxiques sont attribués à la chimie de surface des nanoparticules qui, selon la nature de celle-ci, influence le mode d'internalisation des nanoparticules. A titre d'exemple, les NPOFs dépourvues d'enrobage polymérique semblent induire une cytotoxicité plus importante, qui se traduit par la modification du cytosquelette, comparativement aux NPOFs enrobées de polymères tels que le PEG. Plusieurs études montrent également que les NPOFs induisent un stress oxydant au sein de la cellule.<sup>76 77</sup> Les espèces réactives de l'oxygène, appelées ERO, sont à l'origine de différents dommages cellulaires (altération de l'ADN, perméabilisation des membranes) et peuvent également induire la mort cellulaire par apoptose ou nécrose.<sup>63</sup> La production d'ERO induite par les nanoparticules dépend de la composition, de la taille et de l'enrobage de ces dernières.<sup>78</sup> En particulier, dans le cas de NPOFs, le fer catalyse la réaction de Fenton (Eq.1), générant des espèces radicalaires très réactives tels que des radicaux hydroxyles selon :



L'étude de la toxicité des nanomatériaux a fait émerger un nouveau domaine de recherche réunissant chimistes, physiciens, toxicologues, biologistes et médecins : la nano-toxicologie.<sup>79 80</sup> La nano-toxicologie consiste à déterminer les différents effets des nanoparticules sur l'organisme en évaluant les réponses physiologiques suite à leur administration. Le nombre de publications concernant l'étude de la nano-toxicologie a explosé passant d'une dizaine en 2007 à plus de 300 en 2016 (chiffres Pubmed, mot clé : nanotoxicology).

Un des principaux défis de celle-ci réside dans le choix d'un modèle d'étude pertinent. A titre d'exemple, des études de nano-toxicité menées sur un modèle animal ne permettront pas de sonder

l'impact des nanoparticules sur les différents processus biologiques à l'échelle cellulaire. A l'inverse, il n'est pas possible d'extrapoler les résultats obtenus sur un modèle cellulaire au modèle animal voire humain.

### 3.1 Cytotoxicité : échelle cellulaire.

L'étude de la cytotoxicité des nanoparticules s'inscrit dans l'évaluation d'une part des risques associés à leur utilisation en médecine régénérative ou en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie, et, d'autre part, de leur efficacité en tant qu'agents thérapeutiques par l'étude de leurs mécanismes d'action au sein de la cellule.

Les études consacrées à l'évaluation de la cytotoxicité ont pu mettre en lumière différents processus survenant après l'internalisation de NPOFs et perturbant l'homéostasie cellulaire. A titre d'exemple, différents auteurs ont observé la modification du cytosquelette ainsi que la perméabilisation des membranes dans des cellules fibroblastiques humaines<sup>81</sup>, la présence de lésions générées par oxydation de l'ADN dans des cellules épithéliales du poumon<sup>82</sup> ou encore l'augmentation de la concentration intracellulaire en ERO au sein de macrophages murins.<sup>83</sup> L'explosion du nombre de publications consacrées à l'étude de la nano-toxicologie des NPOFs a mis en évidence une diversité importante de réponses biologiques suite à l'internalisation de nanoparticules dans les cellules. Plusieurs revues ont recensé ces études, établissant ainsi un panorama des possibles interactions entre la cellule et les nanoparticules.<sup>63,84-89</sup> Les perturbations cellulaires majoritairement rencontrées à travers ces études sont exposées dans la [Figure 3.1](#).

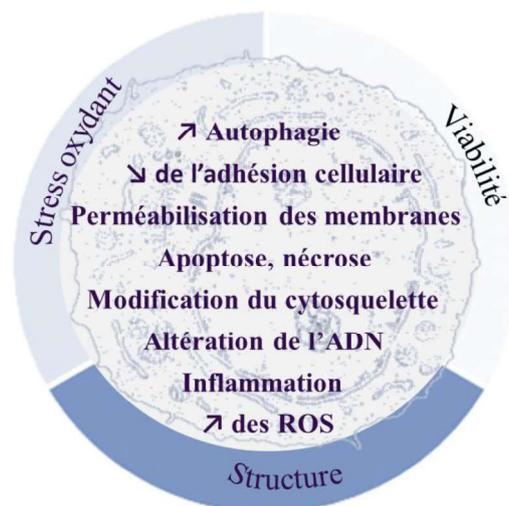


Figure 3.1 : Réponses cellulaires suite à l'internalisation de NPOF dans la cellule

Ces réponses biologiques induisent un stress oxydant intracellulaire et ont une influence directe sur la structure et la viabilité des cellules. Les principaux mécanismes associés à celles-ci sont d'une part la production d'espèces radicalaires *via* la réaction de Fenton catalysée par la présence de fer dans

le milieu intracellulaire<sup>87</sup> et d'autre part la nature du processus d'internalisation des nanoparticules dans les cellules.<sup>74,75</sup>

Ces études ont permis également de mettre en évidence l'influence de plusieurs paramètres sur la cytotoxicité des nanoparticules. On peut les classer en deux catégories :

*Les paramètres associés aux nanoparticules :*

Composition : les NPOFs les plus couramment utilisées pour des applications en nanomédecine sont la maghémite  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  et la magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Plusieurs études visant à comparer les réponses biologiques suite à l'internalisation de ces nanoparticules ont montré une augmentation du taux d'oxydation de l'ADN dans le cas de la magnétite.<sup>82,90</sup> La réaction de Fenton étant catalysée par du fer à l'état d'oxydation (II), on peut expliquer ces observations par la différence de l'état d'oxydation du fer dans la maghémite (fer (III) uniquement, étape de réduction du fer (III) en fer (II) nécessaire pour catalyser la réaction de Fenton) et dans la magnétite (fer (III) et fer (II), catalyse possible après internalisation du fer).

Taille : La réactivité des nanoparticules dans un environnement biologique dépend de la surface accessible par les organites intracellulaires. Ainsi de petites nanoparticules, possédant un rapport surface sur volume élevé, sont plus réactives vis-à-vis de l'environnement biologique et *in fine* plus toxiques.<sup>86,90,91</sup> Soenen *et al.* ont calculé que 500 NPOFs d'un diamètre de 250 nm étaient équivalentes à  $7,82 \cdot 10^6$  nanoparticules d'un diamètre de 10 nm en termes de quantité de fer. En supposant une internalisation de ces nanoparticules équivalente en masse, la surface exposée au milieu biologique serait de  $98 \cdot 10^6 \text{ nm}^2$  pour les plus grosses nanoparticules et de  $2455 \cdot 10^6 \text{ nm}^2$  pour les plus petites.<sup>92</sup> Ainsi, à concentration en fer constante, la probabilité d'induire des effets cytotoxiques augmente avec la diminution de la taille des nanoparticules.

Enrobage : La nature de l'enrobage des nanoparticules détermine les interactions entre protéines et nanoparticules.<sup>54</sup> La couronne de protéines formée en surface impose la charge et la stabilité des nanoparticules dans le milieu biologique,<sup>59,84</sup> et conditionne la quantité de nanoparticules internalisée dans les cellules ainsi que la voie d'internalisation.<sup>74,93</sup> Il a été montré que la présence d'une couronne de protéine autour des NPOFs diminuait la toxicité de ces dernières. A titre d'exemple, la diminution de la viabilité cellulaire induite par des NPOFs enrobées de polyvinylpyrrolidone n'est plus observée lorsque ces dernières sont entourées d'une couronne de protéine, constituant ainsi une couche protectrice autour des NPOFs.<sup>94,95</sup> L'ensemble de ces interactions qui définissent l'identité biologique des nanoparticules modifie la cytotoxicité des nanoparticules.

*Les paramètres associés aux conditions expérimentales*

Type cellulaire : Les réponses physiologiques suite à l'internalisation de nanoparticules sont propres à chaque type cellulaire. A titre d'exemple, Mahmoudi *et al.* ont montré que des cellules

neuronales issues de neuroblastome (tumeur extra-cérébrale) sont plus sensibles à la présence de NPOFs comparativement à des cellules du cœur (cardiomyocytes) et à des cellules embryonnaire rénales. En effet, la viabilité des cellules neuronales chute en dessous de 40 % pour une concentration en fer égale à 9 mM et celle des cellules rénales et cardiaques pour une concentration en fer au-dessus de 36 mM.<sup>96</sup>

Dose : La cytotoxicité dépend également de la quantité de nanoparticules internalisée dans les cellules. Plusieurs études réalisées sur une large gamme de NPOFs, de taille et d'enrobage différents, montrent qu'en dessous d'une concentration en fer de 100 µg/mL les NPOFs ne semblent pas présenter d'effet toxique.<sup>83,84</sup>

Conditions d'incubation : La stabilité des nanoparticules ainsi que la couronne protéique dépend de la quantité et de la nature des protéines mise en présence des nanoparticules lors de l'incubation avec les cellules.<sup>97</sup> La concentration de plasma usuellement ajoutée lors des études de cytotoxicité *in vitro* correspond à 10% du volume du milieu d'incubation, ce qui est bien en deçà des conditions *in vivo*. Il a été montré que des protéines différentes s'adsorbaient à la surface des NPOFs selon la quantité de sérum dans le milieu d'incubation. Le temps d'incubation, déterminant la quantité de nanoparticules internalisées, est également un paramètre essentiel dans le cadre de l'étude de la cytotoxicité des nanoparticules.<sup>83</sup>

Bien qu'il existe une pléthore d'études consacrées à l'évaluation de la cytotoxicité des nanoparticules, la variabilité des conditions expérimentales ne permet de pas d'établir un consensus quant aux éventuels effets toxiques générés par les NPOFs à l'échelle cellulaire. A cet égard, différents auteurs ont souligné la nécessité de mener des études de toxicité standardisées pour chaque formulation de NPOFs.<sup>73,86</sup>

Les études de cytotoxicité nous apportent des informations précieuses quant aux mécanismes d'action des nanoparticules à l'échelle cellulaire, cependant ces modèles de culture de cellule en 2D ne sont pas représentatifs du fonctionnement de l'organisme. Certains modèles proposent l'étude de la toxicité sur des agrégats cellulaires en 3D afin de reproduire les interactions entre cellules.<sup>98</sup> Toutefois, le modèle animal reste le principal modèle permettant d'étudier la biodistribution et la toxicité dans l'organisme et de faire éventuellement un lien entre les modèles cellulaires et humains.

### **3.2 Nano-toxicité : études *in vivo***

Les modèles *in vivo* permettent d'étudier la biodistribution des nanoparticules et ainsi évaluer d'une part leurs capacités de ciblage et également les effets biologiques induits dans chaque tissu. Ils sont indispensables pour comprendre les réponses associées aux nanoparticules à l'échelle de l'organisme. Les études de toxicité des NPOFs administrées par voie intraveineuse *in vivo* sont cependant peu nombreuses et contradictoires.<sup>87</sup> Au même titre que les études de cytotoxicité, la toxicité des nanoparticules *in vivo* dépend des caractéristiques des nanoparticules telles que leur taille et leur

enrobage.<sup>88,99</sup> Néanmoins, les effets toxiques aigus ne sont observés qu'au-delà de concentrations considérablement plus grandes que celles administrées lors des essais clinique chez l'homme.<sup>100</sup> A titre d'exemple, selon l'enrobage des NPOFs, leur dose létale médiane (DL50) varie entre 200 mg/kg à environ 1000 mg/kg chez la souris.<sup>101,102</sup> Or, en IRM, les doses généralement administrées pour des essais cliniques chez l'homme sont de l'ordre de 6 mg/kg en fer (essai clinique n°: NCT01927887 et NCT01815333) soit, au minimum, trente fois inférieures à la DL50 chez la souris.

Bien que ces résultats soient encourageants pour les applications des NPOFs en nanomédecine, il est impératif de mener des études supplémentaires afin d'avoir une connaissance complète de leur cycle de vie dans l'organisme et ainsi statuer quant à leur sureté pour l'homme.

Au-delà de la nano-toxicité des nanoparticules à court terme, la question du devenir des nanoparticules après injection reste encore peu abordée. Les études de nano-toxicologie sondent les effets des nanoparticules dans l'organisme en tant qu'objets intègres et sont généralement conduites sur des temps courts (quelques semaines). Or, une fois dans l'organisme, les nanoparticules interagissent avec des protéines, des enzymes, sont soumises à des conditions acides au sein des lysosomes et sont susceptibles d'être dissoutes, dégradées ou transformées. Par analogie avec la pharmacocinétique d'un médicament, un des défis de la nanomédecine est de comprendre le cycle de vie des nanoparticules dans l'organisme, c'est-à-dire caractériser leur distribution, leur transformation, leur dégradation, leur métabolisation et leur élimination. Ces questions se posent également afin d'évaluer l'efficacité biomédicale des nanoparticules et de s'assurer que les effets à long terme ne contrebalancent pas les effets médicaux bénéfiques à court terme. Une fois introduites dans un environnement complexe, leurs propriétés magnétiques seront-elles modifiées ? Seront-elles toujours détectables par IRM et capable de chauffer pour détruire ou sensibiliser des tumeurs ? L'évaluation du comportement des nanoparticules dans un environnement complexe permet de moduler leurs propriétés afin de trouver un compromis entre efficacité et sureté. Cette approche, complémentaire de la nano-toxicologie, qui consiste à comprendre les effets des nanoparticules sur l'organisme, se place du point de vue des nanoparticules en évaluant les effets de l'environnement biologique sur celles-ci. La difficulté de cette démarche réside dans le choix de méthodes adaptées pour caractériser et quantifier l'évolution des nanoparticules dans un environnement complexe.

## 4. Comment détecter les NPOFs *in vivo* ?

---

Dans la section précédente, nous avons vu qu'après injection par voie intraveineuse de nanoparticules, celles-ci sont distribuées dans les différents tissus puis confinées au sein des cellules. Ainsi, l'étude du parcours des nanoparticules au sein de l'organisme nécessite une approche multi-échelle, de l'échelle tissulaire à l'échelle nanométrique afin de comprendre leur cycle de vie. La difficulté réside dans le choix de méthodes de nanométrie permettant de détecter et quantifier sélectivement des objets de tailles nanométriques dans différents environnements. Les NPOFs se caractérisent par leurs propriétés magnétiques, il est ainsi possible de tirer avantage de celles-ci pour les détecter et les quantifier dans des milieux complexes. Je présenterai en particulier les méthodes magnétiques de métrologie utilisées au cours de cette thèse, à savoir l'IRM et la résonance ferromagnétique.

### 4.1 L'imagerie par résonance magnétique

L'IRM est une technique d'imagerie médicale non invasive basée sur le principe de la résonance magnétique nucléaire (RMN) décrit par Isidor Isaac Rabi en 1938, ce qui lui valut le prix Nobel de physique en 1944. Les méthodes actuelles de RMN se sont développées grâce aux premières mesures du magnétisme par induction réalisées par Felix Bloch et Edward Mills Purcell en 1946, qui obtinrent le prix Nobel de physique pour ces travaux en 1952. A la fin des années 70, Raymond Vahan Damadian proposa d'utiliser le phénomène de RMN à des fins médicales et démontra une différence de réponse de RMN pour des tissus sains et malades.<sup>103</sup> C'est en 1975 que Peter Mansfield produisit les premières images de tissus humains. Avant d'aborder les différents avantages de l'utilisation de l'IRM pour la détection des NPOF, revenons sur le phénomène de RMN.

#### 4.1.1 Résonance magnétique nucléaire

Dans le contexte de l'imagerie médicale, nous nous limiterons à la description du phénomène de RMN du noyau d'hydrogène. Celui-ci possède un spin égal à  $\frac{1}{2}$  auquel on associe un moment magnétique de spin  $\vec{\mu}_s = \gamma \vec{S}$  avec  $\gamma$  le rapport gyromagnétique.

En l'absence de champ magnétique extérieur, les moments magnétiques des noyaux d'hydrogènes sont distribués aléatoirement. L'aimantation  $M_0$  correspondant à la somme des moments magnétiques  $\vec{\mu}_s$  est nulle. La présence d'un champ magnétique statique extérieur noté  $\vec{B}_0$  et dirigé selon l'axe Oz entraîne un moment de précession des moments magnétiques nucléaires autour de l'axe de  $\vec{B}_0$ , de fréquence  $\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$ , appelée fréquence de Larmor. L'aimantation  $M_0$  résultante est alors non nulle et alignée selon l'axe Oz (Figure 4.1). D'un point de vue quantique, les spins nucléaires occupent des niveaux d'énergie dégénérés en l'absence de champ magnétique. L'application d'un champ magnétique extérieur lève cette dégénérescence et les spins nucléaires occupent, conformément à la loi de

distribution de Boltzmann, deux niveaux énergétiques distincts  $\alpha$  et  $\beta$ . La différence de population dans ces deux niveaux énergétiques est à l'origine de l'aimantation non nulle du matériau sous l'action d'un champ magnétique extérieur.

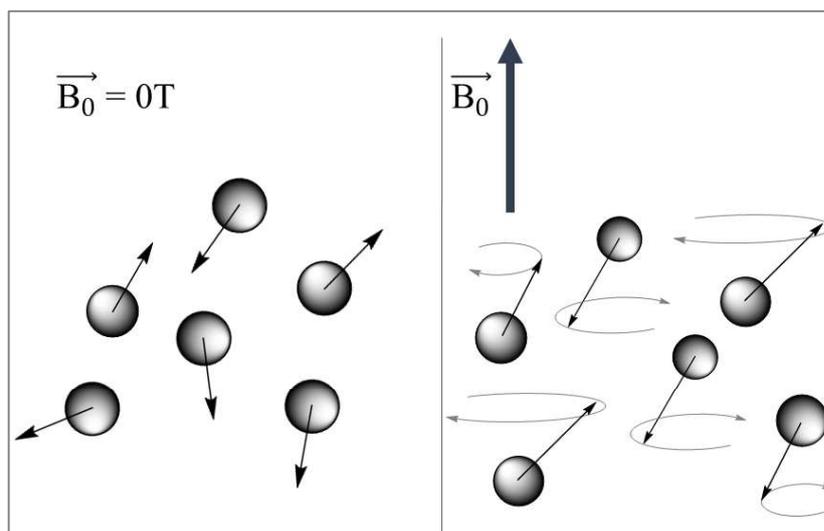


Figure 4.1 : Ensemble des spins nucléaires en l'absence et en présence d'un champs magnétique extérieur  $B_0$

Un second champ magnétique oscillant  $\vec{B}_1$ , de fréquence égale à la fréquence de Larmor des spins nucléaires et dirigé ici selon l'axe xy permet de se placer dans les conditions de résonance. Les spins ainsi excités entrent en précession autour de l'axe de  $\vec{B}_1$ . L'aimantation résultante initialement dirigée selon l'axe Oz se retrouve, suite à l'application du champ  $\vec{B}_1$ , dans le plan xy. L'arrêt de l'excitation provoque un retour à l'équilibre, appelé relaxation, caractérisée par une diminution de la composante  $M_{xy}$  et l'augmentation de la composante  $M_z$  jusqu'à sa valeur initiale. La décroissance de la composante  $M_{xy}$  se fait avec un moment de précession libre, *FID* pour *free induction decay*, correspondant au signal RMN détecté par l'antenne réceptrice du spectromètre RMN. Le signal mesuré constitué d'un ensemble de sinusoïdes correspondant aux valeurs des composantes  $M_x$  et  $M_y$  en fonction du temps est ensuite traité par transformée de Fourier, permettant d'obtenir un spectre RMN dans le domaine des fréquences (Figure 4.2.).

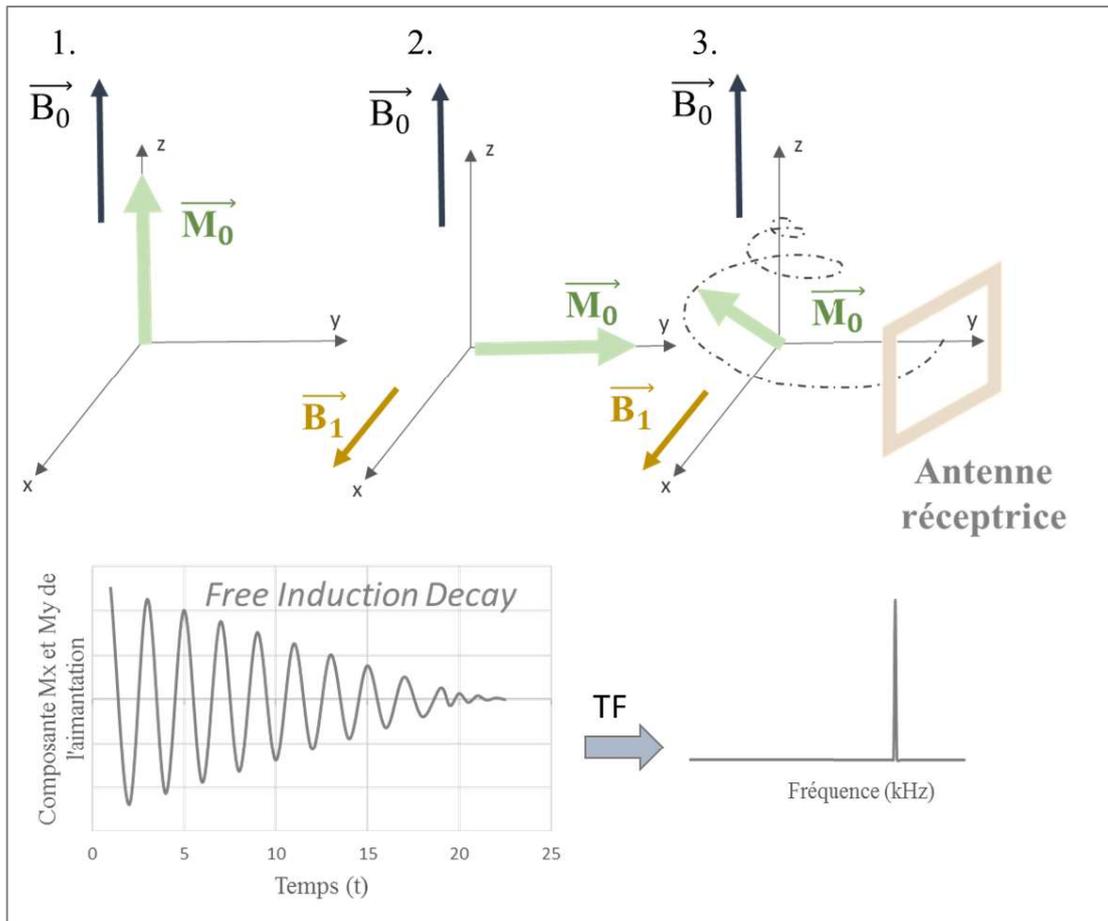


Figure 4.2 :Acquisition d'un signal RMN. L'échantillon est placé dans un champ magnétique externe  $B_0$ , l'aimantation résultante  $M_0$  est non nulle et dirigée selon  $\vec{B}_0$ . Suite à l'excitation de l'échantillon par un champ externe  $\vec{B}_1$  et dirigé selon l'axe x, le vecteur aimantation bascule dans le plan xy. L'arrêt de l'excitation provoque le retour à l'équilibre du vecteur  $\vec{M}_0$ . L'évolution des composante  $M_x$  et  $M_y$  sont mesurées par l'antenne réceptrice du spectromètre, donnant lieu au signal FID qui traité par une transformé de Fourier conduit au signal RMN.

Le retour du vecteur aimantation à l'équilibre est défini par deux temps de relaxation caractéristiques, le temps de relaxation longitudinal appelé aussi temps de relaxation spin-réseau et le temps de relaxation transversal ou spin-spin. Le temps de relaxation longitudinal  $T_1$  correspond au temps au bout duquel la composante  $M_z$  retourne à sa valeur d'équilibre. Sous l'action du champ  $B_1$ , l'aimantation bascule dans le plan xy, ainsi la composante  $M_z$  est nulle. A la fin de l'excitation, la composante  $M_z$  augmente en fonction du temps selon la loi exponentielle :

$$M_z(t) = M_{0z} (1 - e^{-\frac{t}{T_1}})$$

Sous l'action du champ  $B_1$ , les moments magnétiques nucléaires tournent à la même fréquence, ils sont en phase. Suite à l'arrêt de l'excitation, les interaction spins-spins créent des hétérogénéités de champ, ce qui engendre une perte de cohérence. Le déphasage entre les moments magnétiques nucléaires

entraîne une diminution de la composante  $M_{xy}$  en fonction du temps caractérisée par le temps de relaxation transversal  $T_2$  et suivant la loi exponentielle suivante :

$$M_{xy}(t) = M_{0xy} e^{-\frac{t}{T_2}}$$

On peut souligner ici que ces équations sont valables en supposant que l'appareil RMN est muni d'un aimant parfait générant un champ magnétique  $\vec{B}_0$  homogène. En pratique, on observe des hétérogénéités du champ  $\vec{B}_0$  à l'échelle microscopique qui accélèrent la décroissance transversale. On définit ainsi un temps de relaxation transversal effectif et noté  $T_2^*$ . L'enveloppe du signal FID présenté dans la [Figure 4.2](#) est ainsi une exponentielle décroissante en  $T_2^*$  et non en  $T_2$ . Néanmoins, il est possible de s'affranchir des hétérogénéités de champ en modifiant certains paramètres lors de l'acquisition du signal.

L'IRM qui repose sur le principe de la RMN, consiste à appliquer un gradient de champ magnétique afin de faire varier les fréquences de précession de Larmor des moments magnétiques en fonction de leurs positions. Après séparation et traitement des différents signaux reçus après l'excitation, il est possible de reconstituer la distribution spatiale des protons dans l'objet. Le contraste de l'image est obtenu grâce aux variations des temps de relaxation transversaux et longitudinaux des protons de l'eau contenue dans les tissus de l'organisme, ainsi que de la densité de protons. Il est souvent nécessaire d'optimiser le contraste des images afin de distinguer les différents tissus en faisant varier les protocoles d'acquisition ou en ajoutant un agent de contraste. Ces protocoles sont appelés séquences et permettent d'optimiser le signal détecté en limitant les artéfacts et le rapport signal/bruit. Le choix des séquences dépend d'une part des tissus observés et, d'autre part, des agents de contraste considérés, et permet d'obtenir des images dites pondérées en  $T_1$ ,  $T_2$  ou  $T_2^*$ . Il existe plus de cents séquences IRM différentes, il serait donc fastidieux de les décrire ici. Néanmoins, les séquences utilisées lors des analyses IRM présentées dans ce manuscrit sont décrites dans la partie expérimentale.

#### 4.1.2 Les agents de contraste

La relaxation des moments magnétiques nucléaires dépend de leur environnement. Ainsi la présence d'une source magnétique locale dans un tissu cible induit une variation du champ magnétique ressenti par les protons et modifie leur relaxation.

Le temps de relaxation dépend de la relaxivité de l'agent de contraste considéré selon l'équation<sup>104</sup> :

$$\frac{1}{(T_i)_{obs}} = \frac{1}{(T_i)_{dia}} + r_i [M]$$

Avec  $(T_i)_{obs}$  et  $(T_i)_{dia}$  les temps de relaxation (en seconde) avant et après ajout de l'agent de contraste,  $r_i$  la relaxivité de l'agent de contraste (en  $\text{seconde}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ ) et  $[M]$  sa concentration (en  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

D'après l'équation ci-dessus, on observe que les agents de contraste permettent de diminuer les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  et ainsi d'accélérer la relaxation. On distingue les agents de contraste  $T_1$  ou positif des agents  $T_2$  ou négatifs. Les agents de contraste positifs, diminuent de la même façon les temps de relaxation longitudinale et transverse ( $r_2/r_1$  de l'ordre de 1) et ont tendance à éclaircir les zones où ils s'accumulent (effet  $T_1$ ) (Figure 4.3).<sup>105</sup> Les complexes de gadolinium sont les agents de contraste positifs les plus utilisés en clinique.

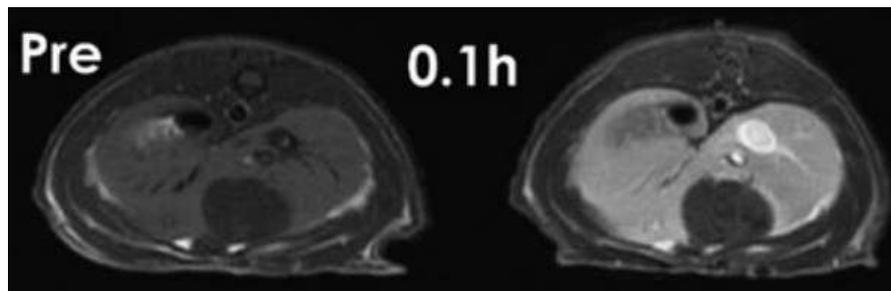


Figure 4.3 : Images IRM d'une coupe de foie de rat atteint d'un cancer du foie (hépatocarcinome) avant et après injection intraveineuse de l'agent de contraste Gd-DTPA-Pullulan. Images extraite de [105].

A l'inverse, les agents de contraste  $T_2$  diminuent plus fortement le temps de relaxation transverse par rapport au longitudinal ( $r_2/r_1 \gg 1$ ) et ont tendance à assombrir les zones où ils s'accumulent. Les entités superparamagnétiques telles que les NPOFs sont des agents de contraste négatifs (Figure 1.5).

Au-delà des applications médicales, l'IRM est une technique particulièrement utile et efficace pour détecter et suivre la distribution et l'évolution des propriétés magnétiques des nanoparticules à l'échelle tissulaire.

## 4.2 La résonance ferromagnétique

La résonance ferromagnétique (RFM) est une technique spectroscopique permettant de sonder l'aimantation de matériaux magnétiques. Contrairement à la RMN qui mesure la dynamique de l'aimantation nucléaire (influencée en particulier par la présence de nanoparticules magnétiques), la RFM est sensible à la dynamique magnétique électronique et donc directement à l'aimantation électronique des nanoparticules. La RFM repose sur le principe de la résonance paramagnétique électronique (RPE), présenté ci-dessous. Le principe de la RPE est similaire au principe de la RMN. Cependant les entités sondées ne sont pas les spins nucléaires mais les spins électroniques.

En l'absence de champ magnétique extérieur, les spins électroniques d'espèces paramagnétiques sont distribués de manière aléatoire et occupent des niveaux d'énergie dégénérés. La présence d'un

champs magnétique statique extérieur provoque une levée de dégénérescence des niveaux énergétiques en plusieurs états d'énergie associés au nombre quantique de spin  $m_s$  : c'est l'effet Zeeman. L'électron ayant un spin  $s = \frac{1}{2}$ , il y a  $2s+1$  soit deux niveaux énergétiques possibles associés aux nombres quantiques  $m_s = \frac{1}{2}$  et  $m_s = -\frac{1}{2}$  (Figure 4.4).

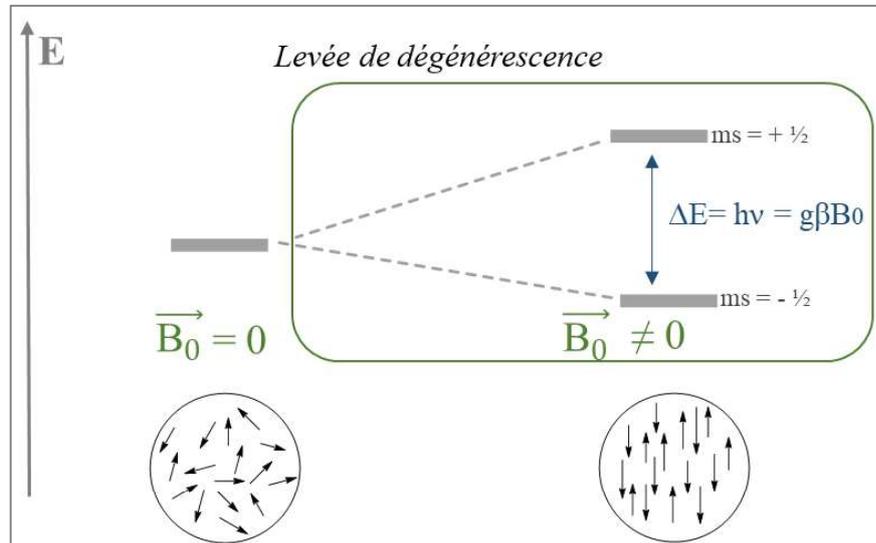


Figure 4.4 : Levée de dégénérescence des niveaux d'énergie pour un ensemble de spins électroniques ( $S=1/2$ ) sous l'action d'un champ magnétique extérieur.

L'application d'un champ magnétique oscillant de fréquence  $\nu = \frac{g\beta B_0}{h}$ , avec  $g$  le facteur de Landé (sans dimension),  $\beta$  le magnéton de Bohr (en Joules.Tesla<sup>-1</sup>),  $h$  la constante de Planck (en Joule.seconde) et  $\vec{B}_0$  le champ magnétique (en Tesla) (Figure 4.4) provoque des transitions entre les différents états énergétiques, le système est alors en résonance. A titre d'exemple, la fréquence de résonance pour un champ de 1 Tesla est d'environ 30 GHz, les ondes magnétiques excitatrices sont ainsi des micro-ondes. Les conditions de résonance sont déterminées en faisant varier le champ magnétique statique  $\vec{B}_0$  pour une fréquence des micro-ondes fixe. On parle de spectromètres fonctionnant en bande X ou en bande Q lorsque la fréquence des micro-ondes est de 9,26 GHz et de 34 GHz, respectivement. Expérimentalement, le signal mesuré est la dérivée de l'absorption des ondes excitatrices par l'échantillon et son intensité est proportionnelle au nombre de spins présents dans l'échantillon.

La RFM est basée sur le principe de la RPE cependant, le système considéré est alors un matériau ferromagnétique (ou ferrimagnétique) constitué d'un ensemble de moments magnétiques électroniques couplés entre eux. Dans le cas de nanoparticules superparamagnétiques, on considère l'aimantation globale de la suspension définie par la somme des moments magnétiques de chaque nanoparticule. En l'absence de champ magnétique, les directions de ces moments magnétiques sont distribuées de manière aléatoire, l'aimantation de la suspension est nulle. Sous l'action d'un champ magnétique statique  $\vec{B}_0$ , les moments magnétiques s'alignent dans la direction de  $\vec{B}_0$ , ce qui confère une aimantation à la suspension.

Les conditions de résonance peuvent aussi être déterminées à fréquence fixe de l'onde excitatrice et en faisant varier le champ magnétique statique  $\vec{B}_0$ . La dérivée de l'absorption est mesurée en fonction du champ magnétique appliqué, et l'intensité du signal est proportionnelle au nombre de moments magnétiques électroniques en résonance. Il est ainsi possible de relier l'intensité du signal avec la concentration en nanoparticules.<sup>106</sup>

Cette méthode permet d'évaluer sélectivement la variation de l'aimantation de nanoparticules superparamagnétiques. Il est ainsi possible de détecter mais aussi de quantifier les nanoparticules grâce à leurs propriétés magnétiques dans un milieu complexe tel que l'organisme. Cette technique possède également l'avantage d'être réalisable sur divers types d'échantillons, liquides ou solides.

### 4.3 L'approche multi-échelle

Les deux méthodes présentées ci-dessus permettent de caractériser les propriétés magnétiques des NPOFs dans un environnement complexe. L'IRM permet de suivre la biodistribution des NPOFs dans l'organisme mais ne les quantifie pas. A l'inverse, la RFM caractérise l'évolution des propriétés magnétiques des oxydes de fer et les relie directement à leur concentration, permettant ainsi de les quantifier dans les organes.

Ces mesures macroscopiques ont été combinées à l'analyse histologique de coupes d'organes permettant de caractériser la biodistribution des nanoparticules à l'échelle tissulaire et à la microscopie électronique en transmission (MET). La MET est une technique permettant de caractériser d'une part la localisation des nanoparticules à l'échelle cellulaire mais aussi l'évolution de leurs propriétés morphologiques et structurelles à l'échelle nanométrique. Une fois introduites dans l'organisme et massivement internalisées par les macrophages, les nanoparticules sont soumises à des conditions hostiles rencontrées dans les lysosomes. Nous verrons dans la section suivante que les nanoparticules sont susceptibles d'y être transformées et dégradées. Ainsi, des méthodes supplémentaires permettant de caractériser les transformations des nanoparticules et les produits issus de celles-ci, potentiellement non magnétiques, sont nécessaires. La méthode d'analyse élémentaire par spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP), que nous présenterons dans le chapitre 2, a permis de suivre l'intégrité des nanoparticules, c'est-à-dire l'ensemble des entités magnétiques et non magnétiques issues de ces dernières dans l'organisme.

La combinaison de toutes ces techniques permet l'étude des nanoparticules de l'échelle macroscopique à l'échelle nanométrique et, en outre, la détection et le suivi des produits de dégradation de ces dernières. Cette approche multi-échelle est nécessaire pour suivre l'intégralité du cycle de vie des nanoparticules dans l'organisme en fonction du temps (Figure 4.5).

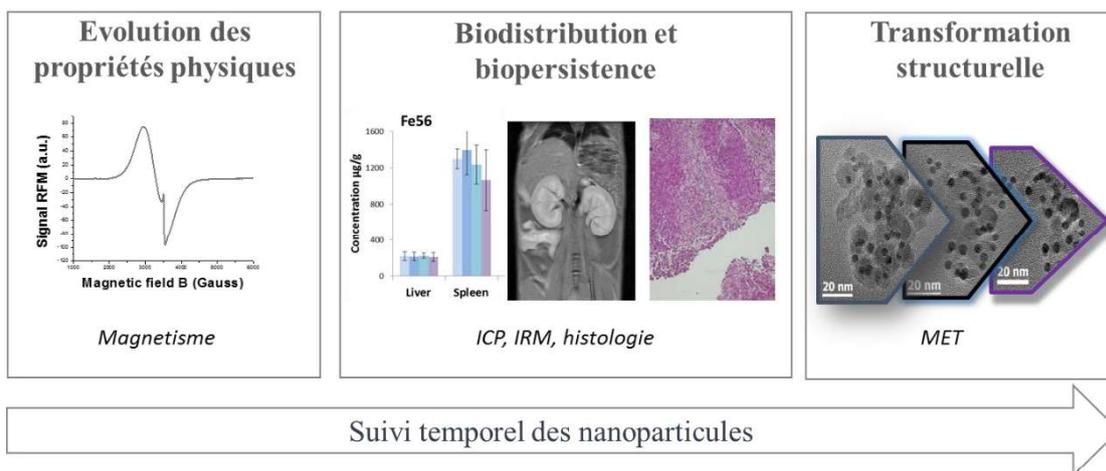


Figure 4.5 : Techniques utilisées pour suivre l'évolution des nanoparticules dans l'organisme au cours du temps.

Ce n'est qu'à partir des années 2010, qu'ont été publiées les premières études sur le devenir des nanoparticules d'oxydes de fer. Les travaux précurseurs de Mickaël Levy, mon prédécesseur, ont permis de mettre en évidence le comportement des NPOFs dans des milieux de complexités différentes, allant d'une solution acide à l'étude chez l'animal à long terme. Ces travaux présentés dans la section suivante ont permis de définir les différentes problématiques associées à cette thèse.

## 5. Devenir des NPOFs

---

L'interaction des nanoparticules avec le milieu biologique peut modifier drastiquement les propriétés magnétiques de ces dernières. Nous avons abordé en section 2.2 la biodistribution des nanoparticules après injection par voie intraveineuse. Celles-ci sont reconnues dans la majorité des cas par les macrophages du système réticulo-endothélial, puis acheminées et internalisées dans les cellules du foie et de la rate. Elles sont ensuite confinées au sein des lysosomes et exposées à des conditions enzymatiques et de pH hostiles. Dans ces conditions, comment évolue l'intégrité des nanoparticules ? Sont-elles transformées ou dégradées ? Pendant combien de temps conserveront-elles leurs propriétés magnétiques pour créer un contraste suffisant en IRM ou chauffer efficacement un tissu tumoral ? L'étude du devenir des nanoparticules permet d'une part d'évaluer la robustesse des agents *théranostiques* dans leur environnement d'application mais également de suivre leur cycle de vie c'est-à-dire, leur transformation, leur persistance, leur élimination et leur recyclage au sein de l'organisme.

Afin de répondre à ces questions il est nécessaire de pouvoir quantifier les nanoparticules au sein de l'organisme. Dans la section précédente, nous avons établi les méthodes de nanométrie adaptées pour suivre les NPOFs, et en particulier leur propriétés magnétiques, *in vivo*. De nombreuses recherches se concentrent sur l'évaluation de la toxicité et la biodistribution des nanoparticules sur une période de quelques heures voire quelques jours. Cependant, leur devenir sur le long terme allant de quelques semaines à plusieurs mois, temps nécessaire à l'organisme pour les transformer, les dégrader ou les éliminer, reste peu étudié. Le temps des expériences est un facteur clé dans la compréhension du cycle de vie des nanoparticules. Les études présentées ci-dessous se concentrent sur le suivi et la quantification des nanoparticules sur des périodes allant de trois mois à un an.

### 5.1 Transformation des nanoparticules

#### 5.1.1 Etudes *in vivo*.

Les études du cycle de vie des nanoparticules sont réalisées dans la plupart des cas sur des modèles murins. Dans la suite de cette section, nous présenterons les études sur le devenir de nanoparticules réalisées précédemment au laboratoire, par mes prédécesseurs.

Après injection intraveineuse, Lévy *et al.* ont montré que la majorité des nanoparticules sont confinées dans les lysosomes des macrophages résidents du foie et de la rate.<sup>107</sup> L'étude de l'évolution du signal RFM pour des NPOFs sphériques,<sup>107</sup> cubiques<sup>30</sup> ou de nanoparticules hybrides constituée de nanoparticules d'or entourées d'oxyde de fer<sup>108</sup> montre une diminution du signal au cours du premier mois suivant l'injection (Figure 5.1 (A, B et C)). Ces résultats ont été confirmés par IRM *in vivo* (Figure 5.1 (D)), montrant une diminution du contraste dû aux nanoparticules au bout de quatorze jours suivant l'injection. La diminution du signal magnétique peut s'expliquer par l'élimination des nanoparticules au

cours du temps dans les organes observés ou par une transformation des nanoparticules entraînant une modification de leurs propriétés magnétiques. L'analyse de l'évolution des propriétés magnétiques intrinsèques des nanoparticules, en particulier leur température de blocage, montre une modification de celle-ci (diminution après trois mois dans la rate), témoin de la transformation magnétique des nanoparticules. En effet, l'élimination seule des nanoparticules entraîne une diminution du signal magnétique des nanoparticules sans en modifier leur température de blocage.

Ces études ont permis également de mettre en évidence différents paramètres influençant la transformation des nanoparticules. On observe que cette dernière dépend de la forme et de la taille des nanoparticules : au bout de sept jours, la quantité de nanoparticules magnétiques est d'environ 20 % de la masse injectée pour des nanoparticules sphériques et de moins de 5 % pour des nanoparticules cubiques pour une dose injectée égale à 50  $\mu\text{mol}$  de fer par kilogramme (Figure 5.1 (A et C)). Kolosnjaj-Tabi *et al.* ont également montré que l'enrobage des nanoparticules influe sur la biodistribution et sur leur cinétique de transformation : plus de 80 % des nanoparticules injectées enrobées avec un polymère amphiphile (polymer-coated) se retrouvent dans le foie contre environ 40% pour les nanoparticules enrobées avec du PEG.<sup>108</sup> Ces dernières sont rapidement transformées dans le foie, on retrouve moins de 20 % de la masse injectée après 7 jours contre environ 80% pour les nanoparticules enrobées avec le polymère amphiphile (Figure 5.1 (B)). Enfin, la cinétique de transformation des nanoparticules semble dépendre également de l'environnement biologique, on observe en effet, une cinétique de dégradation plus rapide dans le foie que dans la rate.

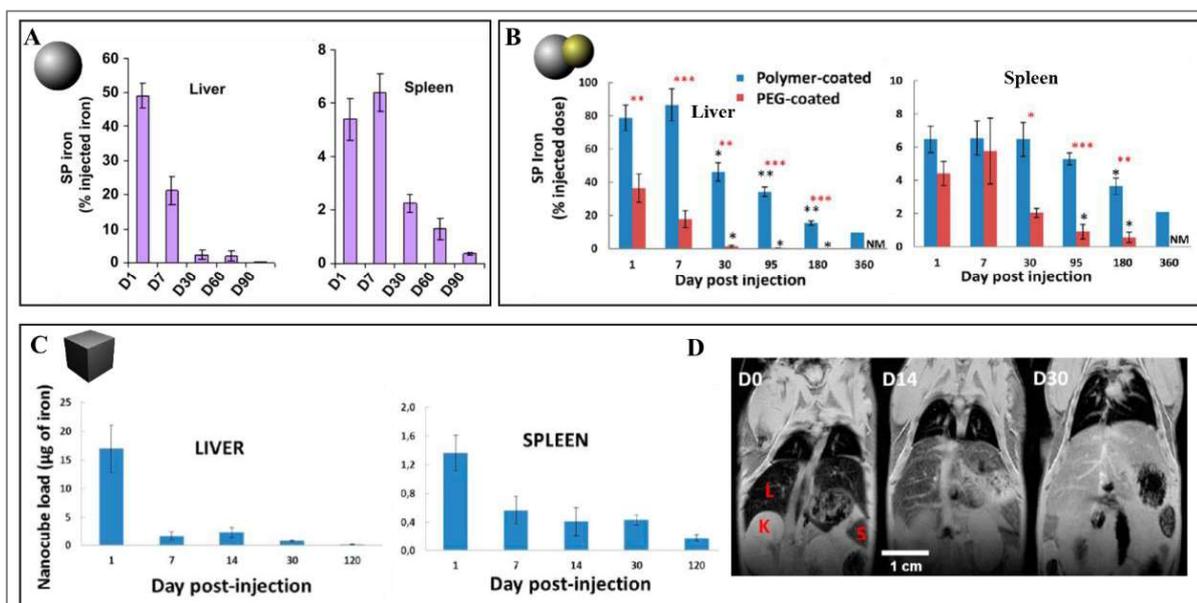


Figure 5.1 : Evolution de la quantité de fer superparamagnétique (SP) mesurée en RFM dans le foie et dans la rate pour des NPOFs sphérique<sup>107</sup>(A) , hybrides<sup>108</sup> (B) et cubiques<sup>30</sup> (C). IRM *in vivo* des nanoparticules cubiques après injection et 14 et 30 jours suivant l'injection (D). Images extraites de [30], [107] et [108].

Des observations en MET sur des coupes de foie et de rate ont confirmé la transformation des nanoparticules après internalisation cellulaire dans les lysosomes. Après injection de nanocubes, ceux-ci sont confinés à la périphérie des lysosomes sous forme d'agrégats (Figure 5.2 (A)). On observe 120 jours suivant l'injection, la présence de nanoparticules sphériques attestant la dégradation de ces derniers (Figure 5.2 (A) flèche rouge) On observe également une modification structurelle des nanoparticules hybrides, sept jours après l'injection, qui se traduit par la persistance des nanoparticules d'or et la disparition de la couche d'oxyde de fer les entourant (Figure 5.2 flèche bleue).

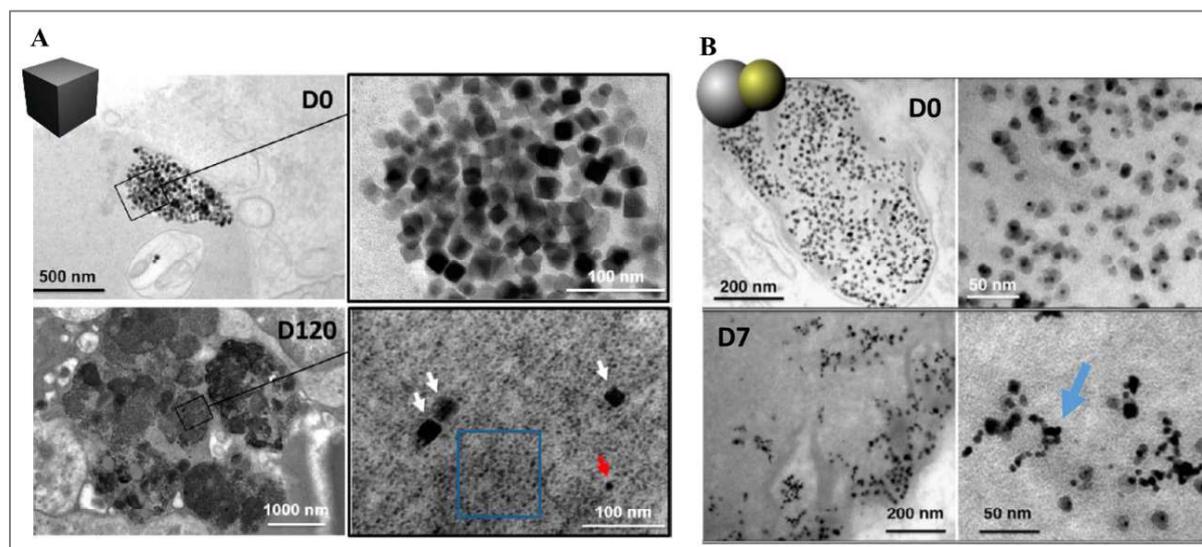


Figure 5.2 : Evolution des propriétés structurales de NPOFs cubique (A)<sup>30</sup> et hybrides (oxyde de fer / or) (B).<sup>108</sup> Après injection et internalisation, les nanocubes sont localisés à la périphérie des lysosomes contrairement aux nanoparticules hybrides dont la distribution est homogène au sein des lysosomes. 120 jours après l'injection des nanocubes intacts (flèche blanche) et rognés sous une forme sphérique (flèche rouge) sont observés dans les lysosomes. Les NPOFs hybrides perdent leur enrobage d'oxyde de fer 7 jours après injection (flèche bleue). Images extraites de [30] et [108].

Ces études ont pu mettre en évidence qu'après internalisation dans les lysosomes, les nanoparticules sont dégradées localement par le milieu biologique au sein des lysosomes. La dégradation dépend également de certains paramètres caractéristiques des nanoparticules mais également de l'environnement biologique dans lequel elles se trouvent. Pour mieux comprendre ces phénomènes de dégradation, leurs mécanismes et l'influence de certains facteurs sur ceux-ci, des études complémentaires ont été réalisées en solution dans un modèle reproduisant les conditions de chélation et d'acidité des lysosomes. Cette modélisation, initialement développée par Arbab *et al.*<sup>109</sup> est d'une part plus responsable d'un point de vue éthique en considérant le nombre important d'animaux nécessaires pour réaliser ces expériences, et permet d'autre part, de sonder l'influence de certains paramètres individuels sur la dégradation, ce qui est difficilement réalisable *in vivo* du fait de la complexité de ces milieux.

### 5.1.2 Modélisation de la dégradation des nanoparticules

Arbab *et al.* ont évalué l'influence de deux paramètres sur la dégradation : les conditions de chélation et le pH du milieu. Ils ont ainsi comparé l'évolution de la dégradation de NPOFs dans des milieux constitués d'acide citrique, d'acide acétique ou de RPMI (milieu utilisé en culture cellulaire), pour des pH compris entre 4,5 et 7. Ils ont montré qu'elle est maximale lorsque les nanoparticules sont plongées dans un milieu contenant de l'acide citrique au pH avoisinant celui des lysosomes, autour de 4.5. L'acide citrique permet la dissolution des NPOFs par complexation puis diffusion. Ces études ont permis de mettre en évidence deux paramètres essentiels dans la dégradation des NPOFs, la nature des chélates ainsi que le pH de la solution. Quelques années plus tard, Levy *et al.* ont réalisé une étude complète du mécanisme de dégradation de NPOFs sphériques dans le milieu mimant les conditions lysosomales en combinant différentes techniques permettant de suivre l'évolution des propriétés magnétiques et structurales de ces dernières.<sup>110</sup> Une diminution de l'aimantation totale de la suspension est observée à partir de 23 heures d'incubation dans le milieu modèle, sans néanmoins changer les caractéristiques intrinsèques des nanoparticules (aimantation à saturation et température de blocage). Ces résultats, confirmés par des analyses de MET, suggèrent une dissolution des nanoparticules tout en gardant une distribution en taille constante (Figure 5.3). Ces observations macroscopiques ont mis en évidence un mécanisme particulier que l'on peut qualifier de mécanisme « tout-ou-rien » dans lequel la dissolution des nanoparticules, caractérisée par une diminution de l'aimantation de la suspension, est observée sans modifier leurs propriétés magnétiques et structurales. Ainsi les nanoparticules en contact direct avec les molécules de citrate, adsorbées à leurs surfaces, sont totalement dissoutes tandis que les autres restent intactes.

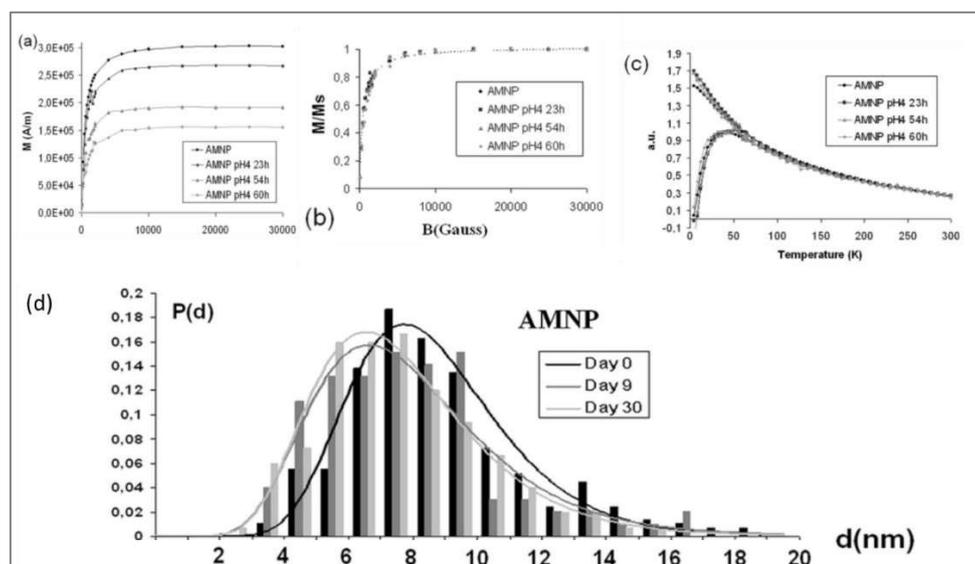


Figure 5.3 : Evolution des propriétés magnétiques et structurales de NPOFs sphériques dans un milieu modélisant les conditions lysosomales<sup>110</sup>. Evolution de l'aimantation globale de la suspension (a), l'aimantation à saturation (b) et la température de blocage (c) pour des NPOFs dans le milieu mimant les conditions lysosomales après 23h, 54h et 60h d'incubation. (d) Evolution de la distribution en taille dans le milieu modèle à pH = 4. Graphes extraits de [110]

Des études complémentaires utilisant la MET haute résolution et corrigée en aberrations ont permis de visualiser l'évolution des propriétés structurales de nanoparticules individuelles et ainsi d'analyser les mécanismes de dégradation à l'échelle nanométrique. Lartigue *et al.* ont observé une diminution de la taille de nanocubes d'oxyde de fer plongés dans le milieu mimant les conditions lysosomales dès 30 minutes.<sup>111</sup> Les nanocubes attaqués par les molécules d'acide citrique semblent se dégrader intégralement et préférentiellement par les coins des cubes. Ces résultats ont mis en évidence une influence importante de l'agrégation et de l'enrobage des nanocubes sur la dégradation. L'agrégation des nanoparticules et un enrobage stable, constituant une couche protectrice, tendent à restreindre l'accès des molécules de citrate à la surface des nanocubes et ainsi diminuent la dégradation. Une étude similaire, réalisée sur un assemblage de NPOFs appelé nanofleurs, a montré qu'une fois plongées dans le milieu modèle, celles-ci se désassemblent en nanoparticules sphériques uniques.<sup>112</sup> La perte de la structure en fleurs affecte les propriétés magnétiques de ces particules et a pour conséquence une diminution significative de leur efficacité en tant qu'agent de contraste et de leur capacité de chauffage.

L'avantage de ces études est double puisqu'elles apportent d'une part des informations préliminaires concernant l'influence des caractéristiques intrinsèques des nanoparticules sur la dégradation, à savoir leur architecture (taille, forme et structure, état d'agrégation) et leur enrobage, mais aussi la possibilité de suivre en temps réel ces mécanismes de dégradation à l'échelle nanométrique.

L'ensemble des résultats *in vivo* et en solution ont permis d'établir que les nanoparticules sont dégradées au sein des lysosomes après injection intraveineuse. Cette dégradation semble être due en premier lieu aux conditions acides des lysosomes et à la présence de molécules tel que le citrate, ayant une grande affinité avec le fer, qui permettent la dissolution des NPOFs. Ainsi, du fer non particulaire, issu de la dissolution des nanoparticules, se retrouve dans le milieu intracellulaire. Dans la section 3.1, nous avons vu que la présence de fer à l'état d'oxydation (+II) catalyse la réaction de Fenton et ainsi risque d'induire un stress oxydant à l'échelle cellulaire. On peut se demander alors, si la cellule peut palier à cette augmentation intracellulaire en fer et prendre en charge le fer libéré par les nanoparticules.

## **5.2 Prise en charge du fer libéré par les nanoparticules.**

Des clichés de MET réalisés sur des coupes de foie et de rate montrent qu'après internalisation de NPOFs dans les lysosomes, celles-ci coexistent avec des particules d'environ 5 nm de diamètre.<sup>107,111</sup> Ces observations ont également révélé la présence de structure semblables à des empreintes digitales (structures *finger print*) caractéristiques de l'organisation d'une protéine intervenant dans le métabolisme du fer, la ferritine (Figure 5.4 (A)). Indépendamment de la taille et de la forme des nanoparticules injectées, celles-ci (Figure 5.4, flèches rouges) se retrouvent systématiquement en présence de ferritine (Figure 5.4, flèches jaunes) dans les lysosomes. Les ferritines sont des protéines de stockage du fer, pouvant stocker jusqu'à 4500 atomes de fer par protéine. Ainsi ces observations

suggèrent un mécanisme de transfert des atomes de fer issus de la dégradation des nanoparticules vers les ferritines. Lopez-Castro *et al.* ont également observé en microscopie électronique, un remplissage des ferritines de la rate en présence de NPOFs.<sup>113</sup> En outre, l'analyse de l'expression des gènes dans un modèle de sphéroïde de cellules souches mésenchymateuses a montré une surexpression des gènes codant la ferritine trois jours après internalisation de nanoparticules d'oxydes de fer<sup>114</sup> et quatre mois après injection intraveineuse chez la souris (études non publiées).

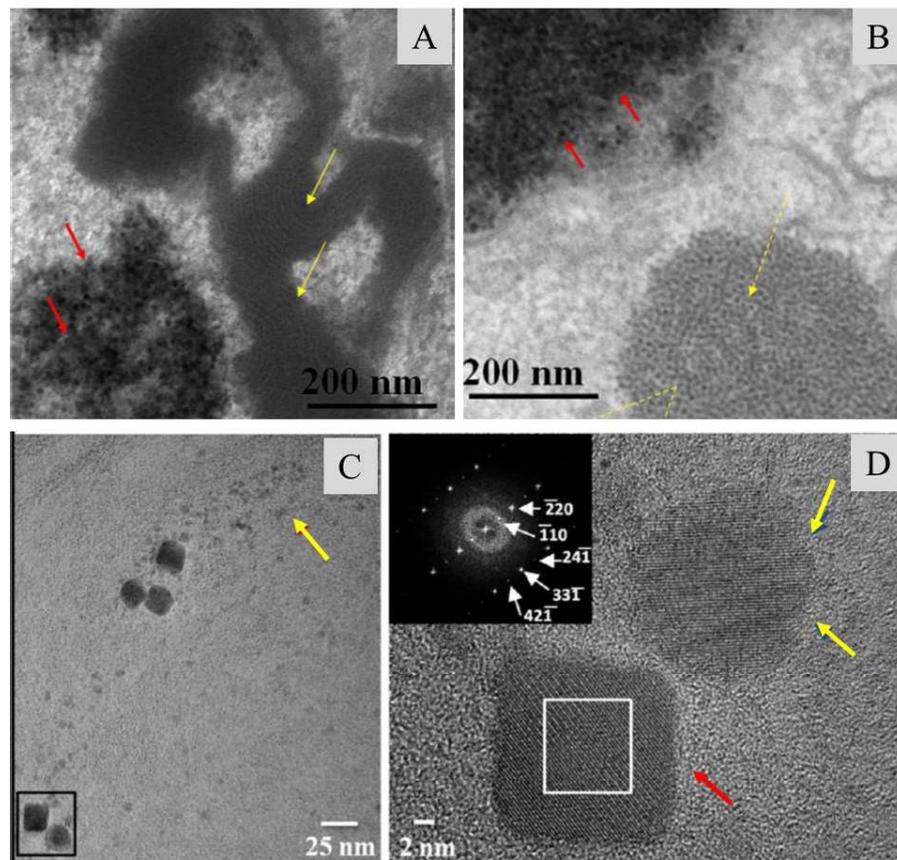


Figure 5.4 : Clichés de MET de coupes de rate 7 jours après injection de NPOFs sphériques (A,B)<sup>107</sup> et 14 jours après injection de nanocubes d'oxyde de fer (C,D)<sup>111</sup>. Après injection des NPOFs (flèches rouge), on observe la présence de ferritines (flèches jaune) à proximité de ces dernières. Extraits de [107] et [111].

Du fait de ses capacités de stockage et de sa proximité avec les nanoparticules, la ferritine semble jouer un rôle important dans la dégradation des nanoparticules et dans le stockage du fer issu de ces dernières. Néanmoins, les mécanismes de transfert restent encore peu connus. Les nanoparticules sont-elles dissoutes puis le fer acheminés vers les ferritines ? Y-a-t-il un mécanisme de transfert direct entre les nanoparticules et les ferritines ? Si un transfert effectif existe entre les nanoparticules et les ferritines, quelles en sont les conséquences sur la dégradation de ces dernières ? En effet, les ferritines pouvant stocker le fer, elles pourraient déplacer l'équilibre de dissolution des nanoparticules et ainsi être de véritables catalyseurs de la dégradation de ces dernières.

Une partie de mes travaux de thèse a pour but de répondre aux questions soulevées précédemment. Le premier chapitre est consacré aux interactions entre nanoparticules et ferritine à travers, d'une part, l'étude des mécanismes de transfert du fer entre ces entités et, d'autre part, l'évaluation de l'impact de la présence de ferritine sur la dégradation des nanoparticules. Il est ainsi dédié à l'étude, à l'échelle moléculaire et cellulaire, des mécanismes de prise en charge des produits de dégradations issus des NPOFs.

La dégradation des nanoparticules au sein de l'organisme pose d'une part la question de la prise en charge du fer exogène, traitée dans le chapitre 1, mais également des dynamiques temporelles et spatiales, à l'échelle de l'organisme, des produits de dégradation issus des nanoparticules : peuvent-ils être recyclés et recrutés pour les besoins de l'organisme ou sont-ils éliminés ? Qu'en est-il alors de leur distribution à l'échelle tissulaire dans le temps ? Du fait de la présence de fer endogène, il est nécessaire d'établir de nouvelles stratégies pour suivre le fer exogène non magnétique issu des nanoparticules.

Le deuxième chapitre de cette thèse est ainsi consacré à la présentation d'une nouvelle méthode analytique consistant à réaliser un marquage isotopique des nanoparticules afin de différencier le fer, issu de la dégradation des nanoparticules, du fer endogène.

Enfin, le troisième chapitre est dédié à l'étude du devenir et de l'intégrité des nanoparticules chez un modèle murin sur une période de six mois, grâce au marquage isotopique présenté dans le deuxième chapitre.

1. <http://www.its.caltech.edu> (Accessed 5th October 2017)
2. <http://eng.thesaurus.rusnano.com> . (Accessed 5th October 2017)
3. Hulla, J., Sahu, S. & Hayes, A. Nanotechnology: History and future. *Hum. Exp. Toxicol.* **34**, 1318–1321 (2015).
4. <http://e-drexler.com> . (Accessed 5th October 2017)
5. Riehemann, K. *et al.* Nanomedicine—Challenge and Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 872–897 (2009).
6. <http://www.etp-nanomedicine.eu> (Accessed 6th October 2017)
7. Boisseau, P. & Loubaton, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Phys.* **12**, 620–636 (2011).
8. <https://clinicaltrials.gov> (Accessed 6th October 2017)
9. <http://www.nanospectra.com> . (Accessed 6th October 2017)
10. <https://clinicaltrials.gov>. (Accessed 6th October 2017)
11. La nanomédecine. Enjeux éthiques, juridiques et normatifs - Christian Hervé, Michèle Stanton-Jean, Patrick-A Molinari, Marie-Angèle Grimaud, Emmanuelle Laforêt.
12. Les nanomatériaux, effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement / Forsapre.
13. <http://www.inrs.fr> (Accessed 6th October 2017).
14. Faivre, D. Introduction. in *Iron Oxides* (ed. Faivre, D.) 1–6 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016).
15. Cornell, R. M. & Schwertmann, U. Introduction to the Iron Oxides. in *The Iron Oxides* 1–7 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003).
16. Shubayev, V. I., Pisanic, T. R. & Jin, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 467–477 (2009).
17. Teja, A. S. & Koh, P.-Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **55**, 22–45 (2009).
18. Arami, H., Khandhar, A., Liggitt, D. & Krishnan, K. M. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 8576–8607 (2015).
19. Lu, A.-H., Salabas, E. L. & Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 1222–1244 (2007).
20. Kolhatkar, A. G., Jamison, A. C., Litvinov, D., Willson, R. C. & Lee, T. R. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 15977–16009 (2013).
21. Cortajarena, A. L. *et al.* Engineering Iron Oxide Nanoparticles for Clinical Settings. *Nanobiomedicine* 1 (2014).
22. Fortin, J.-P. *et al.* Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2628–2635 (2007).
23. Shen, Z., Wu, A. & Chen, X. Iron Oxide Nanoparticle Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Mol. Pharm.* **14**, 1352–1364 (2017).
24. Sun, C. *et al.* In vivo MRI detection of gliomas by chlorotoxin-conjugated superparamagnetic nanoprobess., In Vivo MRI Detection of Gliomas by Chlorotoxin-Conjugated Superparamagnetic Nanoprobess. *Small Weinh. Bergstr. Ger. Small Weinh. Bergstr. Ger.* **4**, 4, 372, 372–379 (2008).

25. Anselmo, A. C. & Mitragotri, S. A Review of Clinical Translation of Inorganic Nanoparticles. *AAPS J.* **17**, 1041–1054 (2015).
26. Cortajarena, A. L. *et al.* Engineering Iron Oxide Nanoparticles for Clinical Settings. *Nanobiomedicine* **1**, 2 (2014).
27. Markides, H., Rotherham, M. & El Haj, A. J. Biocompatibility and Toxicity of Magnetic Nanoparticles in Regenerative Medicine. *Journal of Nanomaterials* (2012).
28. Bulte, J. W. M. In Vivo MRI Cell Tracking: Clinical Studies. *Am. J. Roentgenol.* **193**, 314–325 (2009).
29. Lévy, M. *et al.* Magnetically induced hyperthermia: size-dependent heating power of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *J. Phys. Condens. Matter* **20**, 204133 (2008).
30. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle “Destructurators” of the Tumoral Microenvironment. *ACS Nano* **8**, 4268–4283 (2014).
31. A. J. Giustini, A. A. Petryk, S. M. Cassim, J. A. Tate, I. Baker, and P. J. Hoopes, “Magnetic nanoparticle hyperthermia in cancer treatment,” *Nano LIFE*, vol. 1, no. 01n02, 2010.
32. Bañobre-López, M., Teijeiro, A. & Rivas, J. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* **18**, 397–400 (2013).
33. R.V. Ramanujan and L.L. Lao, Magnetic particles for hyperthermia treatment of cancer, Proc. First Intl. Bioengg. Conf, Singapore, 2004
34. Maier-Hauff, K. *et al.* Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* **103**, 317–324 (2011).
35. <http://www.magforce.de> (Accessed 26th March 2017)
36. <http://www.nocanther-project.eu> (Accessed 26th March 2017)
37. Campbell, S., Maitland, D. & Hoare, T. Enhanced Pulsatile Drug Release from Injectable Magnetic Hydrogels with Embedded Thermosensitive Microgels. *ACS Macro Lett.* **4**, 312–316 (2015).
38. Brulé, S. *et al.* Doxorubicin Release Triggered by Alginate Embedded Magnetic Nanoheaters: A Combined Therapy. *Adv. Mater.* **23**, 787–790 (2011).
39. Chen, R., Romero, G., Christiansen, M. G., Mohr, A. & Anikeeva, P. Wireless magnetothermal deep brain stimulation. *Science* **347**, 1477–1480 (2015).
40. Stanley, S. A. *et al.* Radio-Wave Heating of Iron Oxide Nanoparticles Can Regulate Plasma Glucose in Mice. *Science* **336**, 604–608 (2012).
41. Al-Jamal, K. T. *et al.* Magnetic Drug Targeting: Preclinical in Vivo Studies, Mathematical Modeling, and Extrapolation to Humans. *Nano Lett.* **16**, 5652–5660 (2016).
42. Janko, C. *et al.* Magnetic Drug Targeting Reduces the Chemotherapeutic Burden on Circulating Leukocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 7341–7355 (2013).
43. Herrmann, I. K. *et al.* Nanomagnet-based removal of lead and digoxin from living rats. *Nanoscale* **5**, 8718–8723 (2013).
44. Lee, E. A. *et al.* Application of magnetic nanoparticle for controlled tissue assembly and tissue engineering. *Arch. Pharm. Res.* **37**, 120–128 (2014).
45. Fayol, D. *et al.* Use of Magnetic Forces to Promote Stem Cell Aggregation During Differentiation, and Cartilage Tissue Modeling. *Adv. Mater.* **25**, 2611–2616 (2013).

46. Jun, Y. *et al.* Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals and Their Utilization for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 5732–5733 (2005).
47. Di Corato, R. *et al.* Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials* **35**, 6400–6411 (2014).
48. Laurent, S. *et al.* Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **108**, 2064–2110 (2008).
49. Hayashi, K. *et al.* Superparamagnetic nanoparticle clusters for cancer theranostics combining magnetic resonance imaging and hyperthermia treatment., Superparamagnetic Nanoparticle Clusters for Cancer Theranostics Combining Magnetic Resonance Imaging and Hyperthermia Treatment. *Theranostics Theranostics* **3, 3**, 366–376 (2013).
50. Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 428–437 (2009).
51. Lundqvist, M. *et al.* The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study. *ACS Nano* **5**, 7503–7509 (2011).
52. Walkey, C. D. & Chan, W. C. W. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2780–2799 (2012).
53. Lynch, I. & Dawson, K. A. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* **3**, 40–47 (2008).
54. Nel, A. E. *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat. Mater.* **8**, nmat2442 (2009).
55. Monopoli, M. P., Åberg, C., Salvati, A. & Dawson, K. A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 779–786 (2012).
56. Feliu, N. *et al.* In vivo degeneration and the fate of inorganic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 2440–2457 (2016).
57. Karmali, P. P. & Simberg, D. Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **8**, 343–357 (2011).
58. Saptarshi, S. R., Duschl, A. & Lopata, A. L. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J. Nanobiotechnology* **11**, 26 (2013).
59. Greish, K. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting. in *Cancer Nanotechnology* 25–37 (Humana Press, 2010).
60. Kreuter, J. *et al.* Apolipoprotein-mediated Transport of Nanoparticle-bound Drugs Across the Blood-Brain Barrier. *J. Drug Target.* **10**, 317–325 (2002).
61. Kim, H. R. *et al.* Translocation of Poly(ethylene glycol-co-hexadecyl)cianoacrylate Nanoparticles into Rat Brain Endothelial Cells: Role of Apolipoproteins in Receptor-Mediated Endocytosis. *Biomacromolecules* **8**, 793–799 (2007).
62. Kievit, F. M. & Zhang, M. Cancer Nanotheranostics: Improving Imaging and Therapy by Targeted Delivery Across Biological Barriers. *Adv. Mater.* **23**, H217–H247 (2011).
63. Mahmoudi, M., Azadmanesh, K., Shokrgozar, M. A., Journeay, W. S. & Laurent, S. Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. *Chem. Rev.* **111**, 3407–3432 (2011).
64. Conner, S. D. & Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37 (2003).

65. Kocbek, P., Obermajer, N., Cegnar, M., Kos, J. & Kristl, J. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J. Controlled Release* **120**, 18–26 (2007).
66. Choi, C. H. J., Alabi, C. A., Webster, P. & Davis, M. E. Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 1235–1240 (2010).
67. Mu, Q. *et al.* Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems. *Chem. Rev.* **114**, 7740–7781 (2014).
68. Fadeel, B., Feliu, N., Vogt, C., Abdelmonem, A. M. & Parak, W. J. Bridge over troubled waters: understanding the synthetic and biological identities of engineered nanomaterials. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **5**, 111–129 (2013).
69. Josephson, L., Lewis, J., Jacobs, P., Hahn, P. F. & Stark, D. D. The effects of iron oxides on proton relaxivity. *Magn. Reson. Imaging* **6**, 647–653 (1988).
70. Kent, T. A., Quast, M. J., Kaplan, B. J., Lifsey, R. S. & Eisenberg, H. M. Assessment of a superparamagnetic iron oxide (AMI-25) as a brain contrast agent. *Magn. Reson. Med.* **13**, 434–443 (1990).
71. <http://pubs.rsna.org/doi/pdf/10.1148/radiology.168.2.3393649>.
72. Weissleder, R. *et al.* Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am. J. Roentgenol.* **152**, 167–173 (1989).
73. Pisanic, T. R., Jin, S. & Shubayev, V. I. Iron Oxide Magnetic Nanoparticle Nanotoxicity: Incidence and Mechanisms. in *Nanotoxicity* (eds. Sahu, S. C. & Casciano, D. A.) 397–425 (John Wiley & Sons, Ltd, 2009).
74. Gupta, A. K. & Gupta, M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials* **26**, 1565–1573 (2005).
75. Gupta, A. K. & Curtis, A. S. G. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Interaction studies with human fibroblasts in culture. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **15**, 493–496 (2004).
76. J van den Bos, E. *et al.* Improved Efficacy of Stem Cell Labeling for Magnetic Resonance Imaging Studies by the Use of Cationic Liposomes. *Cell Transplant.* **12**, 743–56 (2003).
77. Stroh, A. *et al.* Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 976–984 (2004).
78. Fu, P. P., Xia, Q., Hwang, H.-M., Ray, P. C. & Yu, H. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *J. Food Drug Anal.* **22**, 64–75 (2014).
79. Service, R. F. Calls Rise for More Research on Toxicology of Nanomaterials. *Science* **310**, 1609–1609 (2005).
80. Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W. & Borm, P. J. A. Nanotoxicology. *Occup. Environ. Med.* **61**, 727–728 (2004).
81. Gupta, A. K. & Curtis, A. S. G. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. *Biomaterials* **25**, 3029–3040 (2004).
82. Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J. & Möller, L. Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 1726–1732 (2008).

83. Naqvi, S. *et al.* Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International Journal of Nanomedicine* (2010).
84. Singh, N., Jenkins, G. J. S., Asadi, R. & Doak, S. H. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev.* **1**, (2010).
85. Lewinski, N., Colvin, V. & Drezek, R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* **4**, 26–49 (2008).
86. Soenen, S. J. & Cuyper, M. D. Assessing iron oxide nanoparticle toxicity in vitro : current status and future prospects. *Nanomed.* **5**, 1261–1275 (2010)
87. Valdiglesias, V. *et al.* Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **38**, 53–63 (2016).
88. Mahmoudi, M., Hofmann, H., Rothen-Rutishauser, B. & Petri-Fink, A. Assessing the In Vitro and In Vivo Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Chem. Rev.* **112**, 2323–2338 (2012).
89. Valdiglesias, V. *et al.* Effects of iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* **56**, 125–148 (2015).
90. Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P. & Möller, L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol. Lett.* **188**, 112–118 (2009).
91. Nel, A., Xia, T., Mädler, L. & Li, N. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* **311**, 622–627 (2006).
92. Soenen, S. J. H. & De Cuyper, M. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. *Contrast Media Mol. Imaging* **4**, 207–219 (2009).
93. Wilhelm, C. *et al.* Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* **24**, 1001–1011 (2003).
94. Escamilla-Rivera, V. *et al.* Protein corona acts as a protective shield against Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG inflammation and ROS-induced toxicity in human macrophages. *Toxicol. Lett.* **240**, 172–184 (2016).
95. Deng, Z. J., Liang, M., Monteiro, M., Toth, I. & Minchin, R. F. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nat. Nanotechnol.* **6**, nno.2010.250 (2010).
96. Mahmoudi, M., Laurent, S., Shokrgozar, M. A. & Hosseinkhani, M. Toxicity Evaluations of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Cell “Vision” versus Physicochemical Properties of Nanoparticles. *ACS Nano* **5**, 7263–7276 (2011).
97. Lartigue, L. *et al.* Nanomagnetic Sensing of Blood Plasma Protein Interactions with Iron Oxide Nanoparticles: Impact on Macrophage Uptake. *ACS Nano* **6**, 2665–2678 (2012).
98. Lee, J., Lilly, G. D., Doty, R. C., Podsiadlo, P. & Kotov, N. A. In vitro Toxicity Testing of Nanoparticles in 3D Cell Culture. *Small* **5**, 1213–1221 (2009).
99. Yang, L. *et al.* Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice. *Nanoscale* **7**, 625–636 (2014).
100. Bourrinet, P. *et al.* Preclinical Safety and Pharmacokinetic Profile of Ferumoxtran-10, an Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Magnetic Resonance Contrast Agent: *Invest. Radiol.* **41**, 313–324 (2006).

101. Volkovova, K. *et al.* Health effects of selected nanoparticles *in vivo*: liver function and hepatotoxicity following intravenous injection of titanium dioxide and Na-oleate-coated iron oxide nanoparticles in rodents. *Nanotoxicology* **9**, 95–105 (2015).
102. Wagner, S., Schnorr, J., Pilgrimm, H., Hamm, B. & Taupitz, M. Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging: preclinical *in vivo* characterization. *Invest. Radiol.* **37**, 167–177 (2002).
103. Damadian, R. Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science* **171**, 1151–1153 (1971).
104. Lauffer, R. B. Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design. *Chem. Rev.* **87**, 901–927 (1987).
105. Yim, H. *et al.* The performance of gadolinium diethylene triamine pentaacetate-pullulan hepatocyte-specific T1 contrast agent for MRI. *Biomaterials* **32**, 5187–5194 (2011).
106. Billotey, C. *et al.* Cell internalization of anionic maghemite nanoparticles: Quantitative effect on magnetic resonance imaging. *Magn. Reson. Med.* **49**, 646–654 (2003).
107. Levy, M. *et al.* Long term *in vivo* biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 3988–3999 (2011).
108. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* The One Year Fate of Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles in Mice. *ACS Nano* **9**, 7925–7939 (2015).
109. Arbab, A. S. *et al.* A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed.* **18**, 383–389 (2005).
110. Lévy, M. *et al.* Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties. *Nanotechnology* **21**, 395103 (2010).
111. Lartigue, L. *et al.* Biodegradation of Iron Oxide Nanocubes: High-Resolution In Situ Monitoring. *ACS Nano* **7**, 3939–3952 (2013).
112. Javed, Y. *et al.* Biodegradation Mechanisms of Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers and Tunable Shield Effect of Gold Coating. *Small* **10**, 3325–3337 (2014).
113. López-Castro, J. D. *et al.* From synthetic to natural nanoparticles: monitoring the biodegradation of SPIO (P904) into ferritin by electron microscopy. *Nanoscale* **3**, 4597–4599 (2011).
114. Mazuel, F. *et al.* Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels. *ACS Nano* (2016).

---

# Partie

# I

---

Suivi du devenir des NPOFs à  
l'échelle moléculaire



# Chapitre 1

## Transferts de métaux vers la ferritine

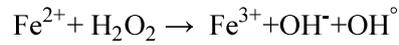
---

### Table des matières

---

- 1. La ferritine : élément essentiel du métabolisme du fer**
  - 1.1 Le cycle de vie du fer
  - 1.2 La ferritine
- 2. Prise en charge du fer issu des nanoparticules à l'échelle nanométrique**
  - 2.1 Méthodologie
  - 2.2 Synthèse des principaux résultats
  - 2.3 Publication associée à l'étude
- 3. Prise en charge de métaux issus de nanoparticules**
  - 3.1 Description du modèle étudié : les ferrites de cobalt
  - 3.2 Méthodologie
  - 3.3 Synthèse des principaux résultats
  - 3.4 Publication associée à l'étude
- 4. Conclusion**

Un des aspects fondamentaux du cycle de vie des NPOFs, abordé dans le chapitre d'introduction, est qu'après endocytose, celles-ci sont dégradées dans les lysosomes, libérant ainsi des ions  $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  dans le cas de la maghémite et de la magnétite, respectivement. Or, le  $\text{Fe}^{2+}$  labile, entité dite redox-active, catalyse la réaction de Fenton et induit un stress oxydant cellulaire *via* la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) selon :



Pour pallier à l'augmentation de la concentration en ERO, la cellule peut stocker le fer sous une forme dite redox-non active, il est alors complexé au sein de protéines telles que la ferritine. La présence de ferritine à proximité de NPOFs localisées dans les lysosomes, ainsi qu'une surexpression des gènes liés à la ferritine, suggère un mécanisme de transfert de fer entre ces entités.<sup>1-3</sup>

Ce chapitre est consacré à l'étude des mécanismes de transferts de métaux issus de nanoparticules inorganiques vers les ferritines. Nous aborderons dans une première partie le rôle de la ferritine dans le métabolisme du fer ainsi que la structure et les processus de stockage de la ferritine. La deuxième partie est dédiée à l'étude des mécanismes de transferts en solution ainsi que les conséquences de la présence de ferritine sur la dégradation des nanoparticules. La troisième et dernière partie a pour objectif de mettre en évidence ces transferts *in vivo*.

# 1. La ferritine : élément essentiel du métabolisme du fer

Le fer est un élément essentiel pour l'organisme. Celui-ci est présent au sein de protéines telles que la myoglobine, l'hémoglobine et différentes protéines composées d'un cluster fer-soufre. Ces protéines sont impliquées dans différents processus biologiques fondamentaux tels que la respiration, le transport de l'oxygène et la synthèse d'ADN.<sup>4,5</sup> Deux degrés d'oxydation du fer sont présents dans l'organisme, le fer (II) et le fer (III). Un excès de fer libre dans l'organisme catalyse la réaction de Fenton et augmente la production d'ERO, pouvant endommager les protéines, les lipides et l'ADN. Au contraire, un manque de fer impacte la prolifération cellulaire. Le fer peut être ainsi lié à différentes pathologies telles que l'anémie (manque de fer), l'hémochromatose (fer en excès) ou encore impliqué dans différentes maladies neurodégénératives telles que Parkinson ou Alzheimer.<sup>6-8</sup> Ainsi, la quantité de fer est une grandeur finement régulée par l'organisme.

## 1.1 Le cycle de vie du fer

L'organisme contient 4 à 5 grammes de fer pour un adulte de 70 kg. La moitié, soit environ 2,5 grammes, est incorporée dans l'hémoglobine, au sein des érythrocytes (globules rouges). Un peu moins de la moitié, soit 1 à 2 grammes environ, est stockée dans les ferritines principalement des macrophages du foie et de la rate.<sup>9</sup> Enfin, le reste de fer est utilisé au sein de différentes ferroprotéines telles que la myoglobine ou les cytochromes. Seule une quantité très faible, de l'ordre du milligramme, circule dans le plasma sanguin lié à la transferrine.<sup>5,9</sup> Le fer issu de l'alimentation est absorbé par les cellules de l'intestin, les entérocytes, puis exporté dans la circulation sanguine afin de répondre aux différents besoins de l'organisme. Il est alors utilisé au sein de métalloprotéines ou dirigé vers différentes cellules telles que les érythrocytes ou vers les macrophages du foie et de la rate où il sera stocké (Figure 1.1).<sup>9</sup>

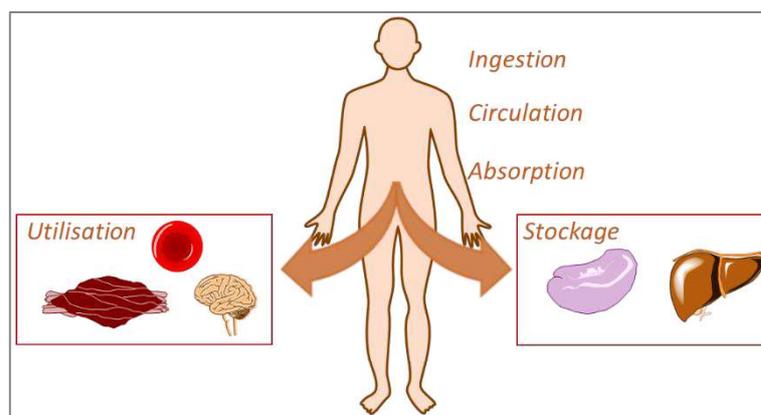


Figure 1.1 : Cycle de vie du fer. Après ingestion, le fer circule dans le tube digestif jusqu'à atteindre l'intestin où il est absorbé. Il est ensuite distribué vers différentes cellules pour être utilisé ou stocké. Figure inspirée de [9].

### 1.1.1 Absorption du fer

Le parcours du fer depuis l'absorption jusqu'à l'entrée dans la circulation sanguine est présenté Figure 1.2. L'absorption du fer a lieu dans le duodenum au sein des cellules intestinales, les entérocytes. Deux états d'oxydation du fer peuvent être absorbés, le fer héminique au degré d'oxydation (II) et le fer non-héminique au degré d'oxydation (III). Le fer héminique est associé à un hème, celui possède une structure porphyrrique et permet de complexer le fer. A titre d'exemple, le fer héminique est présent au sein de l'hémoglobine, et permet de fixer les molécules de dioxygène pour leur transport dans l'organisme. Dans un premier temps, le fer non héminique est réduit à la membrane de l'entérocyte par l'enzyme réductase Dcytb (*duodenal cytochrome*) puis transporté au sein de l'entérocyte par la protéine transporteur d'ion divalent DMT1 (*divalent metal transporter 1*). Le fer héminique est quant à lui internalisé dans l'entérocyte via la protéine HCP1 (*heme carrier protein 1*).<sup>9-11</sup> Une fois dans les entérocytes, les hèmes sont dégradés par l'oxygénase HO-1 (hème oxygénase 1) libérant du fer (II), qui est acheminé dans la circulation sanguine par la ferroportine, une protéine présente à la membrane cellulaire des entérocytes. Le fer est ensuite pris en charge dans le plasma par les transferrines, protéines pouvant transporter deux atomes de fer. Les transferrines interagissent uniquement avec le fer à l'état d'oxydation (III). Ainsi la ferroportine est associée à des ferroxidases telles que l'héphaestine, qui oxyde le fer (II) en fer (III).

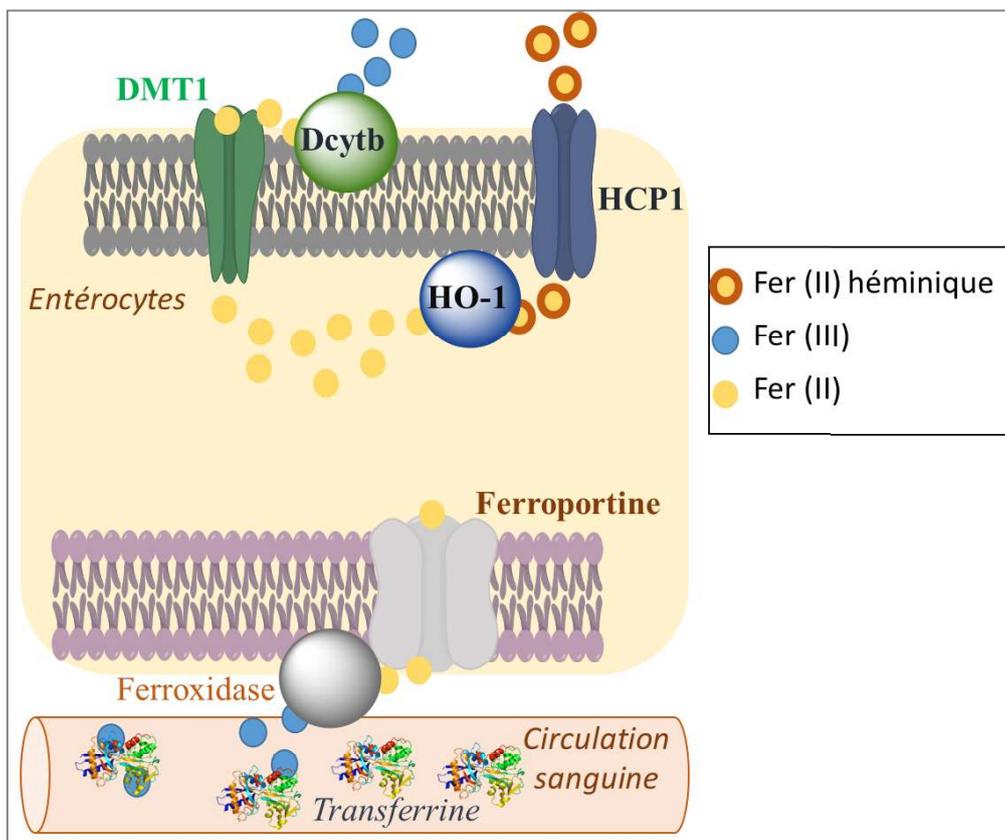


Figure 1.2 : Parcours du fer depuis l'absorption par les entérocyte jusqu'à la libération dans la circulation sanguine. Figure inspirée de [9].

### 1.1.2 Internalisation cellulaire.

Dans la circulation sanguine, le fer est lié à la transferrine, formant ainsi un complexe binucléaire transferrine-fer,  $Tf(Fe)_2$ .<sup>12</sup> Ce complexe est acheminé vers les cellules par l'intermédiaire des récepteurs de la transferrine TfR1, exprimés à la surface des cellules.<sup>12,13</sup> Il est ensuite internalisé dans la cellule par endocytose. Des complexes mononucléaires peuvent également être internalisés par ce mécanisme. Cependant l'affinité du récepteur TfR1 est plus faible pour ces derniers et presque nulle pour l'apo-transferrine (transferrine dépourvue de fer), ce qui rend ce processus sélectif du fer. Le complexe  $Tf(Fe)_2$ -TfR1 est acheminé vers les endosomes dont le pH, proche de 4,7, favorise sa dissociation, libérant ainsi les ions  $Fe^{3+}$  de la transferrine. Le récepteur TfR1 ainsi que l'apo-transferrine, protéine résultante de la dissociation du fer, sont alors excrétés de la cellule.<sup>13</sup> Le fer (III) est réduit en fer (II) par l'enzyme réductase STEAP3 avant d'être transféré dans le cytosol par le transporteur d'ion divalent DMT1 pour rejoindre la réserve de fer labile (non complexé par des protéines de haut poids moléculaire).<sup>13</sup> Le fer est alors chélaté par différentes petites molécules telles que le citrate.<sup>14-16</sup> Il est ensuite distribué et utilisé au sein des différents compartiments cellulaires. Selon les besoins de l'organisme, trois processus sont possibles (Figure 1.3):

- L'acheminement vers les mitochondries pour la formation de métalloprotéines (hème, clusters fer-soufre). Le fer est transporté vers les mitochondries soit par un mécanisme dit de « *kiss and run* », impliquant l'internalisation du fer dans des vésicules soit grâce à différents transporteurs du fer tels que les mitoferrines, paraferritines ou ferritines<sup>11</sup>.
- L'exportation hors de la cellule via des ferroportines associées à des ferroxidases.
- Le stockage au sein des ferritines.

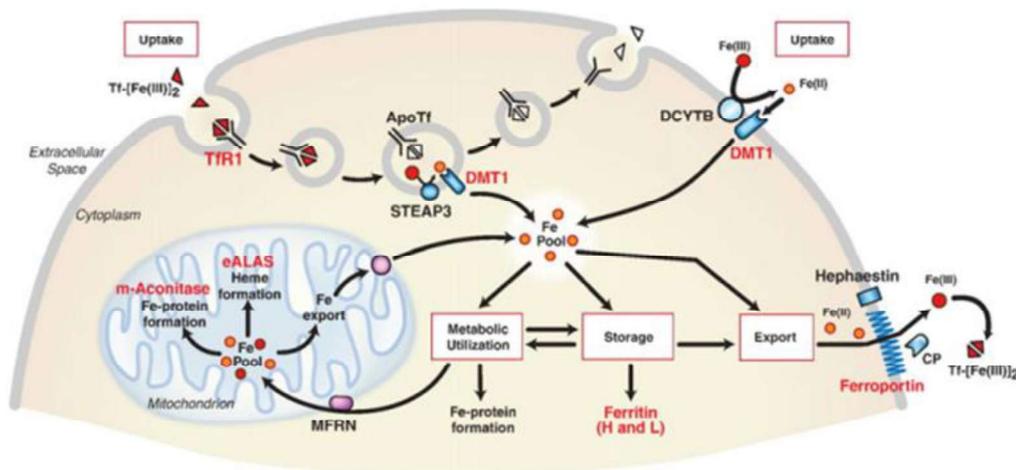


Figure 1.3 : Parcours intracellulaire du fer.<sup>13</sup> Le fer est importé dans les cellules sous la forme du complexe  $Tf(Fe)_2$ , puis après dissociation de ce complexe rejoint la réserve de fer libre pour être utilisé, stocké ou exporté de la cellule. Extrait de [13].

Le fer stocké dans les ferritines peut ensuite être libéré selon les besoins de l'organisme. La concentration intracellulaire en fer est finement régulée par l'hepcidine, une hormone sécrétée par les hépatocytes (cellules du foie), et les protéines régulatrices du fer (IRP1 et IRP2) permettant de contrôler la synthèse de protéines intervenant dans le métabolisme du fer. Ainsi la ferritine constitue un élément essentiel du métabolisme du fer.

## 1.2 La ferritine

La ferritine est une protéine pouvant stocker jusqu'à 4500 atomes de fer. Elle est constituée d'une couronne de protéines de 12 nm de diamètre et d'une cavité de 8 nm de diamètre où sont stockés les atomes de fer. La ferritine est présente essentiellement dans le cytosol mais aussi dans les lysosomes, dans les mitochondries et dans le sang.<sup>1,2,11</sup>

### 1.2.1 Structure de la ferritine

La couronne protéique appelée apo-ferritine est constituée de 24 sous unités peptidiques identiques. On distingue deux types de sous-unités partageant la même séquence d'acides aminés à 55% : la chaîne H, *heavy-chain*, constituée de 182 acides aminés et la chaîne L, *light-chain*, constituée de 174 acides aminés.<sup>17</sup> La chaîne H est responsable de l'oxydation du fer (II) en fer (III) et la chaîne L de la nucléation d'oxyde de fer dans la cavité de la ferritine, sous la forme d'une structure polyphasique. Les sous-unités, constituées de quatre hélices alpha, interagissent deux à deux afin de former des dimères, puis l'auto-assemblage de ceux-ci forme la couronne de protéines (Figure 1.4).<sup>18</sup>

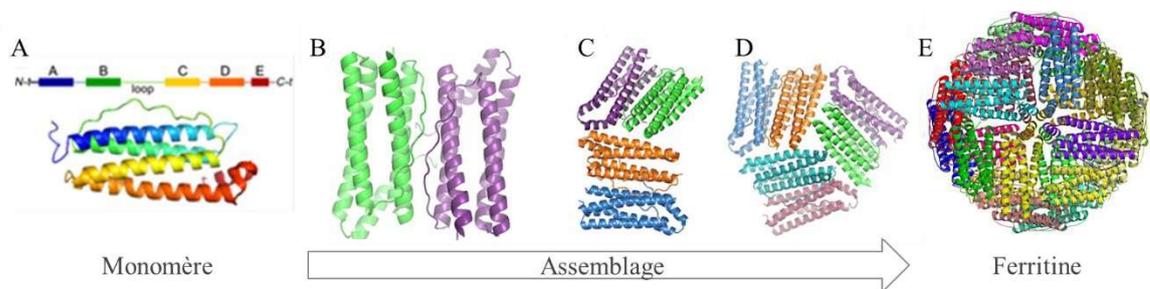


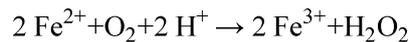
Figure 1.4 : Assemblage de la ferritine : monomère constitué de quatre hélices alpha (A), formation de dimères (B), assemblage de deux (C) et trois (D) dimères. Extrait de [18]. Structure de la ferritine (E). Image extraite de la *protein data bank* (PDB), code : 3KX9.

### 1.2.2 Stockage du fer

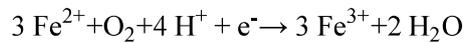
La Figure 1.5 (A) résume le parcours du fer dans les canaux de la ferritine, depuis son entrée jusqu'à la nucléation au sein de la cavité. Le fer, à l'état d'oxydation (II), présent dans le cytoplasme, est acheminé vers les ferritines grâce à des protéines chaperones telle que PCBP1, *poly(RC)-binding protein 1*.<sup>9,18</sup> Le fer (II) pénètre dans la ferritine *via* des canaux présents à la surface de la structure en cage. Il est ensuite dirigé vers le centre ferroxidase grâce à un gradient électrostatique au sein des canaux,

engendré via des résidus chargés négativement. Le fer (II) est ensuite oxydé en fer (III) par le centre ferroxidase situé dans la chaîne H. Le centre catalytique, situé au milieu de chaque sous-unité, possède trois sites de liaison du fer A, B et C. Les sites A et B sont situés au centre des hélices alpha, et le site C est proche de la surface interne de la ferritine. Deux mécanismes d'oxydation peuvent avoir lieu en fonction du nombre d'atomes de fer liés au site A, B et C.

Si un atome de fer (II) est lié à chaque site A et B, ceux-ci sont oxydés par le dioxygène présent dans la ferritine selon la réaction suivante :



Si un atome de fer (II) est lié à chaque site A, B et C alors le fer (II) est oxydé en fer (III) selon la réaction :



L'apport d'électron est issu d'un résidu tyrosine proche du site B. Dans les deux cas, deux intermédiaires sont formés durant l'oxydation du fer (II) en fer (III). Le premier intermédiaire, observé dans des ferritines issues de cellules eucaryotes, de bactéries et d'archées (archéobactéries), de couleur bleue, a été détecté par spectroscopie UV-visible. La structure de cet intermédiaire n'a pas encore été déterminée, cependant plusieurs hypothèses convergent sur la formation d'un dimère de fer relié par des ponts oxygènes.<sup>18</sup> Le second intermédiaire est une espèce radicalaire mise en évidence par spectroscopie par RPE. Lorsqu'un troisième atome de fer (II) est présent sur le site C du centre catalytique, le résidu tyrosine permet une réduction du dioxygène en eau, formant une espèce radicalaire Tyr•. Celle-ci est alors réduite par l'atome de fer (II) sur le site C ou par un autre partenaire oxydo-réducteur. Cette réaction permet la production d'eau au lieu de la production de peroxyde d'hydrogène, évitant ainsi la production d'ERO. Les espèces produites après l'oxydation du fer (II) ont été analysées par spectroscopie Mössbauer du fer 57. Environ 60 à 80 % du fer (II) est oxydé dans le centre ferroxidase et forme le dimère Fe(III)-O(H)-Fe(III) *via* l'intermédiaire bleu. Les 20 à 40 % restant sont oxydés au niveau du site C et les espèces formées sont des monomères, trimères ou clusters de fer (III).<sup>18</sup> Le fer (III) reste alors au sein du centre ferroxidase avant d'être déplacé vers la cavité de la ferritine sous la forme d'une structure polyphasique constituée de ferrihydrite majoritairement, de magnétite et d'hématite.<sup>17,19</sup> L'analyse de la taille de cette structure cristalline montre la formation de nanoparticules sphériques et monodisperses d'un diamètre égal à environ 5 nm. La nucléation et la formation du cœur cristallin ont lieu au sein de la chaîne L grâce à des résidus glutamates et histidine.<sup>17,20</sup> Cette dernière permet le stockage lorsque le fer intracellulaire est en excès. La chaîne H quant à elle est un véritable anti oxydant grâce à la séquestration rapide et l'oxydation du fer (II) en fer (III). Ainsi, le ratio des chaînes H et L peut être modulé selon les besoins d'agents antioxydants et cytoprotecteurs<sup>11</sup> et de la localisation de la ferritine. A titre d'exemple, dans le foie ou la rate, lieux de stockage du fer, les ferritines

présentes sont riches en chaînes L, tandis que dans les muscles, le cœur ou le cerveau, elles sont riches en chaînes H.<sup>11</sup>

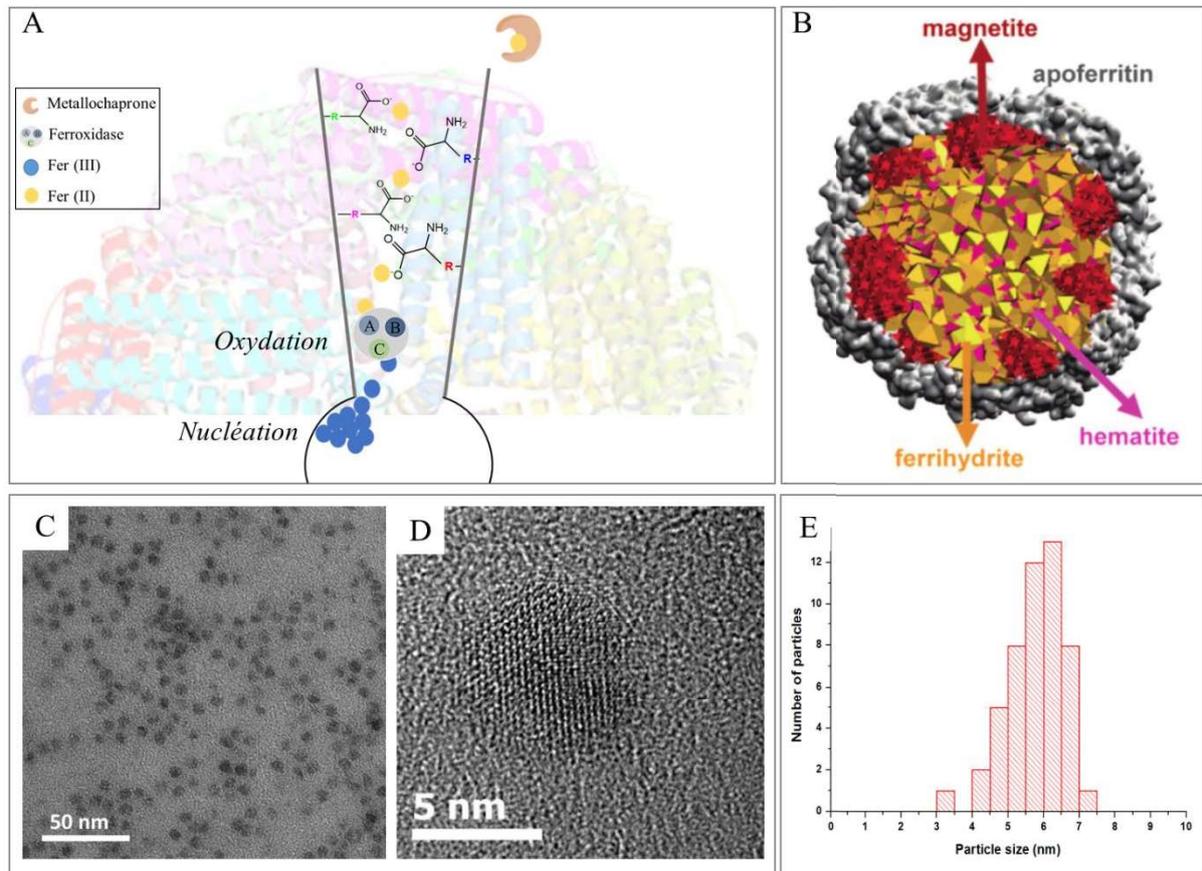


Figure 1.5 : Stockage du fer au sein de la ferritine. Entrée du fer via des métallochaperones. Le fer est ensuite guidé dans les canaux de la ferritine grâce à un gradient électrostatique engendré par les résidus jusqu'à atteindre le centre ferroxidase (A). Il est ensuite oxydé en fer (III). La nucléation a lieu dans la cavité, formant une structure cristalline polyphasique constituée de magnétite, d'hématite et de ferrihydrite (B), extrait de [19]. Image de MET (C) et de MET haute résolution (D) de ferritine issue de rate équine. Distribution en taille des nanoparticules sphériques formées au sein des ferritines (E).

### 1.2.3 Régulation du fer

Lorsque le fer cytosolique est en excès, celui-ci est acheminé vers les ferritines pour être stocké sous la forme redox non active (fer non accessible par le peroxyde d'hydrogène). Dans le cas de certaines pathologies impliquant un dysfonctionnement dans l'homéostasie du fer (maladie de la ferroportine, taux d'hepcidine trop élevé), les ferritines peuvent être directement excrétées de la cellule par exocytose permettant ainsi de protéger les cellules d'une surcharge en fer.<sup>11</sup>

Au contraire, lorsque la cellule manque de fer, celui-ci est relargué de la ferritine. Les mécanismes de libération du fer *in vivo* sont encore mal connus. Une première hypothèse est que d'autres protéines, telles que la transferrine, captent le fer (III) de la ferritine. Alors que le temps caractéristique de ce processus est de l'ordre de la minute lorsque la source de fer (III) provient du centre ferroxidase, il est

de quelques jours lorsque le fer provient du cœur cristallin. Un autre mécanisme de libération du fer proposé est la dégradation de la ferritine *via* l'internalisation de celle-ci dans les lysosomes par autophagie.<sup>21,22</sup> Les conditions acides des lysosomes et la présence d'enzymes protéolytiques facilitent la dégradation de la ferritine. Le fer est ensuite relargué du compartiment endo/lysosomal vers le cytosol *via* différents transporteurs du fer tels que DMT1 ou TRMPL1.

La concentration intracellulaire de la ferritine est régulée par les protéines régulatrices du fer IRP1 et IRP2, capables de se fixer sur les sites spécifiques IRE, *iron responsive element*, de l'ARN messager codant la ferritine.

#### **1.2.4 La ferritine comme antioxydant**

Pour protéger les cellules, le fer intracellulaire est majoritairement complexé par différentes protéines ou stocké sous forme redox non-active afin de limiter la production de radicaux libres.<sup>22</sup> Après l'internalisation intracellulaire du fer, celui-ci est séquestré dans les compartiments endo/lysosomaux avant d'être distribué aux différents organites intracellulaires (section 1.1.2). Les compartiments endo/lysosomaux sont ainsi de véritables rhéostats contrôlant les flux intracellulaires du fer. Dans les lysosomes, une quantité trop importante de fer sous forme redox active (fer (II)) favorise la production de radicaux libres qui augmentent la perméabilisation de la membrane lysosomale et induit le relargage d'enzymes lysosomales dans le cytosol. Dans certains cas, ce phénomène peut induire l'apoptose ou la nécrose des cellules.<sup>22,23</sup> La cellule peut pallier à une augmentation de la concentration du fer intracellulaire *via* l'import d'apoferritine dans les lysosomes par autophagie<sup>22,24</sup> ou encore *via* la synthèse de ferritine *de novo*.<sup>11</sup>

Le rôle de la ferritine dans les lysosomes est double, elle peut soit être dégradée pour relarguer le fer afin de subvenir aux besoins de la cellule (ferritine saturée), soit être un véritable antioxydant en captant le fer sous forme redox active et ainsi protéger la cellule d'un potentiel stress oxydant (ferritine non saturée).

## 2. Prise en charge du fer issu des nanoparticules à l'échelle nanométrique

---

La présence de ferritines à proximité des nanoparticules de maghémite dégradées dans les lysosomes suggère que le fer issu de leur dégradation est pris en charge par les ferritines.<sup>1,2</sup> Cependant, la complexité du milieu biologique et la haute concentration en fer endogène ne permettent pas de sonder sélectivement ces phénomènes *in vivo*. La quantité de fer endogène s'élève à quelques grammes (4 grammes) et les doses injectées en fer, pour l'IRM, sont de l'ordre de la centaine de milligramme (environ 200 mg) pour un homme de 70 kilogrammes. Aussi un des objectifs de mes travaux de thèse a été de développer une méthodologie pour étudier les possibles interactions entre les NPOFs et les ferritines. Et en particulier, tester le remplissage des ferritines par du fer issu de la dégradation de NPOFs, et évaluer si la présence de ferritine pouvait avoir une influence sur la dégradation des NPOFs.

La stratégie adoptée pour cette étude a été de faire interagir des NPOFs avec des ferritines dans un milieu mimant les conditions lysosomales et de suivre le remplissage des ferritines par spectroscopie UV-visible. En parallèle un suivi des propriétés magnétiques et structurales des NPOFs en présence ou non de ferritine a été réalisé pour évaluer l'influence de la ferritine sur la dégradation des NPOFs. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal *Small*.

Ferritin protein regulates the degradation of iron oxide nanoparticles.

J. Volatron, F. Carn, J. Kolosnjaj-Tabi, Y. Javed, Q.L. Vuong, Y. Gossuin, C. Ménager, N. Luciani, G. Charron, M. Hémadi, D. Alloyeau, et F. Gazeau.

*Small*, 2016

Dans cette partie je vous présenterais d'une part la méthodologie développée pour étudier ces phénomènes. Puis je résumerai les questions que nous nous sommes posées à travers cette étude et les principaux résultats que nous avons obtenus.

### 2.1 Méthodologie

#### 2.1.1 Modélisation de l'environnement biologique.

Les études *in vivo* présentées dans l'introduction ont montré qu'après injection de NPOFs par voie intraveineuse, celles-ci sont confinées dans les lysosomes.<sup>1</sup> En outre, dans ceux-ci, les NPOFs se dégradent et coexistent avec les ferritines endogènes.<sup>1,2</sup> Une première hypothèse est que les atomes de fer issus de la dégradation des NPOFs sont pris en charge par les ferritines. Aussi il est nécessaire de se placer dans des conditions permettant la dégradation de celles-ci.

Des études réalisées précédemment au laboratoire, et présentées dans l'introduction de ce manuscrit, ont montré que dans un milieu mimant les conditions lysosomales, les nanoparticules se dissolvent et libèrent, dans le cas de NPOFs de maghémite, du fer (III).<sup>2,25,26</sup> Le suivi de la dégradation de NPOFs de forme cubique a permis d'évaluer d'une part les processus de dégradation à l'échelle nanométrique et, d'autre part, l'influence de différents paramètres sur les cinétiques de dégradation, tels que l'enrobage des NPOFs.<sup>2</sup> La Figure 2.1 montre les images obtenues en MET haute résolution de NPOFs de forme cubique enrobées d'un polymère PEG ou amphiphile dans le milieu mimant les conditions lysosomales, à différents temps. On constate d'une part que les nanocubes se dissolvent dans le milieu mimant les conditions lysosomales, et que les cinétiques de dissolutions dépendent de l'enrobage des nanocube. En effet, les nanocubes enrobés d'un polymère amphiphile (A) semblent se dissoudre à partir de 90 minutes alors que ceux enrobés avec du PEG semblent se dissoudre à partir de 40 minutes.

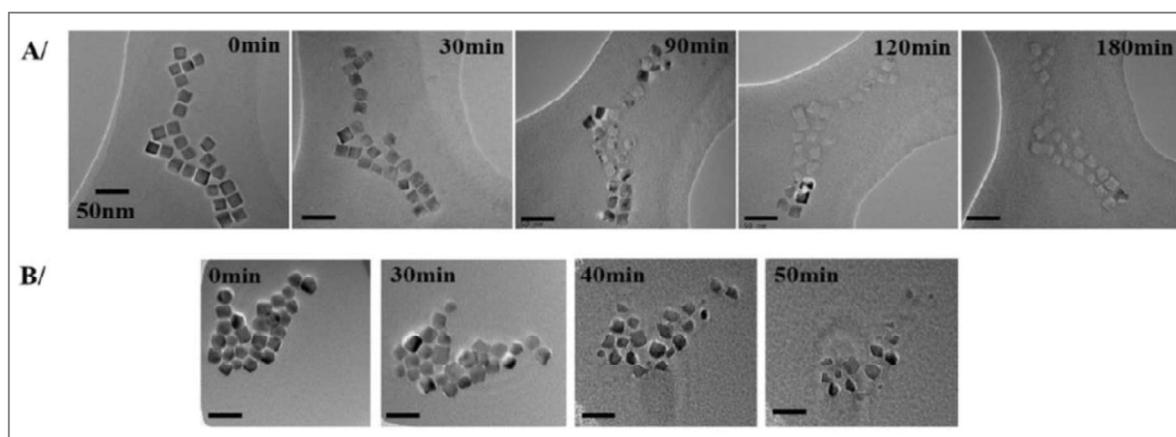


Figure 2.1 : Suivi en MET haute résolution de la dégradation de NPOFs de forme cubiques enrobées d'un polymère amphiphile (A) ou avec un PEG (B), dans le milieu mimant les conditions lysosomales. Image extraites de [2].

Nous avons choisi d'étudier les phénomènes de remplissage des ferritines dans ce milieu reproduisant les conditions lysosomales. Ce milieu, décrit par Arbab *et al.*<sup>14</sup>, est tamponné au pH du lysosome, égal à 4,7 et supplémenté en ions citrates. Il constitue ainsi un milieu modèle minimal permettant de reproduire les conditions d'acidité et de chélation des lysosomes. En outre, l'avantage de ce milieu est qu'il permet de s'affranchir de la complexité du milieu endogène et de mettre en évidence sélectivement les phénomènes de remplissage des ferritines.

### 2.1.2 Nanoparticules d'oxyde de fer.

Afin d'évaluer l'influence de l'enrobage sur le remplissage et la dégradation des NPOFs, nous avons testé des NPOFs possédant un cœur magnétique de maghémite  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  identique et enrobées de citrate ou de dextran. Le citrate, chargé négativement à pH 4,7, favorise les interactions avec les protéines. Au contraire, le dextran est un polysaccharide neutre, et minimise les interactions avec les

protéines, il est caractérisé d'enrobage *antifouling*. Les NPOFs ont été synthétisées par notre collaboratrice Christine Ménager du laboratoire Phénix de l'Université Pierre et Marie Curie.

### **2.1.3 Nanométrie**

#### **2.1.3.1 Dégradation des NPOFs dans le milieu modèle**

L'évolution des propriétés magnétiques et structurales des nanoparticules dans le milieu modèle a été suivie au cours du temps. Les propriétés magnétiques ont été caractérisées par RFM et relaxométrie RMN, deux techniques présentées dans l'introduction. Les mesures de relaxométrie RMN ont permis de quantifier les temps de relaxation longitudinaux et transversaux de la suspension au cours du temps. Elles ont été réalisées pour des fréquences de Larmor de 40 et 60 MHz et sur une gamme de fréquences de Larmor comprises entre 0,01 et 40 MHz (RMN en dispersion). L'étude des propriétés magnétiques des NPOFs par RMN permet d'une part de caractériser leur évolution et d'autre part leur efficacité en tant qu'agent de contraste pour l'IRM.

Le suivi de l'évolution des propriétés structurales des nanoparticules, c'est-à-dire l'évolution de leur taille et de leur état d'agrégation, a été réalisé par MET, diffusion dynamique de la lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering) et par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS pour *Small Angle X-rays Scattering*). La DLS est une technique d'analyse spectroscopique non destructive permettant d'accéder au rayon hydrodynamique des nanoparticules. La MET et le SAXS permettent de sonder directement la taille du cœur inorganique des nanoparticules. Ces études en solution possèdent l'avantage de pouvoir utiliser des techniques supplémentaires telles que la DLS qui nécessite une solution homogène et n'est pas adaptée aux études *in vivo*, et logistiquement moins contraignantes telles que la relaxométrie RMN plutôt que l'IRM.

La combinaison de ces méthodes complémentaires a permis de caractériser intégralement les propriétés des NPOFs au cours du temps (Figure 2.2).

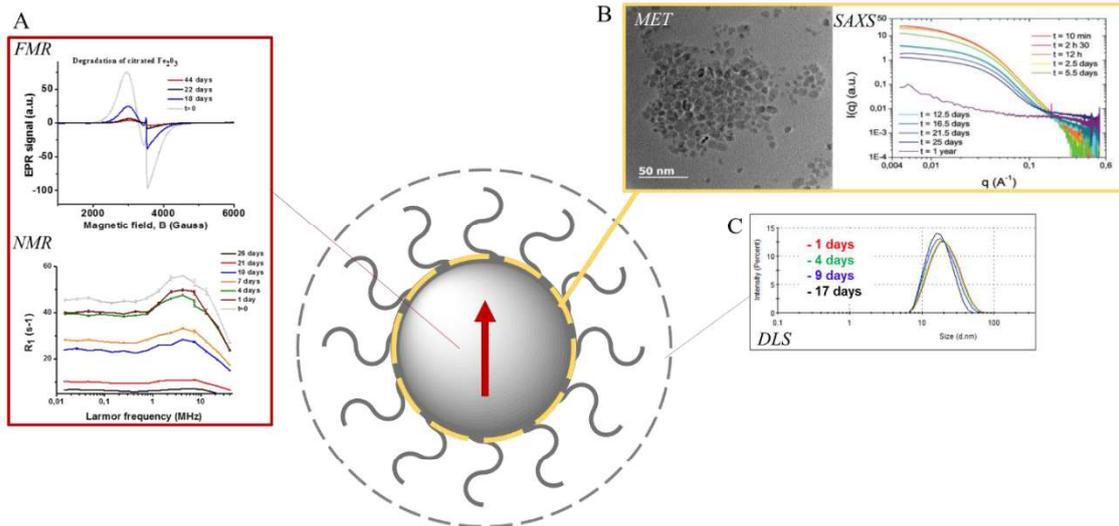


Figure 2.2 : Caractérisations des propriétés magnétiques et structurales des NPOFs. Leurs propriétés magnétiques sont caractérisées par RFM et relaxométrie RMN (A). La taille du cœur inorganique est évaluée par MET et SAXS (B), la taille du diamètre hydrodynamique des nanoparticules par DLS (C).

### 2.1.3.2 Interaction entre NPOFs et ferritines

#### - Remplissage de la ferritine.

Une stratégie développée pour étudier les phénomènes de remplissage de la ferritine est d'utiliser une ferritine dépourvue de fer, l'apo-ferritine.<sup>27</sup> En effet, la ferritine et l'apo-ferritine présentent des signaux différents en spectroscopie UV-visible, ainsi, il est possible de suivre le remplissage de l'apo-ferritine lorsqu'on l'expose à une source de fer.<sup>28-30</sup> En particulier, la bande à 280 nm du spectre UV-visible de l'apo-ferritine (flèche bleue, Figure 2.3), se transforme en épaulement pour la ferritine qui caractérise le remplissage de la ferritine par différents cations tels que le cobalt  $\text{Co}^{2+}$ , le platine  $\text{Pt}^{2+}$  ou encore l'yttrium  $\text{Y}^{3+}$  (flèche grise, Figure 2.3).

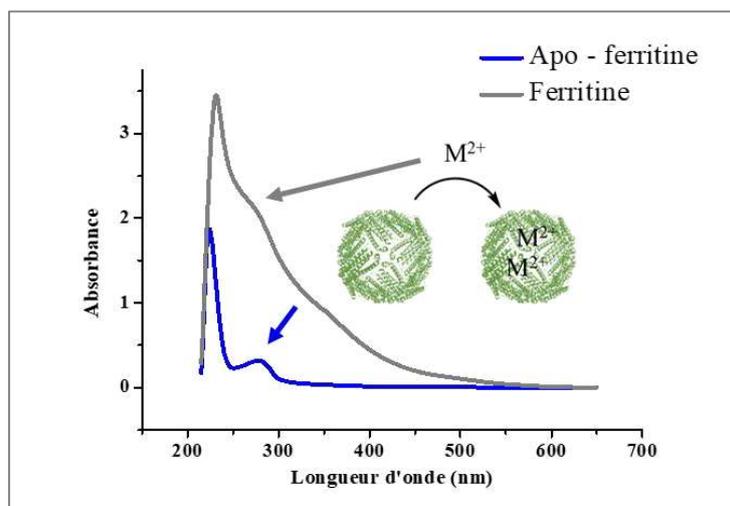


Figure 2.3 : Spectre UV-visible de la ferritine (gris) et de l'apo-ferritine (bleu). La bande de l'apo-ferritine à 280 nm se transforme en épaulement pour la ferritine, caractéristique du remplissage par des métaux.

- *Dégradation des nanoparticules en présence d'apo-ferritine.*

La dégradation des NPOFs a été suivie en premier lieu dans le milieu modélisant les conditions lysosomales seul, pour une concentration en fer initiale égale à 10 mM. Les NPOFs ont ensuite été mises en présence de différents ratios d'apo-ferritine. La quantité d'apo-ferritine ajoutée dans la solution de NPOFs de concentration initiale en fer égale à 10 mM, permet de définir le ratio  $\xi$  tel que :

$$\xi = \frac{\text{Nombre d'atomes de fer dans les NPOFs}}{\text{Nombre de sites de stockage disponibles dans les ferritines}}$$

Le nombre de sites de stockage disponibles représente le nombre total d'atomes de fer pouvant être stockés au sein d'une apo-ferritine, soit 4500. Les ratios  $\xi = 1$ ,  $1/2$  et  $1/4$  ont été testés. Pour le ratio  $\xi = 1$ , il y a autant d'atomes de fer dans les NPOFs initialement que de sites de stockage disponibles ; pour le ratio  $\xi = 1/4$ , l'apo-ferritine est en excès et il y a quatre fois plus de sites de stockages disponibles que d'atomes de fer présents.

L'influence de différents ratios d'apo-ferritine sur les propriétés des NPOFs et leur dégradation a été analysée par SAXS et RFM, respectivement.

## 2.2 Synthèse des principaux résultats.

Pour illustrer les principaux résultats, je ferais référence aux figures de l'article Small associé à cette étude. Celui-ci est inclus dans le manuscrit à la suite de cette section.

### Les NPOFs se dissolvent elles dans le milieu modèle ?

Le suivi de l'évolution des propriétés magnétiques et structurales des nanoparticules a été réalisé dans le milieu modèle. On observe une diminution du signal magnétique et des temps de relaxation dès 24 heures d'incubation, témoignant la dissolution des NPOFs (Figure 2, *Small*). L'évaluation des propriétés structurales des nanoparticules montre que la diminution des propriétés magnétiques s'effectue à taille de NPOFs constante (Figure 3 (A, B & C), *Small*). L'ensemble de ces résultats montre que les NPOFs se dissolvent par un mécanisme de « tout ou rien », présenté dans le chapitre d'introduction. Les NPOFs attaquées par les molécules de citrate sont intégralement dissoutes tandis que d'autres demeurent intactes.

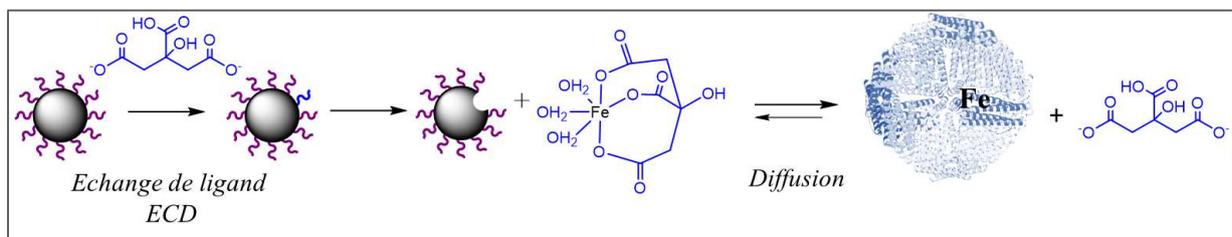
### Le fer à l'état d'oxydation (+III) peut-il être stocké dans la ferritine ?

Dans la section 1.2.2 nous avons introduit les mécanismes physiologiques le remplissage *in vivo* des ferritines endogènes. C'est le fer à l'état d'oxydation (II) qui pénètre au sein des canaux de la ferritine avant d'être oxydé en fer (III). Pour cette raison, la plupart des études de remplissage de la ferritine ont été réalisées avec du fer (II) et dans des conditions d'incubations différentes (milieu, pH et température).<sup>31-33</sup> Or, les NPOFs utilisées sont de la maghémite  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ , et donc constituées de fer à l'état d'oxydation (III). En premier lieu, nous avons donc vérifié la possibilité du le remplissage effectif de la

ferritine à partir de sels de fer à l'état d'oxydation (III), et en particulier à partir du complexe nitrilotriacétique de fer, FeNTA. Ce complexe a été incubé avec de l'apo-ferritine à 37°C dans le milieu modèle. Les résultats en spectroscopie UV-visible confirment le remplissage de l'apo-ferritine par les sels de fer un jour après mise en présence de ces derniers avec l'apo-ferritine (Figure 5 (A), *Small*). L'analyse en MET deux mois après incubation montre la présence de nanoparticules cristallines d'un diamètre de 3,5 nm ( $\pm 0,9$  nm) présentant une structure spinelle inverse correspondant à la magnétite et à la maghémite (Figure 5 (E, F), *Small*). Les distances interréticulaires caractéristiques de la structure spinelle inverse et de l'hématite étant très proches, nous n'excluons pas la présence d'hématite au sein des nanoparticules formées à l'intérieur de l'apo-ferritine.

### Qu'en est-il du fer issu des NPOFs ?

Les NPOFs ont été incubées avec de l'apo-ferritine dans le milieu modèle à 37°C. Le suivi de l'évolution du signal de l'apo-ferritine en spectroscopie UV-visible montre un transfert de fer issu des nanoparticules vers cette dernière (Figure 6, *Small*). Ce transfert est caractérisé par une cinétique rapide durant les deux premiers jours avant d'atteindre un palier. L'étude de ce phénomène pour les mêmes nanoparticules avec des enrobages différents a permis de mettre en évidence un ralentissement de la cinétique de transfert pour des nanoparticules enrobées de dextran comparativement à celles enrobées de citrate. Les nanoparticules enrobées de dextran ont également montré une cinétique de dégradation plus lente dans la solution mimant les conditions lysosomales, en absence d'apo-ferritine. Ces observations ont permis de formuler une première hypothèse quant au mécanisme de transfert de fer issu des nanoparticules vers les apo-ferritines : la première étape de ce mécanisme est une dissolution des nanoparticules par les molécules de citrate, aboutissant à la formation de complexes fer – citrate. Cette étape, qui est caractérisée par un échange de ligand entre l'enrobage des nanoparticules et les molécules de citrate, constitue l'étape cinétiquement déterminante du processus de transfert. Ces complexes sont ensuite acheminés, par diffusion, vers l'apo-ferritine puis complexés par celle-ci *via* un échange de ligand **Figure 2.4** : Mécanisme de transfert de fer issu des nanoparticules vers l'apo-ferritine. La première étape d'échange de ligand est l'étape cinétiquement déterminante. Les complexes fer-citrate sont ensuite acheminés vers l'apoferritine, où ils seront complexés par cette dernière. (Figure 2.4).

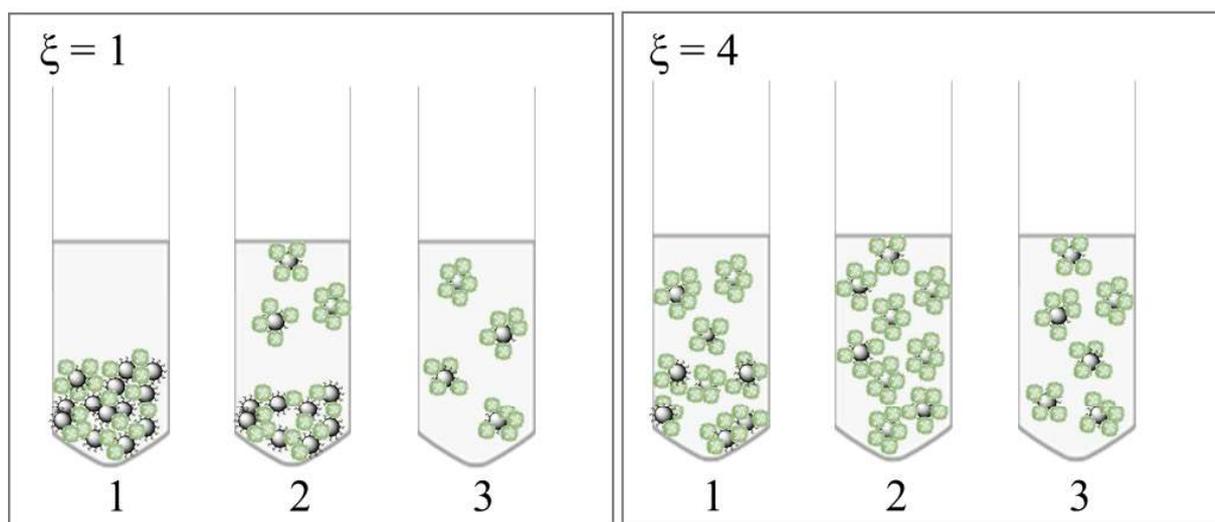


**Figure 2.4** : Mécanisme de transfert de fer issu des nanoparticules vers l'apo-ferritine. La première étape d'échange de ligand est l'étape cinétiquement déterminante. Les complexes fer-citrate sont ensuite acheminés vers l'apoferritine, où ils seront complexés par cette dernière.

### Quelle est l'influence de la présence d'apo-ferritine sur la dégradation des NPOFs ?

Nous avons montré dans le paragraphe précédent que le fer issu des NPOFs peut être stocké au sein des apo-ferritines. Or, en stockant le fer, l'apo-ferritine pourrait déplacer l'équilibre de la dissolution des nanoparticules et ainsi modifier les cinétiques de dégradation des NPOFs, et en particulier, les accélérer. Nous avons constaté au contraire qu'en augmentant la quantité d'apo-ferritine ajoutée aux nanoparticules, la cinétique de dégradation est significativement ralentie comparativement à celle des nanoparticules seules (Figure 7, *Small*).

Afin de comprendre ce phénomène, les solutions contenant les NPOFs avec différents ratios d'apo-ferritines ont été analysées par SAXS. Les résultats montrent d'une part la présence d'agrégats dans les solutions, dus à la formation d'une couronne d'apo-ferritines autour des NPOFs, et, d'autre part, que la nature de ces agrégats dépend du ratio d'apo-ferritines ajouté (Figure 8, *Small*). Néanmoins pour l'ensemble des ratios d'apo-ferritines ajouté, la dynamique d'évolution des agrégats est caractérisée par trois étapes distinctes. Les NPOFs qui initialement sont bien dispersées dans le milieu modèle sont déstabilisées lors de l'ajout d'apo-ferritines, ce qui est caractérisé par la formation d'agrégats. Pour le ratio  $\xi = 1$ , deux phases distinctes apparaissent au bout de deux jours (le culot et le surnageant). En augmentant la quantité d'apo-ferritine, la séparation de phase est plus lente et incomplète. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la quantité d'apo-ferritines tend à former un enrobage homogène autour des NPOFs et ainsi à les stabiliser. La deuxième étape est caractérisée par la redispersion d'une partie des agrégats du culot vers le surnageant. En effet lors de la dégradation des NPOFs, le nombre d'apo-ferritines par NPOFs augmente ce qui les stabilise. La troisième et dernière étape est caractérisée par la stabilisation de l'ensemble des agrégats NPOFs-Apo-ferritines, la solution est alors homogène. La Figure 2.5 représente les différentes étapes de la formation des agrégats en fonction du ratio d'apo-ferritines ajouté.



**Figure 2.5 :** Dynamique de la formation d'agrégats en fonction de la quantités d'apo-ferritines ajoutées aux NPOFs. L'étape 1 est caractérisée par déstabilisation des NPOFs formant des agrégats. La dégradation des NPOFs les restabilise (étape 2) jusqu'à obtenir une solution homogène (étape 3).

En considérant les cinétiques de dégradation des NPOFs en présence des différents ratios de protéines et les dynamique de formation des agrégats, nous avons pu formuler une hypothèse quant au mécanisme de dégradation des NPOFs en présence d'apo-ferritine.

Lors de l'ajout d'apo-ferritine au NPOFs dans le milieu modèle, une couronne de d'apo-ferritine se forme autour des NPOFs. L'accès des molécules de citrates, qui induisent la dissolution des NPOFs est alors restreint en fonction de la quantité d'apo-ferritine. En effet, en présence d'un excès d'apo-ferritine ( $\xi = 4$ ), la couronne d'apo-ferritines autour des NPOFs est homogène et les protège ainsi de la dissolution. A l'inverse pour le ratio  $\xi = 1$ , la couronne d'apo-ferritine enrobe partiellement les NPOFs et celles-ci se dissolvent plus rapidement.

### **L'apo-ferritine peut-elle dégrader les NPOFs ?**

Afin de s'affranchir des effets chélatés des molécules de citrate et de sonder les effets de l'apo-ferritine, des études complémentaires ont été réalisées en substituant le tampon citrate par un tampon acétate dont le pH mime le milieu lysosomal mais qui est moins chélatant pour le fer que le citrate. En effet, dans ce milieu, les nanoparticules sont stables et ne se dissolvent pas. En revanche, en présence d'apo-ferritine, une diminution du signal magnétique des nanoparticules est observée au bout de quarante jours (Figure 9, *Small*). Ces observations, caractéristiques de la dégradation des nanoparticules, ont permis de formuler une hypothèse selon laquelle les apo-ferritines pourraient dégrader les nanoparticules en l'absence d'agents de chélation. Il existe une centaine de sites de liaisons du fer à la surface de la ferritine<sup>34</sup>, ainsi la dégradation des NPOFs par l'apo-ferritine se traduirait par un transfert de fer direct entre ces deux entités. Cette hypothèse a permis d'affiner le modèle présenté dans la Figure 2.4.

Dans le milieu modélisant les conditions lysosomales, deux mécanismes de dégradation coexistent. Le premier a une cinétique rapide et correspond à la dissolution des nanoparticules par les molécules de citrate. Le second, de cinétique lente, correspond à l'érosion des nanoparticules par l'apoferritine. En présence d'une faible quantité d'apo-ferritine ( $\xi = 1$ ) l'enrobage protéique autour des nanoparticules est inhomogène, laissant un accès aux molécules de citrate à la surface des nanoparticules. Le mécanisme dominant est alors le mécanisme de dissolution. A l'inverse, lorsque l'apo-ferritine est en excès ( $\xi = 1/4$ ), l'enrobage protéique est homogène et protège intégralement la surface des nanoparticules. Le mécanisme dominant est alors l'érosion des nanoparticules par l'apo-ferritine (Figure 2.6).

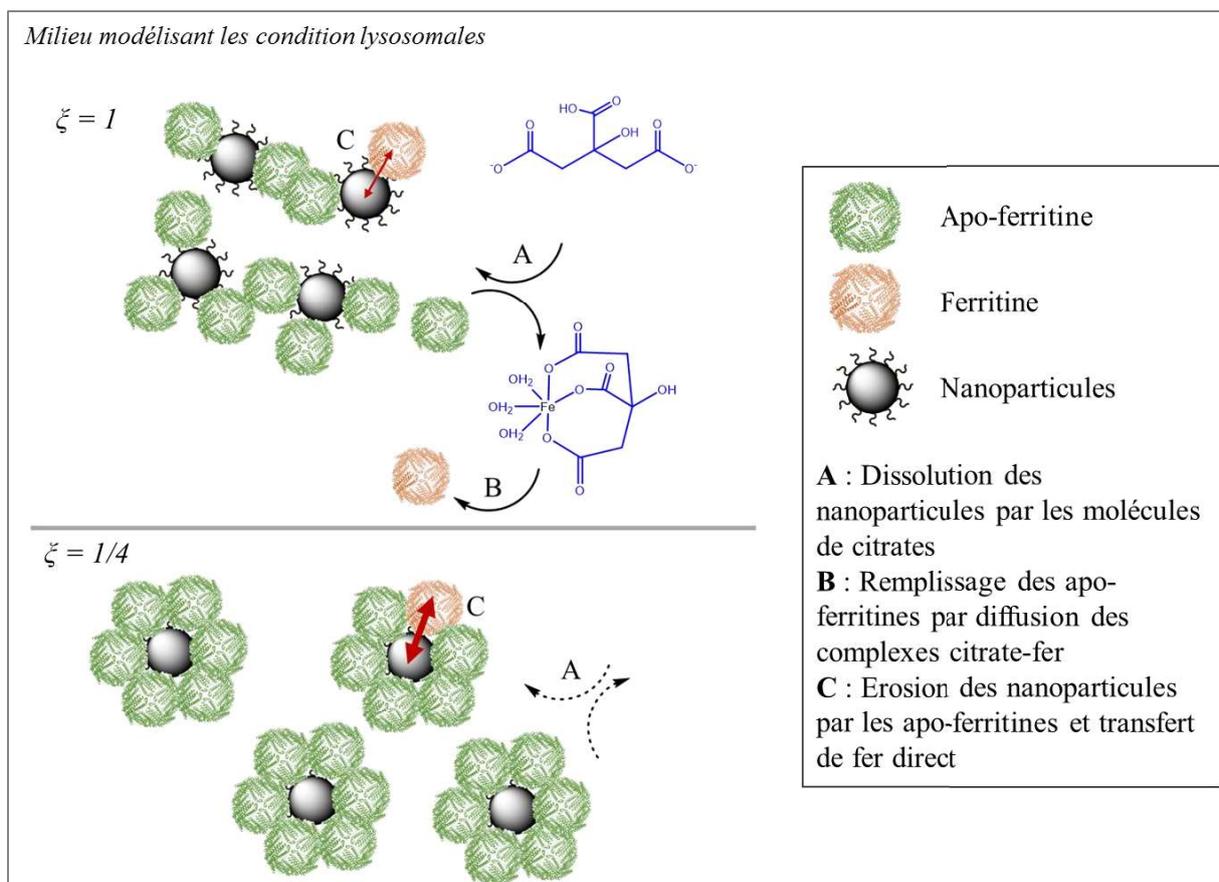


Figure 2.6 : Mécanismes de dégradation et de transfert de fer des NPOFs vers les apo-ferritines dans le milieu mimant les conditions lysosomales

### Pertinence du modèle par rapport aux observations *in vivo*?

A travers cette étude nous avons d'une part montré le transfert effectif de fer (III) issu de la dégradation des NPOFs de maghémite vers l'apo-ferritine. D'autre part, nous avons constaté que les interactions entre apo-ferritine et NPOFs modulent la dégradation de celles-ci, et en outre, que l'apo-ferritine peut les dégrader sans la présence d'un intermédiaire de chélation tel que le citrate.

Plusieurs études *in vivo* ont montré la présence de ferritine autour de NPOFs dans les lysosomes de macrophages, après injection intraveineuse.<sup>1,2,35</sup> Suite à l'injection les NPOFs sont confinées dans les lysosomes sous forme d'agrégat (Figure 2.7 (A)). On constate l'isolement progressif des NPOFs (Figure 2.7 (B)) et la coexistence avec une quantité croissante de ferritine. On observe également que la ferritine est présente sous la forme de particules uniques (Figure 2.7 (B & D)) ou sous la forme de clusters caractérisés par leur structure *finger print* (Figure 2.7 (C)). L'augmentation de ferritine autour des NPOFs est cohérente avec la surexpression des gènes codant la ferritine dans un modèle de sphéroïde de cellules souches mésenchymateuses, et en particulier celui codant la chaîne L, responsable de la nucléation et du stockage du fer.<sup>3</sup>

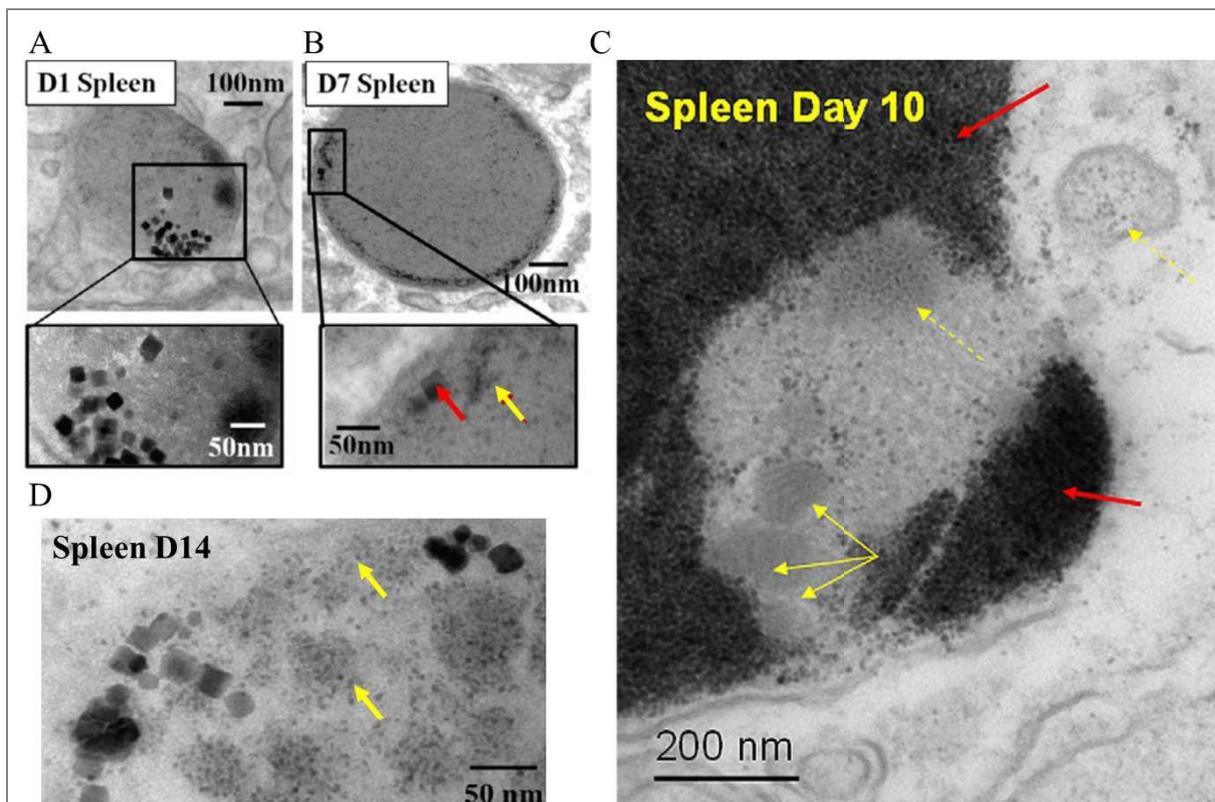


Figure 2.7 : Clichés de MET de coupes de rate à 1, 7, 10 et 14 jours après injection de NPOFs (flèches rouges) par voie intraveineuse. On constate la coexistence des NPOFs avec des ferritines dès sept jours après injection (flèches jaunes). Extrait de [1, 2, 35].

L'ensemble des résultats en solution, *in vitro* et *in vivo* suggèrent un mécanisme de prise en charge du fer (III) issu de la dégradation de NPOFs de maghémite par les ferritines, dans les lysosomes. Dans un premier temps, les NPOFs sont confinées dans les lysosomes où elles sont dégradées. Un recrutement de ferritines est alors observé pour prendre en charge le fer issu de la dégradation. Ce scénario permettrait d'une part à la cellule de cantonner les échanges de fer dans les compartiments lysosomaux et d'autre part de stocker le fer exogène sous forme cristalline non toxique au sein des ferritines afin de réguler le potentiel redox du lysosome. En lien avec l'introduction de ce chapitre, le stockage des produits de dégradation des NPOFs au sein des ferritines permet de diminuer la quantité de fer labile

disponible et éviter la production de radicaux libres *via* la réaction de Fenton. La modulation de la dégradation des NPOFs ainsi que le stockage des produits de dégradation dans les ferritines sous une forme non toxique permet de réguler la disponibilité de fer labile et minimise ainsi la potentielle toxicité induite par les NPOFs. Une étude a montré qu'après injection de NPOFs enrichie en  $^{59}\text{Fe}$  chez des modèles murins, 20 % du  $^{59}\text{Fe}$  injecté est incorporé au sein d'hémoglobine au bout de 49 jours.<sup>36</sup> Ces observations suggèrent qu'en plus du mécanisme de prise en charge du fer issu de la dégradation de NPOFs par les ferritines, celui-ci pourrait par la suite être recyclé et remobilisé pour subvenir aux besoins de l'organisme.

### **2.3 Publication associée à l'étude**

L'ensemble des résultats présentés précédemment sont décrits dans la publication ci-dessous. La synthèse et la fonctionnalisation des NPOFs a été réalisée par l'équipe de notre collaboratrice Christine Ménager au laboratoire Phénix (Sorbone Université). Les images de MET ont été réalisées avec Yasir Javed et Damien Alloiseau du laboratoire MPQ (Université Paris Diderot). J'ai réalisé les études de dégradation des NPOFs avec et sans apo-ferritines par mesures RFM (Plateforme RPE de l'Université Paris Descartes) et par caractérisation de leur taille en DLS, ainsi que l'étude du transfert de fer vers les apo-ferritines par spectroscopie UV-visible. Les mesures magnétiques en relaxométrie RMN ont été réalisées avec nos collaborateurs Quoc Lam Vuong et Yves Gossuin à l'Université de Mons. Enfin la caractérisation de l'apo-ferritine ainsi que la caractérisation des interactions apo-ferritine – NPOFs par SAXS ont été réalisées par Florent Carn (MSC) au synchrotron Soleil et au synchrotron de Barcelone.

# Ferritin Protein Regulates the Degradation of Iron Oxide Nanoparticles

Jeanne Volatron, Florent Carn, Jelena Kolosnjaj-Tabi, Yasir Javed, Quoc Lam Vuong, Yves Gossuin, Christine Ménager, Nathalie Luciani, Gaëlle Charron, Miryana Hémadi, Damien Alloyeau,\* and Florence Gazeau\*

*Proteins implicated in iron homeostasis are assumed to be also involved in the cellular processing of iron oxide nanoparticles. In this work, the role of an endogenous iron storage protein—namely the ferritin—is examined in the remediation and biodegradation of magnetic iron oxide nanoparticles. Previous in vivo studies suggest the intracellular transfer of the iron ions released during the degradation of nanoparticles to endogenous protein cages within lysosomal compartments. Here, the capacity of ferritin cages to accommodate and store the degradation products of nanoparticles is investigated in vitro in the physiological acidic environment of the lysosomes. Moreover, it is questioned whether ferritin proteins can play an active role in the degradation of the nanoparticles. The magnetic, colloidal, and structural follow-up of iron oxide nanoparticles and proteins in lysosome-like medium confirms the efficient remediation of potentially harmful iron ions generated by nanoparticles within ferritins. The presence of ferritins, however, delays the degradation of particles due to a complex colloidal behavior of the mixture in acidic medium. This study exemplifies the important implications of intracellular proteins in processes of degradation and metabolization of iron oxide nanoparticles.*

Dr. J. Volatron, F. Carn, Dr. J. Kolosnjaj-Tabi, Dr. N. Luciani,  
Dr. G. Charron, Dr. F. Gazeau  
Laboratoire Matières et Systèmes Complexes  
UMR 7057 CNRS/Université Paris Diderot  
Sorbonne Paris Cité  
10 rue Alice Domon et Léonie Duquet, 75205 Paris Cedex 13, France  
E-mail: florence.gazeau@univ-paris-diderot.fr

Dr. Y. Javed, Dr. D. Alloyeau  
Laboratoire Matériaux et Phénomènes Quantiques  
UMR 7162 CNRS/Université Paris Diderot  
Sorbonne Paris Cité  
10 rue Alice Domon et Léonie Duquet, 75205 Paris Cedex 13, France  
E-mail: damien.alloyeau@univ-paris-diderot.fr

Dr. Y. Javed  
Department of Physics  
University of Agriculture  
Faisalabad, Pakistan

Dr. Q. L. Vuong, Prof. Y. Gossuin  
Service de Physique Biomédicale  
Université de Mons  
20 Place du Parc, 7000 Mons, Belgium  
Prof. C. Ménager  
Laboratoire PHENIX  
UMR 7195  
CNRS/Université Pierre et Marie Curie/ESPCI  
4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France  
Dr. M. Hémadi  
ITODYS, Interfaces, Traitements, Organisation et  
Dynamique des Systèmes  
UMR 7086 CNRS/Université Paris Diderot  
Sorbonne Paris Cité  
15 rue Jean-Antoine de Baïf, 75205 Paris Cedex 13, France



DOI: 10.1002/sml.201602030

## 1. Introduction

The use of inorganic nanoparticles (NPs) in preclinical research is rapidly expanding, paving the way for new imaging and therapeutic strategies. Particularly magnetic NPs, mostly made of iron oxide (IO), display attractive functionalities making them the most popular inorganic NPs with applications in Magnetic Resonance Imaging (MRI), Magnetic Particle Imaging, magnetic manipulation of drug delivery systems and cells, tissue engineering, or magnetic hyperthermia, to cite just a few.<sup>[1]</sup> Remarkably, iron oxide NPs (IONPs) are considered efficient and safe and already found their way into clinics.<sup>[2]</sup> In contrast to the majority of metallic NPs, their biocompatibility relies on possible degradation in the body and recycling by iron metabolism pathway.<sup>[3]</sup> Recent studies evaluating the fate of IONPs *in vivo* demonstrated that IONPs were indeed locally degraded in the lysosomes of splenic and hepatic macrophages while they lose their superparamagnetic properties over periods of months after injection.<sup>[4]</sup> Radioactive labeling of IONPs showed that <sup>59</sup>Fe released from NPs appeared in the hemoglobin of newly formed erythrocytes one week after injection, confirming intracellular degradation and channeling of iron into the physiological transport pathways for iron.<sup>[5]</sup> A substantial part of the radiolabel was also retained in organs, suggesting intracellular storage of iron. Importantly, the gene expression of ferritin, the endogenous iron storage protein, and of other proteins involved in iron homeostasis, was upregulated after cell internalization of IONPs.<sup>[3b,6]</sup> Ferritin consists of a protein shell (called apoferritin (ApoF)) of 24 subunits with an outer diameter of 12 nm and a cavity of 8 nm diameter, able to store up to 4500 atoms of iron (iron-filled ferritin is called holoferritin (HoloF)).<sup>[7]</sup> Ferritin is a multifunctional protein that does not only detoxify, store, and transport iron, but is also implicated in several metabolic processes.<sup>[8]</sup> Ferritin is able to store excess iron, which is not immediately required by cells for metabolic processes, in a readily available nontoxic form.<sup>[9]</sup> It thus protects the cell from the toxic effects of hydroxyl radicals HO<sup>•</sup> generated by the Fenton reaction initiated by free Fe<sup>2+</sup> ions.<sup>[10]</sup> Given the ubiquitous presence of ferritin close to intracellular IONPs demonstrated by high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) of organs,<sup>[4c]</sup> it has been suggested that ferritin could be involved in the degradation mechanism of IONPs *in vivo* by recycling iron ions released by NPs.<sup>[4a,11]</sup> Indeed, the magnetic properties of the original particles in spleen turned to that of the iron-filled ferritin over months following administration.<sup>[4a,c,f]</sup> Nonetheless, the interplay between IONPs and ferritin and their intracellular crosstalk remain unclear. Overall, while it has been generally accepted that NPs extensively interact with intracellular proteins,<sup>[12,13]</sup> the precise interaction patterns and the role of each of them in NP transformation, degradation and recycling have yet to be unraveled.

The purpose of this paper is to get insight into the role of ferritin protein in the intracellular recycling and remediation of iron IONPs. After cellular uptake (mainly by cells of the mononuclear phagocytic system), NPs converge to intracellular compartments called lysosomes in which they endure the effects of acidic environment (pH 4.7), hydrolytic enzymes, and

a variety of proteins and lipids, collectively responsible for the degradation of NP's coating and core.<sup>[14]</sup> The loss of the protective layer on the metal or oxide surface, the chemical etching of the crystal itself and the affinity of metal chelators are intracellular events that govern the crystal disintegration, the release of metallic ions, and eventually the formation of metal complexes. Hence, the intracellular loss of NP integrity, observed for quantum dots,<sup>[15]</sup> silver NPs,<sup>[16]</sup> ZnO NPs,<sup>[17]</sup> or IONPs,<sup>[4c,18]</sup> has two major consequences: first, it alters the physical properties and functionalities of NPs and second, it may produce highly reactive and potentially harmful metal ions due to the cascade of chemical reactions to which particle components are exposed. Ferritin could be able to capture the free and potentially harmful iron species generated by the intracellular degradation of IONPs. It has been shown that lysosomal iron overload induce pro-oxidant conditions which trigger *de novo* ferritin synthesis or transfer of apoferritin by autophagy.<sup>[9b,19]</sup> Ferritins in lysosomes thus protect from iron overload and exert cytoprotective properties.<sup>[20]</sup> On the other hand, it may stimulate lysosomal stress and induce adverse effects.<sup>[21]</sup> Ferritin can be also degraded by proteases in lysosomes, thereby releasing iron.<sup>[22]</sup> The dynamics of endolysosomal iron pool thus serves as a rheostat of cellular iron flux which controls the lysosome stability.<sup>[9b]</sup> By monitoring the colloidal status and dissolution of IONPs in the presence of ferritin, we investigated for the first time the role of this protein in the behavior, aggregation and erosion of iron oxide nanocrystals. The capacity of ferritin cages to accommodate and store the degradation products of maghemite NPs was examined *in vitro* in a minimal medium mimicking the acidic environment of the lysosomes where NPs are physiologically confined and degraded. Moreover we questioned whether ferritin proteins could play an active role in the degradation of IONPs. The Nuclear Magnetic Resonance (NMR) relaxometric behavior as well as superparamagnetic and structural properties of IONPs was monitored over time in order to assess crystal degradation in the presence of different amounts of the protein and to follow the loss of MRI detectability. UV-visible spectroscopy and electron microscopy allowed assessing the transfer of iron from NPs to proteins. The colloidal status and transformations of both proteins and IONPs were monitored by small angle X-ray scattering (SAXS) and dynamic light scattering (DLS). The magnetic, colloidal, and structural follow-up of IONPs and proteins in lysosome-like medium confirmed the efficient remediation of iron ions generated by NPs within ferritins. The presence of ferritins, however, delayed the degradation of particles due to a complex colloidal behavior of the mixture in acidic medium. This study exemplifies the important implication of a particular intracellular protein in processes of metabolization of IONPs and in the regulation of their degradation.

## 2. Results and Discussion

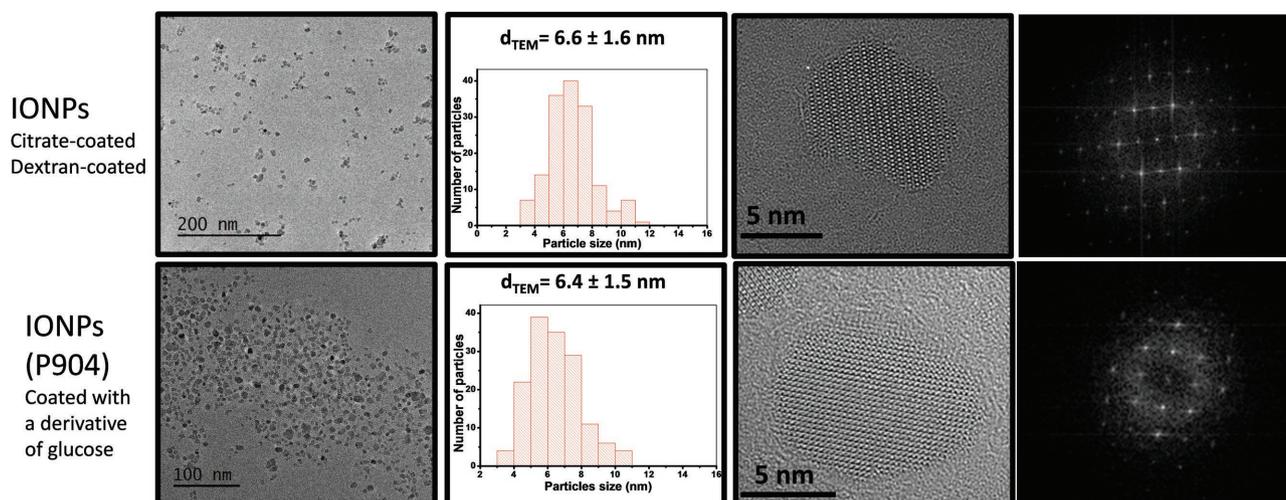
### 2.1. Degradation of IONPs in Acidic Environment Mimicking the Lysosome pH

IONPs were previously shown to degrade in lysosomes<sup>[3b]</sup> as well as in a minimal medium mimicking the acidic pH of

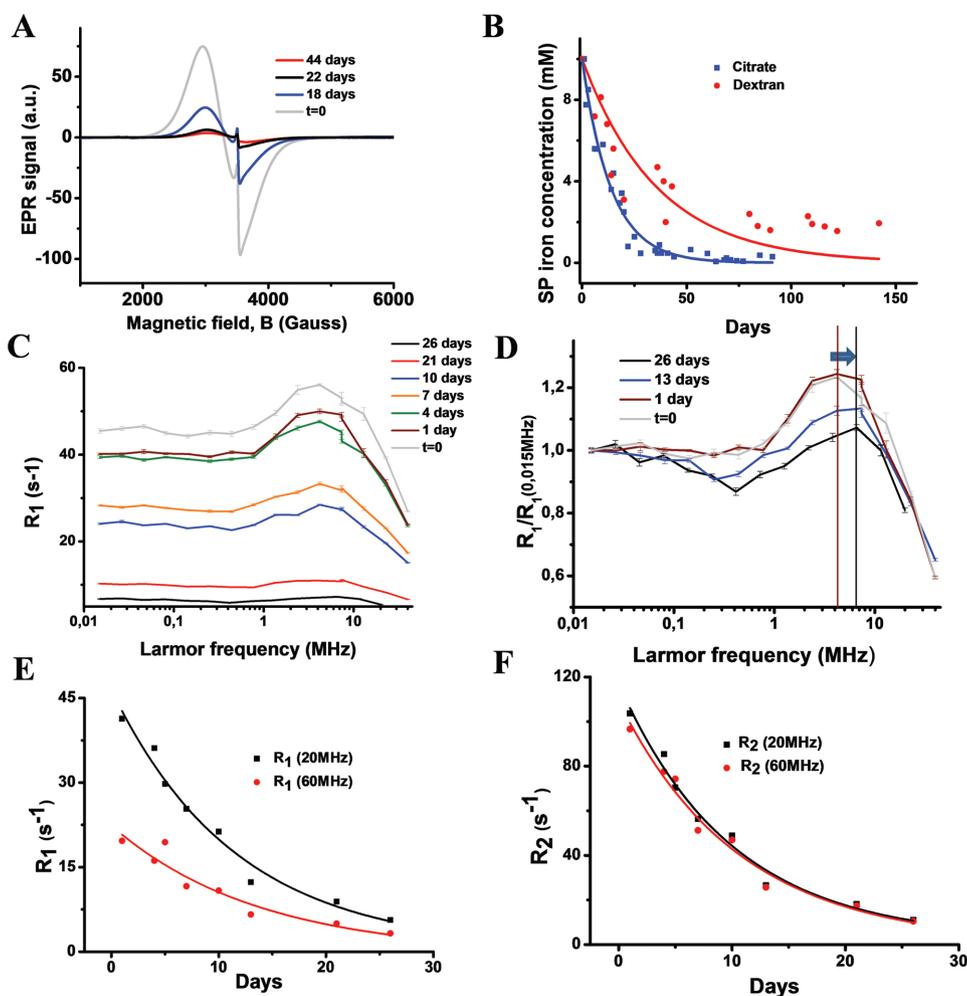
lysosomes (pH 4.7) and containing citrate as iron chelator. The kinetics of degradation depended on NPs surface coating, size, shape, and architecture.<sup>[4c,e,18,23]</sup> Herein, we chose archetypical 7–8 nm superparamagnetic IONPs made by coprecipitation with different coating in order to evidence the role of ferritin in their degradation process (Figure 1). Their superparamagnetic properties, NMR relaxation behavior, colloidal stability, and morphology were first followed in an aqueous medium at pH 4.7 and  $20 \times 10^{-3}$  M citrate in the absence of ferritin. Electron Paramagnetic Resonance (EPR) was used to specifically detect the superparamagnetic IONPs as a function of time (Figure 2A). As the released iron ions have no or negligible EPR signal at room temperature in comparison to exchange-coupled iron in ferrimagnetic crystal lattice, the integration of the EPR absorption signal provides the measurement of the quantity of iron in the form of superparamagnetic particles (SP iron) remaining in the solution and thus an indirect determination of what is lost over time due to degradation of nanocrystals.<sup>[24]</sup> We observe an exponential decay of SP iron for citrate-coated IONPs, and a slower decay for dextran-coated IONPs (Figure 2B). Importantly, we observed no degradation in the absence of citrate at pH 4.7 or in the presence of citrate at pH 6.8 (data not shown).

To measure the efficacy of IONPs as MRI contrast agents and characterize their NMR magnetic properties over time, the longitudinal and transverse relaxation rates,  $R_1$  and  $R_2$ , were measured at Larmor frequencies close to those used in clinical scanners—20 MHz and 60 MHz—respectively corresponding to 0.5 T and 1.5 T magnetic fields. A deeper investigation was provided by Nuclear Magnetic Resonance Dispersion (NMRD) profile, which represents the longitudinal nuclear relaxation rate  $R_1$  as a function of the proton Larmor frequency on a large range of Larmor frequencies. NMRD measurement constitutes a valuable tool to characterize the magnetic properties of IONPs and their interactions with their local environment.<sup>[25]</sup> As shown in Figure 2C–F, at any fixed proton Larmor frequency,  $R_1$  and

$R_2$  decreased with time in acidic medium due to the loss of iron belonging to “efficient” particles that are able to boost proton relaxation. Indeed the relaxation of free iron ions is almost negligible when compared to the relaxation induced by the same amount of iron structured in IONPs. When  $R_1$  was normalized to its value at 0.015 MHz (Figure 2D), we observed that the high field inflection point of the NMRD profiles slightly shifted toward higher Larmor frequencies. This shift can be theoretically explained by a slight decrease of the minimal distance of approach of protons to the particles, reflecting the erosion of remaining particles.<sup>[25]</sup> It is important to note that the colloidal stability of citrate-coated IONPs was maintained all over their degradation in acidic medium. Indeed the size distribution deduced from DLS experiments was almost unmodified over days in acidic medium (Figure 3B). In contrast, the time-averaged intensity scattered at  $173^\circ$  (Figure 3C) progressively decreased in agreement with a diminution of the number of particles at constant NPs’ size. SAXS experiment was used to characterize both the form factor of IONPs and their colloidal state as a function of time. The evolution of SAXS patterns confirmed the DLS results (Figure 3D). All the curves obtained during the first 25 d could be well fitted with a sphere form factor with radius  $R = 2.3$  nm and log. normal polydispersity  $0.5 \leq PD \leq 0.6$ , without detectable aggregation in the available  $q$  range (Figure S1, Supporting Information). After 1 year no IONPs could be detected. The main effect of NP aging in acidic medium is a decrease of the scattered intensity at low and intermediate  $q$  ranges that should be related to IONPs dissolution. If we assume that IONPs keep their size and composition (i.e.,  $R = 2.3$  nm and molecular weight =  $150\,356$  g mol<sup>-1</sup>) during the degradation process, the time evolution of IONP concentration can be deduced from the relative intensity extrapolated to  $q \rightarrow 0$ , revealing a first-order kinetic with a characteristic time of 7.7 d, consistent with EPR and NMR relaxation results (Figure 3E).



**Figure 1.** Description of IONPs used in the study. TEM images of citrate-coated IONPs (these IONPs were also coated with dextran) and IONPs coated with a derivative of glucose (P904) and corresponding TEM size distribution with a mean diameter of  $(6.6 \pm 1.6$  nm),  $(6.4 \pm 1.5$  nm), respectively. High-resolution images of IONPs and P904 and FFT of selected particles show monocrystalline inverse spinel structure oriented along the [112], [112], [001] zone axes, respectively.



**Figure 2.** The evolution of magnetic properties of IONPs reveals their degradation in acidic medium. A) EPR signal as a function of time for citrate-coated IONPs. B) Integrated EPR signal measures the concentration of superparamagnetic iron in suspension. It decreases over time in acidic medium, faster for citrate-coated than for dextran-coated IONPs. C) NMRD profile of citrate-coated IONPs ( $1 \times 10^{-3}$  M iron concentration) at different time points in acidic medium. Note the incremental decrease of longitudinal relaxation rate  $R_1$ , regardless of the proton Larmor frequency. D) Normalized NMRD profile  $R_1/R_1(0.015 \text{ MHz})$  shows that the maximum of relaxation rate shifts toward higher frequency over time. E, F) Time evolution of the longitudinal and transverse relaxation rates of citrate-coated IONPs at proton Larmor frequencies of 20 and 60 MHz—corresponding to clinical MRI magnetic field of 0.5 and 1.5 T.

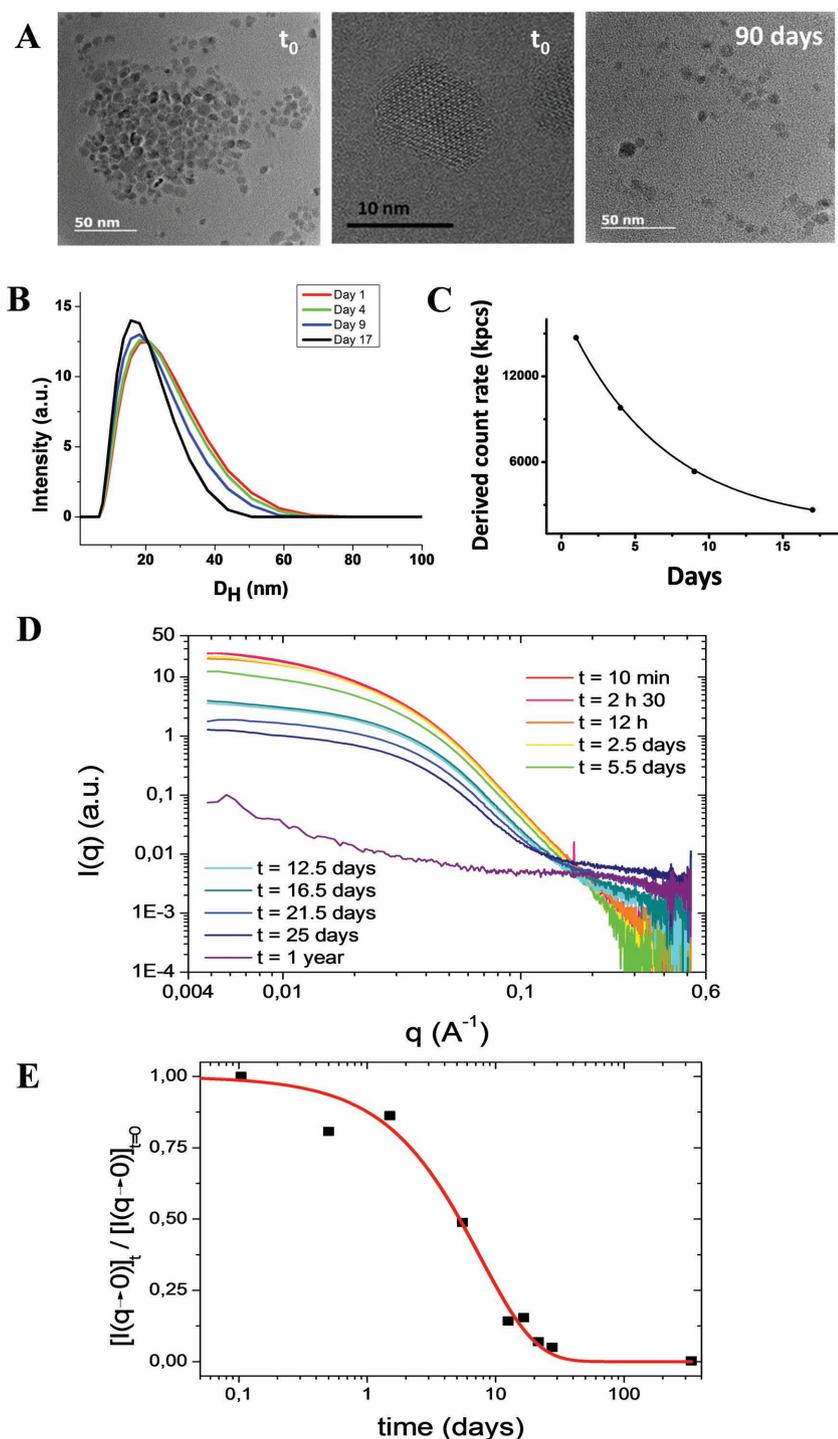
## 2.2. Signatures of Apoferritin and Metal-Filled Ferritin in Acidic Environment

Prior to the analysis of particles interactions with ApoF in acidic environment, we characterized the distinct behavior of ApoF and HoloF proteins in different environmental media. The SAXS curves of the commercial horse spleen protein stock solutions in water (pH 6.8) are plotted in **Figure 4A**. The SAXS pattern of ApoF shows a plateau for  $q \leq 0.02 \text{ \AA}^{-1}$  and two well-defined oscillations, at  $q = 8.7 \times 10^{-2}$  and  $1.50 \times 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ . This curve fits the form factor of monodisperse vesicles with  $R_{\text{core}} = 3.2 \text{ nm}$  and a shell thickness  $t_s = 3.0 \text{ nm}$ , in line with the cage structure of ApoF. In contrast, the SAXS pattern of the HoloF stock solution presents a power-law decay for  $q \leq 0.03 \text{ \AA}^{-1}$  and slight oscillation at  $q = 1.65 \cdot 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ . The form factor of full spheres with a radius of 3.3 nm and a log-normal polydispersity  $PD = 0.20$  fits the curve for  $q > 0.3 \text{ \AA}^{-1}$ , which is consistent with filled protein cages. However, the power-law

decay ( $I \propto q^{-0.85}$  for  $q \leq 0.03$ ) indicates the contribution of proteins' aggregates to the scattering.

To clarify the aggregation state, the ratio  $I(q)/P(q)$  was plotted in Figure S2 (Supporting Information), where  $P(q)$  is the form factor of the individual HoloF. The obtained low- $q$  data could be fitted by the Guinier expression and enable to estimate, neglecting the Virial effects between aggregates, the aggregation number ( $N_{\text{Agg.}} \approx 5$ ) and the radius of gyration ( $R_G = 15 \text{ nm}$ ) of the aggregates. This domain is followed by  $q^{-0.75}$  decay toward unity, suggesting that these small clusters have an elongated structure.

Importantly, the dispersion of ApoF and HoloF in the citrate buffer at pH 4.7 led to protein aggregation and to phase separation. As shown in Figure 4B, ApoF form large ramified aggregates characterized by a fractal dimension  $D_f \approx 1.4$  according to the power-law decay of  $I(q)$  observed for  $q \leq 0.03 \text{ \AA}^{-1}$ . At higher  $q$  values, the scattering pattern is well fitted by the form factor of ApoF. Although HoloF proteins were already aggregated in the stock solution, the

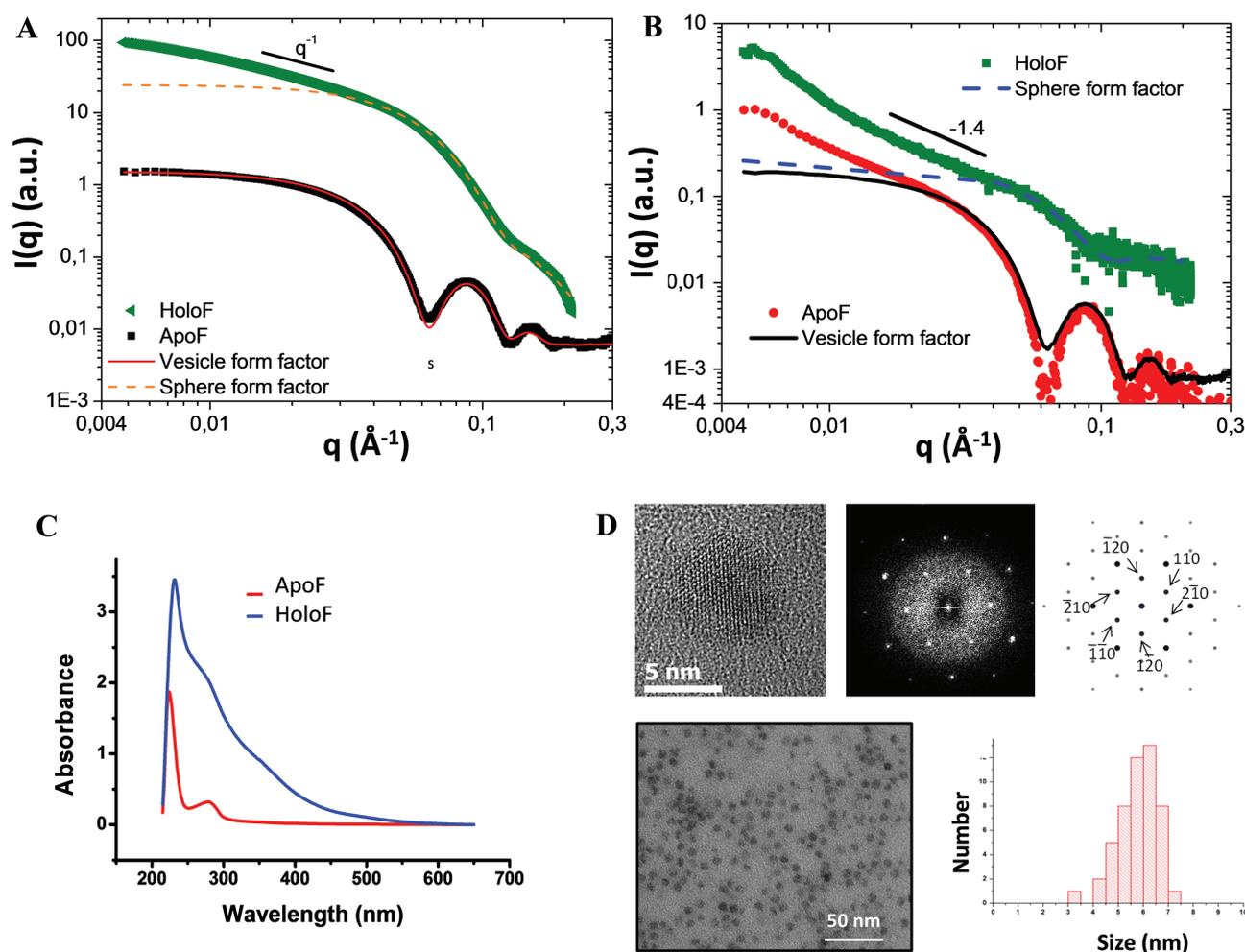


**Figure 3.** A) Representative TEM images of citrate-coated IONPs at different time points in acidic citrate buffer. B) Distribution of hydrodynamic sizes and C) derived count rate in light scattering experiments showing the growing scarcity of IONPs, while hydrodynamic size is only slightly decreased. D) SAXS curves of citrate-coated IONPs measured at different times after dispersion in the acidic citrate buffer ( $[\text{Fe}] = 10 \times 10^{-3}$  M). E) Time evolution of the SAXS normalized intensity  $I(q=0)_t / I(q=0)_{t=0}$ . The red line corresponds to the best adjustment of single exponential with a characteristic decay time of 7.7 days.

structure of aggregates was modified upon dispersion in acidic citrate buffer reaching a higher fractal dimension similar to the one of ApoF clusters. The low  $q$  part of the curve is still well fitted by the sphere form factor with  $R = 3.3$  nm and PD = 0.2.

Apart from different colloidal behaviors, ApoF can be distinguished from iron-filled HoloF by its UV-visible spectral signature. In comparison to ApoF spectrum, HoloF spectrum displays a shoulder band at 280 nm, which is due to the stored metal<sup>[26,27]</sup> and an intensity increase of the band at 220 nm (Figure 4C). HRTEM observations of commercial HoloF evidenced a size distribution with a mean diameter of  $5.8 \pm 0.8$  nm, mostly composed of hematite nanocrystals (Figure 3D).

Because the used IONPs are made of maghemite ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) and only comprise trivalent iron III, we first investigated if free iron III ions in solution could be transferred from salts to the protein core in acidic condition. The use of ApoF as nanoreactor was reported in ad-hoc conditions for NP synthesis,<sup>[28]</sup> but never in an acidic citrate medium. Moreover the transfer of iron ions to ApoF has been mostly described for divalent iron II and acidic media have been recognized as highly unfavorable for the ferritin binding of divalent metals except for  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  which remained unaffected by pH alteration.<sup>[29]</sup> Herein iron III salts were incubated with ApoF in acidic citrate medium for one day and subsequently dialyzed. UV-visible spectrum shows an intensity increase of the band at 220 nm, an evolution of the band at 280 nm and a charge-transfer band at 450 nm indicating a metal-protein bond (Figure 5A). These signals show a clear evolution toward the absorbance signal of commercial HoloF suggesting a filling of ApoF with iron. To confirm this result, the metal salt/ApoF mixtures were analyzed by HRTEM after an incubation time of two months (Figure 5B–F). For the iron salt-ApoF sample, transmission electron microscopy (TEM) images show the presence of crystalline NPs with a diameter of  $3.5 \pm 0.9$  nm (60% of the commercial HoloF size, Figure 5D), indicating a partial filling of the protein core. The structure of these nanocrystals was determined by analyzing the inter-reticular-distance ( $d_{\text{hkl}}$ ) distribution measured on many HRTEM images. As seen in figure 5C, some  $d_{\text{hkl}}$  exclusively correspond to the inverse spinel structure of iron oxide demonstrating that magnetite or maghemite nanocrystals formed inside protein shells. Nevertheless, due to the overlap of  $d_{\text{hkl}}$  between inverse spinel and hematite structures, hematite might have also grown inside the ferritin. Ferrihydrite, one of the phase frequently found in ferritin



**Figure 4.** A) SAXS curves of Apoferritin and Holo ferritin stock solution in water. The best fit corresponds to the form factor of plain spheres with radius  $R = 3.3$  nm and log-normal polydispersity  $PD = 0.2$  for HoloF (dashed orange line) and the form factor of monodisperse spherical vesicles with  $R_{\text{core}} = 3.2$  nm and shell thickness  $t_s = 3.0$  nm for ApoF (continuous red line). At low  $q$ , the power law as  $q^{-1}$  for HoloF indicates linear aggregates of proteins. B) SAXS curves obtained 1 h after dispersion of ApoF and HoloF in acidic citrate buffer. The lines correspond to the sphere form factor with  $R = 3.3$  nm and  $PD = 0.2$  (dashed blue line) and to the vesicle form factor with  $R_{\text{core}} = 3.2$  nm and shell thickness  $t_s = 3.0$  nm (continuous black line). The  $q^{-1.4}$  power-law decay at small  $q$  indicates the formation of loose fractal aggregates. C) UV-vis absorbance spectrum of ApoF and HoloF, showing the growth of an absorbance shoulder at 280 nm for iron-filled HoloF in comparison to iron-free ApoF. D) From left to right, HRTEM image of an HoloF nanocrystal, FFT of the HRTEM image showing the [001] zone axis of the hematite structure, simulated diffraction of hematite structure along the same zone axis. TEM image of HoloF and corresponding crystal size distribution (mean diameter  $5.8 \pm 0.8$  nm).

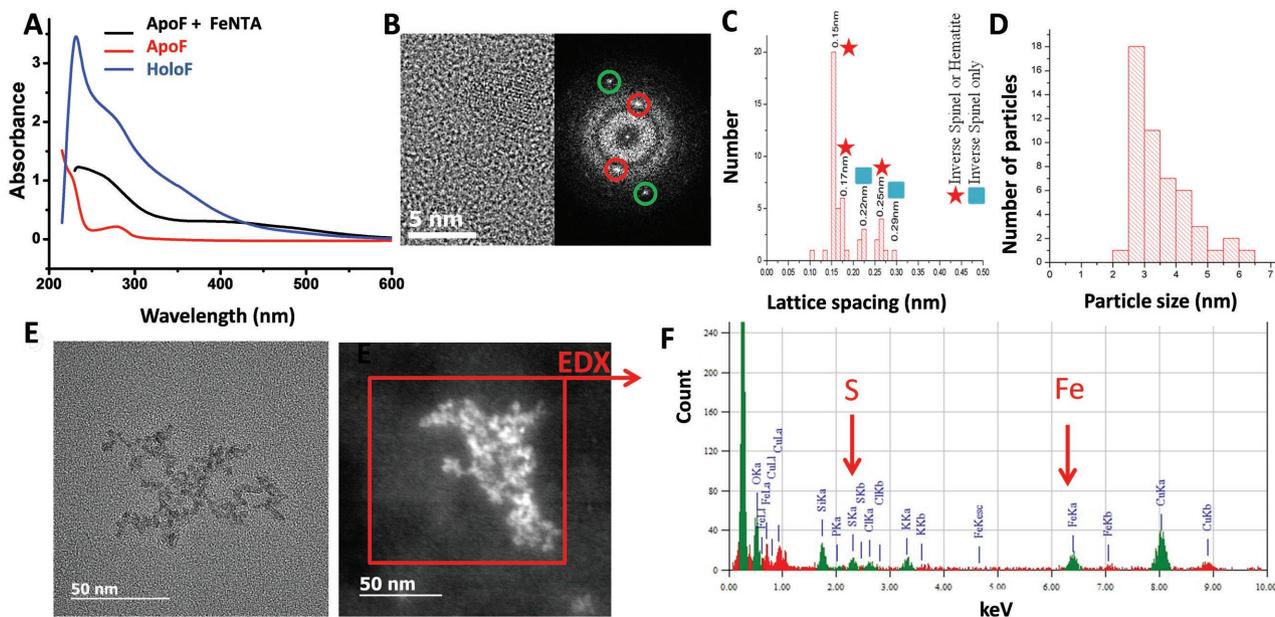
core,<sup>[7c,d]</sup> was not identified probably due to its poorly crystallized structure and sensitivity to the electron beam.<sup>[30]</sup> The nanostructures were analyzed by EDX in the STEM-HAADF mode, to check the colocalization of iron and of sulfur coming from the protein (Figure 5F). All these results confirm the uptake of iron III ions by ApoF and the mineralization of different iron oxides in the protein core.

### 2.3. Interactions of IONPs with Apoferritin: Aggregation State, NP Degradation, and Metal Transfer

Previous studies showing the presence of ferritins nearby NPs in organ slices suggest a potential transfer of iron relocating from NPs to ferritins.<sup>[3b,4e]</sup> We thus analyzed the evolution of ApoF interacting with IONPs in acidic citrate medium. During the 2 d of incubation at 37 °C, the absorbance signal

of ApoF evolved to that of the commercial HoloF, showing an incremental filling of ApoF with metals transferred from NPs (Figure 6A). The growth of the absorbance at 280 nm is summarized in Figure 6B for IONPs with different coatings (citrate, dextran, and hydrophilic derivative of glucose (P904)), indicating a partial and progressive filling of the protein, depending on the NPs. Consistently with the kinetics of degradation of IONPs (Figure 2B), the transfer of iron from citrate-coated NPs is faster than the one from dextran-coated NPs.

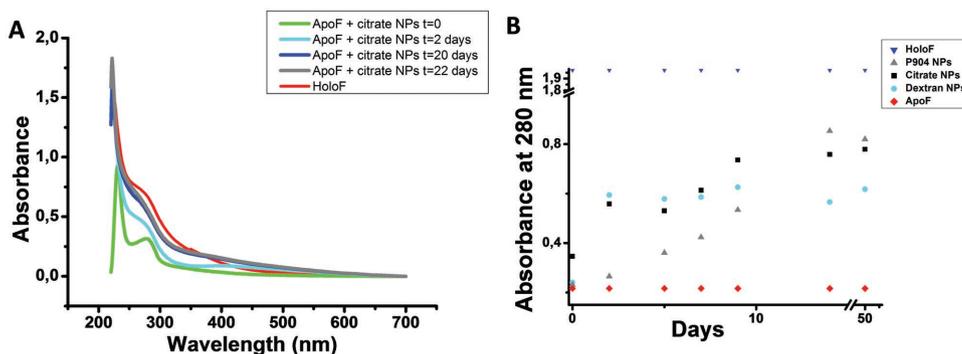
While ApoF is capable of recycling the byproducts of IONPs, it is unclear if it can catalyze per se the degradation of IONPs. Due to its intrinsic capacity to sequester iron, ApoF could shift the equilibrium in the direction of NP dissolution. Therefore we analyzed the degradation of NPs in acidic citrate medium in the presence of different ratios of ApoF with respect to the total iron concentration,  $\zeta = 1, 2$  or 4. For  $\zeta = 1$ ,



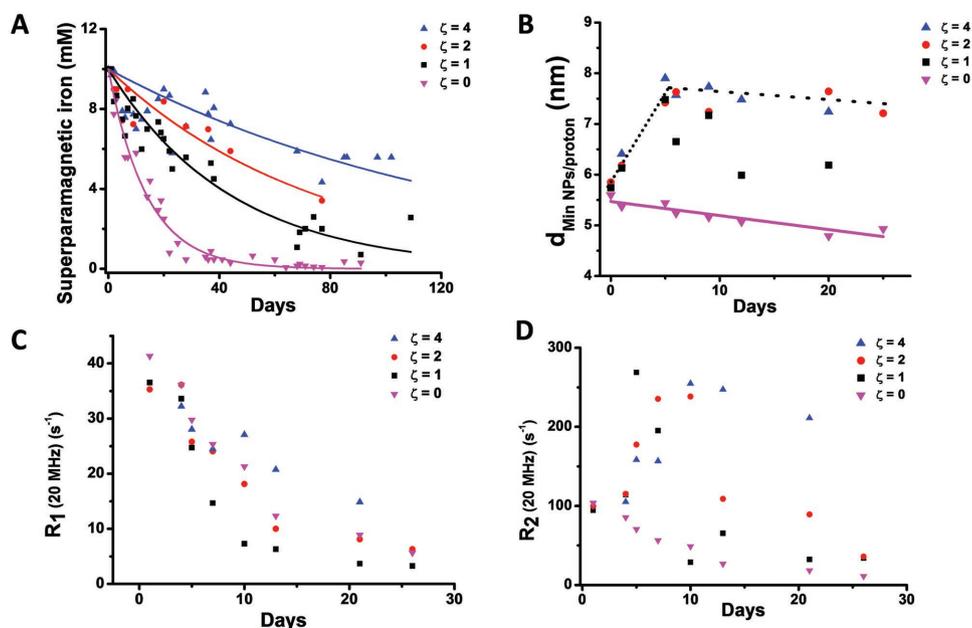
**Figure 5.** Signature of apoferritin filling with iron from metal salt, FeNTA. A) UV-vis spectrum of ApoF incubated with FeNTA for 22 h in acidic medium in comparison to ApoF alone and HoloF. Note the growth of the absorbance shoulder at 280 nm indicating the filling of the protein cage. B) HRTEM of ApoF incubated with FeNTA shows a crystalline structure with a diffraction spectrum displaying two systems of lattice fringes with lattice spacing of 0.22 and 0.29 nm characteristic of the inverse spinel structure of magnetite or maghemite (planes (113) and (440), zone axis [112]). C) Histogram of inter-reticular distance observed in ferritin nanocrystals, demonstrating the presence of the inverse spinel structure and possibly the presence of the hematite structures. D) Distribution of crystal sizes (mean diameter  $3.5 \pm 0.9$  nm) suggesting a partial filling of the protein cage, in line with UV-Vis spectrum. E) HRTEM and STEM-HAADF images of a ferritin particle aggregate and F) EDX analysis of the red area depicted in (F), indicated characteristic lines of iron and sulfur.

the number of iron atoms available in particles is equal to the maximal number of iron that can be stored in ApoF (i.e., 4500 iron atoms per ApoF protein). For  $\zeta = 2$  ( $\zeta = 4$ ), we have two (respectively, four) proteins for 4500 available metal atoms. Surprisingly, the kinetics of NP degradation, evaluated by EPR (Figure 7A), was slowed down by the presence of ApoF, regardless of particle coating (citrate or dextran). The larger the excess of proteins, the longer the characteristic time of NP degradation. The NMR relaxation measurements corroborate this finding with a slower diminution of the longitudinal relaxation rate  $R_1$  in the presence of ApoF (Figure 7C). Importantly, by fitting the NMRD profiles using

EPR determination of superparamagnetic iron concentration, one can deduce the minimal distance of approach between the citrate-coated IONPs and water protons in the sample. While this distance slightly decreases in the absence of ApoF ( $\zeta = 0$ ) indicating the degradation of IONPs, it increases with the excess of ApoF during the first days in acidic medium and then decreases again (Figure 7B). Consistently, the transverse relaxation rate  $R_2$  shows similar variations over time. These results can be explained by the transient aggregation of NPs with proteins or by the formation of a protein corona around the NPs, both processes being susceptible to delay IONP dissolution. This aggregation is nevertheless followed by the



**Figure 6.** Follow-up of iron transfer from NPs to apoferritin proteins. In all experiments, the ApoF/NPs ratio is  $\zeta = 1$ . A) UV-vis spectra of ApoF incubated with citrate-coated IONPs in acidic medium for different times in comparison to ApoF and HoloF. The growth of absorbance shoulder at 280 nm indicates metal filling of the protein. B) Kinetic of metal transfer in proteins measured by the evolution of the 280 nm absorbance of ApoF incubated with IONPs with different coating (citrate, dextran, and hydrophilic derivative of glucose (P904)). Note the partial filling of proteins in comparison to HoloF.



**Figure 7.** Degradation kinetics of citrate-coated IONPs in the presence of different ratios  $\zeta$  of ApoF in acidic medium. A) Time evolution of the superparamagnetic iron derived from EPR measurements. The higher the ratio of ApoF, the slower the kinetics of NP degradation. B) Minimal distance of approach between IONPs and water protons deduced from NMRD profiles. This distance continuously diminishes in the absence of ApoF, but increases first and then diminishes in the presence of ApoF. The transient distance increase is due to protein–particle aggregation, while its diminution results from IONPs degradation. Time evolution of the C) longitudinal and D) transverse relaxation rates at 20 MHz for different ratios  $\zeta$  of ApoF. The diminution of  $R_1$  results from the interplay of IONPs degradation and protein-induced aggregation.  $R_2$  first increases due to aggregation and then diminishes due to degradation.

delayed degradation of NPs, which tends to diminish the minimal distance of approach of water protons.

To deeper investigate the interactions of NPs with proteins and characterize the colloidal dynamics of the mixture for different protein ratios, SAXS experiments were carried out. Ten minutes after mixing, all protein-NPs samples were homogenous but their SAXS spectrum differed from that of IONPs alone ( $\zeta = 0$ ) by the presence of “extra scattering” at low and high  $q$  range. At low  $q$  range, the power law decay,  $I \propto q^{-1.6}$ , indicates the presence of aggregates of IONPs with proteins and the high  $q$  range reflects the contribution of ApoF form factor, notably at  $\zeta = 4$  when the form factor oscillations are visible.

As the dispersion of IONPs with ApoF led to phase separation in the studied range of protein ratio, we characterized the supernatant at different aging times after mixing. The SAXS curves corresponding to supernatant at  $\zeta = 1$  and 4 for the different stages of the degradation process are shown in **Figure 8B,C**. In the protein-free acidic medium ( $\zeta = 0$ ), the intensity scattered at  $q = 0.02 \text{ \AA}^{-1}$  decays exponentially due to the degradation of IONPs. On the contrary, the scattered intensity shows a nonmonotonous evolution in the presence of ApoF (**Figure 7A**). Actually, a three-stage kinetics appears for  $\zeta \geq 1$ .

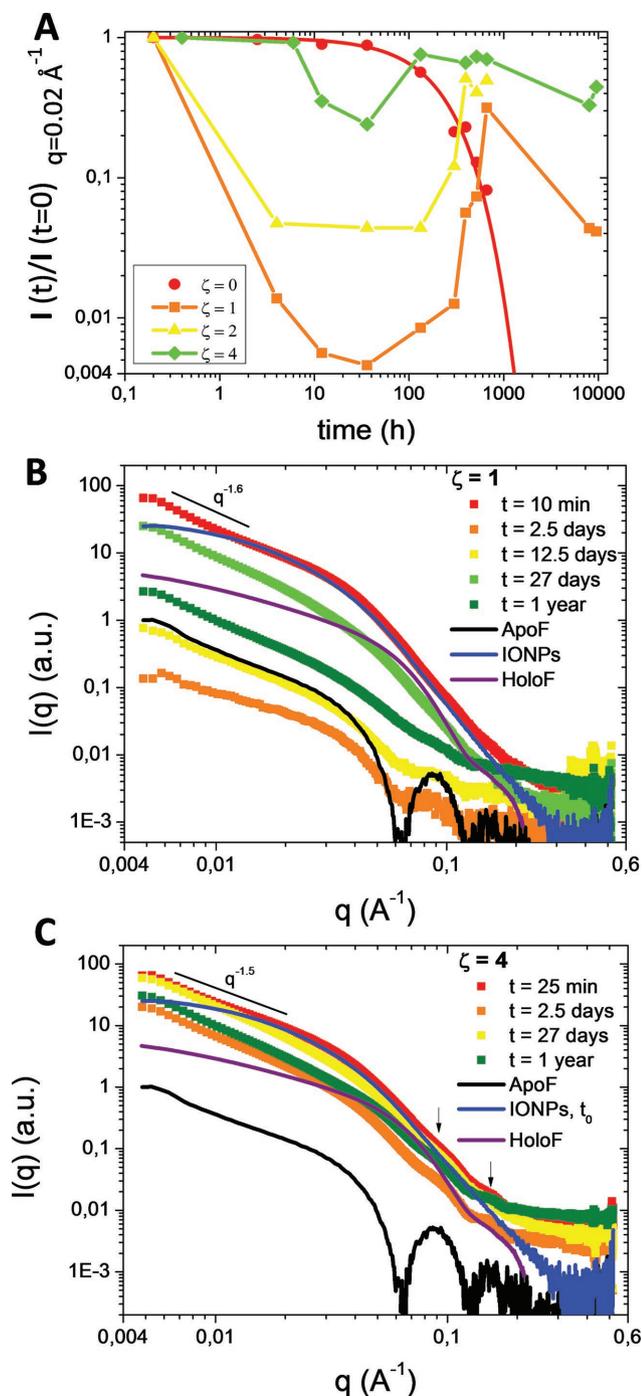
The first stage takes place during the first two days and corresponds to a decrease of the normalized intensities until a minimum due to the destabilization of ApoF/IONPs mixture. A complete phase separation rapidly occurs at  $\zeta = 1$ , segregating particles and proteins in the dense phase and a highly diluted solution of aggregated ApoF in the supernatant. When enhancing the protein ratio  $\zeta$  from 1 to 4, the destabilization is less marked and slower.

The evolution of the supernatant SAXS pattern at  $\zeta = 4$  indicates that more and more IONPs are associated and stabilized by ApoF in the supernatant.

The second step, characterized by an increase of the scattering intensity in the supernatant, reveals a redispersion process of both proteins and NPs from the dense phase to the supernatant. This redispersion can reflect a partial degradation of IONPs in the dense phase. As NP degradation occurs, the number of NPs and the total area at NPs’ interfaces decrease. As a consequence the apparent protein number per particle increases leading to a spontaneous restabilization of NPs/protein complexes. Consistently, this redispersion sets on faster when increasing the protein ratio, confirming the crucial role of ApoF protein corona in the restabilization process.

In the final step, the suspension becomes homogeneous and the scattering intensity decreases again due to IONPs degradation.

Overall, we can conclude that the formation of NPs/protein aggregates and of ApoF corona around NPs initially restricts the access of the citrate to the NPs surface and slows down the kinetics of NPs degradation. The effective transfer of metal ions into ApoF cavity did not accelerate NP degradation in acidic citrate medium, which rather results from the interplay between colloidal stability governed by NP/protein interactions and access of iron chelators to the NP surface. This statement was definitely established by complementary experiment in which NPs and ApoF were separated by a dialysis membrane permeable to small molecules such as citrate, iron ions or citrate-iron complexes (**Figure 9A**). Indeed when close interactions between NPs and ApoF were abolished,



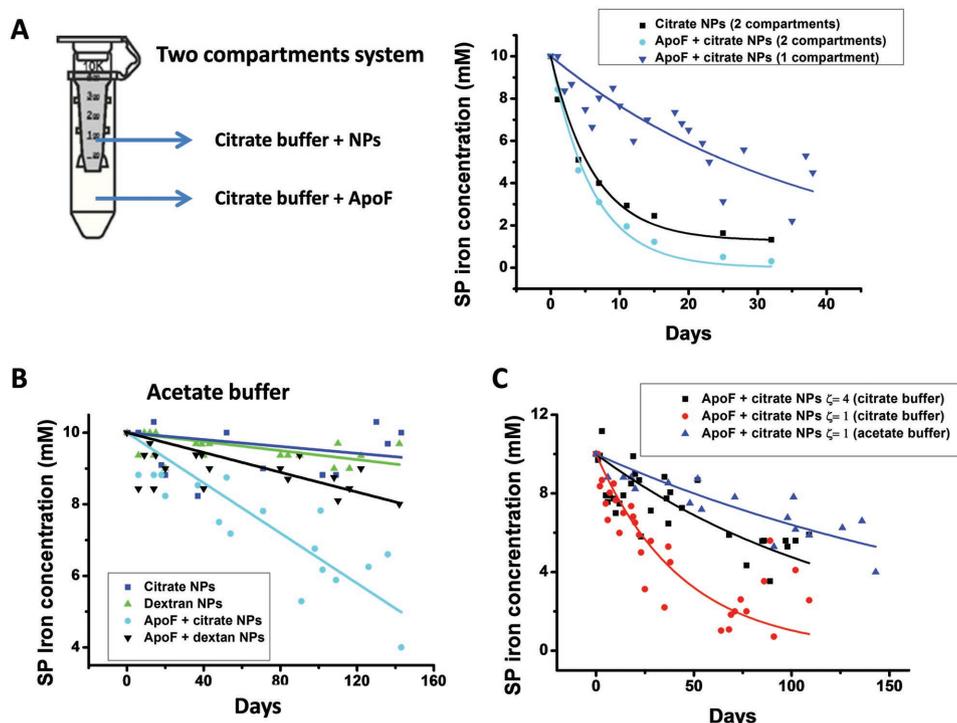
**Figure 8.** A) Time evolution of the SAXS intensity measured at  $q = 0.02 \text{ \AA}^{-1}$  and normalized to the intensity at  $t = 0$  for the supernatant of citrate-coated IONPs in the presence of different protein ratio  $\zeta$  of ApoF as indicated in the inset. The red line corresponds to the best adjustment of single exponential with characteristic degradation time of 7.7 d. The other lines are guides for the eye. SAXS curves of ApoF/IONPs mixtures (supernatant) at different time points in acidic citrate medium and different protein ratios  $\zeta =$  B) 1 and C) 4. The continuous lines correspond to the SAXS pattern of ApoF (black curve), HoloF (violet curve), and IONPs diluted in the citrate buffer 1 h after dispersion.

we observed similar degradation kinetics in the presence and absence of ApoF, confirming the importance of protein/NP contact in the regulation of degradation.

The question remained whether and to what extent ApoF could eventually favor the degradation of IONPs by direct chelation of iron on the surface of the particles, competing with citrate or other chelating agents. We thus performed degradation experiments in citrate-free acetate buffer (acetate  $40 \times 10^{-3} \text{ M}$ , pH 4.7) in which IONPs remained quasi-intact for long period of time in the absence of ApoF. As shown in Figure 9B, IONPs started to degrade in the presence of ApoF ( $\zeta = 1$ ), with a faster kinetics for the citrate-coated IONPs in comparison to dextran-coated NPs (Figure 9B). This is consistent with a direct role of ApoF protein in the complexation of iron coming from particles. The access of ApoF to iron at the surface of particles is less easy in case of dextran coating, known to be an antifouling coating, compared to citrate-coating. We thus conclude that ApoF per se has the ability to induce IONP degradation and directly accommodate their residues. Figure 9C shows the different degradation kinetics for citrate-coated NPs in acetate buffer or citrate buffer. As described previously, the degradation of IONPs in citrate buffer is slowed down in the presence of ApoF due to the formation of an ApoF corona around the NPs. This ApoF shield restricts the access of citrate to the NPs and thus slow down the degradation of the NPs. In the citrate buffer there are two degradation mechanisms: the dissolution of the NPs by the citrate ligand (fast) and the erosion of the NPs by the ApoF (slow). When an excess of ApoF is added to the NPs ( $\zeta = 4$ ) in the citrate buffer the evolution of the superparamagnetic iron concentration tend to the evolution in the acetate buffer meaning a progressive and almost total covering of ApoF around the IONPs (Figure 9C). Thus the ApoF protects the IONPs from the citrate ligand and the degradation of the NPs is governed by the sole effect of ApoF proteins.

#### 2.4. Significance for In Vivo Remediation of IONPs

In previous studies, high-resolution observations of organs excised from treated animals provided information on the ultrastructure of lysosomes in macrophages located within different tissues (spleen, liver,<sup>[4a,c,11b]</sup> or inflammatory sites such as adipose tissue<sup>[31]</sup> or atherosclerotic plaques<sup>[11a]</sup>) and pointed out the ubiquitous presence of HoloF nearby or within IONP-rich zones. In addition, the local lysosomal degradation of IONPs has been empirically demonstrated<sup>[3b,4b]</sup> and the transfer of  $^{59}\text{Fe}$  from IONPs to the hemoglobin of rats<sup>[5a]</sup> and mice<sup>[5b]</sup> was established. Here we first showed that ApoF could accommodate in its cavity relevant quantities of iron III after incubation with metal salts at the acidic, lysosome-like pH, but also iron ions released from IONPs in the course of their degradation in the acidic citrate medium. ApoF has been proposed as bioreactor for the encapsulation of various metallic compounds and drugs by disassembly/reassembly of the protein shell under specific conditions. However its capacity to store iron III ions released from NPs under physiologically relevant conditions was never investigated. Our finding suggests the capacity of ferritin to store iron ions released by IONPs in lysosomes and consequently avoid harmful reactions related to free metal ions, providing protection against oxidative stress.



**Figure 9.** A) Comparison of the degradation kinetics of citrate-coated IONPs in acidic citrate medium in cases NPs and ApoF are mixed with  $\zeta = 1$  in a single compartment or are separated by a dialysis membrane in two compartments as illustrated in the scheme. ApoF delays the degradation of IONPs only if contact with NPs is granted. B) Degradation of citrate-coated and dextran-coated IONPs in acidic acetate medium ( $\zeta = 1$ ) showing that ApoF by itself is able to trigger the dissolution of citrate-coated NPs and to a lesser extent of dextran-coated NPs. C) Comparison of the degradation of citrate-coated IONPs in acidic citrate and acetate medium for  $\zeta = 1$  and 4.

The role of metal chelating agents as intermediates for metal transfer and recycling in ferritin requires further investigation into more realistic and more complete lysosomal media. Particularly ferritins can be degraded by proteases in lysosomes and partially lose their ferroxidase activity. Note the ferroxidase activity of ferritin, provided by ferritin H subunit, is not mandatory for the recycling and nucleation of iron ions coming from maghemite NPs which comprise iron in its already oxidized state. This point has been confirmed recently in a tissue model consisting of stem cell spheroid labeled with maghemite NPs.<sup>[3b]</sup> IONPs were shown to degrade into endolysosomal compartments of stem cells, while ferritin L gene expression responsible for iron binding and nucleation was overexpressed, but not ferritin H. Nevertheless, we observed that, in the absence of more potent iron chelating agent, ApoF per se could trigger the degradation of IONPs and accommodate iron III ions. In the presence of citrate ions, which by itself induce the degradation of particles in acidic conditions, the dissolution of IONPs was delayed and not accelerated by the presence of ApoF. The unexpected delay in IONPs degradation, observed after increasing the ratio of apoferritin in the acidic medium, can be explained by a complex and dynamic colloidal behavior within the mixture as shown by SAXS investigations. When mixed with ApoF at increasing ratios, IONPs are destabilized and assemble with proteins to form loose aggregates. Although IONPs dissolution is delayed by aggregation owing to restricted access of ApoF and citrate ions to the NP surface, the aggregates tend to dissociate at longer times which eventually results in the

dissolution of IONPs and the transfer of iron into the protein cage. This dynamic evolution of the NP/protein complexes is confirmed by NMR relaxation measurements, which revealed both the rarefaction of relaxation rates) and the nonmonotonous variation of the proton accessibility to the magnetic cores, restricted by the shield of aggregated proteins. Remarkably, the different nanostructurations of ferritin proteins were also observed in tissue samples, particularly within lysosomes.<sup>[4a,c]</sup> For example, HoloF are frequently assembled in large separated structures or are present as loose aggregates surrounding the NPs. In view of the present results, the biogenesis, recruitment and spatial distribution of ferritin proteins around administered NPs could be a step in the cell's strategy to modulate IONPs degradation and iron transfer, and regulate the availability of free and reactive metal ions in lysosomes.

### 3. Conclusion

In conclusion, this study relied on different complementary methods to monitor the degradation of metal oxide NPs, the loss of their magnetic and functionally relevant properties, their morphological change, and aggregation status in the presence of ferritin proteins. Our results demonstrate, at the nanoscale, the transfer of iron from IONPs to endogenous ferritin proteins in the acidic conditions of lysosomes and highlight the role of ferritin in the remediation of

NP-released metal ions. The relative spatial structuration of NPs with ferritins is shown to have a crucial effect on their degradation and recycling processes.

## 4. Experimental Section

**Nanoparticles:** All NPs used in this study were synthesized by coprecipitation method according to Massart's procedure.<sup>[32]</sup> IONPs consisted of a magnetic (magnetite) core obtained by coprecipitation of ferrous and ferric ions and fully oxidized to maghemite ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). IONPs were covered with citrate (citrate-coated IONPs), carboxymethyl dextran (dextran-coated IONPs), or a hydrophilic aminoalcohol derivative of glucose grafted by phosphonate groups on the surface of NPs (P904, developed by Guerbet SA for MRI imaging of inflammation process).<sup>[31]</sup> The suspensions were stable in water in a pH range of 3–8 owing to electrostatic stabilization (negatively charged citrate-coating) or both steric and electrostatic repulsions (dextran and derivative of glucose).<sup>[33]</sup> The size distributions of the NPs were determined by TEM. The hydrodynamic diameter was determined by DLS in water and was in the range of 20–40 nm. Detailed NPs specifications are reported in Figure 1.

**TEM:** HRTEM imaging and EDX spectroscopy were performed on a JEOL ARM 200 F microscope, equipped with a CEOS aberration corrector, a cold field emission gun and a JEOL EDX diode, operated at 200 kV.<sup>[34]</sup>

**Lysosome-Like Buffer:** The medium used to mimic the acidic environment of the lysosomes, as described by Arbab et al.<sup>[18b]</sup> consisted of  $20 \times 10^{-3}$  M citric acid at pH 4.7. The acidic citrate buffer was prepared by mixing  $10 \times 10^{-3}$  M of citric acid ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  Fluka, >99.5%) and  $10 \times 10^{-3}$  M of sodium citrate tribasic ( $\text{C}_6\text{H}_7\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Fluka >99%) in 250 mL of purified water.

**Metal Transfer to ApoF: Filling of ApoF with Metal Complexes Salts:** A  $0.05 \times 10^{-3}$  M solution of ApoF (apoferritin from equine spleen, Sigma) was incubated at 37 °C for 1 d with an excess of iron(III) nitrilotriacetate complex (FeNTA,  $5 \times 10^{-3}$  M) in the acidic citrate buffer and the mixture was dialyzed (Dialysis membrane 50 kD, Spectrum Labs) to remove the excess of iron salt.

**Filling ApoF with IONPs:** The IONPs were incubated with ApoF in the acidic citrate buffer for different times, the final concentrations being  $0.12 \times 10^{-3}$  M of NPs and  $0.5 \times 10^{-6}$  M of ApoF.

**UV-Visible Spectroscopy:** Absorption measurements were performed at  $(37 \pm 0.5)$  °C on a Cary 4000 UV/Vis/NIR spectrophotometer equipped with a thermostated cell carrier. The signal of nondegraded NPs was subtracted to remove the diffusion signal related to NPs.

**In Vitro NP Degradation Procedure:** NPs were incubated at 37 °C in the dark with and without ApoF in the acidic citrate or acetate buffer at  $20 \times 10^{-3}$  and  $40 \times 10^{-3}$  M respectively with a final iron concentration of  $10 \times 10^{-3}$  M. ApoF was used at different ratios,  $\zeta = 0, 1, 2, \text{ or } 4$ . Each ApoF could accommodate up to 4500 iron atoms. For  $\zeta = 1$ , there were 4500 atoms of iron available for one apoF ( $10 \times 10^{-3}$  M iron,  $2.2 \times 10^{-6}$  M ApoF) and for  $\zeta = 4$ , 4500 atoms of iron for four apoF ( $10 \times 10^{-3}$  M iron,  $8.8 \times 10^{-6}$  M ApoF). Amicon filters 10K were used for the experiment where the NPs were separated from the ApoF (two compartments). In the first compartment, the NPs (iron concentration =  $10 \times 10^{-3}$  M) were incubated in the citrate buffer at  $20 \times 10^{-3}$  M and the second compartment contained the citrate buffer at  $20 \times 10^{-3}$  M without or

with apoF ( $\zeta = 1$ ). The suspensions were characterized by physical methods described below.

**NMRD:** The frequency dependence of the longitudinal  $^1\text{H}$  relaxation rate,  $R_1 = 1/T_1$ , was recorded in the suspension over the frequency range of 0.015–40 MHz using a Spinmaster FFC-2000 fast-field cycling NMR relaxometer (Stelar SRL, Mede, Italy). The temperature of the samples was maintained at 37 °C using a thermostated airflow system. All of the  $^1\text{H}$  magnetization recovery curves were monoexponential within experimental error, and the random errors in fitting  $T_1$  were always less than 2%.  $R_1$  and  $R_2 (= 1/T_2)$  were also measured using the inversion recovery and CPMG pulse sequence with an interecho time of 1 ms, respectively, on a 20 MHz and on a 60 MHz Bruker Minispec. All measurements were performed in samples with iron concentration of  $1 \times 10^{-3}$  M, prepared by aqueous extemporaneous 10-times dilutions of the suspensions in acidic citrate medium taken at different incubation times.

**EPR:** EPR was performed with an E500 EPR spectrometer operating at X band frequencies (9.5 GHz). The first derivative of the absorption  $dW(B)/dB$  was recorded as a function of the applied field  $B$  in the range 0–10 kGauss with a microwave power of 1 mW. The signal was collected for small volumes (2  $\mu\text{L}$ ) of IONP suspensions, at iron concentration of  $10 \times 10^{-3}$  M, inserted in capillary Wiretrol II 1–5  $\mu\text{L}$  (VWR, France). The area of the EPR absorption curve, calculated by a double integration of the spectrum  $dW(B)/dB$ , was proportional to the amount of superparamagnetic IONPs in the sample. An absolute calibration was performed using suspensions of initial IONPs at different iron concentrations, quantified by ICP-MS. It was checked that paramagnetic iron species that could be released in the acidic medium were not contributing to the EPR signal at room temperature.

**DLS:** DLS measurements were carried out at 25 °C on a Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Instruments) equipped with a 5.0 mW He-Ne laser operating at 632.8 nm and an Avalanche photodiode detector. The time-averaged intensity of scattered light at 173° (derived count rate) was used to quantify the number of scattering NPs in course of their degradation. It was also verified that for the native nondegraded NPs, the time-averaged intensity of scattered light was proportional to the iron concentration. The dispersions were never filtered before measurements.

**SAXS:** SAXS experiments were performed at 25 °C with samples ( $[\text{Fe}] = 0 \text{ or } 10 \times 10^{-3}$  M,  $[\text{ApoF}] = 0, 2.2 \times 10^{-6}, 4.4 \times 10^{-6}, \text{ or } 8.8 \times 10^{-6}$  M in acidic citrate medium; or  $[\text{ApoF}] = 8.8 \times 10^{-6}$  M or  $[\text{HoloF}] = 8.8 \times 10^{-6}$  M in water) placed in sealed quartz capillaries on two synchrotron beamlines:

- SWING beamline (SOLEIL synchrotron at Saint-Aubin, France) with a configuration  $D = 2.1$  m and  $\lambda = 1$  Å to get a  $q$ -range from  $4.8 \times 10^{-3}$  to  $0.52$  Å $^{-1}$ .
- BL11-NCD beamline (ALBA synchrotron at Barcelona, Spain) with the following configuration:  $D = 6.1$  m and  $\lambda = 1$  Å to get a  $q$ -range from  $4.8 \times 10^{-3}$  to  $0.21$  Å $^{-1}$ .

## Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

## Acknowledgements

This work was supported by ANR (Agence Nationale de la Recherche) and CGI (Commissariat à l'Investissement d'Avenir) through Labex SEAM (Science and Engineering for Advanced Materials and devices; ANR 11 LABX 086, ANR 11 IDEX 05 02), by the CNRS (Defi Nano) and DIM C'Nano Ile de France. The authors are grateful to Y. Frappart and S. Lajnef for EPR experiments. The authors are grateful to Guerbet company for providing with P904 IONPs. The authors acknowledge synchrotron SOLEIL (SWING, SOLEIL, Saint-Aubin, France) and synchrotron ALBA (Barcelona, Spain) for SAXS beam time allocation and Thomas Bizien and Marc Malfois for their assistance.

- [1] H. Liu, J. Zhang, X. Chen, X.-S. Du, J.-L. Zhang, G. Liu, W.-G. Zhang, *Nanoscale* **2016**, *8*, 7808.
- [2] H. Arami, A. Khandhar, D. Liggitt, K. M. Krishnan, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8576.
- [3] a) N. Feliu, D. Docter, M. Heine, P. del Pino, S. Ashraf, J. Kolosnjaj-Tabi, P. Macchiarelli, P. Nielsen, D. Alloyeau, F. Gazeau, R. H. Stauber, W. J. Parak, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 2440; b) F. Mazuel, A. Espinosa, N. Luciani, M. Refay, R. Le Borgne, L. Motte, K. Desboeufs, A. Michel, T. Pellegrino, Y. Lalatonne, C. Wilhelm, *ACS Nano* **2016**, *10*, 7627.
- [4] a) M. Levy, N. Luciani, D. Alloyeau, D. Elgrabli, V. Deveaux, C. Pechoux, S. Chat, G. Wang, N. Vats, F. Gendron, C. Factor, S. Lotersztajn, A. Luciani, C. Wilhelm, F. Gazeau, *Biomaterials* **2011**, *32*, 3988; b) J. Kolosnjaj-Tabi, Y. Javed, L. Lartigue, J. Volatron, D. Elgrabli, I. Marangon, G. Pugliese, B. Caron, A. Figuerola, N. Luciani, T. Pellegrino, D. Alloyeau, F. Gazeau, *ACS Nano* **2015**, *9*, 7925; c) L. Lartigue, D. Alloyeau, J. Kolosnjaj-Tabi, Y. Javed, P. Guardia, A. Riedinger, C. Pechoux, T. Pellegrino, C. Wilhelm, F. Gazeau, *ACS Nano* **2013**, *7*, 3939; d) A. Ruiz, Y. Hernandez, C. Cabal, E. Gonzalez, S. Veintemillas-Verdaguer, E. Martinez, M. P. Morales, *Nanoscale* **2013**, *5*, 11400; e) A. Ruiz, L. Gutierrez, P. R. Caceres-Velez, D. Santos, S. B. Chaves, M. L. Fascinelli, M. P. Garcia, R. B. Azevedo, M. P. Morales, *Nanoscale* **2015**, *7*, 16321; f) R. Mejias, L. Gutiérrez, G. Salas, S. Pérez-Yagüe, T. M. Zotes, F. J. Lázaro, M. P. Morales, D. F. Barber, *J. Controlled Release* **2013**, *171*, 225; g) J. Kolosnjaj-Tabi, L. Lartigue, Y. Javed, N. Luciani, T. Pellegrino, C. Wilhelm, D. Alloyeau, F. Gazeau, *Nano Today* **2016**, *11*, 280.
- [5] a) R. Weissleder, D. D. Stark, B. L. Engelstad, B. R. Bacon, C. C. Compton, D. L. White, P. Jacobs, J. Lewis, *AJR, Am. J. Roentgenol.* **1989**, *152*, 167; b) D. Pouliquen, J. J. Le Jeune, R. Perdrisot, A. Ermias, P. Jallet, *Magn. Reson. Imaging* **1991**, *9*, 275; c) B. Freund, U. I. Tromsdorf, O. T. Bruns, M. Heine, A. Giemsa, A. Bartelt, S. C. Salmen, N. Raabe, J. Heeren, H. Ittrich, R. Reimer, H. Hohenberg, U. Schumacher, H. Weller, P. Nielsen, *ACS Nano* **2012**, *6*, 7318; d) E. Okon, D. Pouliquen, P. Okon, Z. V. Kovaleva, T. P. Stepanova, S. G. Lavit, B. N. Kudryavtsev, P. Jallet, *Lab. Invest.* **1994**, *71*, 895.
- [6] a) E. Pawelczyk, A. S. Arbab, S. Pandit, E. Hu, J. A. Frank, *NMR Biomed.* **2006**, *19*, 581; b) R. Schafer, R. Kehlback, J. Wiskirchen, R. Bantleon, J. Pintaske, B. R. Brehm, A. Gerber, H. Wolburg, C. D. Claussen, H. Northoff, *Radiology* **2007**, *244*, 514.
- [7] a) E. C. Theil, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 304; b) R. K. Watt, R. J. Hilton, D. M. Graff, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2010**, *1800*, 745; c) N. Gálvez, B. Fernández, P. Sánchez, R. Cuesta, M. Ceolín, M. Clemente-León, S. Trasobares, M. López-Haro, J. J. Calvino, O. Stéphan, J. M. Domínguez-Vera, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8062; d) C. Quintana, J. M. Cowley, C. Marhic, *J. Struct. Biol.* **2004**, *147*, 166.
- [8] J. Joshi, A. Zimmerman, *Toxicology* **1988**, *48*, 21.
- [9] a) P. M. Harrison, P. Arosio, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1275*, 161; b) N. Bresgen, P. Eckl, *Biomolecules* **2015**, *5*, 808.
- [10] N. D. Chasteen, P. M. Harrison, *J. Struct. Biol.* **1999**, *126*, 182.
- [11] a) V.-A. Maraloiu, F. Appaix, A. Broisat, D. Le Guellec, V. S. Teodorescu, C. Ghezzi, B. van der Sanden, M.-G. Blanchin, *Nanomedicine* **2016**, *12*, 191; b) J. D. Lopez-Castro, A. V. Maraloiu, J. J. Delgado, J. J. Calvino, M. G. Blanchin, N. Galvez, J. M. Domínguez-Vera, *Nanoscale* **2011**, *3*, 4597.
- [12] a) I. Lynch, K. A. Dawson, *Nano Today* **2008**, *3*, 40; b) C. D. Walkey, W. C. W. Chan, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2780.
- [13] F. Bertoli, G.-L. Davies, M. P. Monopoli, M. Moloney, Y. K. Gun'ko, A. Salvati, K. A. Dawson, *Small* **2014**, *10*, 3307.
- [14] S. J. Soenen, W. J. Parak, J. Rejman, B. Manshian, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2109.
- [15] a) N. Liu, Y. Mu, Y. Chen, H. Sun, S. Han, M. Wang, H. Wang, Y. Li, Q. Xu, P. Huang, Z. Sun, *Part. Fibre Toxicol.* **2013**, *10*, 37; b) A. M. Derfus, W. C. W. Chan, S. N. Bhatia, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 11.
- [16] R. P. Singh, P. Ramarao, *Toxicol. Lett.* **2012**, *213*, 249.
- [17] W.-S. Cho, R. Duffin, S. E. M. Howie, C. J. Scotton, W. A. H. Wallace, W. MacNee, M. Bradley, I. L. Megson, K. Donaldson, *Part. Fibre Toxicol.* **2011**, *8*, 27.
- [18] a) M. Levy, F. Lagarde, V. A. Maraloiu, M. G. Blanchin, F. Gendron, C. Wilhelm, F. Gazeau, *Nanotechnology* **2010**, *21*, 395103; b) A. S. Arbab, L. B. Wilson, P. Ashari, E. K. Jordan, B. K. Lewis, J. A. Frank, *NMR Biomed.* **2005**, *18*, 383; c) S. J. H. Soenen, U. Himmelreich, N. Nuytten, T. R. Pisanic, A. Ferrari, M. De Cuyper, *Small* **2010**, *6*, 2136.
- [19] M. Ghosh, F. Carlsson, A. Laskar, X.-M. Yuan, W. Li, *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 623.
- [20] a) T. Kurz, B. Gustafsson, U. T. Brunk, *Free Radical Biol. Med.* **2011**, *50*, 1647; b) T. Kurz, A. Terman, B. Gustafsson, U. T. Brunk, *Histochem. Cell Biol.* **2008**, *129*, 389.
- [21] M. A. Krenn, M. Schürz, B. Teuffl, K. Uchida, P. M. Eckl, N. Bresgen, *Free Radical Biol. Med.* **2015**, *80*, 48.
- [22] J. D. Mancias, X. Wang, S. P. Gygi, J. W. Harper, A. C. Kimmelman, *Nature* **2014**, *509*, 105.
- [23] Y. Javed, L. Lartigue, P. Hugounenq, Q. L. Vuong, Y. Gossuin, R. Bazzi, C. Wilhelm, C. Ricolleau, F. Gazeau, D. Alloyeau, *Small* **2014**, *10*, 3325.
- [24] F. Gazeau, V. Shilov, J.-C. Bacri, E. Dubois, F. Gendron, R. Perzynski, Y. L. Raikher, V. I. Stepanov, *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *202*, 535.
- [25] Y. Gossuin, P. Gillis, A. Hocq, Q. L. Vuong, A. Roch, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, *1*, 299.
- [26] Z. Yang, X. Wang, H. Diao, J. Zhang, H. Li, H. Sun, Z. Guo, *Chem. Commun.* **2007**, *33*, 3453.
- [27] J.-W. Kim, S. H. Choi, P. T. Lillehei, S.-H. Chu, G. C. King, G. D. Watt, *Chem. Commun.* **2005**, *32*, 4101.
- [28] a) F. C. Meldrum, V. J. Wade, D. L. Nimmo, B. R. Heywood, S. Mann, *Nature* **1991**, *349*, 684; b) E. Fantechi, C. Innocenti, M. Zanardelli, M. Fittipaldi, E. Falvo, M. Carbo, V. Shullani, L. Di Cesare Mannelli, C. Ghelardini, A. M. Ferretti, A. Ponti, C. Sangregorio, P. Ceci, *ACS Nano* **2014**, *8*, 4705; c) J. C. Cutrin, S. G. Crich, D. Burghelena, W. Dastrù, S. Aime, *Mol. Pharmaceutics* **2013**, *10*, 2079.
- [29] S. Pead, E. Durrant, B. Webb, C. Larsen, D. Heaton, J. Johnson, G. Watt, *J. Inorg. Biochem.* **1995**, *59*, 15.
- [30] Y.-H. Pan, G. Vaughan, R. Brydson, A. Bleloch, M. Gass, K. Sader, A. Brown, *Ultramicroscopy* **2010**, *110*, 1020.
- [31] A. Luciani, S. Dechoux, V. Deveaux, M. Poirier-Quinot, N. Luciani, M. Levy, S. Ballet, S. Manin, C. Pechoux, G. Autret, O. Clément,

- A. Rahmouni, A. Mallat, C. Wilhelm, S. Lotersztajn, F. Gazeau, *Radiology* **2012**, 263, 786.
- [32] R. Massart, *IEEE Trans. Magn.* **1981**, 17, 1247.
- [33] L. Lartigue, C. Wilhelm, J. Servais, C. Factor, A. Dencausse, J.-C. Bacri, N. Luciani, F. Gazeau, *ACS Nano* **2012**, 6, 2665.
- [34] C. Ricolleau, J. Nelayah, T. Oikawa, Y. Kohno, N. Braidy, G. Wang, F. Hue, L. Florea, V. Pierron Bohnes, D. Alloyeau, *Microscopy* **2013**, 62, 283.

Received: June 17, 2016  
Revised: September 23, 2016  
Published online:



### 3. Prise en charge de métaux issus de nanoparticules

---

L'étude présentée dans la section précédente a permis de mettre en évidence, en solution, le rôle de la ferritine dans la dégradation des NPOFs et la prise en charge du fer issu de ces dernières. Ce transfert témoigne de la capacité des ferritines à stocker le fer sous forme redox non active, diminuant ainsi la potentielle toxicité des NPOFs, cependant celui-ci n'a pas pu être démontré formellement *in vivo*. En outre, ces résultats soulèvent la question du rôle de la ferritine dans la détoxification des métaux dans le cas de nanoparticules autres que les NPOFs. En effet, une grande variété de nanoparticules inorganiques constituées de métaux divers tels que l'or, l'argent ou encore le zinc est utilisée en nanomédecine.<sup>37,38</sup> Ainsi, une question essentielle est de savoir si seul le fer peut être incorporé dans la ferritine ou si d'autres métaux issus de la dégradation des nanoparticules peuvent être stockés dans ces dernières dans les conditions physiologiques du lysosome.

Dès les années 1970, la question du rôle de la ferritine dans la détoxification de métaux est déjà abordée. De nombreuses études ont mis en évidence la capacité des ferritines à stocker différents métaux divalents tels le zinc, le plomb, le cadmium, l'aluminium et le cuivre.<sup>39,40</sup> Lindenschmidt *et al.* montrent en 1986 qu'après injection de sulfate de béryllium par voie intraveineuse chez le rat, il est stocké au sein des ferritines du foie.<sup>41</sup> En 1995, Pead *et al.* réalisent une étude complète du remplissage de ferritines et d'apo-ferritines, en solution, à partir de sels métalliques de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ .<sup>27</sup> Cette étude montre que le remplissage des ferritines dépend de plusieurs paramètres tels que l'affinité des protéines avec les métaux, le pH de la solution et le taux de remplissage des ferritines.

Plus récemment, la ferritine est devenue, grâce à ses propriétés de stockage remarquables, un véritable nanobioréacteur pour la synthèse de nanoparticules. Une fois complexés avec les ferritines, les métaux sont dirigés vers le centre ferroxidase où ils peuvent être oxydés puis acheminés vers le centre de nucléation où sont formées les nanoparticules. Grâce à sa structure en cage, l'utilisation de ferritine pour la biominéralisation de nanoparticules possède l'avantage de former des nanoparticules monodisperses, de composition variée et dans des conditions douces.<sup>28,30</sup>

Toutes ces études ont mis en évidence les capacités de stockage de sels métalliques de la ferritine, aussi bien en solution que *in vivo*. L'objectif de cette section est d'étudier le rôle de la ferritine dans la détoxification de métaux issus de nanoparticules, et en particulier du cobalt, dans des conditions lysosomales. A la suite de ces études préliminaires, nous avons sélectionné le cobalt, *a priori* non naturellement présent dans les ferritines endogènes, comme traceur du transfert de métaux vers les ferritines *in vivo*.

### 3.1 Description du système étudié : les ferrites de cobalt

Dans le cadre de la nanomédecine, les performances des NPOFs dépendent de leurs propriétés magnétiques. Celles-ci peuvent être contrôlées en modifiant leur taille, leur forme ou leur revêtement.<sup>42,43</sup> Une autre stratégie consiste à modifier la composition chimique des NPOFs en les dopant avec d'autres métaux, ce qui permet également de moduler leurs propriétés magnétiques. En particulier dans le cas de la magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $\text{FeFe}_2\text{O}_4$ ), constituée de deux atomes de fer à l'état d'oxydation (III) et un à l'état d'oxydation (II), il est possible de remplacer le fer (II) par un autre ion divalent (M) tel que le zinc, le cobalt, le manganèse ou le nickel, formant ainsi les nanoparticules ferrites  $\text{MFe}_2\text{O}_4$ . Qing Song *et al.* ont montré qu'un dopage au cobalt, formant des nanoparticules de ferrites de cobalt  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , améliorerait considérablement les propriétés magnétiques comparativement à celle de la magnétite.<sup>44</sup> En particulier, une augmentation de l'aimantation à saturation et de la température de blocage a été observée. Ce comportement magnétique est dû aux différences d'anisotropie magnéto-cristalline entre la magnétite et des ferrites de cobalt.<sup>45</sup>

Grâce à leurs propriétés magnétiques, les ferrites de cobalt suscitent désormais un réel intérêt pour des applications biomédicales<sup>46</sup> et en particulier pour l'hyperthermie magnétique. Plusieurs études ont montré de meilleures capacités de chauffage des nanoparticules dopées au cobalt par rapport à celles constituées uniquement de fer.<sup>45,47</sup>

Pour une utilisation sûre des nanoparticules de ferrites de cobalt en nanomédecine, l'étude de leur toxicité et de leur devenir à long terme dans l'organisme est indispensable. Plusieurs études *in vitro* ont montré que les nanoparticules de cobalt induisent une cytotoxicité accrue.<sup>48-50</sup> A titre d'exemple, Hahn *et al.* ont rapporté qu'après 72 heures d'incubation de nanoparticules de cobalt avec des cellules endothéliales à une concentration de 0,1  $\mu\text{M}$ , l'activité métabolique était réduite de plus de 20 %.<sup>50</sup> Plongées dans un milieu de culture cellulaire, les ferrites de cobalt se dissolvent, libérant ainsi des atomes de  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  sous forme non particulaire.<sup>50,51</sup> Or le cation  $\text{Co}^{2+}$  est considéré comme la forme la plus toxique du cobalt.<sup>50,51</sup> Au même titre que le  $\text{Fe}^{2+}$ , le  $\text{Co}^{2+}$  peut catalyser la réaction de Fenton et induire ainsi un stress oxydant par la production d'EROs au sein de la cellule.<sup>52</sup> L'inhibition d'enzymes d'intérêt ainsi que la perturbation du flux intracellulaire de calcium ont également été observées.<sup>52</sup>

L'étude du remplissage des ferritines avec des atomes de cobalt permet d'une part d'évaluer les capacités de ces protéines à stocker différents métaux issus des nanoparticules et, d'autre part, de déterminer s'il existe un mécanisme de détoxification du cobalt, diminuant ainsi les possibles effets toxiques susmentionnés.

Ces travaux de thèse ont consisté à évaluer si la ferritine pouvait stocker le cobalt issu de la dégradation de ferrite de cobalt dans le milieu modèle mimant les conditions lysosomales. Les phénomènes de transfert vers les ferritines ont ensuite été étudiés *in vivo*, après injection intraveineuse

de ferrites de cobalt, en considérant le cobalt comme élément de référence pour détecter ce transfert. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal Scientific Report.

Physiological remediation of cobalt ferrite nanoparticles by ferritin

J. Volatron, J. Kolosnjaj-Tabi, Y. Javed, Q.L. Vuong, Y. Gossuin, S; Neveu, N. Luciani, M. Hémadi, F. Carn, D. Alloyeau, et F. Gazeau.

*Scientific Reports*, 2017

Dans cette partie, incluse en amont de l'article, je vous présenterais d'une part la méthodologie adoptée pour étudier ces phénomènes, puis je résumerai les questions que nous nous sommes posées à travers cette étude et les principaux résultats que nous avons obtenus.

### 3.2 Méthodologie

#### Suivi de la dégradation de NPs de ferrites de cobalt

En premier lieu, la dégradation de nanoparticules de ferrites de cobalt a été évaluée dans le milieu modèle mimant les conditions lysosomales. L'anisotropie magnéto-cristalline des nanoparticules de ferrites de cobalt est telle qu'il n'est pas possible d'observer leur résonance ferromagnétique électronique à température ambiante avec un spectromètre utilisant des fréquences d'excitation de l'ordre du GHz.<sup>53,54</sup> Ainsi, le suivi de la dégradation au cours du temps a été réalisé par la mesure du temps de relaxation protonique transversal, présentée dans la section 2.1, et de l'aimantation globale de la suspension.

La mesure de l'aimantation globale de la suspension a été réalisée avec un magnétomètre à échantillon vibrant, VSM pour *vibrating sample magnetometer*. L'échantillon est soumis à un champ magnétique extérieur uniforme et placé dans un porte échantillon oscillant mécaniquement sur l'axe z. Les oscillations de l'échantillon magnétique engendrent un courant électrique proportionnel à l'aimantation de la suspension. La mesure de la différence de tension aux bornes de la bobine permet d'en déduire le moment magnétique de la suspension. Ces mesures ont été réalisées avec nos collaborateurs Quoc Lam Vuong et Yves Gossuin à l'Université de Mons.

Les propriétés structurales des nanoparticules de ferrites de cobalt ont été caractérisées par DLS et MET.

#### Remplissage en solution des ferritines

Dans un premier temps, le remplissage des ferritines a été réalisé à partir de sels de cobalt et a été suivi en spectroscopie UV-visible et en microscopie électronique afin de caractériser les structures cristallines formées au sein des ferritines.

Le remplissage des ferritines par les métaux issus des nanoparticules de ferrites de cobalt a été suivi par spectroscopie UV-visible dans des conditions identiques à celles présentées dans la section 2.1. Cependant, l'évolution du signal en spectroscopie UV-visible ne permet pas de distinguer le fer du cobalt. Ainsi nous avons combiné cette méthode avec de la spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDX) couplée au microscope électronique en transmission. Le faisceau d'électron, utilisé en MET, interagit avec l'échantillon ce qui engendre des rayons X d'énergie caractéristique des éléments chimiques présents dans l'échantillon. Il est ainsi possible de déterminer la composition chimique après analyse de ces énergies sur une surface délimitée de l'échantillon. Les analyses en MET et en EDX ont été réalisées par Yasir Javed et Damien Alloyeau du laboratoire MPQ de l'Université Paris Diderot.

#### Transfert *in vivo*.

Les transferts de fer vers les ferritines ne peuvent pas être mis en évidence *in vivo*. En effet, le fer exogène issu de la dégradation des NPOFs ne peut être distingué du fer endogène présent initialement dans les ferritines. En revanche, les ferritines endogènes ne contiennent *a priori* pas de cobalt. Aussi, en considérant le cobalt comme métal de référence, il est possible de suivre les phénomènes de remplissage des ferritines *in vivo*.

Les nanoparticules de ferrites de cobalt ont été injectées chez la souris et l'évolution de leurs propriétés structurales au sein des différents organes a été suivie par MET. La présence de ferritine à proximité des nanoparticules a pu être mise en évidence en MET grâce à un anticorps anti-ferritine couplé avec des nanoparticules d'or. Enfin, le suivi du remplissage des ferritines par les atomes de cobalt issus des nanoparticules a été réalisé par spectroscopie EDX couplée à la MET, comme présenté ci-dessus.

### **3.3 Synthèse des principaux résultats**

Dans cette section je résumerai les questions que nous nous sommes posées à travers cette étude et les principaux résultats que nous avons obtenus.

#### **Les ferrites de cobalt se dissolvent-elles dans le milieu modèle ?**

Plongée dans le milieu mimant les conditions lysosomales, les nanoparticules de ferrites de cobalt se dissolvent au bout de quatre jours. La dissolution des nanoparticules est caractérisée par une diminution du temps de relaxation transversal de la suspension au bout de quatre jours d'incubation dans le milieu modèle (Figure 3 (E), *Scientific Report*). La diminution de l'aimantation de la suspension au cours du temps a également été observée, confirmant ainsi les résultats précédents (Figure 3 (D), *Scientific Report*). Le suivi des propriétés structurales des nanoparticules a montré que leur taille demeure constante au cours de la dissolution avec une diminution du nombre de nanoparticules (Figure 3 (A, B & C), *Scientific Report*). Ces observations sont caractéristiques du mécanisme « tout ou rien » observé précédemment dans le cas des NPOFs. La dissolution des nanoparticules de ferrites de cobalt

libère des atomes de fer et de cobalt sous forme non particulière qui pourraient être pris en charge par les ferritines, comme cela a été démontré dans la section précédente pour le fer.

### **Le cobalt à l'état d'oxydation (+II) peut-il être stocké dans la ferritine ?**

Une question déterminante pour la suite de cette étude a été d'évaluer si la ferritine pouvait stocker des atomes de cobalt à l'état d'oxydation (+II). En effet, et contrairement au fer, les ferritines endogènes ne contiennent pas de cobalt.

Dans le but de synthétiser des nanoparticules d'oxydes de cobalt au sein de ferritines, plusieurs études ont montré un transfert effectif d'atome de cobalt vers ces dernières.<sup>28,55,56</sup> L'incubation de sels de cobalt en présence de ferritine conduit à la formation d'oxydes de cobalt  $\text{Co}_3\text{O}_4$ . Ces résultats ont été obtenus pour un pH égal à 8,5, en présence de peroxyde d'hydrogène, et à des températures supérieures à 50°C.<sup>55,56</sup> Dans le cadre de l'étude de la détoxification du cobalt par les ferritines, nous avons étudié les processus de transfert dans les conditions d'acidité des lysosomes, soit à un pH égal à 4,7 et à 37°C. Or, Pead *et al.* ont montré que l'affinité des ferritines pour les métaux dépend fortement du pH de la solution.<sup>27</sup> A titre d'exemple, dix-sept atomes de cobalt sont complexés à l'apo-ferritine à pH 7,5 contre seulement 0,3 à pH 5,5. Dans un premier temps, nous avons donc évalué si un transfert de cobalt vers les ferritines pouvait avoir lieu dans nos conditions expérimentales de pH. Les résultats en spectroscopie UV-visible montrent un remplissage de l'apo-ferritine à partir des sels de cobalt vingt-deux heures après le mélange de ces derniers à pH 4,7. Deux mois après l'incubation, l'analyse en MET de la solution montre la formation d'une phase cristalline CoO d'un rayon de 3,5 nm ( $\pm 0,6$  nm) au sein de la cavité de la protéine (Figure 4, *Scientific Report*). Le pH de la solution ainsi que l'absence de peroxyde d'hydrogène diminuent le taux d'oxydation du cobalt, ce qui pourrait expliquer la formation d'une phase cristalline CoO différente de celle observée dans les études citées ci-dessus.<sup>56</sup> Néanmoins, ces résultats montrent que le cobalt est stocké au sein de l'apo-ferritine à pH 4,7 sous forme d'oxyde de cobalt.

### **Qu'en est-il du cobalt issu de la dégradation des ferrites de cobalt ?**

Les nanoparticules de ferrites de cobalt ont ensuite été incubées avec l'apo-ferritine dans le milieu mimant les conditions lysosomales. On observe en spectroscopie UV-visible un remplissage de l'apo-ferritine par des métaux, deux jours suivant l'incubation (Figure 5 (A), *Scientific Report*). Cependant cette méthode seule ne permet pas de distinguer le remplissage du fer de celui du cobalt. Ainsi, une analyse en spectroscopie EDX a été réalisée deux mois après l'incubation des nanoparticules avec les apo-ferritines. Les résultats montrent la présence de nanoparticules d'un rayon de 3,3 nm ( $\pm 0,4$  nm), à proximité de nanoparticules de ferrites de cobalt intactes. L'analyse EDX de ces particules montrent la coexistence de fer, de cobalt et de soufre avec un pourcentage relatif de 64,7%, 28,2% et 7,13%, respectivement (Figure 5 (B, C & D), *Scientific Report*). La présence de soufre est la signature de l'apo-ferritine et confirme le remplissage de l'apo-ferritine avec du fer et du cobalt issu des nanoparticules.

L'ensemble de ces résultats montre que les nanoparticules de ferrites de cobalt se dissolvent dans le milieu modèle, libérant des atomes de fer et de cobalt sous forme non particulaire, ceux-ci sont ensuite stockés au sein de l'apo-ferritine. En ce sens, les ferrites de cobalt constituent un bon modèle pour mettre en évidence ces transferts *in vivo* et permettent en outre de s'affranchir des problèmes de détection liés au fer endogène.

### **Le transfert de cobalt issu des ferrites de cobalt a-t'il lieu *in vivo* ?**

Les nanoparticules de ferrites de cobalt ont été injectées par voie intraveineuse chez la souris. L'analyse des organes *ex vivo* en MET montre que les nanoparticules se retrouvent confinées dans les lysosomes des macrophages hépatiques et spléniques. Les ferritines sont caractérisées *in vivo* d'une part par leur taille, qui diffère de celle des nanoparticules de ferrites de cobalt et, d'autre part, par un marquage avec un anticorps couplé à des nanoparticules d'or. En outre, les ferritines peuvent être différenciées des nanoparticules de ferrites de cobalt par la présence de soufre en analyse EDX. Ainsi, les ferritines ont été observées à proximité des nanoparticules de cobalt sous forme de particules individuelles ou de clusters (Figure 1, *Scientific Report*).

Quarante-deux jours après l'injection intraveineuse, on observe un ensemble de particules constituées de ferritines et de ferrites de cobalt intactes dans la rate. L'analyse EDX sur des particules uniques montre la présence d'entités composées de fer, de soufre et de cobalt, caractéristique d'un remplissage des ferritines avec le cobalt issu des nanoparticules (Figure 2, *Scientific Report*).

A travers ces résultats nous avons pu montrer que l'apo-ferritine peut stocker d'autres métaux que le fer, et en particulier le cobalt, issu de sels ou de la dégradation de ferrites de cobalt. En outre, en considérant le cobalt comme traceur des processus de transfert *in vivo*, nous avons pu montrer que les ferritines endogènes peuvent stocker le cobalt issu de la dégradation des ferrites de cobalt *in vivo*. Aussi la ferritine endogène, en stockant les métaux exogènes provenant de la dégradation de nanoparticules sous forme redox non active, permet de réguler les flux de métaux labiles dans la cellule et la protège des potentiels effets toxiques liés à ceux-ci.

### **3.4 Publication associée à l'étude**

L'ensemble des résultats présentés précédemment sont décrits dans la publication ci-dessous. La synthèse et la fonctionnalisation des NPOFs a été réalisée par notre collaboratrice Sophie Neveu (Laboratoire Phénix Sorbone Université). Les images de MET ainsi que les analyses EDX ont été réalisées par Yasir Javed et Damien Alloyeau du laboratoire MPQ (Université Paris Diderot). J'ai réalisé les études de dégradation des ferrites de cobalt par mesures magnétiques et de temps de relaxation transversale avec nos collaborateurs Quoc Lam Vuong et Yves Gossuin à l'Université de Mons, et par caractérisation de leur taille en DLS, ainsi que l'étude du transfert de fer vers les apo-ferritines par spectroscopie UV-visible. Les études *in vivo* ont été réalisées par Jelena Kolosnjaj-Tabi.

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Physiological Remediation of Cobalt Ferrite Nanoparticles by Ferritin

Received: 05 October 2016  
Accepted: 30 November 2016  
Published: 09 January 2017

Jeanne Volatron<sup>1</sup>, Jelena Kolosnjaj-Tabi<sup>1,2</sup>, Yasir Javed<sup>3,4</sup>, Quoc Lam Vuong<sup>5</sup>, Yves Gossuin<sup>5</sup>, Sophie Neveu<sup>6</sup>, Nathalie Luciani<sup>1</sup>, Miryana Hémadi<sup>7</sup>, Florent Carn<sup>1</sup>, Damien Alloyeau<sup>3</sup> & Florence Gazeau<sup>1</sup>

Metallic nanoparticles have been increasingly suggested as prospective therapeutic nanoplatforms, yet their long-term fate and cellular processing in the body is poorly understood. Here we examined the role of an endogenous iron storage protein – namely the ferritin – in the remediation of biodegradable cobalt ferrite magnetic nanoparticles. Structural and elemental analysis of ferritins close to exogenous nanoparticles within spleens and livers of mice injected *in vivo* with cobalt ferrite nanoparticles, suggests the intracellular transfer of degradation-derived cobalt and iron, entrapped within endogenous protein cages. In addition, the capacity of ferritin cages to accommodate and store the degradation products of cobalt ferrite nanoparticles was investigated *in vitro* in the acidic environment mimicking the physiological conditions that are present within the lysosomes. The magnetic, colloidal and structural follow-up of nanoparticles and proteins in the lysosome-like medium confirmed the efficient remediation of nanoparticle-released cobalt and iron ions by ferritins in solution. Metal transfer into ferritins could represent a quintessential process in which biomolecules and homeostasis regulate the local degradation of nanoparticles and recycle their by-products.

The lifecycle of inorganic nanoparticles (NPs) in the body and potentially associated health risks still raise serious concerns. The evaluation of the fate of NPs is important to understand the behavior of particles that have been intentionally injected for medical purposes, but might also help predicting the outcomes related to particles environmental and occupational exposure. NPs made of metallic compounds such as quantum dots, silver, gold, iron and cobalt have been proposed for their potential in imaging and therapy, as well as their widespread technological applications. The exposure to NPs indeed raises questions on their interactions with proteins, intracellular processing, persistence and residence time within the organs<sup>1,2</sup>. What kind of mechanisms could be employed by the cell to process NPs? When particles degrade, could the body eliminate or recycle NPs degradation products? Do we have some innate mechanisms that could protect us from potential deleterious effects generated by NPs or their degradation products? Are there some pathways of NP remediation ensured by endogenous proteins?

Iron oxide nanoparticles (IONPs) found their way into the clinics because they are biodegradable and their products of degradation can be processed by the physiological iron metabolism. Studies evaluating the fate of IONPs *in vivo* demonstrated that IONPs lose their magnetic properties over time while being degraded in the acidic environment of lysosomes, mostly in splenic and hepatic macrophages<sup>3–5</sup>. Studies generally converge to a cellular processing of IONPs, which involves the physiological homeostasis pathways for iron<sup>6–9</sup>. The remediation of iron coming from radiolabelled IONPs can be monitored and quantified by measuring the amount of

<sup>1</sup>Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057 CNRS/Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 10 rue Alice Domon et Léonie Duquet, 75205 Paris Cedex 13, France. <sup>2</sup>Inserm U970, Paris Cardiovascular Research Center-PARCC/Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, 56 rue Leblanc, 75015 France. <sup>3</sup>Laboratoire Matériaux et Phénomènes Quantiques, UMR 7162 CNRS/Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 10 rue Alice Domon et Léonie Duquet, 75205 Paris Cedex 13, France. <sup>4</sup>Department of Physics, University of Agriculture Faisalabad, Pakistan. <sup>5</sup>Service de Physique Biomédicale, Université de Mons, 20 Place du Parc, 7000 Mons, Belgium. <sup>6</sup>Laboratoire PHENIX, UMR 7195, CNRS/Université Pierre et Marie Curie/ESPCI, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France. <sup>7</sup>ITODYS, Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes, UMR 7086 CNRS/Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 15 rue Jean-Antoine de Baïf, 75205 Paris Cedex 13, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.A. (email: damien.alloyeau@univ-paris-diderot.fr) or F.G. (email: florence.gazeau@univ-paris-diderot.fr)

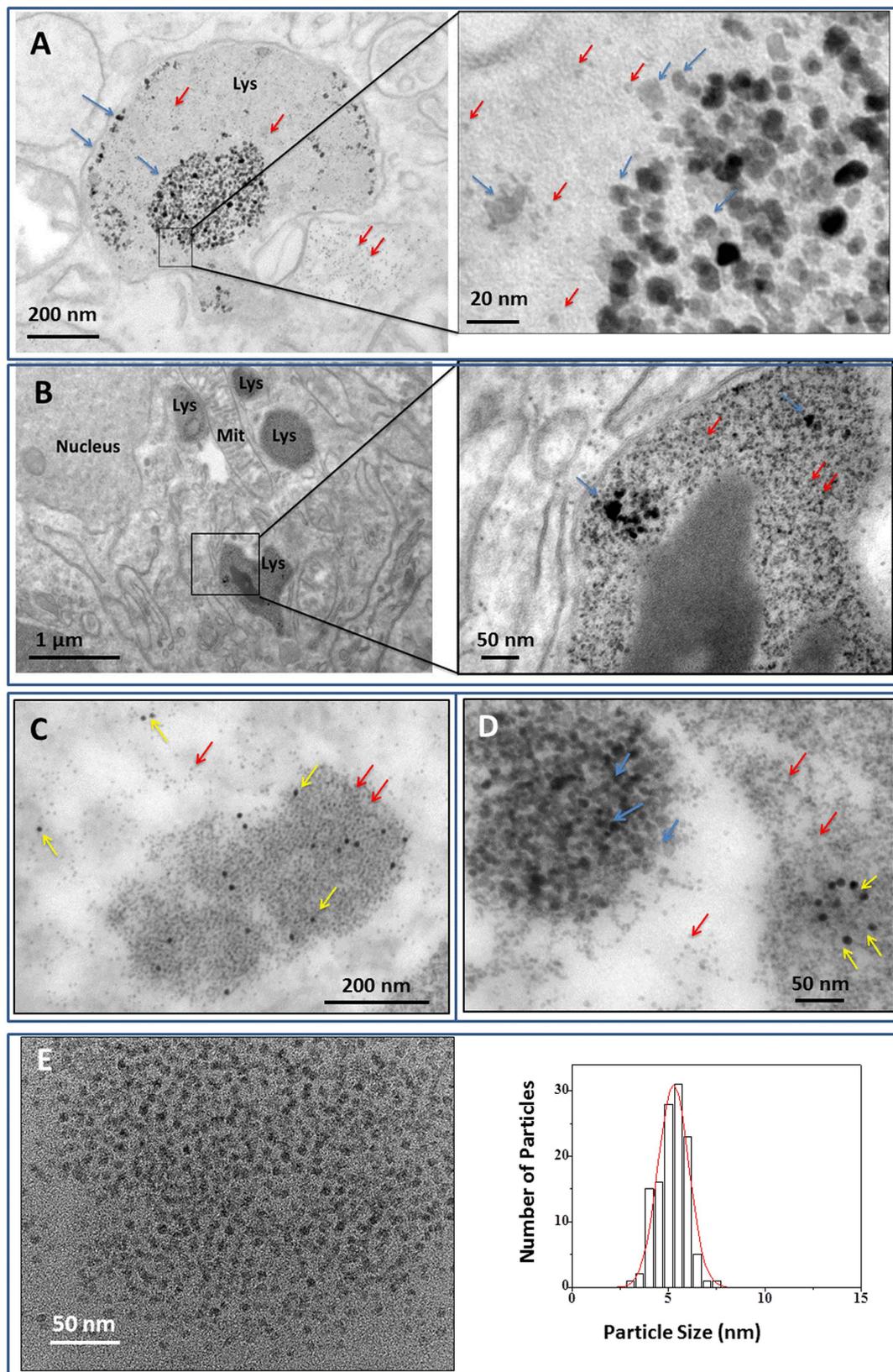
$^{59}\text{Fe}$  incorporated into the hemoglobin of newly formed erythrocytes, which demonstrates that the degradation products of IONPs can join the iron pool of the organism. Intracellular storage of iron is also mediated by ferritin, a protein cage-like structure composed of 24 self-assembled subunits in which up to 4500 iron atoms can be stored<sup>10,11</sup>. Moreover, the gene expression of ferritin and other proteins involved in iron homeostasis is upregulated after cell internalization of IONPs<sup>10,12,13</sup>. Magnetic studies in organs *ex vivo* showed the transformation of the original superparamagnetic properties of IONPs into the magnetic signature of iron-filled ferritins<sup>3,11</sup>. At the nanoscale, transmission electron microscopy (TEM) revealed the ubiquitous presence of ferritins close to intracellular IONPs, in spleen, liver and inflammatory macrophages. Therefore ferritin appears involved in the intracellular degradation mechanism of IONPs *in vivo* and in the recycling and storage of iron ions released by NPs<sup>3,14,15</sup>. Such a scenario could consequently warrant minimal toxicity of iron-based NPs, since the potentially harmful labile iron species generated by the intracellular degradation of IONPs could be captured in its non-toxic form within ferritin proteins. Here we questioned if other metals, such as cobalt coming from the degradation of nanoparticles, could follow the same pathway of physiological remediation by endogenous ferritin.

In order to modulate the magnetic properties of IONPs, partial replacement of ferrous ions with other divalent ions has been suggested, the most prominent example being the introduction of cobalt ions. Cobalt ferrite NPs (CoIONPs) arise interest for theranostic applications, data storage, catalysis, environmental and biodevices as their magnetocrystalline anisotropy can be finely tuned by cobalt substitution. This approach is particularly useful for magnetic hyperthermia, which benefits from optimized hyperthermic efficacy at tunable excitation with different magnetic field frequencies<sup>16–20</sup>. However little is known about the *in vivo* fate of nanoparticles metallic dopants such as cobalt. The potential toxicity of CoIONPs is a subject of debate with regards to environmental, health and safety issues connected to their application in nanomedicine<sup>21–23</sup>. Natural organic matter as well as cellular media can promote degradation of CoIONPs resulting in possible release of  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  into the environment<sup>24,25</sup>. Reports on Co toxicity suggested that  $\text{Co}^{2+}$  ions are the primary toxic form of  $\text{Co}^{26,27}$ . Particularly, some interference with  $\text{Ca}^{2+}$  entry and signaling has been reported. Therefore the important issues of the dissolution of CoIONPs and of the fate of released ions need to be investigated *in vitro* and *in vivo*.

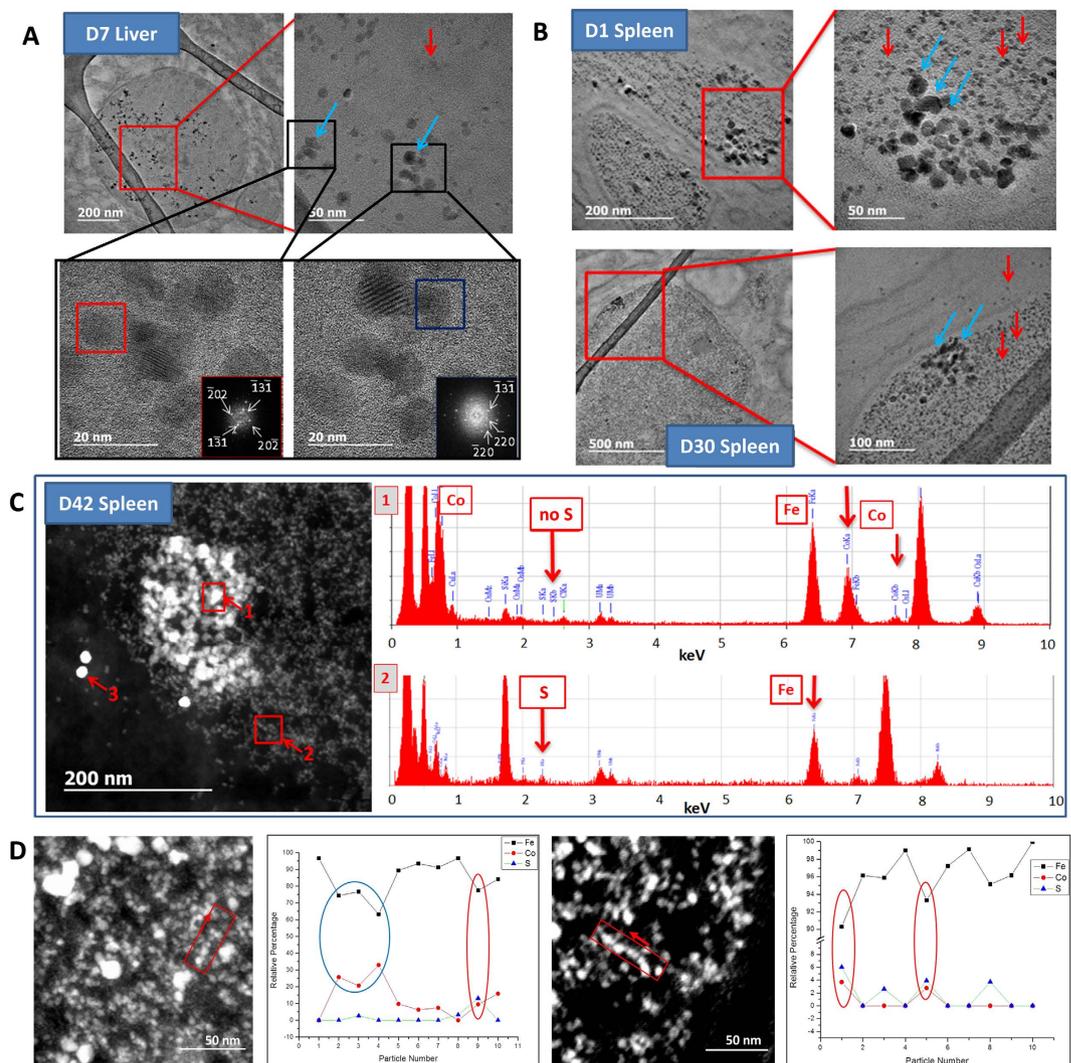
In this paper we present an ultrastructural follow up of CoIONPs nanoparticles over four months after intravenous injection in mice. Our focus was to get insight into the role of ferritin proteins in the intracellular recycling and remediation of metal oxide nanoparticles and to examine if  $\text{Co}^{2+}$  and Fe ions released by NPs can be stored into endogenous ferritin proteins. Ferritin proteins are implicated in various metabolic processes<sup>28</sup>, owing to their ability to detoxify, carry, store and release iron in a controlled fashion<sup>29</sup>. It has been shown that ferritins also act as a multifunctional detoxicant for soluble metal ions other than iron<sup>30–33</sup>. Studies published in the eighties evidenced ferritin's *in vivo* binding potential for metals such as  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Be}^{2+}$  after administration of their respective salts<sup>32–34</sup>. *In vitro*, the protein shell called apoferritin (ApoF) and the iron-filled protein called holoferritin (HoloF) have different affinities for divalent metal atoms also depending of the pH<sup>31</sup>. Moreover, ApoF was successfully used as a monodisperse and spherical-shaped biotemplate for the mineralization of various inorganic NPs including iron, cobalt, manganese, platinum, zinc, rare earths-doped yttrium-vanadate or gadolinium<sup>19,31,35–41</sup>. The *in vitro* versatility of ferritin proteins to encapsulate different metals suggests that they could also play a role *in vivo* in the metabolism of various metallic NPs. While ferritin is considered as a physiological constituent in several tissues, other proteins, such as the metallothionein, are synthesized under metabolic stress in response to highly toxic levels of metal ions, and could also be involved in metallic NPs metabolism<sup>32</sup>. Ferritin and metallothionein both act as chelators-donors of metal ions, but since ferritin is present at a higher constitutive level, it could act as a first line defense against metal ions<sup>32</sup>. While previous studies demonstrated *in vitro* divalent metal binding to ferritins at pH 7.4, the acidic pH of 5.5 nearly abolished the binding of metals other than  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ <sup>31</sup>. Nevertheless, here we question the possibility of ferritin storing of cobalt, released by CoIONPs *in vitro* and *in vivo*, at a pH of 4.7, which is physiologically present in lysosomes, where NPs are confined and degraded. The mechanism of metal transfer from NPs to endogenous proteins such as ferritin would exemplify a quintessential process in which biomolecules and homeostasis regulate the local degradation of NPs and recycle their by-products.

## Results and Discussion

Citrate-coated CoIONPs of  $8.7 \pm 2.9$  nm diameter synthesized by coprecipitation method (Figure S1) were injected intravenously in mice at the dose recommended for clinical MRI when using IONPs ( $50 \mu\text{mol}/\text{kg}$  iron). Structural follow up of CoIONPs was performed by TEM, High Resolution TEM (HRTEM) and scanning TEM using a high angle annular dark field detector (STEM-HAADF) in liver and spleen samples (Figs 1 and 2) up to 8 months post-injection. In parallel, the Co content was measured by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in these organs (Figure S2). Histological examinations of liver, spleen and kidney of treated animals at day 1, day 7 and day 34 after injection of CoIONPs do not show any microstructural alterations in comparison to control, untreated mice (Figures S3–S6). Co content in spleens and livers decreases over time (more rapidly in the liver) but a substantial fraction of the cobalt content at D1 (about 30%) still persists in spleen after 4 months. Similar results were found previously for IONPs with different shapes, sizes and surface coating<sup>13,34,35</sup>. Both the excretion of intact nanoparticles or the transfer of Co to different organs or metabolic pools may account for the decrease in the Co contents in liver and spleen with time. Consistent with elemental analysis, TEM observations at the nanoscale show intact CoIONPs in the lysosomes of splenic and hepatic macrophages from day 1 to 8 months post-injection, although the intact particles tend to rarify over time (Fig. 1 and Figure S7). Iron-filled ferritins are distinguished from native CoIONPs first by their characteristic spherical shape and rather monodisperse size, up to eight nanometers, and second by the use of colloidal gold immunological labeling with anti-ferritin antibodies (Fig. 1). Numerous ferritin proteins are observed in the neighborhood of CoIONPs lying within lysosomes (Fig. 1), with similar patterns to what was previously observed after injection of IONPs<sup>3–5</sup>. Ferritins are either found as large organized clusters or are individually disseminated within lysosomes or within

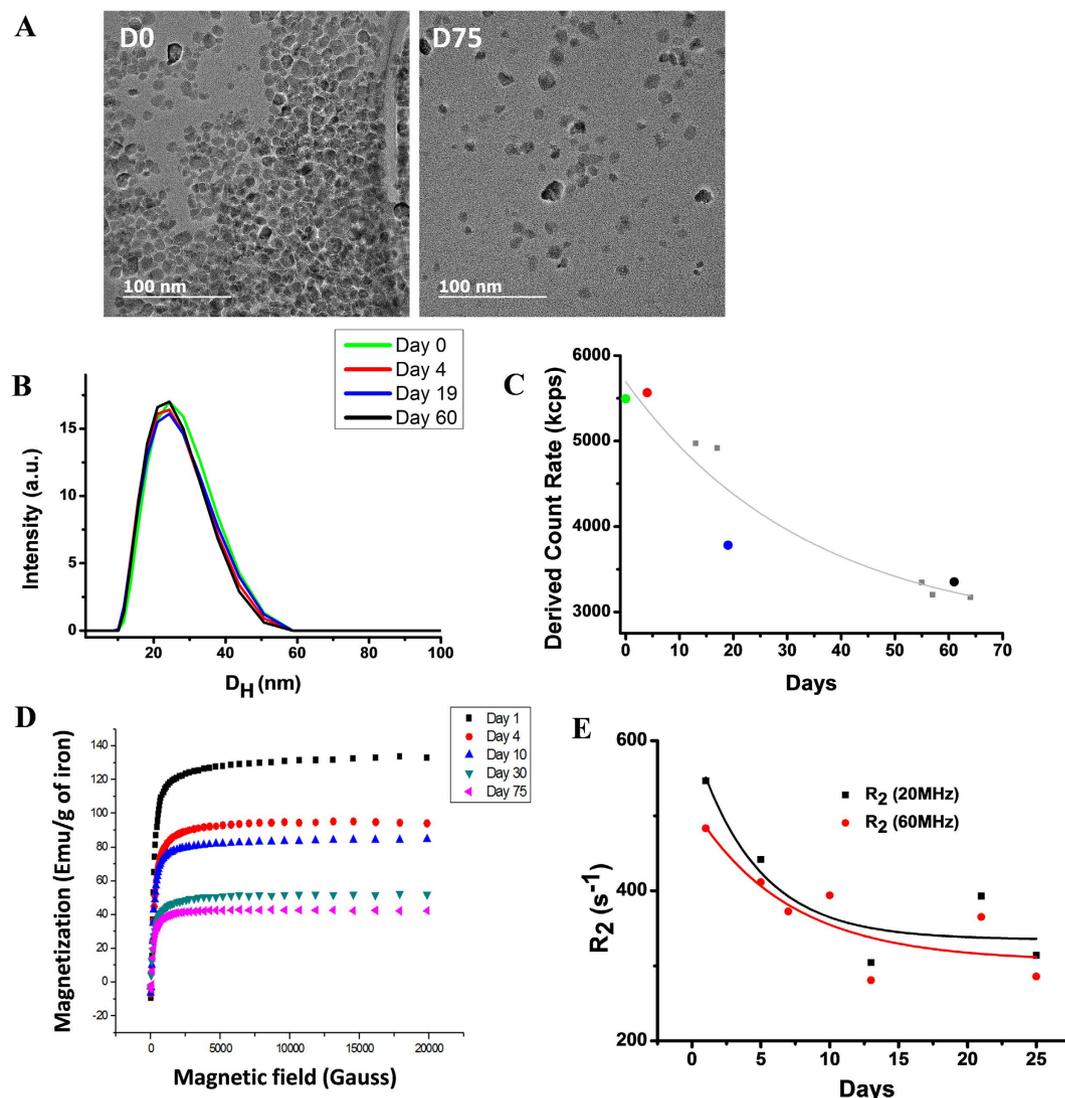


**Figure 1.** TEM micrographs of spleen samples at day 1 (A), day 7 (B) and day 42 (C,D) after intravenous injection of CoIONPs in mice. CoIONPs (indicated with blue arrows) are found in lysosomes (Lys) of macrophages in proximity to iron-filled ferritin proteins (HoloF) (red arrows). In C&D, ferritin proteins are labeled with 10 nm colloidal gold anti-ferritin antibody (yellow arrows). Note the organization of HoloF as large clusters. (E) HoloF aggregates in spleen and corresponding size distribution.



**Figure 2. TEM tracking and EDX nano analyses of CoIONPs and ferritins in liver and spleen at different time-points after intravenous injection of CoIONPs.** (A) CoIONPs are identified in the lysosomes of liver macrophages at day 7, by their characteristic size distribution ( $8.7 \pm 2.9$  nm) and inverse spinel structure of cobalt ferrite, determined from the FFT of the HRTEM pictures (red and blue squares). (B) CoIONPs (blue arrows) are seen in the neighborhood of numerous HoloF proteins (red arrows) in spleen lysosomes at day 1 (top images) and at day 30 (bottom images). (C) STEM-HAADF micrograph of intralysosomal CoIONPs in spleen at day 42 post injection. The 10 nm monodisperse bright particles (labelled 3) are antiferritin immunogold particles. The less bright and polydisperse particles (square “1”) are the native CoIONPs with a Fe:Co ratio of 2 to 3 and absence of sulfur, as determined by EDX analysis. The small quasi-monodisperse particles correspond to HoloF, characterized by the colocalization of iron and sulfur (Fe:S ratio of about 20). (D) Single particle EDX analyses on spleen samples at day 42 post-injection. The graphs on the right of the STEM-HAADF picture show the relative percentage of Fe, Co and S determined from the point by point EDX analysis of the red quadrant scanned in the arrow direction. Blue oval depicts a native CoIONP particle, while red ovals indicate colocalization of cobalt, iron and sulfur, indicating cobalt uptake by ferritins.

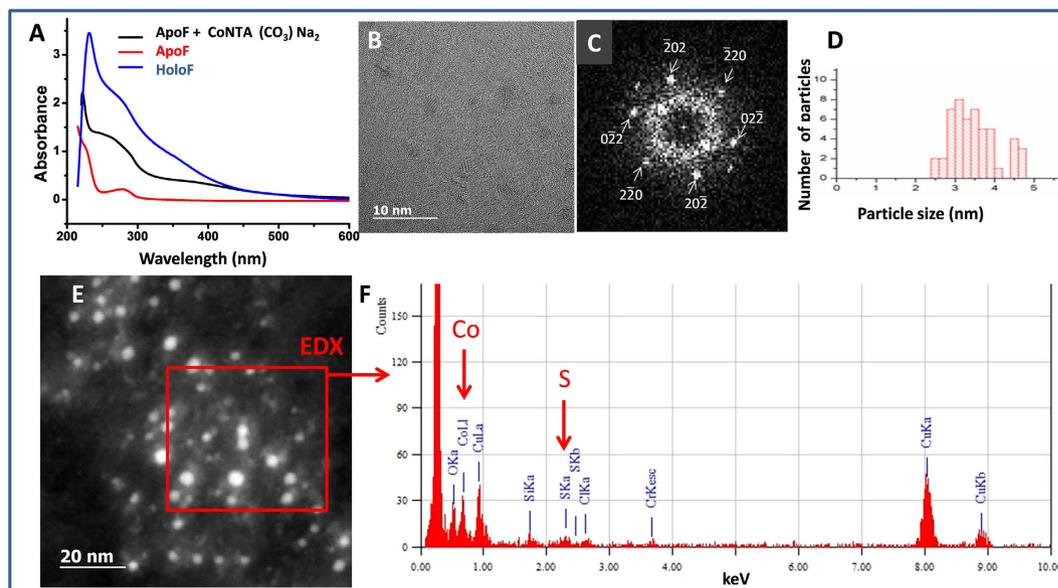
the cytoplasm. Structural and elemental analyses of the exogenous intact or degraded CoIONPs and endogenous ferritin proteins were achieved by HRTEM, STEM-HAADF and energy dispersive X-ray (EDX) nano-analyses performed on single particles at different time-points after injection. Apart from their distinct sizes, structures and contrast in comparison to CoIONPs, ferritin proteins are identified by EDX through their sulfur content. In contrast, injected CoIONPs or their remnants are characterized by colocalization of cobalt, iron, and an absence of sulfur (Fig. 2C). Importantly EDX also reveals the nature of the metals incorporated inside the ferritin protein shell. While most of ferritins contain only iron (collocating with sulfur), some of them reveal the presence of cobalt collocating with iron and sulfur (Fig. 2D). Although the quantities of cobalt in ferritins are much smaller than the iron ones, these observations in spleen samples, 42 days after injection, support the hypothesis that ferritins could incorporate both iron and cobalt ions, transferred from CoIONPs ferritins within lysosomes, providing the first observation of metal ions transfer from exogenous nanoparticles to endogenous ferritin proteins *in vivo*.



**Figure 3. Evolution of citrate-coated CoIONPs in acidic citrate medium.** (A) Representative TEM micrographs at two time-points. (B) Time evolution of the distribution of hydrodynamic sizes and (C) derived count rate in DLS. (D) Time evolution of the field-dependent magnetization curve at 300 K and (E) Time evolution of the transverse NMR relaxation rate  $R_2$  at proton Larmor frequencies of 20 MHz and 60 MHz.

The results suggested by this *in vivo* study motivated additional *in vitro* investigations to probe the degradability of CoIONPs in a simplified model of lysosomal environment and the ability of ferritin to integrate cobalt and iron ions in the acidic pH, which is present within lysosomes, but was formerly thought to hinder the binding of metals other than iron to ferritin proteins<sup>31</sup>. IONPs were previously shown to degrade in a minimal medium mimicking the acidic lysosome environment and consisting of sodium citrate (10 mM) at pH = 4.7<sup>5,42–45</sup>. Here we also observe the degradation of CoIONPs in this acidic citrate medium (Fig. 3). The loss of magnetic properties of CoIONPs over time is attested by the decrease of the saturation magnetization in magnetization curves (Fig. 3D) together with a decrease of the transverse nuclear magnetic resonance (NMR) relaxation rate  $R_2$  at proton Larmor frequencies of 20 MHz and 60 MHz, which probes the efficiency of CoIONPs as MRI contrast agents (Fig. 3E). The hydrodynamic size distribution of CoIONPs assessed by diffusion light scattering (DLS) remains almost constant over time, but the time-averaged light scattered intensity (Fig. 3B,C) decreased, which is consistent with a diminution of the number of particles. HRTEM and EDX elemental analysis on single particles indicate that the spinel structure of the remaining particles is maintained during the degradation and the fraction of Co per Fe in particles (Co/Fe = 40/60) remains unchanged up to day 75.

We next investigated whether ApoF protein core is capable of accommodating Co ions coming from cobalt salt in lysosome-mimicking acidic citrate medium. Cobalt salt  $\text{CoNTA}(\text{CO}_3)_2\text{Na}_2$  was incubated with ApoF for one day in acidic citrate medium and subsequently dialyzed. The UV-visible spectrum of the mixture was monitored at different time-points and compared to the UV-vis signatures of ApoF and iron-filled HoloF. The intensity increase of the band at 220 nm and the evolution of the band at 280 nm indicates a metal-protein bond (Fig. 4)<sup>37,46</sup>. The UV-vis spectra of Co salt/ApoF mixture show a clear evolution toward the absorbance signal of commercial



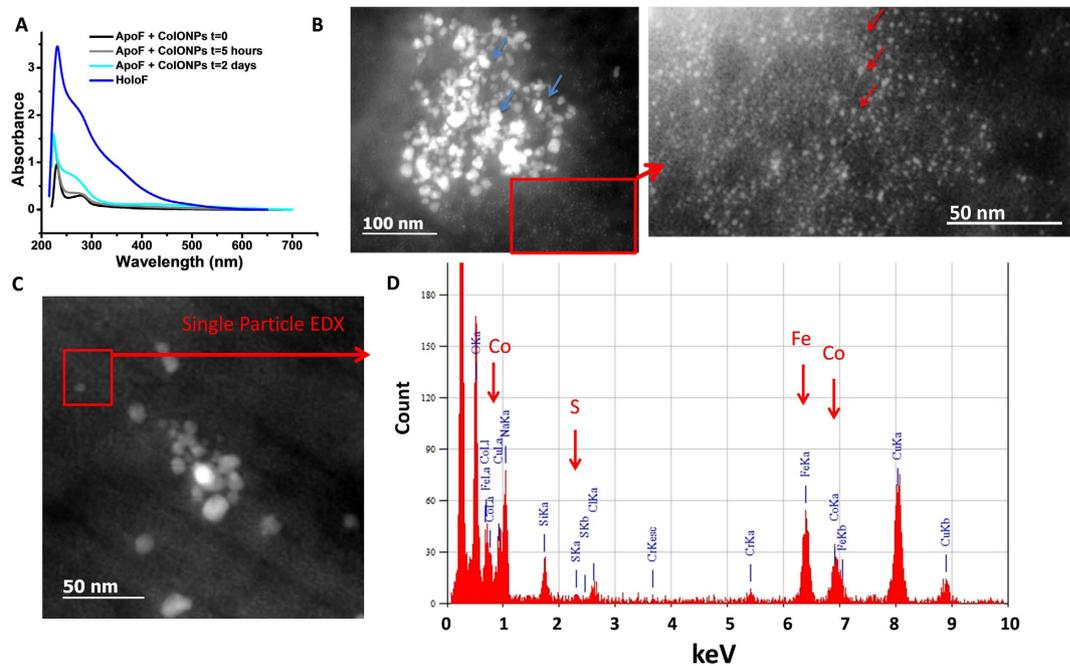
**Figure 4.** Signature of apoferritin filling cobalt from cobalt salt CoNTA ( $\text{CO}_3$ )  $\text{Na}_2$ . (A) UV-Vis spectrum of ApoF incubated with CoNTA ( $\text{CO}_3$ )  $\text{Na}_2$  for 22 hours in acidic medium in comparison to ApoF alone and HoloF. Note the growth of the absorbance shoulder at 280 nm indicating the filling of the protein cage. (B) HRTEM of ApoF incubated with CoNTA showing crystalline structures with diffraction pattern (C) characteristic of the cobalt oxide (CoO) along [111] zone axis. (D) Distribution of crystal sizes (mean diameter  $3.5 \pm 0.6$  nm) suggesting a partial filling of the protein cage, in line with UV-Vis spectrum. (E) STEM-HAADF images of ferritin nanocrystals and (F) EDX analysis of the red area, indicated characteristic lines of cobalt and sulfur.

HoloF suggesting a filling of ApoF with cobalt. This result is confirmed by HRTEM, which shows the presence of crystalline NPs with a diameter of  $3.5 \pm 0.6$  nm (60% of the commercial HoloF size) and CoO structure. The EDX analysis in the STEM-HAADF mode indicates the colocalization of sulfur and cobalt and confirms the storage of cobalt in ApoF (Fig. 4). The formation of cobalt oxide  $\text{Co}_3\text{O}_4$  was previously reported, but the result was obtained in a different pH range<sup>37</sup>. Overall, our results suggest a partial filling of ApoF cavity with cobalt even at the low pH value<sup>47</sup>.

The presence and the composition of ferritins nearby CoIONPs in organ slices suggest a transfer of iron and cobalt ions relocating from NPs to ferritins. We thus analyzed the evolution of ApoF interacting with CoIONPs in acidic citrate medium. During the two days of incubation at 37 °C, the absorbance signal of ApoF evolve to that of the commercial HoloF, showing an incremental filling of ApoF with metals transferred from NPs (Fig. 5). STEM-HAADF and EDX analysis confirm the presence of two types of structures: the native cobalt ferrite NPs ( $8.7 \pm 2.9$  nm) coexisting with very small NPs ( $3.3 \pm 0.4$  nm) which exhibit EDX peaks for iron, cobalt and sulfur at 6.45 KeV, 6.95 KeV and 2.4 KeV, respectively, with relative atomic percentages of 64.7%, 28.2% and 7.13% and with an error of  $\pm 1\%$ . This result clearly confirms the ability of ApoF to sequester simultaneously iron and cobalt ions coming from the degradation of CoIONPs within a minimal lysosome-like environment.

## Conclusion

In conclusion, elemental nanoscale investigations of excised organs highlighted the possible implication of endogenous ferritin proteins in the recycling of iron and cobalt originating from intralysosomal degradation of cobalt ferrite NPs. In previous studies, high resolution observations of excised organs provided information on the ultrastructure of lysosomes in macrophages located within different tissues (spleen, liver<sup>3,5,15</sup>, inflammatory sites such as adipose tissue<sup>48</sup> or atherosclerotic plaques<sup>14</sup>) and pointed out the ubiquitous presence of HoloF nearby or within IONP-rich zones in organs harvested from treated animals. In addition, the local lysosomal degradation of IONPs has been empirically demonstrated<sup>4</sup> and the transfer of <sup>59</sup>Fe from IONPs to the hemoglobin of rats<sup>6</sup> and mice<sup>7</sup> was established. On the other hand, ferritins are able to antagonize lysosomal iron overload and oxidative stress by being relocated in lysosomes or synthesized *de novo*<sup>29,49,50</sup>. However neither the transfer of metal ions from nanoparticles to ferritin was formally demonstrated, nor the transfer within environments exhibiting acidic pH going below 5.5 has been reported. Yet, due to biological intralysosomal sequestration and processing of nanoparticles, the transfer to ferritins in acidic media has a particular physiological relevance. In the present study EDX nanoanalysis provided evidence for the first time, that intracellular ferritin cages localized nearby degrading CoIONPs could act as storage proteins for both iron and cobalt ions released by injected NPs. The investigations performed *in vitro* in the minimal model of the acidic lysosome environment served to undoubtedly demonstrate that this metal transfer is empirically possible at pH 4.7 with Co coming from metal salts, but also from cobalt ferrite NPs degraded in the acidic citrate medium. *Ex vivo* evidence for iron and cobalt remediation after *in vivo*



**Figure 5. Metal transfer from NPs to apoferritin proteins.** (A) UV-vis spectra of ApoF incubated with CoIONPs in acidic medium for 5 hours and 2 days, in comparison to ApoF and HoloF. The growth of absorbance shoulder at 280 nm indicates metal filling of the protein. (B) STEM-HAADF images of CoIONPs (blue arrows) incubated with ApoF for 2 months. Metal-filled proteins appear as small particles (red arrows). (C,D) Single particle EDX analysis of the red-contoured area in C confirms occupancy of iron, cobalt and sulfur in single ApoF with relative atomic percentages of 64.7%, 28.2% and 7.13% respectively.

administration of cobalt ferrite nanoparticles suggests that ferritins could represent an archetypal mechanism of metabolization of metal-containing NPs.

## Experimental Section

**Nanoparticles.** CoIONPs are synthesized by co-precipitation of Co(II) and Fe(III) hydroxide<sup>51</sup>. CoIONPs ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) have the inverse spinel structure like magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) where  $\text{Fe}^{2+}$  ions are substituted by  $\text{Co}^{2+}$  ions. CoIONPs are coated by citrate ligands. The suspensions were stable in water in a pH range of 3–8 owing to electrostatic stabilization (negatively charged citrate-coating). The size distributions of the NPs were determined by TEM. The hydrodynamic diameter was determined by DLS in water and was in the range of 20 to 40 nm. Detailed NPs specifications are reported in supporting information Figure S1.

**In vivo study.** Animal experiments were approved by the ethical comity of University Paris Descartes and performed in accordance with institutional ethical rules and guidelines for animal use and care of the Paris Cardiovascular Research Center animal facility. The animals were allowed to acclimate to this facility for at least 1 week before being used in the experiments and were fed a standard diet *ad libitum* throughout the experiments. Pathogen-free female 8 week old C57/Bl6 mice (mean weight  $20.5 \pm 1$  g) (Janvier, France) were injected in the retro-orbital vein with CoIONPs suspended in 100  $\mu\text{L}$  of physiological saline medium at a dose of 50  $\mu\text{mol}$  iron/kg (injected dose of 56  $\mu\text{g}$  iron). One mouse was sacrificed at each time point after CoIONPs injection (at days D1, D7, D30, D42 and D112, respectively). Livers and spleens were excised and prepared for TEM and ICP-MS experiments.

**Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS).** Cobalt content in suspension and organs was quantified by ICP-MS. After excision, organ samples were conserved at  $-80^\circ\text{C}$  until preparation for ICP-MS measurements. The organs were mineralized in closed vials in presence of 4 ml nitric acid at  $70^\circ\text{C}$  for 2 h on heating blocs (DigiPREP Jr SCP Science, Canada) and then heated in open vials at  $80^\circ\text{C}$  for 10 additional hours. The volume of each sample was adjusted to 20 or 4 ml with 3% nitric acid in distilled water and analyzed for Co content by ICP-MS (Thermo Electron, France).

**Transmission electron microscopy (TEM).** Organs were cut into 1  $\text{mm}^3$  pieces after excision and fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, post-fixed with 1% osmium tetroxide containing 1.5% potassium cyanoferrate, gradually dehydrated in ethanol, and embedded in Epon. Thin sections (70 nm) of selected zones were observed with Zeiss EM902 electron microscope operated at 80 kVe (MIMA2 MET –GABI, INRA, Jouy-en-Josas, France). Ultrathin sections (30 nm) were prepared for high-resolution imaging and EDX analysis.

High resolution TEM imaging and EDX spectroscopy were performed on a JEOL ARM 200 F microscope<sup>52</sup>, equipped with a CEOS aberration corrector, a cold field emission gun and a JEOL EDX diode, operated at 200 kV or 80 kV (biological samples).

**Gold immunolabeling on TEM sections.** Tissues were fixed with a mixture of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. The 70 nm sections were quenched with glycine 50 mM in 0.1 M phosphate buffer pH 7.2, blocked with buffer containing 10% Goat normal serum (GNS), 1% bovine serum albumin (BSA), 0.1% BSA-c<sup>TM</sup> (prepared by acetylation of BSA (Aurion, Nederland)). Antiferritin antibodies were added to a 1/100 w/w dilution in buffer containing 1% GNS, 1% BSA, 0.1% BSA-c<sup>TM</sup> and incubated for 2 h; the grids were rinsed twice, then the goat anti-rabbit IgG coupled to 10 nm colloidal gold particles (British Biocell International – TEBU, France) was used at a 1/50 dilution for an 1 hour incubation. The grids were rinsed again, and stained with 2% uranyl acetate. Grids were examined with a Hitachi HT7700 electron microscope operated at 80 kV (Elexience – France), and images were acquired with a charge-coupled device camera (AMT).

**Lysosome-like buffer.** The medium used to mimic the acidic environment of the lysosomes, as described by Arbab *et al.*<sup>43</sup>, consisted of 20 mM citric acid at pH 4.7. The acidic citrate buffer was prepared by mixing 10 mM of citric acid (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, Fluka, France, >99, 5%) and 10 mM of sodium citrate tribasic (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O, Fluka, >99%) in 250 mL of purified water.

**Metal transfer to ApoF.** *Filling of ApoF with metal complex salts.* A 0.05 mM solution of ApoF (apoferritin from equine spleen, Sigma, France) was incubated at 37 °C for one day with an excess of the mixed sodium cobalt(III) nitrilotriacetate carbonate complex Na<sub>2</sub>CoNTA(CO<sub>3</sub>) in the acidic citrate buffer and the mixture was dialyzed (Dialysis membrane 50 kD, Spectrum Labs, France) to remove the excess of cobalt complex salt.

*Filling ApoF with NPs.* The NPs were incubated with ApoF in the acidic citrate buffer for different times, the final concentrations being 0.12 mM of NPs and 0.5 μM of ApoF.

**UV-visible Spectroscopy.** Absorption measurements were performed at (37 ± 0.5) °C on a Cary 4000 UV/Vis/NIR spectrophotometer equipped with a thermostated cell-carrier. The signal of non-degraded NPs was subtracted to remove the diffusion signal related to NPs.

**In vitro NP degradation procedure.** NPs were incubated at 37 °C in the dark with and without ApoF in the acidic citrate buffer, at iron + cobalt concentration of 10 mM. ApoF was added at a concentration of 2.2 μM (corresponding to 4500 iron atoms available for one ApoF).

**Nuclear Magnetic Resonance Dispersion (NMRD).** The frequency dependence of the longitudinal <sup>1</sup>H relaxation rate, R<sub>1</sub> = 1/T<sub>1</sub>, was recorded in the suspension over the frequency range of 0.015 to 40 MHz using a Spinmaster FFC-2000 fast-field cycling NMR relaxometer (Stelar SRL, Italy). The temperature of the samples was maintained at 37 °C using a thermostated airflow system. All of the <sup>1</sup>H magnetization recovery curves were mono-exponential within experimental error. R<sub>2</sub> were measured using the CPMG pulse sequence with an echo time of 1 ms on a 20 MHz and on a 60 MHz Bruker Minispec. All measurements were performed in samples with iron + cobalt concentration of 1 mM, prepared by aqueous extemporaneous 10-times dilutions of the suspensions in acidic citrate medium taken at different incubation times.

**Dynamic Light Scattering (DLS).** DLS measurement were carried out at 25 °C on a Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Instruments, France) equipped with a 5.0 mW He-Ne laser operating at 632.8 nm and an Avalanche photodiode detector. The time-averaged intensity of scattered light at 173 degrees (derived count rate) was used to quantify the number of scattering NPs in course of their degradation. We also verified that for the native non-degraded NPs, the time-averaged intensity of scattered light was proportional to the iron + cobalt concentration. The dispersions were never filtered before measurements.

**Magnetic measurements.** Magnetization measurements were carried out on a vibrating sample magnetometer (PPMS, Quantum Design, Inc., CA, USA) on suspensions of CoIONPs at 10 mM iron + cobalt concentration in acidic citrate medium. The data were corrected from the diamagnetic contribution of the acidic citrate buffer and of the sample holder. The field-dependent magnetization curves were measured at 310 K in the range between 0 and 3 × 10<sup>4</sup> Gauss.

## References

1. Feliu, N. *et al.* *In vivo* degeneration and the fate of inorganic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 2440–2457 (2016).
2. Caracciolo, G., Farokhzad, O. C. & Mahmoudi, M. Biological Identity of Nanoparticles *In Vivo*: Clinical Implications of the Protein Corona. *Trends Biotechnol.* sept 20 (2016)
3. Levy, M. *et al.* Long term *in vivo* biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 3988–3999 (2011).
4. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* The One Year Fate of Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles in Mice. *ACS Nano* **9**, 7925–7939 (2015).
5. Lartigue, L. *et al.* Biodegradation of Iron Oxide Nanocubes: High-Resolution *In Situ* Monitoring. *ACS Nano* **7**, 3939–3952 (2013).
6. Weissleder, R. *et al.* Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am. J. Roentgenol.* **152**, 167–173 (1989).
7. Pouliquen, D., Le Jeune, J. J., Perdrisot, R., Ermias, A. & Jallet, P. Iron oxide nanoparticles for use as an MRI contrast agent: pharmacokinetics and metabolism. *Magn. Reson. Imaging* **9**, 275–283 (1991).
8. Freund, B. *et al.* A Simple and Widely Applicable Method to <sup>59</sup>Fe-Radiolabel Monodisperse Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for *In Vivo* Quantification Studies. *ACS Nano* **6**, 7318–7325 (2012).
9. Okon, E. *et al.* Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat. A histologic and biophysical study. *Lab. Invest.* **71**, 895–903 (1994).
10. Mazuel, F. *et al.* Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels. *ACS Nano* **10**, 7627–7638 (2016).

11. Mejías, R. *et al.* Long term biotransformation and toxicity of dimercaptosuccinic acid-coated magnetic nanoparticles support their use in biomedical applications. *J. Control. Release* **171**, 225–233 (2013).
12. Pawelczyk, E., Arbab, A. S., Pandit, S., Hu, E. & Frank, J. A. Expression of transferrin receptor and ferritin following ferumoxides-protamine sulfate labeling of cells: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed.* **19**, 581–592 (2006).
13. Schafer, R. *et al.* Transferrin receptor upregulation: *in vitro* labeling of rat mesenchymal stem cells with superparamagnetic iron oxide. *Radiology* **244**, 514–523 (2007).
14. Maraloiu, V.-A. *et al.* Multiscale investigation of USPIO nanoparticles in atherosclerotic plaques and their catabolism and storage *in vivo*. *Nanomedicine NBM* **12**, 191–200 (2016).
15. Lopez-Castro, J. D. *et al.* From synthetic to natural nanoparticles: monitoring the biodegradation of SPIO (P904) into ferritin by electron microscopy. *Nanoscale* **3**, 4597–4599 (2011).
16. Mameli, V. *et al.* Studying the effect of Zn-substitution on the magnetic and hyperthermic properties of cobalt ferrite nanoparticles. *Nanoscale* **8**, 10124–10137 (2016).
17. Lee, J.-H. *et al.* Exchange-coupled magnetic nanoparticles for efficient heat induction. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 418–422 (2011).
18. Fortin, J. P. *et al.* Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2628–2635 (2007).
19. Fantechi, E. *et al.* A Smart Platform for Hyperthermia Application in Cancer Treatment: Cobalt-Doped Ferrite Nanoparticles Mineralized in Human Ferritin Cages. *ACS Nano* **8**, 4705–4719 (2014).
20. Laurent, S., Dutz, S., Hafeli, U. O. & Mahmoudi, M. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **166**, 8–23 (2011).
21. Ahmad, F., Liu, X., Zhou, Y. & Yao, H. An *in vivo* evaluation of acute toxicity of cobalt ferrite nanoparticles in larval-embryo Zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* **166**, 21–28 (2015).
22. Ahmad, F., Yao, H., Zhou, Y. & Liu, X. Toxicity of cobalt ferrite (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) nanobeads in *Chlorella vulgaris*: Interaction, adaptation and oxidative stress. *Chemosphere* **139**, 479–485 (2015).
23. Horev-Azaria, L. *et al.* Predictive Toxicology of cobalt ferrite nanoparticles: Comparative *in-vitro* study of different cellular models using methods of knowledge discovery from data. *Part. Fibre Toxicol.* **10**, 32 (2013).
24. Romih, T. *et al.* Bioavailability of cobalt and iron from citric-acid-adsorbed CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Sci. Total Environ.* **508**, 76–84 (2015).
25. López-Moreno, M. L. *et al.* Effect of cobalt ferrite (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles on the growth and development of *Lycopersicon lycopersicum* (tomato plants). *Sci. Total Environ.* **550**, 45–52 (2016).
26. Simonsen, L. O., Harbak, H. & Bennekou, P. Cobalt metabolism and toxicology—A brief update. *Sci. Total Environment* **432**, 210–215 (2012).
27. Chattopadhyay, S. *et al.* Cobalt oxide nanoparticles induced oxidative stress linked to activation of TNF- $\alpha$ /caspase-8/p38-MAPK signaling in human leukemia cells. *J. Appl. Toxicol.* **35**, 603–613 (2015).
28. Joshi, J. & Zimmerman, A. Ferritin: an expanded role in metabolic regulation. *Toxicol.* **48**, 21–29 (1988).
29. Bresgen, N. & Eckl, P. Oxidative Stress and the Homeodynamics of Iron Metabolism. *Biomolecules* **5**, 808 (2015).
30. Niederer, W. Ferritin: iron incorporation and iron release. *Experientia* **26**, 218–220 (1970).
31. Pead, S. *et al.* Metal ion binding to apo, holo, and reconstituted horse spleen ferritin. *J. Inorg. Biochem.* **59**, 15–27 (1995).
32. Price, D. & Joshi, J. G. Ferritin: a zinc detoxicant and a zinc ion donor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **79**, 3116–3119 (1982).
33. Fleming, J. & Joshi, J. G. Ferritin: isolation of aluminum-ferritin complex from brain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **84**, 7866–7870 (1987).
34. Lindenschmidt, R. *et al.* Ferritin and *in vivo* beryllium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **82**, 344–350 (1986).
35. Meldrum, F. C., Wade, V. J., Nimmo, D. L., Heywood, B. R. & Mann, S. Synthesis of inorganic nanophas materials in supramolecular protein cages. *Nature* **349**, 684–687 (1991).
36. Galvez, N. *et al.* Apoferritin-encapsulated Ni and Co superparamagnetic nanoparticles. *J. Mat. Chem.* **16**, 2757–2761 (2006).
37. Kim, J.-W. *et al.* Cobalt oxide hollow nanoparticles derived by bio-templating. *Chem. Comm.* 4101–4103 (2005).
38. Cutrin, J. C., Crich, S. G., Burghlelea, D., Dastrù, W. & Aime, S. Curcumin/Gd Loaded Apoferritin: A Novel “Theranostic” Agent To Prevent Hepatocellular Damage in Toxic Induced Acute Hepatitis. *Mol. Pharmaceutics* **10**, 2079–2085 (2013).
39. Harada, T. & Yoshimura, H. Synthesis of rare earth doped yttrium-vanadate nanoparticles encapsulated within apoferritin. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 14947–14952 (2014).
40. Liu, X. *et al.* Apoferritin-camouflaged Pt nanoparticles: surface effects on cellular uptake and cytotoxicity. *J. Mat. Chem.* **21**, 7105–7110 (2011).
41. Kálmán, F. K., Geninatti-Crich, S. & Aime, S. Reduction/Dissolution of a  $\beta$ -MnOOH Nanophas in the Ferritin Cavity To Yield a Highly Sensitive, Biologically Compatible Magnetic Resonance Imaging Agent. *Angewandte Chem.* **49**, 612–615 (2010).
42. Levy, M. *et al.* Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties. *Nanotechnology* **21**, 395103 (2010).
43. Arbab, A. S. *et al.* A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed* **18**, 383–389 (2005).
44. Soenen, S. J. H. *et al.* Intracellular Nanoparticle Coating Stability Determines Nanoparticle Diagnostics Efficacy and Cell Functionality. *Small* **6**, 2136–2145 (2010).
45. Javed, Y. *et al.* Biodegradation Mechanisms of Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers and Tunable Shield Effect of Gold Coating. *Small* **10**, 3325–3337 (2014).
46. Yang, Z. *et al.* Encapsulation of platinum anticancer drugs by apoferritin. *Chem. Comm.* 3453–3455 (2007).
47. Macara, I. G., Hoy, T. G. & Harrison, P. M. The formation of ferritin from apoferritin. Kinetics and mechanism of iron uptake. *Biochem. J.* **126**, 151–162 (1972).
48. Luciani, A. *et al.* Adipose Tissue Macrophages: MR Tracking to Monitor Obesity-associated Inflammation. *Radiology* **263**, 786–793 (2012).
49. Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B. & Brunk, U. T. Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 389–406 (2008).
50. Kurz, T., Gustafsson, B. & Brunk, U. T. Cell sensitivity to oxidative stress is influenced by ferritin autophagy. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 1647–1658 (2011).
51. Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans. Magn.* **17**, 1247–1248 (1981).
52. Ricolleau, C. *et al.* Performances of an 80–200 kV microscope employing a cold-FEG and an aberration-corrected objective lens. *Microscopy* **62**, 283–293 (2013).

## Acknowledgements

This work was supported by ANR (Agence Nationale de la Recherche) and CGI (Commissariat à l’Investissement d’Avenir) through Labex SEAM (Science and Engineering for Advanced Materials and devices; ANR 11 LABX 086, ANR 11 IDEX 05 02), by the CNRS (Defi Nano) and DIM C’Nano Ile de France. We are grateful to the personnel of the Paris Cardiovascular Research Center (PARCC) for animal facility, especially to L. Pidal, to F. Gendron and Y. Klein for magnetic experiments and to B. Caron and D. Elgrabli for ICP-MS measurements performed at ISTeP, UMR 7193 CNRS/Université Pierre et Marie Curie. This work has also benefited from the

facilities and expertise of MIMA2 MET –GABI, INRA, AgroparisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France and we thank C. Longin and S. Chat for their assistance.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: J.V., J.K.T., Y.J., N.L., M.H., F.C., D.A. and F.G. Performed the experiments: J.V., J.K.T., Y.J., M.H., Q.L.V., Y.G. Analyzed the data: J.V., J.K.T., Y.J., M.H., F.C. Wrote the manuscript: J.V., J.K.T., D.A. and F.G. Nanoparticle synthesis: S.N. Material science aspects: J.V., Y.J., Q.L.V., Y.G., F.C., M.H., D.A. Animal experiments: J.K.T., N.L. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Volatron, J. *et al.* Physiological Remediation of Cobalt Ferrite Nanoparticles by Ferritin. *Sci. Rep.* 7, 40075; doi: 10.1038/srep40075 (2017).

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

## Conclusion

---

L'étude de l'évolution des propriétés magnétiques et structurales de NPOFs et de nanoparticules de ferrite de cobalt montre que celles-ci se dissolvent dans des conditions acides en présence de citrate dans le milieu minimal pour mimer les conditions lysosomales, et confirme les résultats obtenus précédemment.<sup>2,25,26</sup> Le mécanisme de dissolution est un mécanisme qualifié de « tout ou rien » où les nanoparticules sont soit dissoutes intégralement soit intactes. Il est caractérisé par une première étape d'échange de ligand entre les molécules de citrate du milieu modèle et l'enrobage des nanoparticules puis par une étape de diffusion des métaux ainsi complexés dans la solution.

Ces métaux sous forme non particulaire peuvent ensuite être stockés par l'apo-ferritine présente en solution. Le rôle de cette dernière est double puisqu'elle agit comme couche protectrice de la dégradation des nanoparticules et permet également de stocker les métaux issus de celles-ci. Deux mécanismes de stockage ont été observés. Le premier, de cinétique rapide, implique la complexation des atomes de fer par les molécules de citrate puis la diffusion de ces complexes vers les apo-ferritines. Le second, de cinétique plus lente, ne nécessite pas d'intermédiaires de chélation et les atomes de fer sont directement captés puis stockés par les apo-ferritines.

Les études *in vivo* citées précédemment ont montré la présence de ferritines autour de NPOFs injectées par voie intraveineuse. Après confinement dans les lysosomes, les NPOFs sont initialement sous forme d'agrégat puis sont isolées progressivement. En outre, elles coexistent avec une quantité croissante de ferritine, sous forme de particules individuelles ou de clusters caractérisés par leur structure *finger print*. Le confinement dans les compartiments lysosomaux, la dynamique d'évolution des agrégats des NPOFs et des ferritines *in vivo* semblent réguler la dégradation des NPOFs afin de limiter leur toxicité. En outre, la présence de ferritine à proximité des NPOFs suggère un mécanisme de transfert de fer issu de la dégradation de celles-ci vers les ferritines.

Nous avons pu mettre en évidence ce transfert de métaux vers les ferritines *in vivo* par l'intermédiaire de nanoparticules de ferrites de cobalt. En effet, il n'est pas possible de distinguer le fer endogène du fer exogène stocké dans les ferritines. En revanche, les ferritines endogènes ne contiennent pas de cobalt, aussi nous avons suivi ce transfert en considérant le cobalt comme élément de traçage. L'analyse *ex vivo* des ferritines dans la rate a montré la présence de cobalt au sein de celles-ci et a ainsi permis de démontrer le transfert de cobalt vers les ferritines *in vivo*.

La ferritine constitue en ce sens un véritable régulateur de l'état redox des lysosomes. En effet celle-ci permet de stocker des métaux tels que le cobalt ou le fer issus de la dégradation de nanoparticules sous forme redox non active, ce qui permet de limiter le stress oxydant au sein des cellules induit par la réaction de Fenton.

Ces travaux de thèse, consacrés à l'étude à l'échelle nanométrique du transfert de métaux vers les ferritines en solution et *in vivo* ont permis de mettre en évidence un mécanisme possible de détoxification des métaux issus de la dégradation des nanoparticules. Weissleder *et al.* ont également montré que, suite à l'injection intraveineuse chez le rat de NPOFs marquées avec le radioisotope  $^{59}\text{Fe}$ , une partie du  $^{59}\text{Fe}$  issu de la dégradation de celles-ci est incorporée dans l'hémoglobine des érythrocytes, à hauteur de 20 % du  $^{59}\text{Fe}$  injecté au bout de 49 jours.<sup>36</sup> Ces résultats démontrent que le fer issu de la dégradation des NPOFs peut rejoindre la réserve de fer endogène par différents mécanismes.

Une perspective intéressante de ces travaux serait de suivre l'évolution de la cytotoxicité de ces nanoparticules en fonction d'une part de leur dégradation et, d'autre part, de leur stockage au sein des ferritines. L'étude de ces processus relativement longs de dégradation et de stockage ne semblent pas réalisable sur un modèle de cellules en mono couche. En revanche, Mazuel *et al.* ont développé au laboratoire un modèle de sphéroïde de cellules souches mésenchymateuses permettant de suivre la dégradation de NPOFs.<sup>3</sup> Ils sont également suivi l'expression des gènes codant la ferritine, et ont montré une surexpression du gène associé à la ferritine L, responsable du stockage du fer. Des études de cytotoxicité pourraient être menées en parallèle sur ce modèle afin d'évaluer l'influence du stockage de métaux issus de la dégradation de nanoparticules sur la toxicité associée à celles-ci.

Ces études, conduites au niveau moléculaire voire cellulaire, ne permettent pas de déterminer les dynamiques de circulation et d'élimination des métaux issus de la dégradation des nanoparticules à l'échelle de l'organisme. Dans le cas des NPOFs, la haute concentration en fer endogène complique ce suivi. Ainsi une partie de mes travaux de thèse a consisté à l'élaboration d'une nouvelle méthodologie pour suivre les NPOFs ainsi que leurs produits de dégradation à l'échelle de l'organisme. Ces résultats sont présentés dans les deux chapitres suivants.

1. Levy, M. *et al.* Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 3988–3999 (2011).
2. Lartigue, L. *et al.* Biodegradation of Iron Oxide Nanocubes: High-Resolution In Situ Monitoring. *ACS Nano* **7**, 3939–3952 (2013).
3. Mazuel, F. *et al.* Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels. *ACS Nano* (2016).
4. Garrick, M. D. & Garrick, L. M. Cellular iron transport. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1790**, 309–325 (2009).
5. Conrad, M. E. & Umbreit, J. N. Iron absorption and transport—An update. *Am. J. Hematol.* **64**, 287–298 (2000).
6. Moos, T. & Morgan, E. H. The Metabolism of Neuronal Iron and Its Pathogenic Role in Neurological Disease: Review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1012**, 14–26 (2004).
7. Quintana, C., Cowley, J. M. & Marhic, C. Electron nanodiffraction and high-resolution electron microscopy studies of the structure and composition of physiological and pathological ferritin. *J. Struct. Biol.* **147**, 166–178 (2004).
8. Quintana, C. Contribution of Analytical Microscopies to Human Neurodegenerative Diseases Research (PSP and AD). *Mini Rev. Med. Chem.* **7**, 961–975 (2007).
9. Waldvogel-Abramowski, S. *et al.* Physiology of Iron Metabolism. *Transfus. Med. Hemotherapy* **41**, 213–221 (2014).
10. Le Blanc, S., Garrick, M. D. & Arredondo, M. Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302**, C1780-1785 (2012).
11. Bresgen, N. & Eckl, P. M. Oxidative stress and the homeodynamics of iron metabolism. *Biomolecules* **5**, 808–847 (2015).
12. Wallander, M. L., Leibold, E. A. & Eisenstein, R. S. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 668–689 (2006).
13. Anderson, C. P., Shen, M., Eisenstein, R. S. & Leibold, E. A. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 1468–1483 (2012).
14. Arbab, A. S. *et al.* A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed.* **18**, 383–389 (2005).
15. Wang, J. & Pantopoulos, K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem. J.* **434**, 365–381 (2011).
16. Patel, M. & Ramavataram, D. V. S. S. Non Transferrin Bound Iron: Nature, Manifestations and Analytical Approaches for Estimation. *Indian J. Clin. Biochem.* **27**, 322–332 (2012).
17. Watt, R. K., Hilton, R. J. & Graff, D. M. Oxido-reduction is not the only mechanism allowing ions to traverse the ferritin protein shell. *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 745–759 (2010).

18. Honarmand Ebrahimi, K., Hagedoorn, P.-L. & Hagen, W. R. Unity in the Biochemistry of the Iron-Storage Proteins Ferritin and Bacterioferritin. *Chem. Rev.* **115**, 295–326 (2015).
19. Gálvez, N. *et al.* Comparative Structural and Chemical Studies of Ferritin Cores with Gradual Removal of their Iron Contents. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 8062–8068 (2008).
20. C Linder, M. *Mobilization of Stored Iron in Mammals: A Review.* **5**, (2013).
21. Asano, T. *et al.* Distinct Mechanisms of Ferritin Delivery to Lysosomes in Iron-Depleted and Iron-Replete Cells. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2040–2052 (2011).
22. Kurz, T., Gustafsson, B. & Brunk, U. T. Cell sensitivity to oxidative stress is influenced by ferritin autophagy. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 1647–1658 (2011).
23. Ghosh, M., Carlsson, F., Laskar, A., Yuan, X.-M. & Li, W. Lysosomal membrane permeabilization causes oxidative stress and ferritin induction in macrophages. *FEBS Lett.* **585**, 623–629 (2011).
24. Garner, B., Roberg, K. & Brunk, U. T. Endogenous ferritin protects cells with iron-laden lysosomes against oxidative stress. *Free Radic. Res.* **29**, 103–114 (1998).
25. Lévy, M. *et al.* Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties. *Nanotechnology* **21**, 395103 (2010).
26. Javed, Y. *et al.* Biodegradation Mechanisms of Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers and Tunable Shield Effect of Gold Coating. *Small* **10**, 3325–3337 (2014).
27. Pead, S. *et al.* Metal ion binding to apo, holo, and reconstituted horse spleen ferritin. *J. Inorg. Biochem.* **59**, 15–27 (1995).
28. Kim, J.-W. *et al.* Cobalt oxide hollow nanoparticles derived by bio-templating. *Chem. Commun.* 4101 (2005). doi:10.1039/b505097a
29. Yang, Z. *et al.* Encapsulation of platinum anticancer drugs by apoferritin. *Chem. Commun.* 3453 (2007). doi:10.1039/b705326f
30. Harada, T. & Yoshimura, H. Synthesis of rare earth doped yttrium–vanadate nanoparticles encapsulated within apoferritin. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 14947–14952 (2014).
31. Macara, I. G., Hoy, T. G. & Harrison, P. M. The formation of ferritin from apoferritin. Kinetics and mechanism of iron uptake. *Biochem. J.* **126**, 151–162 (1972).
32. Harrison, P. M., Hoy, T. G., Macara, I. G. & Hoare, R. J. Ferritin iron uptake and release. Structure–function relationships. *Biochem. J.* **143**, 445–451 (1974).
33. Levi, S. *et al.* Mechanism of ferritin iron uptake: activity of the H-chain and deletion mapping of the ferro-oxidase site. A study of iron uptake and ferro-oxidase activity of human liver, recombinant H-chain ferritins, and of two H-chain deletion mutants. *J. Biol. Chem.* **263**, 18086–18092 (1988).
34. Pozzi, C. *et al.* Iron binding to human heavy-chain ferritin. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 1909–1920 (2015).

35. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* Cycle de vie de nanoparticules magnétiques dans l'organisme. *Biol. Aujourd'hui* **208**, 177–190 (2014).
36. Weissleder, R. *et al.* Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am. J. Roentgenol.* **152**, 167–173 (1989).
37. Mieszawska, A. J., Mulder, W. J. M., Fayad, Z. A. & Cormode, D. P. Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease. *Mol. Pharm.* **10**, 831–847 (2013).
38. Xu, G. *et al.* New Generation Cadmium-Free Quantum Dots for Biophotonics and Nanomedicine. *Chem. Rev.* **116**, 12234–12327 (2016).
39. Price, D. & Joshi, J. G. Ferritin: a zinc detoxicant and a zinc ion donor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 3116–3119 (1982).
40. Fleming, J. & Joshi, J. G. Ferritin: isolation of aluminum-ferritin complex from brain., Ferritin: isolation of aluminum-ferritin complex from brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. Am. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. Am.* **84**, **84**, 7866, 7866–7870 (1987).
41. Lindenschmidt, R. C. *et al.* Ferritin and in vivo beryllium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **82**, 344–350 (1986).
42. Jun, Y. *et al.* Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals and Their Utilization for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 5732–5733 (2005).
43. Di Corato, R. *et al.* Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials* **35**, 6400–6411 (2014).
44. Song, Q. & Zhang, Z. J. Correlation between Spin–Orbital Coupling and the Superparamagnetic Properties in Magnetite and Cobalt Ferrite Spinel Nanocrystals. *J. Phys. Chem. B* **110**, 11205–11209 (2006).
45. Fortin, J.-P. *et al.* Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2628–2635 (2007).
46. Amiri, S. & Shokrollahi, H. The role of cobalt ferrite magnetic nanoparticles in medical science. *Mater. Sci. Eng. C* **33**, 1–8 (2013).
47. Fantechi, E. *et al.* A Smart Platform for Hyperthermia Application in Cancer Treatment: Cobalt-Doped Ferrite Nanoparticles Mineralized in Human Ferritin Cages. *ACS Nano* **8**, 4705–4719 (2014).
48. Horev-Azaria, L. *et al.* Predictive Toxicology of Cobalt Nanoparticles and Ions: Comparative In Vitro Study of Different Cellular Models Using Methods of Knowledge Discovery from Data. *Toxicol. Sci.* **122**, 489–501 (2011).
49. Liu, Y. *et al.* Toxicity and bioactivity of cobalt nanoparticles on the monocytes. *Orthop. Surg.* **7**, 168–173 (2015).
50. Hahn, A., Fuhlrott, J., Loos, A. & Barcikowski, S. Cytotoxicity and ion release of alloy nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **14**, 686 (2012).

51. Romih, T. *et al.* Bioavailability of cobalt and iron from citric-acid-adsorbed CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Sci. Total Environ.* **508**, 76–84 (2015).
52. Simonsen, L. O., Harbak, H. & Bennekou, P. Cobalt metabolism and toxicology—A brief update. *Sci. Total Environ.* **432**, 210–215 (2012).
53. Shilov, V. P., Raikher, Y. L., Bacri, J.-C., Gazeau, F. & Perzynski, R. Effect of unidirectional anisotropy on the ferromagnetic resonance in ferrite nanoparticles. *Phys. Rev. B* **60**, 11902–11905 (1999).
54. Tannenwald, P. E. Multiple Resonances in Cobalt Ferrite. *Phys. Rev.* **99**, 463–464 (1955).
55. Allen, M., Willits, D., Young, M. & Douglas, T. Constrained Synthesis of Cobalt Oxide Nanomaterials in the 12-Subunit Protein Cage from *Listeria innocua*. *Inorg. Chem.* **42**, 6300–6305 (2003).
56. Tsukamoto, R., Iwahori, K., Muraoka, M. & Yamashita, I. Synthesis of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Using the Cage-Shaped Protein, Apoferritin. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **78**, 2075–2081 (2005).

---

# Partie

# II

---

Suivi du devenir des NPOFs à l'échelle de  
l'organisme



# Chapitre 2 : Stratégie de marquage du cœur inorganique et de l'enrobage de nanoparticules

---

## Table des matières

---

- 1. Suivi de l'intégrité des nanoparticules – état de l'art**
  - 1.1 Suivi de la couronne de protéines
  - 1.2 Suivi de l'enrobage
  - 1.3 Suivi du cœur inorganique
  - 1.4 Stratégie de marquage
- 2. Marquage du cœur inorganique**
  - 2.1 Marquage isotopique
  - 2.2 Principe de l'ICP-MS
  - 2.3 Synthèse des NPOFs
  - 2.4 Conclusion
- 3. Marquage de l'enrobage**
  - 3.1 Stratégie du double marquage par des complexes de lanthanides
  - 3.2 Méthodes
- 4. Conclusion**

Comme abordé dans le chapitre d'introduction, lorsque les nanoparticules sont injectées par voie intraveineuse, elles se retrouvent dans la circulation sanguine et interagissent instantanément avec les protéines plasmatiques. Ces interactions, notamment dépendantes de la nature de l'enrobage des nanoparticules, déterminent leur biodistribution (Figure 0.1 (A, B)). Après capture cellulaire, elles se retrouvent confinées dans les lysosomes au sein de différents organes, en particulier dans les macrophages hépatiques et spléniques, où elles sont dégradées.

Une conséquence de la dégradation est la perte d'intégrité des nanoparticules, c'est-à-dire le scindement des constituants initiaux de celles-ci, libérant des produits de dégradation non particulaire dans les lysosomes. L'étude du devenir des nanoparticules correspond à la caractérisation de l'ensemble de leurs constituants au cours du temps, c'est-à-dire la couronne de protéines, l'enrobage organique, le cœur inorganique, et les produits de dégradation de ceux-ci (Figure 0.1 (C)).

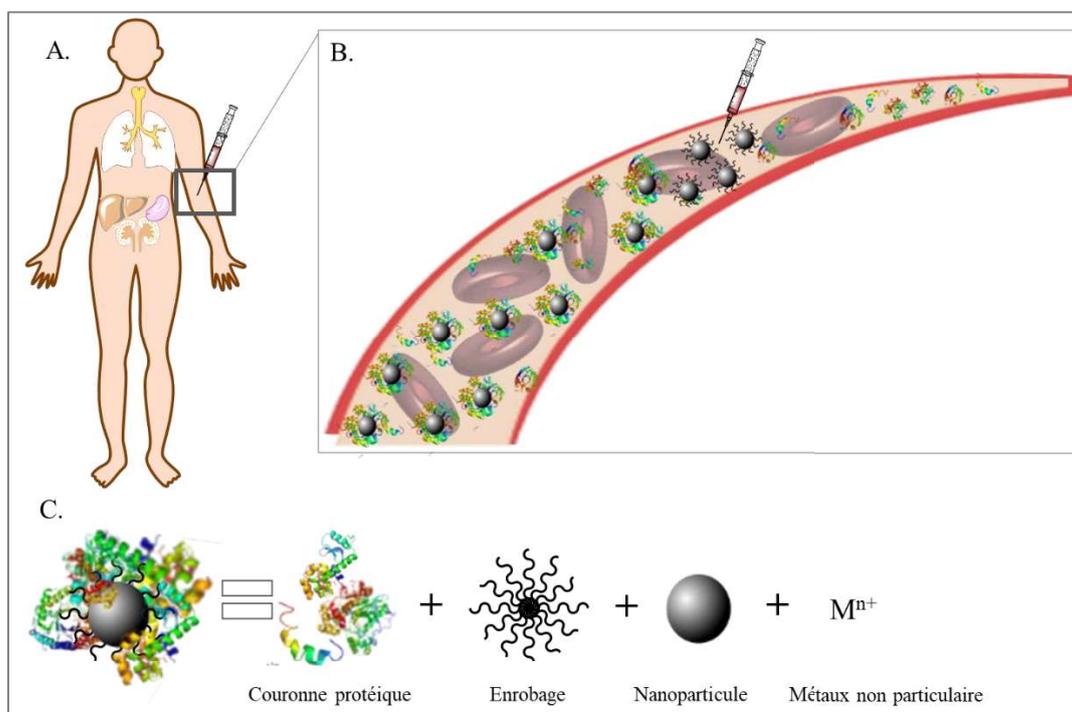


Figure 0.1 : Biodistribution après injection iv de nanoparticules (A) Interaction avec les protéines plasmatique. (B). L'étude du devenir des nanoparticules correspond à la caractérisation de l'ensemble des constituants de celles-ci *in vivo* : la couronne de protéines, l'enrobage, le cœur inorganique et les métaux non particulaire issus de la dégradation (C).

Dans le cas des NPOFs, une difficulté majeure que pose l'étude de leur devenir après injection tient au fait qu'il est nécessaire de distinguer les produits de dégradation non magnétiques issus des NPOFs du fond endogène riche en fer. En outre, l'enrobage des nanoparticules est dans la majorité des cas constitué de polymères organiques composés d'atomes de carbone, d'oxygène, d'hydrogène et d'azote. Ces éléments étant également à la base de l'ensemble des biomolécules endogènes, il est en pratique très compliqué de déterminer les voies de prise en charge par l'organisme de l'enrobage.

Les méthodes développées dans le chapitre I ont permis de s'affranchir du fer endogène en étudiant des phénomènes spécifiques en solution ou, *in vivo* en substituant le fer des nanoparticules par un autre métal, moins abondant dans l'organisme, à savoir le cobalt. Ces stratégies ont permis de mettre en évidence, aux échelles moléculaire et cellulaire, un mécanisme possible de prise en charge de ces métaux, à savoir le stockage de ceux-ci au sein de protéines endogènes, les ferritines.

L'objet de ce chapitre est ainsi d'établir une nouvelle méthodologie permettant de suivre le fer particulaire et non particulaire issu des NPOFs à l'échelle de l'organisme. Nous aborderons dans un premier temps les stratégies développées dans la littérature pour évaluer le devenir des nanoparticules. Nous présenterons par la suite la stratégie adoptée pour suivre les NPOFs, leur enrobage et leurs produits de dégradation dans l'organisme



# 1. Suivi de l'intégrité des nanoparticules – état de l'art

---

L'étude de l'intégrité des nanoparticules doit permettre d'évaluer d'une part l'influence de différents paramètres tels que l'enrobage et la couronne de protéines sur la biodistribution et le cycle de vie des NPOFs, et, d'autre part, les différents processus de dégradation, d'élimination et de recyclage des nanoparticules. Le défi de ces recherches est d'établir des méthodes permettant de distinguer les constituants des nanoparticules des éléments endogènes. Nous présenterons ici un état de l'art sur les différentes stratégies développées pour suivre l'intégrité des nanoparticules, de la couronne de protéines jusqu'au cœur inorganique.

## 1.1 Suivi de la couronne de protéines

Les interactions entre protéines et nanoparticules, à l'origine de la formation d'un complexe nanoparticules-protéines, façonnent l'identité biologique des nanoparticules. La nature des protéines adsorbées à la surface des nanoparticules détermine leur temps de circulation, leur pharmacocinétique et leur biodistribution.<sup>1-4</sup> Au sein de la couronne de protéine, on distingue deux types d'interactions. La première, entre les nanoparticules et les protéines ayant une forte affinité pour celles-ci, est à l'origine de la formation d'une première couronne, dite « hard corona », par adsorption des protéines à la surface des nanoparticules. La seconde est une interaction faible entre les protéines adsorbées sur les nanoparticules et les protéines libres dans le milieu biologique, elle constitue la couronne appelée « soft corona ».<sup>5,6</sup> La couronne de protéines est unique pour chaque type de nanoparticules, elle varie selon leur identité synthétique définie par leur taille, leur enrobage ou leur composition.<sup>5</sup>

Bien qu'il existe de nombreuses techniques permettant de caractériser la couronne de protéines autour des nanoparticules *ex situ*,<sup>3,4</sup> et en particulier la « hard corona », le défi actuel est de pouvoir caractériser les dynamiques et le devenir de celle-ci dans différents milieux biologiques. Dans les cellules, les complexes nanoparticule-protéines sont internalisés *via* des interactions entre les récepteurs de la membrane cellulaire et les protéines entourant les nanoparticules.<sup>7,8</sup> Dans le cadre de la nanomédecine, la couronne protéique constitue en ce sens un véritable cheval de Troie, permettant dans certains cas l'internalisation cellulaire de nanoparticules, et en particulier dans les macrophages. Plusieurs études ont montré *in vitro* que la couronne de protéines autour des nanoparticules évolue en fonction de son parcours dans les différents compartiments biologiques, tout en gardant l'empreinte protéique de ces derniers.<sup>9,10</sup> Wang *et al.* ont pu suivre le devenir de la couronne de protéines autour de nanoparticules polymériques *in vitro*.<sup>11</sup> Les nanoparticules sont en premier lieu incubées avec des protéines plasmatiques marquées avec un fluorochrome, puis les complexes nanoparticules-protéines sont ensuite isolés et mis en présence de cellules. Le devenir de la couronne de protéines est ainsi suivi par fluorescence. Les résultats montrent qu'après internalisation dans les cellules, les complexes

nanoparticules-protéines sont confinés dans les lysosomes. Dans ces derniers, la couronne de protéines est dégradée par différentes enzymes lysosomales.

Une stratégie développée par Bargheer *et al.* a permis de suivre l'intégrité des nanoparticules et de la couronne de protéines *in vivo*, sur une échelle de temps de deux heures. Celle-ci a consisté à marquer des NPOFs avec le radioisotope  $^{59}\text{Fe}$ , et à les enrober d'un polymère sur lequel sont greffées des transferrines marquées avec le radioisotope  $^{125}\text{I}$ .<sup>12</sup> Cette stratégie a permis de suivre l'intégrité du cœur inorganique et de la transferrine, élément de la couronne de protéines. Les résultats montrent d'une part que la biodistribution de la transferrine greffée aux NPOFs est différente de celle de la transferrine libre, c'est-à-dire injectée sans nanoparticules, et, d'autre part, que l'évolution du ratio  $^{125}\text{I}/^{59}\text{Fe}$ , caractérisant l'intégrité des NPOFs et de la couronne de protéines, montre un recyclage de la protéine du foie vers le sang. Celle-ci est ensuite redistribuée vers différents tissus, en adéquation avec la biodistribution de la transferrine libre marquée. Ainsi les NPOFs et la couronne de protéines sont internalisées principalement dans le foie, où la couronne de protéines est dégradée dans les cellules hépatiques puis libérée dans la circulation sanguine où elle est recyclée.

En synthétisant l'ensemble de ces données *in vitro* et *in vivo* nous avons pu formuler une première hypothèse quant au devenir de la couronne de protéines *in vivo* : une fois injectée dans le sang les nanoparticules sont entourées d'une couronne de protéines. Le complexe nanoparticule-protéines est ensuite acheminé principalement dans le foie où il est internalisé dans les cellules hépatiques, puis confiné au sein des lysosomes. Durant son parcours à travers l'organisme, la couronne de protéines évolue en fonction de la nature des protéines présentes dans chaque compartiment biologique. Une fois dans les lysosomes, la couronne de protéines est dégradée par les enzymes lysosomales puis excrétée de la cellule et recyclée dans la circulation sanguine (Figure 1.1).

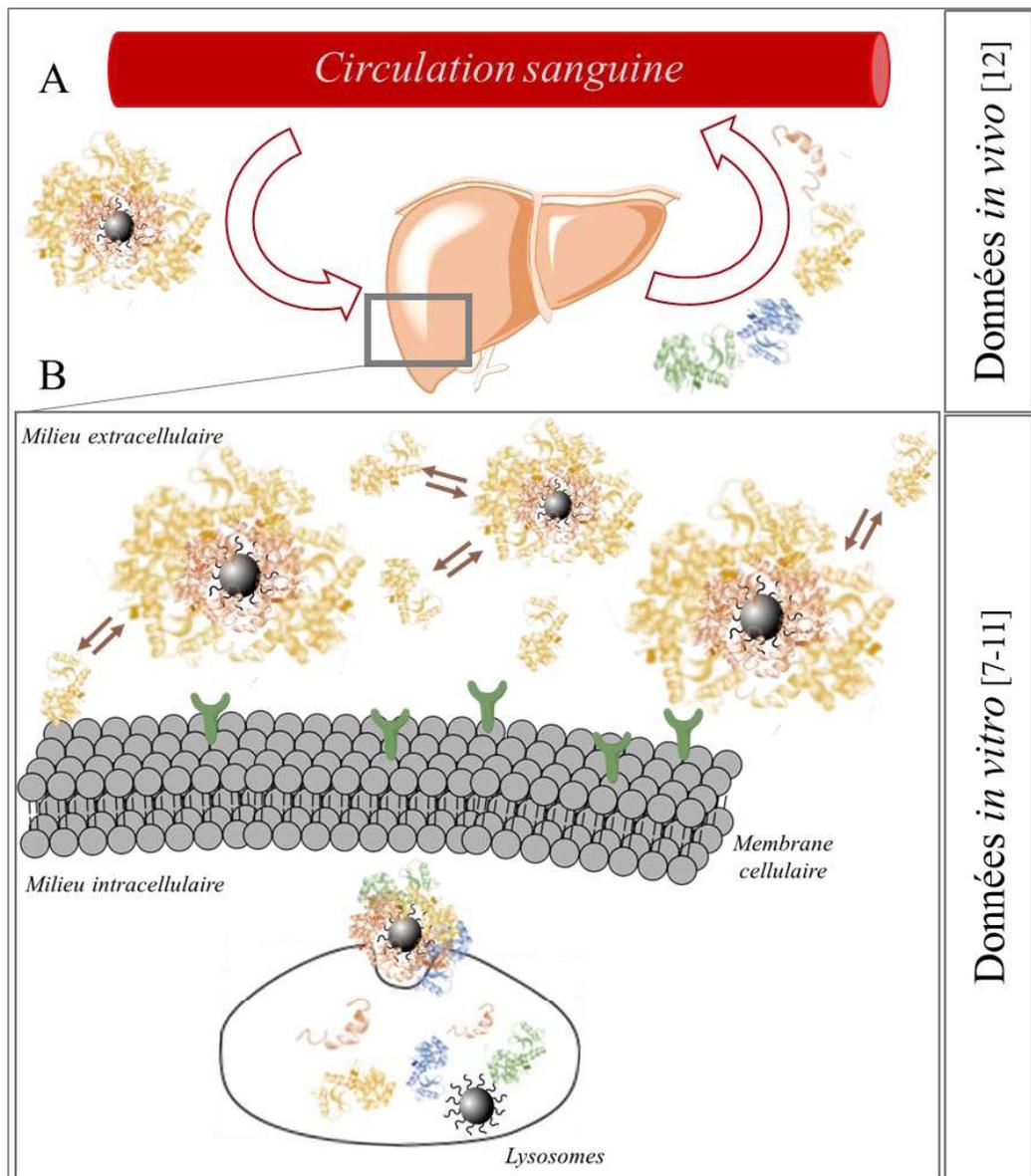


Figure 1.1 : Parcours de la couronne de protéines. Les données *in vivo* ont permis de mettre en évidence la capture de la couronne de protéines dans les cellules hépatiques puis le recyclage des protéines dans la circulation sanguine (A). Les données *in vitro* montrent que le complexe nanoparticule-protéines est internalisé dans les cellules puis dans les lysosomes où la couronne protéique est dégradée par les enzymes lysosomales (B). Les protéines sont ensuite recyclées dans la circulation sanguine avant d'être redistribuées vers différents organes.

Les études présentées ci-dessus apportent des informations précieuses quant au devenir de la couronne de protéines *in vitro* et *in vivo*. Des études complémentaires en solution, recensées dans plusieurs revues,<sup>3,5</sup> ont permis de sonder la nature des protéines constituant la couronne de protéines. La dynamique de la couronne a également pu être étudiée *in vitro*.<sup>9,10</sup> Cependant, dans ces expériences, les nanoparticules sont incubées avec 10% de plasma<sup>9,11</sup> ou du plasma pur.<sup>10</sup> Or, Lartigue *et al.* ont mis en évidence que la nature des protéines adsorbées à la surface des nanoparticules dépend, entre autres, de la quantité relative de plasma incubée avec les nanoparticules.<sup>13</sup> L'isolation du complexe nanoparticule-protéines nécessite plusieurs étapes de centrifugation ce qui perturbe également l'équilibre des protéines

adsorbées en surface et change ainsi la composition de la couronne de protéines.<sup>14</sup> En outre, ces techniques ne sont pas adaptées à l'étude de la dynamique de la couronne de protéines *in vivo*. Par ailleurs, l'expérience réalisée par Bargheer *et al.*, et présentée ci-dessus a consisté à suivre uniquement la transferrine liée de manière covalente aux nanoparticules. Aussi celle-ci ne permet pas d'évaluer le devenir de l'ensemble de la couronne de protéines, ni les dynamiques d'échanges *in vivo*. L'enjeu actuel de l'étude de la couronne de protéines est de développer de nouvelles méthodes de caractérisation *in situ*, afin de minimiser les différentes perturbations liées à l'isolation du complexe nanoparticule-protéines et de pouvoir sonder directement les dynamiques de la couronne de protéines *in vivo*.

## 1.2 Suivi de l'enrobage

L'enrobage définit l'identité synthétique des nanoparticules et détermine les interactions de celles-ci avec les protéines plasmatiques. Comme abordé dans l'introduction de ce manuscrit, l'enrobage des nanoparticules influence leur biodistribution ainsi que leur temps de circulation dans le sang. L'étude de l'intégrité du complexe nanoparticule-enrobage permet d'évaluer leur stabilité *in vivo* et ainsi de la moduler, en amont, lors de leur synthèse.

Une stratégie développée par Sée *et al.* a consisté à greffer un peptide fonctionnalisé avec un fluorochrome sur des nanoparticules d'or.<sup>15</sup> Les nanoparticules d'or inhibent la fluorescence du fluorochrome, par transfert d'énergie, uniquement lorsque celui-ci est greffé sur ces dernières. Après internalisation dans des cellules cancéreuses HeLa, les nanoparticules sont internalisées dans les lysosomes. Dans ces compartiments, une augmentation de la fluorescence, caractéristique de la dissociation de l'enrobage des nanoparticules, est observée. La dégradation du peptide est attribuée en particulier à une enzyme lysosomale, la cathepsine L, responsable de la dégradation de protéines et peptides. Des expériences *in vitro* similaires ont également montré que l'enzyme alpha-glucosidase était impliquée dans la dégradation de dérivés du dextran, constituant l'enrobage de NPOFs.<sup>16</sup> *In vitro*, les nanoparticules sont internalisées dans les cellules puis une fois confinées dans les lysosomes, leur enrobage semble être dégradé par des protéines adaptées à la composition de celui-ci.

L'étude de l'intégrité des nanoparticules et de leur enrobage *in vivo* nécessite un marquage spécifique de ces entités afin de les suivre individuellement. Une stratégie développée récemment a été de marquer le cœur inorganique et l'enrobage des nanoparticules par des isotopes radioactifs distincts. Wang *et al.* ont ainsi suivi l'intégrité de NPOFs marquées avec le radioisotope <sup>59</sup>Fe, enrobées de polymères marqués avec des radioisotopes du carbone et de l'indium, <sup>14</sup>C et <sup>111</sup>In, respectivement (Figure 1.2 (A)).<sup>17</sup>

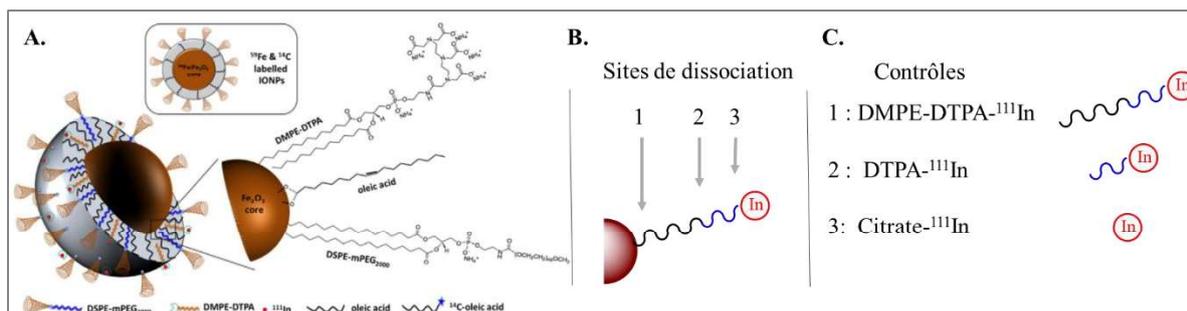


Figure 1.2 : NPOFs marquées avec le radioisotope  $^{59}\text{Fe}$  et enrobées avec de l'acide oléique marqué avec le radioisotope  $^{14}\text{C}$  et le polymère DMPE-DTPA marqué avec le radioisotope  $^{111}\text{In}$ . Figure extraite de [17] (A). Sites de dissociation de l'enrobage DMPE-DTPA-In (B). Contrôles réalisés pour déterminer les sites de dissociation (C).

Après injection par voie intraveineuse chez la souris, la biodistribution du  $^{14}\text{C}$  est différente de celle des deux autres radioisotopes. Ces observations, en accord avec une étude antérieure,<sup>18</sup> montrent que l'acide oléique se dissocie des nanoparticules, et ce quelques minutes après injection. Les isotopes radioactifs  $^{59}\text{Fe}$  et  $^{111}\text{In}$  sont principalement acheminés vers le foie et la rate. Dans le foie, une augmentation de la quantité d'indium est observée vingt-quatre heures après l'injection, alors que la quantité du radioisotope du fer reste constante. Dans les reins, la quantité d'indium est huit fois supérieure à celle du radioisotope du fer. Ces observations suggèrent une dissociation partielle de l'enrobage des nanoparticules et la libération de dérivés de l'indium, éliminés par la suite dans les urines. Afin d'identifier le site de dissociation de l'indium et ainsi la nature des dérivés de l'indium libérés, trois contrôles supplémentaires, le phospholipide (DMPE-DTPA- $^{111}\text{In}$ ) et le ligand (DTPA- $^{111}\text{In}$ ) marqués avec le radioisotope de l'indium ainsi que de l'indium complexé avec du citrate, ont été injectés (Figure 1.2 (B & C)).

La biodistribution de l'indium du contrôle DMPE-DTPA- $^{111}\text{In}$  semble similaire à celle des nanoparticules marquées. L'indium des contrôles citrate- $^{111}\text{In}$  et DTPA- $^{111}\text{In}$  est majoritairement acheminé vers les reins ou éliminé dans les urines. Ces résultats montrent qu'après injection chez la souris, une dissociation partielle de l'enrobage des nanoparticules a lieu, libérant le dérivé de l'indium DMPE-DTPA- $^{111}\text{In}$ . Kreyling *et al.* ont également suivi l'intégrité de nanoparticules d'or et de leur enrobage marqués avec les isotopes radioactifs  $^{198}\text{Au}$  et  $^{111}\text{In}$  respectivement.<sup>19</sup> L'évolution du ratio  $^{198}\text{Au} : ^{111}\text{In}$  montre une disparité de la biodistribution de ces deux entités. Bien que la majorité de ces radioisotopes soit acheminée dans le foie, un pourcentage non négligeable de  $^{111}\text{In}$  est acheminé vers les reins et éliminé *via* les urines. Tout comme dans l'étude précédente, une dissociation partielle de l'enrobage des nanoparticules est observée *in vivo*.

Une première hypothèse quant au mécanisme de dissociation est que les nanoparticules sont internalisées intactes dans les cellules hépatiques et confinées dans les lysosomes où l'enrobage est dissocié des nanoparticules ou dégradé par les enzymes lysosomales. L'enrobage est ensuite excrété par

les cellules dans la circulation sanguine où il est redistribué vers d'autres organes ou éliminé. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats obtenus *in vitro* et également avec ceux obtenus *in vivo* pour la couronne de protéines, présentés dans la partie précédente. Une autre hypothèse est qu'une dissociation partielle a lieu dans la circulation sanguine, celle-ci pouvant être expliquée par la présence d'enzymes telles que des estérases.<sup>14</sup> L'enrobage est ensuite distribué vers le foie et les reins, ou éliminé dans les urines.

### 1.3 Suivi du cœur inorganique

L'ensemble des études sur le devenir des nanoparticules inorganiques dans différents milieux, a permis de mettre en évidence deux conditions essentielles pour pouvoir effectuer le suivi de leur intégrité *in vivo*.

La première est de pouvoir **distinguer les éléments endogènes des éléments exogènes** : c'est-à-dire être capable de reconnaître si l'élément détecté (par exemple le fer) est issu de la dégradation de NPOFs ou s'il était déjà présent auparavant.<sup>20</sup> Pour des nanomatériaux constitués d'éléments peu abondants dans l'organisme telles que les nanoparticules d'argent, d'or ou encore certains types de quantum dots (CdSe)<sup>14,21</sup>, le problème de la différenciation des entités exogènes de celles endogènes ne se pose pas. En effet, les nanoparticules elles-mêmes se différencient du fond endogène par leur composition. Il sera ainsi possible de les quantifier par analyse élémentaire. Lorsqu'à l'inverse, les nanoparticules sont constituées d'éléments naturellement présents dans les tissus vivants, leur détection dans l'organisme devient impossible. Aussi, une stratégie proposée pour les différencier du fond endogène est de les marquer avec un isotope radioactif.<sup>22</sup> Dans le cas des NPOFs, plusieurs auteurs ont marqué les nanoparticules avec le radioisotope <sup>59</sup>Fe.<sup>17,18</sup> Ces études ont permis de suivre la biodistribution du <sup>59</sup>Fe après injection intraveineuse chez la souris sur une période d'un jour. Les résultats montrent que le <sup>59</sup>Fe est majoritairement acheminé vers le foie et la rate. Cependant, ce marquage quantifie la totalité du fer exogène introduit et ne permet pas de distinguer les nanoparticules de leurs produits de dégradation. Ainsi, la seconde condition essentielle pour un suivi de l'intégrité des nanoparticules est de pouvoir **différencier les formes particulières et non particulières issues de ces dernières**.

L'avantage des NPOFs est qu'il est possible de caractériser les entités particulières sélectivement par mesures magnétiques. Weissleder *et al.* ont proposé dès la fin des années 1980 de suivre la biodistribution de NPOFs marquée avec du <sup>59</sup>Fe en combinant des mesures de radioactivité et des temps de relaxation protoniques en présence de NPOFs.<sup>23</sup> Les mesures de temps de relaxation protoniques caractérisent l'évolution de la biodistribution des NPOFs par comparaison des différents échantillons mais ne permettent pas de quantifier de manière exacte les NPOFs. Les études présentées dans l'introduction proposent de suivre le devenir de NPOFs en combinant plusieurs méthodes telles que la RFM pour le suivi de la quantité de fer sous forme particulière superparamagnétique, l'IRM pour le suivi de la biodistribution magnétique et la MET pour le suivi des propriétés structurelles des

nanoparticules.<sup>24,25</sup> Les mesures RFM et IRM montrent qu'après injection intraveineuse, les NPOFs sont majoritairement acheminées dans le foie et la rate. Une diminution du signal en RFM, caractéristique de la dégradation des NPOFs, est observée dès sept jours après injection, dans le foie. Dans la rate, on observe une cinétique de dégradation plus lente comparativement à celle du foie. Les cinétiques de dégradation dépendent donc de l'organe dans lequel sont localisées les NPOFs, mais aussi de leur enrobage ou de la dose injectée. Ces études ont ainsi mis en évidence la dégradation des NPOFs *in vivo*. Cependant, la haute concentration en fer endogène ne permet pas de caractériser les produits non particuliers et non magnétiques issus de leur dégradation.

Ainsi, dans le cadre du suivi de l'intégrité des NPOFs, il est nécessaire de combiner des méthodes de marquage du fer avec des méthodes de mesures magnétiques pour caractériser à la fois les dynamiques de dégradation des nanoparticules, et celles de circulation des produits issus de leur dégradation.

#### 1.4 Stratégie de marquage

Dans l'ensemble des études présentées ci-dessus, les chercheurs se sont attachés à développer de nouvelles méthodes de marquage du cœur inorganique et de l'enrobage des nanoparticules. Le Tableau 3 recense les différents types de marquages réalisés pour le suivi de NPOFs ainsi que l'échelle de temps de ces études.

Couroane de protéines	Enrobage	Cœur inorganique	Echelle de temps	Référence
<sup>125</sup> I	-	<sup>59</sup> Fe	120 min	[12]
-	<sup>14</sup> C	<sup>59</sup> Fe	24 h	[18]
-	<sup>14</sup> C/ <sup>111</sup> In	<sup>59</sup> Fe	24 h	[17]
-	-	<sup>59</sup> Fe	3 mois	[23]

Tableau 3 : Recensement des différents marquages des NPOFs *in vivo*.

Dans toutes ces études, le cœur inorganique et l'enrobage des NPOFs sont marqués avec des radioisotopes détectés par mesures des radiations gamma induites par ceux-ci. Les inconvénients de l'utilisation de radiotraceur pour le suivi des NPOFs sont d'une part la dangerosité liée à la manipulation de produits radioactifs et d'autre part les fenêtres temporelles offertes par ceux-ci pour le suivi *in vivo*. A titre d'exemple le temps de demi-vie du <sup>59</sup>Fe est estimé à environ 45 jours, aussi pour un suivi sur le long terme, il sera nécessaire de considérer la loi de désintégration radioactive de ce radiotraceur. On constate en outre que la plupart des études ci-dessus sont menées sur une échelle de temps n'excédant pas quelques heures. Comme mentionné précédemment dans l'introduction, plusieurs études ont montré qu'après administration dans l'organisme, les NPOFs se dégradent et libèrent ainsi des entités non

particulaires. Cependant, dans les études citées ci-dessus, aucune d'entre elles ne combinent un suivi magnétique au suivi des radiotraceurs afin de distinguer et de quantifier les NPOFs de leurs produits de dégradation.

L'enjeu de cette partie de mes travaux de thèse est double puisqu'il a consisté à développer une méthode de marquage du cœur inorganique et de l'enrobage de NPOFs adaptée pour le suivi du devenir de celles-ci *in vivo* sur le long terme. Il s'est également agi de mettre au point une méthode analytique pour différencier les NPOFs de leurs produits de dégradation. Dans le cadre du suivi des NPOFs et de leur enrobage sur le long terme, nous nous sommes tournées vers des nucléides stables (non radioactifs) afin de n'être pas limitées le temps de demi-vie du radiotraceur en comparaison à l'échelle de temps du suivi *in vivo*. Aussi dans le cadre du suivi du cycle de vie de NPOFs, nous les avons marqués avec un isotope stable du fer. Nous avons décidé de marquer l'enrobage des NPOFs avec des éléments possédant une abondance endogène négligeable pour pouvoir les détecter aisément dans des matrices biologiques complexes. Des complexes de lanthanides ont été retenus comme traceurs de l'enrobage.

Dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps le choix du marquage du cœur inorganique ainsi que la méthode adoptée pour synthétiser les NPOFs marquées. Puis dans un second temps, nous discuterons le choix et la méthode retenue pour marquer l'enrobage des NPOFs.

## 2. Marquage du cœur inorganique

---

L'objet de cette section est d'établir une méthodologie permettant de suivre les NPOFs ainsi que leurs produits de dégradation dans des matrices biologiques complexes, avec pour objectif de l'appliquer à l'étude de l'intégrité des NPOFs *in vivo*.

### 2.1 Marquage isotopique

C'est en 1913 que Frederick Soddy découvrit que certains éléments peuvent avoir des masses différentes sans pour autant modifier leur propriété chimique, faisant alors naître la notion d'isotope. L'isotope d'un élément chimique est un nucléide possédant le même nombre de protons mais un nombre de neutrons différent et, par conséquent, une masse atomique différente. L'invention du spectromètre de masse par Francis Aston au début de l'année 1920 a permis de séparer et d'identifier les différents isotopes d'un élément.

Les isotopes font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches allant du domaine de l'agroalimentaire à celui de la science de la Terre en passant par la médecine. On distingue les isotopes radioactifs, possédant un noyau instable et se désintégrant avec une émission de radioactivité, des isotopes stables. Les isotopes radioactifs peuvent être utilisés par exemple pour la datation grâce à l'isotope du carbone, le  $^{14}\text{C}$  ou pour l'imagerie en médecine nucléaire avec les isotopes du technétium ou du fluor, le  $^{99}\text{Tc}$  ou le  $^{18}\text{F}$ . Les études de suivi du cœur inorganique des nanoparticules présentées dans la section précédente ont également utilisé un isotope radioactif, le  $^{59}\text{Fe}$ .<sup>17,18</sup>

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous limiterons à l'utilisation des isotopes stables. La composition isotopique d'une entité, c'est-à-dire l'abondance de chaque isotope, n'est pas constante, elle varie en fonction de son origine et de son parcours. A titre d'exemple, l'étude des isotopes de l'hydrogène  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$  et de l'oxygène  $^{16}\text{O}$  et  $^{18}\text{O}$  permet de retracer la vie d'une eau de source. La composition isotopique de ces éléments permet de détecter les éventuelles transformations de l'eau, telle que l'évaporation, ou caractériser les interactions avec des roches ou des gaz<sup>26</sup> ainsi que les différents processus de contamination de cette dernière.<sup>27</sup>

Le marquage isotopique consiste à modifier artificiellement la signature isotopique d'un élément afin de le détecter et de le suivre dans une matrice complexe. A titre d'exemple, l'enrichissement d'arbre en  $^{15}\text{N}$ , isotope minoritaire de l'azote, a permis d'étudier le cycle de minéralisation de cet élément.<sup>28</sup> Plus récemment, des chercheurs ont marqué différents types de nanoparticules avec des isotopes stables afin d'évaluer leur impact environnemental. A cet égard, Larner *et al.* ont suivi le devenir de nanoparticules d'oxyde de zinc marquées avec l'isotope stable  $^{68}\text{Zn}$  dans des matrices aquatiques complexes.<sup>29</sup> L'analyse du rapport isotopique modifié du zinc montre que les nanoparticules se dissolvent et le zinc issu de la dissolution peut être ingéré par des crustacés tels que *corophium volutator*. Bourgeault *et al.*

ont également étudié l'accumulation de nanoparticules d'oxyde de titane  $\text{TiO}_2$  marquées avec l'isotope  $^{47}\text{Ti}$  sur un modèle de moule zébrée.<sup>30</sup>

Dans ce contexte, la stratégie adoptée pour suivre les NPOFs dans des matrices biologiques complexes a été de les marquer avec un isotope minoritaire stable du fer. Le fer en possède quatre : le 54, le 56, le 57 et le 58, d'abondances naturelles respectives de 5,85%, 91,754%, 2,12% et 0,28%. Pour choisir entre les trois isotopes minoritaires disponibles, il faut identifier le meilleur compromis entre la sensibilité de la détection de cet isotope minoritaire au sein des échantillons et le coût des précurseurs enrichis en isotope minoritaire. En effet, plus l'enrichissement des NPOFs est contrasté par rapport à la signature isotopique du fond endogène et plus la détection peut être poussée jusqu'à des concentrations faibles de NPOFs marquées dans le fond endogène. Par cette logique, il faudrait idéalement travailler avec des NPOFs enrichies à 100 % en  $^{58}\text{Fe}$  car celui-ci est l'isotope minoritaire absolu du milieu naturel. Cependant, en pratique, plus l'enrichissement est poussé et minoritaire, et plus les précurseurs sont coûteux. En considérant l'échelle de la cohorte sur laquelle cette étude devait être menée, le  $^{57}\text{Fe}$  nous est apparu comme le meilleur compromis entre contraste et coût. L'objectif est ainsi de distinguer le  $^{57}\text{Fe}$  provenant des nanoparticules de la composition isotopique naturelle en fer d'une matrice biologique complexe (Figure 2.1). Afin de détecter et de séparer les différents isotopes stables du fer provenant de la matrice ou des NPOFs, nous avons utilisé la spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif haute résolution (HR-ICP-MS). Ces travaux initiés par Gaëlle Charron ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration avec Mickaël Tharaud et Yann Sivry, tous deux chercheurs à l'Institut de Physique de Globe de Paris (IPGP).

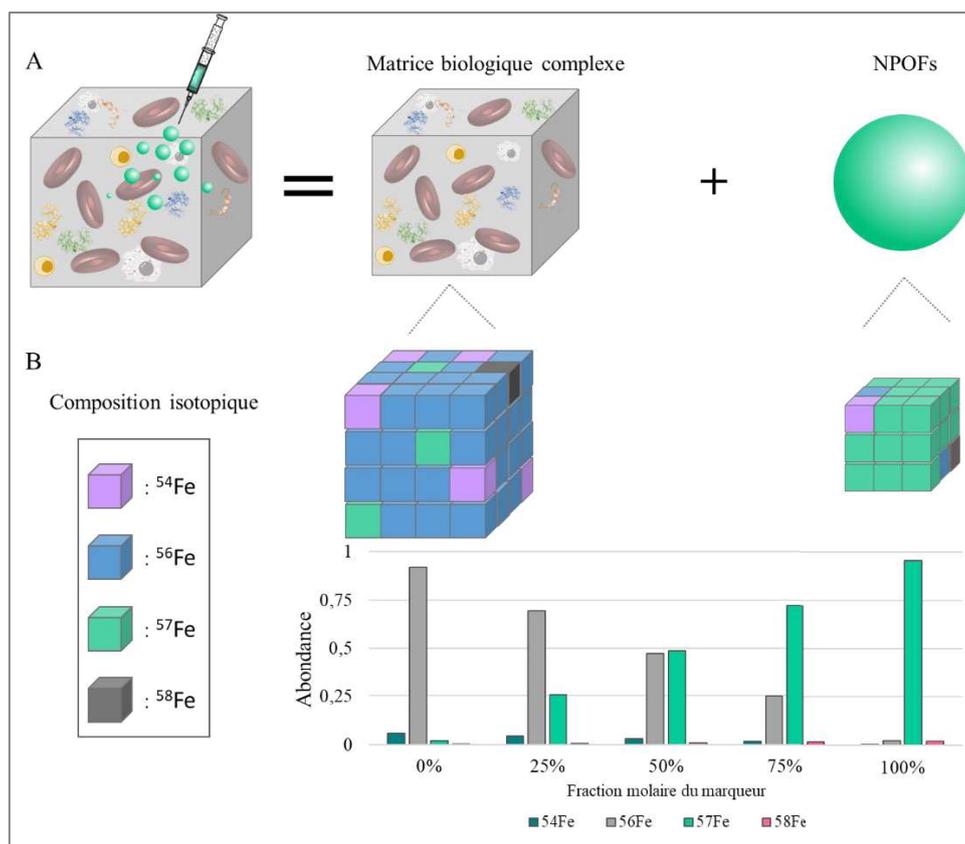


Figure 2.1 : Injection de nanoparticules marquées avec l'isotope  $^{57}\text{Fe}$  du fer (A). La matrice biologique complexe est de composition isotopique naturelle en fer tandis que les NPOFs sont enrichies en isotope  $^{57}\text{Fe}$ , aussi leur présence modifie l'abondance de chaque isotope du fer (B).

## 2.2 Principe de l'ICP-MS

### 2.2.1 Appareil ICP-MS

Le principe de l'ICP-MS peut se résumer en trois étapes : l'ionisation, la sélection des ions et leur détection. L'ionisation est réalisée par une torche à plasma permettant d'atteindre des températures de 10 000 Kelvin et d'ioniser l'échantillon à analyser. Les ions positifs sont ensuite dirigés vers le spectromètre de masse où ils sont séparés. Sur un spectromètre de masse à double focalisation (HR-ICP-MS), la sélection des ions à analyser est réalisée à l'aide d'un secteur magnétique suivi d'un secteur électrostatique. Lorsque des particules chargées en mouvement sont mises en présence d'un champ magnétique, celles-ci sont déviées d'un angle qui est fonction du rapport de masse sur charge ( $m/z$ ) de la particule. Ainsi, pour les ions extraits du plasma, le rayon de courbure de leur trajectoire est défini tel que :

$$r = \frac{(2V \frac{m}{z})^2}{H}$$

Avec  $V$  la différence de potentiel et  $H$  l'amplitude du champ magnétique.

Le secteur électrostatique permet quant à lui de sélectionner les ions selon leur énergie cinétique. En effet, les ions positifs soumis à un champ électrostatique adoptent une trajectoire circulaire de rayon de courbure :

$$r = \frac{mv^2}{Ez}$$

Avec  $v$  la vitesse de la particule,  $E$  le champ électrostatique et  $m/z$  le rapport masse sur charge de l'élément. Ces deux secteurs constituent ainsi de véritables filtres permettant de sélectionner les ions de valeur  $m/z$  d'intérêt. Enfin, la détection du signal est réalisée par un détecteur de type multiplicateur d'électrons secondaires. Les ions sortant du secteur électrostatique sont convertis en électrons en entrant en contact avec la première dynode du détecteur. Le nombre d'électrons est ensuite amplifié/multiplié par une succession de dynodes induisant ainsi un courant électrique mesurable. On obtient un signal en coups par seconde, chaque coup représentant un ion (Figure 2.2).

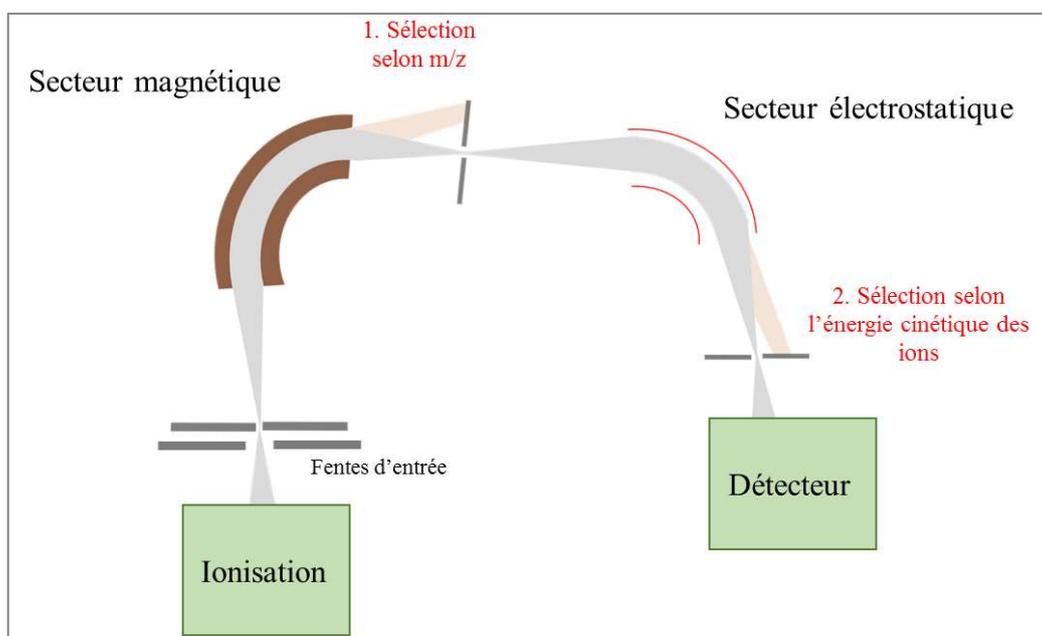


Figure 2.2 : Principe de l'ICP-MS. L'échantillon à analyser est ionisé par une torche à plasma. Les ions sont ensuite dirigés vers le secteur magnétique où une première sélection est réalisée selon leur rapport  $m/z$ . Puis le secteur électrostatique permet une seconde sélection selon l'énergie cinétique des ions. Les ions sélectionnés sont ensuite dirigés vers le détecteur.

Sur un spectromètre de masse haute résolution (HR-ICP-MS), il est possible de travailler à différentes résolutions. La résolution, définie par le rapport de la masse atomique d'un ion sur la différence de masse atomique ( $m/\Delta m$ ) entre cet ion et ses interférences (isobariques et/ou polyatomiques), représente le pouvoir de séparation de l'appareil. Celle-ci est obtenue en faisant varier la taille du faisceau grâce à des fentes en aval des secteurs magnétiques et électrostatique (fentes d'entrée dans la Figure 2.2). Ces fentes, au nombre de 3, permettent d'obtenir 3 résolutions différentes ; la basse résolution (LR), la moyenne résolution (MR) et la haute résolution (HR) pouvant séparer les éléments

d'intérêt de leurs interférences. Ces résolutions sont caractérisées par un rapport  $m/\Delta m$  respectivement égaux à 300, 4 000 et 10 000. Ces interférences, polyatomiques et isobariques, sont respectivement dues à la formation d'ions polyatomiques dans le plasma, et à la présence d'autres éléments, de masse atomique similaire à celles des éléments d'intérêts.

Dans le cadre de la détection de  $^{57}\text{NPOFs}$  dans des matrices biologiques complexes, nous analysons tous les isotopes du fer, c'est-à-dire le  $^{54}\text{Fe}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{57}\text{Fe}$  et  $^{58}\text{Fe}$ . Chacun de ces isotopes est susceptible d'être interféré par d'autres éléments. Pour des raisons de concision, les interférences appelées polyatomiques et isobariques associées aux isotopes du fer ainsi que les équations permettant de les corriger sont présentées en Annexe 2.

### 2.2.2 Quantité de fer exogène dans les matrices biologiques complexes

La détection des NPOFs enrichies en  $^{57}\text{Fe}$  a été réalisée dans plusieurs matrices biologiques complexes. Le fer issu des nanoparticules ainsi que celui issu de la matrice complexe contribuent à la concentration totale déterminée pour chaque isotope. L'objectif de cette section est donc d'arriver à différencier par le calcul le fer issu des nanoparticules du fer endogène présent dans la matrice biologique.

On distingue les trois entités suivantes : l'échantillon analysé, noté E, la matrice biologique complexe, notée m et les nanoparticules marquées avec l'isotope  $^{57}\text{Fe}$ , notées NPOFs.

- Notations :

On note :

$C_E$  : la concentration totale en fer dans l'échantillon

$C_E^x$ ,  $A_E^x$  : la concentration et l'abondance de l'isotope x dans l'échantillon

$C_{ma}$  : la concentration totale en fer provenant de la matrice

$C_{ma}^x$  : la concentration de l'isotope x provenant de la matrice

$A_{ma}^x$  : l'abondance de l'isotope x dans la matrice

$C_{\text{NPOFs}}$  : la concentration totale en fer provenant des NPOFs

$C_{\text{NPOFs}}^x$  : la concentration de l'isotope x provenant des NPOFs

$A_{\text{NPOFs}}^x$  : l'abondance de l'isotope x dans les NPOFs

- Variable à déterminer

Les concentrations  $C_E$  et  $C_E^x$  sont déterminées lors de l'analyse de l'échantillon complexe. Les abondances  $A_{ma}^x$  et  $A_{NPOFs}^x$  sont déterminées antérieurement suite à l'analyse de la matrice biologique sans nanoparticules et de la solution stock de nanoparticules.

La variable à déterminer est la concentration en fer provenant des nanoparticules dans l'échantillon soit  $C_{NPOFs}$ .

- Relations entre abondances isotopiques et concentrations :

$$C_E^x = A_E^x \times C_E$$

$$C_{ma}^x = A_{ma}^x \times C_{ma}$$

$$C_{NPOFs}^x = A_{NPOFs}^x \times C_{NPOFs}$$

- Mise en équation :

Pour chaque isotope, la concentration mesurée dans l'échantillon est la somme de la concentration de cet isotope provenant de la matrice et des NPOFs. Ainsi, pour les isotopes  $^{56}\text{Fe}$  et  $^{57}\text{Fe}$  la concentration totale dans l'échantillon est telle que :

$$C_E^{56} = C_{ma}^{56} + C_{NPOFs}^{56}$$

$$C_E^{57} = C_{ma}^{57} + C_{NPOFs}^{57}$$

Soit en exprimant les concentrations en fonction des abondances isotopiques et de la concentration totale en fer :

$$A_E^{56} \times C_E = A_{ma}^{56} \times C_{ma} + A_{NPOFs}^{56} \times C_{NPOFs} \quad (\text{Eq.2.16})$$

$$A_E^{57} \times C_E = A_{ma}^{57} \times C_{ma} + A_{NPOFs}^{57} \times C_{NPOFs} \quad (\text{Eq.2.17})$$

En exprimant la concentration en fer totale dans la matrice en fonction des autres variables pour l'équation (2.16), on obtient :

$$C_{ma} = \frac{A_E^{56} \times C_E - A_{NPOFs}^{56} \times C_{NPOFs}}{A_{ma}^{56}} \quad (\text{Eq.2.18})$$

Puis, en remplaçant l'expression de  $C_{ma}$  obtenue dans l'équation (2.18), dans l'équation (2.17), on obtient l'expression de la concentration totale issue des nanoparticules dans l'échantillon selon :

$$C_{NPOFs} = \frac{A_E^{57} \times A_{ma}^{56} - A_E^{56} \times A_{ma}^{57}}{A_{ma}^{56} \times A_{NPOFs}^{57} - A_{ma}^{57} \times A_{NPOFs}^{56}} \times C_E \quad (\text{Eq.2.19})$$

Ainsi, il est possible de déterminer la concentration en fer provenant des nanoparticules dans la matrice biologique complexe à partir de l'équation (2.19). L'HR-ICP-MS permet ainsi de réaliser un suivi élémentaire des  $^{57}\text{NPOFs}$ .

## 2.3 Synthèse des NPOFs

### 2.3.1 Synthèse du cœur inorganique

Les nanoparticules ont été synthétisées par décomposition thermique à partir du protocole de synthèse proposé par Park *et al.*<sup>31</sup> Le mécanisme de formation des nanoparticules par un mécanisme de germination-croissance a été décrit par V. LaMer.<sup>32</sup> Il se déroule en deux étapes, la nucléation et la croissance des germes. Un précurseur métallique, généralement sous forme de complexe est chauffé jusqu'à sa décomposition. La décomposition du complexe augmente la concentration ionique en solution (Figure 2.3, phase I) et induit la formation de germes. Au-delà d'une concentration critique, dite concentration à saturation  $C_s$ , les germes formés sont stables : c'est le processus de nucléation (Figure 2.3 phase II). La nucléation persiste jusqu'à ce que la concentration en ions diminue jusqu'au seuil critique  $C_s$ , les germes formés ne sont alors plus stables et se dissolvent. La décomposition du complexe induit alors la croissance des germes (Figure 2.3 phase III).

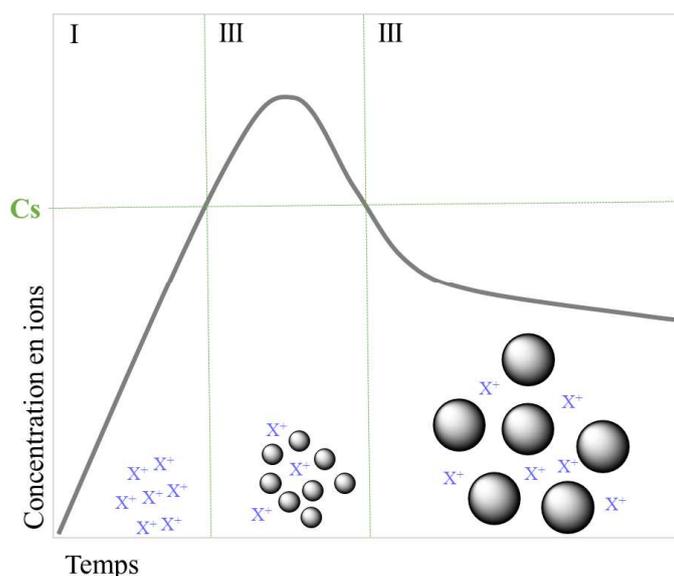
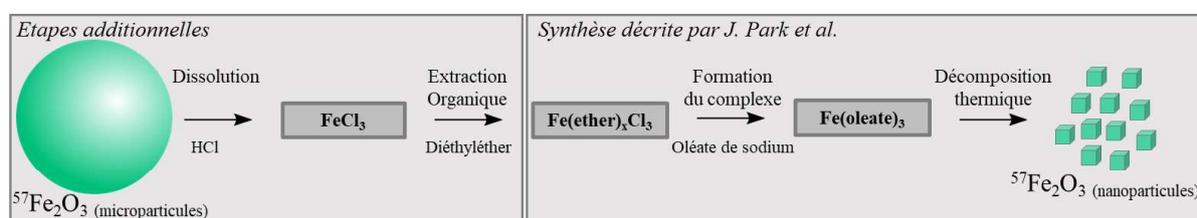


Figure 2.3 : Diagramme de LaMer résumant le mécanisme de formation des nanoparticules. Le complexe précurseur se décompose et forme des ions  $X^+$  (phase I). Au-dessus d'une concentration critique les ions forment des germes, ce qui constitue l'étape de nucléation (phase II). La formation de germes diminue la concentration en ions de la solution jusqu'à la concentration critique. Les germes ne sont plus formés et les ions dans la solution participent au processus de croissance des germes formés durant l'étape de nucléation (phase III).

Différents paramètres permettent de contrôler la taille et la polydispersité des nanoparticules ainsi formées, tels que la température ou le temps de réaction. Dans le protocole proposé par Park *et al.*, un complexe d'oléate de fer ( $\text{Fe}(\text{oléate})_3$ ), synthétisé à partir du chlorure de fer(III) et d'oléate de sodium,

est chauffé dans un solvant organique, l'octadécène en présence d'acide oléique, jusqu'à atteindre une température de 320°C. L'étude mécanistique de la formation des nanoparticules a montré que la nucléation, induite par la dissociation d'un ligand oléate, a lieu entre 200°C et 240°C. Puis la croissance des nanoparticules, initiée par la dissociation des deux autres ligands oléate, se déroule à une température de 300°C. Les nanoparticules sont stabilisées par l'acide oléique ajouté initialement dans le milieu. Un des avantages de ce protocole est qu'il est possible de séparer les processus de nucléation et de croissance par un contrôle de la température, et ainsi de synthétiser des nanoparticules monodisperses de taille contrôlée.

Nous avons ainsi suivi ce protocole pour la synthèse de nanoparticules marquées avec l'isotope  $^{57}\text{Fe}$ . Cependant, ni le complexe oléate de fer, ni le chlorure de fer (III), nécessaires à la synthèse de ce dernier, marqués avec le  $^{57}\text{Fe}$  ne sont disponibles dans le commerce. Le précurseur utilisé a été l'oxyde de fer  $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$  sous forme de microparticules. Ainsi la difficulté a été d'ajouter des étapes de dissolution et d'extraction organique en amont,<sup>33</sup> afin de former le chlorure de fer marqué à partir du précurseur marqué tout en minimisant les contaminations en fer de compositions isotopique naturelle liées à l'ubiquité du fer dans l'environnement de la salle de chimie. Dans un premier temps le précurseur  $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$  est digéré dans de l'acide chlorhydrique concentré. Le fer dissous est ensuite extrait en milieu organique par extraction liquide-liquide à l'aide d'éther diéthylique. Après séchage de la solution, le complexe  $\text{Fe}(\text{oléate})_3$  est synthétisé à l'aide d'oléate de sodium. Les différentes étapes de la synthèse des nanoparticules sont présentées dans la [Figure 2.4](#).



**Figure 2.4 :** Synthèse de nanoparticules marquées avec l'isotope  $^{57}\text{Fe}$  à partir de l'oxyde de fer microparticulaire  $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Les microparticules sont dissoutes dans l'acide chlorhydrique afin de former le chlorure de fer. Après extraction organique la formation du complexe fer-oléate est réalisé en présence d'oléate de sodium. Puis la décomposition thermique de ce complexe induit la formation de l'oxyde de fer nanoparticulaire  $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$ .

### 2.3.2 Enrobage des NPOFs

Afin d'avoir une dispersion en taille des NPOFs satisfaisante, nous avons suivi le protocole de synthèse par décomposition thermique, proposé par Park *et al.*. Cependant cette synthèse est réalisée en solvant organique et les NPOFs synthétisées sont stabilisées par des chaînes aliphatiques, en particulier par des molécules d'acide oléique, et sont totalement insolubles dans l'eau et donc dans un milieu biologique aqueux. Afin de pouvoir les transférer en milieu aqueux, il est nécessaire de modifier leur surface chimiquement et de les rendre hydrophiles. Une première stratégie consiste à construire un

enrobage hydrophile autour de la couche de ligands aliphatiques native en utilisant des polymères amphiphiles (Figure 2.5, stratégie 1). Les brins hydrophobes du polymère amphiphile s'intercalent entre les chaînes aliphatiques tandis que leurs blocs hydrophiles sont exposés vers la solution.<sup>34</sup> Cette stratégie a l'avantage de s'adapter à toutes les natures de cœur inorganique et de préserver les propriétés de celui-ci. Néanmoins, cet enrobage a tendance à augmenter drastiquement la taille en solution des nano-objets. Une autre stratégie consiste à substituer les ligands aliphatiques par des ligands hydrophiles ayant une bonne affinité pour le fer (Figure 2.5, stratégie 2). Ceci permet de fonctionnaliser les NPOFs au plus près du cœur inorganique et ainsi de maintenir leurs tailles les plus faibles possible en solution. Cependant, l'affinité entre les métaux de surface et les ligands ne suffit pas à maintenir les ligands de manière irréversible en présence d'un réservoir de ligands compétiteurs important, comme c'est le cas dans un milieu biologique. Les ligands de surface se désorbent, ce qui occasionne généralement une perte de stabilité colloïdale ou une détérioration des propriétés physiques du cœur inorganique.

Nous avons retenu une stratégie intermédiaire entre ces deux approches, mise au point par l'équipe de Mattoussi.<sup>35</sup> Elle implique la synthèse d'un copolymère à blocs présentant d'une part un motif de répétition capable de chélater avec une forte affinité les atomes de fer de surface, et d'autre part des brins latéraux de PEG conférant aux NPOFs une bonne hydrophilie (Figure 2.5, stratégie 3). La dopamine a été retenue comme bloc chélatant car elle comporte un motif catéchol, connu pour présenter une forte affinité pour les atomes de fer. La présence de multiples unités dopamine sur un même brin squelette du polymère amphiphile augmente la stabilité de l'enrobage sur la surface par un effet « chélate » macromoléculaire d'origine thermodynamique. Grâce à ce design de polymère d'enrobage, Mattoussi et son équipe ont réussi à obtenir des NPOFs stables sur une très large gamme de pH. Le polymère utilisé pour enrober les NPOFs est constitué d'une chaîne principale PIMA (anhydride poly(isobutylène-*alt*-maléique)) sur laquelle sont greffés des dopamines, constituant le point d'ancrage sur les NPOFs, et des dérivés du PEG. Les dérivés du PEG greffés sont soit monofonctionnel, ils présentent un groupement amine permettant leur greffage sur le PIMA et un groupement méthoxy en bout de chaîne, soit bifonctionnels (PEG-NH<sub>2</sub>). Ces derniers possèdent deux groupements amines situés chacun aux extrémités de la chaîne PEG permettant d'une part le greffage sur la chaîne PIMA *via* les amines et d'autre part la fonctionnalisation ultérieure de ceux-ci (Figure 2.5, B). Cette fonctionnalité sera exploitée dans le chapitre suivant.

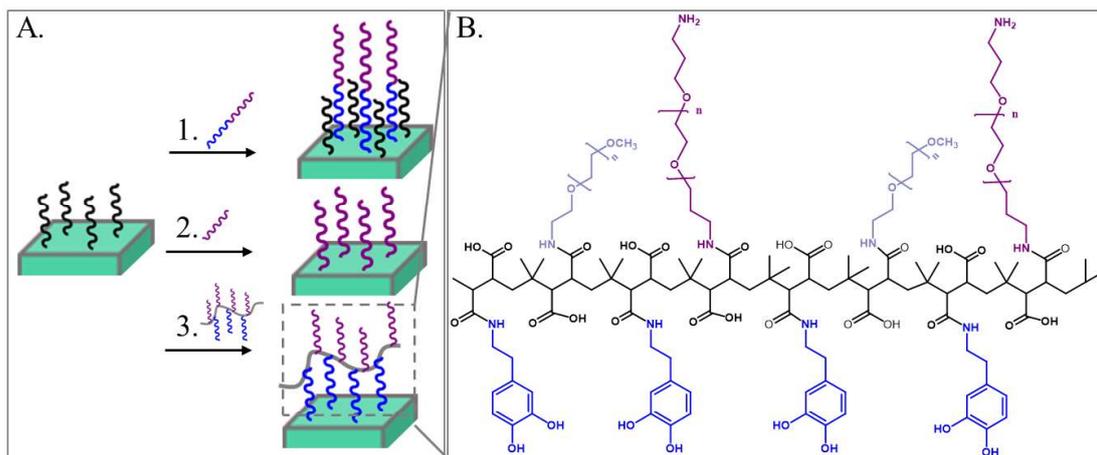


Figure 2.5 : Les différentes stratégies d'enrobage des NPOFs (A). La stratégie 3 a été retenue pour l'enrobage des NPOFs avec le polymère Dopa-PIMA-PEG. La structure de celui-ci est constitué d'une chaîne PIMA (noir) sur laquelle sont greffés des motifs dopamine (bleu) et des PEG monofonctionnels (gris) et biofonctionnels (violet) (B).

## 2.4 Conclusion

Pour suivre le cœur inorganique nous avons décidé de réaliser un enrichissement des NPOFs avec le  $^{57}\text{Fe}$ . Celui-ci détecté par HR-ICP-MS peut être différencié du fer endogène par les équations présentées dans la section précédente. Afin de pouvoir disperser les NPOFs enrichies en  $^{57}\text{Fe}$ , notées  $^{57}\text{NPOFs}$ , dans des milieux aqueux, nous avons choisi de les enrober avec un polymère biocompatible, le Dopa-PIMA-PEG. Dans la section suivante, nous aborderons la stratégie développée pour marquer cet enrobage afin de le détecter et le suivre dans des milieux biologiques complexes.

## 3. Marquage de l'enrobage

### 3.1.1 Stratégie du double marquage par des complexes de lanthanides

La nature de l'enrobage est un facteur déterminant la stabilité des nanoparticules, leurs interactions avec les protéines endogènes et *a fortiori* leur biodistribution. Nous avons choisi d'enrober les  $^{57}\text{NPOFs}$  avec le polymère Dopa-PIMA-PEG. Sa structure est rappelée dans la Figure 3.1. L'avantage de ce polymère est qu'il possède des amines primaires en surface, pouvant être fonctionnalisées. Aussi, le polymère sera marqué *via* ces amines primaires.

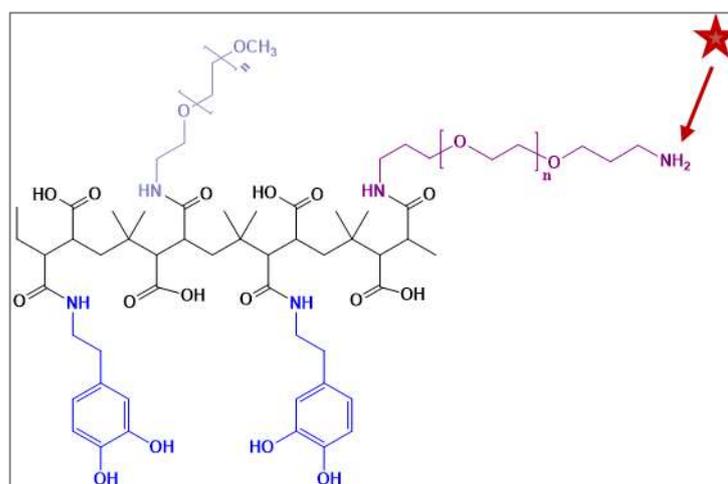


Figure 3.1 : Structure du polymère Dopa-PIMA-PEG utilisé pour l'enrobage des  $^{57}\text{NPOFs}$ . Celui-ci possède des amines primaires en bout de chaîne sur lesquelles seront greffées les traceurs du polymère (étoile rouge).

Afin de déterminer le choix du traceur de l'enrobage des NPOFs, nous avons précisé un cahier des charges auquel celui-ci doit répondre. Il ne doit pas présenter de toxicité aigüe après injection *in vivo*. Pour une détection efficace dans des matrices biologiques complexes, celui-ci doit avoir une abondance endogène négligeable. Enfin, il doit pouvoir réagir avec des amines primaires afin de se lier efficacement et durablement au Dopa-PIMA-PEG. La stratégie choisie a été de marquer l'enrobage avec des complexes de lanthanides. En effet, la concentration endogène en ces éléments est négligeable voire nulle et ils sont d'ores et déjà utilisés pour de nombreuses applications en nanomédecine et en particulier pour l'imagerie.<sup>36</sup> On pourra notamment citer le gadolinium (Gd) déjà approuvé en clinique en tant qu'agent de contraste. A titre d'exemple les médicaments Gadovist et Dotarem, solutions injectables de complexes de gadolinium, ont obtenu une autorisation de mise sur le marché en 2000 et 1989, respectivement. L'enjeu est désormais de trouver des molécules adéquates permettant un couplage stable avec les amines primaires du polymère. L'entreprise Macrocylics propose des complexes de lanthanides Lt-p-SCN-Bn-DOTA qui répondent au cahier des charges susmentionné. Les lanthanides sont complexés à un ligand polydentate de type cyclène et sont fonctionnalisés avec un isothiocyanate

qui peut réagir avec une amine primaire. La réaction de marquage du polymère avec le complexe de lanthanide, noté CPX-Lt est présenté dans la Figure 3.2.

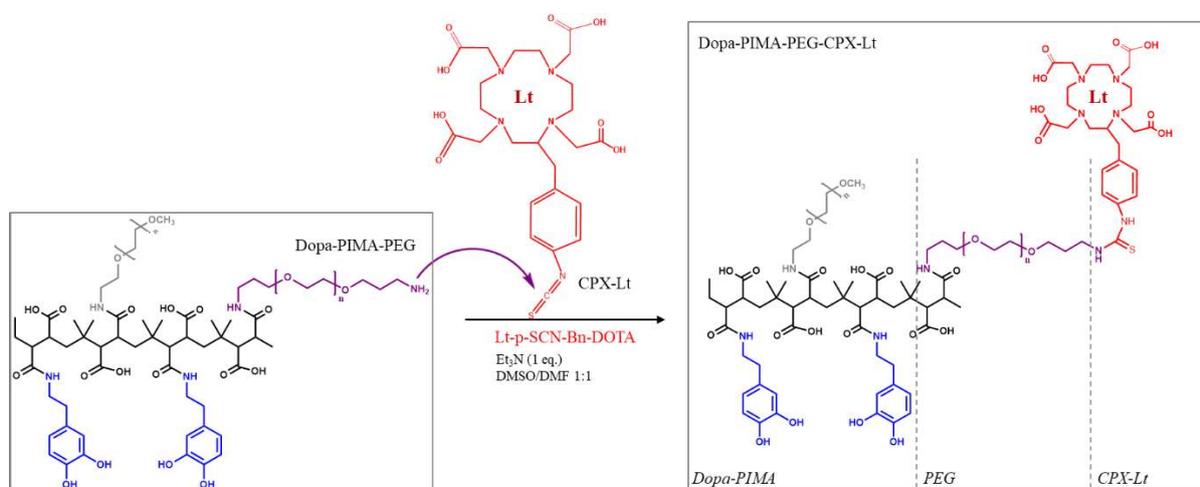
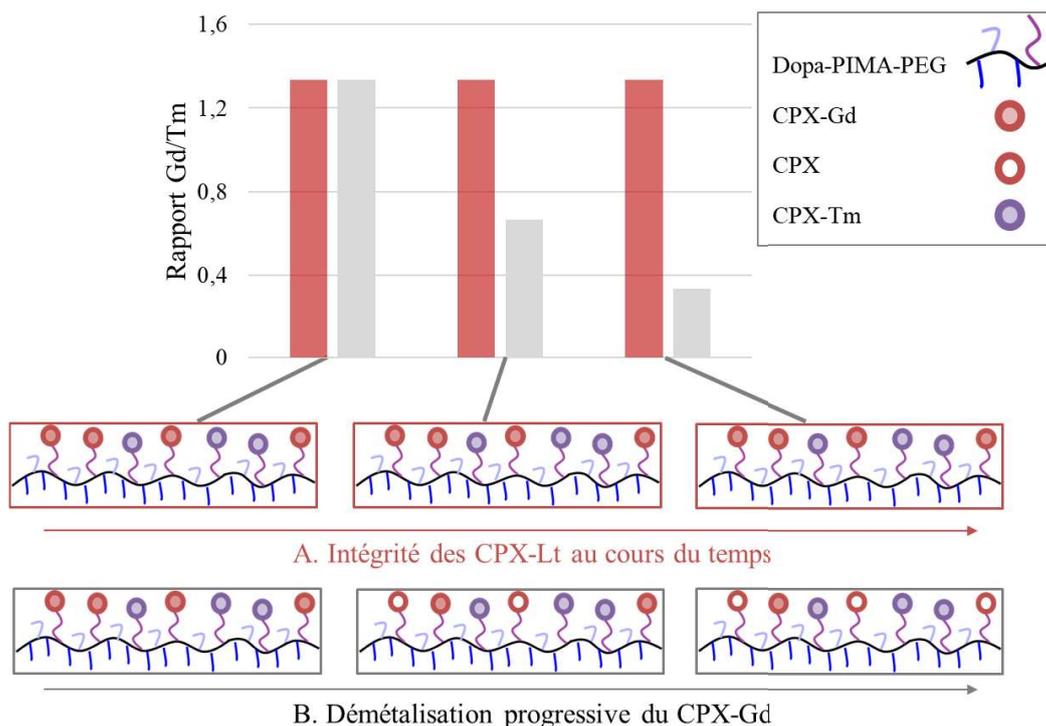


Figure 3.2 : Marquage du polymère Dopa-PIMA-PEG avec le complexe de lanthanide Lt-p-SCN-Bn-DOTA.<sup>37</sup>

Bien que ces ligands, analogues aux éthers couronnes, sont définis par une constante de dissociation faible, la présence d'un réservoir de ligands variés et en large excès *in vivo* pourrait décoordonner le lanthanide de son complexe. Afin de ne pas attribuer à mauvais escient une disparition du lanthanide à la dégradation du polymère ou au détachement de l'enrobage des NPOFs, il est nécessaire d'avoir un contrôle de l'intégrité du complexe de lanthanide. Aussi un second traceur lanthanide est intégré au polymère. Nous avons choisi d'utiliser des complexes de gadolinium (Gd) et de thulium (Tm) pour suivre l'enrobage des <sup>57</sup>NPOFs. Les deux lanthanides n'ayant pas exactement la même réactivité, ils n'interagissent pas de la même manière et avec la même affinité avec le réservoir de ligands endogènes. En suivant le rapport du signal issu des deux lanthanides, soit le rapport Gd/Tm, il est ainsi possible de suivre l'intégrité du marquage du polymère. Si ce rapport devait changer au cours du temps, cela indiquerait très certainement une décooordination d'un des lanthanides. Au contraire, si le rapport reste constant, le couplage entre les lanthanides et le polymère reste stable. La Figure 3.3 présente l'évolution du rapport Gd/Tm dans le cas des deux scénarii évoqués ci-dessus.



### 3.1.2 Méthodes

Nous avons choisi de coupler les complexes de lanthanides sur le polymère avant de le greffer sur les  $^{57}\text{NPOFs}$ . En effet, le greffage de ceux-ci en amont permet d'optimiser son homogénéité. Dans le scénario inverse, où les lanthanides seraient greffés sur le polymère enrobant au préalable les  $^{57}\text{NPOFs}$ , la présence de potentiels agrégats de  $^{57}\text{NPOFs}$  pourraient favoriser le greffage sur une seule partie des  $^{57}\text{NPOFs}$ . Ainsi, le polymère a d'abord été fonctionnalisé, puis greffé aux  $^{57}\text{NPOFs}$  (Figure 3.4).

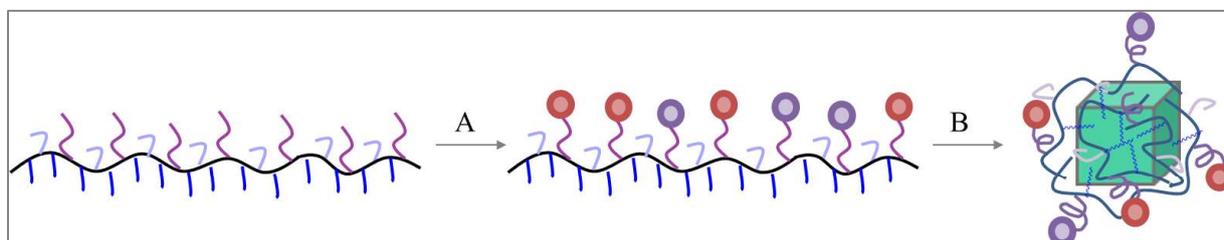


Figure 3.4 : Schéma de synthèse des  $^{57}\text{NPOFs}$  enrobées par du polymère Dopa-PIMA-PEG marqué avec les complexes de lanthanide. Après synthèse du polymère Dopa-PIMA-PEG, les complexes de lanthanides y sont greffés. (A). Après le double marquage il est mis en présence des  $^{57}\text{NPOFs}$  (B).

Les  $^{57}\text{NPOFs}$  enrobées du polymère Dopa-PIMA-PEG marqué avec les complexes de lanthanides seront notées  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ .

## 4. Conclusion

Après injection intraveineuse de NPOFs enrobées, plusieurs questions se posent : quelle est leur biodistribution ? Comment sont-elles dégradées ou autrement dit, quelles sont les entités libérées suite à leur dégradation ? Quelles sont alors les dynamiques de circulation temporelles et spatiales des produits issus de la dégradation ? Pour répondre à ces questions, la stratégie envisagée a été d'enrichir le cœur inorganique des NPOFs avec du  $^{57}\text{Fe}$  et de marquer leur enrobage avec des lanthanides (Figure 4.1).

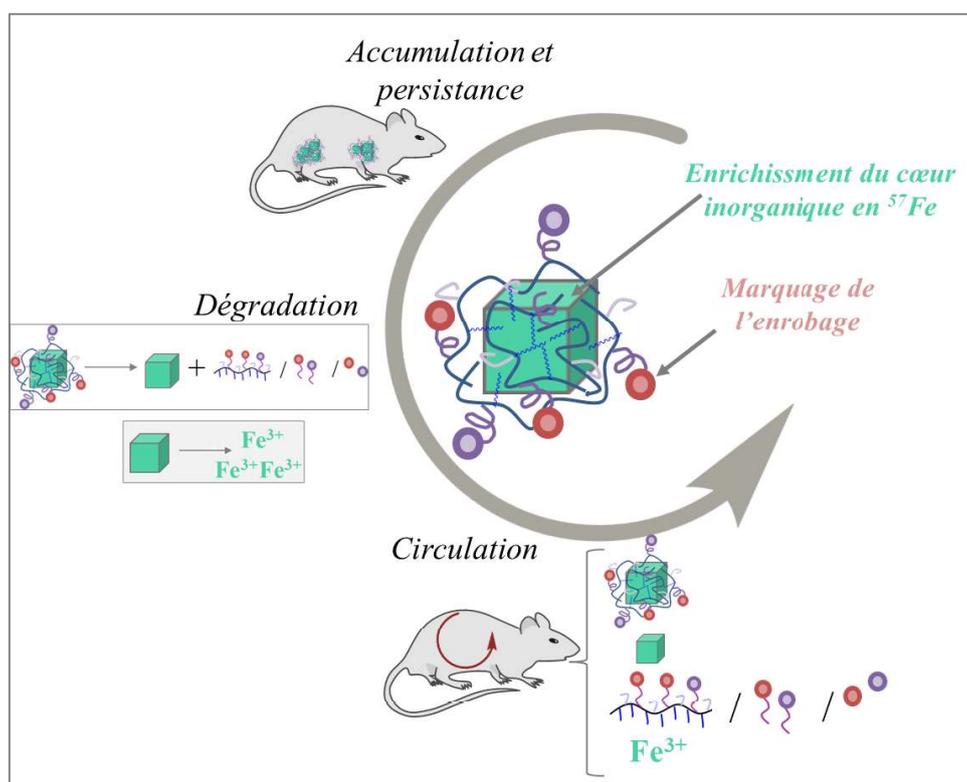
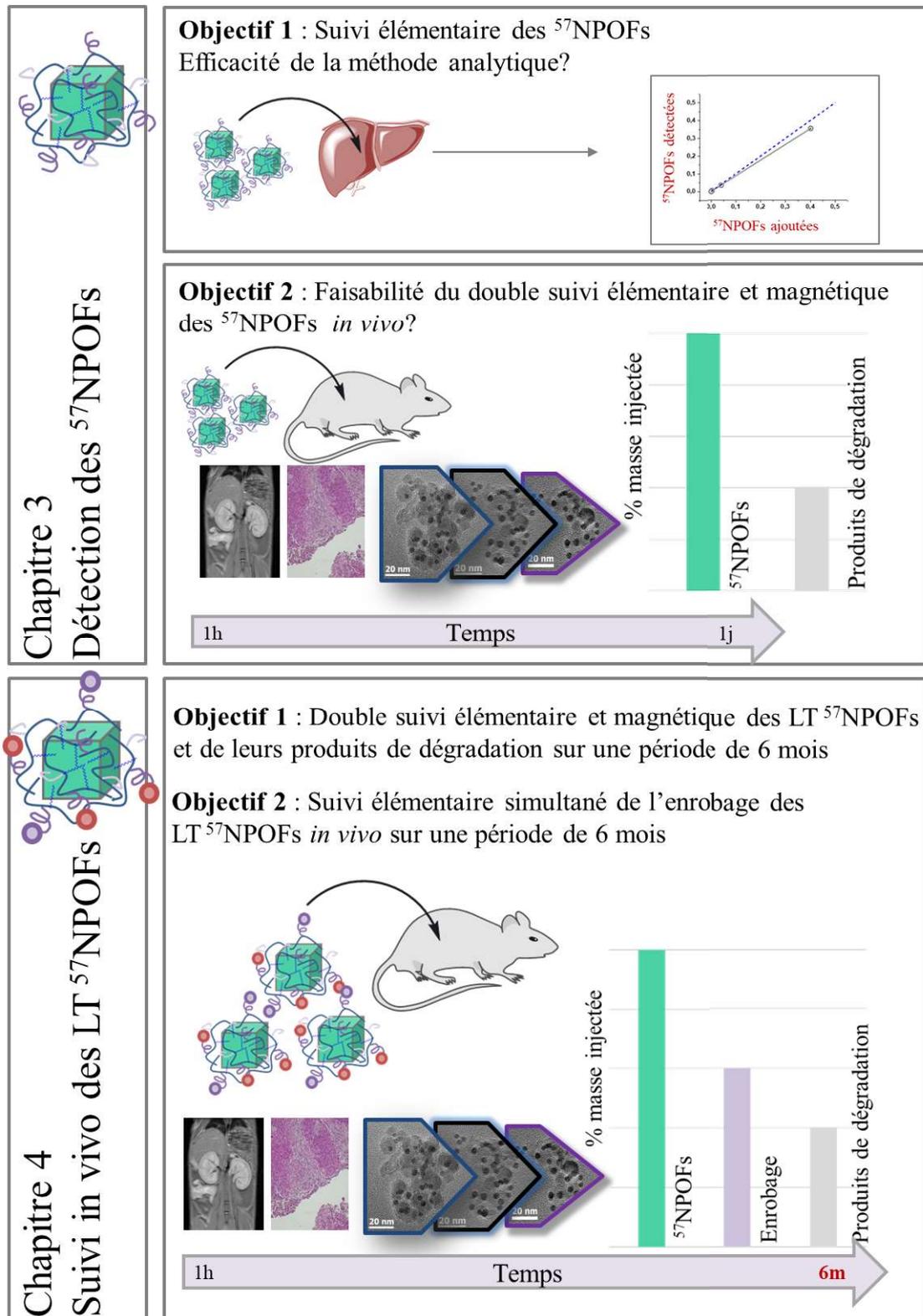


Figure 4.1 : Etude du devenir des NPOFs dans l'organisme après injection intraveineuse. Le marquage du cœur inorganique (vert) et de l'enrobage (cercle rouge) permet de suivre leur accumulation et leur persistance, et également de caractériser leur dégradation ainsi que les dynamiques temporelles et spatiales des produits issus de la dégradation.

Dans le chapitre 3 nous évaluerons l'efficacité de la méthodologie d'enrichissement au  $^{57}\text{Fe}$  développée pour suivre le cœur inorganique des NPOFs. Dans un premier temps, les capacités de détection et de quantification des  $^{57}\text{NPOFs}$  en HR-ICP-MS seront évaluées dans des matrices biologiques complexes modèles appelées matrices de validation. Après avoir validé la méthode analytique dans ces matrices, nous la transposerons à l'étude du devenir des  $^{57}\text{NPOFs}$  *in vivo* à travers une étude pilote constituée d'un nombre réduit de souris. En outre, en combinant cette méthode analytique à des mesures magnétiques, nous évaluerons l'efficacité du double suivi *in vivo* afin de caractériser les  $^{57}\text{NPOFs}$  et leurs produits de dégradation (Figure 4.2).

Le chapitre 4 est dédié au suivi du devenir du cœur inorganique et de l'enrobage des  $LT^{57}NPOFs$  *in vivo* sur une période de six mois. L'objectif de ce chapitre est d'évaluer les dynamiques de circulation spatiales et temporelles des  $LT^{57}NPOFs$ , de leurs produits de dégradation et de l'enrobage (Figure 4.2).





1. Sakulkhu, U., Mahmoudi, M., Maurizi, L., Salaklang, J. & Hofmann, H. Protein Corona Composition of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Various Physico-Chemical Properties and Coatings. *Sci. Rep.* **4**, 5020 (2014).
2. Sacchetti, C. *et al.* Surface Polyethylene Glycol Conformation Influences the Protein Corona of Polyethylene Glycol-Modified Single-Walled Carbon Nanotubes: Potential Implications on Biological Performance. *ACS Nano* **7**, 1974–1989 (2013).
3. Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 428–437 (2009).
4. Karmali, P. P. & Simberg, D. Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **8**, 343–357 (2011).
5. Walkey, C. D. & Chan, W. C. W. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2780–2799 (2012).
6. Lynch, I. & Dawson, K. A. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* **3**, 40–47 (2008).
7. Lynch, I., Salvati, A. & Dawson, K. A. Protein-nanoparticle interactions: What does the cell see? *Nat. Nanotechnol.* **4**, 546–547 (2009).
8. Walczyk, D., Bombelli, F. B., Monopoli, M. P., Lynch, I. & Dawson, K. A. What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 5761–5768 (2010).
9. Bertoli, F. *et al.* Magnetic Nanoparticles to Recover Cellular Organelles and Study the Time Resolved Nanoparticle-Cell Interactome throughout Uptake. *Small* **10**, 3307–3315 (2014).
10. Lundqvist, M. *et al.* The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study. *ACS Nano* **5**, 7503–7509 (2011).
11. Wang, F. *et al.* The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **9**, 1159–1168 (2013).
12. Bargheer, D. *et al.* The fate of a designed protein corona on nanoparticles in vitro and in vivo. *Beilstein J. Nanotechnol.* **6**, 36–46 (2015).
13. Lartigue, L. *et al.* Nanomagnetic Sensing of Blood Plasma Protein Interactions with Iron Oxide Nanoparticles: Impact on Macrophage Uptake. *ACS Nano* **6**, 2665–2678 (2012).
14. Feliu, N. *et al.* In vivo degeneration and the fate of inorganic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 2440–2457 (2016).
15. Sée, V. *et al.* Cathepsin L Digestion of Nanobioconjugates upon Endocytosis. *ACS Nano* **3**, 2461–2468 (2009).
16. Lunov, O. *et al.* Lysosomal degradation of the carboxydextran shell of coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and the fate of professional phagocytes. *Biomaterials* **31**, 9015–9022 (2010).

17. Wang, H. *et al.* Integrity of (111)In-radiolabeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the mouse. *Nucl. Med. Biol.* **42**, 65–70 (2015).
18. Freund, B. *et al.* A Simple and Widely Applicable Method to <sup>59</sup>Fe-Radiolabel Monodisperse Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for *In Vivo* Quantification Studies. *ACS Nano* **6**, 7318–7325 (2012).
19. Kreyling, W. G. *et al.* In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 619–623 (2015).
20. *Design and Applications of Nanoparticles in Biomedical Imaging* | J W M Bulte | Springer.
21. Soenen, S. J., Parak, W. J., Rejman, J. & Manshian, B. (Intra)Cellular Stability of Inorganic Nanoparticles: Effects on Cytotoxicity, Particle Functionality, and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **115**, 2109–2135 (2015).
22. Bargheer, D. *et al.* The distribution and degradation of radiolabeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles and quantum dots in mice. *Beilstein J. Nanotechnol.* **6**, 111–123 (2015).
23. Weissleder, R. *et al.* Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am. J. Roentgenol.* **152**, 167–173 (1989).
24. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* The One Year Fate of Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles in Mice. *ACS Nano* **9**, 7925–7939 (2015).
25. Levy, M. *et al.* Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 3988–3999 (2011).
26. Les nouveaux isotopes dans les sciences de l'eau - L'Actualité Chimique. Available at: <https://www.lactualitechimique.org/Les-nouveaux-isotopes-dans-les-sciences-de-l-eau>. (Accessed: 8th January 2018)
27. Yin, N.-H., van Hullebusch, E. D., Benedetti, M., Lens, P. N. L. & Sivry, Y. Zn isotopes fractionation during slags' weathering: One source of contamination, multiple isotopic signatures. *Chemosphere* **195**, 483–490 (2018).
28. Le devenir de l'azote dans les litières forestières : étude par marquage isotopique - L'Actualité Chimique. Available at: <http://www.lactualitechimique.org/Le-devenir-de-l-azote-dans-les-litieres-forestieres-Etude-par-marquage-isotopique>. (Accessed: 8th January 2018)
29. Larner, F. *et al.* Tracing Bioavailability of ZnO Nanoparticles Using Stable Isotope Labeling. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 12137–12145 (2012).
30. Bourgeault, A. *et al.* The Challenge of Studying TiO<sub>2</sub> Nanoparticle Bioaccumulation at Environmental Concentrations: Crucial Use of a Stable Isotope Tracer. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 2451–2459 (2015).
31. Park, J. *et al.* Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat. Mater.* **3**, 891–895 (2004).
32. LaMer, V. K. & Dinegar, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 4847–4854 (1950).

33. Dodson, R. W., Forney, G. J. & Swift, E. H. The Extraction of Ferric Chloride from Hydrochloric Acid Solutions by Isopropyl Ether. *J. Am. Chem. Soc.* **58**, 2573–2577 (1936).
34. Lartigue, L. *et al.* Biodegradation of Iron Oxide Nanocubes: High-Resolution In Situ Monitoring. *ACS Nano* **7**, 3939–3952 (2013).
35. Wang, W. *et al.* Design of a Multi-Dopamine-Modified Polymer Ligand Optimally Suited for Interfacing Magnetic Nanoparticles with Biological Systems. *Langmuir* **30**, 6197–6208 (2014).
36. Zhang, Y., Wei, W., Das, G. K. & Yang Tan, T. T. Engineering lanthanide-based materials for nanomedicine. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **20**, 71–96 (2014).
37. <https://www.macrocyclics.com> (Accessed: 28th March 2018).



# Chapitre 3 : Détection des $^{57}\text{NPOFs}$

---

## Table des matières

---

- 1. Synthèse des nanoparticules marquées avec l'isotope  $^{57}\text{Fe}$** 
  - 1.1 Taille des NPOFs
  - 1.2 Enrobage des NPOFs
  - 1.3 Composition isotopique
  - 1.4 Propriétés magnétiques
  - 1.5 Conclusion
- 2. Suivi élémentaire des  $^{57}\text{NPOFs}$  – matrices de validation**
  - 2.1 Exemple de la matrice complexe « foie »
  - 2.2 Résultats des matrices de validation
- 3. Détection *in vivo* – Etude pilote**
  - 3.1 Méthodologie
  - 3.2 Biodistribution
  - 3.3 Quantification du fer exogène provenant des  $^{57}\text{NPOFs}$  par HR-ICP-MS
  - 3.4 Dégradation des  $^{57}\text{NPOFs}$
- 4. Conclusion**

Ce chapitre se concentre sur la détection et le suivi des NPOFs enrichie au  $^{57}\text{Fe}$ , les  $^{57}\text{NPOFs}$ . Nous présenterons dans une première partie les résultats de la synthèse des  $^{57}\text{NPOFs}$  ainsi que leurs caractérisations. Dans une deuxième partie nous évaluerons l'efficacité du suivi élémentaire des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans des matrices biologiques modèles, les matrices de validation. Enfin dans une dernière partie nous étudierons la faisabilité du double suivi élémentaire et magnétique des  $^{57}\text{NPOFs}$  *in vivo* à travers une étude pilote sur une période de 24 heures.

# 1. Synthèse des nanoparticules marquées avec l'isotope $^{57}\text{Fe}$

Les  $^{57}\text{NPOFs}$  ont été synthétisées selon le protocole présenté dans le chapitre 2. Nous présenterons dans cette partie les différentes caractérisations des  $^{57}\text{NPOFs}$  ainsi synthétisées.

## 1.1 Taille des NPOFs

La disponibilité du précurseur de  $^{57}\text{Fe}$  sous forme d'oxyde de fer micrométrique seulement nous a contraint à rajouter au protocole de Park *et al.* des étapes supplémentaires non rapportées dans la littérature auparavant. Le coût de ces précurseurs isotopiquement enrichis ne permettant pas des essais multiples, nous avons dans un premier temps optimisé les paramètres de synthèse en utilisant un précurseur d'oxydes de fer microparticulaires d'abondance isotopique naturelle (et donc bien meilleur marché). La Figure 1.1 donne les distributions en taille de deux synthèses typiques à partir du précurseur non marqué, réalisées à partir de l'analyse des clichés de MET à l'aide du logiciel Image J.

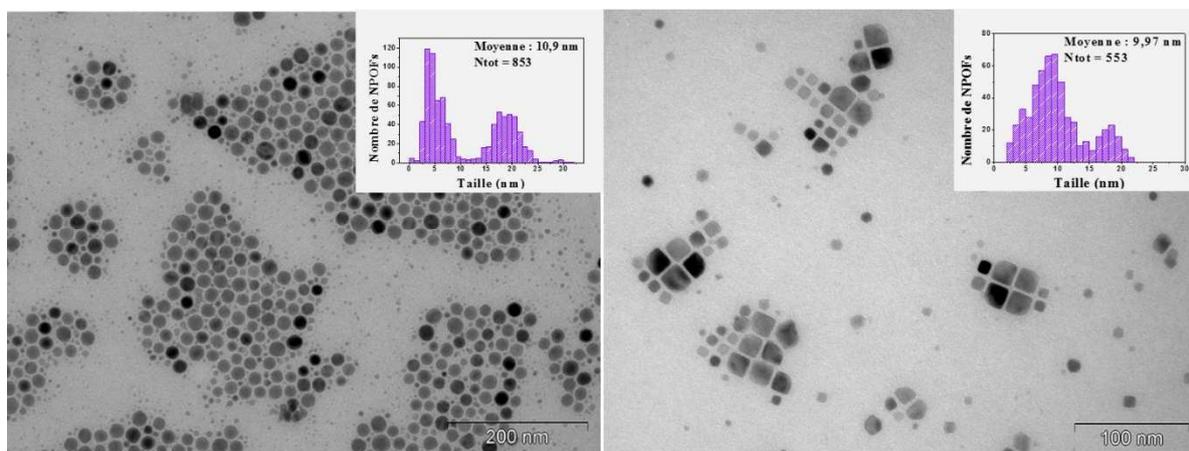


Figure 1.1 : Image de MET pour deux synthèses de NPOFs avec le précurseur non marqué

Sur la Figure 1.1, on observe deux distributions en taille autour de 5 nm et de 20 nm pour les deux synthèses. On constate également la présence de deux formes de nanoparticules : des NPOFs sphériques (Figure 1.1 (gauche)) et cubiques (Figure 1.1 (droite)). Les deux distributions en tailles sont probablement dues à la présence de contaminations induites par la verrerie et la sonde de température. En effet, la présence d'entités ferriques additionnelles peut induire une germination ou une croissance de nanoparticules précoce, ce qui pourrait être à l'origine d'une distribution bimodale. L'obtention de populations bimodales de NPOFs ainsi que de formes différentes d'une synthèse à l'autre contraste avec la monodispersité des nanocristaux observée jusqu'à l'échelle du gramme par Park *et al.*. Néanmoins, nous avons observé des déviations dans le déroulement de la synthèse qui pourraient être à l'origine des différences de qualité des nanocristaux que nous avons pu constater. D'après le protocole de Park *et al.*, la vitesse de montée en température et la température de nucléation et croissance sont des facteurs déterminants sur la taille et la forme des particules.<sup>37</sup> Or notre montage (chauffe-ballon couplé à un

contrôleur de puissance lui-même asservi à une sonde de température) ne nous a pas permis de respecter le gradient de température de 3,3°C/min recommandé dans le protocole original. Toujours d'après ce protocole, une réaction sévère est observée lorsque la température de la solution atteint 320°C et la solution doit être maintenue à cette température pendant trente minutes. Or d'une part cette réaction n'est pas toujours observée et d'autre part elle a lieu sur une échelle de temps variable, à plus ou moins dix minutes. Ainsi, le contrôle médiocre exercé sur les rampes de montée en température et les durées des paliers de températures appliquées occasionnent des variations importantes de temps de chauffe total, qui est donc susceptible d'avoir considérablement dévié par rapport au protocole décrit par Park *et al.*. La vitesse de chauffage non constante et la variabilité du temps de chauffage des nanoparticules pourraient être à l'origine des variations observées. Cependant, lors de la synthèse, on observe systématiquement une baisse de température de la solution entre 300°C et 320°C, correspondant à la dissociation de deux des ligands oléate du complexe. Celle-ci caractérisant le début de la croissance des nanoparticules, nous avons décidé de prendre ce phénomène comme point de référence à partir duquel la solution est chauffée pendant trente minutes. Après optimisation de ces paramètres, les nanoparticules obtenues sont de forme cubique et présentent une distribution en taille autour de 10 nm (Figure 1.1).

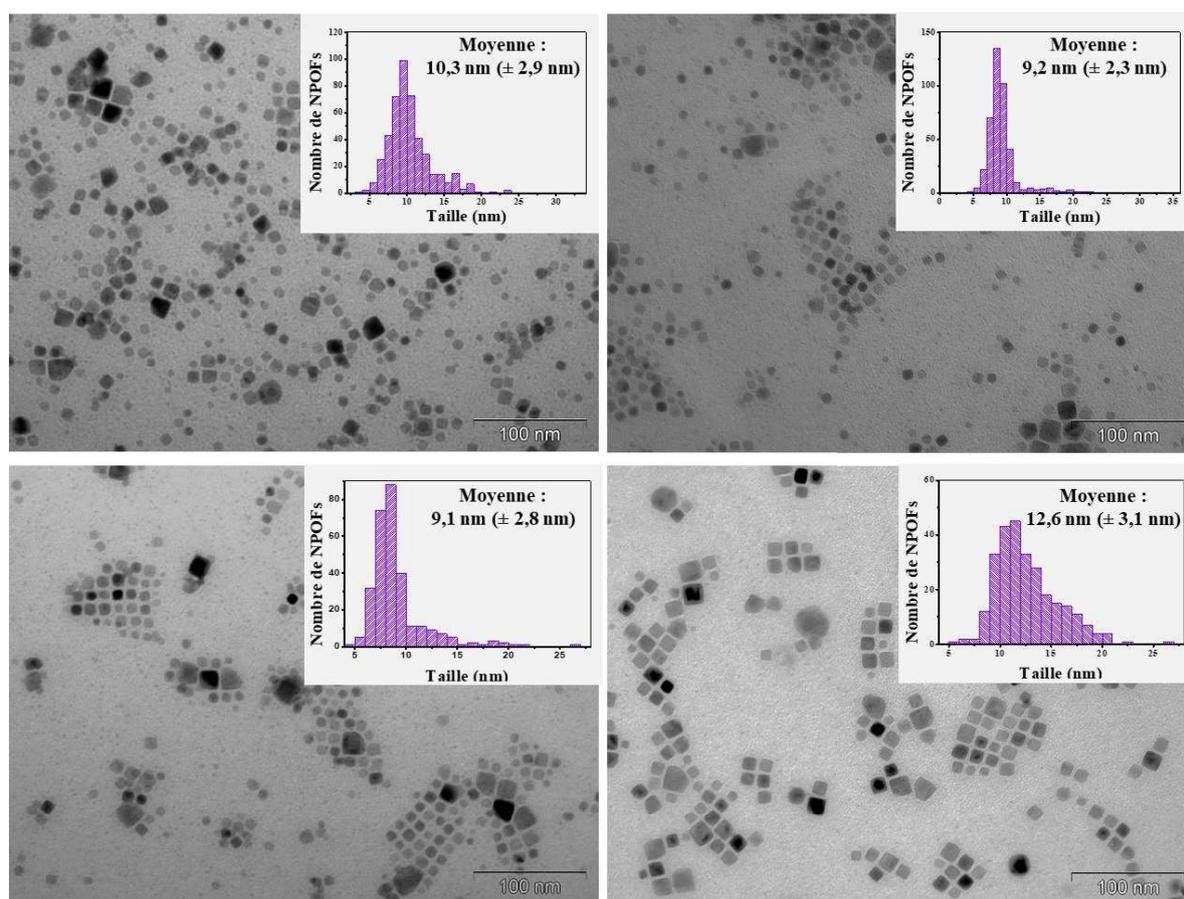


Figure 1.2 : Images de MET et distribution en taille de quatre synthèses de NPOFs à partir du précurseur d'oxyde de fer non marqué.

La synthèse des  $^{57}\text{NPOFs}$  à partir du précurseur isotopiquement marqué  $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$  a été réalisée dans des conditions similaires aux synthèses présentées dans Figure 1.2 en utilisant de la verrerie ainsi qu'une sonde de température neuves afin d'éviter toutes contaminations et d'optimiser la polydispersité de l'échantillon. Les nanoparticules ainsi synthétisées ont une forme cubique d'une taille égale à  $9,4 \text{ nm} (\pm 2,6 \text{ nm})$  (Figure 1.3).

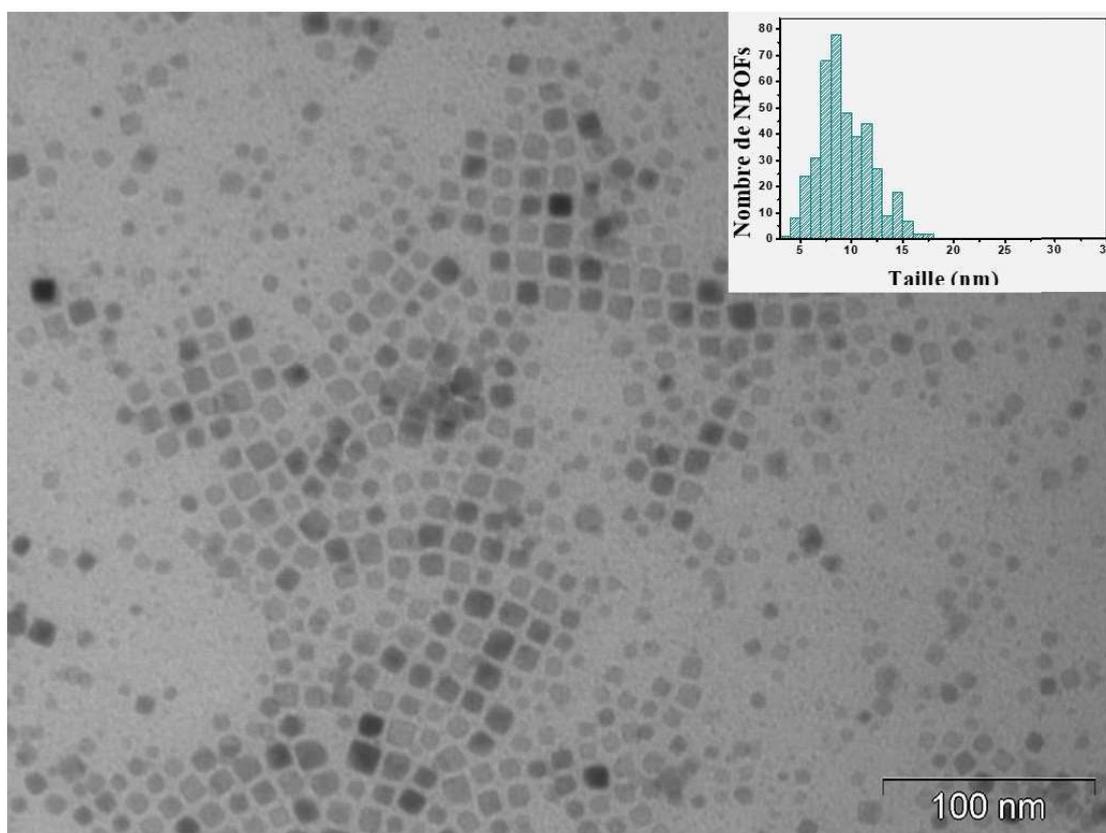


Figure 1.3 : Image de MET et distribution en taille des  $^{57}\text{NPOFs}$  synthétisées avec le précurseur marqué  $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$ .

Les nanoparticules synthétisées en phase organique sont ensuite enrobées par un polymère amphiphile et transférées en phase aqueuse, dans du sérum physiologique, milieu classique d'injection *in vivo*.

## 1.2 Enrobage des NPOFs

### 1.2.1 Caractérisation du polymère par spectroscopie infra-rouge

Comme présenté dans le chapitre précédent, le polymère synthétisé est constitué d'une chaîne principale PIMA sur laquelle sont greffés d'une part des groupements dopamines et d'autre part des dérivés du PEG. La chaîne principale PIMA est constituée d'anhydrides maléiques sur lesquels sont greffés les groupements additionnels aminés *via* la formation d'une liaison amide. Dans un premier temps, la dopamine et le PEG monofonctionnel réagissent avec la chaîne PIMA, puis est ajouté le PEG bifonctionnel, noté PEG-NH<sub>2</sub> (Figure 1.4).

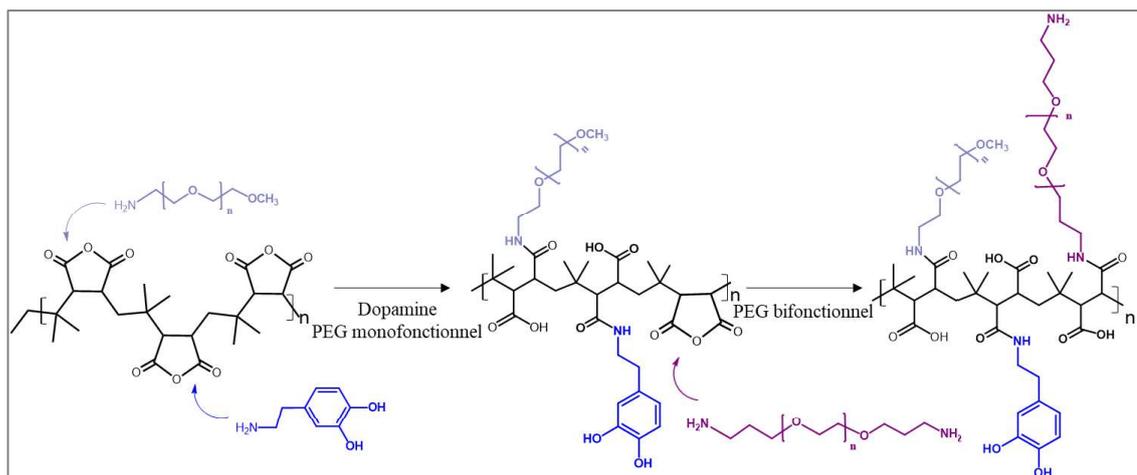


Figure 1.4 : Etapes de synthèse du polymère Dopa-PIMA-PEG.

La formation du polymère Dopa-PIMA-PEG qualifiée par l'ouverture des anhydrides maléiques et la formation de liaisons amides peut être caractérisée par spectroscopie infra-rouge. La Figure 1.5 représente les spectres infra-rouge des réactifs PIMA et PEG-NH<sub>2</sub> et du polymère Dopa-PIMA-PEG synthétisé. La vibration d'élongation de la double liaison C=O des anhydrides maléiques est caractérisée par deux pics à 1766 cm<sup>-1</sup> et 1841 cm<sup>-1</sup>. Sur le spectre correspondant au polymère Dopa-PIMA-PEG, le pic correspondant à la vibration d'élongation de liaisons C=O est observé à 1660 cm<sup>-1</sup>. Cette vibration d'élongation est caractéristique des liaisons C=O d'acides carboxyliques et d'amines. Aussi, ce décalage est caractéristique de l'ouverture des anhydrides maléiques au profit de la formation d'acides carboxyliques et de liaisons amides. On constate également une bande vers 1090 cm<sup>-1</sup> correspondant à la vibration d'élongation de liaisons C-N des amides et C-O des éthers. Ce pic est également présent sur le spectre du PEG-NH<sub>2</sub>, confirmant le greffage de celui-ci sur la chaîne PIMA. On observe enfin la présence d'une bande faible vers 3250 cm<sup>-1</sup> correspondant à la vibration d'élongation des liaisons OH et NH<sub>2</sub> issues des acides carboxyliques et des amines primaires. Cette bande peut aussi témoigner de l'éventuelle hydratation du polymère Dopa-PIMA-PEG. Enfin les pics multiples situés entre 2700 cm<sup>-1</sup> et 3000 cm<sup>-1</sup> correspondent aux vibrations d'élongation des liaisons C-H. L'analyse infra-rouge du polymère montre que les anhydrides maléiques se sont ouverts au profit d'acides carboxyliques et d'amides, caractéristiques de la fonctionnalisation du PIMA par le PEG-NH<sub>2</sub>.

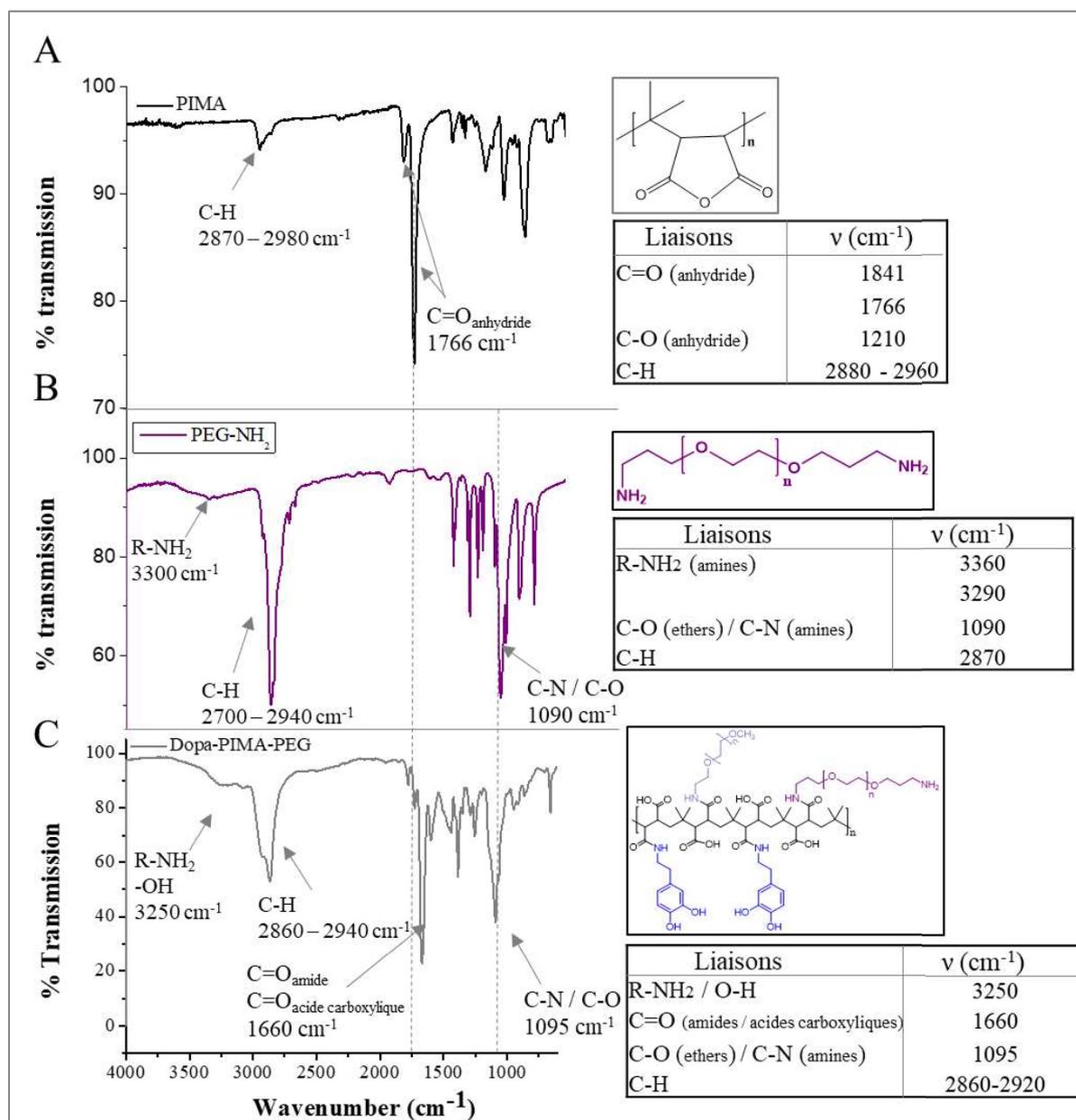


Figure 1.5 : Spectre infra-rouge du PIMA (A), du PEG biofonctionnel (B) et du polymère Dopa-PIMA-PEG synthétisé.

Le polymère Dopa-PIMA-PEG ainsi synthétisé est ensuite mis en présence des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans un solvant organique, le tétrahydrofurane (THF). L'avantage de ce solvant est que le polymère Dopa-PIMA-PEG et les  $^{57}\text{NPOFs}$  (avant et après enrobage par le Dopa-PIMA-PEG) y sont solubles, ce qui augmente l'efficacité et l'homogénéité de la réaction d'échange de ligand. Après réaction pendant une nuit à  $50^\circ\text{C}$ , les  $^{57}\text{NPOFs}$  qui initialement étaient insolubles en milieux aqueux se dispersent dans ceux-ci, témoignant de l'efficacité de la réaction d'échange de ligand. Les  $^{57}\text{NPOFs}$  sont ensuite transférées en phase aqueuse, dans du sérum physiologique, milieux classique d'injection *in vivo*.

## 1.2.2 Taille des $^{57}\text{NPOFs}$ enrobées

Afin d'évaluer la stabilité des nanoparticules dans le sérum physiologique, le diamètre hydrodynamique a été analysé par diffusion dynamique de la lumière (DDL). En comparaison avec la taille inorganique des  $^{57}\text{NPOFs}$  mesurée à partir des images de MET, la mesure du diamètre hydrodynamique considère la taille des  $^{57}\text{NPOFs}$  enrobées du polymère ainsi que la sphère de solvation formée en solution aqueuse. Le graphe représentant le diamètre hydrodynamique en fonction de l'intensité montre la présence de deux pics, l'un à 10,6 nm ( $\pm 2,1$  nm) et l'autre à 68,9 nm ( $\pm 40,7$  nm) caractéristiques des  $^{57}\text{NPOFs}$  individuelles et d'agrégats formés de quelques  $^{57}\text{NPOFs}$ , respectivement (Figure 1.6). Les mesures pour les  $^{57}\text{NPOFs}$  individuelles sont légèrement supérieures à celles obtenues en MET car les couches de polymère et la sphère de solvation sont incluses dans la mesure du diamètre hydrodynamique. L'intensité mesurée en DDL est proportionnelle au diamètre à la puissance six. Ainsi à nombre de particules égal, des particules de plus grand diamètre diffuseront plus efficacement que des particules de plus petits diamètres. La distribution des intensités diffusées en fonction de la taille n'est ainsi pas directement représentative de la distribution en nombre de particules en fonction de la taille : les pics d'intensité correspondant aux plus grands diamètres dominent largement la distribution même si les nanoparticules correspondantes sont largement minoritaires. L'algorithme de Schmoluschowsky permet d'estimer la distribution en nombre des NPs en fonction du diamètre à partir de la distribution d'intensités, en utilisant comme paramètre l'indice optique du matériau constitutif des NPs et celui du solvant.

D'après la Figure 1.6, on observe un seul pic à 8,5 nm ( $\pm 2,6$  nm) correspondant aux  $^{57}\text{NPOFs}$  individuelles. Celles-ci ne sont majoritairement pas sous la forme d'agrégats et sont donc stables dans le sérum physiologique. Néanmoins, le diamètre hydrodynamique calculé en fonction du nombre de  $^{57}\text{NPOFs}$  est inférieur à celui mesuré en fonction de l'intensité. Cette différence s'explique par le calcul utilisant de nombreuses approximations de la distribution en nombre réalisé à partir de la mesure de la distribution en intensité.

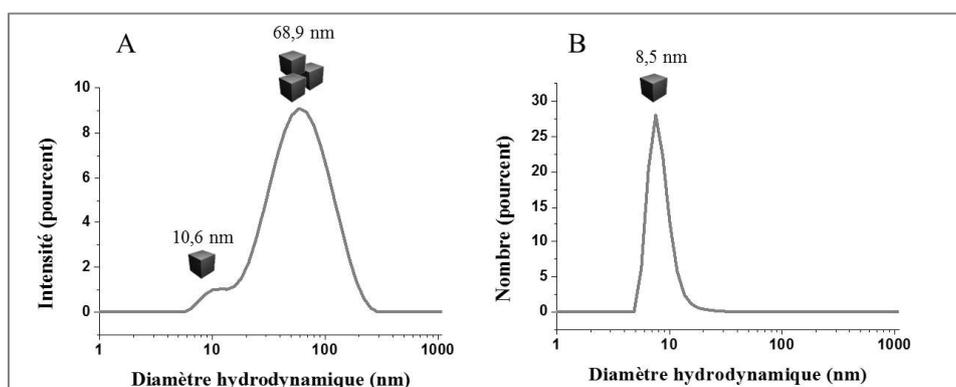


Figure 1.6 : Distribution du diamètre hydrodynamique des  $^{57}\text{NPOFs}$  en intensité (A) et en nombre (B).

En conclusion de cette partie dédiée à la synthèse des  $^{57}\text{NPOFs}$ , le protocole de décomposition thermique décrit par Park *et al.* avec quelques modifications et étapes additionnelles a permis de synthétiser des  $^{57}\text{NPOFs}$  cubiques constituées d'un cœur inorganique de taille égale à 9,4 nm ( $\pm$  2,6 nm) et enrobées d'un polymère amphiphile. Le paragraphe suivant est consacré à l'évaluation de l'efficacité du marquage avec l'isotope  $^{57}\text{Fe}$ .

### 1.3 Composition isotopique

La synthèse des  $^{57}\text{NPOFs}$  a été réalisée à partir d'un précurseur d'oxyde de fer  $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$  enrichi à 95,47 % en  $^{57}\text{Fe}$ . La composition isotopique de la solution de  $^{57}\text{NPOFs}$  synthétisées a été déterminée par HR-ICP-MS et comparée à celle du précurseur commercial et du fond naturel. L'abondance de chaque isotope a été déterminée par le rapport de l'intensité de l'isotope considéré sur la somme des intensités de chaque isotope, calcul présenté dans le chapitre précédent (Figure 1.7).

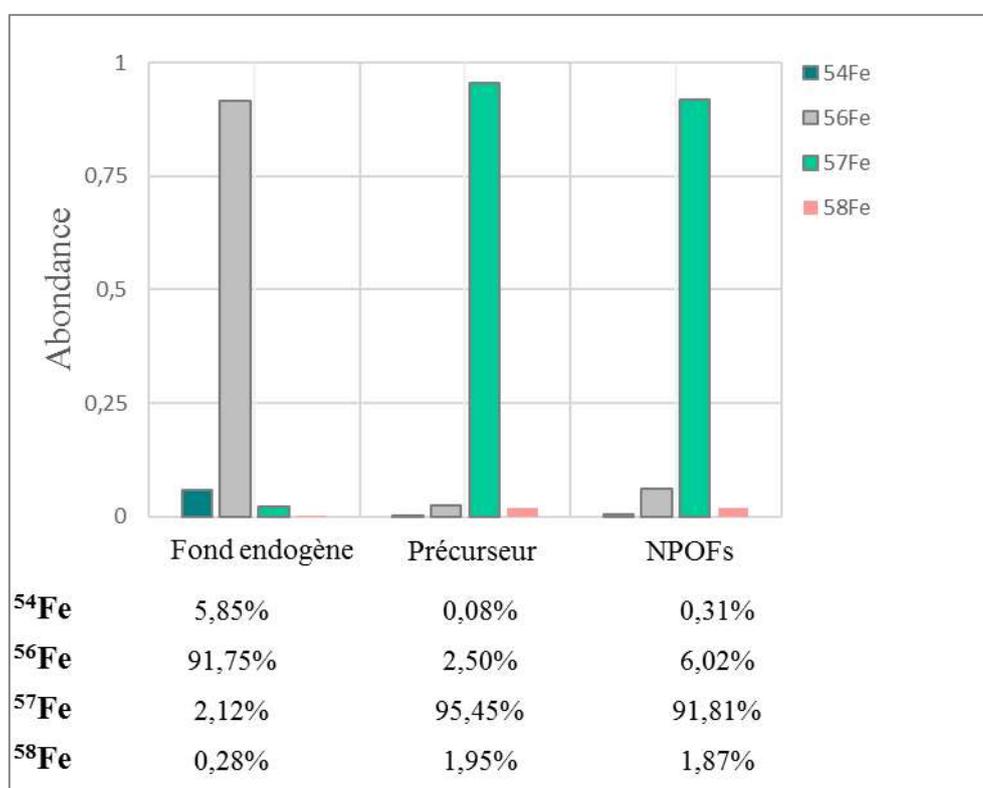


Figure 1.7 : Composition isotopique du fond endogène, du précurseur et des  $^{57}\text{NPOFs}$  pour l'élément fer.

On observe d'une part que l'enrichissement en  $^{57}\text{Fe}$  des  $^{57}\text{NPOFs}$ , d'une valeur de 91,81% est inférieur à celle du précurseur, égale à 95,45%. Cette différence peut s'expliquer par différentes contaminations durant les étapes de synthèse des  $^{57}\text{NPOFs}$ , cette dernière ayant été effectuée sous une hotte classique de chimie et non en salle blanche. Malgré la diminution de l'enrichissement en  $^{57}\text{Fe}$  des  $^{57}\text{NPOFs}$ , on constate que celui-ci est significativement supérieur à l'abondance naturelle en  $^{57}\text{Fe}$ , égale à 2,12%, ce qui confère aux  $^{57}\text{NPOFs}$  synthétisée un fort contraste isotopique par rapport au fond de fer

endogène. La concentration totale en fer de la solution de  $^{57}\text{NPOFs}$  mesurée en HR-ICP-MS est de 0,72  $\mu\text{g/L}$ .

Nous avons ainsi élaboré des  $^{57}\text{NPOFs}$  marquées avec l'isotope  $^{57}\text{Fe}$  pouvant être distinguées du fer endogène dans des matrices biologiques complexes. Ces  $^{57}\text{NPOFs}$  ont été synthétisées pour créer un modèle de biodistribution à long terme de NPOFs ayant une pertinence biomédicale, c'est-à-dire des performances pour le diagnostic ou la thérapeutique. Dans le paragraphe suivant, les propriétés physiques des  $^{57}\text{NPOFs}$  sont évaluées afin d'estimer leur pertinence comme modèles de nanoparticules utilisées en clinique. Le paragraphe suivant est donc consacré à l'étude des propriétés magnétiques des  $^{57}\text{NPOFs}$  et de leur efficacité en tant qu'agent de contraste pour l'IRM.

#### 1.4 Propriétés magnétiques

Les cycles d'aimantation des  $^{57}\text{NPOFs}$  en fonction du champ magnétique appliqué ont été réalisés à différentes températures, 3,9 K, 200 K et 298 K, et pour des champs compris entre -5 T et 5 T (Figure 1.8 (A)).

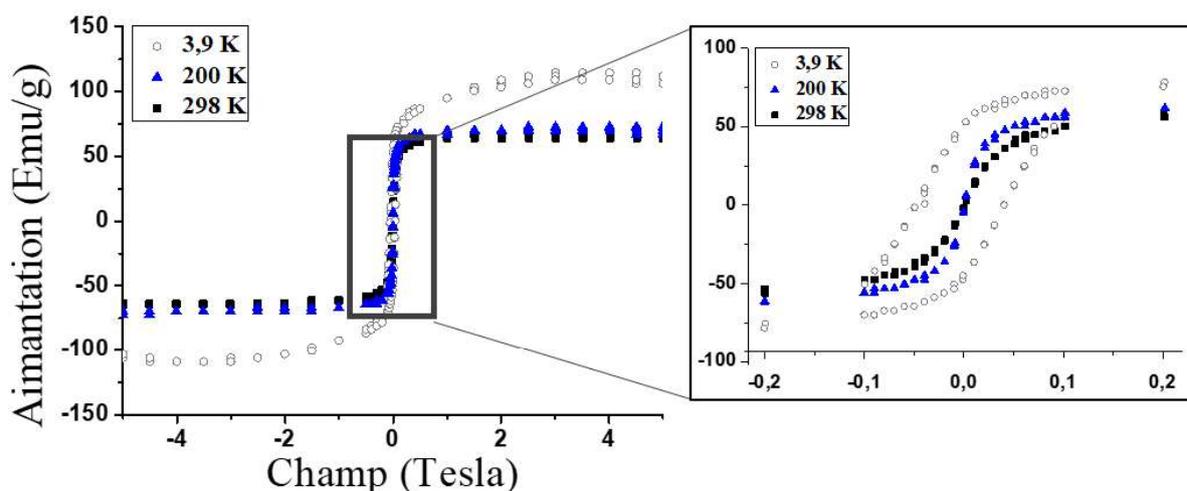


Figure 1.8 : Propriétés magnétiques des  $^{57}\text{NPOFs}$ . Cycles d'aimantation pour des champs compris entre -5T et 5T mesurés pour des températures de 3,9K (cercles blancs), 200K (triangles bleus) et 298K (carrés noirs) (A).

Les cycles d'aimantation montrent qu'à 200 K et 298 K, les  $^{57}\text{NPOFs}$  possèdent une aimantation nulle en l'absence de champ magnétique extérieur. Ainsi, à ces températures, les  $^{57}\text{NPOFs}$  ont un comportement superparamagnétique. A 3,9 K, on observe la présence d'un cycle d'hystérésis, caractéristique du comportement ferrimagnétique des oxydes de fer. Ainsi, en dessous d'une certaine température, le temps de relaxation est plus grand que le temps de mesure, les moments magnétiques ne se renversent pas durant cette période, ils sont dits dans un état bloqué. Cette température, appelée température de blocage  $T_b$ , peut être déterminée par mesure de la variation d'aimantation en fonction

de la température (Figure 1.9). L'échantillon est dans un premier temps refroidi jusqu'à 5 K sans champ magnétique. La variation de l'aimantation est ensuite mesurée entre 5 K et 300 K sous un champ magnétique constant égal à 50 Gauss, la courbe ZFC, pour Zero Field Cooled, est ainsi obtenue. A basse température, proche de 5 K, les moments magnétiques sont bloqués dans des directions aléatoires, le temps de relaxation est supérieur au temps de la mesure et l'aimantation apparaît nulle. Lorsque la température augmente, la barrière d'activation est franchie, et les moments magnétiques s'alignent selon le champ magnétique extérieur durant le temps de la mesure. L'aimantation atteint un maximum lorsque la majorité des moments magnétiques ne sont plus dans l'état bloqué, à la température de blocage. La température de blocage des <sup>57</sup>NPOFs synthétisées, déterminée à partir de la courbe ZFC, est de 84 K. La courbe FC, pour Field Cooled, détermine la variation de l'aimantation en fonction de l'aimantation lorsque l'échantillon est refroidi sous un champ magnétique constant. L'échantillon est refroidi sous un champ magnétique, ainsi les moments magnétiques sont alignés selon ce champ à basse température. Lorsque la température augmente, l'aimantation diminue. Pour les températures au-dessus de T<sub>b</sub>, la courbe FC se superpose à la courbe ZFC.

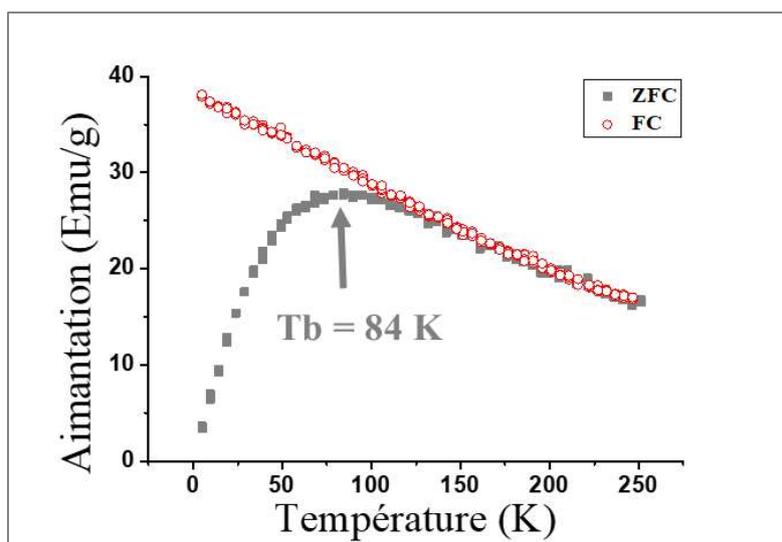


Figure 1.9 : Détermination de la température de blocage des NPOFs. Courbe ZFC (gris) et FC (rouge).

Les propriétés de contraste en IRM des <sup>57</sup>NPOFs ont été évaluées par la mesure des temps de relaxation longitudinaux et transversaux pour différentes concentrations en fer à température ambiante. La détermination des temps de relaxation a été réalisée sur un appareil IRM à 4,7 T. Les taux de relaxation R<sub>i</sub> et la relaxivité r<sub>i</sub> sont calculés à partir des temps de relaxation T<sub>i</sub> tels que :

$$R_i = \frac{1}{T_i} ; r_i = \frac{R_i - R_{i0}}{[Fe]} \quad (\text{Eq.1.1})$$

La Figure 1.10 présente les images acquises en IRM pondérées en T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> de la solution de <sup>57</sup>NPOFs (A et B) ainsi que le taux de relaxation R<sub>i</sub> en fonction de la concentration des <sup>57</sup>NPOFs.

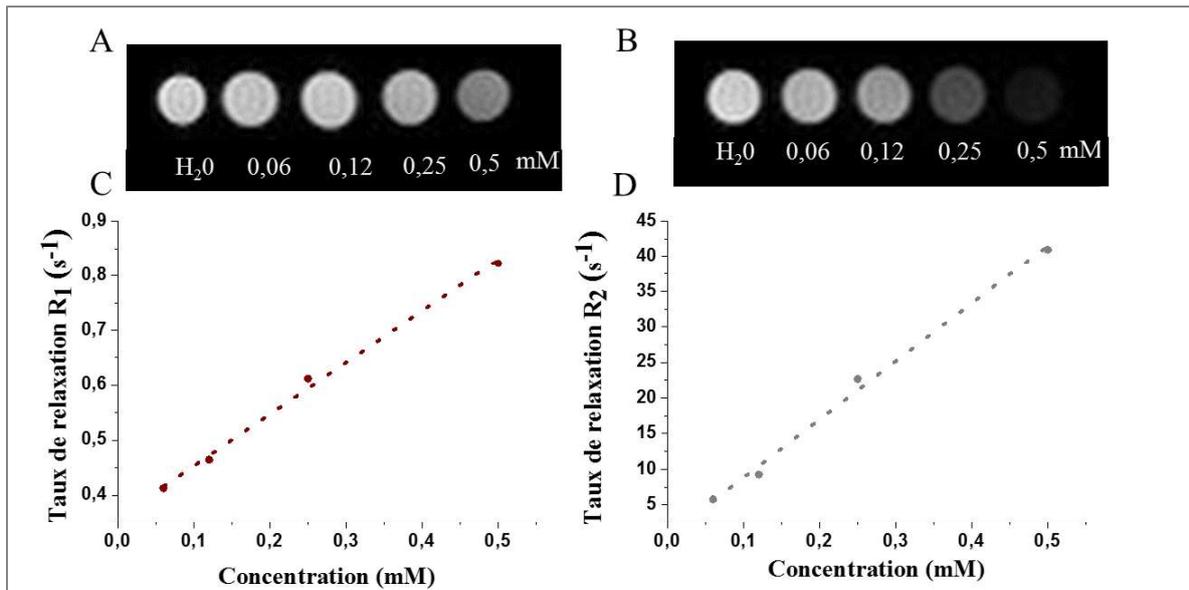


Figure 1.10 : Images pondérées en T<sub>1</sub> (A) et en T<sub>2</sub> (B) d'une solution de <sup>57</sup>NPOFs à différentes concentrations. Taux de relaxation R<sub>1</sub> (C) et R<sub>2</sub> (D) en fonction de la concentration, mesurés à 4,7 T.

L'intensité du signal IRM varie en fonction de la concentration en <sup>57</sup>NPOFs, démontrant la modification des temps de relaxation transversaux et longitudinaux des protons de l'eau en présence des <sup>57</sup>NPOFs synthétisées (Figure 1.10 (A et B)). La variation des taux de relaxation R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> en fonction de la concentration montre qu'ils augmentent proportionnellement avec la concentration en fer. Les relaxivités r<sub>1</sub> et r<sub>2</sub> sont déterminées à partir de la formule de l'équation (1.1), et sont égales à 0,86 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> et 81 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>, respectivement. La valeur de la relaxivité transversale r<sub>2</sub>, proche de la valeur de NPOFs utilisées en tant qu'agents de contraste en essais cliniques.<sup>40</sup> Le Tableau 4, montre que les <sup>57</sup>NPOFs synthétisées sont de bons agents de contraste négatifs.

	(r <sub>1</sub> mM <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	(r <sub>2</sub> mM <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )
Feridex	2,3	105
Resovist	2,8	176
Ferucarbotran	4,3	66
<sup>57</sup> NPOFs	0,86	81

Tableau 4 : Valeurs de relaxivités pour trois NPOFs utilisées en tant qu'agent de contraste, mesurées dans l'eau à 4,7 T et comparaison avec les <sup>57</sup>NPOFs synthétisées.

## 1.5 Conclusion

En adaptant le protocole proposé par Park *et al.*, nous avons synthétisé des <sup>57</sup>NPOFs cubiques d'une taille égale à 9,4 nm (± 2,6 nm) et enrichies à 91 % en <sup>57</sup>Fe. La Figure 1.11 récapitule les différentes étapes de la synthèse des <sup>57</sup>NPOFs présentées dans cette section, depuis la synthèse du cœur inorganique jusqu'à leur enrobage par le polymère Dopa-PIMA-PEG.

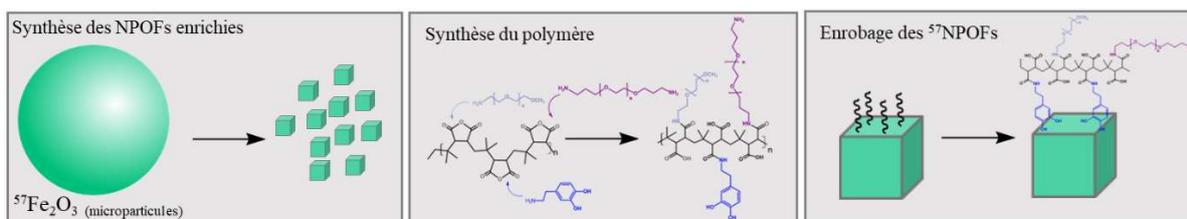


Figure 1.11 : Etapes de la synthèse des  $^{57}\text{NPOFs}$  enrobées de Dopa-PIMA-PEG.

Ces  $^{57}\text{NPOFs}$  constituent en outre de bons modèles d'agent de contraste pour l'IRM. La suite de ce chapitre est consacrée à la détection de ces  $^{57}\text{NPOFs}$  dans des matrices biologiques complexes et *in vivo*. Nous avons cependant été limitées par la quantité de  $^{57}\text{NPOFs}$  synthétisées. Cette limitation est due d'une part au coût élevé du précurseur (2000 euros pour 400 mg) et d'autre part aux pertes de matières non négligeables durant les étapes additionnelles de synthèse et de purification. A titre d'exemple, en partant d'une masse de précurseur enrichi en  $^{57}\text{Fe}$  correspondant à 112 mg en fer, la masse de fer obtenue dans la solution de  $^{57}\text{NPOFs}$  après synthèse, enrobage et purification est égale à environ 31 mg, soit un rendement de 28 %.

## 2. Suivi élémentaire des $^{57}\text{NPOFs}$ – matrices de validation

---

La détection des  $^{57}\text{NPOFs}$  est subordonnée au fait que la composition isotopique d'un échantillon incorporant ces  $^{57}\text{NPOFs}$  soit significativement distincte de celle d'un échantillon ne comportant que le fond endogène de fer. Lorsque la contribution exogène est négligeable devant la contribution endogène, les deux signatures isotopiques sont indiscernables et la contribution exogène n'est plus détectable. Ainsi le rapport entre les concentrations endogène et exogène de fer constitue donc le facteur limitant de la méthode de suivi de la biodistribution envisagée ici.

Avant de pouvoir suivre les  $^{57}\text{NPOFs}$  *in vivo*, il a été nécessaire de s'assurer de la validité de la méthode analytique, c'est-à-dire de s'assurer que les  $^{57}\text{NPOFs}$  exogènes pouvaient être quantifiées au milieu du fond endogène, à des concentrations pertinentes vis-à-vis des concentrations attendues *in vivo* et dans les différents compartiments de l'organisme. Nous avons en premier lieu caractérisé ces capacités de détection et de quantification sur des matrices biologiques complexes modèles par suivi élémentaire en HR-ICP-MS. Pour cela des quantités connues de  $^{57}\text{NPOFs}$  ont été ajoutées aux matrices puis comparées aux valeurs calculées à partir des intensités en HR-ICP-MS mesurées pour les différents isotopes du fer (équations présentées dans le chapitre 2).

Idéalement les capacités de détection et de quantification des  $^{57}\text{NPOFs}$  devraient être caractérisées dans chaque organe de la souris, en vue d'une expérience de biodistribution *in vivo*. En pratique, les quantités de  $^{57}\text{NPOFs}$  et le coût de celles-ci ne nous ont pas permis de tester ce modèle sur chaque organe. Nous avons fait le choix de sélectionner quatre matrices biologiques dont deux solides et deux liquides. Ce choix repose entre autres, sur la concentration en fer endogène des tissus biologiques qui est donnée dans le Tableau 5 en partie par million (ppm). Pour les matrices biologiques liquides, nous avons retenu le sang et les urines comme matrices complexes modèles. Le fer endogène dans les urines s'élève à 3,5 ppm ( $\pm 1,9$  ppm) et à 215 ppm ( $\pm 22$  ppm) dans le sang. Aussi le choix de ces matrices possède l'avantage de pouvoir tester la méthode de traçage dans deux environnements limites : une matrice physiologique comportant une grande contribution en fer endogène, c'est le cas du sang, et une ayant une concentration en fer endogène plus faible, c'est le cas des urines. En suivant ce même raisonnement, la rate, présentant la contribution en fer endogène la plus importante, constitue l'organe qui permettrait d'évaluer au mieux les performances analytiques de la méthode. Cependant, la rate ne pèse que 100 mg quand la validation de la méthode nécessite la préparation d'une vingtaine d'échantillons utilisant le broyat d'organe comme matrice de dispersion. En outre, comme abordé dans l'introduction, après injection intraveineuse, les NPOFs sont majoritairement acheminée vers le foie. Celui-ci représente une masse d'environ 1 g ce qui permet de réaliser confortablement le nombre d'échantillon requis en limitant le nombre d'animaux sacrifiés. Aussi nous avons retenu le foie comme une des matrices complexes modèles solide. Les selles, étant le deuxième tissu présentant une contribution en fer endogène importante a également été retenue comme matrice complexe modèle.

	<b>Organes</b>	<b>Concentration en fer endogène</b>
Solide	Rate	300 ppm ( $\pm$ 48 ppm)
	Selles	200 ppm ( $\pm$ 110 ppm)
	Poumons	120 ppm ( $\pm$ 20 ppm)
	Foie	110 ppm ( $\pm$ 14 ppm)
	Reins	70 ppm ( $\pm$ 24 ppm)
Liquide	Urine	3,5 ppm ( $\pm$ 1,9 ppm)
	Sang	215 ppm ( $\pm$ 22 ppm)

Tableau 5: Concentration en fer endogène en ppm de différents organes et liquides biologiques.

Afin de s'assurer de la pertinence de la méthode de traçage isotopique du fer, nous avons cherché à déterminer la plage de concentration en fer exogène à laquelle elle était sensible. Aussi, les quantités de  $^{57}\text{NPOFs}$  à ajouter dans chaque matrice couvrent plusieurs décades. La gamme de concentrations étudiée se situe entre 1/10000 et 10 fois la concentration d'accumulation maximale des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans chaque matrice. Celle-ci est calculée en considérant que la totalité des  $^{57}\text{NPOFs}$  est localisée dans un organe en particulier après injection intraveineuse. Pour chaque matrice, six quantités différentes de  $^{57}\text{NPOFs}$  ont été ajoutées.

## 2.1 Exemple de la matrice complexe « foie »

### 2.1.1 Détermination des quantités de $^{57}\text{NPOFs}$ à ajouter

Pour chaque matrice, il faut préciser les quantités de  $^{57}\text{NPOFs}$  à ajouter afin d'obtenir la gamme de concentration désirée. Dans un premier temps il est nécessaire d'estimer la concentration d'accumulation des  $^{57}\text{NPOFs}$  maximale par tissu en considérant que la totalité des  $^{57}\text{NPOFs}$  s'est accumulée dans celui-ci. On considère que la dose injectée par voie intraveineuse est de 56  $\mu\text{g}$  en  $^{57}\text{Fe}$  pour une souris de 20 g (soit une dose de 50  $\mu\text{mol/kg}$ ). Aussi en faisant l'hypothèse que la totalité s'est accumulée dans le foie, d'une masse moyenne de 1,37 g, la concentration en  $^{57}\text{Fe}$  exogène s'élève à 43,6  $\mu\text{g/g}$  soit 43,6 ppm dans le foie. Pour faciliter la lecture des graphes et la comparaison des différentes données, les concentrations dans cette section seront exprimées en ppm (ce qui correspond à des  $\mu\text{g/g}$  pour les matrices solides et à des  $\mu\text{g/mL}$  pour les matrices liquides). Comme précisé ci-dessus, nous avons choisi d'étudier l'efficacité de la méthode de traçage sur plusieurs décades, de concentration allant de 1/10000 à 10 fois la concentration d'accumulation maximale, soit de 436 ppm à  $43,6 \cdot 10^{-4}$  ppm. Six échantillons, notés Val-x ont été préparé en ajoutant la quantité de  $^{57}\text{NPOFs}$  nécessaire aux matrices foie pour obtenir les concentrations désirées. Les valeurs des concentrations obtenues expérimentalement pour chaque échantillon Val-x sont données dans le Tableau 6.

	Val-1	Val-2	Val-3	Val-4	Val-5	Val-6
<b>Concentration expérimentale (ppm)</b>	338	36,5	3,48	0,344	0,0329	0,00362

Tableau 6 : Concentration expérimentales des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans les matrices foie pour les échantillons de validation Val-x.

## 2.1.2 Préparation des échantillons

On distingue deux types d'échantillons, les échantillons Val-x où une quantité de  $^{57}\text{NPOFs}$  a été ajoutée et les échantillons Val-m correspondant aux matrices foie sans ajout de  $^{57}\text{NPOFs}$ . Après avoir prélevé les foies, ceux-ci sont divisés et pesés pour préparer les échantillons Val-x et Val-m. Pour les échantillons Val-x les  $^{57}\text{NPOFs}$  ont été ajoutées pour obtenir les concentrations données dans le Tableau 6.

Après ajout des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans les matrices, les échantillons Val-x sont digérés dans de l'acide nitrique concentré à chaud afin de dissoudre d'une part les organes mais également les  $^{57}\text{NPOFs}$ . Après évaporation à sec de l'acide nitrique, les résidus d'organe et de fer dissous sont ensuite dispersés dans une solution aqueuse à 1 % en acide nitrique pour obtenir une solution homogène. L'analyse HR-ICP-MS nécessite des solutions homogènes diluées, en dessous d'une concentration totale en fer de 0.1 ppm. Aussi, des étapes de dilution additionnelles sont nécessaires pour obtenir des concentrations en fer satisfaisantes pour l'analyse HR-ICP-MS. Les étapes de préparation des échantillons Val-x et Val-m depuis le prélèvement jusqu'à l'analyse sont représentées dans la Figure 2.1.

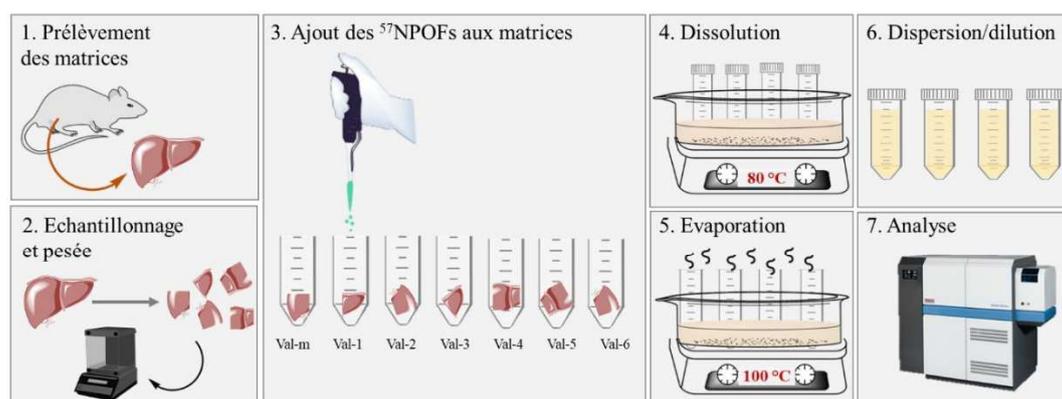


Figure 2.1 : Etape de préparation des échantillons pour les matrices de validation, depuis le prélèvement des matrices jusqu'à l'analyse des échantillons.

## 2.1.3 Analyse des données HR-ICP-MS

Suite à l'analyse des échantillons par HR-ICP-MS, on obtient les intensités de chaque isotope considéré. Le traitement numérique qui est présenté dans le chapitre 2 permet ensuite de calculer la concentration en  $^{57}\text{Fe}$  issus des  $^{57}\text{NPOFs}$  de chaque échantillon analysé. En effet, la préparation des échantillons pour l'analyse HR-ICP-MS nécessite la dissolution complète des  $^{57}\text{NPOFs}$ , ainsi le  $^{57}\text{Fe}$  détecté en HR-ICP-MS n'est plus sous forme de nanoparticules. Le fer exogène issu des  $^{57}\text{NPOFs}$  et mesurée en HR-ICP-MS sera donc noté  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$ . Les étapes de dispersion/dilution sont ensuite considérées pour obtenir la masse de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  dans les échantillons Val-x. Cette masse est par la suite normalisée par le poids de l'échantillon d'organe analysé afin d'exprimer la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  par gramme de tissu (Eq. 2.1).

$$C(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}) \text{ (ppm)} = \frac{C(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}) \text{ (}\mu\text{g/L)} \times V_{\text{dilution}}}{m_{\text{bout d'organe}}} \quad (\text{Eq.2.1})$$

Les courbes de validation expriment la concentration  $C(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}})$  mesurée en HR-ICP-MS, soit calculée à partir des intensités mesurées en HR-ICP-MS en fonction de la concentration  $C(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}})$  de référence ajoutée aux matrices, données dans le Tableau 6.

A partir de ces données, la précision de la concentration estimée ainsi que la limite de détection de la mesure sont déterminées. La précision de la concentration estimée est déterminée à partir de la déviation standard, ou résidu moyen, calculée pour le modèle (RMSE pour *Root Mean Square Error*) définie telle que :

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum (C_{\text{est},i} - \hat{C}_{\text{est},i})^2}{n-2}} \quad (\text{Eq.3.3})$$

Avec  $C_{\text{est},i}$  la concentration estimée en HR-ICP-MS,  $\hat{C}_{\text{est},i}$  la concentration estimée par le modèle de régression linéaire et  $n$  le nombre d'échantillons, soit 6 pour chaque matrice. Par ce calcul, la précision de la concentration estimée des  $^{57}\text{NPOFs}$  est égale à 2,1 ppm.

La courbe de validation pour la matrice foie est représentée Figure 2.2. Pour une meilleure lisibilité, on représente également cette courbe en échelle logarithmique (Figure 2.2 (B)).

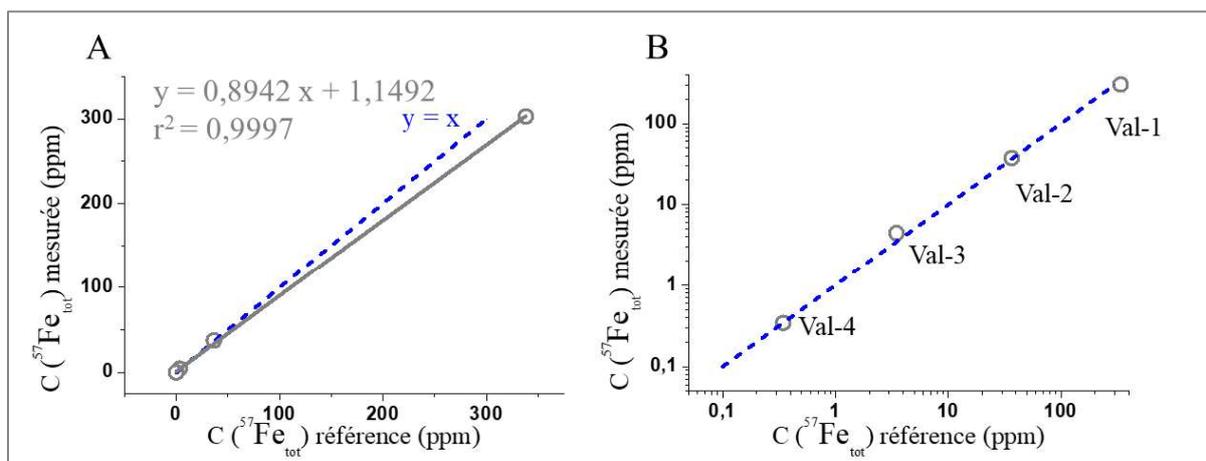


Figure 2.2: Détection des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans le foie. Courbes représentant la concentration  $C(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}})$  mesurée en HR-ICP-MS en fonction de la concentration  $C(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}})$  de référence ajoutée aux échantillon en échelle linéaire (A) et en échelle logarithmique (B).

On constate que pour la matrice foie la concentration en fer exogène varie linéairement avec la concentration d'ajout réellement introduite sur les six décades explorées. La pente de la régression linéaire conduit au taux de recouvrement de la méthode analytique, à savoir la quantité de  $^{57}\text{Fe}$  issu des  $^{57}\text{NPOFs}$  détectée par rapport à celles effectivement présentes. Pour la matrice foie, on obtient un taux de recouvrement très proche de l'unité, égal à 89 %, c'est-à-dire que sur 100 atomes de fer exogènes, l'

HR-ICP-MS en détecte 89. L'erreur moyenne de prédiction en milieu de gamme vaut 3 % de la concentration en milieu de gamme, ce qui est très satisfaisant.

## 2.2 Résultats des matrices de validation

A partir du raisonnement présenté ci-dessus, les courbes représentant les concentrations estimées en HR-ICP-MS en fonction des concentrations de référence ont été tracées pour les trois autres matrices, à savoir les urines, les selles et le sang (Figure 2.3).

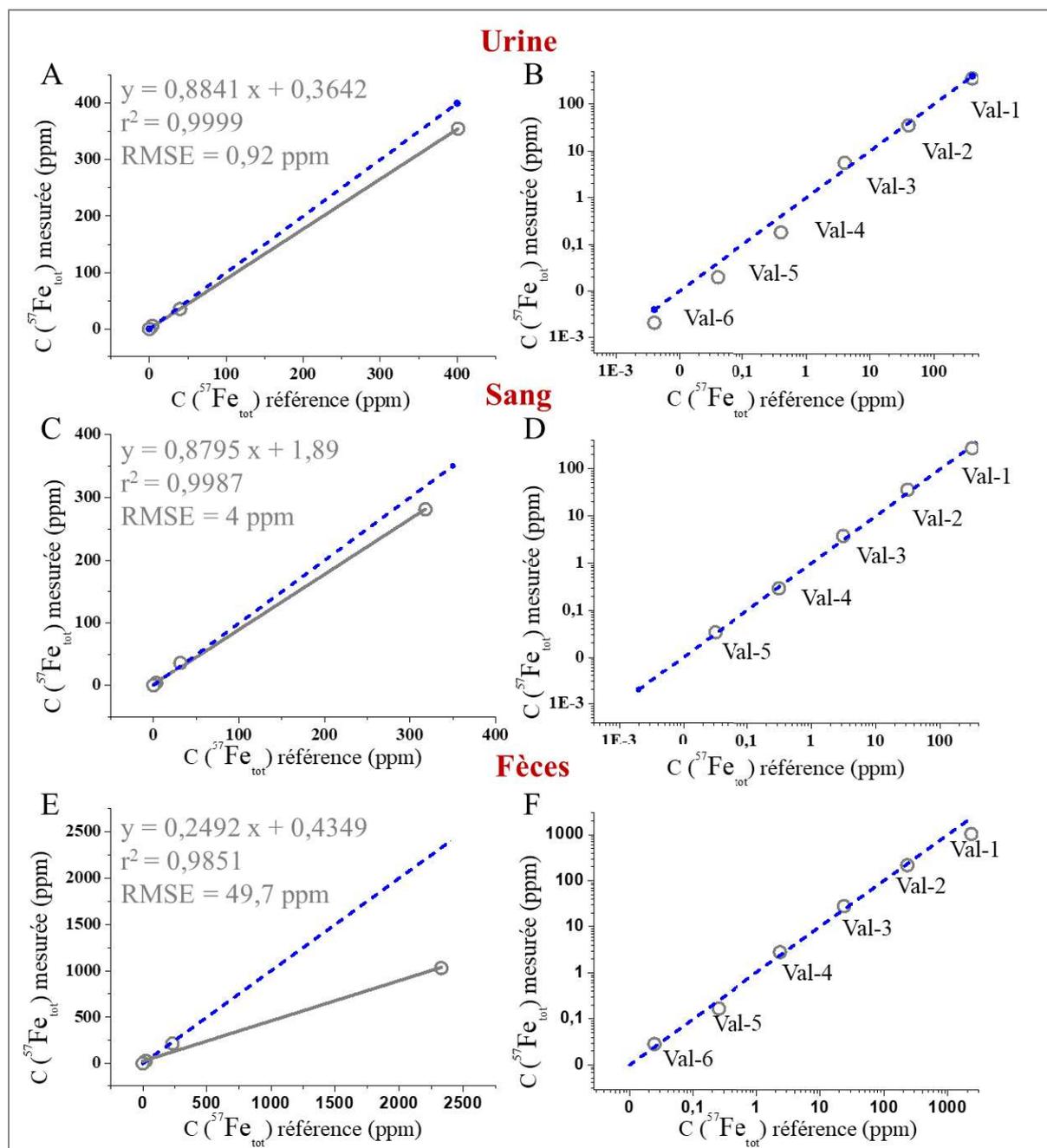


Figure 2.3 : Détection des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans l'urine (A et B), le sang (C et D) et les fèces (E et F). Courbes représentant la concentration  $C(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}})$  mesurée en HR-ICP-MS en fonction de la concentration  $C(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}})$  de référence ajoutée aux échantillons en échelle linéaire (A, C, E) et en échelle logarithmique (B, D, F).

Pour chacune des matrices, on constate que la concentration en fer exogène détectée varie linéairement avec la concentration d'ajout des  $^{57}\text{NPOFs}$  sur les six décades explorées. Les taux de récupération de la méthode sont tous très proches de l'unité pour les matrices urine et sang avec un biais positif. L'erreur moyenne de prédiction pour les matrices urine et sang sont respectivement égales à 1,2 % et 6,7 % de la concentration de milieu de gamme. Pour le sang et les urines, on constate un léger effet de matrice ressenti sur l'erreur moyenne de prédiction qui est plus élevée dans le cas du sang. L'effet de matrice est dû à la concentration endogène en fer qui est plus élevée dans le sang (215 ppm  $\pm$  22 ppm) que dans les urines (3,5 ppm  $\pm$  1,9 ppm). On observe pour les fèces, un taux de recouvrement faible, à hauteur de 25 %. Afin d'analyser les différents échantillons, il est nécessaire de digérer l'intégralité de la matière organique et de dissoudre les  $^{57}\text{NPOFs}$ . Une hypothèse pour expliquer ce taux de recouvrement faible est que le protocole de digestion dans l'acide nitrique n'est pas adapté pour la digestion complète des selles. En effet, dans plusieurs publications, les chercheurs ajoutent de l'acide perchlorique ou du peroxyde d'hydrogène à l'acide nitrique pour digérer intégralement cette matrice organique.<sup>25,41</sup> Ici, la digestion a été réalisée avec uniquement de l'acide nitrique, ainsi une partie des selles n'a pas été digérée et n'a pas pu être analysée correctement.

Les résultats obtenus pour les matrices de validation montrent que le marquage isotopique avec le  $^{57}\text{Fe}$  des  $^{57}\text{NPOFs}$  permet de les détecter sélectivement dans des matrices biologiques complexes, à des concentrations qui couvrent six décades de concentrations. La [Figure 2.4](#) dresse un bilan des résultats obtenus dans cette section pour les matrices de validation.

	Organes	Concentration en fer endogène	Gamme de concentration testée	Erreur moyenne de prédiction
Solide	Foie	110 ppm ( $\pm$ 14 ppm)	$3,6 \cdot 10^{-3}$ – 340 ppm	3%
	Selle	200 ppm ( $\pm$ 110 ppm)	$2,4 \cdot 10^{-2}$ – 2400 ppm	11,2%
Liquide	Urine	3,5 ppm ( $\pm$ 1,9 ppm)	$4,0 \cdot 10^{-3}$ – 400 ppm	1,2%
	Sang	215 ppm ( $\pm$ 22 ppm)	$3,2 \cdot 10^{-3}$ – 320 ppm	6,7%

Figure 2.4 : Bilan des caractéristiques et des résultats obtenus pour les matrices de validation.

Nous avons ensuite vérifié que les concentrations des  $^{57}\text{NPOFs}$  détectées aux temps courts dans les organes de souris injectées se situaient dans la gamme de linéarité de la méthode de détection.

### 3. Détection *in vivo* – étude pilote

Après avoir démontré l'efficacité de la détection des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans des matrices biologiques complexes par analyse élémentaire, nous avons appliqué cette méthode pour leur détection *in vivo*. Afin de s'assurer que cette méthode est adaptée pour la détection *in vivo*, nous avons réalisé une première expérience sur un échantillon réduit de souris, soit trente souris, constituant une première preuve de concept. Les objectifs de cette expérience préliminaire sont d'évaluer la biodistribution des  $^{57}\text{NPOFs}$  synthétisées, et d'évaluer la faisabilité d'un double suivi élémentaire et magnétique des  $^{57}\text{NPOFs}$  *in vivo*.

#### 3.1 Méthodologie

Cette expérience préliminaire est réalisée dans l'objectif de valider la méthode afin de mener une étude du devenir des  $^{57}\text{NPOFs}$  sur une période de six mois. Or la mesure de la concentration en fer endogène dans les organes foie, rate, rein et poumons pour des souris de six semaines et six mois montre des différences significatives entre ces deux âges (Figure 3.1). A titre d'exemple, la concentration en fer dans la rate pour les souris de six semaines est égale à 300  $\mu\text{g/g}$  et pour les souris de six mois augmente jusqu'à 1400  $\mu\text{g/g}$ . Ainsi la détection des  $^{57}\text{NPOFs}$  a été réalisée sur ces deux populations pour évaluer les effets de matrice.

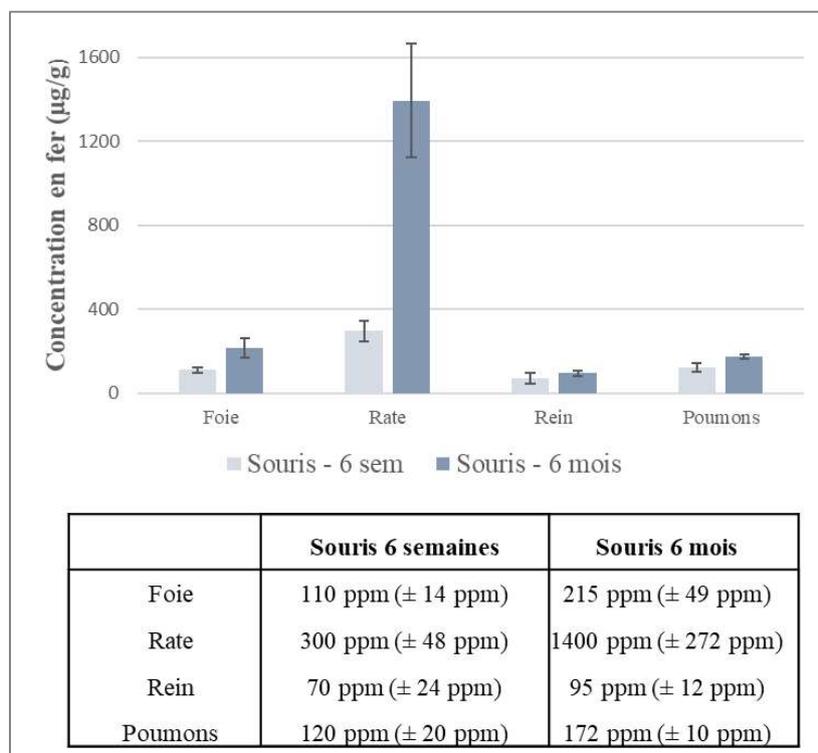


Figure 3.1 : Concentrations en fer endogène dans différents organes pour des souris âgées de six semaines et de six mois.

Ces expériences *in vivo* ont été validées par le Comité d'éthique en expérimentation animale n°34. Elles ont été menées dans les animaleries de la plateforme d'Imagerie du Petit Animal de l'Institut Cochin (numéro d'agrément A751406) et du PARCC – Elevage Rongeurs Inserm (numéro d'agrément A751532). Les expériences ont été réalisées selon la réglementation institutionnelle sur l'utilisation et la prise en charge des animaux de l'animalerie du Centre de Recherche Cardiovasculaire de Paris. Avant les expériences, les animaux se sont acclimatés à l'animalerie pendant au moins une semaine et ont été nourri avec un régime standard tout au long des expériences.

Six groupes de cinq souris ont été constitués. Les groupes 1, 3 et 5 sont constitués de souris âgées de six semaines et les groupes 2, 4 et 6 de souris âgées de six mois. Les groupes 1 à 4 ont été injectés d'une dose de 50 µg en fer par voie intraveineuse au sinus rétro-orbital. Les souris des groupes 1 et 2 ont été sacrifiées une heure après l'injection et les groupes 3 et 4 à un jour après l'injection. Les groupes 5 et 6 correspondent aux groupes contrôles et n'ont pas été injectés avec des <sup>57</sup>NPOFs. Avant sacrifice, une solution de kétamine-xylazine est administrée aux souris en intrapéritonéale qui permet analgésie et sédation suffisantes pour des procédures chirurgicales. Les souris sont ensuite sacrifiées par ponction cardiaque, permettant également de prélever le sang. Les organes foie, rate, reins et poumons sont ensuite prélevés. Chaque organe prélevé est ensuite pesé puis partagé en quatre morceaux afin de réaliser toutes les analyses nécessaires.

Le fer exogène issu des <sup>57</sup>NPOFs et noté <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub> a été quantifié par HR-ICP-MS. Pour les analyses HR-ICP-MS les morceaux d'organe sont préparés selon le protocole présenté dans la [Figure 2.1](#). Chaque morceau d'organe est pesé puis digéré dans l'acide nitrique. Après digestion, des solutions sont préparées aux dilutions adaptées pour l'analyse HR-ICP-MS, soit à une concentration totale en fer inférieure à 0,1 ppm.

Le fer superparamagnétique issu des <sup>57</sup>NPOFs et noté <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> a été quantifié par RFM. Pour les analyses RFM, chaque morceau d'organe est pesé puis séché à l'étuve pendant une nuit à 50 °C. Le séchage permet de concentrer les échantillons pour l'analyse RFM. Après avoir pesé les morceaux d'organes secs, ceux-ci sont broyés à l'aide d'un mortier. Enfin, une masse connue du broyat d'organe est insérée dans des tubes en quartz puis analysée en RFM.

Le prélèvement des échantillons ainsi que leur préparation pour les analyses HR-ICP-MS et RFM est décrit dans la [Figure 3.2](#).

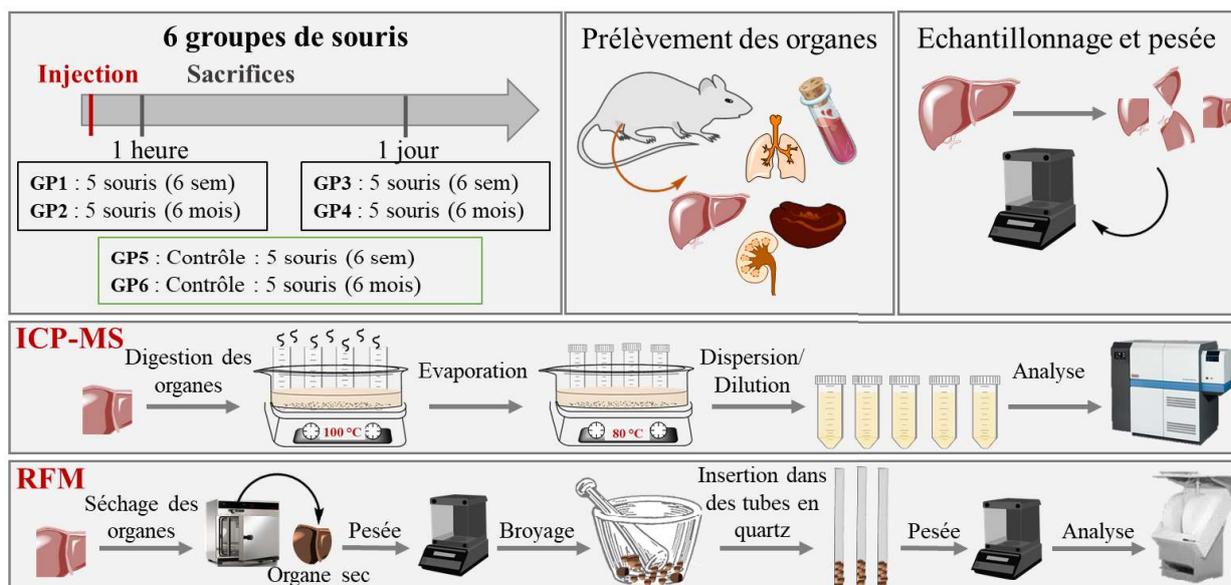


Figure 3.2 : Design de l'expérience in vivo. Six groupes de souris ont été analysés, quatre injectés avec des  $^{57}\text{NPOFs}$  et deux groupes contrôles. Après sacrifice des souris, les organes foie, rate, rein, poumons et le sang sont prélevés. Après échantillonnage de chaque organe, ceux-ci sont pesés. La quantification du fer magnétique et total est réalisée par HR-ICP-MS et RFM.

Afin d'évaluer l'évolution des propriétés structurales ainsi que la localisation à l'échelle nanométrique des  $^{57}\text{NPOFs}$ , les organes ont été analysés en MET. Pour les analyses en MET, les échantillons prélevés sont fixés dans une solution glutaraldéhyde/cacodylate pendant 24 heures puis conservés dans une solution de cacodylate. La préparation des échantillons pour l'observation en MET nécessite des étapes d'inclusion en résine, de coupes et de coloration à l'acétate d'uranyle. Celles-ci ont été réalisées par Christine Longin de la plateforme de MET de l'INRA.

La biodistribution et l'évolution de la persistance des  $^{57}\text{NPOFs}$  ont été analysées par histologie. Les échantillons prélevés sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde pendant 24 heures puis conservés dans de l'éthanol. L'inclusion en résine, les coupes et les colorations ont été réalisés à la plateforme d'histologie Histim de l'institut Cochin.

Enfin, la biodistribution des  $^{57}\text{NPOFs}$  a été suivie par IRM en collaboration avec Gwennael Autret de la plateforme IRM de l'hôpital Georges Pompidou.

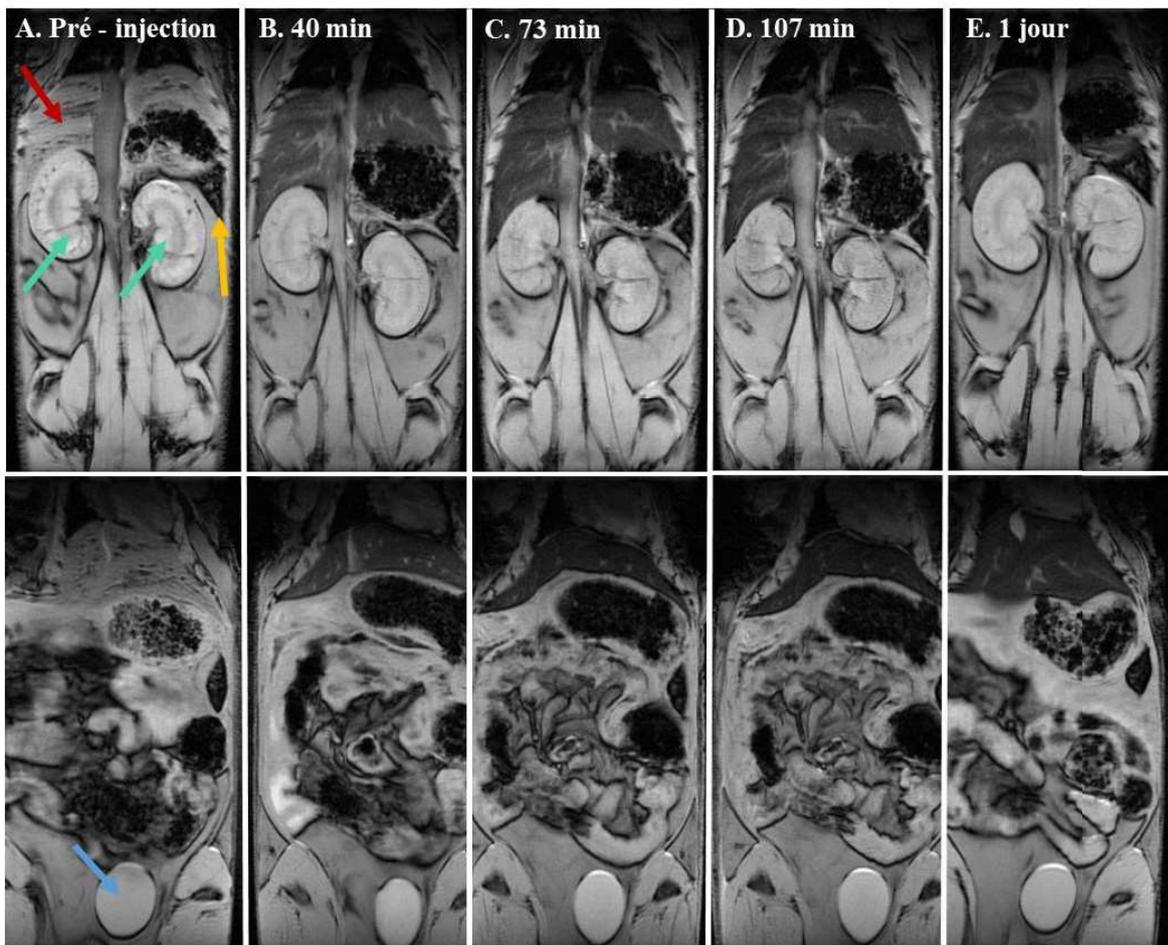
La collecte des urines et des selles nécessite l'utilisation de cages métaboliques. Or il n'a pas été possible de s'en procurer suffisamment pour analyser l'ensemble des souris. Ainsi nous n'avons pas pu analyser les urines et les selles.

### 3.2 Biodistribution

Une souris a été suivie par IRM entre quarante minutes et un jour après l'injection de  $^{57}\text{NPOFs}$ . Une souris a également été analysée en IRM avant l'injection de  $^{57}\text{NPOFs}$ , constituant la souris contrôle,

notée pré-injection. Le suivi IRM a été réalisé sur un appareil Biospec 47/40 USR possédant un aimant de champ magnétique de 4,7 tesla. L'analyse de résultats a été réalisée grâce au logiciel ParaVision. L'intégralité de la souris a été imagée en utilisant une séquence en écho de gradient pondérée  $T_2^*$  ( $TR/TE = 300/5$  ms). Pendant l'analyse, les souris sont anesthésiées par voie gazeuse avec de l'isoflurane. Leur température est maintenue constante par un circuit d'eau chaude thermostatée et leur rythme cardiaque est également suivi par électrocardiogramme.

L'IRM permet d'évaluer la biodistribution des  $^{57}\text{NPOFs}$  à l'échelle de l'organisme. La **Figure 3.3** montre les IRM d'une souris pré-injection (A), et 40 (B), 73 (C), 107 (D) minutes et un jour (E) après injection. On observe que le contraste des reins (flèches vertes), et de la vessie (flèche bleu) n'est pas modifié de manière significative après injection des  $^{57}\text{NPOFs}$ , comparativement à celui avant l'injection. A l'inverse, le contraste du foie (flèche rouge) et de la rate (flèche jaune) augmente suite à l'injection des  $^{57}\text{NPOFs}$ , en effet ces organes deviennent plus sombres en IRM pondérée en  $T_2^*$ . Ainsi, après injection intraveineuse de NPOFs, celles-ci se retrouvent majoritairement localisées dans le foie et dans la rate.



**Figure 3.3** : Suivi de la biodistribution des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans le foie (flèches rouge), dans les reins (flèches vertes), dans la rate (flèche jaune) et dans la vessie (flèche bleu). IRM d'une souris non injectée (gauche) et 40, 73, 107 minutes et un jour après injection. Séquence écho de gradient FSPGR pondérées  $T_2^*$  ( $T_R/T_E = 300/10$  ms)

A défaut de quantifier les NPOFs de manière exacte, il est possible de comparer les signaux ( $S_t$ ) obtenus en IRM pour chaque temps afin de caractériser les dynamiques d'internalisation des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans les organes. Les signaux sont normalisés par le signal de l'eau pour chaque mesure. On peut définir le pourcentage d'augmentation de contraste (AC) tel que :

$$\% \text{ AC} = \frac{\frac{S_t(\text{organe})}{S_t(\text{eau})} - \frac{S_{t=0}(\text{organe})}{S_{t=0}(\text{eau})}}{\frac{S_{t=0}(\text{organe})}{S_{t=0}(\text{eau})}} \quad (\text{Eq.3.5})$$

Avec  $S_t$  le signal IRM au temps  $t$  après injection et  $S_{t=0}$  le signal IRM avant injection.

La Figure 3.4 montre la variation du contraste pour chaque organes 40, 73, 107 minutes et un jour après l'injection de  $^{57}\text{NPOFs}$ . On observe d'une part que le contraste diminue à hauteur de 7 % dans les reins, ce qui signifie qu'une faible quantité de  $^{57}\text{NPOFs}$  transite par les reins 73 et 107 minutes après l'injection. On observe d'autre part que le contraste diminue à hauteur de 40 % et 60 % dans le foie 40 et 107 minute après l'injection, respectivement. Ainsi le maximum d'internalisation est observé à 107 minutes pour le foie. Pour la rate, celui-ci est observé 73 minutes après l'injection.

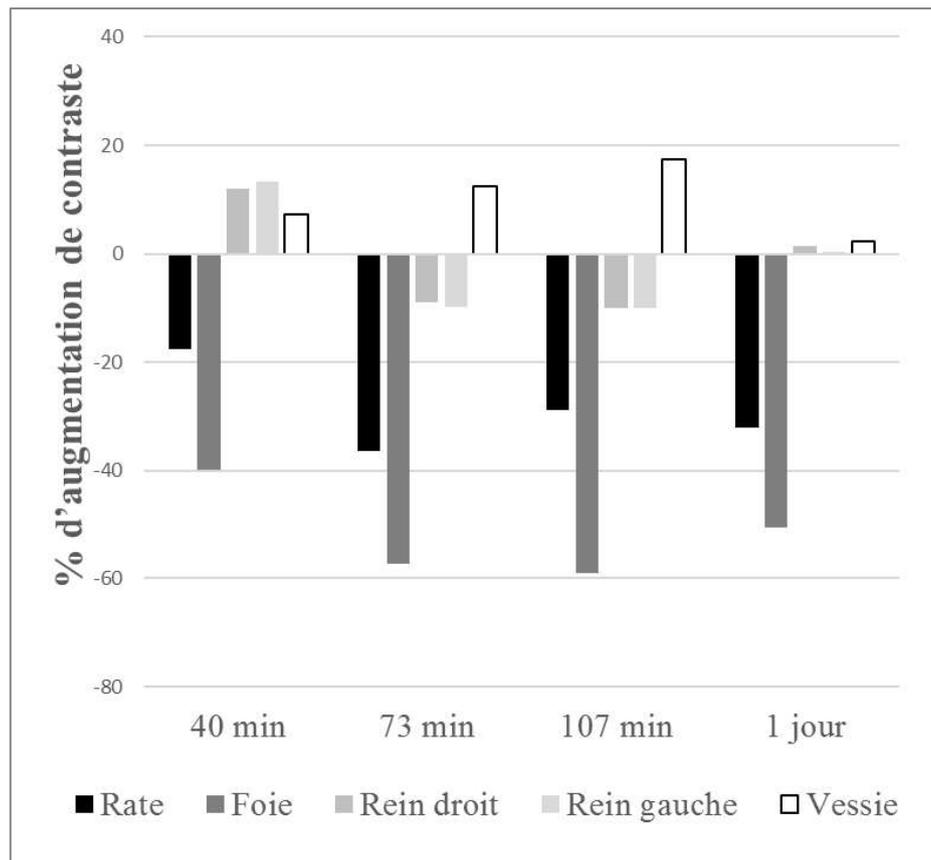


Figure 3.4 : Pourcentage d'augmentation de contraste pour les organes rate, foie, reins et vessie, calculé d'après l'équation (3.3) à 40, 73, 107 minutes et un jour après l'injection de  $^{57}\text{NPOFs}$ .

L'analyse IRM permet de conclure que les  $^{57}\text{NPOFs}$  sont majoritairement localisées dans le foie et dans la rate.

Des analyses histologiques ont été réalisées sur ces tissus pour évaluer la répartition des  $^{57}\text{NPOFs}$  à l'échelle tissulaire (Annexe 3). Cependant, la sensibilité de cette méthode n'a pas permis de visualiser les  $^{57}\text{NPOFs}$  dans chaque tissu, après une coloration spécifique du fer (PEARLS). Néanmoins, après injection des  $^{57}\text{NPOFs}$ , aucune modification cellulaire ou d'altération du tissu n'ont été observés en histologie. En accord avec les résultats obtenus en HR-ICP-MS, on a constaté une coloration bleue plus importante en histologie pour les coupes de rates des souris six mois, caractérisant une concentration en fer plus importante.

Des coupes des organes foie et rate ont été analysées en MET afin de localiser les  $^{57}\text{NOFs}$  au sein de ces tissus. Dans le foie on constate la présence de cellules de Kupffer (macrophages) et d'hépatocytes (Figure 3.5 (A & B)). Dans la rate on constate la présence de globule rouge et de macrophages (Figure 3.5 (C & D)).

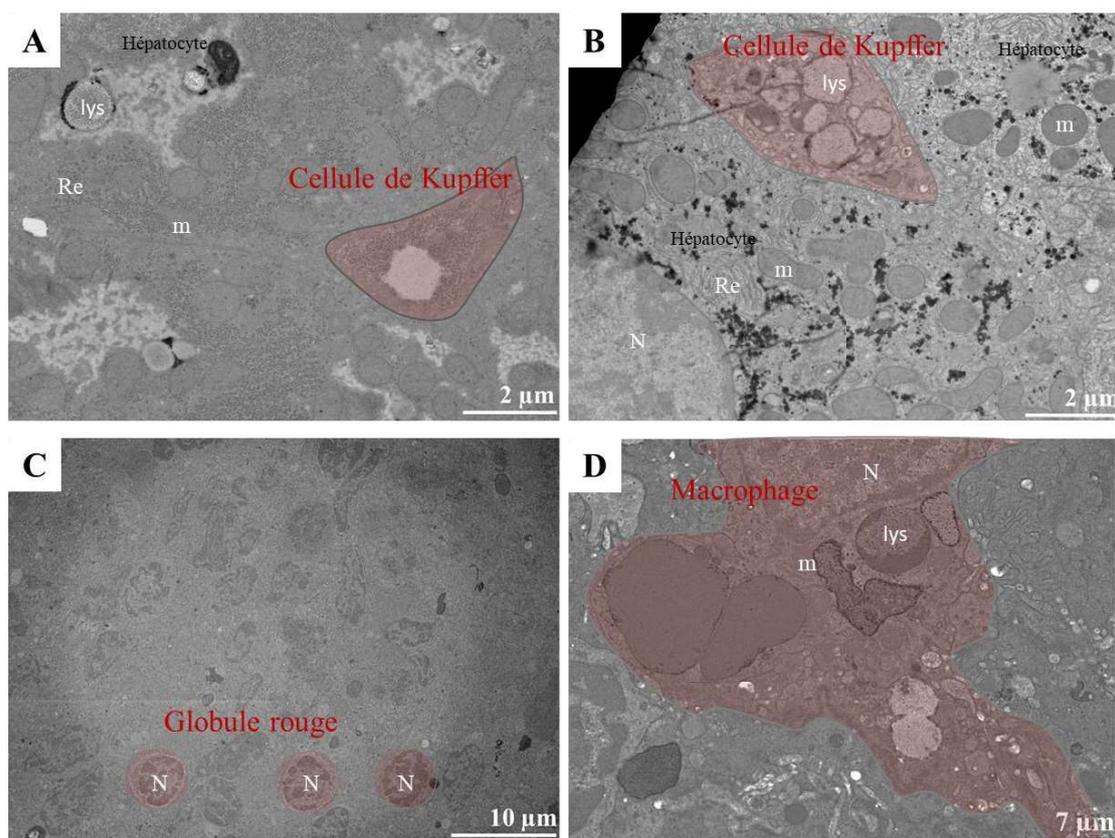


Figure 3.5 : Images de MET de coupes de foie (A & B) et de rate (C & D). On observe la présence d'hépatocytes et de cellules de Kupffer dans le foie et dans la rate la présence de globules rouges et de macrophages. Les organites cellulaires sont notés en blanc (N : noyaux, m : mitochondrie, lys : lysosomes, Re : réticulum endoplasmique)

On constate que les  $^{57}\text{NPOFs}$  sont confinées dans les compartiments endo/lysosomaux des macrophages dans le foie et dans la rate, ces observations sont en adéquation avec les résultats de plusieurs études antérieures.<sup>24,25,38</sup> Et en particulier dans des cellules de Kupffer dans le foie(Figure 3.6).

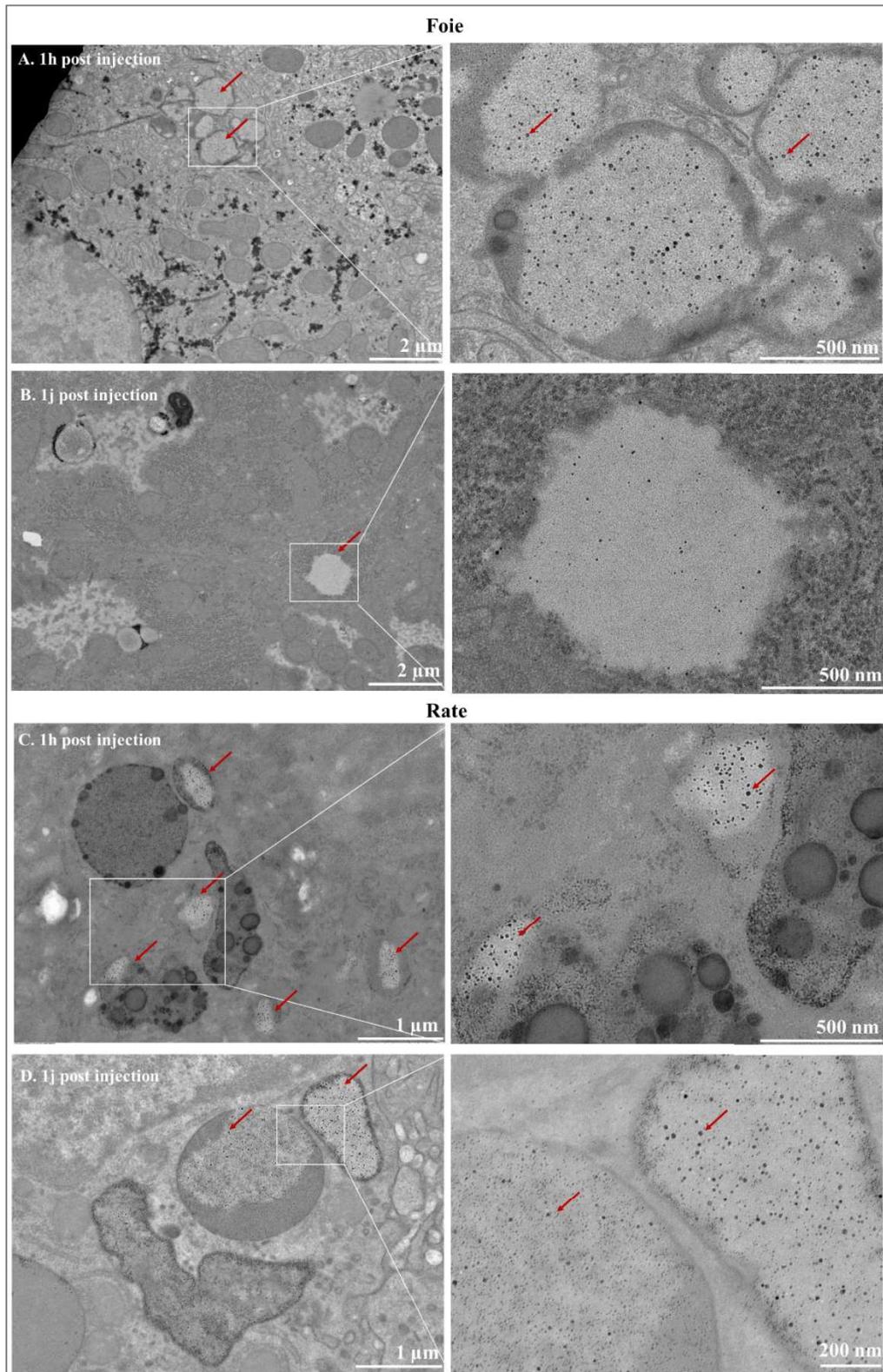


Figure 3.6 : Images de MET des  $^{57}\text{NPOFs}$  (flèches rouge) dans le foie et dans la rate, à une heure (A, C) et un jour après injection (B, D).

### 3.3 Quantification du fer exogène provenant des $^{57}\text{NPOFs}$ par HR-ICP-MS

Le fer exogène provenant des nanoparticules a été quantifié par HR-ICP-MS dans les organes foie, rate, reins et poumons, et également dans le sang. Dans un premier temps, nous avons comparé nos mesures à celles obtenues pour les courbes de validation. Notre stock de  $^{57}\text{NPOFs}$  étant limité, ainsi pour les matrices de validation, nous avons fait le choix de n'évaluer les performances analytiques que dans un organe solide et riche en fer où les NPOFs s'accumulent préférentiellement : le foie. Nous exportons donc les figures de mérites évaluées lors de l'étape de validation de la méthode analytique aux autres organes solides : la rate, les reins et les poumons. On constate que toutes les concentrations détectées sont au minimum deux ordres de grandeur au-dessus de la borne inférieure de concentration d'ajout (Figure 3.7) et donc confortablement sises dans la gamme de linéarité des courbes de validation, ce qui valide la pertinence de la méthode de détection pour ces temps courts.

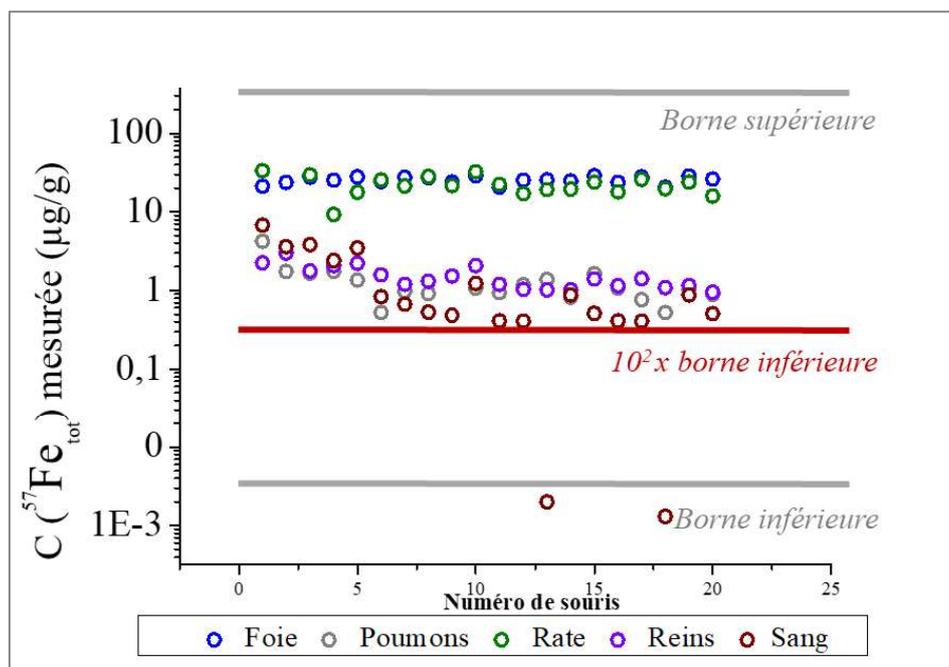


Figure 3.7 : Concentration en  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  mesurées dans les organes foie, rate, reins, poumons et sang issus de l'ensemble des souris analysées. Comparaison de ces valeurs avec les bornes inférieures et supérieures de la gamme de concentrations testées pour les matrices foie et sang (ligne grise).

Aux temps longs cependant, on s'attend à ce que les concentrations en fer exogène tendent asymptotiquement vers zéro. Il est donc nécessaire d'estimer les limites de détection de la méthode analytique dans chacune des matrices.

#### 3.3.1 Principe de la détermination de la limite de détection.

Le critère sous-tendant l'estimation d'une limite de détection résulte d'un choix arbitraire de la probabilité d'erreur considérée comme acceptable. En général, la limite de détection est choisie de manière à limiter la possibilité de rapporter un faux négatif (rapporter l'absence de l'analyte alors qu'il

est bien présent) ou un faux positif (rapporter la présence de l'analyte alors qu'il est bien absent) à 7%. C'est le critère statistique sous-entendu derrière le critère communément appliqué de « signal du blanc + 3 écarts-types du blanc ».

Dans notre cas, et du fait de la variabilité biologique importante à laquelle on peut s'attendre chez les groupes de souris, nous avons préféré appliquer un critère plus contraignant : la limite de détection a été fixée comme la concentration minimale à partir de laquelle la probabilité de rapporter un faux positif ou un faux négatif est inférieure à 1%.

Pour estimer cette concentration minimale, nous avons identifié parmi toutes les concentrations d'ajouts non nulles (échantillons Val-x) la première pour laquelle la concentration prédite est significativement distincte de la concentration prédite pour la matrice pure (échantillons Val-m) avec un degré de confiance de 99%. Pour faire ces estimations, il nous a été nécessaire de ré-estimer les modèles de calibration sur des gammes de concentration restreintes, pour les raisons que nous exposons ci-après.

La limite de détection d'un modèle de calibration linéaire non pondéré est traditionnellement estimée sur une décade de concentrations. En effet, cette amplitude de gamme de calibration représente le meilleur compromis entre précision sur l'estimation de la pente du modèle et précision sur l'estimation de l'ordonnée à l'origine. De plus, elle permet généralement de s'assurer que les résidus sont du même ordre de grandeur sur toute la gamme. Etant donné qu'on s'attend à ce que les concentrations de NPOFs dans les différents organes varient de plus d'un ordre de grandeur au cours des six mois après injection, une gamme de calibration d'une décade n'est pas adaptée au suivi cinétique de leur biodistribution. Cependant, en estimant une limite de détection de la méthode à partir d'un modèle de calibration multi-décade, on surestime fortement la limite de détection réelle. En effet, le résidu moyen (RMSEP) sur une gamme multi-décade est très fortement impacté par les résidus aux concentrations les plus hautes. De ce fait, il peut largement excéder les concentrations les plus basses de la gamme. Les points expérimentaux présentent alors des résidus standardisés (résidus divisé par la concentration) faibles aux grandes concentrations mais très grands aux faibles concentrations. En d'autres termes, les grandes concentrations sont très bien modélisées mais les faibles concentrations sont mal modélisées.

Afin de mieux rendre compte des faibles concentrations, il est nécessaire de restreindre la gamme de concentrations. Les concentrations estimées dans les différents organes aux temps 1h et 24h constituent des bornes supérieures des concentrations que l'on s'attend à observer dans ces organes aux temps plus longs. Pour les organes foie et rate, les concentrations sont inférieures aux concentrations de l'échantillon Val-1, nous avons ainsi supprimé cette concentration et déterminé les nouveaux modèles de calibration plus adaptés à la description des faibles concentrations. Pour les organes poumons et reins on constate que les concentrations sont inférieures aux échantillons Val-1 et Val-2 et pour le sang aux concentrations Val-1, Val-2 et Val-3. De la même manière, nous écarterons ces concentrations pour

déterminer un nouveau modèle de calibration. Les limites de détection (LOD) ont ensuite été estimées à partir de ces modèles de calibration plus adaptés, selon le protocole analytique présenté en annexe. Les taux de récupération, RMSEP et LODs obtenus sont résumés dans le Tableau 7.

	Foie - Rate	Poumons - Reins	Sang
Taux de récupération	103 %	129%	94 %
RMSEP (ppm)	0,4	0.04	0,06
LOD (ppm)	3	0.3	0,3

Tableau 7 : Taux de récupération et limites de détection pour les nouveaux modèles de calibration pour les organes foie, rate, reins, poumons et sang.

Nous avons dans un premier temps comparé nos mesures aux valeurs limites de détection déterminées à partir des matrices de validation. En rappelant la quantité de fer endogène dans chaque organe analysés (Tableau 8), on constate que la quantité de fer endogène dans la rate des souris âgées de six mois est significativement supérieure à celle contenue dans le foie. Aussi nous pouvons nous demander si l'approximation selon laquelle la limite de détection obtenue pour le foie peut être étendue aux autres organes tels que la rate est réaliste. Les valeurs des concentrations du fer exogène  $^{57}\text{Fe}$  issus des  $^{57}\text{NPOFs}$  estimées en HR-ICP-MS dans les différents organes sont données dans la Figure 3.8. On constate que pour la rate, ces valeurs sont significativement supérieures, d'un facteur 10 environ, à la limite de détection obtenue pour le foie (3 ppm). Aussi nous considérons que l'approximation d'extension de la limite de détection aux autres organes est valide.

	Souris 6 semaines	Souris 6 mois
Foie	110 ppm ( $\pm$ 14 ppm)	215 ppm ( $\pm$ 49 ppm)
Rate	300 ppm ( $\pm$ 48 ppm)	1400 ppm ( $\pm$ 272 ppm)
Rein	70 ppm ( $\pm$ 24 ppm)	95 ppm ( $\pm$ 12 ppm)
Poumons	120 ppm ( $\pm$ 20 ppm)	172 ppm ( $\pm$ 10 ppm)

Tableau 8 : Quantité de fer endogène dans les organes foie, rate et poumons pour des souris âgées de six semaine et de six mois.

En comparant les valeurs de concentrations  $C(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}})$  mesurées en HR-ICP-MS et la valeur limite de détection pour chaque organe, on observe que toutes les valeurs se situent au-dessus de celle-ci (Figure 3.8 (A)). Le  $^{57}\text{Fe}$  issus des  $^{57}\text{NPOFs}$  localisées dans les organes foie, rate, poumons et reins peuvent ainsi être quantifiées *in vivo* par HR-ICP-MS. Les concentrations en  $^{57}\text{Fe}$  issu des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans le sang sont également supérieures à la limite de détection déterminée pour la matrice de validation sang, mise à part pour deux valeurs, qui seront écartées des statistiques (Figure 3.8 (B)).

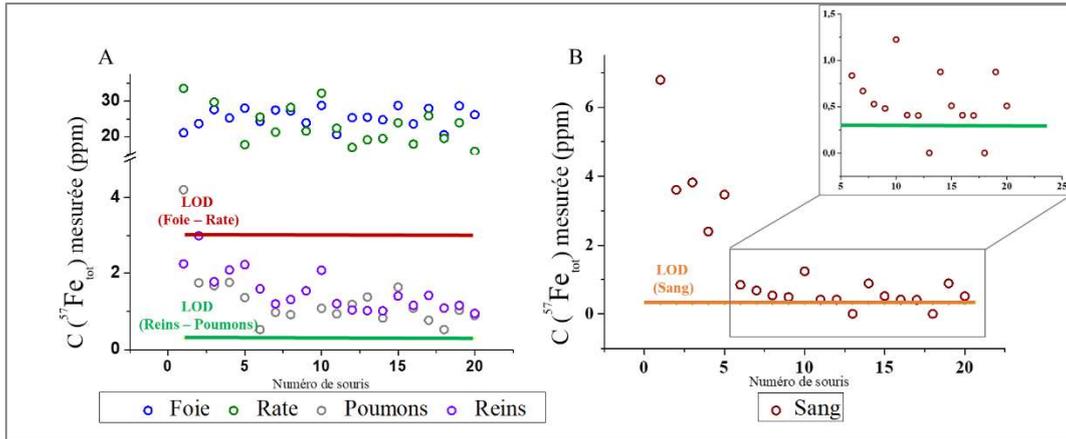


Figure 3.8 : Valeurs de concentration  $C(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}})$  mesurées en HR-ICP-MS pour les organes foie, rate, reins, poumons (A) et pour le sang (B) comparées aux valeurs de limites de détection déterminées par les matrices de validation.

### 3.3.2 Distribution du fer exogène *in vivo*

Pour chaque organe, on quantifie le  $^{57}\text{Fe}$  issu des  $^{57}\text{NPOFs}$  en pourcentage de la masse de fer injectée, noté  $\% \text{MI}$ , défini tel que :

$$\% \text{MI} = \frac{C(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}) \text{ (ppm)} \times m_{\text{organe}}}{m_{\text{injectée}}}, \text{ pour les organes solides} \quad (\text{Eq.3.6})$$

$$\% \text{MI} = \frac{C(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}) \text{ (ppm)} \times V_{\text{sang}}}{m_{\text{injectée}}}, \text{ pour le sang}$$

Avec  $C(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}})$  (ppm) la concentration en  $^{57}\text{Fe}$  issus NPOFs dans le bout d'organe déterminée précédemment (Eq.3.2),  $m_{\text{organe}}$ , la masse de l'organe entier et  $m_{\text{injectée}}$ , la masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée (50  $\mu\text{g}$ ).

La Figure 3.9 montre la quantité de  $^{57}\text{Fe}$  exogène mesurée en HR-ICP-MS dans les différents organes et dans le sang une heure et un jour après injection pour les souris de 6 semaines et six mois.

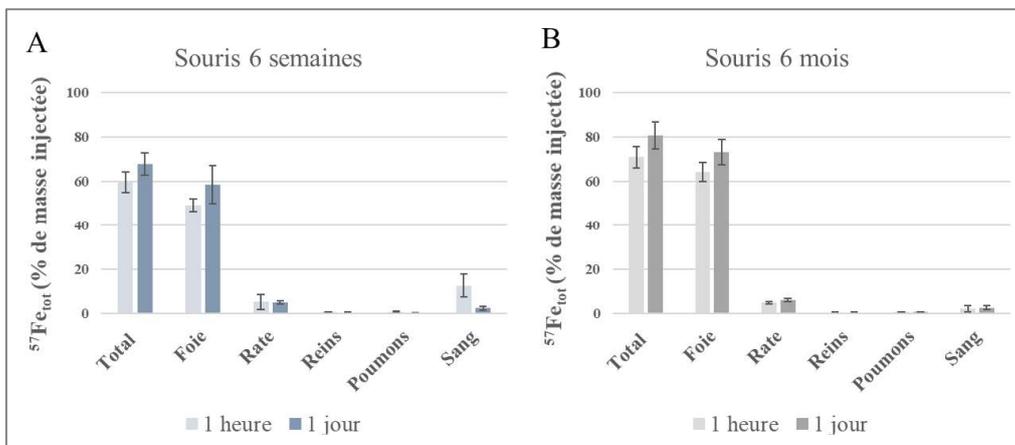


Figure 3.9 : Quantité de  $^{57}\text{Fe}$  exogène dans les différents organes et dans le sang, une heure et un jour après l'injection, pour les souris de six semaines (A) et six mois (B). Les barres d'erreurs caractérisent l'hétérogénéité des souris dans chaque groupe.

On observe dans un premier temps que l'intégralité du  $^{57}\text{Fe}$  issu des  $^{57}\text{NPOFs}$  n'est pas contenue dans les organes analysés. En effet, un jour après l'injection, on retrouve seulement 70 % et 80 % de la masse injectée pour les souris de six semaines et de six mois respectivement. Cela signifie qu'une partie du  $^{57}\text{Fe}$  exogène est excrétée par les urines<sup>17</sup> et les selles ou internalisée dans d'autres tissus tels que les tissus adipeux.<sup>18</sup>

En accord avec les analyses IRM, on constate que le  $^{57}\text{Fe}$  exogène est majoritairement localisé dans le foie et dans la rate pour les deux populations de souris. On observe également une légère augmentation de la quantité de  $^{57}\text{Fe}$  exogène dans le foie entre une heure et un jour, passant de 49,3 % ( $\pm 2,7$  %) de la masse injectée à 58,5 % ( $\pm 8,6$  %) et de 64,3% ( $\pm 4,3$  %) à 73,4 % ( $\pm 5,7$  %) pour les souris de six semaines et de six mois respectivement. Ces résultats sont cohérents avec les analyses IRM montrant un maximum d'accumulation pour des temps supérieurs à une heure, situé au bout de 73 minutes (Figure 3.4). Enfin, on observe la présence de  $^{57}\text{Fe}$  exogène dans le sang, témoignant sa circulation à 60 minutes au moins après injection. La quantité de  $^{57}\text{Fe}$  exogène retrouvée dans le sang a été calculé en considérant une volémie de 79 mL/kg et un poids moyen de 20 g pour les souris de six semaines et de 30 g pour celles de six mois. Pour les souris âgées de six semaines, la quantité de  $^{57}\text{Fe}$  exogène dans le sang diminue de 12,7 % ( $\pm 5,2$  %) à 2,4 % ( $\pm 0,9$  %) entre les deux temps. Ainsi au bout d'une heure, une partie du  $^{57}\text{Fe}$  exogène circule encore dans le sang, ce qui explique l'augmentation de leur concentration dans le foie entre une heure et un jour. Pour les souris âgées de six mois, on ne détecte que très peu de  $^{57}\text{Fe}$  exogène dans le sang, environ 2 % de la masse injectée une heure et un jour après l'injection. Ce résultat suggère une capture plus rapide du  $^{57}\text{Fe}$  exogène dans les organes pour les souris de six mois comparativement aux souris de six semaines.

On observe également une quantité plus importante de  $^{57}\text{Fe}$  exogène dans les souris âgées de six mois comparativement aux souris âgées de six semaines. Or toutes les souris ont été injectées avec la même dose de  $^{57}\text{NPOFs}$ , soit 50  $\mu\text{g}$  de fer. Aussi, cette différence s'explique par une masse des organes plus importante pour les souris de six mois que pour celle de six semaines. A titre d'exemple, la masse moyenne d'un foie de souris âgée de six semaines est égale à 1 g, tandis qu'elle vaut environ 1,4 g pour celles âgées de six mois. En calculant la concentration de  $^{57}\text{Fe}$  exogène par organe, on constate que les concentrations ne sont pas significativement différentes en fonction de l'âge de la souris (Tableau 9). Le Tableau 9 récapitule les valeurs des concentrations en  $^{57}\text{Fe}$  exogène mesurées après injection en fonction des caractéristiques des différents organes pour les deux population de souris à une heure et un jour après injection.

	Age de la souris	Temps	Poids organe ( $\mu\text{g}$ )	Concentration fer endogène (ppm)	Concentration $^{57}\text{Fe}$ exogène (ppm)
Foie	6 semaines	1h	0.994 ( $\pm 0.102$ )	110 ( $\pm 14$ )	25,1 ( $\pm 2.9$ )
		1d	1.118 ( $\pm 0.145$ )		26,3 ( $\pm 2.1$ )
	6 mois	1h	1.301 ( $\pm 0.097$ )	215 ( $\pm 49$ )	25,0 ( $\pm 2.9$ )
		1d	1.464 ( $\pm 0.117$ )		25,4 ( $\pm 3.3$ )
Rate	6 semaines	1h	0.084 ( $\pm 0.011$ )	300 ( $\pm 48$ )	31,0 ( $\pm 21.2$ )
		1d	0.098 ( $\pm 0.016$ )		25,8 ( $\pm 4.6$ )
	6 mois	1h	0.128 ( $\pm 0.006$ )	1400 ( $\pm 272$ )	20,4 ( $\pm 2.7$ )
		1d	0.148 ( $\pm 0.019$ )		20,6 ( $\pm 4.1$ )
Poumons	6 semaines	1h	0.165 ( $\pm 0.018$ )	120 ( $\pm 20$ )	2,15 ( $\pm 1.16$ )
		1d	0.206 ( $\pm 0.031$ )		0,87 ( $\pm 0.24$ )
	6 mois	1h	0.248 ( $\pm 0.044$ )	172 ( $\pm 10$ )	1,19 ( $\pm 0.33$ )
		1d	0.278 ( $\pm 0.052$ )		0,86 ( $\pm 0.22$ )
Reins	6 semaines	1h	0.139 ( $\pm 0.015$ )	70 ( $\pm 24$ )	2,26 ( $\pm 0.45$ )
		1d	0.151 ( $\pm 0.016$ )		1,54 ( $\pm 0.34$ )
	6 mois	1h	0.195 ( $\pm 0.017$ )	95 ( $\pm 12$ )	1,13 ( $\pm 0.17$ )
		1d	0.184 ( $\pm 0.027$ )		1,15 ( $\pm 0.17$ )

Tableau 9 : Poids, concentration en fer endogène et concentration en  $^{57}\text{Fe}$  exogène dans les différents organes en fonction de l'âge des souris ainsi que du temps entre l'injection et le sacrifice de celles-ci.

On constate d'une part que la concentration en  $^{57}\text{Fe}$  exogène dans le foie et dans la rate sont similaires. A titre d'exemple, la concentration en  $^{57}\text{Fe}$  exogène un jour après injection est de 26,3 ppm ( $\pm 2,1$  ppm) dans le foie et de 25,8 ppm ( $\pm 4.6$  ppm) dans la rate, pour une souris âgée de six semaines. On observe également que l'internalisation de  $^{57}\text{Fe}$  exogène dans les différents organes est indépendante de la concentration en fer endogène. En effet, les différences de concentrations en  $^{57}\text{Fe}$  exogène à un jour après injection, égale à 25,8 ppm ( $\pm 4.6$  ppm) pour une souris âgée de six semaines et à 20,6 ppm ( $\pm 4,1$  ppm) pour une souris âgée de six mois, ne sont pas significativement différentes.

Grâce aux mesures HR-ICP-MS, il est possible de quantifier le  $^{57}\text{Fe}$  exogène issu des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans les organes et dans le sang. Néanmoins, ce suivi élémentaire ne permet pas de conclure quant à l'état particulaire ou non des  $^{57}\text{NPOFs}$ . L'HR-ICP-MS permet de quantifier le fer exogène introduit et seules des mesures magnétiques pourront quantifier la fraction de nanoparticules superparamagnétiques. Ainsi en combinant ces deux méthodes, il est possible de distinguer les  $^{57}\text{NPOFs}$  de leurs produits de dégradation. Dans la suite de ce manuscrit, le fer exogène total sous forme particulaire ou non et mesuré en HR-ICP-MS sera noté  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  et le fer sous forme particulaire, soit superparamagnétique, mesuré en RFM sera noté  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$ .

### 3.4 Dégradation des $^{57}\text{NPOFs}$

#### 3.4.1 Quantification du fer superparamagnétique

Afin d'évaluer la dégradation des  $^{57}\text{NPOFs}$  il est nécessaire de pouvoir quantifier le fer superparamagnétique exogène, noté  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$ , dans un milieu biologique complexe. A température ambiante, la RFM est une technique sensible aux entités superparamagnétiques, et les entités diamagnétiques et paramagnétiques telles que les ions ferreux et ferriques provenant respectivement de l'hémoglobine et de la transferrine ne contribuent pas au signal RFM.<sup>42</sup> Le signal de la ferritine, dont le

cœur est une phase polycristalline constituée d'hématite, de ferrihydrite et de magnétite,<sup>43</sup> est négligeable comparativement au signal des <sup>57</sup>NPOFs.<sup>25</sup>

Pour quantifier le <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> contenu dans les organes à partir des signaux RFM, il est nécessaire de réaliser une courbe d'étalonnage représentant le signal RFM des <sup>57</sup>NPOFs en fonction de la masse de fer. En effet, l'aire sous la courbe représentant le signal RFM est directement proportionnelle au nombre de macrospins contenus dans l'échantillon, soit à la concentration en fer superparamagnétique.<sup>44</sup> La courbe d'étalonnage a été réalisée à partir de la solution stock des <sup>57</sup>NPOFs, dont la concentration en fer a, au préalable, été analysée par HR-ICP-MS. Pour l'analyse d'échantillons en solution, 2μL de la solution sont insérés dans un capillaire en quartz puis analysés en RFM. La Figure 3.10 (A) représente le signal RFM des <sup>57</sup>NPOFs en fonction de leur concentration en <sup>57</sup>Fe. La solution stock a été diluée deux, cinq et dix fois avant d'être analysée en RFM. En accord avec une étude précédente,<sup>25</sup> on constate que les conditions de résonance sont atteintes pour un champ égal à 3300 gauss. En calculant l'aire sous la courbe en fonction de la masse de fer, on obtient la courbe d'étalonnage (Figure 3.10 (B)).

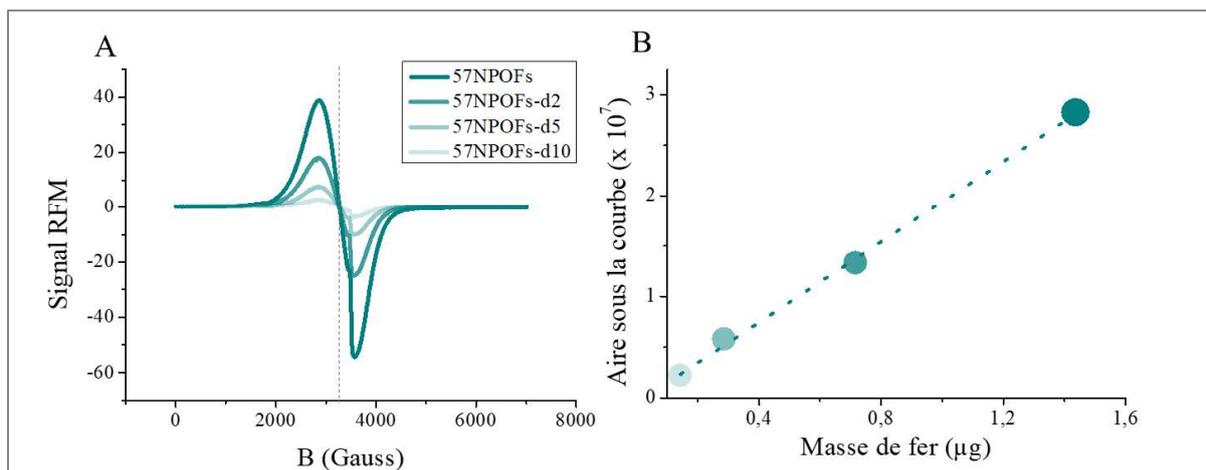


Figure 3.10 : Signal RFM en fonction de la concentration en <sup>57</sup>Fe des <sup>57</sup>NPOFs (A). Courbe d'étalonnage représentant l'aire sous la courbe du signal RFM en fonction de la masse de fer (B).

Les organes prélevés sur les souris âgées de six semaines et de six mois sont analysés et la concentration en <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> est estimée à partir de la courbe d'étalonnage. Après séchage et broyage des organes prélevés (Figure 3.2), une partie du broyat d'organe est inséré dans des tubes en quartz avant d'être analysés. La masse de fer superparamagnétique contenue dans chaque échantillon est calculée à partir de l'aire sous la courbe de leur signal RFM et de l'équation de la droite d'étalonnage. Le signal est ensuite rapporté à la masse de broyat d'organe contenue dans le tube tel que :

$$C_m(^{57}\text{Fe}_{\text{SP}})_{\text{tube}} (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{Masse de fer } (\mu\text{g})}{\text{Masse broyat d'organe}_{\text{tube}}} \quad (\text{Eq.3.7})$$

On obtient alors la concentration massique de fer superparamagnétique, notée  $C_m(^{57}\text{Fe}_{\text{SP}})$ , dans le broyat d'organe sec contenu dans le tube. Afin d'obtenir la concentration massique de fer superparamagnétique dans le morceau d'organe humide prélevé pour les analyses RFM, noté  $C_m(^{57}\text{Fe}_{\text{SP}})_{\text{humide}}$ , la concentration massique de fer contenue dans le tube est normalisée par le rapport de la masse du morceau d'organe sec sur la masse du morceau d'organe humide :

$$C_m(^{57}\text{Fe}_{\text{SP}})_{\text{humide}} (\mu\text{g/g}) = C_m(^{57}\text{Fe}_{\text{SP}})_{\text{tube}} (\mu\text{g/g}) * \frac{\text{masse}_{\text{organe sec}}}{\text{masse}_{\text{organe humide}}} \quad (\text{Eq.3.8})$$

Enfin, la masse de fer superparamagnétique contenue dans l'organe entier, notée  $m(^{57}\text{Fe}_{\text{SP}})$  est obtenue selon :

$$m(^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}) = C_m(^{57}\text{Fe}_{\text{SP}})_{\text{humide}} (\mu\text{g/g}) * \text{masse organe} \quad (\text{Eq.3.9})$$

Grâce aux trois équations ci-dessus, la masse de fer superparamagnétique est calculée dans les organes analysés. Celle-ci est exprimée, au même titre que pour l'HR-ICP-MS en pourcentage de masse injectée tel que :

$$\%_{\text{MI}} = \frac{m(^{57}\text{Fe}_{\text{SP}})}{m_{\text{injectée}}} \quad (\text{Eq.3.10})$$

Les organes foie, rate, reins et poumons ont été analysés en RFM. La concentration en  $^{57}\text{NPOFs}$  étant trop faible dans le sang, nous n'avons pas pu analyser ce dernier en RFM.

### 3.4.2 Comparaison HR-ICP-MS / RFM – analyse des organes

La quantité de fer exogène apportée par les  $^{57}\text{NPOFs}$  mesurée par HR-ICP-MS est notée  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$ , et celle sous forme superparamagnétique, notée  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  a été mesurée par RFM. A partir de ces données, on peut définir la quantité de  $^{57}\text{Fe}$  non superparamagnétique, notée  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$ , issue de la dégradation des  $^{57}\text{NPOFs}$ . Celle-ci est calculée en soustrayant la quantité de fer sous forme particulaire  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  mesurée en RFM de la quantité en fer exogène  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  mesurée en HR-ICP-MS, et exprimée en pourcentage de masse injectée (Eq.3.11).

$$\%_{\text{MI}}(^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}) = \%_{\text{MI}}(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}) - \%_{\text{MI}}(^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}) \quad (\text{Eq.3.11})$$

La [Figure 3.11](#) représente les quantités de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$ ,  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  et  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  à une heure et un jour après injection pour les souris âgées de six semaines et de six mois.

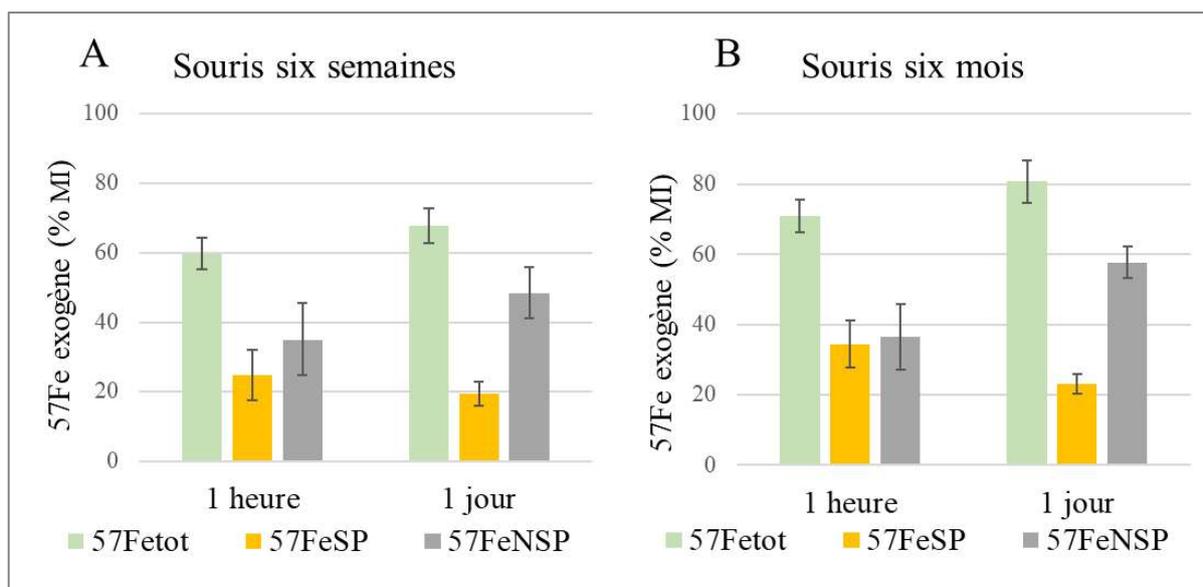


Figure 3.11 : Comparaison de la quantité de fer exogène mesurée en HR-ICP-MS (vert) et en RFM (jaune) ainsi que la différence des deux (gris) à une heure et un jour après injection, pour des souris âgées de six semaines (A) et âgées de six mois (B).

On observe que la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  mesurée en HR-ICP-MS diffère de celle mesurée en RFM, et ce à une heure et un jour après l'injection pour les deux populations de souris. A titre d'exemple, pour les souris âgées de six semaines, la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  mesurée en HR-ICP-MS représente 60 % ( $\pm 5$  %) de la masse injectée, et celle de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  mesurée en RFM est de 24,8 % ( $\pm 7,3$  %) une heure après injection. La quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  étant calculée à partir de la droite d'étalonnage réalisée à partir de la solution stock des  $^{57}\text{NPOFs}$ , il n'est ainsi pas possible d'envisager que cette différence provienne de la solution injectée. Une hypothèse pour expliquer ces résultats est que les  $^{57}\text{NPOFs}$  se dégradent dès une heure après l'injection. Afin de statuer quant à ces différences, il est nécessaire de comparer la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  à celle de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  dans un organe dans lequel il y a une internalisation significative de  $^{57}\text{NPOFs}$  et où elles ne sont pas dégradées. D'après les résultats IRM précédents (Figure 3.3), les deux organes dans lesquelles les  $^{57}\text{NPOFs}$  sont majoritairement internalisées sont le foie et la rate. Des études précédentes ont montré qu'après injection intraveineuse de NPOFs, la quantité de NPOFs dans la rate mesurée en RFM reste constante durant sept jours<sup>25</sup> ou trente jours après injection,<sup>24</sup> selon la nature des NPOFs, témoignant de leur stabilité. Ainsi, dans la rate les NPOFs ne semblent pas se dégrader aux temps courts.

### Rate

La Figure 3.12 montre les quantités de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$ ,  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  et  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  dans la rate à une heure et un jour après injection pour les deux populations de souris. On observe que la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  est sensiblement similaire à la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$ . A titre d'exemple pour les souris âgées de six mois, la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  est égale à 5,2 % ( $\pm 0,4$  %) de la masse injectée et celle de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  à 5,45 % ( $\pm 0,7$  %) à une heure après l'injection. Aussi la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$ , témoin de la dégradation des  $^{57}\text{NPOFs}$ , est négligeable à une

heure après injection et augmente légèrement à un jour après injection. En effet celle-ci est égale à 0,11 % ( $\pm 0,53$  %) et à 1,29 % ( $\pm 0,92$  %) de la masse injectée pour les souris âgées de six semaines et de six mois, respectivement.

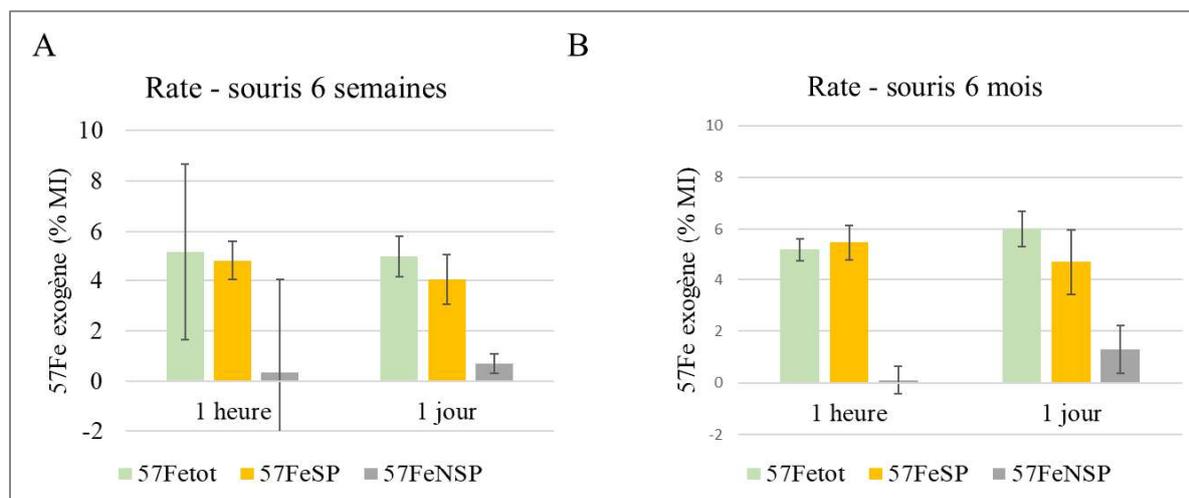


Figure 3.12 : Quantité de  $^{57}\text{Fe}$  exogène mesurée en HR-ICP-MS (vert) et en RFM (jaune) et différence des deux (gris) dans la rate, à une heure et un jour après injection, pour des souris âgées de six semaine (A) et âgées de six mois (B).

Ces résultats confirment d'une part que les  $^{57}\text{NPOFs}$  ne sont pas dégradées dans la rate un jour après l'injection, et d'autre part, qu'elles commencent à se dégrader dans la rate à partir d'un jour suivant l'injection. Les différences observées Figure 3.11 sont dues à des phénomènes de dégradation des  $^{57}\text{NPOFs}$  au sein d'organes autre que la rate.

### Foie

La Figure 3.13 la quantité de  $^{57}\text{Fe}$  exogène mesurée en HR-ICP-MS et en RFM pour les deux populations de souris une heure et un jour après injection. On constate des différences significatives entre la quantité  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  mesurée en ICP et la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  mesurée en RFM. Par exemple, une heure après injection, la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  représente 49,3 % ( $\pm 2,7$  %) de la masse injectée contre seulement 19 % ( $\pm 7$  %) pour la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$ . Ces résultats signifient qu'une heure après injection, une partie des  $^{57}\text{NPOFs}$  ne sont plus sous la forme particulière, mais sous la forme d'entités non superparamagnétiques, telles que des ions fer (III). On constate que la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  augmente de 30,7 % ( $\pm 6,4$  %) à 45,4 % ( $\pm 9,5$  %) et de 36,3 % ( $\pm 8,4$  %) à 55,4 % ( $\pm 4,6$  %) entre une heure et un jour pour les souris de six semaines et de six mois, respectivement. Cette augmentation entre une heure et un jour a été observée indépendamment sur les deux populations de souris et confirme ainsi que les  $^{57}\text{NPOFs}$  se dégradent dans le foie dès une heure après l'injection.

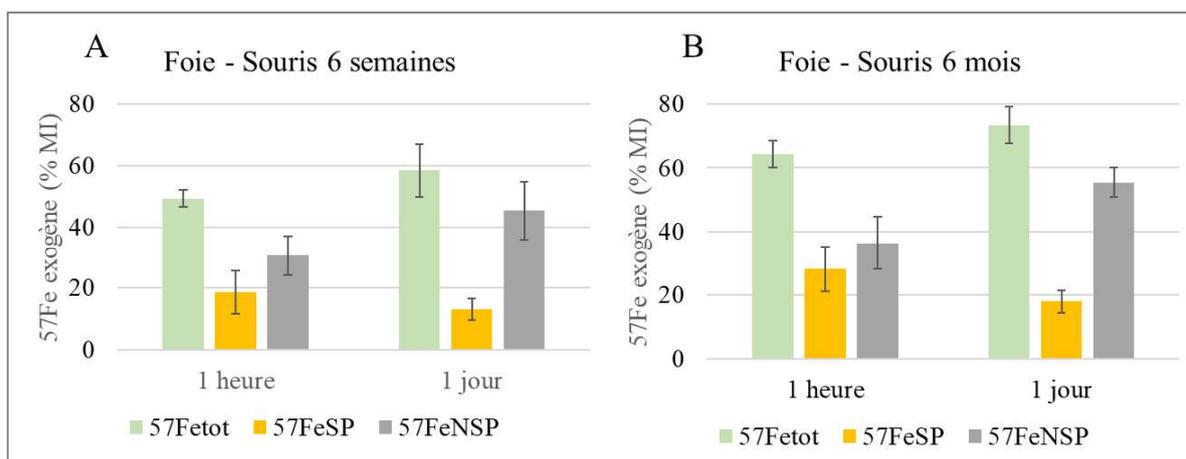


Figure 3.13 : Quantité de  $^{57}\text{Fe}$  exogène mesurée en HR-ICP-MS (vert), RFM (jaune) et différence de ces deux valeurs (gris) une heure et un jour après injection dans le foie pour les souris âgées de 6 semaines (A) et de 6 mois (B).

### Reins et poumons

Seule une minorité du  $^{57}\text{Fe}$  exogène injecté est localisée dans les reins et les poumons (Figure 3.9). La Figure 3.14 représente la quantité de  $^{57}\text{Fe}$  exogène mesurée en HR-ICP-MS et en RFM dans les poumons (A et B) et dans les reins (C et D) à une heure et un jour après injection, pour des souris âgées de six semaines et six mois. On constate tout d'abord que la quantité de  $^{57}\text{Fe}$  n'excède pas 1 % de la masse injectée dans ces deux organes. Ainsi seule une fraction négligeable est localisée dans ces organes. Dans les poumons, on observe une diminution de la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  et de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  entre une heure et un jour pour les souris de six semaines. En effet, la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  varie de 0,7 % ( $\pm 0,3$  %) à 0,34 % ( $\pm 0,08$  %) de la masse injectée et de 0,84 % ( $\pm 0,15$  %) à 0,23 % ( $\pm 0,07$  %) pour celle de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$ . La diminution simultanée des  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  et  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  suggère une élimination du  $^{57}\text{Fe}$  exogène des poumons plutôt qu'une dégradation, comme observé dans le foie. Dans les reins, un jour après injection, on observe une différence significative entre la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  et de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  pour les souris de six mois, caractéristique de la dégradation des  $^{57}\text{NPOFs}$ .

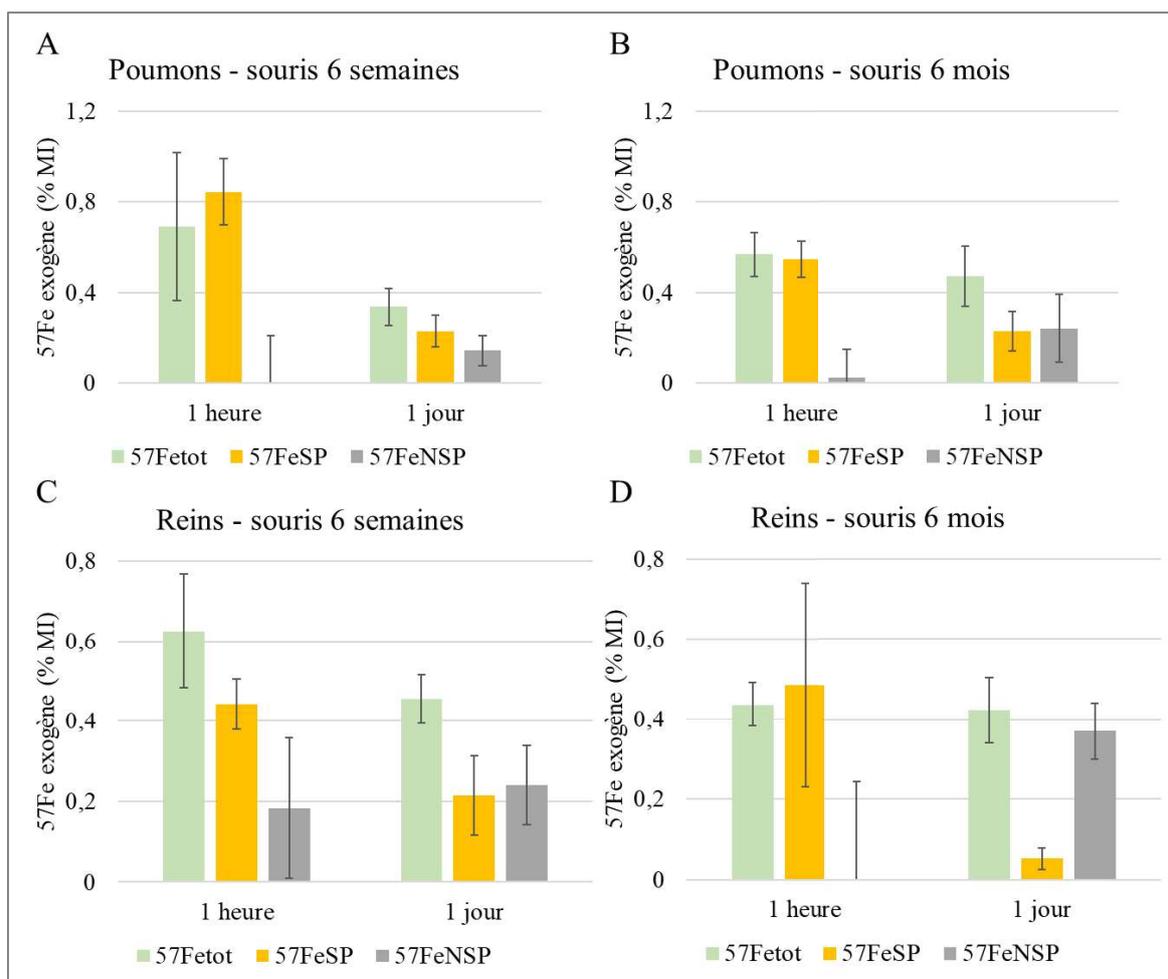


Figure 3.14 : Quantité de  $^{57}\text{Fe}$  exogène mesurée en HR-ICP-MS (vert), RFM (jaune) dans les poumons (A et B) et dans les reins (C et D) une heure et un jour après injection pour les souris âgées de 6 semaines et de 6 mois.

### 3.4.3 Quantification de la dégradation

Dans cette section, nous nous limiterons à la description de la dégradation des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans les organes contenant une quantité non négligeable de  $^{57}\text{Fe}$  exogène, soit le foie et la rate. On peut exprimer le taux de dégradation  $\xi_D$  qui caractérise la dégradation des  $^{57}\text{NPOFs}$  en fonction du temps tel que :

$$\xi_D = \frac{\%_{\text{MI}}(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}) - \%_{\text{MI}}(^{57}\text{Fe}_{\text{SP}})}{\%_{\text{MI}}(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}})} \quad (\text{Eq.3.12})$$

Lorsque les  $^{57}\text{NPOFs}$  ne sont pas dégradées, alors les quantités  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  détectée par HR-ICP-MS et  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  par RFM sont égales et  $\xi_D$  est égal à zéro. Lorsque les  $^{57}\text{NPOFs}$  se dégradent,  $\xi_D$  augmente jusqu'à une valeur limite égale à 1, atteinte lorsque toutes les  $^{57}\text{NPOFs}$  sont dégradées, la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  est alors nulle (Figure 3.15). En calculant le taux de dégradation, on fait l'hypothèse qu'une fois les  $^{57}\text{NPOFs}$  localisées dans les organes et éventuellement dégradées, il n'y a pas de recirculation de celles-ci ou des produits de dégradation dans l'organisme. Autrement dit, on néglige l'élimination des  $^{57}\text{NPOFs}$

des organes. Dans le cadre de cette expérience, les temps d'observation sont au maximum de vingt-quatre heures. Or, d'après les résultats HR-ICP-MS présentés précédemment (Figure 3.12 et Figure 3.13), il n'y a pas de diminution de la quantité  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$ , ainsi le calcul du taux de dégradation peut être réalisé dans le foie et dans la rate pour ces temps d'observation.

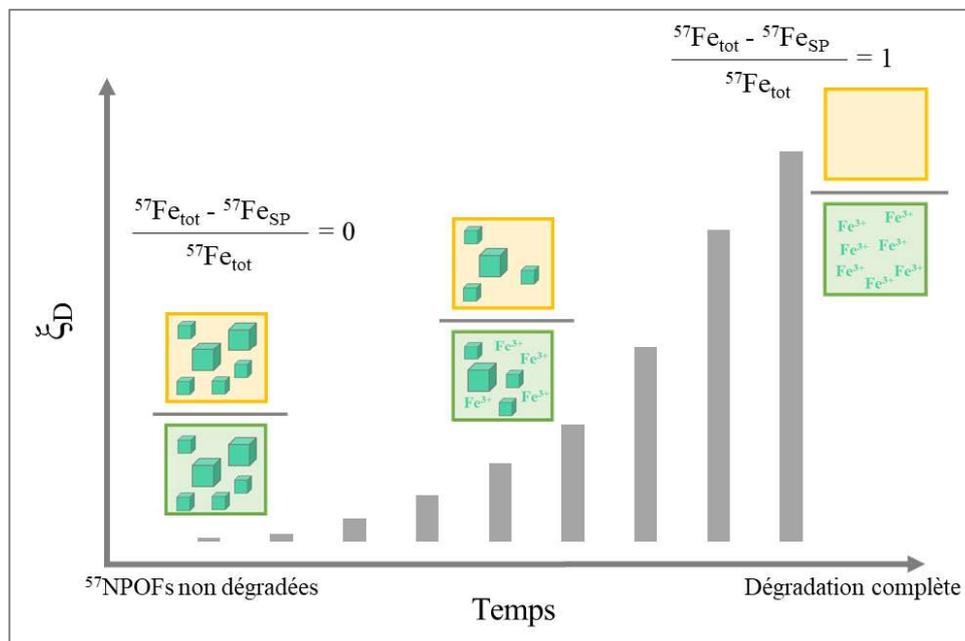


Figure 3.15 : Taux de dégradation en fonction du temps. Aux temps courts, lorsque les  $^{57}\text{NPOFs}$  ne sont pas dégradées, le taux de dégradation est égal à 0. Une fois que les  $^{57}\text{NPOFs}$  se dégradent, le taux de dégradation augmente en fonction du temps jusqu'à atteindre une valeur limite égale à 1 pour laquelle toutes les  $^{57}\text{NPOFs}$  sont dégradées.

Le taux de dégradation est calculé dans la rate (Figure 3.16 (A)) et dans le foie (Figure 3.16 (B)) d'après l'équation (3.10) une heure et un jour après injection dans les deux populations de souris.

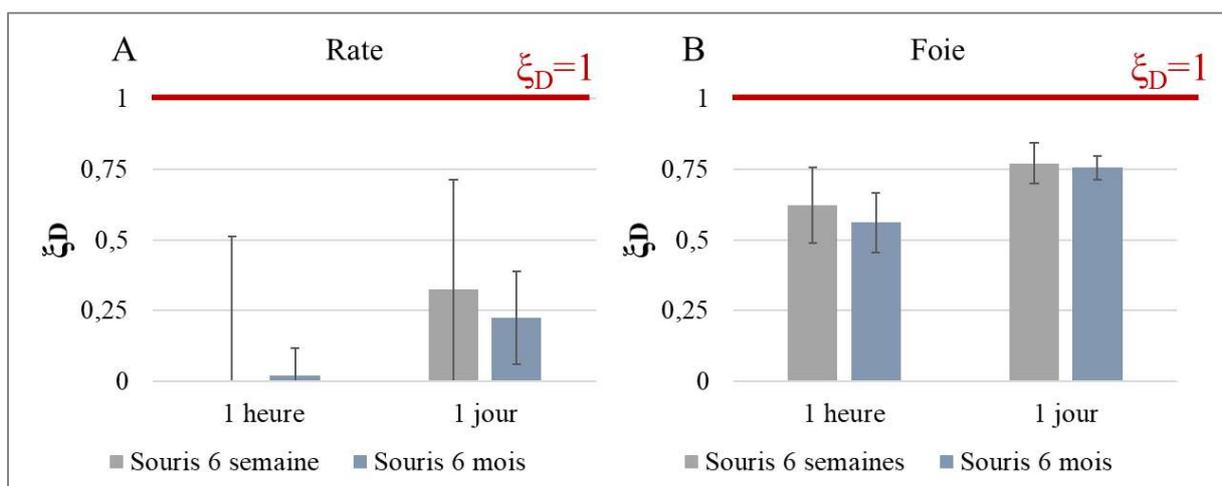


Figure 3.16 : Calcul du taux de dégradation dans la rate (A) et dans le foie (B) pour des souris âgées de six semaines et de six mois, une heure et un jour après injection intraveineuse.

Le taux de dégradation dans la rate à une heure après injection est proche de zéro pour les deux populations de souris, signifiant que pour ce temps, les  $^{57}\text{NPOFs}$  ne sont pas dégradées. L'augmentation du taux de dégradation un jour après injection n'est pas significative. Aussi, dans la rate, les  $^{57}\text{NPOFs}$  ne semblent pas être dégradées pour ces temps d'observation. En revanche, seulement une heure après injection, on constate que le taux de dégradation dans le foie est égal à 0,62 ( $\pm 0,13$ ) et à 0,56 ( $\pm 0,11$ ) pour les souris de six semaines et de six mois respectivement. Ces valeurs montrent que les  $^{57}\text{NPOFs}$  sont dégradées dans le foie pendant la première heure suivant l'injection. On observe également que cette valeur augmente jusqu'à 0,77 ( $\pm 0,07$ ) et 0,76 ( $\pm 0,04$ ) un jour après injection alors que le pourcentage de la masse injectée mesuré en HR-ICP-MS reste constant (Figure 3.13), ce qui confirme la dégradation des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans le temps.

## 4. Conclusion

---

En combinant des mesures d'analyses élémentaires (HR-ICP-MS) et des mesures magnétiques (RFM) nous avons élaboré une méthode de caractérisation de l'intégrité du cœur inorganique des NPOFs *in vivo*. Pour réaliser ce double suivi, nous avons synthétisé des  $^{57}\text{NPOFs}$  enrichies en  $^{57}\text{Fe}$  afin de distinguer le fer exogène du fer endogène. Les  $^{57}\text{NPOFs}$  ont été synthétisées à partir du précurseur  $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$  en adaptant la synthèse proposée par Park *et al.*<sup>34</sup>. L'analyse des propriétés magnétiques des  $^{57}\text{NPOFs}$  montre qu'elles possèdent des propriétés d'agents de contraste négatifs pour l'IRM, et constituent en ce sens de bons modèles pour étudier la biodistribution.

Nous avons en premier lieu évalué la quantité de  $^{57}\text{Fe}$  issus des  $^{57}\text{NPOFs}$  par HR-ICP-MS dans plusieurs matrices biologiques telles que le foie, les selles, l'urine et le sang. Ces expériences préliminaires ont permis, d'une part, de valider la méthode de détection des  $^{57}\text{NPOFs}$  par HR-ICP-MS et, d'autre part, de quantifier la limite de détection des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans ces différentes matrices.

Nous avons ensuite combiné les mesures d'HR-ICP-MS à des mesures de RFM afin de suivre l'intégrité des  $^{57}\text{NPOFs}$  jusqu'à un jour après injection intraveineuse chez la souris. Les résultats montrent que la majorité des  $^{57}\text{NPOFs}$  sont rapidement internalisées dans la rate et dans le foie. Dans la rate les  $^{57}\text{NPOFs}$  ne se dégradent pas comparativement au foie où une dégradation importante est observée après une heure. On peut comparer ces résultats avec ceux d'une étude précédente qui a montré qu'un jour après injection intraveineuse de  $50\ \mu\text{mol/kg}$  de nanocubes (NC)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  d'une taille de  $19\ \text{nm}$ , soit une dose de  $56\ \mu\text{g}$  par souris de  $20\ \text{g}$ , ceux-ci sont présents dans le foie à hauteur de  $30\ \%$  de la masse injectée.<sup>45</sup> Bien que dans cette étude, le taux de dégradation n'ait pas été quantifié, le pourcentage de NPOFs-SP à un jour après injection est supérieur à celui mesuré pour notre étude (environ  $13\ \%$  de la masse injectée pour les souris de six semaines). Cette différence suggère que les  $^{57}\text{NPOFs}$  se dégradent plus rapidement que les NC, ce qui peut être dû d'une part à la différence de taille et de composition des nanoparticules ou d'autre part à leur état d'agrégation après internalisation dans les cellules du foie, et en particulier les cellules de Kupffer. En effet, d'après la [Figure 4.1](#), on observe que les NC de Kolosnjaj-Tabi *et al.* sont sous forme d'agrégats alors que les  $^{57}\text{NPOFs}$  que nous avons injectées sont dispersées dans les lysosomes des cellules hépatiques. Or, l'agrégation des nanoparticules les protège partiellement de la dégradation, ce qui pourrait expliquer les différences de dégradation observées.

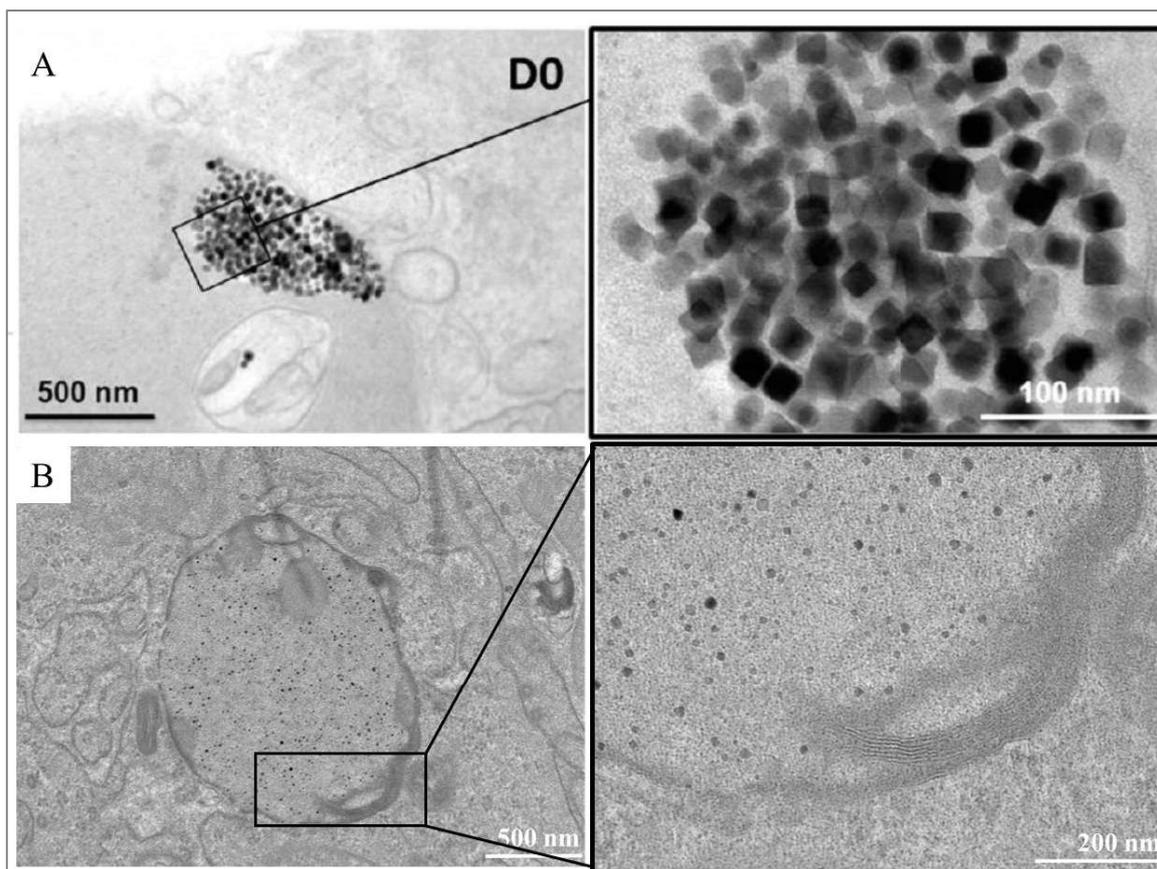


Figure 4.1 : Image de MET des NC (A) extrait de [45] et des <sup>57</sup>NPOFs (B) localisées dans des cellules hépatiques après injection intraveineuse.

Nos résultats montrent également qu'il y a une différence significative de la dégradation dans le foie et dans la rate. La rate est un organe constitué de deux entités, la pulpe rouge et la pulpe blanche. La pulpe rouge constitue une réserve de monocytes (globules blancs) qui peuvent se différencier en macrophages, elle permet également la filtration des érythrocytes (globules rouges). La pulpe blanche est composée essentiellement de lymphocytes B et T qui sont des cellules du système immunitaire. Le foie quant à lui est composé essentiellement de cellules de Kupffer (macrophages), de cellules endothéliales et d'hépatocytes. Les macrophages ainsi que les cellules endothéliales sont des phagocytes, elles peuvent phagocyter des entités étrangères. Ces constatations nous ont permis de formuler une première hypothèse selon laquelle la différence de dégradation observée dans le foie et dans la rate provient de la différence de composition cellulaire de ces deux organes. La seconde hypothèse provient de la différence de la concentration endogène en fer dans le foie et dans la rate. En effet, d'après la Figure 3.1 et le Tableau 5, la concentration en fer endogène est d'environ 110 ppm dans le foie et 300 ppm dans la rate. Ainsi après internalisation des <sup>57</sup>NPOFs dans la rate, l'augmentation de la concentration en fer jusqu'à une potentielle saturation pourrait diminuer les capacités de dégradation de la rate.

Ainsi, une première perspective de ces travaux consisterait à comparer les mécanismes de dégradation des  $^{57}\text{NPOFs}$  à l'échelle cellulaire au sein de différents types cellulaires hépatiques et spléniques.

Le but de ces travaux était de développer une méthode permettant de suivre simultanément les  $^{57}\text{NPOFs}$  ainsi que leurs produits de dégradation. Ces expériences préliminaires sur un nombre réduit de souris ont permis de démontrer la robustesse du double suivi des  $^{57}\text{NPOFs}$  *in vivo* grâce au marquage isotopique avec le  $^{57}\text{Fe}$ . L'objectif étant de suivre les dynamique spatiale et temporelle de dégradation des  $^{57}\text{NPOFs}$  sur le long terme. Nous avons donc transposé cette approche sur une plus grosse cohorte, représentant un total de cent quarante-quatre souris, les crazy 144s. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre suivant.



1. Sakulkhu, U., Mahmoudi, M., Maurizi, L., Salaklang, J. & Hofmann, H. Protein Corona Composition of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Various Physico-Chemical Properties and Coatings. *Sci. Rep.* **4**, 5020 (2014).
2. Sacchetti, C. *et al.* Surface Polyethylene Glycol Conformation Influences the Protein Corona of Polyethylene Glycol-Modified Single-Walled Carbon Nanotubes: Potential Implications on Biological Performance. *ACS Nano* **7**, 1974–1989 (2013).
3. Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 428–437 (2009).
4. Karmali, P. P. & Simberg, D. Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **8**, 343–357 (2011).
5. Walkey, C. D. & Chan, W. C. W. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2780–2799 (2012).
6. Lynch, I. & Dawson, K. A. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* **3**, 40–47 (2008).
7. Lynch, I., Salvati, A. & Dawson, K. A. Protein-nanoparticle interactions: What does the cell see? *Nat. Nanotechnol.* **4**, 546–547 (2009).
8. Walczyk, D., Bombelli, F. B., Monopoli, M. P., Lynch, I. & Dawson, K. A. What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 5761–5768 (2010).
9. Bertoli, F. *et al.* Magnetic Nanoparticles to Recover Cellular Organelles and Study the Time Resolved Nanoparticle-Cell Interactome throughout Uptake. *Small* **10**, 3307–3315 (2014).
10. Lundqvist, M. *et al.* The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study. *ACS Nano* **5**, 7503–7509 (2011).
11. Wang, F. *et al.* The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **9**, 1159–1168 (2013).
12. Bargheer, D. *et al.* The fate of a designed protein corona on nanoparticles in vitro and in vivo. *Beilstein J. Nanotechnol.* **6**, 36–46 (2015).
13. Lartigue, L. *et al.* Nanomagnetic Sensing of Blood Plasma Protein Interactions with Iron Oxide Nanoparticles: Impact on Macrophage Uptake. *ACS Nano* **6**, 2665–2678 (2012).
14. Feliu, N. *et al.* In vivo degeneration and the fate of inorganic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 2440–2457 (2016).
15. Sée, V. *et al.* Cathepsin L Digestion of Nanobioconjugates upon Endocytosis. *ACS Nano* **3**, 2461–2468 (2009).
16. Lunov, O. *et al.* Lysosomal degradation of the carboxydextran shell of coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and the fate of professional phagocytes. *Biomaterials* **31**, 9015–9022 (2010).

17. Wang, H. *et al.* Integrity of (111)In-radiolabeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the mouse. *Nucl. Med. Biol.* **42**, 65–70 (2015).
18. Freund, B. *et al.* A Simple and Widely Applicable Method to <sup>59</sup>Fe-Radiolabel Monodisperse Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for *In Vivo* Quantification Studies. *ACS Nano* **6**, 7318–7325 (2012).
19. Kreyling, W. G. *et al.* In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 619–623 (2015).
20. *Design and Applications of Nanoparticles in Biomedical Imaging* | J W M Bulte | Springer.
21. Soenen, S. J., Parak, W. J., Rejman, J. & Manshian, B. (Intra)Cellular Stability of Inorganic Nanoparticles: Effects on Cytotoxicity, Particle Functionality, and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **115**, 2109–2135 (2015).
22. Bargheer, D. *et al.* The distribution and degradation of radiolabeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles and quantum dots in mice. *Beilstein J. Nanotechnol.* **6**, 111–123 (2015).
23. Weissleder, R. *et al.* Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am. J. Roentgenol.* **152**, 167–173 (1989).
24. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* The One Year Fate of Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles in Mice. *ACS Nano* **9**, 7925–7939 (2015).
25. Levy, M. *et al.* Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 3988–3999 (2011).
26. Les nouveaux isotopes dans les sciences de l'eau - L'Actualité Chimique. Available at: <https://www.lactualitechimique.org/Les-nouveaux-isotopes-dans-les-sciences-de-l-eau>. (Accessed: 8th January 2018)
27. Yin, N.-H., van Hullebusch, E. D., Benedetti, M., Lens, P. N. L. & Sivry, Y. Zn isotopes fractionation during slags' weathering: One source of contamination, multiple isotopic signatures. *Chemosphere* **195**, 483–490 (2018).
28. Le devenir de l'azote dans les litières forestières : étude par marquage isotopique - L'Actualité Chimique. Available at: <http://www.lactualitechimique.org/Le-devenir-de-l-azote-dans-les-litieres-forestieres-Etude-par-marquage-isotopique>. (Accessed: 8th January 2018)
29. Larner, F. *et al.* Tracing Bioavailability of ZnO Nanoparticles Using Stable Isotope Labeling. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 12137–12145 (2012).
30. Bourgeault, A. *et al.* The Challenge of Studying TiO<sub>2</sub> Nanoparticle Bioaccumulation at Environmental Concentrations: Crucial Use of a Stable Isotope Tracer. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 2451–2459 (2015).
31. Livechart - Table of Nuclides - Nuclear structure and decay data. Available at: <https://www-nds.iaea.org/relnsd/vcharthtml/VChartHTML.html>. (Accessed: 10th January 2018)

32. Croteau, M.-N., Luoma, S. N. & Pellet, B. Determining metal assimilation efficiency in aquatic invertebrates using enriched stable metal isotope tracers. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* **83**, 116–125 (2007).
33. May, T. W. & Wiedmeyer, R. H. A table of polyatomic interferences in ICP-MS. *At. Spectrosc.* **19**, 6 (1998).
34. Park, J. *et al.* Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat. Mater.* **3**, 891–895 (2004).
35. LaMer, V. K. & Dinegar, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 4847–4854 (1950).
36. Dodson, R. W., Forney, G. J. & Swift, E. H. The Extraction of Ferric Chloride from Hydrochloric Acid Solutions by Isopropyl Ether. *J. Am. Chem. Soc.* **58**, 2573–2577 (1936).
37. Jun, Y., Choi, J. & Cheon, J. Shape Control of Semiconductor and Metal Oxide Nanocrystals through Nonhydrolytic Colloidal Routes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 3414–3439 (2006).
38. Lartigue, L. *et al.* Biodegradation of Iron Oxide Nanocubes: High-Resolution In Situ Monitoring. *ACS Nano* **7**, 3939–3952 (2013).
39. Wang, W. *et al.* Design of a Multi-Dopamine-Modified Polymer Ligand Optimally Suited for Interfacing Magnetic Nanoparticles with Biological Systems. *Langmuir* **30**, 6197–6208 (2014).
40. Rohrer, M., Bauer, H., Mintorovitch, J., Requardt, M. & Weinmann, H.-J. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest. Radiol.* **40**, 715–724 (2005).
41. Kimura, F. T. & Miller, V. L. Chromic Oxide Measurement, Improved Determination of Chromic Oxide in Cow Feed and Feces. *J. Agric. Food Chem.* **5**, 216–216 (1957).
42. Ślawska-Waniewska, A., Mosiniewicz-Szablewska, E., Nedelko, N., Gałazka-Friedman, J. & Friedman, A. Magnetic studies of iron-entities in human tissues. *J. Magn. Magn. Mater.* **272–276, Part 3**, 2417–2419 (2004).
43. Gálvez, N. *et al.* Comparative Structural and Chemical Studies of Ferritin Cores with Gradual Removal of their Iron Contents. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 8062–8068 (2008).
44. Wilhelm, C., Gazeau, F. & Bacri, J.-C. Magnetophoresis and ferromagnetic resonance of magnetically labeled cells. *Eur. Biophys. J.* **31**, 118–125 (2002).
45. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle “Destructurators” of the Tumoral Microenvironment. *ACS Nano* **8**, 4268–4283 (2014).



# Chapitre 4

## Suivi *in vivo* des $LT^{57}NPOFs$

---

### Table des matières

---

- 1. Résultats du marquage du cœur inorganique et de l'enrobage**
  - 1.1 Marquage du cœur inorganique
  - 1.2 Marquage de l'enrobage
  - 1.3 Greffage du polymère sur les  $^{57}NPOFs$
  - 1.4 Propriétés magnétiques des  $LT^{57}NPOFs$
  - 1.5 Design de l'expérience
- 2. Devenir du cœur inorganique - résultats**
  - 2.1 Quantification du fer exogène des  $LT^{57}NPOFs$  par HR-ICP-MS
  - 2.2 Dégradation des  $LT^{57}NPOFs$
  - 2.3 Discussion
- 3. Devenir de l'enrobage**
  - 3.1 Efficacité du marquage du polymère avec les complexes de lanthanides
  - 3.2 Intégrité des  $LT^{57}NPOFs$
  - 3.3 Discussion
- 4. Conclusion**

Dans le chapitre précédent, nous avons pu évaluer la méthode d'enrichissement isotopique avec du  $^{57}\text{Fe}$  pour le suivi élémentaire des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans des matrices biologiques. Nous avons en outre couplé cette méthode à des mesures magnétiques pour le double suivi de  $^{57}\text{NPOFs}$  *in vivo*, sur un modèle murin, durant 24 heures après injection intraveineuse. La combinaison de ces deux méthodes a permis de suivre l'intégrité du cœur inorganique, en distinguant, d'une part, les entités particulières,  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  et, d'autre part, les entités non particulières,  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  issues de la dégradation des  $^{57}\text{NPOFs}$ . Cette expérience, réalisée sur un nombre réduit d'animaux, a constitué une expérience préliminaire validant la pertinence du couplage des méthodes RFM et HR-ICP-MS pour le suivi du cœur inorganique. Afin d'évaluer le devenir du cœur inorganique ainsi que les dynamiques de circulation des produits issus de la dégradation des  $^{57}\text{NPOFs}$  sur le long terme, nous avons réalisé une étude sur une période de six mois. L'enrobage des  $^{57}\text{NPOFs}$  a été marqué avec des lanthanides afin d'apprécier l'intégrité des  $^{57}\text{NPOFs}$  et de leur enrobage sur cette même période, cette stratégie a été présentée dans le chapitre 2. Ce chapitre est consacré à la présentation de cette étude.

# 1. Résultats du marquage du cœur inorganique et de l'enrobage

Nous présenterons en premier lieu les résultats obtenus pour le cœur inorganique et, dans un second temps, la stratégie adoptée pour le marquage de l'enrobage, ainsi que les résultats obtenus.

## 1.1 Marquage du cœur inorganique

Le chapitre précédent a permis de valider la robustesse du marquage du cœur inorganique avec l'isotope  $^{57}\text{Fe}$ . De ce fait, cette méthodologie sera conservée pour cette expérience. Une nouvelle synthèse a néanmoins été réalisée pour avoir suffisamment de nanoparticules pour étudier leur devenir à long terme sur six mois, ce qui représente un total de 60 souris (injectées avec les  $^{57}\text{NPOFs}$ ). La synthèse a donc été réalisée dans les mêmes conditions et à partir du même précurseur que dans le chapitre 3. La taille des  $^{57}\text{NPOFs}$  a été analysée par MET et leur composition isotopique par HR-ICP-MS (Figure 1.1).

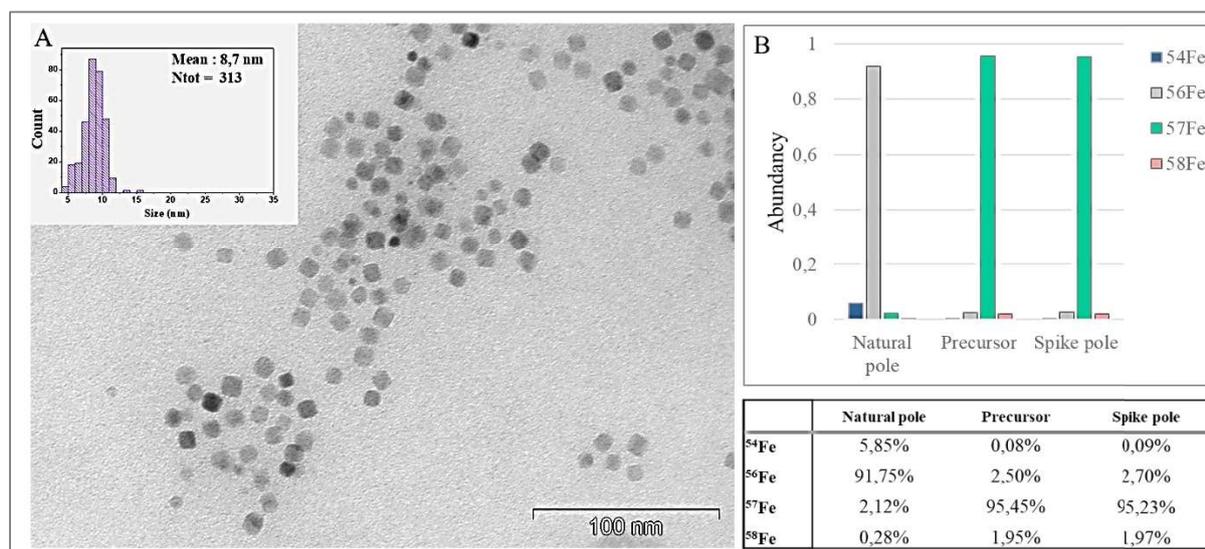


Figure 1.1 : Images de MET et distribution en taille des  $^{57}\text{NPOFs}$  synthétisées avec le précurseur  $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$  (A). Composition isotopique du fond endogène, du précurseur et des  $^{57}\text{NPOFs}$  (B).

Les  $^{57}\text{NPOFs}$  ont une taille moyenne, analysée en MET, égale à 8,7 nm ( $\pm 1,6$  nm) et sont de forme cubique. On constate que les  $^{57}\text{NPOFs}$  issues de cette synthèse sont légèrement plus petites que celles étudiées dans le chapitre précédent, dont la taille moyenne est de 9,4 nm ( $\pm 2,6$  nm). L'abondance de chaque isotope est déterminée par le rapport de l'intensité (*i.e.* le signal ICP-MS) de l'isotope considéré sur la somme des intensités de chaque isotope. Le calcul, présenté dans le chapitre précédent, est rappelé dans l'équation ci-dessous (Eq. 3.1).

$$A^i(E) = \frac{\text{Intensité } ({}^iE)}{\sum_j \text{Intensité } ({}^jE) = I_{\text{tot}}} \quad (\text{Eq.3.1})$$



On constate l'ouverture des anhydrides présents sur le PIMA, caractérisée par le décalage du pic présent à  $1766\text{ cm}^{-1}$  vers  $1660\text{ cm}^{-1}$  pour le polymère Dopa-PIMA-PEG. En effet, le pic à  $1766\text{ cm}^{-1}$  correspond à la vibration d'élongation de la double liaison C=O des anhydrides tandis que celui à  $1660\text{ cm}^{-1}$  correspond à la vibration d'élongation de la double liaison C=O des amides et des acides carboxyliques. On constate également un pic à  $1090\text{ cm}^{-1}$  pour le PEG-NH<sub>2</sub> et le Dopa-PIMA-PEG, caractéristique de la vibration d'élongation des liaisons C-N des amides et C-O des éthers. Enfin, sur le spectre du Dopa-PIMA-PEG, on observe la présence d'une bande faible vers  $3300\text{ cm}^{-1}$  caractérisant la vibration d'élongation des liaisons OH et NH<sub>2</sub> issues des acides carboxyliques et des amines primaires, respectivement. Cette bande peut aussi témoigner de l'éventuelle hydratation du polymère Dopa-PIMA-PEG. On constate également pour les trois spectres, plusieurs pics entre  $2865\text{ cm}^{-1}$  et  $3000\text{ cm}^{-1}$ , correspondant aux vibrations d'élongation des liaisons C-H. Le spectre infra-rouge du polymère Dopa-PIMA-PEG synthétisé montre que les anhydrides se sont ouverts au profit d'acides carboxyliques et d'amides. Aussi le PEG-NH<sub>2</sub> est greffé sur la chaîne principale PIMA.

Le polymère Dopa-PIMA-PEG a ensuite été fonctionnalisé avec les complexes de lanthanides Lt-p-SCN-Bn-DOTA. Les coûts des complexes de lanthanides sont non négligeables et s'élèvent à environ 700 \$ pour 50 mg. Aussi, la quantité de lanthanide à ajouter a été calculée en définissant le rapport lanthanide/fer maximal obtenu à partir des quantités de complexe à notre disposition. Ce rapport égal à environ 0,1 correspond à greffer un lanthanide pour cinq amines disponibles sur le polymère.

### 1.2.2 Analyse ICP-MS du double marquage du polymère

La quantité de lanthanide greffée est ensuite caractérisée par ICP-MS en haute résolution (HR-ICP-MS). Le principe de ce spectromètre de masse a été présenté dans le chapitre précédent, et le protocole est identique. La liste des interférences polyatomiques et isobariques associées aux lanthanides est présenté en Annexe 4.

La concentration en lanthanide a été déterminée grâce au logiciel uFREASI pour *user-FRiendly Elemental dAta procesSIing*). Ce logiciel développé par Tharaud *et al.*, nos collaborateurs de l'IPGP, permet de standardiser le traitement des données HR-ICP-MS. Celui-ci, étant adapté pour la détermination de la concentration élémentaire, ne permet pas néanmoins de calculer les rapports isotopiques. C'est pour cette raison que les données relatives aux isotopes du fer n'ont pas pu être traitées par ce logiciel. Ainsi, la concentration des différents isotopes du fer a été déterminée en utilisant les équations présentées dans le chapitre précédent.

Les analyses HR-ICP-MS du polymère fonctionnalisé avec les complexes de lanthanides, noté Dopa-PIMA-PEG-Lt, montrent qu'il y a environ un lanthanide greffé pour 60 amines disponibles. Cette quantité est sous-estimée car le calcul du nombre d'amines est réalisé en supposant que l'intégralité des amines introduites a réagi et est sur la chaîne PIMA. Toutefois, cette quantité est bien inférieure à la quantité de greffage théorique présenté ci-dessus (un lanthanide pour cinq amines). Aussi, le rendement

de la fonctionnalisation par les lanthanides, égal à environ 8 % est très faible. Une hypothèse pour expliquer ce rendement particulièrement faible est que les amines disponibles réagissent avec les acides carboxyliques résiduels, issus de l'ouverture des anhydrides en intramoléculaire (Figure 1.3 (A)) ou avec ceux d'autres chaînes polymériques (Figure 1.3 (B)). Des liaisons covalentes peuvent être formées entre les amines et les acides carboxyliques, comme présenté dans la Figure 1.3, ou des liaisons hydrogènes entre ces deux entités. En effet, le PEG bifonctionnel utilisé pour la synthèse possède un poids moléculaire égal à 1500 g/mol et possède une chaîne plus longue que celui utilisé par Wang *et al.*, dont le poids moléculaire est d'environ 600 g/mol.<sup>1</sup> L'utilisation d'une chaîne polymérique plus longue pourrait aussi être à l'origine de ces différences de réactivités.

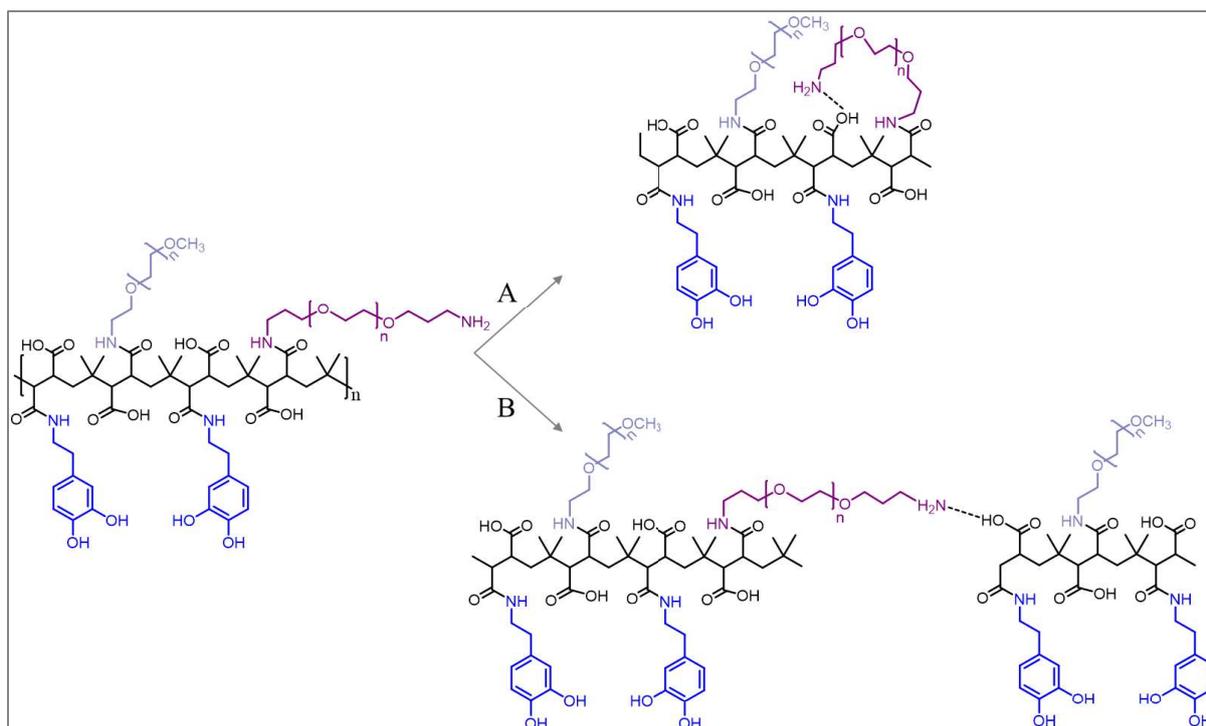


Figure 1.3 : Eventuelles réactions entre les amines disponibles présentes sur les PEG avec les acides carboxyliques résiduels.

### 1.3 Greffage du polymère sur les $^{57}\text{NPOFs}$

Pour une meilleure compréhension des notations et afin de distinguer les NPOFs utilisées dans le chapitre précédent, notées  $^{57}\text{NPOFs}$ , celles fonctionnalisées avec des lanthanides seront notées  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans la suite de ce manuscrit. Néanmoins nous conserverons les notations établies dans le chapitre précédent pour distinguer la quantité de fer exogène mesurée par HR-ICP-MS, notée  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$ , celle mesurée en RFM, notée  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  et les produits de dégradation calculés par soustraction de la quantité  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  de la quantité  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$ , notés  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$ .

### 1.3.1 Greffage du polymère sur les $^{57}\text{NPOFs}$

Le polymère Dopa-PIMA-PEG-Lt a ensuite été greffé sur les  $^{57}\text{NPOFs}$ . Le greffage est réalisé par échange de ligand entre les acides oléiques en surface et le Dopa-PIMA-PEG-Lt, *via* les groupements catéchols présents sur la dopamine, comme présenté dans le chapitre précédent. Après réaction pendant une nuit à 50 °C dans du THF, les  $^{57}\text{NPOFs}$  sont purifiées afin d'éliminer les polymères en excès ainsi que les molécules d'acide oléiques, *via* plusieurs cycles de lavage par centrifugation-redispersion. Les  $^{57}\text{NPOFs}$  qui, après synthèse, sont stables dans des solvants organiques tels que l'hexane, se dispersent dans des milieux aqueux après greffage du polymère et purification, signe de la présence du Dopa-PIMA-PEG-Lt en surface de celles-ci.

### 1.3.2 Taille et composition isotopique des $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$

La taille des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  a été analysée en DLS (Figure 1.4). En intensité, on observe la présence de deux pics, l'un à 14,4 nm ( $\pm 4,1$  nm), caractéristique des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  individuelles et l'autre à 260 nm ( $\pm 300$  nm), caractéristique de la présence d'agrégats de  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  ou d'impuretés dans la solution. En outre, on observe un unique pic lorsque la distribution en taille est analysée en nombre, ce qui confirme la présence majoritaire de  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  individuelles. Le diamètre hydrodynamique rend compte de la couche de polymère et de solvation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ , ainsi il est attendu que sa valeur, égale à 14,4 nm ( $\pm 4,1$  nm), soit supérieure à celle mesurée en MET.

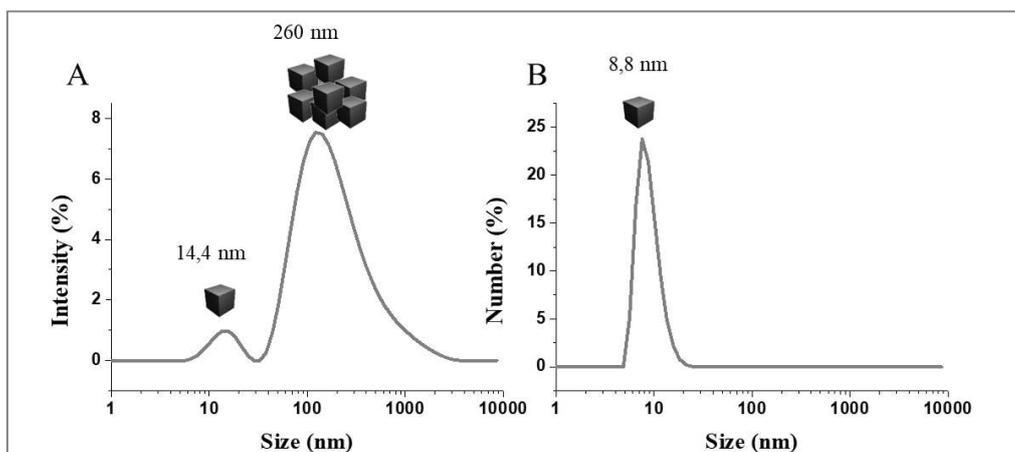


Figure 1.4 : Distribution du diamètre hydrodynamique des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  en intensité (A) et en nombre (B).

L'analyse en HR-ICP-MS des solutions de Dopa-PIMA-PEG-Lt et de  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  a permis de déterminer la quantité de lanthanides greffée au polymère comparativement au nombre d'amines disponibles et au nombre d'atomes de fer. Le Tableau 10 présente les quantités de lanthanides greffées sur le polymère Dopa-PIMA-PEG et sur les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ . Le rapport fer/lanthanides égal à 0,022 est significativement inférieur au rapport théorique attendu égal à 0,1. Ainsi, et en cohérence avec les observations précédentes, le rendement apparent de fonctionnalisation du polymère par les lanthanides,

égal à environ 8 %, est très faible. Comme exposé précédemment, la réaction des amines avec les acides carboxyliques résiduels pourrait être à l'origine de ce rendement faible (Figure 1.3).

		Expérimental	Théorique	Rendement
Dopa-PIMA-PEG-Lt	Nombre d'amines / polymère		5,84	
	Nombre de lanthanide / polymère	0,095	1,07	8%
	Nombre de lanthanide/amines	0,016	0,18	8%
LT <sup>57</sup> NPOFs	Nombre de fer / NPOFs	26		
	Nombre de lanthanide/fer	0,022	0,1	22%
	Nombre de lantha / NPOFs	0,6		
	Nombre de polymère / NPOFs	5,71		

Tableau 10 : Quantités de lanthanides greffées sur le polymère Dopa-PIMA-PEG et sur les NPOFs après enrobage. Ces quantités ont été déterminées sur les solutions de Dopa-PIMA-PEG-Lt après greffage des polymères et sur la solution de LT<sup>57</sup>NPOFs après enrobage avec le polymère Dopa-PIMA-PEG-Lt.

Les calculs permettant d'obtenir les résultats présentés dans le tableau ci-dessus sont présentés en Annexe 5. Nous avons constitué une fiche identité des LT<sup>57</sup>NPOFs et des <sup>57</sup>NPOFs (chapitre 3) regroupant l'ensemble de leurs caractéristiques (Partie expérimentale 6).

#### 1.4 Propriétés magnétiques des LT<sup>57</sup>NPOFs

Les propriétés de contraste en IRM des LT<sup>57</sup>NPOFs ont été évaluées par la mesure des temps de relaxation longitudinaux et transversaux à température ambiante, sur un appareil IRM à 4,7 T, pour différentes concentrations en fer. Comme présenté dans le chapitre précédent, les taux de relaxation Ri et la relaxivité r<sub>i</sub> ont été calculés à partir des temps de relaxation Ti et de la concentration en fer, notée [Fe], tels que :

$$R_i = \frac{1}{T_i} ; r_i = \frac{R_i - R_{i0}}{[Fe]} \quad (\text{Eq.3.2})$$

La Figure 1.5 présente les images pondérées en T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> acquises en IRM, de la solution de LT<sup>57</sup>NPOFs (A et B) ainsi que le taux de relaxation en fonction de la concentration de celles-ci (C et D).

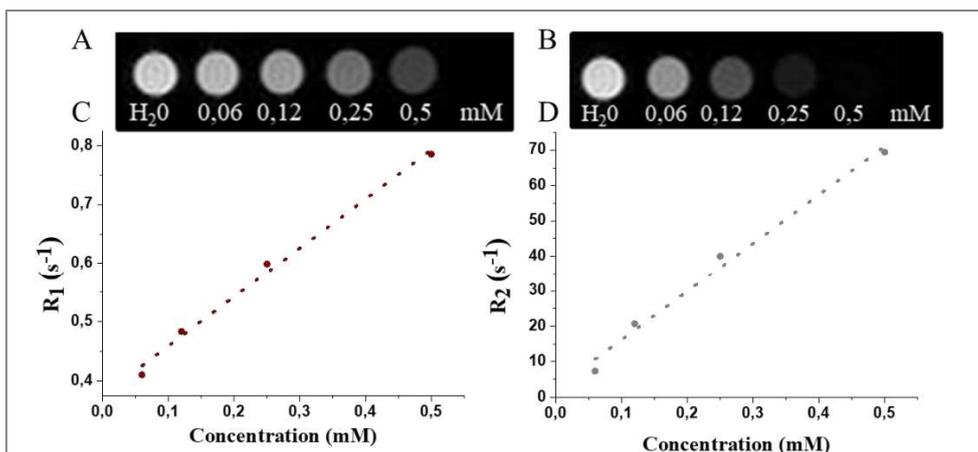


Figure 1.5 : Images pondérées en T<sub>1</sub> (A) et en T<sub>2</sub> (B) d'une solution de LT<sup>57</sup>NPOFs à différentes concentrations. Taux de relaxation R<sub>1</sub> (C) et R<sub>2</sub> (D) en fonction de la concentration, mesurés à 4,7 T

D'après la figure ci-dessus, on constate que l'intensité du signal IRM varie en fonction de la concentration, signe de la modification des temps de relaxation protoniques transversaux et longitudinaux en présence des LT<sup>57</sup>NPOFs. En outre, les taux de relaxation R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> augmentent proportionnellement avec la concentration des LT<sup>57</sup>NPOFs. Les relaxivités r<sub>1</sub> et r<sub>2</sub>, obtenues par régressions linéaires, sont égales à 0,84 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> et 137 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>, respectivement. On constate que la valeur de la relaxivité longitudinale r<sub>1</sub> est proche de celle obtenue pour les <sup>57</sup>NPOFs (0,86 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>). Cependant, la valeur de la relaxivité transversale r<sub>2</sub> est significativement supérieure à celle des <sup>57</sup>NPOFs (81 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>). Une première hypothèse pour expliquer cette différence est que les lanthanides présents en surface des LT<sup>57</sup>NPOFs sont à l'origine de la différence de relaxivité observée entre les deux échantillons. La Figure 1.6 présente les taux de relaxation R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> des complexes Gd-p-SCN-Bn-DOTA et Tm-p-SCN-Bn-DOTA en fonction de leur concentration.

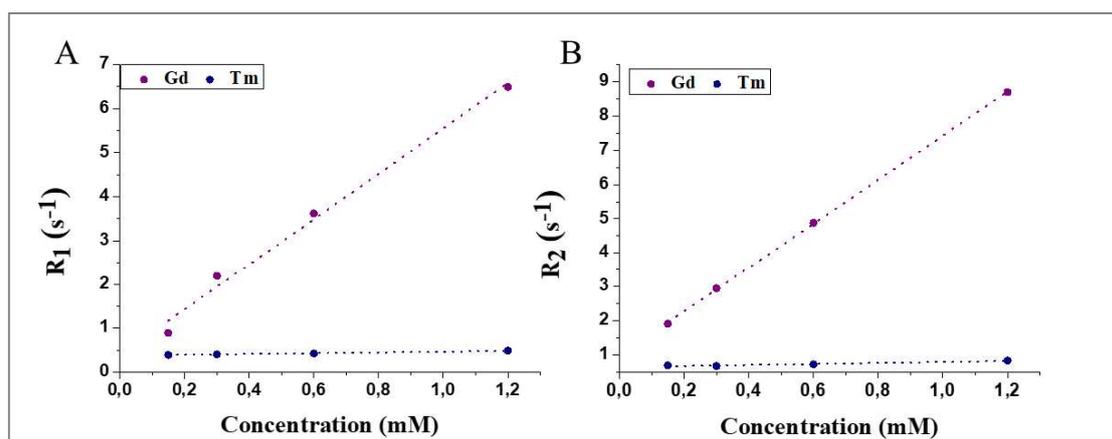


Figure 1.6 : Taux de relaxation R<sub>1</sub> (A) et R<sub>2</sub> (B) des complexes Gd-p-SCN-Bn-DOTA(violet) et Tm-p-SCN-Bn-DOTA (bleu) en fonction de la concentration et mesuré à 4,7 T.

Contrairement au thulium qui possède des relaxivités  $r_1$  et  $r_2$  très faibles, respectivement égales à  $0,09 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  et  $0,15 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , les relaxivités du gadolinium sont égales à  $5,2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  et  $6,4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Néanmoins, en considérant le rapport lanthanides/fer égal à 0,022, la valeur des relaxivités des lanthanides ne sont pas assez importantes pour modifier significativement la valeur de la relaxivité des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ . Une seconde hypothèse pour expliquer cette différence est qu'elle est due à la différence du diamètre hydrodynamique des  $^{57}\text{NPOFs}$ . En effet, Joos *et al.* ont montré que le taux de relaxation est proportionnel au diamètre hydrodynamique au carré.<sup>2</sup> Or, le rayon hydrodynamique des  $^{57}\text{NPOFs}$  synthétisées dans le chapitre 3 est égal à  $10,6 \text{ nm}$  ( $\pm 2,1 \text{ nm}$ ) et celui des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  est égal à  $14,4 \text{ nm}$  ( $\pm 4,1 \text{ nm}$ ). Cette légère différence de taille du diamètre hydrodynamique pour ainsi être à l'origine des différences de relaxivités observées.

## 1.5 Design de l'expérience

L'objectif de cette expérience est de suivre d'une part le devenir du cœur inorganique des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  et, d'autre part, le devenir de l'enrobage. Le devenir de l'enrobage est un suivi complexe car différents scénarii, précisés dans la [Figure 1.7](#), peuvent être envisagés. En effet suite à l'éventuelle désolidarisation des lanthanides des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ , on peut recenser différents sites de dissociation. Dans le scénario A, les lanthanides sont décoordinés du ligand de type cyclène. En suivant le rapport des signaux associés au lanthanides, soit le rapport Gd/Tm, il est possible d'évaluer ce scénario. La dissociation peut également être réalisée entre le PEG fonctionnalisé et le complexe de lanthanide, libérant des complexes de lanthanides, ce qui constitue le scénario B. Ainsi, un groupe de souris additionnel a reçu des complexes de lanthanides seuls afin d'évaluer la robustesse de la liaison entre les complexes de lanthanides et le polymère. Le scénario D implique une dissociation complète du polymère des  $^{57}\text{NPOFs}$ . Un second groupe additionnel a reçu le polymère Dopa-PIMA-PEG-Lt seul afin d'évaluer cette dernière possibilité. Enfin, le scénario C implique une dissociation entre le PEG fonctionnalisé et la chaîne PIMA. Ce scénario n'a pas été évalué *in vivo*. Le PEG étant greffé sur la chaîne PIMA par une liaison amide covalente, nous avons fait l'approximation qu'une potentielle dissociation soit effectuée préférentiellement selon les scénarii A, B ou D.

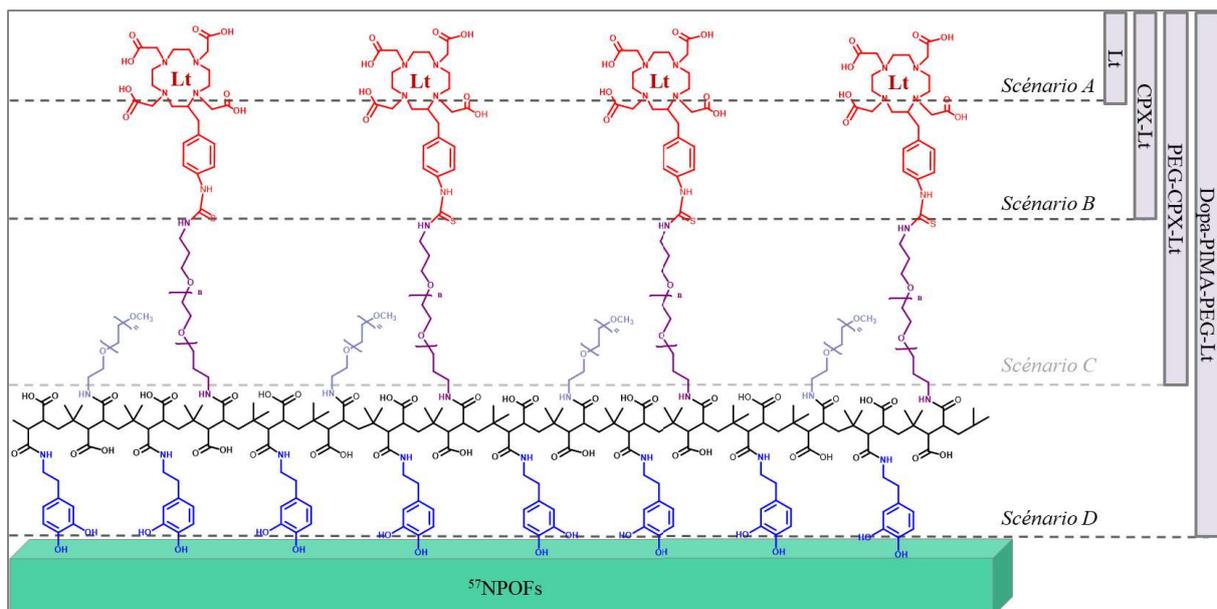
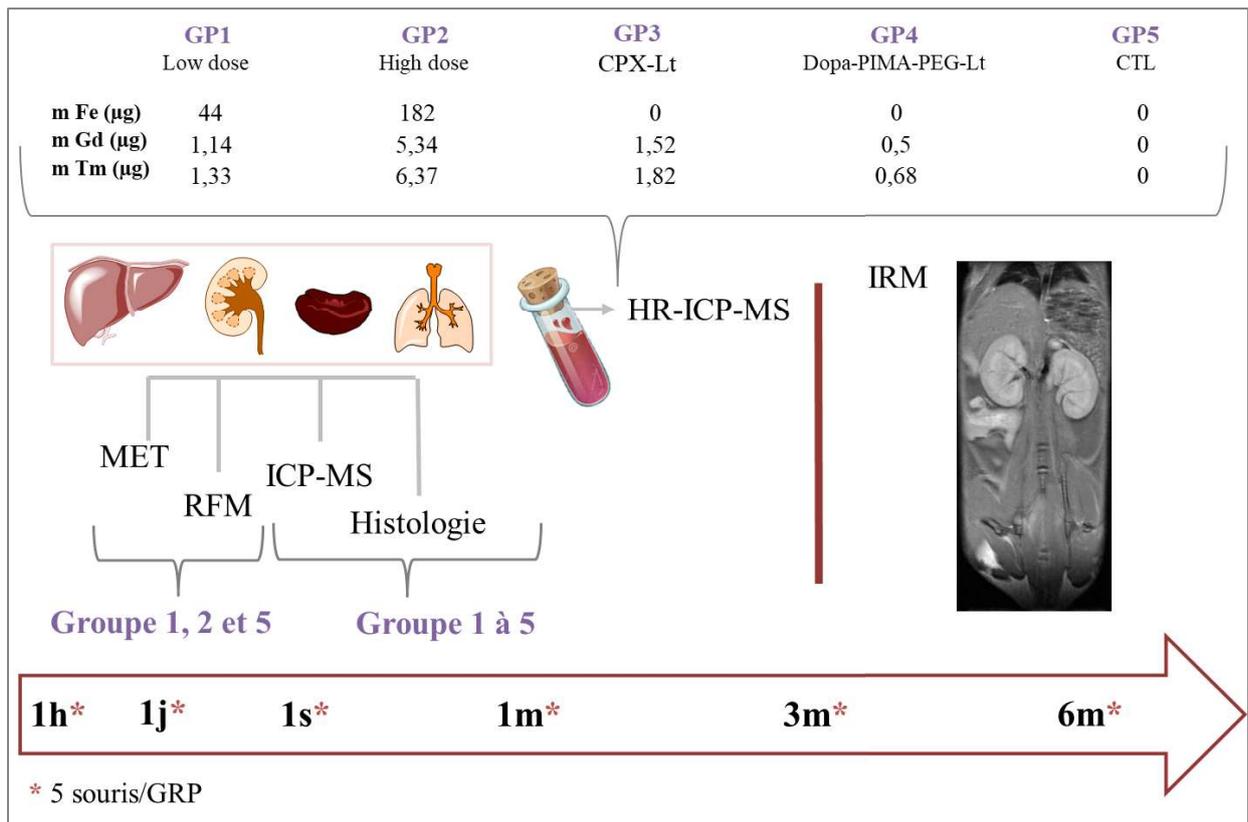


Figure 1.7 : Scénarii potentiels du devenir de l'enrobage autour des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ . Suite à une éventuelle désolidarisation des lanthanides des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  plusieurs entités peuvent être détectées : les lanthanides seuls (A), les complexes de lanthanides notés CPX-Lt (B), les complexes de lanthanides sur le PEG-NH<sub>2</sub> notés PEG-CPX-Lt (C) et enfin les complexes de lanthanides sur le polymère noté Dopa-PIMA-PEG, noté Dopa-PIMA-PEG-Lt (D).

Un dernier aspect traité durant cette expérience, et non encore abordé dans ce manuscrit, est l'effet de la dose de fer injectée. En effet, des expériences préliminaires, effectuées au laboratoire, ont montré que selon la dose en fer injectée, la prise en charge et la dégradation n'étaient pas les mêmes.<sup>3</sup> Ainsi, deux doses ont été administrées, une dose faible (*low dose*) égale à environ 40  $\mu\text{mol/kg}$  et une dose élevée (*high dose*) égale à 163  $\mu\text{mol/kg}$ . Ces doses correspondent respectivement à une injection de 44  $\mu\text{g}$  et 182  $\mu\text{g}$  de fer pour une souris de 20 g.

En prenant en compte les deux doses, les groupes additionnels abordés ci-dessus, ainsi que le groupe de souris témoin, cinq groupes de souris ont été suivi sur une période de six mois. Durant celle-ci, le suivi du devenir du cœur inorganique et de l'enrobage a été réalisé à différents temps, à savoir une heure, un jour, une semaine, un, trois et six mois après injection intraveineuse. Chaque groupe représente un total de cinq souris mis à part le groupe contrôle qui n'en compte que quatre, ce qui représente un total de 144 souris. Pour chaque groupe, la masse respective de fer, gadolinium et thulium injectée est donnée dans le tableau de la Figure 1.8. Pour chaque temps, le foie, la rate, les poumons, les reins et le sang ont été prélevés et analysés, selon les groupes, en HR-ICP-MS, RFM MET et histologie. La Figure 1.8 présente le déroulement de l'expérience, ainsi que les analyses réalisées pour chaque groupe. En parallèle, trois souris des groupes 1, 2 et 5 ont été suivies en IRM. Cette analyse n'étant pas invasive, les mêmes souris ont été suivies pendant toute la durée de l'expérience, celles-ci correspondant au temps de sacrifice six mois. Le sang n'a pu être analysé qu'en HR-ICP-MS. En effet, compte tenu de la haute teneur en eau des échantillons, ceux-ci présentent un signal très faible en RFM.



**Figure 1.8** : Schéma récapitulatif du déroulement de l'expérience pour chaque temps. Cinq groupes de souris ont été réalisés (Gp 1 à 5). Après sacrifice des souris, le foie, la rate, les reins, les poumons et le sang sont prélevés. Chaque organe est analysé en HR-ICP-MS et histologie pour les groupes 1 à 5. Les organes issus des groupes 1, 2 et 5 sont également analysés en RFM et MET. Le sang n'a pu être analysé qu'en HR-ICP-MS. Trois souris des groupes 1, 2 et 5 ont été suivies en IRM durant la durée de l'expérience, soit six mois.

## 2. Devenir du cœur inorganique – Résultats

### 2.1 Quantification du fer exogène des $LT^{57}NPOFs$ par HR-ICP-MS

Les travaux présentés dans le chapitre précédent ont permis d'établir une limite de détection des  $^{57}NPOFs$  par ICP-MS grâce aux matrices de validation foie et sang. L'approximation selon laquelle la limite de détection de la matrice foie s'étend aux organes rate, reins et poumons est également utilisée pour les résultats présentés ci-dessous. L'estimation de la limite de détection est d'autant plus indispensable dans le cadre du suivi des  $LT^{57}NPOFs$  sur le long terme. En effet, plus la durée de l'expérience est grande, plus la probabilité que le fer exogène soit éliminé est élevée. Ainsi il est nécessaire de s'assurer que les entités détectées au cours de l'expérience soient au-dessus de la limite de détection. On rappelle que la limite de détection pour le foie et la rate est égale à 3 ppm et pour les poumons, les reins et le sang égale à 0,3 ppm. Pour chaque souris et au sein de chaque organe, la concentration en  $LT^{57}NPOFs$  a été mesurée par HR-ICP-MS pour les deux doses injectées au cours du temps et comparée aux valeurs de limite de détection (Figure 2.1).

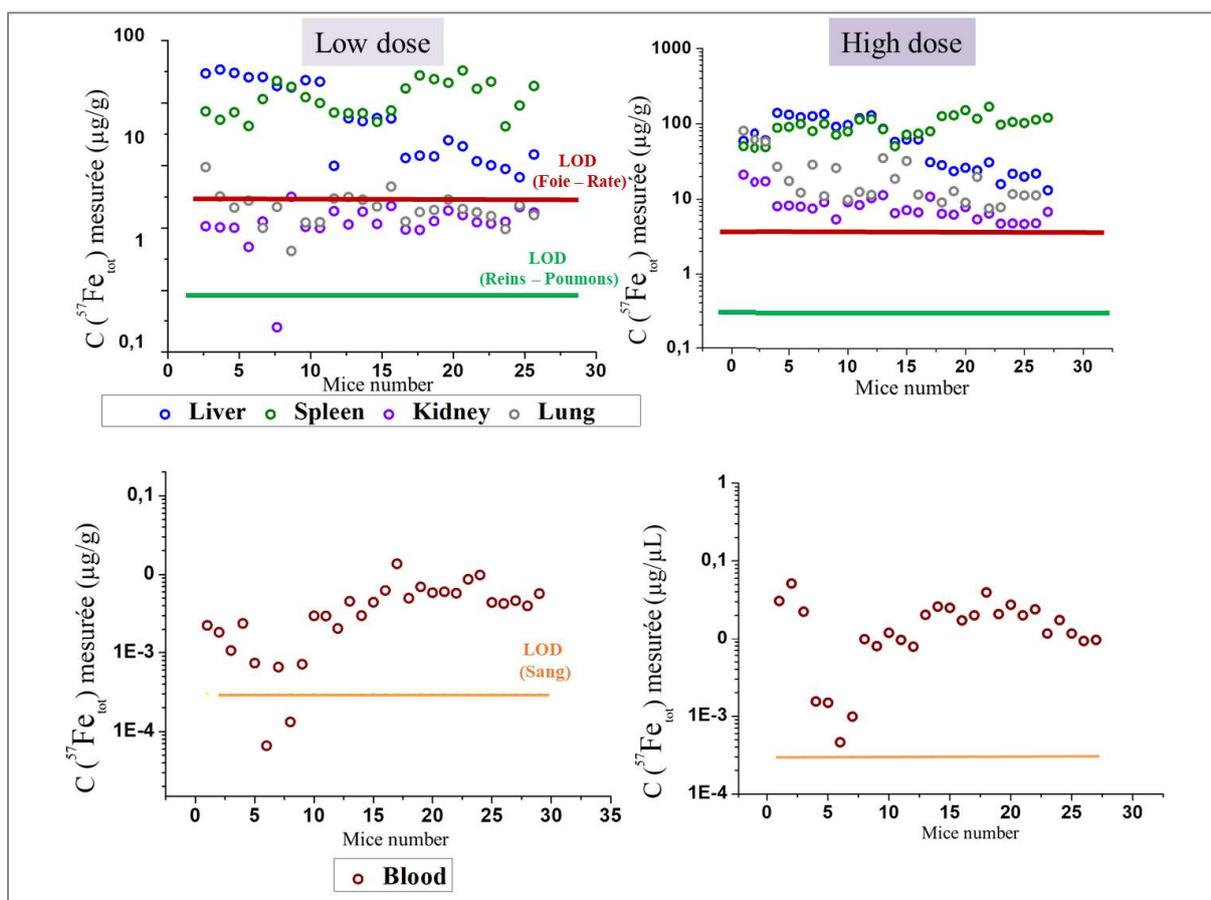


Figure 2.1 : Comparaison des concentrations de  $^{57}Fe_{tot}$  mesurées par HR-ICP-MS aux limites de détection. Les concentrations dans les organes solides (foie, rate, reins, poumons) sont comparées à la valeur de la limite de détection de la matrice foie pour la dose faible (A) et la dose élevée (B). La concentration dans le sang est comparée à la valeur de la limite de détection de la matrice sang pour la dose faible (C) et élevée (D).

On constate pour les organes solides que l'ensemble des concentrations mesurées entre une heure et six mois sont au-dessus de la limite de détection et ce pour les deux doses, mises à part pour un point d'un échantillon de rein. On observe également deux points se situant en dessous de la limite de détection pour le sang après injection de la dose faible. L'ensemble des concentrations mesurées en dessous de la limite de détection sera écarté des statistiques.

### 2.1.1 Quantification du $^{57}\text{Fe}$ exogène dans la souris

De la même manière que le chapitre précédent, la quantité de fer exogène mesurée en HR-ICP-MS,  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  est exprimée par le pourcentage de la masse totale de fer injectée notée %MI. On rappelle que dans le cas de la dose faible, 44  $\mu\text{g}$  de fer ont été injectés et 182  $\mu\text{g}$  pour la dose élevée. La Figure 2.2 représente le cumul des fractions de fer exogène mesurées pour le foie, la rate, les reins et les poumons en fonction du temps pour les deux doses injectées. On observe que la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  pour la dose faible une heure après injection représente 111 % ( $\pm 10$  %) de la masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée théoriquement. Les barres d'erreurs représentent l'hétérogénéité de la détection des  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  en fonction des souris du groupe considéré. D'après le modèle réalisé à partir de la courbe de validation dans la matrice foie, la mesure HR-ICP-MS a tendance à sous-estimer la concentration, avec un taux de recouvrement de 89 % plutôt que de la surestimer. Les erreurs sur la mesure ont été également estimées et ne permettent pas d'expliquer le pourcentage détecté (Annexe 6). Aussi la détection d'un surplus de  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  est attribuée à des erreurs d'ordre expérimental lors de l'injection de la solution.

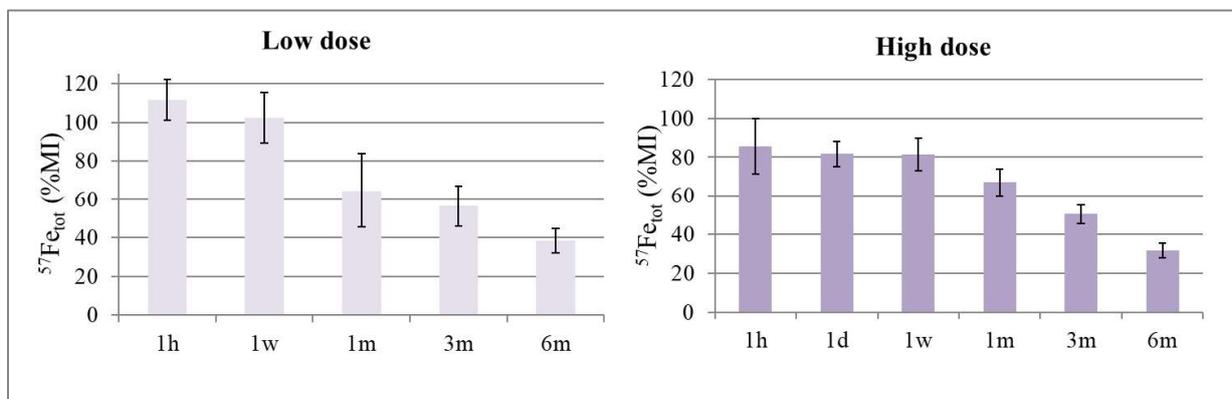


Figure 2.2 : Fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  dans les souris (calculée sur les organes foie, rate, reins et poumons) exprimée en pourcentage de la masse en  $^{57}\text{Fe}$  injectée et en fonction du temps, pour la dose faible (gauche) et élevée (droite). Cette fraction est calculée en sommant les fractions de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  mesurée dans le foie, la rate, les reins, les poumons et le sang.

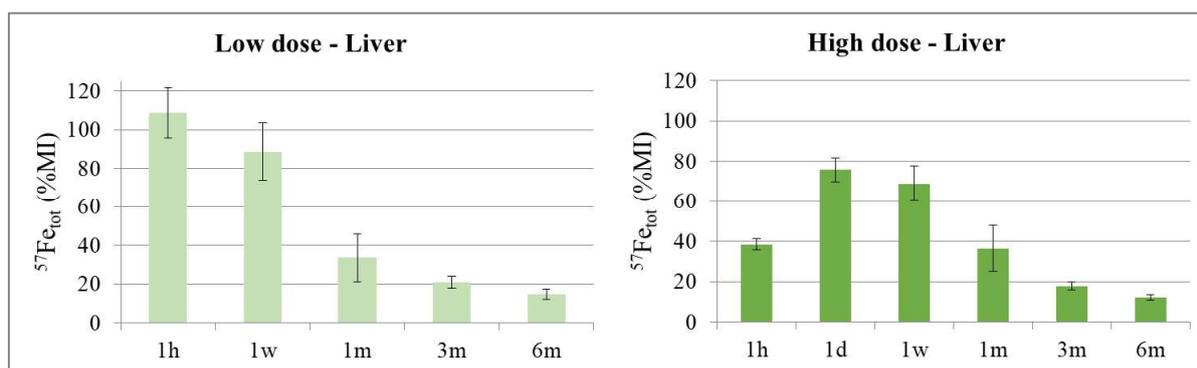
En supposant une erreur de 10 % lors de l'injection (soit un volume de 10  $\mu\text{L}$  sur une injection d'un volume de 100  $\mu\text{L}$ ), la fraction de fer exogène mesurée reste étonnamment élevée et est égal à 100 % ( $\pm 11$  %) de la masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée. On constate que la totalité du fer exogène introduit est détecté par HR-ICP-MS. Ces résultats sont confirmés par la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  mesurée une semaine après injection à hauteur de 102 % ( $\pm 13$  %).

Après injection de la dose élevée, un total de 86 % ( $\pm 14\%$ ) de la masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée est détecté par HR-ICP-MS une heure après injection. Les résultats concernant les deux doses montrent que le fer exogène est essentiellement acheminé vers les organes analysés. Afin d'évaluer la répartition au cours du temps du fer exogène dans l'organisme, regardons dans chacun des organes cités ci-dessus.

### 2.1.2 Cinétique du fer exogène dans le foie

La figure [Figure 2.3](#) représente la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  mesurée en HR-ICP-MS dans le foie pour les deux doses.

Pour la faible dose, la majorité du fer exogène est localisée dans le foie. En effet, une heure après injection la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  est égale 108 % ( $\pm 13\%$ ) de la masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée. On constate également pour cette dose, que la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  diminue passant de 108 % ( $\pm 13\%$ ) une heure suivant l'injection à 15 % ( $\pm 3\%$ ) à six mois après injection. Pour la dose élevée, on constate que l'accumulation hépatique du fer exogène est maximale un jour après injection, passant de 38,5 % ( $\pm 3\%$ ) à 76 % ( $\pm 6\%$ ) à une heure et un jour après injection, respectivement. Cette observation suggère que la capture du fer exogène est limitée par la clairance hépatique. Comme pour la faible dose, la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  diminue au cours du temps passant de 76 % ( $\pm 6\%$ ) à 12 % ( $\pm 1,3\%$ ) entre le premier jour et le sixième mois après injection. Bien que les fractions de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  soient significativement différentes aux temps courts pour les deux doses, elles deviennent comparables à partir d'un mois après injection. En effet pour la faible dose, le pourcentage de fer injecté est de 34 % ( $\pm 12\%$ ), 21 % ( $\pm 3\%$ ) et 15 % ( $\pm 3\%$ ) et pour la dose élevée il est de 36 % ( $\pm 11\%$ ), 18 % ( $\pm 2\%$ ) et 12 % ( $\pm 1,3\%$ ) à un, trois et six mois après injection respectivement. Ces résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme de prise en charge et d'élimination similaire pour les deux doses aux temps longs.



**Figure 2.3 :** Fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  dans le foie mesurées par HR-ICP-MS et exprimées en pourcentage de masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) au cours du temps.

### 2.1.3 Cinétique du fer exogène dans le sang

La [Figure 2.4](#) représente la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  retrouvée dans le sang. Pour les deux doses, on constate que le fer exogène disparaît de la circulation sanguine entre une heure et un jour après injection.

En effet entre une heure et un jour suivant l'injection, la fraction de fer exogène recouvrée passe de 7,2 % ( $\pm 2,3$  %) à 2 % ( $\pm 1$  %) pour la faible dose et de 30 % ( $\pm 13$  %) à 1 % ( $\pm 0,5$  %) pour la dose élevée. Ces résultats montrent que le fer exogène circule encore dans le sang après une heure suivant l'injection et est totalement acheminé vers les organes à un jour après injection. Par ailleurs, ces résultats expliquent aussi le maximum d'accumulation observé à un jour après injection pour la dose élevée dans le foie. On constate également qu'entre une semaine et trois mois, la concentration sanguine en  $^{57}\text{Fe}$  augmente, suggérant une recirculation des entités exogènes injectées, initialement localisées dans d'autres organes.

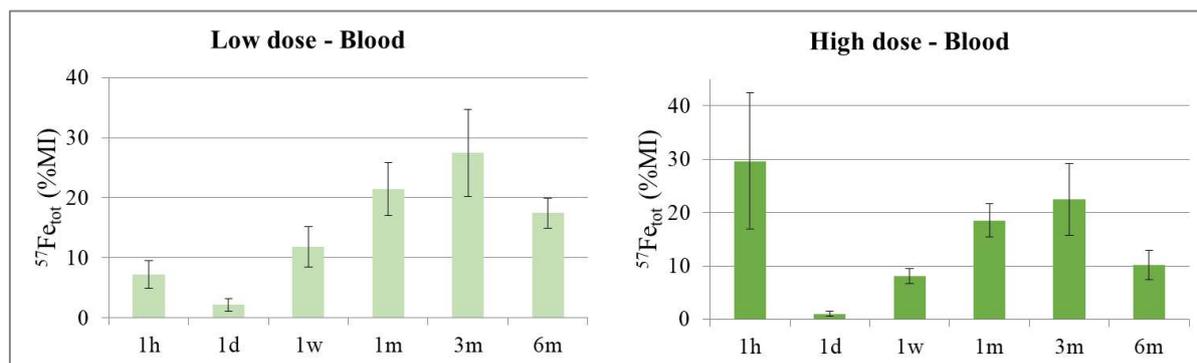


Figure 2.4 : Fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  dans le sang mesurées par HR-ICP-MS et exprimées en pourcentage de masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) au cours du temps.

### 2.1.4 Cinétique du fer exogène dans la rate

La Figure 2.5 présente la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  retrouvée dans la rate au cours du temps.

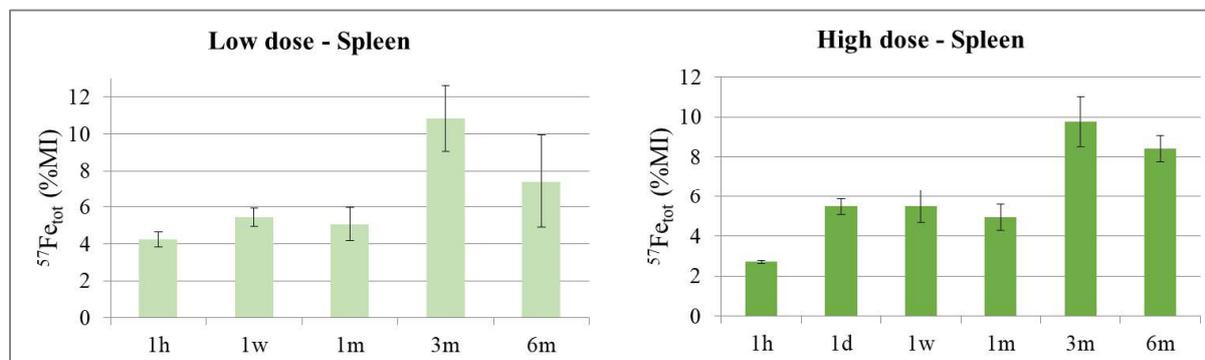


Figure 2.5 : Fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  dans la rate mesurées par HR-ICP-MS et exprimées en pourcentage de masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) au cours du temps.

Pour la dose faible, on observe que la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  augmente légèrement entre une heure et une semaine après injection, passant de 4,2 % ( $\pm 0,4$  %) à 5,4 % ( $\pm 0,5$  %) de la masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée. Cette augmentation correspond à environ 0,7  $\mu\text{g}$  de fer exogène. Or, dans le sang, on constate qu'une heure après injection, on détecte encore du fer exogène correspondant à 7,2 % ( $\pm 2,3$  %) de la masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée, soit un total de 2,83  $\mu\text{g}$  ( $\pm 0,89$   $\mu\text{g}$ ) (Figure 2.4). Aussi l'augmentation de la quantité de fer exogène dans la rate provient vraisemblablement du sang suite à une accumulation tardive de celles-

ci. Durant le premier mois après injection, la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  reste relativement constante et augmente au bout de trois mois, passant de 5 % ( $\pm 0,9$  %) à 10,8 % ( $\pm 1,8$  %). Cette augmentation suggère un stockage des entités exogènes dans la rate après passage dans d'autres organes tels que le foie. Cette observation est cohérente avec l'augmentation de la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  dans le sang au bout d'une semaine, suggérant une recirculation du fer exogène. On observe une tendance similaire pour la dose élevée avec une nette augmentation de la quantité de la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  un jour après injection. On constate également une accumulation du fer exogènes dans la rate au bout de trois mois après injection.

### 2.1.5 Cinétique du fer exogène dans les reins et les poumons

La Figure 2.6 montre la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  recouvrée dans les organes reins et poumons au cours du temps après injection des deux doses.

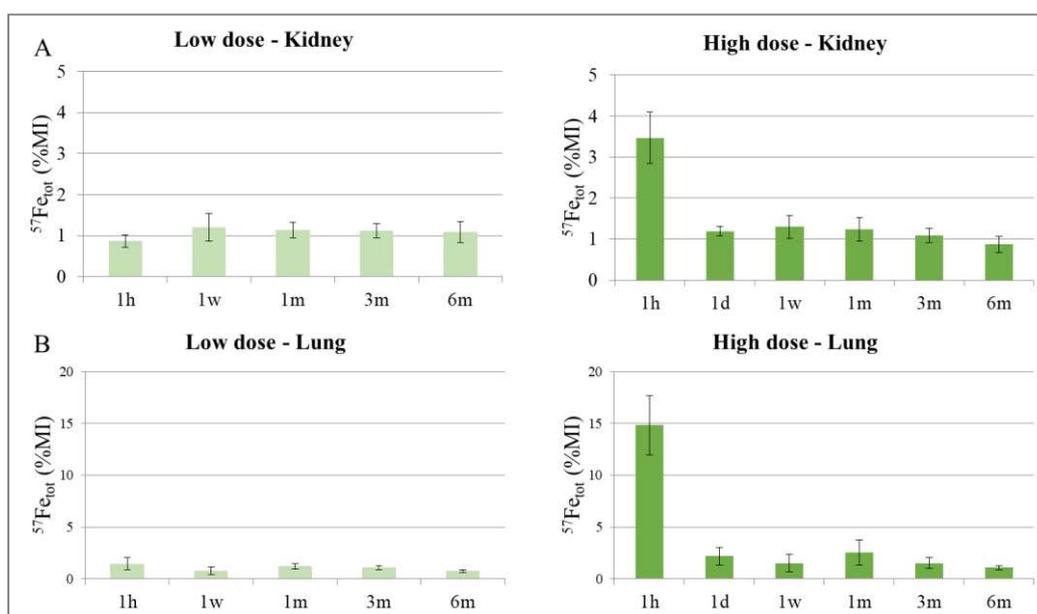


Figure 2.6 : Fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  dans les reins (A) et dans les poumons (B) mesurées par HR-ICP-MS et exprimées en pourcentage de masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) au cours du temps.

Pour la dose faible, le fer exogène est peu localisé dans les reins et les poumons. En effet, la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  est égale à environ de 1 %, et reste constante durant la durée de l'expérience. Cependant, pour la dose élevée, on observe une accumulation du fer exogène plus importante dans les reins. La fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  s'élève en effet à 3,5 % ( $\pm 0,6$  %) de la masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée, une heure après injection. Celle-ci diminue au bout d'un jour après injection et reste constante jusqu'à six mois après injection. Ce résultat suggère qu'une partie du fer exogène est éliminée par le système rénal après injection. Dans les poumons, on constate également une fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  élevée et égale à 14,8 % ( $\pm 2,9$  %) une heure après injection. Lors de la récupération des poumons, nous avons constaté que ceux-ci étaient imbibés de sang. Malgré le rinçage de ces derniers, une couleur rouge a persisté, témoignant

de la présence de sang dans les capillaires pulmonaires. Ainsi, la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  élevée pourrait en grande partie provenir de la quantité de fer exogène contenue dans le sang.

### 2.1.6 Conclusion

L'analyse des organes en HR-ICP-MS a permis d'évaluer les dynamiques de circulation du fer exogène dans l'organisme au cours du temps. Dans un premier temps nous observons qu'une partie du fer exogène est éliminé de l'organisme au cours du temps ou acheminé vers d'autres organes qui n'ont pas été analysés. On constate également qu'il y a une dynamique de recirculation du fer exogène entre organes. En effet, on constate d'une part que le fer exogène est éliminé du foie à partir d'une semaine après injection. En parallèle la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  augmente dans le sang à partir d'une semaine après injection. Ces observations suggèrent un premier transfert du fer exogène du foie vers la circulation sanguine. Nous avons également constaté une augmentation de la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  dans la rate à partir de trois mois, suggérant un second transfert du fer exogène contenu dans le sang vers la rate. La [Figure 2.7](#) représente l'évolution de la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  recouvrée dans le foie, la rate et le sang au cours du temps.

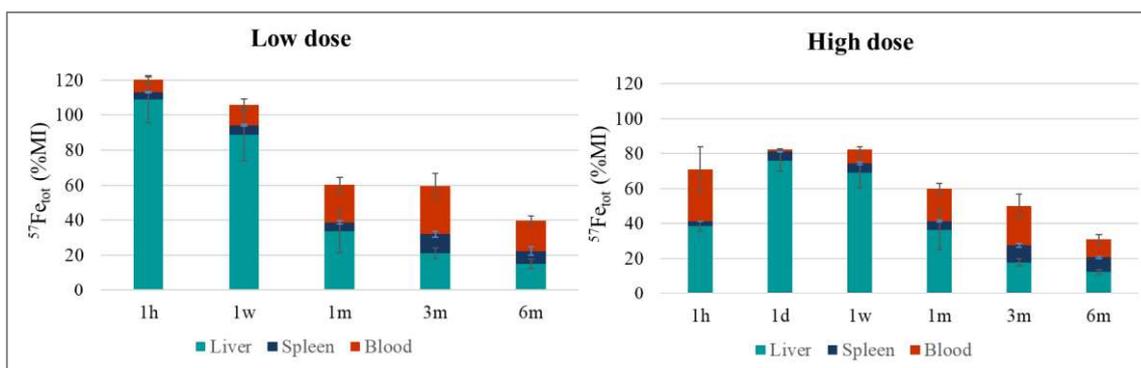


Figure 2.7 : Evolution de la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  dans le foie, la rate et le sang au cours du temps après injection de la dose faible (gauche) et élevée (droite).

On constate d'une part qu'entre un et trois mois la somme des fractions de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  recouvrées dans le foie, la rate et le sang est constante pour la dose faible. Or, en examinant la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  dans chaque organe, on constate que celle-ci n'est pas constante entre ces deux temps. En effet elle diminue dans le foie et augmente dans la rate et le sang. Cette observation confirme les phénomènes de transfert entre le foie et la rate *via* la circulation sanguine. On observe également ces processus de transfert pour la dose élevée entre un jour et une semaine et entre un et trois mois.

Nous avons pu mettre en évidence un processus de transfert du fer exogène du foie vers la rate *via* la circulation sanguine. Néanmoins, les analyses HR-ICP-MS ne permettent pas de statuer quant à la nature du fer exogène transféré. Une première hypothèse est que les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  sont dans un premier temps localisées dans le foie puis excrétées au cours du temps et acheminées vers la rate. Cependant, l'étude pilote présentée dans le chapitre précédent, ainsi que plusieurs études antérieures montrent que

les NPOFs se dégradent dans le foie.<sup>3,4</sup> Aussi une seconde hypothèse, plus probable, est que ce sont les produits issus de la dégradation des NPOFs qui sont transférés. Afin d'étudier les phénomènes de dégradation, nous avons effectué un double suivi élémentaire et magnétique des  $LT^{57}NPOFs$  au cours du temps et présenté dans la partie suivante.

## 2.2 Dégradation des $LT^{57}NPOFs$

### 2.2.1 Biodistribution.

Après injection des deux doses de  $LT^{57}NPOFs$ , les souris ont été observées en IRM à différents temps afin d'évaluer d'une part la biodistribution et la dégradation des  $LT^{57}NPOFs$  et, d'autre part, leur efficacité en tant qu'agent de contraste négatif. La Figure 2.8 présente les images IRM des souris avant et après injection pour différents temps, allant d'une heure à six mois après injection.

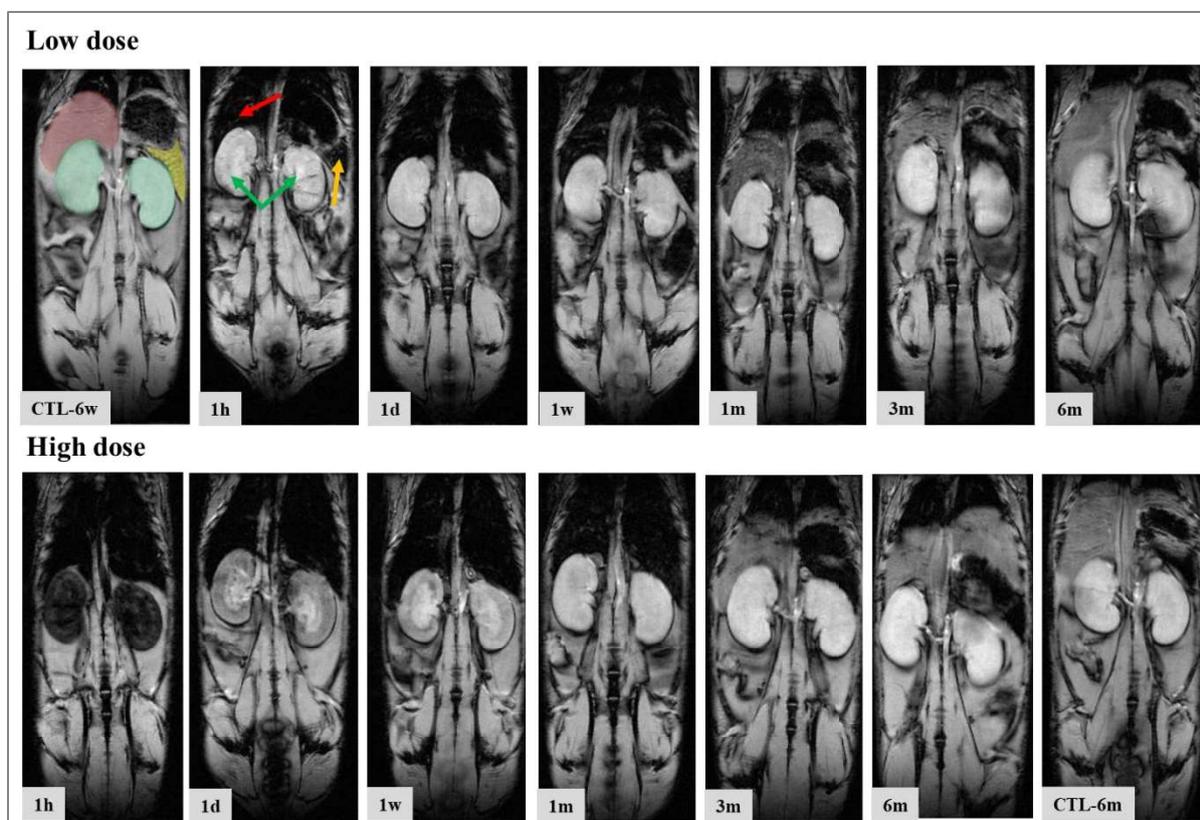


Figure 2.8 : Images IRM. Séquence écho de gradient FSPGR pondérées  $T_2^*$  ( $T_R/T_E = 300/10$  ms) de souris après injection des deux doses de  $LT^{57}NPOFs$ . Images réalisées une heure, un jour, une semaine, un, trois et six mois après injection. L'évolution du contraste, témoignant de la présence de  $LT^{57}NPOFs$  est enregistrée pour le foie (flèche rouge), la rate (flèche jaune) et les reins (flèches vertes). Les souris contrôles présentées CTL-6w et CTL-6m sont respectivement âgées de six semaines et six mois.

On constate pour les deux doses que les  $LT^{57}NPOFs$  sont acheminées majoritairement dans le foie et dans la rate, ce qui est cohérent avec les analyses du fer exogène par HR-ICP-MS. L'analyse IRM seule ne permet pas d'obtenir des informations quantitatives sur la dégradation des  $LT^{57}NPOFs$ .

SP. Ainsi pour chaque organe, les résultats obtenus en IRM sont comparés à ceux obtenus en RFM dans la section suivante.

Des analyses histologiques ont été réalisées sur les tissus foie et rate afin d'évaluer la répartition des  $LT^{57}NPOFs$  au sein de ces tissus (Annexe 2). On constate que pour les deux doses la répartition des  $LT^{57}NPOFs$  semble homogène au sein de ces deux tissus. En outre, aucune modification cellulaire, ni d'altération du tissu ou de nécrose ne sont observées après leur injection, comparativement aux tissus des souris contrôles. On observe également que les  $LT^{57}NPOFs$  détectées par une coloration PEARLS spécifique du fer semblent être hors des noyaux des cellules.

## 2.2.2 Comparaison des valeurs HR-ICP-MS et RFM

De la même manière que dans le chapitre précédent les  $LT^{57}NPOFs$  particulières superparamagnétiques, notées  $^{57}Fe_{SP}$ , ont été quantifiées par RFM. Ces valeurs, comparées à la quantité de fer exogène totale, notée  $^{57}Fe_{tot}$  permettent d'évaluer la dégradation des  $LT^{57}NPOFs$  au cours du temps dans chaque organe à l'exception du sang. On rappelle également que les produits de dégradation sont notés  $^{57}Fe_{NSP}$ . La Figure 2.9 présente l'évolution des fractions  $^{57}Fe_{tot}$  et  $^{57}Fe_{SP}$  au cours du temps pour les deux doses.

Pour la faible dose, nous n'avons pas pu analyser les échantillons à un jour après injection en HR-ICP-MS, en raison d'un problème expérimental, et ce pour l'ensemble des organes. Les échantillons à 6 mois après injection n'ont pas été analysés en RFM pour les deux doses. Dans la suite nous les noterons par le symbole (NA\*).

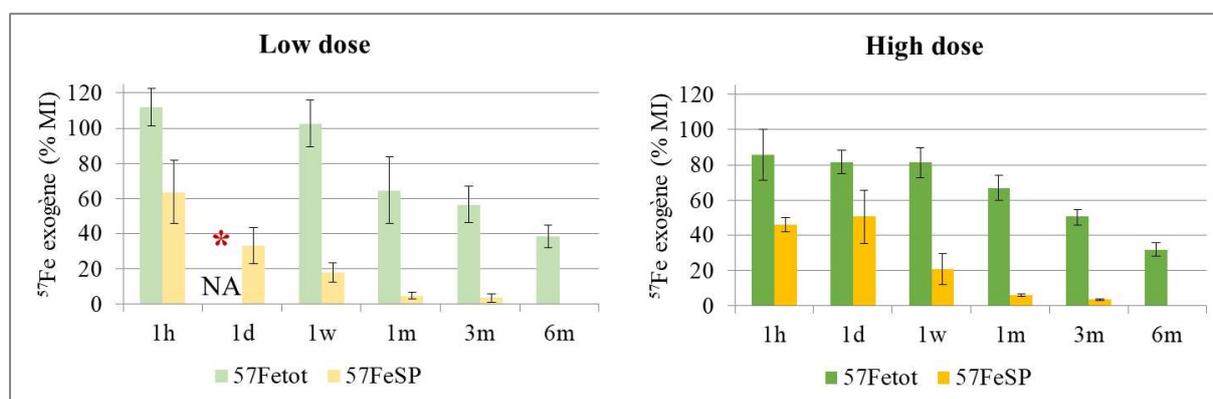


Figure 2.9 : Comparaison des fraction  $^{57}Fe_{tot}$  et  $^{57}Fe_{SP}$  exprimées en pourcentage de masse de  $^{57}Fe$  injectée, mesurées respectivement par HR-ICP-MS (vert) et en RFM (jaune) pour la dose faible (gauche) et élevée (droite). Les échantillons non analysés sont notés par le symbole (NA\*).

On observe, pour les deux doses, une différence significative entre la fraction de  $^{57}Fe_{tot}$  et celle de  $^{57}Fe_{SP}$ , dès une heure après injection. En effet, la fraction de  $^{57}Fe_{tot}$  mesurée représente 111% ( $\pm 10\%$ ) et 86% ( $\pm 14\%$ ) tandis que celle de  $^{57}Fe_{SP}$  vaut 64% ( $\pm 18\%$ ) et 45% ( $\pm 4\%$ ) de la masse de  $^{57}Fe$  injectée pour les doses faible et élevée, respectivement. Ainsi, ce résultat suggère que dès une heure après

injection, les  $LT^{57}NPOFs$  commencent à être dégradées et perdent leurs propriétés superparamagnétiques dans l'organisme. On constate également que la différence entre les fractions  $^{57}Fe_{tot}$  et  $^{57}Fe_{SP}$  s'accroît avec le temps, confirmant la dégradation magnétique des  $LT^{57}NPOFs$ . Dans les sections suivantes, nous évaluerons l'évolution du fer exogène mesuré en HR-ICP-MS et RFM dans chaque organe.

### 2.2.2.1 Dégradation dans le foie

La Figure 2.10 (A) présente l'évolution de la fraction de fer exogène mesurée par HR-ICP-MS (notée  $^{57}Fe_{tot}$ ) et RFM (notée  $^{57}Fe_{SP}$ ) au cours du temps dans le foie.

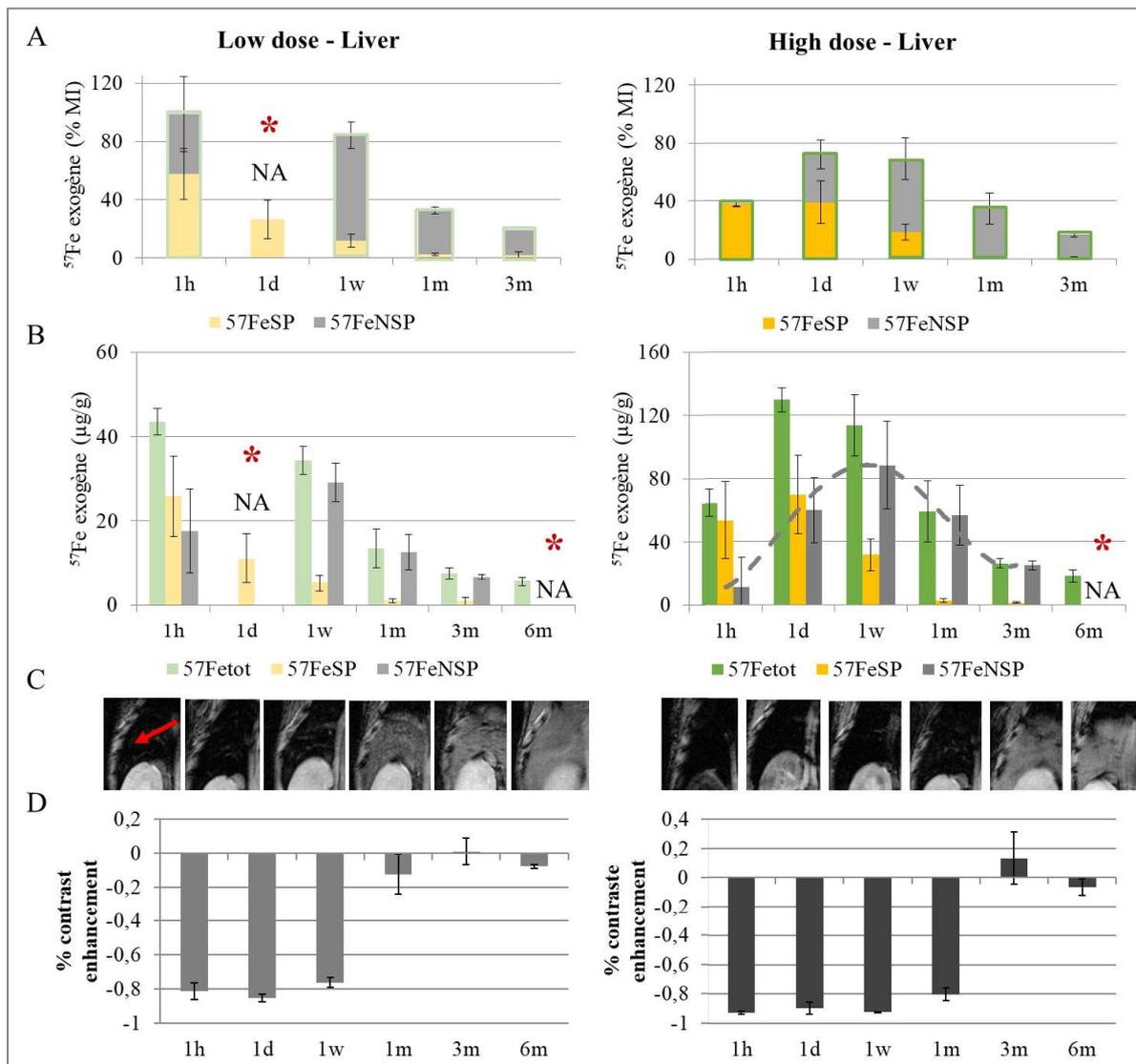


Figure 2.10 : Fraction de  $^{57}Fe$  mesurés en HR-ICP-MS (vert), RFM (jaune) et différence entre ces deux valeurs (gris) au cours du temps pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) (A). Concentrations en  $\mu g/g$  des  $^{57}Fe_{tot}$ ,  $^{57}Fe_{SP}$  et  $^{57}Fe_{NSP}$  dans le foie (B). Evolution de la concentration de  $^{57}Fe_{NSP}$  (droite en pointillé). Images IRM pondérées  $T_2^*$  ( $T_R/T_E = 300/10$  ms) de foie (issus des images de la Figure 2.8) pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) en fonction du temps (C). Pourcentages de l'augmentation du contraste du parenchyme hépatique en fonction du temps (D). Les échantillons non analysés sont notés par le symbole (NA\*).

On observe dans un premier temps que la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  diminue avec le temps pour les deux doses. En effet, elle diminue de 57,5 % ( $\pm 17,5$  %) à 2,15 % ( $\pm 2$  %) et de 37,6 % ( $\pm 1,6$  %) à 0,86 % ( $\pm 0,4$  %) de la masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée, entre une heure et trois mois pour les doses faible et élevée, respectivement. Comme présenté dans le chapitre précédent, la quantité de  $^{57}\text{Fe}$  non superparamagnétique, issue de la dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  notée  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  est calculée par :

$$\%_{\text{MI}}(^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}) = \%_{\text{MI}}(^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}) - \%_{\text{MI}}(^{57}\text{Fe}_{\text{SP}})$$

La quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  reflète et quantifie la dégradation magnétique des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  qui résulte très probablement d'une dégradation cristalline. On constate dès une heure après injection de la faible dose, une fraction non négligeable de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  s'élevant à 41 % ( $\pm 25$  %) de la masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée, ce qui correspond à une concentration de 18  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 10$   $\mu\text{g/g}$ ). Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces résultats, la première est que les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  se dégradent dans le foie dès une heure après injection. La seconde est qu'il y a une dégradation précoce des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans le sang. Entre une heure et une semaine, la concentration de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  augmente de 18  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 10$   $\mu\text{g/g}$ ) à 30  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 4$   $\mu\text{g/g}$ ) confirmant la dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans le foie. En revanche, à partir de trois mois la concentration de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  diminue jusqu'à 6,7  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 0,7$   $\mu\text{g/g}$ ), correspondant à 16 % ( $\pm 2$  %) de la masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée. Ces résultats mettent en évidence deux processus distincts de prise en charge des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans le foie. Le premier est la dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  après capture hépatique, et le second est l'élimination du fer exogène non magnétique issu de la dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  du foie. En parallèle, les souris ont été analysées par IRM entre une heure et six mois après injection ([Figure 2.10 \(C et D\)](#)). On constate qu'une heure après injection, le foie s'assombrit, ce qui est caractéristique de la présence des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ . Bien que la quantité de  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  mesurée en RFM diminue entre ces deux temps, on constate que le contraste reste constant. Cette observation est due à une sursaturation du signal, ce qui ne permet pas d'apprécier l'évolution de la quantité des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  en IRM pour ces concentrations. Néanmoins, au bout d'un mois, on constate la diminution du contraste, témoignant de la dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans le foie. Trois et six mois après injection, le signal IRM s'approche de la valeur du signal mesuré pour les souris contrôles, attestant de la perte totale des propriétés magnétiques des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ .

Pour la dose élevée, les fractions de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  et  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  dans le foie à une heure après injection sont similaires, représentant respectivement 39 % ( $\pm 3$  %) et 38 % ( $\pm 2$  %) de la masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée. Ces observations montrent que les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  ne sont pas dégradées au bout d'une heure après injection, à l'inverse de ce qui a été observé pour la dose faible. Entre une heure et un jour après injection, la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  augmente. Or la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  reste constante, ainsi l'augmentation de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  ne semble pas due à la dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  mais à l'accumulation tardive de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$ . Une première hypothèse est que ceux-ci proviennent de la dégradation de  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans d'autres organes ou, en

lien avec les observations réalisées pour la dose faible, de la dégradation précoce des LT<sup>57</sup>NPOFs dans le sang. Une autre hypothèse est que la vitesse d'accumulation des LT<sup>57</sup>NPOFs dans le foie est identique à la vitesse de dégradation de celle-ci. Ainsi, l'augmentation de la quantité de <sup>57</sup>Fe<sub>NSP</sub> à quantité de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> constante pourrait être due à l'accumulation et la dégradation simultanée des LT<sup>57</sup>NPOFs. Entre un jour et une semaine, la quantité de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> diminue, et celle de <sup>57</sup>Fe<sub>NSP</sub> augmente à quantité de <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub> constante. Ces résultats suggèrent que les LT<sup>57</sup>NPOFs sont dégradées dans le foie et que les produits issus de la dégradation demeurent dans le foie jusqu'à une semaine après injection. Ils permettent en outre d'écarter l'hypothèse selon laquelle la diminution du signal RFM est due à l'élimination des LT<sup>57</sup>NPOFs du foie. Entre une semaine et trois mois, la quantité de <sup>57</sup>Fe<sub>NSP</sub> diminue, confirmant les précédentes observations, selon lesquelles les produits issus de la dégradation des LT<sup>57</sup>NPOFs sont par la suite éliminés du foie.

En IRM, on observe également que le contraste demeure constant entre une heure et une semaine malgré la diminution de la quantité de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub>. Cela est dû à la saturation du contraste initial. En comparant le pourcentage d'augmentation de contraste pour les deux doses, on constate que les LT<sup>57</sup>NPOFs induisent un contraste satisfaisant jusqu'à une semaine et un mois après injection pour la dose faible et élevée, respectivement. Et ce pour des masses de fer égales à 5,2 µg (± 1,9 µg) et 2,8 µg (± 1 µg). Comparativement avec les doses cliniques injectées, s'élevant à hauteur de 50 µmol/kg, correspondant à une masse totale de fer de 56 µg, nous pouvons conclure que les LT<sup>57</sup>NPOFs synthétisées sont de bons agents de contraste.

Pour les deux doses, la quantité de <sup>57</sup>Fe<sub>NSP</sub> suit une tendance similaire, à savoir une première augmentation puis la diminution de cette dernière entre une semaine et un mois. Ces résultats mettent en évidence deux processus distincts. Dans un premier temps, les LT<sup>57</sup>NPOFs sont dégradées, donnant lieu à l'augmentation de la concentration hépatique en <sup>57</sup>Fe<sub>NSP</sub>. Puis, ceux-ci sont éliminés du foie. Cette transition a lieu entre une semaine et un mois suivant l'injection.

Des coupes de foie ont été analysées en MET en fonction du temps pour la dose faible et élevée (Figure 2.11 et Figure 2.13, respectivement). Une heure après injection, les LT<sup>57</sup>NPOFs sont internalisées dans les compartiments endo/lysosomaux des cellules du foie, et en particulier, dans les cellules de Kupffer, et ne sont pas agrégées, quelle que soit la dose injectée. On retrouve les LT<sup>57</sup>NPOFs dans les lysosomes, ce qui est cohérent avec une dégradation intralysosomale abordée dans le chapitre précédent ainsi que dans plusieurs études antérieures.<sup>3-5</sup>

Pour la dose faible, on constate une raréfaction des LT<sup>57</sup>NPOFs dans les compartiments cellulaires dès un jour après injection. On observe aussi la présence de plus petites particules un jour après injection dans les compartiments endo/lysosomaux à un jour et un mois après injection. La distribution en taille de ces particules, déterminée à partir des clichés de MET est égale à 3,3 nm (± 0,6 nm). Celles-ci semblent moins contrastées que les LT<sup>57</sup>NPOFs et pourraient correspondre à des ferritines. Une semaine et un mois après injection les LT<sup>57</sup>NPOFs demeurent dans les compartiments endo/lysosomaux.

Cependant on constate que les LT<sup>57</sup>NPOFs semblent plus petites, et que leurs contours semblent moins définis.

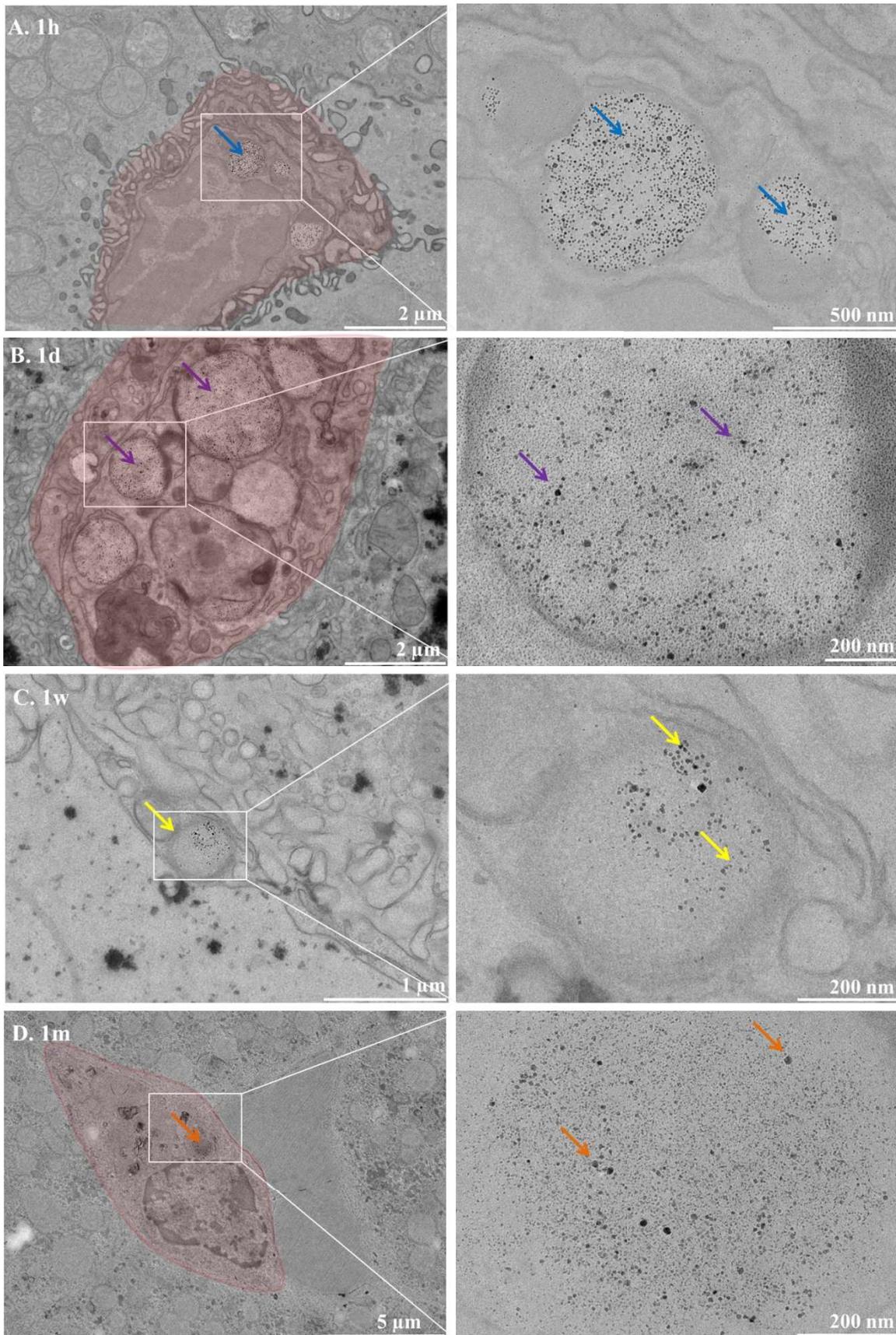


Figure 2.11 : Images de MET dans le foie des  $LT^{57}NPOFs$ , une heure (A, flèches bleues), un jour (B, flèches violettes), une semaine (C, flèches jaunes) et un mois (D, flèches oranges) après injection de la dose faible. Les  $LT^{57}NPOFs$  sont endocytées dans des cellules de Kupffer (voile rouge).

La distribution en taille des particules observées sur les clichés de MET a été analysée en fonction du temps après injection (Figure 2.12). On constate qu'une heure et un jour après injection, la taille moyenne des particules localisées dans les lysosomes est égale à 8,3 nm ( $\pm$  1,9 nm) et 8,1 nm ( $\pm$  1,6 nm), respectivement. Entre une heure et un jour, la taille des LT<sup>57</sup>NPOFs est sensiblement similaire à celle des LT<sup>57</sup>NPOFs post synthèse, égale à 8,7 nm ( $\pm$  1,6 nm). Bien que la distribution en taille des LT<sup>57</sup>NPOFs à un jour après injection soit sensiblement similaire à celle des LT<sup>57</sup>NPOFs post synthèse. Une semaine après injection, la taille des LT<sup>57</sup>NPOFs diminue jusqu'à un diamètre moyen égal à 6,1 nm ( $\pm$  1,6 nm) témoignant de leur dégradation. Un mois après injection, leur taille diminue encore pour atteindre un diamètre moyen égal à 4,3 nm ( $\pm$  1,4 nm) au bout d'un mois.

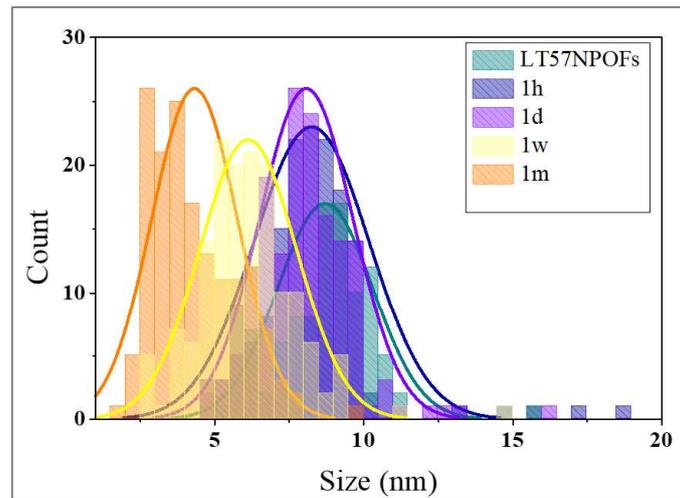


Figure 2.12 : Evolution de la distribution en taille des LT<sup>57</sup>NPOFs au sein des compartiments endo/lysosomaux dans le foie au cours du temps après injection de la dose faible. Les distributions en taille ont été réalisées à partir des clichés de MET, les couleurs utilisées pour les digrammes correspondent à celles des flèches indiquant la localisation des LT<sup>57</sup>NPOFs dans les images de la Figure 2.11.

Pour la dose élevée, on constate qu'une heure après injection les LT<sup>57</sup>NPOFs sont en partie internalisées dans les compartiments endo/lysosomaux. En revanche, on constate qu'au bout d'un mois après injection, les LT<sup>57</sup>NPOFs sont localisées en dehors de ces compartiments suggérant la diffusion de celles-ci hors de ces compartiments, ou encore la destruction de ceux-ci (Figure 2.13, C, flèches oranges).

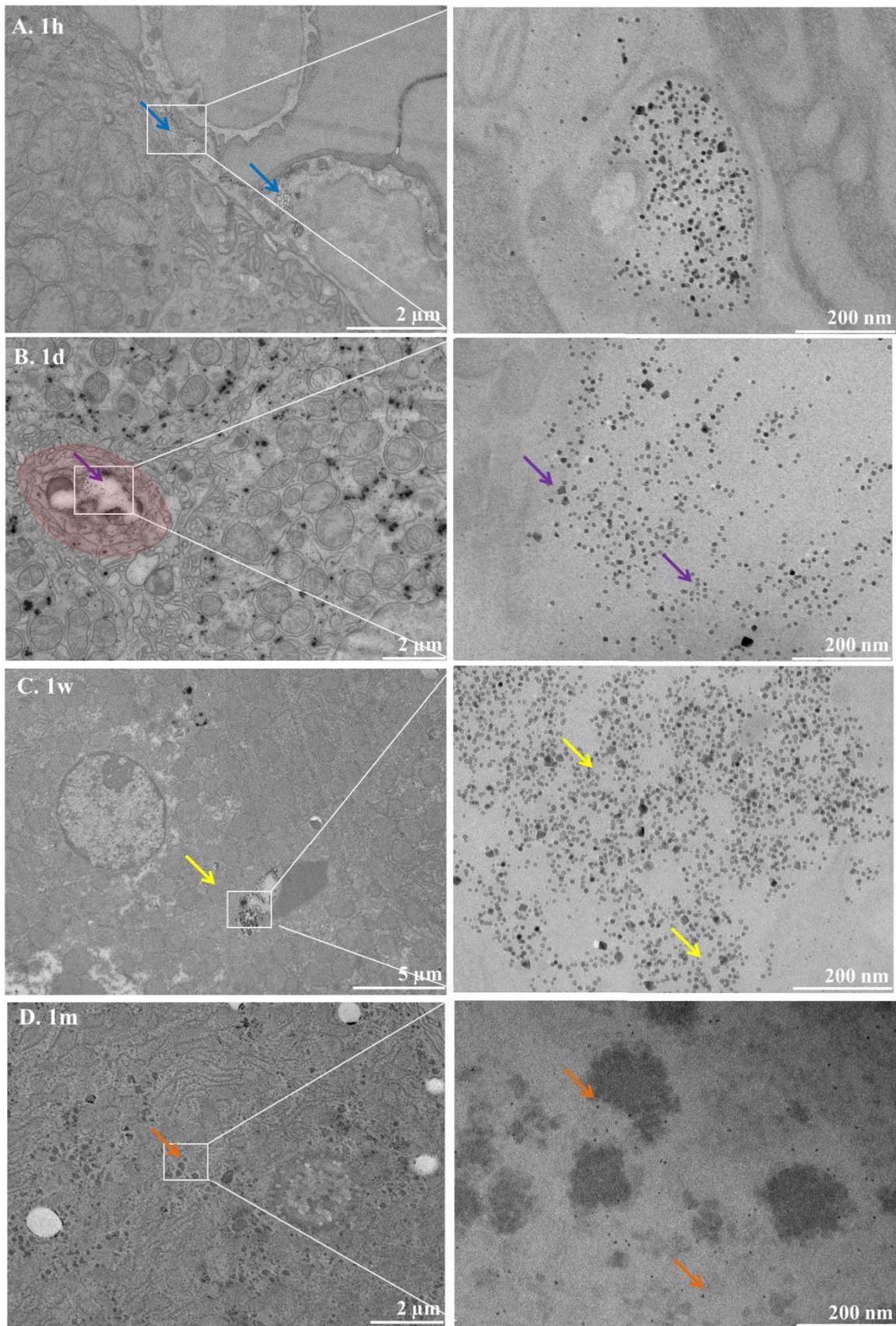


Figure 2.13 : Images de MET des LT<sup>57</sup>NPOFs dans le foie, une heure (A, flèches bleues), un jour (B, flèches violettes), une semaine (C, flèches jaunes) et un mois (D, flèches oranges) après injection de la dose élevée.

La distribution en taille des  $LT^{57}NPOFs$  a été analysée à partir des clichés de MET et comparée à celle des  $LT^{57}NPOFs$  post synthèse (Figure 2.14). On constate d'une part que la taille des  $LT^{57}NPOFs$  localisées dans le foie, une heure et un jour après injection est similaire à celle des  $LT^{57}NPOFs$  post synthèse. En effet, la taille des  $LT^{57}NPOFs$  une heure et un jour après injection est égale à 8,3 nm ( $\pm 2,1$  nm) et 8,1 nm ( $\pm 1,7$  nm), comparativement à celle des  $LT^{57}NPOFs$  post synthèse, égale à 8,7 nm ( $\pm 1,6$  nm). Ces observations sont cohérentes avec les résultats HR-ICP-MS et RFM, montrant qu'une heure après injection les  $LT^{57}NPOFs$  ne sont pas dégradées. De plus, un jour après injection, on observe en HR-ICP-MS une augmentation de la quantité de  $^{57}Fe_{NSP}$  à quantité de  $^{57}Fe_{SP}$  constante (Figure 2.10 (B), high dose). Aussi l'augmentation de la quantité de  $^{57}Fe_{NSP}$  semble due à l'accumulation tardive de produits issus de la dégradation des  $LT^{57}NPOFs$  dans d'autres tissus, ou dans le sang, plutôt qu'à la dégradation des  $LT^{57}NPOFs$  dans le foie. Au bout d'une semaine après injection, on constate que la taille des  $LT^{57}NPOFs$  diminue jusqu'à 7 nm ( $\pm 1,4$  nm), attestant de leur dégradation locale. Ces résultats sont en accord avec les résultats RFM montrant qu'au bout d'une semaine le signal magnétique diminue, suggérant la dégradation des  $LT^{57}NPOFs$ . La taille des  $LT^{57}NPOFs$  au bout d'un mois égale à 5,8 nm ( $\pm 1,0$  nm) confirme ces observations.

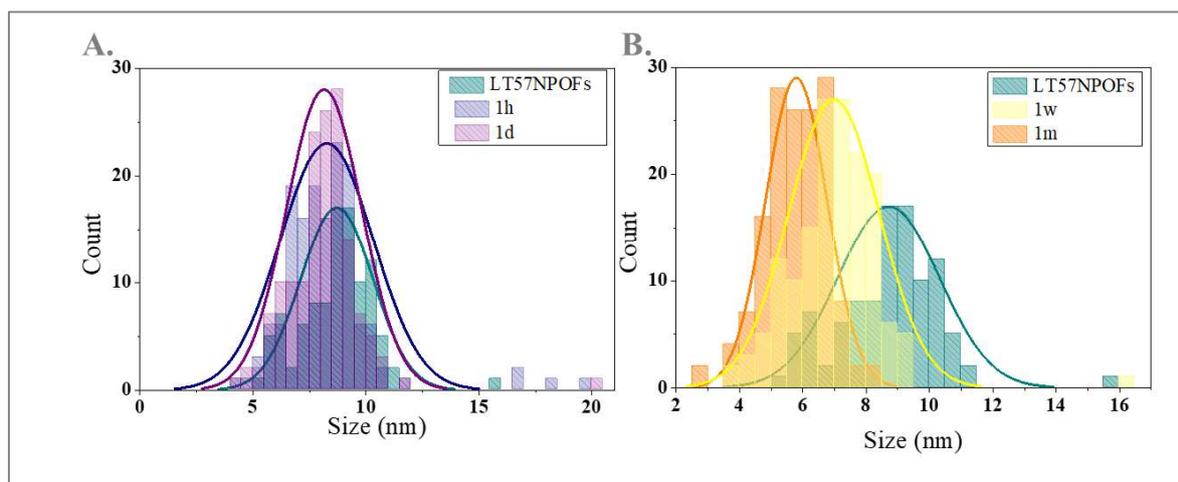


Figure 2.14 : Evolution de la distribution en taille des  $LT^{57}NPOFs$  au sein des compartiments endo/lysosomaux au cours du temps après injection de la dose élevée. Les distributions en taille ont été réalisées à partir des clichés de MET. Les couleurs utilisées pour les digrammes correspondent à celles des flèches indiquant la localisation des  $LT^{57}NPOFs$  dans les images MET de la Figure 2.13.

Dans le foie, on distingue trois processus : l'accumulation, la dégradation et l'élimination. Il convient ici de définir ces termes. Ces définitions seront utilisées dans la suite de ce manuscrit pour décrire les différents processus mentionnés dans l'ensemble des organes analysés.

---

Les notations sont les suivantes :

- Concentration en fer exogène sous forme de nanoparticules superparamagnétiques :  $[SP]_{\text{organe}}$
- Concentration en fer exogène sous forme non superparamagnétique :  $[NSP]_{\text{organe}}$
- Concentration en fer exogène totale, toutes formes confondues  $[^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}]_{\text{organe}}$

La variation des concentrations en fer exogène total, superparamagnétique et non superparamagnétique dans un organe peut être modélisée en supposant que les espèces de fer exogène sont amenées dans l'organe *via* le sang avec une vitesse qui dépend de la concentration de l'espèce dans le sang. Puis que ces espèces subissent des transformations au sein de l'organe et enfin qu'elles sont évacuées de l'organe. On obtient alors un système de trois équations différentielles couplées :

$$\begin{aligned}
 1) \quad \frac{d[^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}]_{\text{foie}}}{dt} &= k_{\text{in,SP}}[SP]_{\text{sang}} + k_{\text{in,NSP}}[NSP]_{\text{sang}} - k_{\text{out,SP}}[SP]_{\text{foie}} - k_{\text{out,NSP}}[NSP]_{\text{foie}} \\
 2) \quad \frac{d[SP]_{\text{foie}}}{dt} &= k_{\text{in,SP}}[SP]_{\text{sang}} - k_{\text{dégradation}}[SP]_{\text{foie}} - k_{\text{out,SP}}[SP]_{\text{foie}} \\
 3) \quad \frac{d[NSP]_{\text{foie}}}{dt} &= k_{\text{in,NSP}}[NSP]_{\text{sang}} + k_{\text{dégradation}}[SP]_{\text{foie}} - k_{\text{out,NSP}}[NSP]_{\text{foie}}
 \end{aligned}$$

Les termes en rouge correspondent à ce que nous désignerons par la suite comme l'accumulation de fer exogène dans un organe. Les termes en bleu correspondent aux phénomènes d'élimination du fer exogène de l'organe vers le sang, les urines, les selles, la bile etc... Enfin, les termes en vert correspondent à ce que nous désignerons comme la dégradation du fer exogène sous forme superparamagnétique vers des formes non superparamagnétiques.

---

La Figure 2.15 constitue le bilan des processus de prise en charge des LT<sup>57</sup>NPOFs dans le foie en fonction du temps et pour les deux doses.

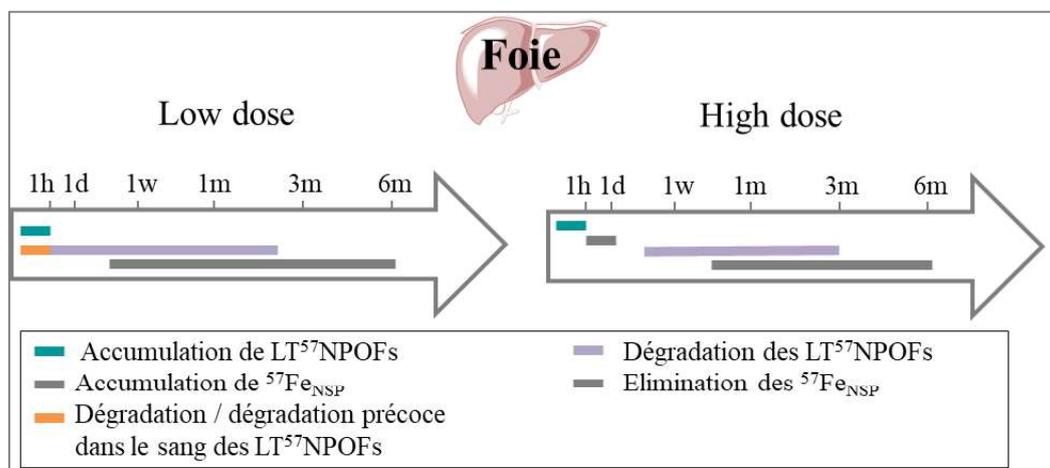


Figure 2.15 : Bilan des processus de prise en charge des LT<sup>57</sup>NPOFs dans le foie au cours du temps pour la dose faible (gauche) et élevée (droite).

### 2.2.2.2 Dégradation dans la rate

La Figure 2.16 (A) présente l'évolution de la quantité de fer exogène mesuré en HR-ICP-MS et en RFM pour les deux doses. Le maximum d'accumulation des LT<sup>57</sup>NPOFs a lieu au bout d'un jour après injection. En effet la fraction de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> s'élève à 5,7 % (± 2,9 %) et 8,8 % (± 2,2 %) pour la dose faible et élevée, respectivement.

Pour la dose faible, on constate que les fractions <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub> et <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> sont sensiblement similaires entre une heure et une semaine, ce qui suggère que les particules arrivent intègres dans la rate et y conservent leurs propriétés superparamagnétiques. Un mois après injection, on observe une augmentation de la fraction de <sup>57</sup>Fe<sub>NSP</sub> et la diminution de <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub>. Deux hypothèses peuvent être formulées. La première est que les LT<sup>57</sup>NPOFs se dégradent localement et les produits issus de la dégradation sont éliminés dans un deuxième temps. La seconde hypothèse serait une élimination directe des LT<sup>57</sup>NPOFs de la rate. Trois mois après injection, on constate une forte augmentation de la concentration splénique en <sup>57</sup>Fe<sub>NSP</sub>, plus importante que la quantité de <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub> au temps précédent, ce qui suggère un apport extérieur. Cette augmentation est caractéristique d'un stockage tardif par la rate de produits issus de la dégradation des LT<sup>57</sup>NPOFs dans d'autres tissus et qui ont probablement transité par le sang.

L'analyse IRM de la rate montre que le contraste reste sensiblement constant durant la première semaine et diminue, en accord avec les résultats RFM, au bout d'un mois. En revanche l'augmentation de la quantité de LT<sup>57</sup>NPOFs au bout d'un jour n'est pas observée en IRM à cause des phénomènes de saturation du signal. A partir de trois mois, on constate que la valeur du pourcentage d'augmentation de contraste est comparable à celle des souris contrôle. Or la rate paraît toujours très sombre (Figure 2.16

(C). En observant les rates des souris contrôles âgées de six mois, on constate que la rate est également très sombre (plus sombre que pour les souris de six semaines). Aussi le fer endogène, probablement sous forme de ferritine ou d'hémosidérine, qui augmente avec l'âge de la souris est responsable de l'assombrissement de la rate.

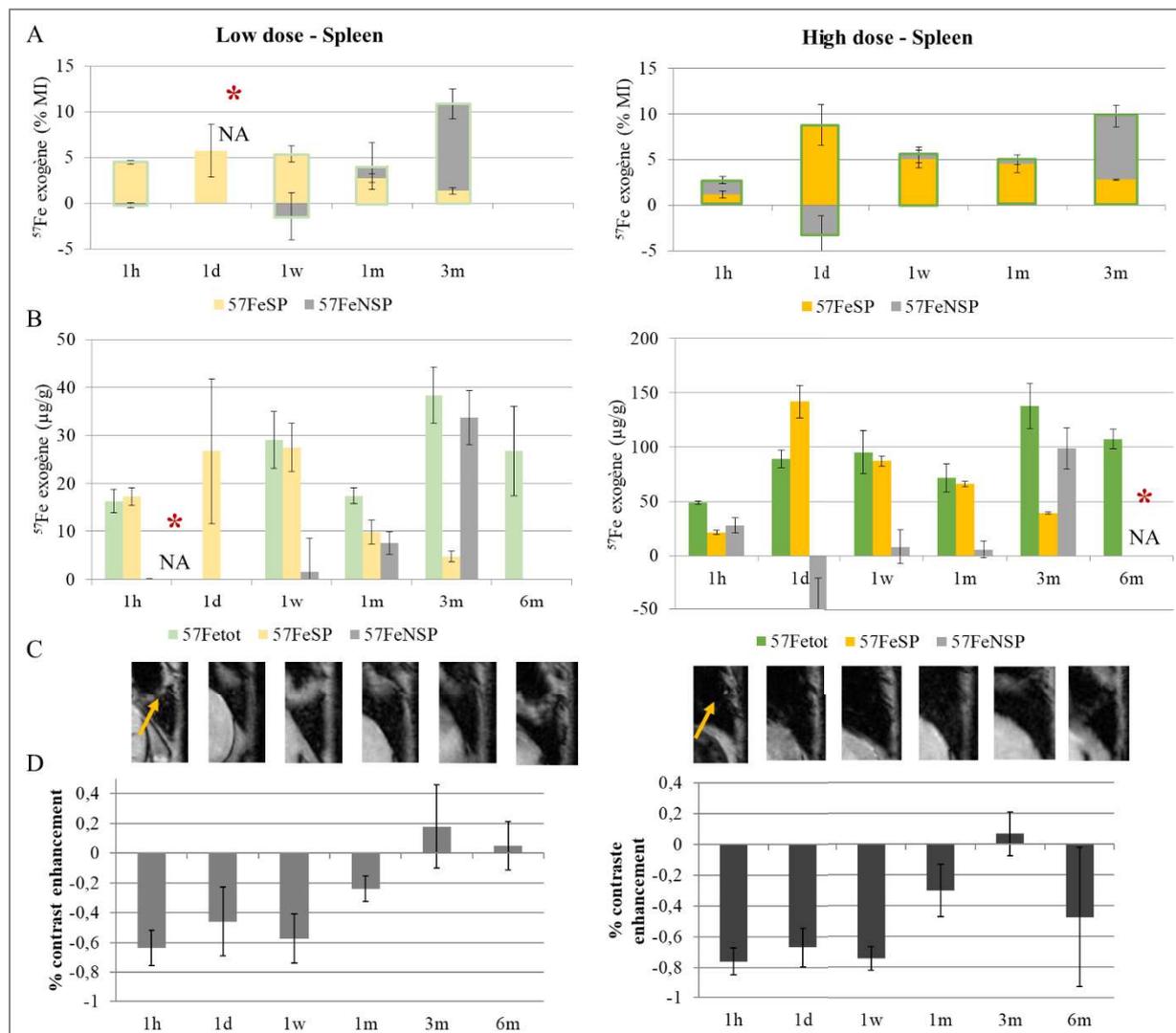


Figure 2.16 : Fraction de fer exogène dans la rate mesurée en HR-ICP-MS (vert), RFM (jaune) et différences entre ces deux valeurs (gris) en fonction du temps pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) (A). Concentrations en  $\mu\text{g/g}$  des  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$ ,  $^{57}\text{FeSP}$  et  $^{57}\text{FeNSP}$  dans la rate (B). Images IRM pondérées  $T_2^*$  ( $T_R/T_E = 300/5$  ms) de rates (issues des images de la Figure 2.8) pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) en fonction du temps (C). Evolution des contrastes IRM des parenchymes spléniques en fonction du temps (D). Les échantillons non analysés sont notés par le symbole (NA\*).

Pour la dose élevée, on constate la présence d'une fraction non négligeable de  $^{57}\text{FeNSP}$  au bout d'une heure. Or, les résultats obtenus pour la faible dose, montrent que les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  sont relativement stables aux temps courts et ne se dégradent pas dans la rate. Ainsi, et en adéquation avec les résultats obtenus pour le foie, nous faisons l'hypothèse que c'est la fraction de  $^{57}\text{FeNSP}$  issue de la dégradation précoce des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans le sang qui se localise dans la rate au temps courts. La fraction maximale

d'accumulation des  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$ , qui représente 8,8 % ( $\pm 2,2$  %) de la masse injectée ou une concentration de  $^{57}\text{Fe}$  égale à 142  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 30$   $\mu\text{g/g}$ ) est atteinte un jour après injection. Entre un jour et un mois on constate que la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  est négligeable, suggérant que les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  ne se dégradent pas. En revanche, on constate une diminution concomitante de la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  et  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  passant de 89  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 8$   $\mu\text{g/g}$ ) à 72  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 13$   $\mu\text{g/g}$ ) et de 142  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 30$   $\mu\text{g/g}$ ) à 66  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 19$   $\mu\text{g/g}$ ), respectivement. Encore une fois, deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette diminution. La première est que les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  sont dégradées et les produits de dégradation sont excrétés de la rate peu après. La seconde hypothèse implique l'élimination directe des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ . Enfin, en accord avec les résultats pour la faible dose, les quantités de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  et  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  augmentent à partir de trois mois, confirmant le stockage des produits de dégradation issus d'autres organes.

En conclusion, on constate un passage dans la rate précoce (dès une heure) des produits issus de la dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans le sang, ainsi qu'une accumulation tardive, au bout de trois mois, de ceux issus de la dégradation de  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans d'autres organes. Dans l'intervalle, les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  s'accumulent dans la rate et y perdent leurs propriétés magnétiques beaucoup plus lentement que dans le foie. Les analyses IRM montrent également une saturation du signal entre une heure et une semaine. A partir d'un mois, on constate la diminution du contraste, en accord avec les résultats RFM, et ce pour les deux doses.

Des coupes de rate ont été analysées par MET. On retrouve les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans les compartiments endo/lysosomaux des cellules de la rate, et en particulier dans des macrophages, dès une heure suivant l'injection de la dose faible (Figure 2.17). Entre une heure et un mois, les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  semblent rester dans les compartiments endo/lysosomaux. On constate la présence de petites particules à proximité des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ . Celles-ci, localisées dans ou hors des compartiments endo/lysosomaux et d'une taille égale à 5,1 nm ( $\pm 0,9$  nm) évoquent des particules de ferritines. Un jour et une semaine après injection, on constate des structures de type *finger print* à proximité des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ , caractéristique de la présence de protéines organisées de ferritine (Figure 2.17, (B & C (flèches rouges))).

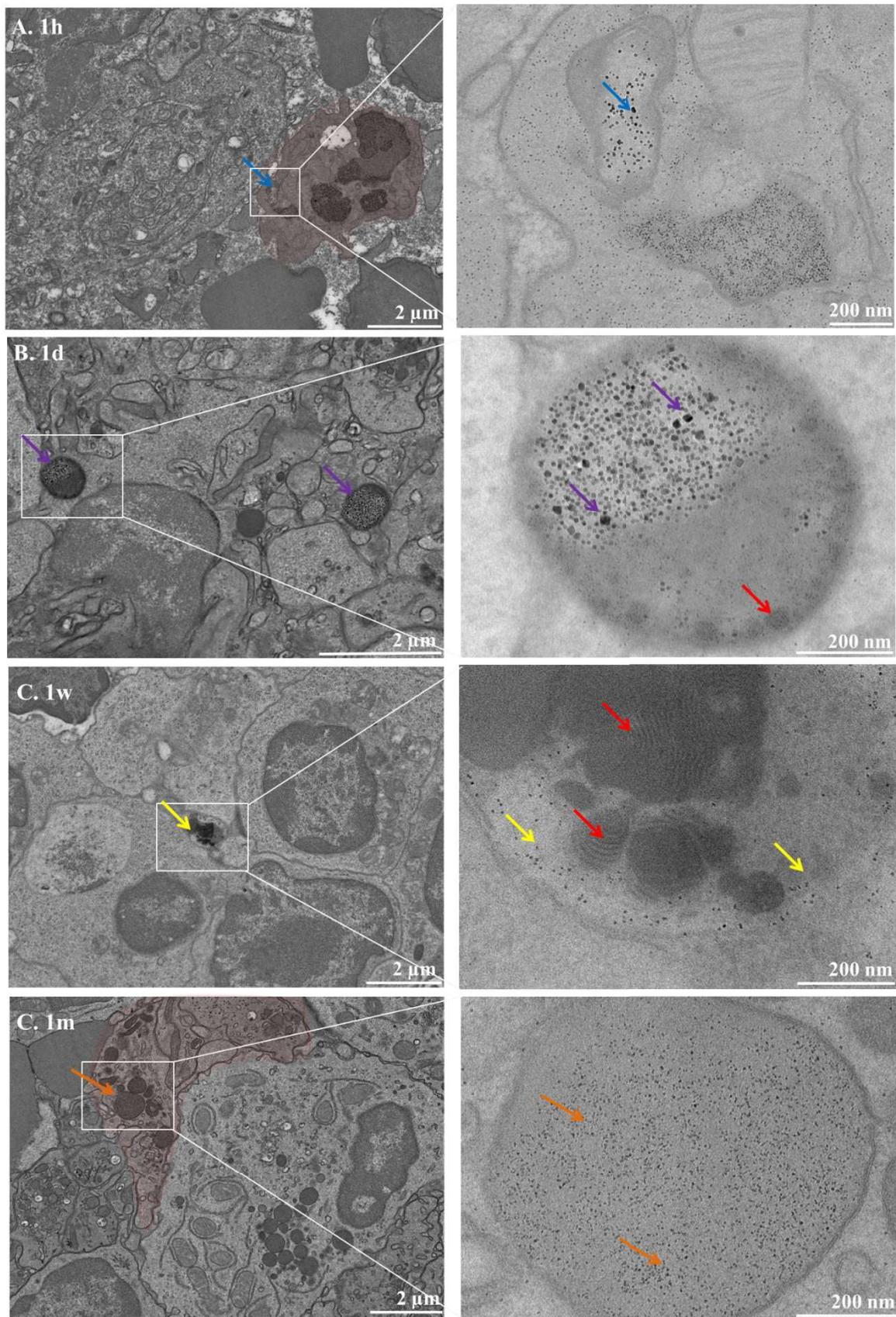


Figure 2.17 : Images de MET des LT<sup>57</sup>NPOFs dans la rate, une heure (A, flèches bleues), un jour (B, flèches violettes), une semaine (C, flèches jaunes) et un mois (D, flèches oranges) après injection de la dose faible. Un jour et une semaine après injection, on constate la présence de structure type *finger print* à proximité des LT<sup>57</sup>NPOFs (flèches rouges).

La distribution en taille des particules a été analysée à partir des clichés de MET sur un total de 150 particules (Figure 2.18). On constate d'une part qu'à une heure et à un jour après injection, les distributions en taille des LT<sup>57</sup>NPOFs égales à 8,6 nm (± 1,9 nm) et 8,4 nm (± 2,4 nm), respectivement, sont comparables à celle des LT<sup>57</sup>NPOFs post synthèse, égale à 8,7 nm (± 1,6 nm). Ces observations confirment les résultats RFM, selon lesquels les LT<sup>57</sup>NPOFs ne sont pas dégradées entre une heure et un jour après injection (Figure 2.16, B). A partir d'une semaine, la taille moyenne des LT<sup>57</sup>NPOFs diminue jusqu'à atteindre une valeur égale à 5 nm (± 1 nm) au bout d'un mois. Or d'après les résultats RFM obtenus précédemment, les quantités de <sup>57</sup>Fe<sub>ESP</sub> et <sup>57</sup>Fe<sub>NSP</sub> sont sensiblement similaires au bout d'une semaine. Aussi nous en avons conclu que les LT<sup>57</sup>NPOFs ne se dégradent pas pour ce temps. Cependant, la diminution de taille de celles-ci observées en MET attestent qu'elles sont dégradées au bout d'une semaine. Une première hypothèse est qu'après la dégradation des LT<sup>57</sup>NPOFs, les produits issus de la dégradation sont par la suite éliminés de la rate. Ce scénario pourrait expliquer l'absence de <sup>57</sup>Fe<sub>NSP</sub> lorsque la taille des LT<sup>57</sup>NPOFs diminue. Nous pouvons en outre écarter l'hypothèse formulée plus haut, selon laquelle les LT<sup>57</sup>NPOFs seraient éliminées sous forme particulaire de la rate.

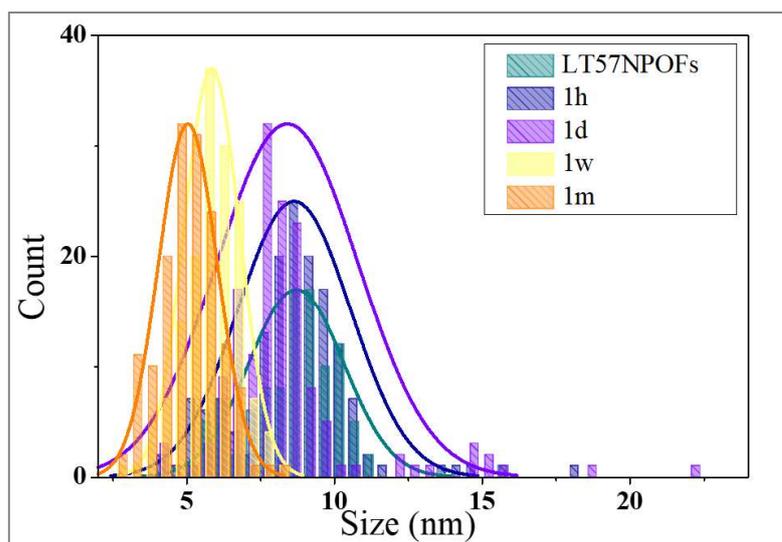


Figure 2.18 : Mesures de MET de l'évolution de la distribution en taille des LT<sup>57</sup>NPOFs au sein des compartiments endo/lysosomaux de cellules de la rate au cours du temps après injection de la dose faible. Les couleurs utilisées pour les digrammes correspondent à celles des flèches indiquant la localisation des LT<sup>57</sup>NPOFs dans les images de la Figure 2.17.

La Figure 2.19 représente les clichés de MET de coupe de rate après injection de la dose élevée. Une heure après injection, on constate qu'une partie des LT<sup>57</sup>NPOFs est localisée dans les compartiments endo/lysosomaux. On constate néanmoins que certaines LT<sup>57</sup>NPOFs demeurent dans le cytoplasme et ce jusqu'à un jour après injection (Figure 2.19, B flèches vertes). Ces observations sont cohérentes avec les résultats RFM montrant que l'accumulation des LT<sup>57</sup>NPOFs dans la rate atteint un maximum au bout d'un jour (Figure 2.16), aussi le processus de capture cellulaire est en cours à un jour après injection. Pour ces temps, les LT<sup>57</sup>NPOFs ne semblent pas être dégradées. On constate qu'une

semaine après injection, le contour des  $LT^{57}NPOFs$  n'est plus aussi bien défini, comparativement aux  $LT^{57}NPOFs$  présentes au bout d'une heure et un jour. En outre, leur contraste semble avoir diminué. Les  $LT^{57}NPOFs$  sont toujours localisées dans les compartiments endo/lysosomaux. Un mois après injection, on observe que les  $LT^{57}NPOFs$  commencent à être localisées hors des compartiments lysosomaux, par ouverture de ceux-ci ou par transport des  $LT^{57}NPOFs$  hors de ces compartiments. Des structures de type *finger print* sont également présentes à proximité des  $LT^{57}NPOFs$ , attestant de la présence de ferritines (flèches rouges).

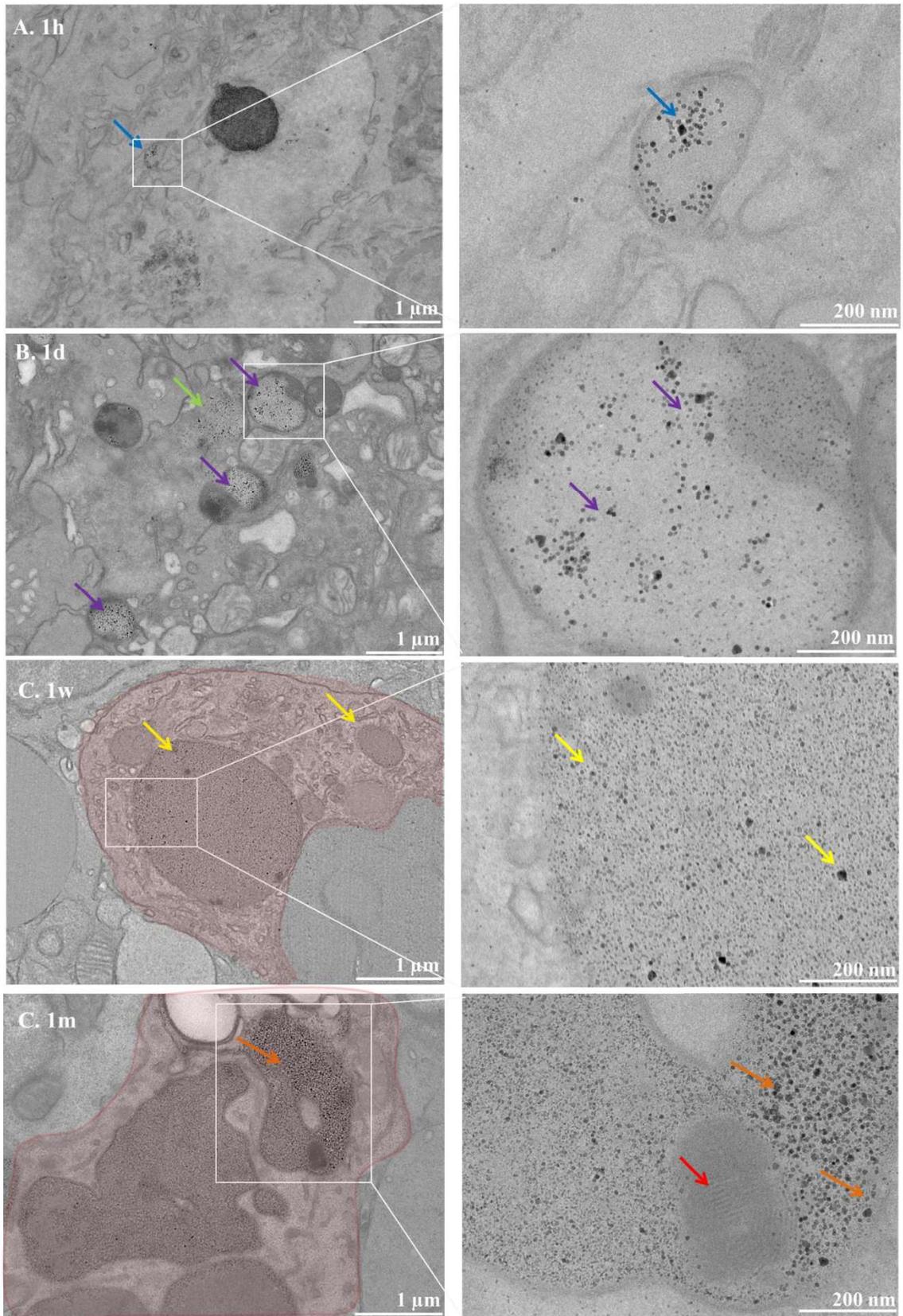


Figure 2.19 : Images de MET des LT<sup>57</sup>NPOFs dans la rate, une heure (A, flèches bleues), un jour (B, flèches violettes dans les compartiments endo/lysosomaux et flèches vertes pour les LT<sup>57</sup>NPOFs contenues hors de ces compartiments.), une semaine (C, flèches jaunes) et un mois (D, flèches oranges) après injection de la dose élevée. Un mois après injection on constate la présence de structure type *finger print* (flèches rouges).

La distribution en taille des particules a été analysée à partir des clichés de MET sur un total de 150 particules (Figure 2.20). On constate d'une part qu'à une heure et un jour après injection, les distributions en taille des LT<sup>57</sup>NPOFs égales à 8,5 nm (± 2,0 nm) et 8,6 nm (± 2,3 nm), respectivement, sont comparables à celle des LT<sup>57</sup>NPOFs post synthèse, égale à 8,7 nm (± 1,6 nm). Ces observations confirment les résultats RFM, selon lesquels les LT<sup>57</sup>NPOFs ne sont pas dégradées entre une heure et un jour après injection (Figure 2.16, B). A partir d'une semaine, la taille des LT<sup>57</sup>NPOFs mesurée à partir des clichés de MET est égale à 7,5 nm (± 1,6 nm), aussi et en adéquation avec les résultats RFM, les LT<sup>57</sup>NPOFs se dégradent. Au bout d'un mois la taille des LT<sup>57</sup>NPOFs est égale à 7,1 nm (± 1,8 nm) ce qui confirme leur dégradation. Ces observations, complémentaires des résultats RFM montrent que la diminution simultanée des quantités de <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub> et <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> observée dans la Figure 2.16 montrent que les LT<sup>57</sup>NPOFs ne sont pas éliminées de la rate mais dégradées dans les compartiments endo/lysosomaux de cellules spléniques. En outre, les produits issus de la dégradation sont excrétés de la rate après dégradation des LT<sup>57</sup>NPOFs.

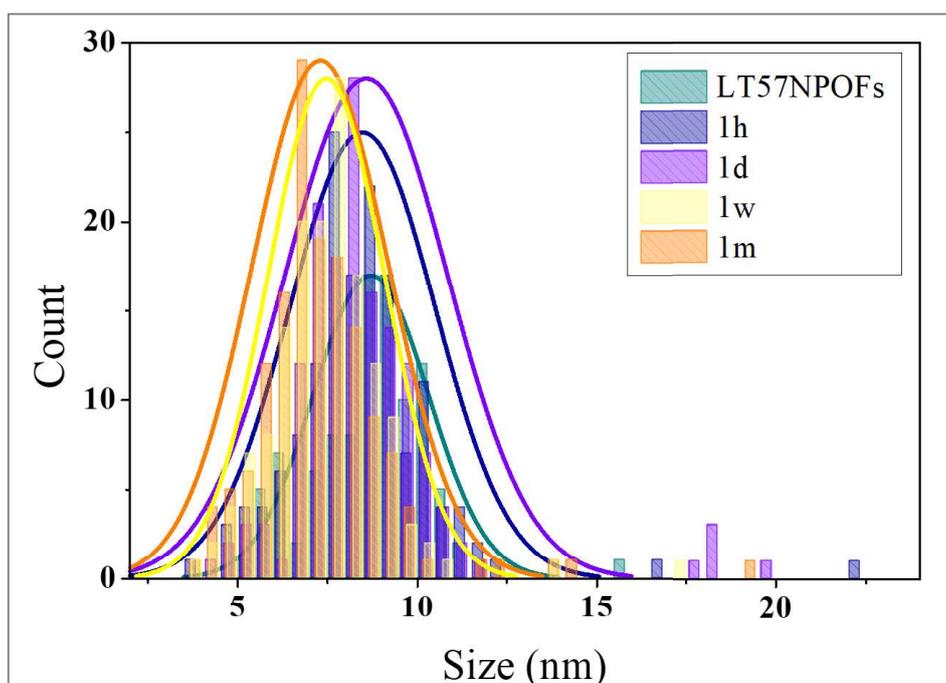


Figure 2.20 : Mesures de MET de l'évolution de la distribution en taille des LT<sup>57</sup>NPOFs au sein des compartiments endo/lysosomaux au cours du temps après injection de la dose élevée. Les couleurs utilisées pour les digrammes correspondent à celles des flèches indiquant la localisation des LT<sup>57</sup>NPOFs dans les images de la Figure 2.19.

La combinaison de ces résultats permet de mettre en avant quatre processus distincts ayant lieu dans la rate. Dans un premier temps les LT<sup>57</sup>NPOFs sont accumulées dans la rate où elles sont confinées dans les compartiments endo/lysosomaux. A partir d'une semaine, elles sont dégradées dans ceux-ci, comme l'atteste la diminution en taille observée en MET et la diminution du signal magnétique. Les produits issus de la dégradation sont ensuite excrétés de la rate entre une semaine et un mois après

injection. Enfin, on observe une accumulation tardive de fer exogène non magnétique issu de la dégradation des  $LT^{57}NPOFs$  dans d'autres organes. Aussi l'information complémentaire apportée par ces expériences est que le transfert entre le foie et la rate concerne des entités non magnétiques. Les produits issus de la dégradation des  $LT^{57}NPOFs$  dans le foie sont excrétés de celui-ci et transférés vers la rate *via* la circulation sanguine. Aussi le rôle de la rate est double puisque d'une part les  $LT^{57}NPOFs$  y sont dégradées (beaucoup plus lentement que dans le foie) et, d'autre part, elle constitue un véritable organe de stockage des produits issus de la dégradation. La Figure 2.21 présente le bilan des processus de prise en charge des  $LT^{57}NPOFs$  dans la rate en fonction du temps et pour les deux doses.

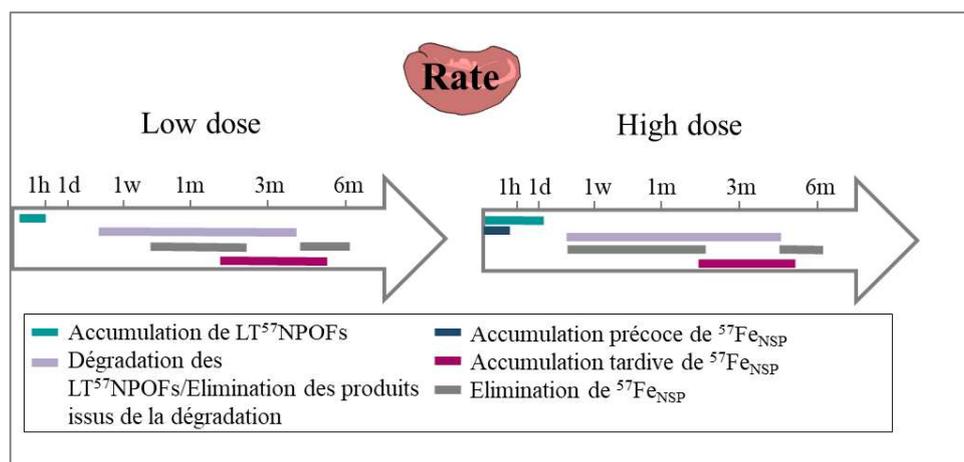


Figure 2.21 : Bilan des processus de prise en charge des  $LT^{57}NPOFs$  dans la rate au cours du temps pour la dose faible (gauche) et élevée (droite).

### 2.2.2.3 Dégradation dans les reins et les poumons

D'après les résultats HR-ICP-MS (Figure 2.6), les  $LT^{57}NPOFs$  ne sont que très peu accumulées dans les reins et dans les poumons, à hauteur d'environ 1 % de la masse injectée un jour après injection.

La Figure 2.22 (A) représente les fractions de fer exogène mesurées en HR-ICP-MS et RFM au cours du temps, respectivement, ainsi que la fraction de  $^{57}Fe_{NSP}$ , calculée par la différence des deux valeurs précédentes dans les poumons. On observe dans un premier temps pour la dose faible, que les fractions de  $^{57}Fe_{tot}$  et  $^{57}Fe_{SP}$  sont indiscernables, avec des valeurs égales à 1,4 % ( $\pm 0,6$  %) et 1,2 % ( $\pm 0,6$  %), respectivement à une heure après injection. Ainsi les  $LT^{57}NPOFs$  sont internalisées dans les poumons sous forme particulaire. Alors que la variation au cours du temps de la quantité de  $^{57}Fe_{tot}$  est faible, passant de 3,1  $\mu g/g$  ( $\pm 1,4$   $\mu g/g$ ) au bout d'une heure à 1,8  $\mu g/g$  ( $\pm 0,3$   $\mu g/g$ ) après six mois, la quantité de  $^{57}Fe_{SP}$  diminue plus rapidement, passant de 4,6  $\mu g/g$  ( $\pm 2,6$   $\mu g/g$ ) à 0,1  $\mu g/g$  ( $\pm 0,16$   $\mu g/g$ ) entre ces deux temps. Ainsi, les  $LT^{57}NPOFs$  localisées dans les poumons sont probablement dégradées et les produits issus de leur dégradation sont éliminés très partiellement des poumons entre un et trois mois. En effet la quantité de  $^{57}Fe_{NSP}$  passe de 2,5  $\mu g/g$  ( $\pm 0,4$   $\mu g/g$ ) à 1,9  $\mu g/g$  ( $\pm 0,4$   $\mu g/g$ ).

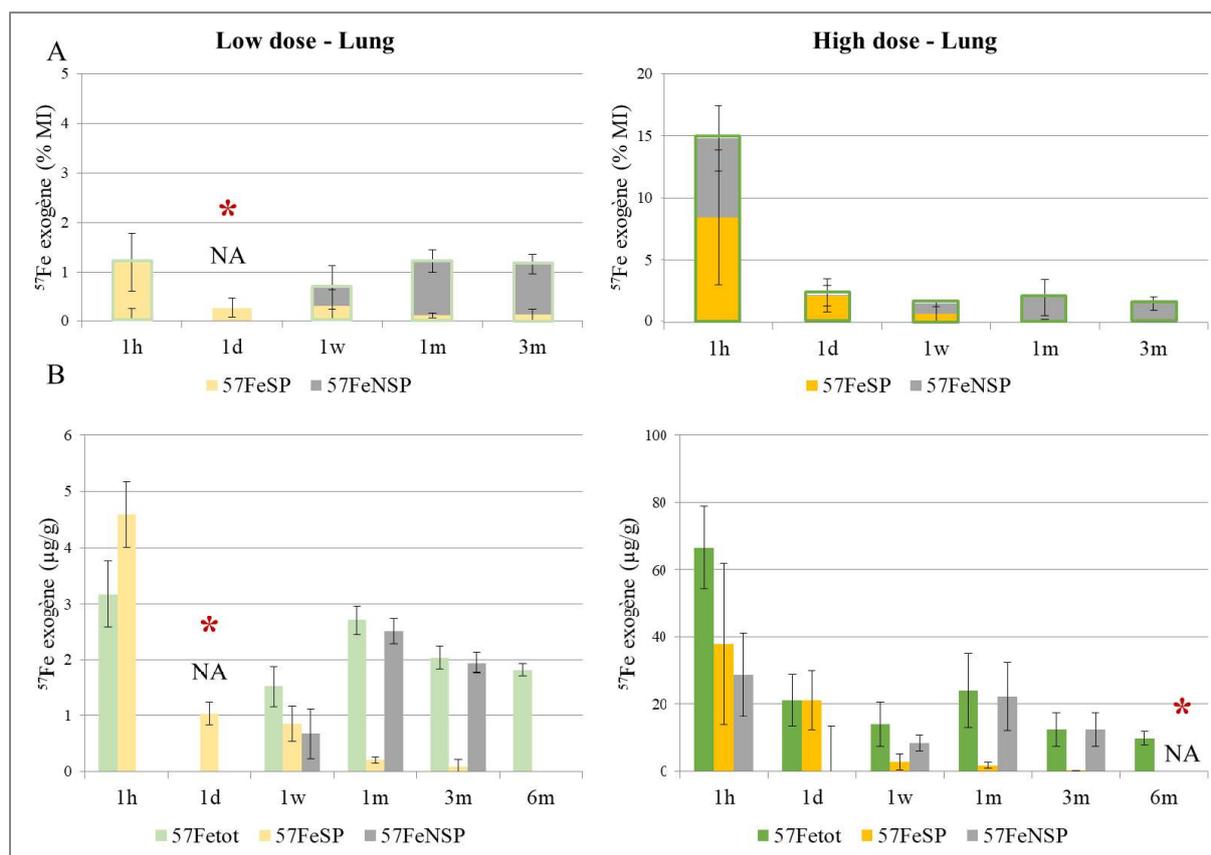


Figure 2.22 : Fractions de fer exogène dans les poumons mesurées en HR-ICP-MS (vert), RFM (jaune) et différences entre ces deux valeurs (gris) en fonction du temps pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) (A). Concentration en  $\mu\text{g/g}$  des  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$ ,  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  et  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  dans les poumons (B). Les échantillons non analysés sont notés par le symbole (NA\*).

Pour la dose élevée, on constate une quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  élevée une heure après injection, à hauteur de  $66 \mu\text{g/g}$  ( $\pm 12 \mu\text{g/g}$ ). Cette quantité peut être due à la présence de quelques agrégats dans le sang qui sont retenus dans les capillaires pulmonaires. A partir d'un jour après injection, on observe une tendance similaire à celle de la faible dose. Les quantités de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  et de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$ , égales à  $21 \mu\text{g/g}$  ( $\pm 9 \mu\text{g/g}$ ) et  $21 \mu\text{g/g}$  ( $\pm 8 \mu\text{g/g}$ ) sont similaires à celles mesurées à un jour après injection, témoignant de la présence de  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ . Les analyses en MET des coupes de poumons pour la dose élevée, un jour après injection, montrent la présence de  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans des compartiments endo/lysosomaux dans les cellules pulmonaires (Figure 2.23, flèches violettes). Puis la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  diminue à quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  constante, confirmant leur dégradation dans les poumons et leur transformation en fer non magnétique. On constate également la diminution de la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  entre un mois et six mois, passant de  $24 \mu\text{g/g}$  ( $\pm 11 \mu\text{g/g}$ ) à  $10 \mu\text{g/g}$  ( $\pm 2 \mu\text{g/g}$ ), suggérant l'élimination progressive et partielle des produits issus de la dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  des poumons.

Les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  localisées dans les poumons y sont ainsi dégradées entre un jour et trois mois. Les produits issus de leur dégradation sont ensuite très partiellement éliminés des poumons, avec une cinétique lente, comparativement à la cinétique d'élimination observée dans le foie.

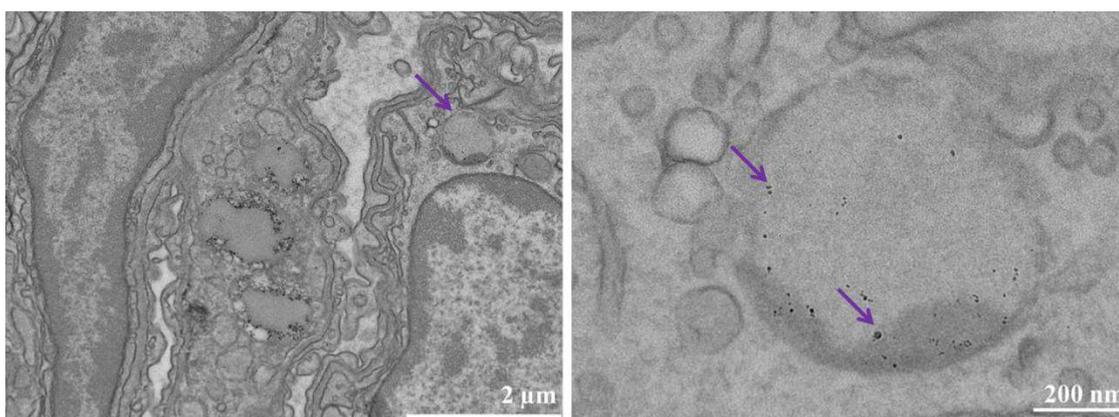


Figure 2.23 : Images de MET des LT<sup>57</sup>NPOFs un jour après injection de la dose élevée dans les poumons (flèches violettes).

La Figure 2.24 montre le bilan des processus de prise en charge des LT<sup>57</sup>NPOFs dans les poumons en fonction du temps et pour les deux doses.

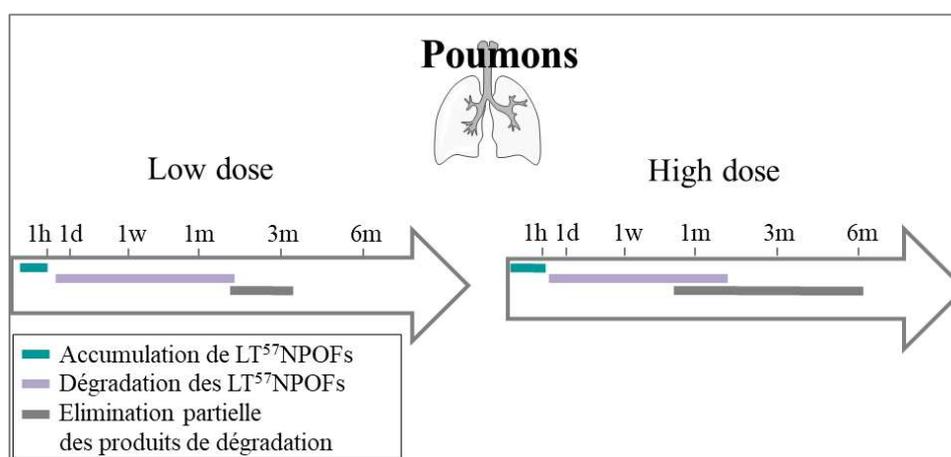


Figure 2.24 : Bilan des processus de prise en charge des LT<sup>57</sup>NPOFs dans les poumons au cours du temps pour la dose faible (gauche) et élevée (droite).

La Figure 2.25 présente les quantités de fer exogène mesurées par HR-ICP-MS et RFM, respectivement et les différences de ces valeurs, dans les reins.

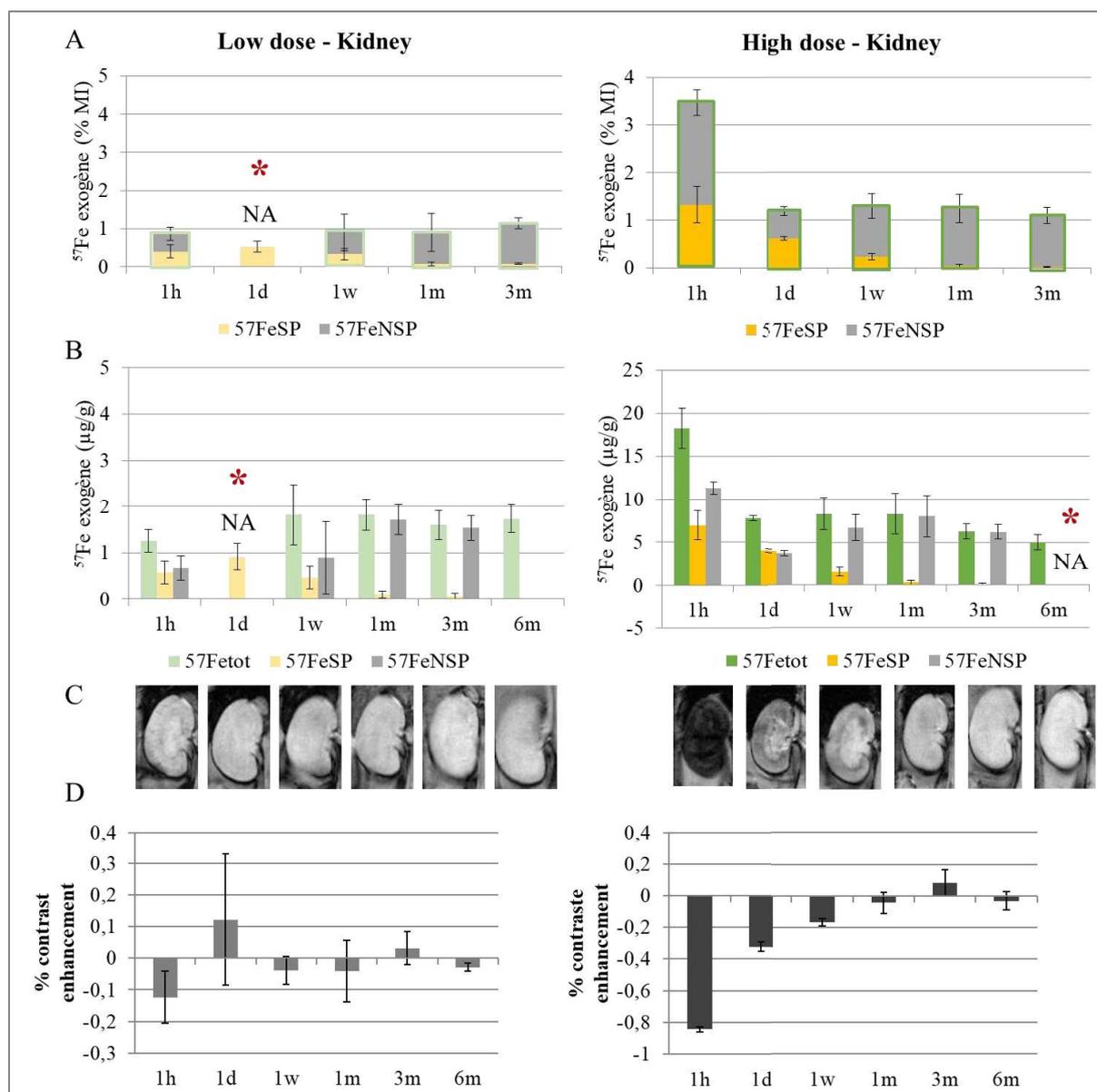


Figure 2.25 : Fractions de fer exogène mesurées en HR-ICP-MS (vert), RFM (jaune) et différences de ces deux valeurs (gris) en fonction du temps pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) (A). Concentrations en  $\mu\text{g/g}$  des  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$ ,  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  et  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  dans les reins (B). Images IRM pondérées  $T_2^*$  ( $T_R/T_E = 300/5$  ms) de reins (issus des images de la Figure 2.8) pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) en fonction du temps (C). Pourcentages d'augmentation de contraste IRM des reins en fonction du temps (D). Les échantillons non analysés sont notés par le symbole (NA\*).

On constate d'une part que, pour les deux doses, la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  est plus élevée que celle de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  ce qui montre qu'à la fois du fer superparamagnétique et du fer non superparamagnétique atteignent les reins au bout d'une heure. Pour la dose faible, la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  reste constante au cours du temps alors que la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  diminue. En effet, la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  varie de  $1,25 \mu\text{g/g}$  ( $\pm 0,25 \mu\text{g/g}$ ) à  $1,74 \mu\text{g/g}$  ( $\pm 0,3 \mu\text{g/g}$ ) entre une heure et six mois alors que la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  diminue de  $0,6 \mu\text{g/g}$  ( $\pm 0,2 \mu\text{g/g}$ ) à  $0,07 \mu\text{g/g}$  ( $\pm 0,06 \mu\text{g/g}$ ). Ces résultats suggèrent que les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  sont dégradées dans les tissus rénaux et les produits issus de leur dégradation y persistent. On observe en

IRM une légère variation du contraste du cortex, une heure après injection, accompagnée d'une faible diminution du pourcentage d'augmentation du contraste, confirmant leur présence dans les reins. Malgré la présence de  $LT^{57}NPOFs$  dans les reins un jour après injection, aucune variation significative du contraste global n'est observée.

Pour la dose élevée, on constate une quantité élevée de  $^{57}Fe_{tot}$  comparativement à la quantité de  $^{57}Fe_{SP}$ , suggérant l'accumulation de  $^{57}Fe_{NSP}$  additionnels ou à la dégradation précoce des  $LT^{57}NPOFs$  dans les reins au bout d'une heure. La diminution de la quantité de  $^{57}Fe_{tot}$  témoigne de l'excrétion rapide, dès le premier jour, des  $^{57}Fe_{NSP}$ . On observe également que la quantité de  $^{57}Fe_{SP}$  diminue en fonction du temps. En effet, celle-ci est égale à  $7 \mu g/g (\pm 2 \mu g/g)$ ,  $4 \mu g/g (\pm 2 \mu g/g)$ ,  $1,5 \mu g/g (\pm 0,5 \mu g/g)$  et  $0,3 \mu g/g (\pm 0,2 \mu g/g)$  une heure, un jour, une semaine et un mois suivant l'injection, respectivement. Les images IRM correspondantes, ainsi que l'évolution du pourcentage d'augmentation de contraste sont cohérentes avec ces observations. Une heure après injection de la dose élevée, les reins paraissent sombres et s'éclaircissent avec le temps (Figure 2.25 (C et D)). On observe également un contraste persistant dans le cortex entre un jour et une semaine après injection, démontrant la localisation des  $LT^{57}NPOFs$  dans ceux-ci.

Pour les deux doses, la quantité de  $^{57}Fe_{SP}$  diminue à quantité de  $^{57}Fe_{tot}$  constante. Ainsi, les  $LT^{57}NPOFs$  se dégradent dans les reins, et les produits issus de la dégradation persistent dans les reins et ce jusqu'à six mois après injection.

La Figure 2.26 résume le bilan des processus de prise en charge des  $LT^{57}NPOFs$  dans les reins en fonction du temps et pour les deux doses.

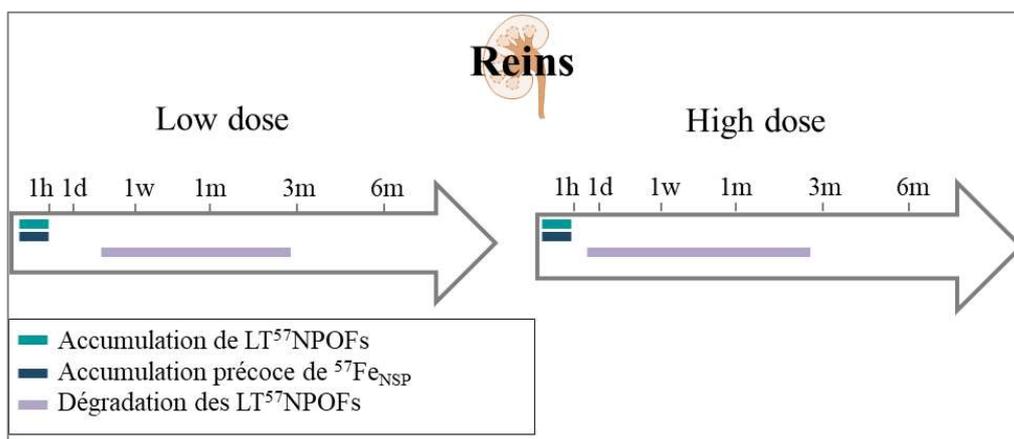


Figure 2.26 : Bilan des processus de prise en charge des  $LT^{57}NPOFs$  dans les reins au cours du temps pour la dose faible (gauche) et élevée (droite).

Dans cette partie, nous avons analysé les dynamiques de dégradation des  $LT^{57}NPOFs$  en fonction du temps et dans chaque organe. Dans un premier temps nous avons observé l'accumulation de  $LT^{57}NPOFs$  et de fer exogène non magnétique dans les organes. L'accumulation de  $^{57}Fe_{NSP}$  dès une

heure après injection suggère un mécanisme de dégradation précoce dans le sang. On constate également que dans la majorité des organes les  $LT^{57}NPOFs$  se dégradent, donnant lieu à des entités non superparamagnétiques. Celles-ci sont, en première hypothèse, complexées avec des ligands endogènes et protéines, affins du fer. La présence de ferritines à proximité des  $LT^{57}NPOFs$  suggère la prise en charge des produits issus de leur dégradation, par les ferritines. Enfin, on observe que ces produits de dégradation circulent dans l'organisme.

### 2.2.3 Transfert des produits issus de la dégradation

Les organes reins et poumons concentrent une fraction faible du fer exogène injecté, bien que potentiellement importante pour la physiopathologie. Dans la suite, ils ne seront plus considérés dans les bilans quantitatifs qui visent à retracer le parcours du fer exogène dans l'organisme.

Dans le foie, on constate que la quantité de fer exogène mesurée en HR-ICP-MS diminue au cours du temps, suggérant l'élimination ou le recyclage de ces entités dans d'autres tissus (Figure 2.27). Par ailleurs, on constate que celle-ci augmente dans le sang à partir d'une semaine et dans la rate entre un et trois mois. Nous avons mentionné dans la section 2.1 la présence d'un transfert de fer exogène du foie vers la rate *via* la circulation sanguine. A partir du double suivi élémentaire et magnétique des  $LT^{57}NPOFs$ , nous constatons que ce transfert a lieu entre les produits issus de la dégradation des  $LT^{57}NPOFs$  dans le foie qui sont par la suite acheminés dans la rate.

L'excrétion des produits de dégradation par le foie ainsi que le gain de ceux-ci dans le sang et la rate ont été quantifiés entre une semaine et un mois et entre un et trois mois pour les deux doses (Figure 2.27 (C et D)).

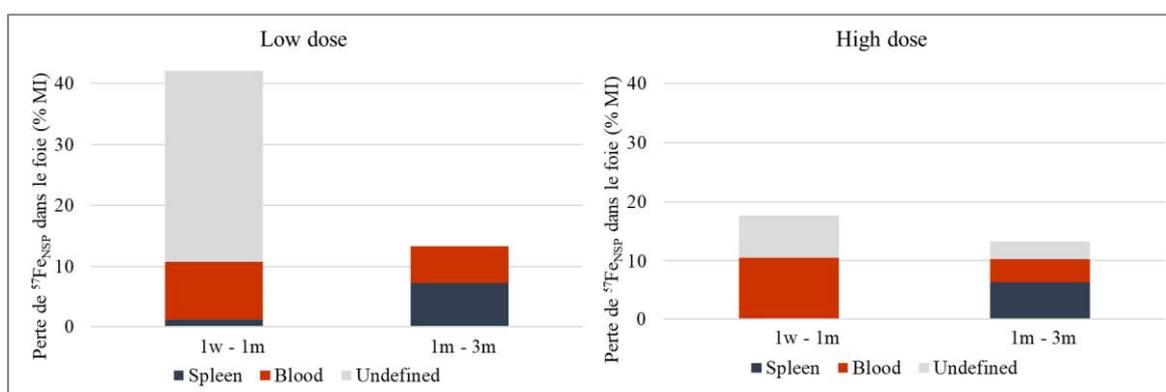


Figure 2.27 : Fractions de  $^{57}Fe_{NSP}$  éliminées du foie et récupérées par la rate ou présente dans le sang, entre une semaine et un mois et entre un et trois mois pour la dose faible (gauche) et élevée (droite).

Pour la dose faible, on constate qu'une partie des  $^{57}Fe_{NSP}$  est retrouvée dans la rate et dans le sang. Cependant, les organes analysés ne permettent pas de rendre compte du devenir de la majorité de cette fraction NSP issue du foie. Pour la dose élevée, la majorité du  $^{57}Fe_{NSP}$  est recyclée dans la circulation sanguine. La quantité de  $^{57}Fe_{tot}$  analysée sur l'ensemble des organes sélectionnés diminue également à

partir d'un mois (Figure 2.2) pour les deux doses. Ainsi, ces résultats montrent qu'une partie du fer exogène est soit éliminée de l'organisme *via* les urines et selles soit acheminée vers d'autres organes et tissus qui n'ont pas été analysés, tels que les os, les muscles ou les tissus adipeux. Entre un et trois mois, l'intégralité des  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  issues du foie est retrouvée dans le sang et dans la rate pour la dose faible. On observe une tendance similaire pour la dose élevée, caractérisée par l'augmentation de la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  dans la rate entre un et trois mois. Ces résultats montrent que les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  sont majoritairement dégradées dans le foie. Puis les produits issus de la dégradation sont dans un premier temps éliminés du foie entre une semaine et un mois après injection. Une partie de ces derniers est ensuite acheminée dans la circulation sanguine puis stockée dans la rate entre un mois et trois mois. Ces résultats sont en accord avec une étude effectuée précédemment au laboratoire, qui a également montré une augmentation du fer non superparamagnétique dans la rate entre un et six mois après injection de NPOFs.<sup>3</sup> En lien avec le premier chapitre de ce manuscrit, ces résultats suggèrent que le fer issu de la dégradation est pris en charge par les ferritines endogènes ou autres protéines intervenant dans le métabolisme du fer telles que les transferrines, et rejoignent la réserve de fer endogène.

#### **2.2.4 Effet de la dose**

Lors de cette expérience, deux doses ont été administrées au souris, la dose faible représentant un total de 44  $\mu\text{g}$  de fer et la dose élevée égale à 182  $\mu\text{g}$  de fer. Les processus de dégradation, d'élimination et de transfert ont lieu essentiellement dans le foie, la rate et le sang. Ainsi nous considérerons seulement ces organes pour l'évaluation de l'effet de la dose sur ces phénomènes.

##### **2.2.4.1 Effet de la dose dans le foie**

Dans le cas du foie, les résultats présentés précédemment (2.2.2.1) ont mis en évidence deux processus distincts, la dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  et l'élimination des produits de dégradation du foie. La Figure 2.28 représente les fractions de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  et  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  dans le foie en fonction du temps, exprimées soit en pourcentages de masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée, soit en  $\mu\text{g/g}$ .

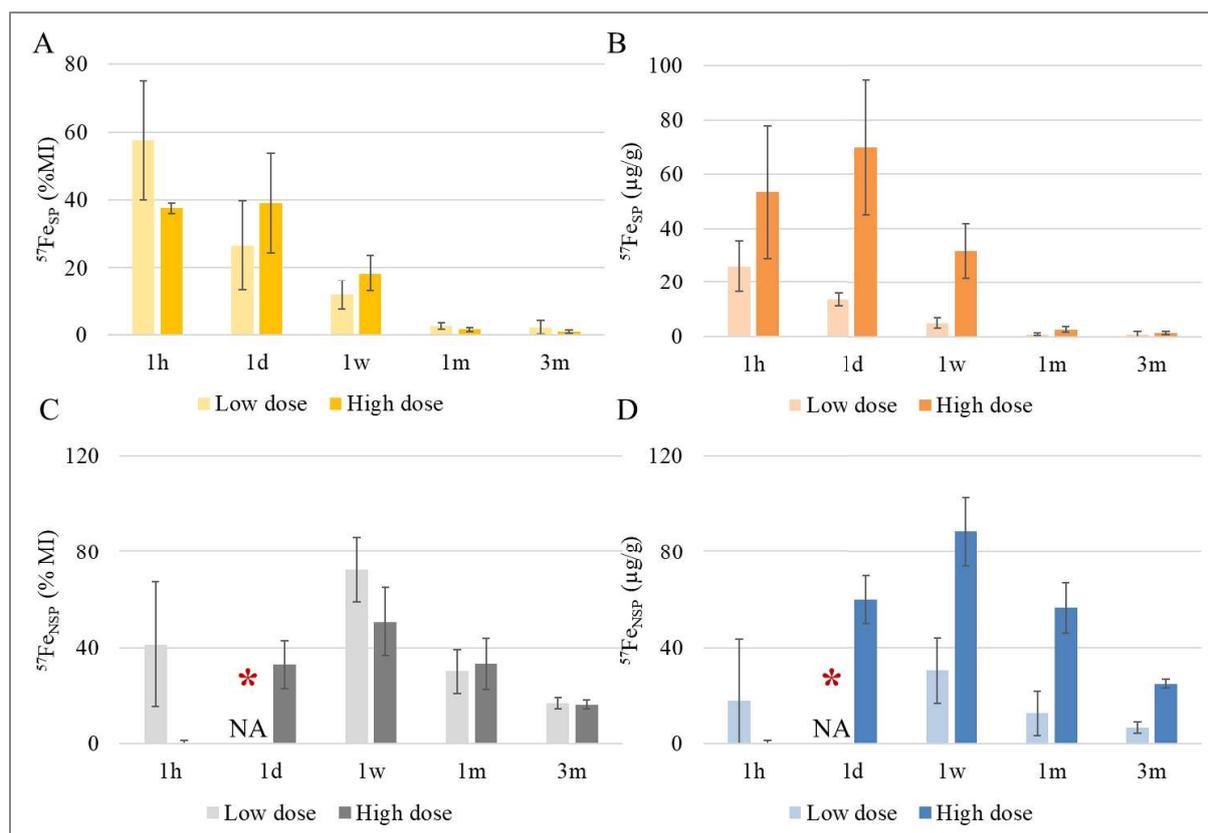


Figure 2.28 : Quantités de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  dans le foie, exprimées en pourcentage de la masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée (A) et en  $\mu\text{g/g}$  (B) et quantités de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  dans le foie exprimées en pourcentages de masse injectée (C) et en  $\mu\text{g/g}$  (D), au cours du temps.

En considérant uniquement l'évolution des fractions de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$ , on constate que ces valeurs sont sensiblement similaires pour les deux doses à partir d'une semaine après injection. Exprimée concentration (en  $\mu\text{g/g}$  du  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  dans le foie), l'accumulation hépatique des LT $^{57}\text{NPOFs}$  est donc bien supérieure pour la dose élevée comparativement à la dose faible (11  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 6 \mu\text{g/g}$ ) versus 69  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 25 \mu\text{g/g}$ )). De plus, la cinétique de dégradation est plus rapide pour la dose élevée que pour la dose faible. En effet, la différence de concentration de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  entre un jour et un mois, est égale à environ 12  $\mu\text{g/g}$  pour la dose faible à comparer à 67  $\mu\text{g/g}$  pour la dose élevée. Ces résultats montrent que la cinétique de dégradation dépend de la dose administrée et que cette dernière est plus rapide pour la dose injectée la plus élevée. Une étude antérieure effectuée dans le laboratoire montre une cinétique de dégradation magnétique plus lente après injection d'une dose de 2630  $\mu\text{g}$  comparativement à une dose de 61  $\mu\text{g}$ .<sup>3</sup> Ainsi une hypothèse est qu'après injection de NPOFs, les cellules de Kupffer exploitent leur capacité de dégradation en fonction de la dose administrée. En augmentant la dose, les cinétiques de dégradation augmentent jusqu'à arriver à un seuil de saturation d'entités exogènes, seuil au-dessus duquel les produits de dégradation sont excrétés de l'organe. L'évolution de la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  reflète le processus de leur élimination du foie. Au même titre que pour le  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$ , la variation de la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  indique un processus d'élimination similaire pour les deux doses. On constate cependant, en

accord avec les cinétiques de dégradation, que la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  est supérieure dans le cas de la dose élevée, comparativement à la dose faible. La différence des quantités de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  s'élève à environ 16  $\mu\text{g/g}$  et 32  $\mu\text{g/g}$  entre une semaine et un mois pour la dose faible et élevée, respectivement. Ainsi dans le cas de la dose élevée, l'élimination des produits issus de la dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  du foie est plus importante, comparativement à la dose faible. L'ensemble de ces résultats montrent que les processus de dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  et d'élimination des produits de dégradation dépendent de la dose injectée. En outre, en comparaison avec l'étude citée précédemment, la saturation en fer exogène n'est pas atteinte dans le cas des deux doses testées.

#### 2.2.4.2 Effet de la dose dans la rate

La Figure 2.29 représente les quantités de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  et  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  dans la rate, exprimées en pourcentages de masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée et en  $\mu\text{g/g}$ .

On constate dans un premier temps que l'accumulation de  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans la rate est maximale à un jour et ce pour les deux doses. Entre un jour et une semaine, la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  reste constante pour la dose faible, passant de 27  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 15 \mu\text{g/g}$ ) à 27,5  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 5 \mu\text{g/g}$ ). En revanche pour la dose élevée, on constate que celle-ci diminue de 142  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 30 \mu\text{g/g}$ ) à 87  $\mu\text{g/g}$  ( $\pm 21 \mu\text{g/g}$ ), sans augmentation significative de la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$ . D'après les résultats obtenus par analyse des clichés de MET, on a montré que pour ces temps, les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  se dégradent dans la rate. Entre une semaine et un mois, la perte de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  s'élève pour les deux doses à hauteur de 20  $\mu\text{g/g}$  et le gain de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  à seulement environ 5  $\mu\text{g/g}$ . Aussi, entre une semaine et un mois, les produits issus de la dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  sont éliminés de la rate, pour les deux doses. A l'inverse, entre un mois et trois mois, la perte de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  s'élève à environ 5  $\mu\text{g/g}$  et 26  $\mu\text{g/g}$  pour les deux doses, ce qui est significativement inférieur au gain de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  égal à 26  $\mu\text{g/g}$  et 92  $\mu\text{g/g}$  environ pour les doses faible et élevée, respectivement. Un scénario possible, précédemment évoqué, est que l'augmentation de la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  provienne d'une part de la dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans la rate et de l'accumulation en parallèle de produits issus de la dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans d'autres organes tel que le foie. La quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  accumulée à trois mois est significativement supérieure dans le cas de la dose élevée, comparativement à la dose faible.

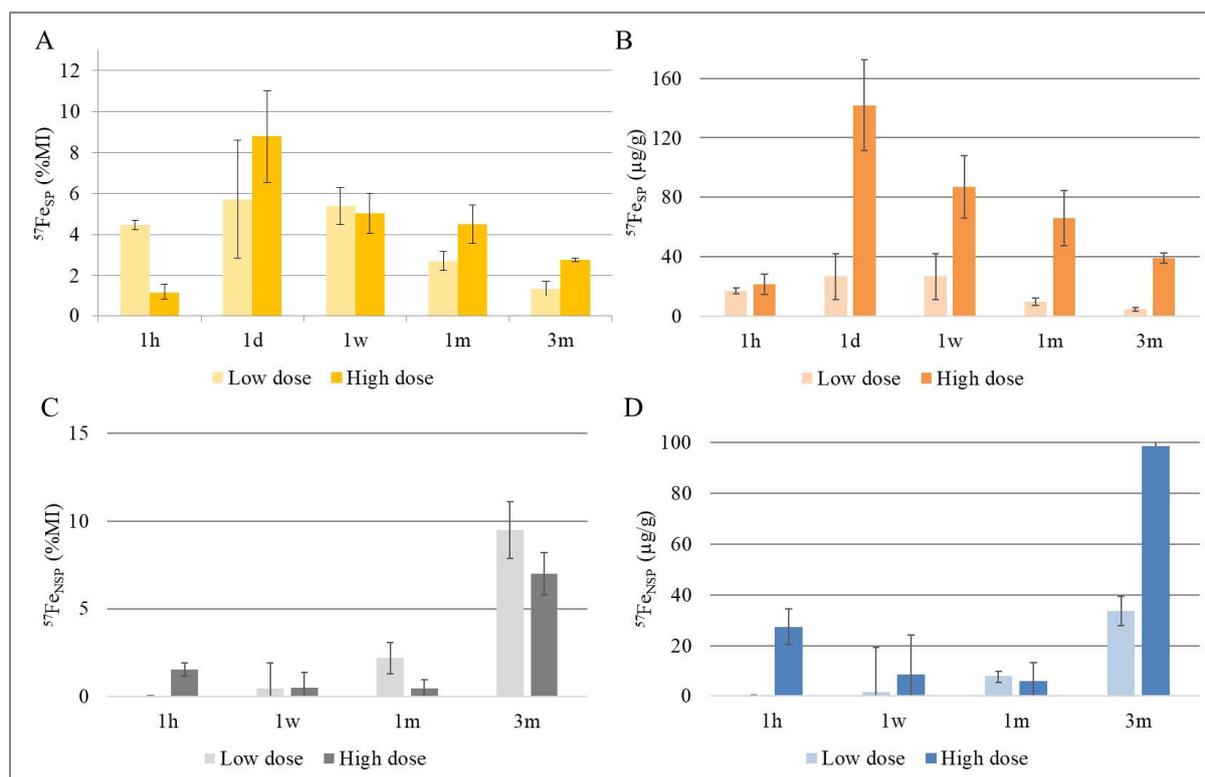


Figure 2.29 : Quantités de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  dans la rate, exprimées en pourcentage de la masse de  $^{57}\text{Fe}$  injectée (A) et en  $\mu\text{g/g}$  (B) et quantités de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  dans la rate exprimées en pourcentages de masse injectée (C) et en  $\mu\text{g/g}$  (D), au cours du temps.

### 2.2.4.3 Effet de la dose dans le sang

Enfin, la Figure 2.30 représente la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  dans le sang en fonction du temps, exprimée en pourcentage de masse injectée et en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . On constate une tendance similaire pour les deux doses, à savoir une première diminution de la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  au bout d'un jour, caractéristique de l'accumulation complète des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  au sein des différents organes. Puis celle-ci augmente au bout d'une semaine après injection, témoignant de la recirculation du fer exogène dans le sang. Enfin entre trois mois et six mois, on observe la diminution de la quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  correspondant à l'élimination du fer exogène de l'organisme ou le stockage vers des organes ou tissus non analysés durant cette expérience. On observe que la concentration en  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  dans le sang dépend fortement de la dose. En effet au bout d'une heure après injection, seulement  $0,002 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $\pm 0,0006 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) sont présents dans le sang pour la dose faible contre  $0,3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $\pm 0,01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) pour la dose élevée. L'accumulation dans les organes semble donc plus lente pour les doses élevées. La quantité de fer exogène circulant dans le sang à partir d'une semaine et jusqu'à trois mois est également supérieure dans le cas de la dose élevée, comparativement à la dose faible. En effet, entre une semaine et trois mois, la concentration de fer exogène dans le sang passe de  $0,003 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $\pm 0,0008 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) à  $0,007 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $\pm 0,002 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) pour la dose faible, contre  $0,009 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $\pm 0,001 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) à  $0,026 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $\pm 0,008 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) pour la dose élevée.

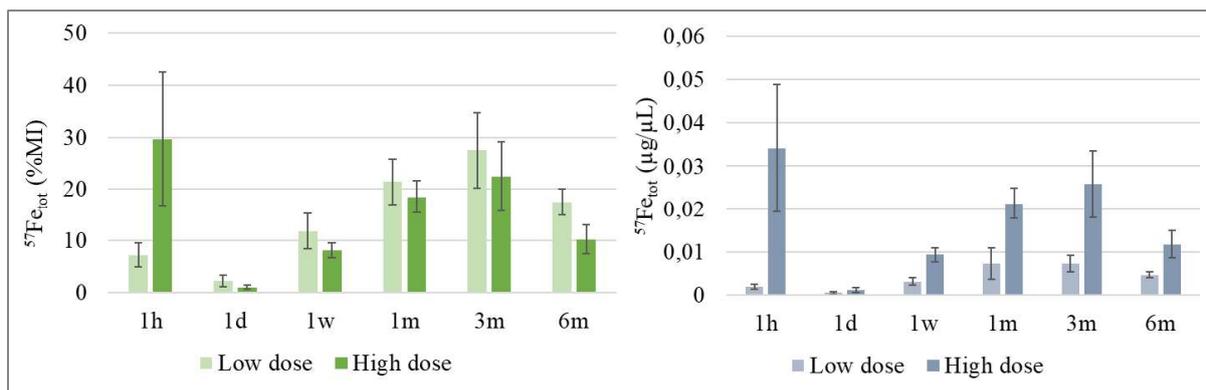


Figure 2.30 : Quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  dans le sang exprimée en pourcentage de la masse injectée (gauche) et en  $\mu\text{g/g}$  (droite).

Que ce soit pour le foie, la rate ou le sang, on constate que l'évolution des fractions de fer exogène est similaire pour les deux doses, avec néanmoins des cinétiques différentes. Ces résultats montrent que les processus de dégradation, d'élimination et de stockage dépendent fortement de la dose, et que leurs cinétiques sont accélérées dans le cas de la dose élevée. Une première hypothèse est que l'organisme s'adapte en fonction de la dose. Plus la dose augmente, et plus l'organisme fournit de l'énergie pour métaboliser les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  jusqu'à arriver au maximum de ses capacités, ce qui a été observé précédemment au laboratoire après injection d'une dose égale à 2630  $\mu\text{g}$  en fer.

## 2.3 Discussion

La Figure 2.31 synthétise l'ensemble des résultats présentés ci-dessus. Après injection intraveineuse, les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  circulent dans le sang pour être notamment distribuées au foie, à la rate, aux reins et aux poumons (Figure 2.31 (A)). La majorité d'entre elles sont capturées par le foie, pour les deux doses injectées. Dans celui-ci, la dégradation débute au bout d'une heure pour la dose faible et après un jour pour la dose élevée. On y constate une augmentation de la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  à une heure et à un jour après injection pour la dose faible et élevée, respectivement. Dans le cas de la dose faible, cette augmentation est attribuée à la dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ , celles-ci étant d'ores et déjà confinées dans les compartiments endo/lysosomiaux. Pour la dose élevée, la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  étant constante pour ces temps, une hypothèse est que la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  provient de la dégradation précoce des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans le sang. Or le sang n'a pas pu être analysé en RFM à cause de la haute teneur en eau des échantillons. Une possibilité serait de lyophiliser ces échantillons afin de concentrer au maximum les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  pour obtenir un signal en RFM. Néanmoins, cette stratégie nécessite de prélever un volume important de sang après sacrifice de la souris, ce qui n'a pas toujours été possible. Les produits issus de la dégradation sont ensuite excrétés du foie au bout d'une semaine pour les deux doses. Ceux-ci sont relargués dans le sang et acheminés en partie vers la rate entre un et trois mois (Figure 2.31 (B)). La quantité de  $^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$  n'est pas retrouvée en totalité dans les organes analysés. Ainsi les produits de dégradation sont probablement réintégrés au métabolisme et pourraient être retrouvés dans d'autres

organes ou tissus non analysés tels que les tissus adipeux, l'estomac, l'intestin ou les ganglions ou encore être excrétés de l'organisme par voies naturelles (Figure 2.31 (C)).

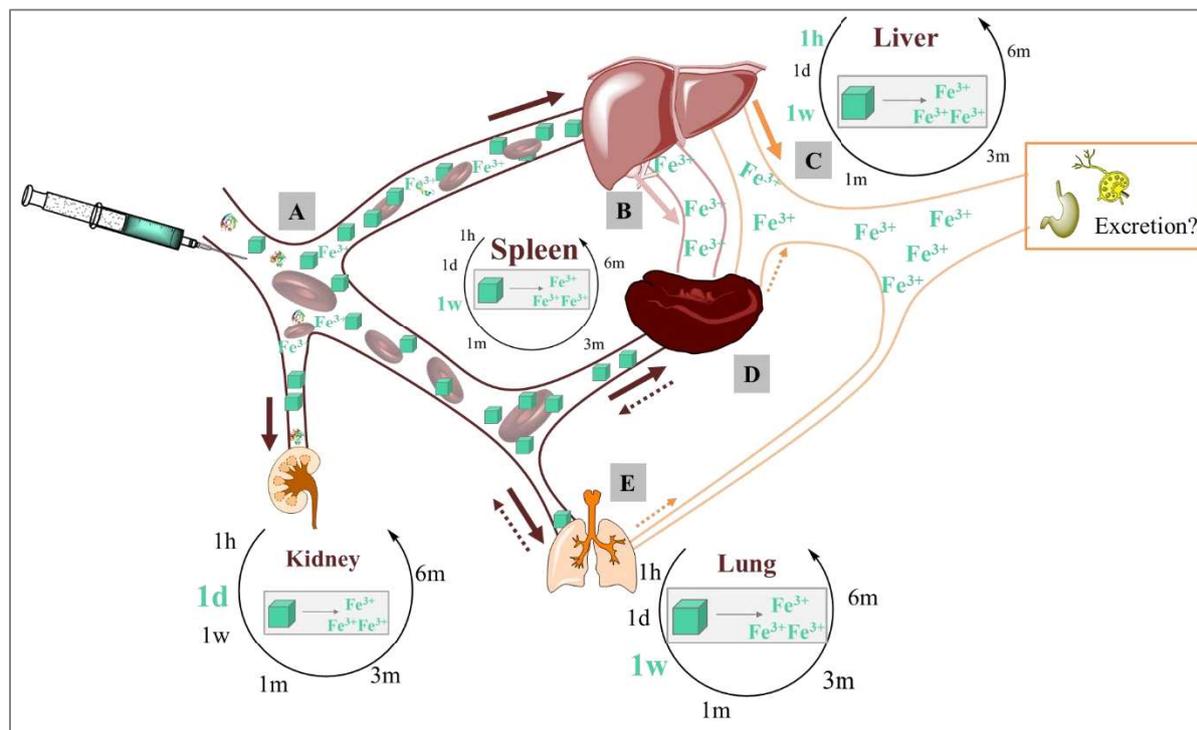


Figure 2.31 : Dynamique de circulation des LT<sup>57</sup>NPOFs injectées par voie intraveineuse. Après circulation dans le sang (A), celles-ci sont localisées dans les organes foie, rate, reins et poumons. Les produits issus de la dégradation des LT<sup>57</sup>NPOFs (notés Fe<sup>3+</sup>) sont ensuite stockés dans la rate (B) dans d'autres organes ou éliminés (C, D et E).

Dans la rate, on constate qu'au bout d'une semaine pour la dose faible et pour la dose élevée, les LT<sup>57</sup>NPOFs sont dégradées. Les produits issus de la dégradation sont redistribués dans la circulation sanguine où ils sont excrétés de l'organisme ou acheminés vers d'autres organes (Figure 2.31 flèche en pointillé rouge et orange, respectivement). Néanmoins, cette quantité représente environ 5 µg de fer entre un jour et un mois pour la dose élevée, et devient négligeable à l'échelle d'un organe tel que le foie. Au bout d'un mois pour la dose faible, on observe une diminution plus importante de la fraction de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> comparativement à celle de <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub>, caractéristique de la dégradation des LT<sup>57</sup>NPOFs. Au bout de trois mois pour les deux doses, l'augmentation de la fraction de <sup>57</sup>Fe<sub>NSP</sub> est telle qu'il n'est plus possible de distinguer le processus de dégradation de celui d'accumulation des produits de dégradation issus du foie.

Les LT<sup>57</sup>NPOFs ne sont que faiblement acheminées vers les poumons, où elles sont dégradées. Les produits issus de la dégradation sont en partie éliminés des poumons à partir de trois mois vers d'autres organes ou excrétés de l'organisme (Figure 2.31 (E)). La quantité éliminée est inférieure à 1 µg de fer, et devient négligeable dans le sang ou dans des organes tels que le foie ou la rate.

Enfin une minorité des LT<sup>57</sup>NPOFs est localisée dans les reins où elles sont dégradées au bout d'une semaine et un jour pour la dose faible et élevée, respectivement. Au bout de six mois on constate que la fraction de <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub> y demeure constante. Aussi les reins constituent un véritable circuit fermé où les LT<sup>57</sup>NPOFs sont dégradées puis les produits issus de la dégradation y sont stockés.

Ces expériences ont permis d'évaluer le cycle de vie du cœur inorganique des LT<sup>57</sup>NPOFs ainsi que les dynamiques de circulation de leurs produits de dégradation. En accord avec l'étude précédemment citée et réalisée par Levy *et al.*<sup>3</sup>, la dégradation des LT<sup>57</sup>NPOFs dépend non seulement de la dose administrée mais également de leur localisation dans l'organisme. Grâce à la stratégie de marquage du cœur inorganique avec un isotope du fer, le <sup>57</sup>Fe, il a été possible de suivre non seulement le devenir des entités superparamagnétiques mais également leurs produits de dégradation. En outre leurs dynamiques de circulation spatiales et temporelles ont pu être suivies sur un période de six mois.

Durant cette expérience, un grand nombre de souris ont été analysées. Le coût des analyses par HR-ICP-MS étant limitant nous avons dû faire un choix d'organes à prélever et à analyser. Ainsi, une perspective de ce travail serait de redéfinir les organes d'intérêt et de mener une campagne d'expérience sur un nombre réduit de souris afin d'en analyser le maximum. Afin d'évaluer les dynamiques d'excrétion des produits issus de la dégradation des LT<sup>57</sup>NPOFs, et à défaut d'avoir un grand nombre de cages métaboliques à disposition, il serait intéressant de prélever le colon. En effet, en récupérant le colon, nous pourrions évaluer la quantité de fer exogène éliminée par les selles sans avoir recours à des cages métaboliques. L'hypothèse selon laquelle les produits de dégradation pourraient être éliminés par les selles est cohérente avec la quantité de fer endogène mesurée dans ceux-ci pour les souris contrôles, et s'élevant à 200 µg/g (± 127 µg/g) et 315 µg/g (± 67 µg/g) pour des souris âgées de six semaines et six mois, respectivement.

Nous avons également constaté d'importantes différences de dégradation des LT<sup>57</sup>NPOFs dans le foie et dans la rate, en accord avec le chapitre précédent. Nous avons fait le choix d'étudier ces phénomènes de dégradation à l'échelle de l'organisme, aussi une perspective de ces travaux serait de mener des études systématiques de dégradation et de cytotoxicité des LT<sup>57</sup>NPOFs dans des cellules hépatiques et spléniques. A titre d'exemple ces études *in vitro* pourraient être menées dans des cellules de Kupffer pour le foie et dans des cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes et macrophages pour la rate. En outre, il serait intéressant d'évaluer le stress oxydant induit par les LT<sup>57</sup>NPOFs afin, entre autre, de comprendre leur diffusion hors des compartiments endo/lysosomaux observée dans la rate et dans le foie un mois après injection de la dose élevée (Figure 2.19).

En comparant cette étude avec celle présentée dans le chapitre précédent, nous constatons une différence importante entre les fractions de fer exogène recouvrées dans le foie. La dose injectée de <sup>57</sup>NPOFs dans l'expérience aux temps courts (chapitre précédent), s'élevant à 50 µg de fer est comparable à la dose faible de LT<sup>57</sup>NPOFs injectée et égale à 44 µg de fer. Toutefois, dans le chapitre

précédent, la fraction de fer exogène dans le foie s'élève à 49,3 % ( $\pm 2,7$  %) pour les  $^{57}\text{NPOFs}$  à une heure après injection, alors que pour les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ , elle s'élève à 108 % ( $\pm 13$  %) (Figure 2.32 (A)).

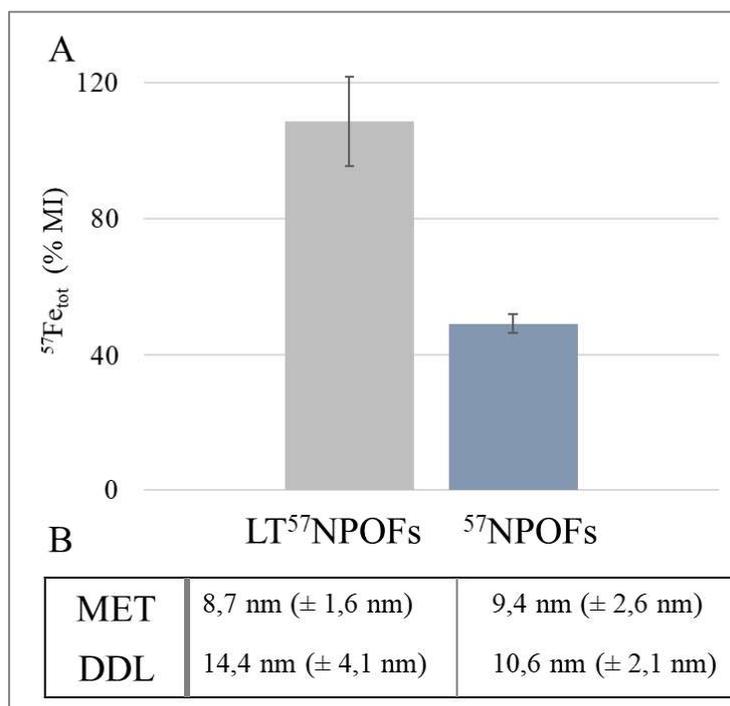


Figure 2.32 : Fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$  mesurée en HR-ICP-MS dans le foie à une heure après injection des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  (chapitre 3) et  $^{57}\text{NPOFs}$  (chapitre 2) pour des doses administrées égales à 44  $\mu\text{g}$  et 50  $\mu\text{g}$  en fer (A). Taille des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  et  $^{57}\text{NPOFs}$  mesurées en MET et DDL (B).

Bien que les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  soient issues d'une synthèse différente de celle des  $^{57}\text{NPOFs}$ , il est surprenant de constater une telle différence. Aussi une première hypothèse est que la chimie de surface est significativement modifiée en présence des lanthanides, comparativement aux  $^{57}\text{NPOFs}$ . Nous rappelons dans la Figure 2.33 la structure de l'enrobage des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  et des  $^{57}\text{NPOFs}$ . Une première hypothèse est que la présence des complexes de lanthanides  $\text{Lt-p-SCN-Bn-DOTA}$  crée un environnement hydrophobe (induit par le complexe DOTA) sur lesquelles des protéines peuvent massivement s'adsorber, ce qui favorise la reconnaissance des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  par le système réticulo-endothélial et leur accumulation dans le foie.

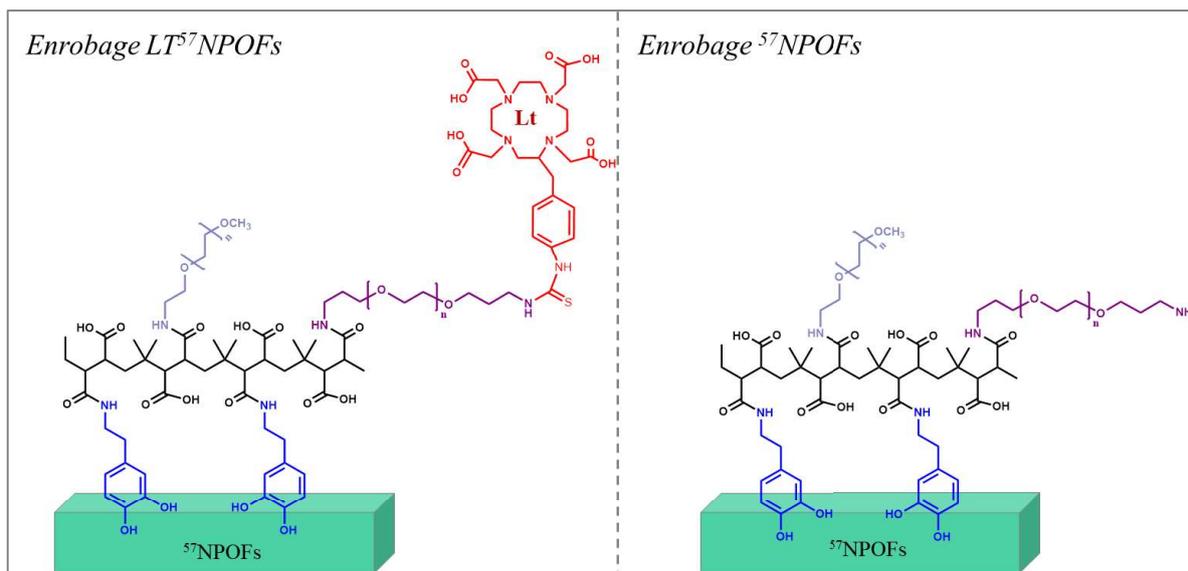


Figure 2.33 : Enrobage des LT<sup>57</sup>NPOFs (gauche) et des <sup>57</sup>NPOFs (droite).

Une autre hypothèse pourrait être que les chaînes du PEG bifonctionnel non fonctionnalisées avec des lanthanides se replient vers la particule (Figure 2.34), exposant à la solution une surface PEG quasi pure, sans amines primaires. Le PEG ayant tendance à augmenter la furtivité des nanoparticules, celles-ci sont reconnues moins rapidement par le système réticulo-endothélial. Aussi elles s'accumuleraient moins dans le foie. Cette hypothèse est corroborée par le fait que le rendement de greffage des lanthanides sur le polymère Dopa-PIMA-PEG est étonnamment faible pour la réaction de couplage considérée, qui est généralement efficace. Aussi, le repliement des chaînes bifonctionnelles vers la surface de la particule rendraient les amines moins disponibles pour le couplage avec les complexes.

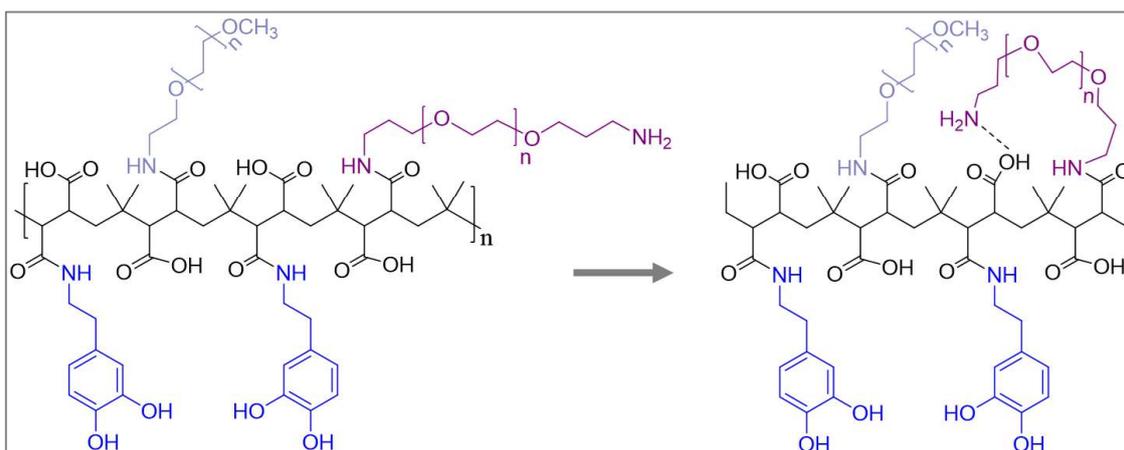


Figure 2.34 : Repliement de la chaîne PEG bifonctionnelle par réaction entre l'amine non fonctionnalisée et l'acide carboxylique issu de l'ouverture des anhydrides.

Aussi une étude de la stabilité et de la couronne de protéines formée autour des <sup>57</sup>NPOFs et LT<sup>57</sup>NPOFs en présence de plasma semble indispensable pour mieux tenter d'expliquer les différences

de biodistribution observées. Cette étude n'a pas été faite dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes consacrés à l'étude du devenir *in vivo* de l'enrobage.

Grâce au marquage isotopique avec du  $^{57}\text{Fe}$ , nous avons, pour la première fois, suivi le devenir du cœur inorganique de NPOFs et des produits issus de leur dégradation, sur une période de six mois. Afin d'évaluer l'intégrité des NPOFs et de leur enrobage, nous avons également marqué ce dernier avec des lanthanides. La section suivante est consacrée à l'étude du devenir de l'enrobage des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  et à la comparaison de celui-ci avec le devenir du cœur inorganique.

### 3. Devenir de l'enrobage

Nous rappelons que les  $LT^{57}NPOFs$  sont enrobées d'un polymère Dopa-PIMA-PEG fonctionnalisé avec des complexes de lanthanides, et en particulier des complexes de gadolinium et de thulium. Dans cette expérience, les souris ont reçu soit une dose faible soit élevée de  $LT^{57}NPOFs$ . Les masses de fer, gadolinium et thulium injectée pour ces deux doses sont données dans le Tableau 11

	m ( $\mu g$ )	
	Low dose	High dose
Fe	44	182
Gd	1,14	5,34
Tm	1,33	6,37

Tableau 11 : Masse de fer, gadolinium et thulium injectée pour les doses faible (low dose) et élevée (high dose).

Dans la section précédente, nous avons montré que le cœur inorganique des  $LT^{57}NPOFs$  se dégrade, principalement dans le foie. Les produits issus de la dégradation sont alors excrétés de cet organe vers la circulation sanguine, pour être stockés dans différents organes, et en particulier dans la rate, ou éliminés de l'organisme. La dégradation du cœur inorganique implique l'accessibilité des atomes de fer présents dans le cœur inorganique et ainsi une séparation de l'enrobage du cœur inorganique ou la dégradation de l'enrobage. Dans cette section, nous avons analysé les dynamiques temporelles et spatiales de circulation de l'enrobage des  $LT^{57}NPOFs$  dans l'organisme.

En premier lieu, il convient de s'assurer de la pertinence du marquage du polymère avec les complexes de lanthanides et vérifier que ceux-ci permettent effectivement de tracer le polymère Dopa-PIMA-PEG.

#### 3.1 Efficacité du marquage du polymère avec les complexes de lanthanides

##### 3.1.1 Robustesse de la liaison complexe – polymère

Les complexes de lanthanides ont été greffés sur le polymère Dopa-PIMA-PEG par réaction entre l'amine primaire du PEG bifonctionnel présent sur le polymère et le groupement isothiocyanate des complexes de lanthanides. Afin d'évaluer l'efficacité de la liaison entre le polymère et les complexes de lanthanides *in vivo*, les complexes de lanthanides ont été injecté à un groupe de souris additionnel. Ainsi nous avons dans un premier temps comparé les cinétiques de circulation des lanthanides détectés après injection des  $LT^{57}NPOFs$  et à ceux détectés après injection des complexes de lanthanides. Le gadolinium et le thulium détectés après injection de  $LT^{57}NPOFs$  sont notés  $Gd_{LT^{57}NPOFs}$  et  $Tm_{LT^{57}NPOFs}$ , respectivement. Ceux détectés après injection des complexes de gadolinium et thulium seront respectivement notés  $Gd_{CPX}$  et  $Tm_{CPX}$ . La Figure 3.1 présente les fractions de gadolinium et de thulium

mesurées en HR-ICP-MS sur l'ensemble de la souris au cours du temps, par somme des fractions détectées dans le foie, la rate, les reins, le sang et les poumons, après injection des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  (dose faible (LD) et dose élevée (HD)) et des complexes de lanthanides. Celles-ci sont exprimées en pourcentage de la masse de Gd et Tm injectée, respectivement.

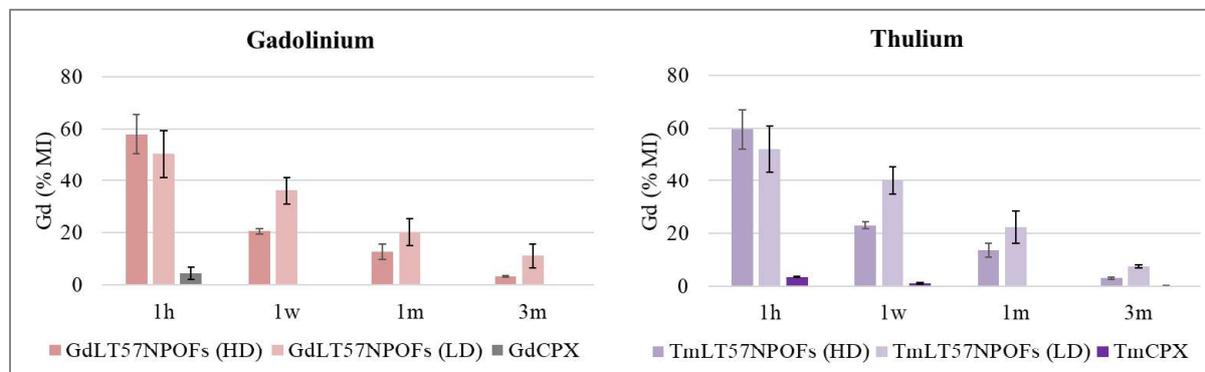


Figure 3.1 : Fraction de gadolinium et de thulium mesurée en HR-ICP-MS au cours du temps après injection des deux doses de  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  et des complexes de lanthanides sur l'ensemble de la souris (somme des fractions détectées dans le foie, la rate, les reins, les poumons et le sang).

On constate que les complexes de lanthanides sont excrétés très rapidement de l'organisme ou s'accumulent dans des organes non analysés. A l'inverse, les lanthanides détectés après injection des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  s'accumulent dans l'organisme et persistent jusqu'à trois mois après injection pour les deux doses. En effet, une heure après injection la fraction de gadolinium  $\text{Gd}_{\text{LT}^{57}\text{NPOFs}}$  recouvrée sur l'ensemble de la souris est égale à 50,4 % ( $\pm 8.9\%$ ) et 57,9 % ( $\pm 7.4\%$ ) pour la dose faible et élevée, respectivement et la fraction de  $\text{Gd}_{\text{CPX}}$  est égale à 4,6 % ( $\pm 2,3\%$ ) de la masse de gadolinium injectée. Les dynamiques de circulation des lanthanides détectés après injection des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  et des complexes de lanthanides sont ainsi significativement différentes. Une fraction de lanthanides égale à environ 50 % pour la dose faible et 40 % pour la dose élevée n'est pas détectée après injection des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ , ce qui suggère une dissociation partielle des complexes de lanthanides du polymère. Aussi les complexes de lanthanides dissociés suivent une cinétique semblable à celle observée après injection de complexes de lanthanides, et sont éliminés de l'organisme rapidement. Néanmoins, ces résultats montrent qu'après injection des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ , au moins 50 % des complexes de lanthanides ne se désolidarisent pas du polymère pour les deux doses une heure après injection.

### 3.1.2 Intégrité du marquage du polymère

Nous avons montré dans la section précédente que les complexes de lanthanides détectés sont greffés efficacement sur le polymère. Cependant, une décoordination des lanthanides de leur complexe est un scénario à envisager. C'est pour cette raison que nous avons réalisé un double marquage du polymère avec deux complexes de lanthanides, un complexe de gadolinium et un complexe de thulium. En effet, comme abordé dans le chapitre 2, en suivant le rapport des signaux issus des deux lanthanides,

soit le rapport Gd/Tm, il est possible d'évaluer l'intégrité du marquage sur le polymère. Si ce rapport évolue au cours du temps, alors une décoordination d'un des lanthanides a lieu. Au contraire, si ce rapport reste constant, signe que les lanthanides restent solidaires, le marquage du polymère est intègre.

Nous avons évalué le rapport des masses de Gd/Tm mesurées en HR-ICP-MS dans l'ensemble des organes analysés au cours du temps et dans le sang après injection des  $LT^{57}NPOFs$ .

Dans le sang, nous n'avons pu analyser le rapport Gd/Tm que pour la première heure après injection de la dose faible et jusqu'à un jour pour la dose élevée (Figure 3.2). Pour la faible dose, nous n'avons pas pu analyser les échantillons à un jour après injection en raison d'un problème expérimental. Passé le délai d'un jour, les lanthanides ne sont plus détectés dans le sang pour les deux doses, signe de leur accumulation dans les différents organes avec les  $LT^{57}NPOFs$  ou de leur élimination de l'organisme. Le rapport des masses Gd/Tm dans la solution de  $LT^{57}NPOFs$  d'injection est représenté par la ligne en pointillés. On constate que le rapport des masses Gd/Tm mesuré dans le sang est similaire à celui injectée. Entre une heure et un jour après injection de la dose élevée, les rapports Gd/Tm ne sont pas significativement différents.

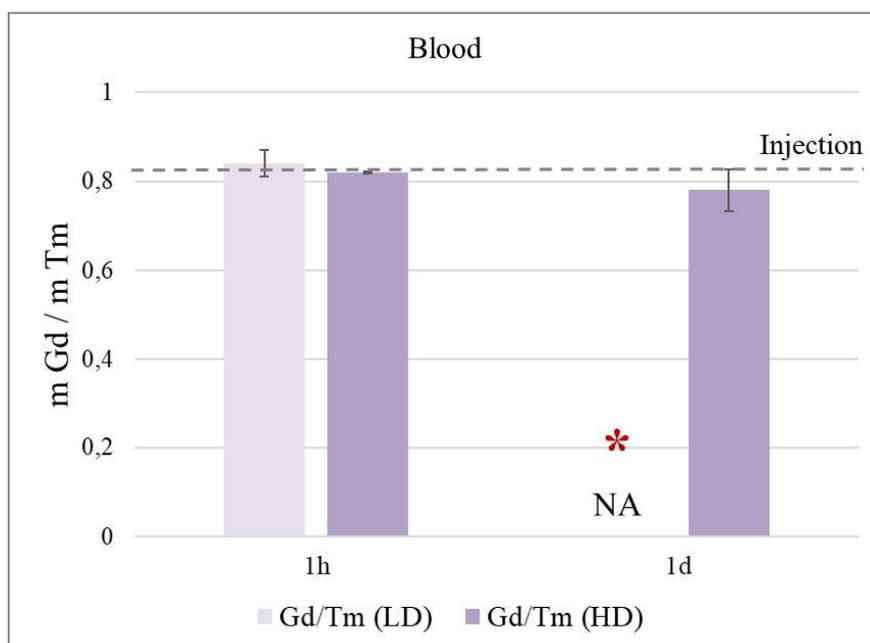


Figure 3.2 : Rapport des masses Gd/Tm détectés dans le sang à une heure et à un jour après injection de la dose faible et élevée de  $LT^{57}NPOFs$  en comparaison au rapport des masses Gd/Tm de la solution injectée (ligne en pointillé).

La Figure 3.3 montre l'évolution du rapport des masses Gd/Tm au cours du temps dans le foie, la rate, les poumons et les reins. On constate que pour tous les organes analysés, ce rapport est similaire au rapport des masses Gd/Tm de la solution d'injection. Pour le foie on constate que le rapport Gd/Tm est constant durant le premier mois après injection. Néanmoins, à partir de trois mois, il augmente pour les deux doses témoignant de la désolidarisation des lanthanides. Pour la rate, les poumons et les reins,

le rapport Gd/Tm est constant pendant six mois après injection du polymère pour les deux doses. On notera cependant que le rapport diminue dans les reins six mois après injection de la dose élevée, signe également de la désolidarisation des lanthanides.

Dans le sang et les différents organes analysés, le rapport Gd/Tm mesuré après injection n'est pas significativement différent de celui de la solution d'injection. Ce résultat montre que le marquage du polymère n'est pas altéré *in vivo* après injection. Pour la majorité des organes, ce rapport demeure constant au cours du temps et pour les deux doses, signe que les lanthanides restent solidaires sur le polymère. Ainsi le double marquage du polymère par les lanthanides est pertinent pour le suivi de l'enrobage des nanoparticules *in vivo* au cours du temps.

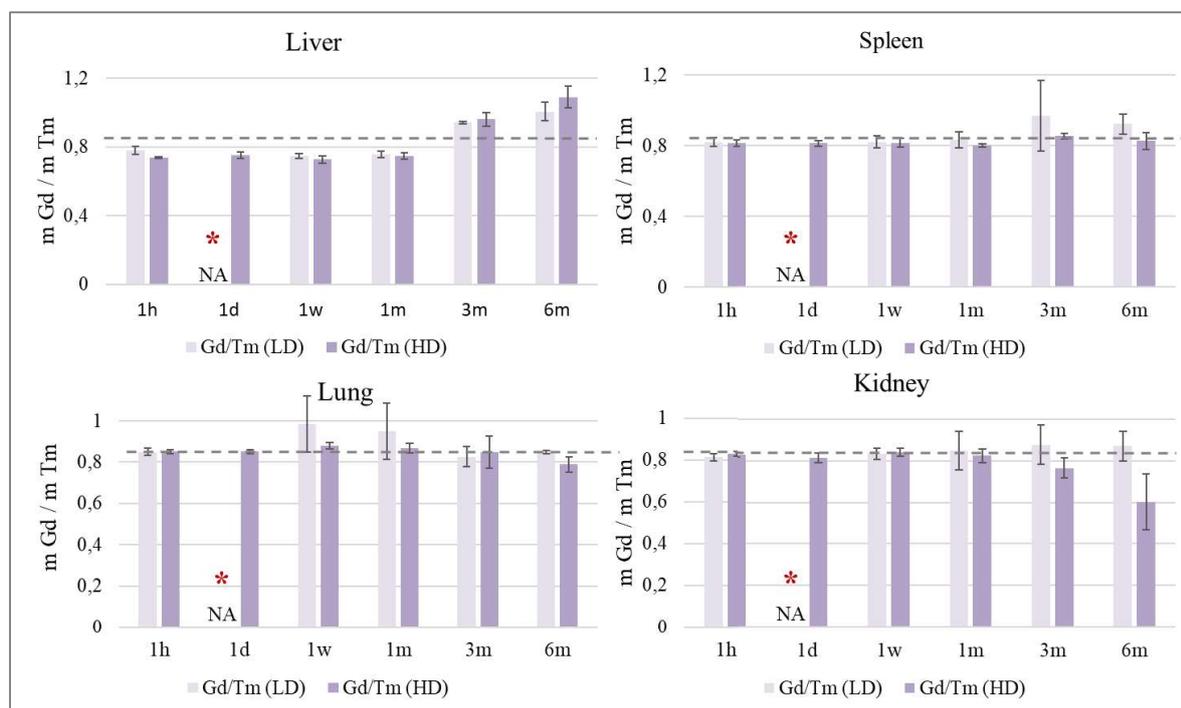


Figure 3.3 : Rapport des masses Gd/Tm détectés en HR-ICP-MS au cours du temps après injection de la dose faible et élevée dans le foie, la rate, les reins et les poumons. Le rapport Gd/Tm de la solution d'injection est représenté en pointillés.

### 3.2 Intégrité des LT<sup>57</sup>NPOFs

Nous avons montré dans la section précédente que l'enrobage des LT<sup>57</sup>NPOFs pouvait être suivi par le double marquage du polymère avec les lanthanides. En comparant simultanément l'évolution de la quantité de fer superparamagnétique, témoin de la présence des nanoparticules, à celle de la quantité de lanthanides, il est possible d'évaluer l'intégrité des LT<sup>57</sup>NPOFs comprenant le cœur magnétique et son enrobage. En effet, si les LT<sup>57</sup>NPOFs sont intègres alors la biodistribution et les dynamiques de circulation du fer superparamagnétique et de l'enrobage seront identiques. A l'inverse, si une dissociation de l'enrobage a lieu, alors on s'attend à observer des différences dans les dynamiques de circulation de l'enrobage, noté Pol<sub>Coating</sub>, comparativement à celles du fer superparamagnétique, noté

$^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$ . A cet égard, la biodistribution ainsi que les dynamiques de circulation du polymère seul (doublement marqué avec les lanthanides mais non enrobé sur des nanoparticules), noté  $\text{Pol}_{\text{CTL}}$  ont également été analysées grâce à un groupe de souris additionnel. Cette section présente le suivi simultané des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  et du polymère doublement marqué. Les doses injectées sont données dans la Figure 3.4.

	m ( $\mu\text{g}$ )		
	Fe	Gd	Tm
Low dose	44	1,14	1,33
High dose	182	5,34	6,37

$\text{Pol}_{\text{CTL}}$	m ( $\mu\text{g}$ )		
	Fe	Gd	Tm
		0,5	0,68

Figure 3.4 : Doses injectées des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  (low dose et high dose) et du polymère  $\text{Pol}_{\text{CTL}}$ .

### 3.2.1 Vue d'ensemble de l'intégrité des $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$

La Figure 3.5 présente les fractions de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$ , de  $\text{Pol}_{\text{Coating}}$  et  $\text{Pol}_{\text{CTL}}$  exprimées en pourcentage de masse injectée sur l'ensemble de la souris. A noter qu'une seule dose de polymère marqué  $\text{Pol}_{\text{CTL}}$ , correspondant à la faible dose, a été injecté aux souris du groupe additionnel.

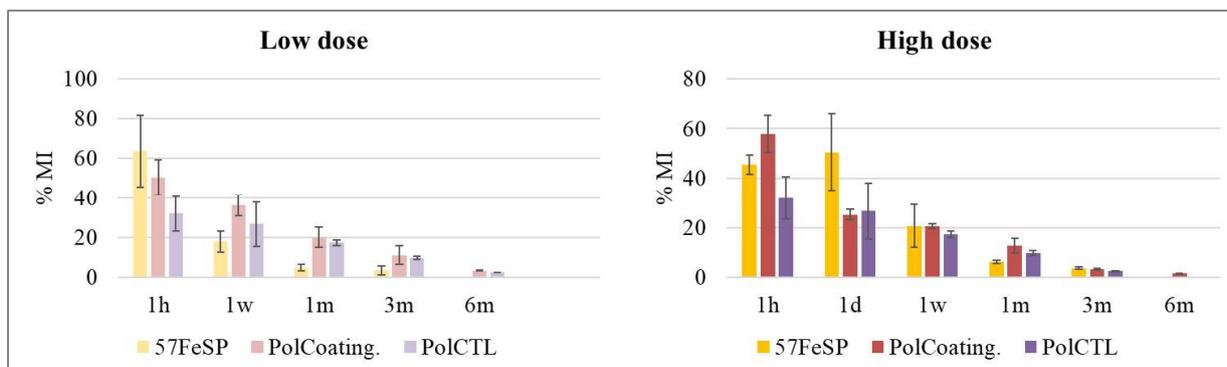


Figure 3.5 : Fractions de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  (jaune) mesurée en RFM et fractions de  $\text{Pol}_{\text{Coating}}$  (rouge) et  $\text{Pol}_{\text{CTL}}$  (violet) mesurées en HR-ICP-MS sur l'ensemble de la souris au cours du temps, pour la dose faible (gauche) et élevée (droite).

Pour les deux doses, on constate que la fraction de  $\text{Pol}_{\text{Coating}}$  est similaire à la fraction de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  une heure après injection. Cette observation montre qu'il n'y a pas d'élimination différentielle entre le cœur inorganique et l'enrobage une heure après injection. Pour la dose faible, on observe une différence entre la fraction de  $\text{Pol}_{\text{Coating}}$  et celle de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  au bout d'une semaine après injection, signe de la dégradation ou l'élimination rapide du cœur magnétique comparativement à l'enrobage. En effet, une

semaine après injection, la fraction de Pol<sub>Coating</sub> s'élève à 36,0 % (± 5,3 %) et celle de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> à 17,9 % (± 5,2 %). A l'inverse, pour la dose élevée, il n'y a pas de différence significative entre ces fractions égales respectivement à 20,5 % (± 1,0 %) et à 20,6 % (± 8,6 %) au bout d'une semaine. Néanmoins, on constate que l'écart entre ces quantités se creuse à partir d'un mois après injection, la fraction de Pol<sub>Coating</sub> s'élevant à 12,8 % (± 3,0 %) et celle de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> à 6,3 % (± 0,7 %). Pour les deux doses, on constate une élimination différentielle entre le polymère et le fer superparamagnétique, caractérisée par une diminution rapide de la fraction de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> comparativement à celle de Pol<sub>Coating</sub> à partir d'une semaine pour la dose faible et d'un mois pour la dose élevée.

On constate également que les cinétiques d'accumulation et d'élimination des fractions Pol<sub>Coating</sub> et Pol<sub>CTL</sub> semblent similaires à partir d'une semaine pour la dose faible et d'un jour pour la dose élevée.

A ce stade, il est impossible de statuer quant à l'intégrité des LT<sup>57</sup>NPOFs, une analyse approfondie de l'évolution des fractions de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub>, Pol<sub>Coating</sub> et Pol<sub>CTL</sub> dans chaque organe est nécessaire.

### 3.2.2 Analyse à l'échelle tissulaire

#### 3.2.2.1 Intégrité dans le sang

L'évolution des fractions de Pol<sub>Coating</sub> ont été comparées à la fraction de <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub> mesurée en HR-ICP-MS dans le sang (Figure 3.6). Comme précisé précédemment, la RFM n'a pas pu être réalisée sur les échantillons de sang.

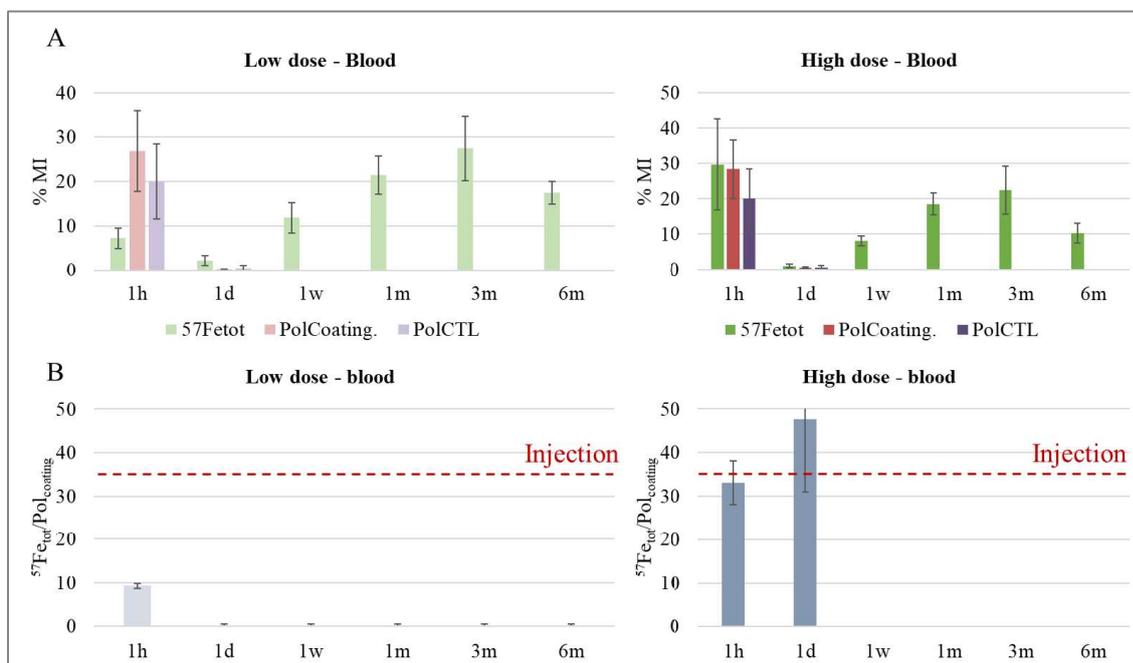


Figure 3.6 : Fraction de Pol<sub>Coating</sub> (rouge) et de Pol<sub>CTL</sub> (violet) et de <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub> (vert) mesurées en HR-ICP-MS, dans le sang, exprimées en pourcentage de la masse injectée au cours du temps, pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) (A). Rapport des masses de <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub>/Pol<sub>Coating</sub> de l'injection (rouge pointillés) et au cours du temps (B).

Pour la dose faible, la fraction de Pol<sub>Coating</sub>, égale à 27 % (± 9 %), est significativement supérieure à celle de <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub> égale à 7,2 % (± 2,3 %) à une heure après injection. On constate également que le rapport <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub>/Pol<sub>Coating</sub>, égal à 9.3 (± 0.5) est significativement inférieur à celui de la solution de LT<sup>57</sup>NPOFs d'injection, égal à 36 (± 3). Ces résultats montrent que pour la dose faible, la quantité de Pol<sub>Coating</sub> est supérieure à celle de fer exogène, comparativement à la solution d'injection. Bien que ces résultats ne nous permettent pas de résoudre directement la spéciation du polymère, une séparation précoce de l'enrobage des LT<sup>57</sup>NPOFs a lieu dans le sang dès la première heure après injection. Ce scénario suppose que les brins de polymère dissociés des LT<sup>57</sup>NPOFs circulent dans le sang pendant au moins une heure après injection. Or, en comparant les fractions de Pol<sub>Coating</sub> et celle de Pol<sub>CTL</sub>, égales respectivement à 27 % (± 9 %) et 20 % (± 8 %) à une heure après injection, on constate que celles-ci sont comparables. Aussi, le polymère marqué circule encore dans le sang à une heure après injection. Ces résultats convergent avec les précédents et suggèrent un mécanisme de dissociation de l'enrobage des LT<sup>57</sup>NPOFs dans le sang durant la première heure après injection.

A l'inverse, pour la dose élevée, on constate que les fractions de Pol<sub>Coating</sub> et de <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub>, égales à 29 % (± 8 %) et à 29,6 % (± 12,8 %), respectivement, sont comparables. Ces observations sont en accord avec la valeur du rapport <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub>/Pol<sub>Coating</sub> égale à 33 (± 5) et proche de la valeur du rapport de l'injection. Ces résultats suggèrent que l'enrobage des LT<sup>57</sup>NPOFs ne s'est pas dissocié pendant la première heure après injection. Or, la fraction de Pol<sub>CTL</sub> recouverte dans le sang à une heure après injection est égale à 20 % (± 8 %) et montre que le polymère marqué circule encore dans le sang à une heure après injection. Ainsi deux scénarii peuvent être envisagés. Le premier est que les LT<sup>57</sup>NPOFs restent intègres dans le sang, le second est que l'enrobage se dissocie des LT<sup>57</sup>NPOFs et le fer exogène ainsi que l'enrobage dissocié coexistent dans le sang à une heure après injection. Nous n'excluons pas que ces deux scénarii peuvent également avoir lieu simultanément.

Pour les deux doses, on observe l'absence de Pol<sub>Coating</sub> et de Pol<sub>CTL</sub> dans le sang à partir d'un jour après injection, signe que ceux-ci se sont accumulés intégralement vers les organes ou éliminés de l'organisme et ce jusqu'à six mois après injection.

### 3.2.2.2 *Intégrité dans le foie*

La Figure 3.7 présente les fractions de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> mesurées en RFM et de Pol<sub>Coating</sub> et Pol<sub>CTL</sub> mesurées en HR-ICP-MS dans le foie, ainsi que le rapport des masses <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub>/Pol<sub>Coating</sub> et l'évolution de la masse de Pol<sub>Coating</sub> au cours du temps pour les deux doses injectées.

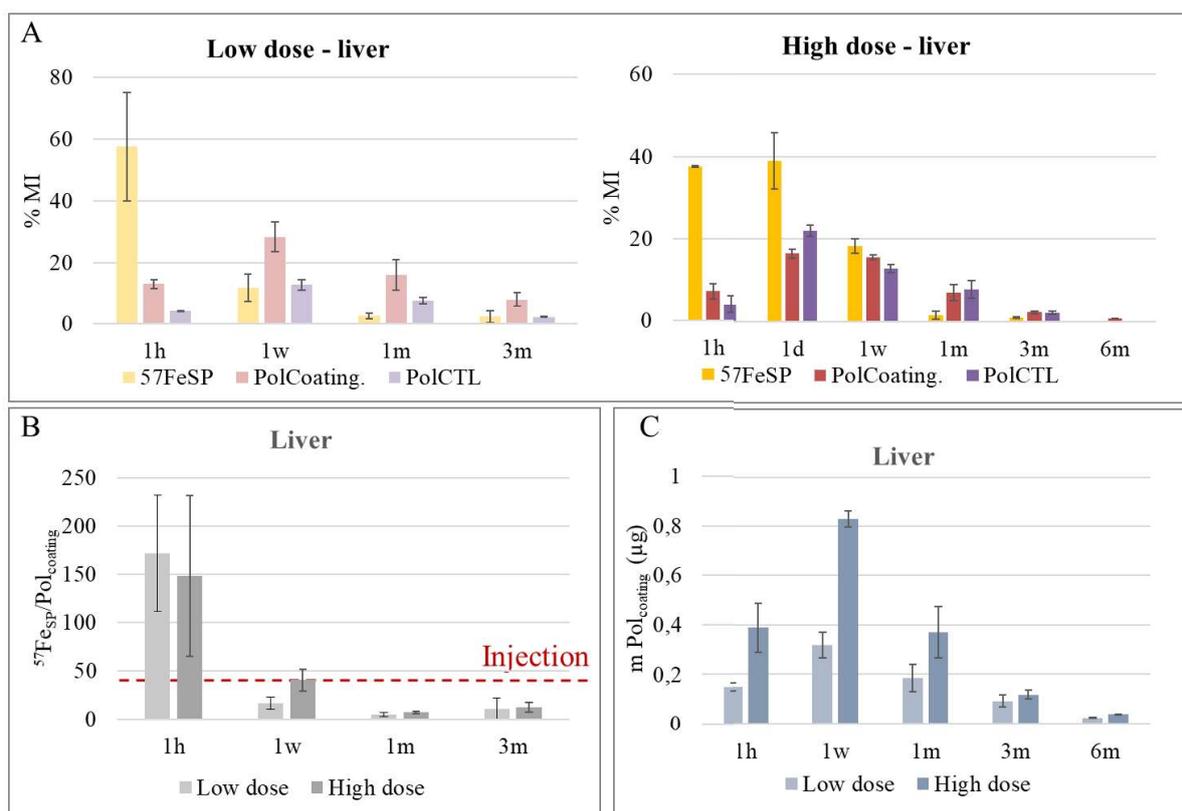


Figure 3.7 : Fraction de de  $^{57}\text{FeSP}$  (jaune) mesurée en RFM et fractions de Pol<sub>Coating</sub> (rouge) et de Pol<sub>CTL</sub> (violet) et mesurées en HR-ICP-MS, dans le foie, exprimées en pourcentage de la masse injectée au cours du temps, pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) (A). Rapport des masses de  $^{57}\text{FeSP}/\text{Pol}_{\text{Coating}}$  de la solution d'injection (rouge pointillé) et dans le foie au cours du temps (B). Masse de Pol<sub>Coating</sub> détectée en HR-ICP-MS au cours du temps pour les deux doses (C).

### Intégrité de l'enrobage

Pour les deux doses, la fraction de Pol<sub>Coating</sub> acheminée dans le foie est inférieure à celle de  $^{57}\text{FeSP}$  à une heure après injection. A titre d'exemple, pour la dose élevée, la fraction de Pol<sub>Coating</sub> représente 13 % ( $\pm 1$  %) et celle de  $^{57}\text{FeSP}$  est égale à 57 % ( $\pm 17$  %) de la masse injectée à une heure après injection. En outre, on constate que le rapport  $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}/\text{Pol}_{\text{Coating}}$  égal à 171 ( $\pm 60$ ) et 148 ( $\pm 83$ ) est supérieur au rapport de l'injection égal à 36 ( $\pm 3$ ). Ces résultats montrent que les LT $^{57}\text{NPOFs}$  ne sont pas intègres et ainsi qu'une partie des LT $^{57}\text{NPOFs}$  accumulées dans le foie ont perdu leur enrobage présent initialement à leur surface. Les LT $^{57}\text{NPOFs}$  ayant perdu les lanthanides initialement présents à leur surface seront qualifiées de nues, par opposition aux LT $^{57}\text{NPOFs}$  enrobées. Afin d'évaluer si la fraction de Pol<sub>Coating</sub> détectée dans le foie est encore solidaire des LT $^{57}\text{NPOFs}$ , nous avons évalué l'évolution de la fraction Pol<sub>CTL</sub> au cours du temps. Pour la dose faible, on constate que les fractions Pol<sub>Coating</sub> et Pol<sub>CTL</sub> sont respectivement égales à 13,1 % ( $\pm 1.3$  %) et 4.0 % ( $\pm 0.1$  %) de la masse injectée. Cette différence montre qu'une plus grande fraction de Pol<sub>Coating</sub> est accumulée dans le foie comparativement au Pol<sub>CTL</sub>, suggérant que l'enrobage est toujours supporté sur les LT $^{57}\text{NPOFs}$ . Néanmoins une fraction de Pol<sub>CTL</sub> est accumulée dans le foie, ainsi pour une fraction de l'enrobage (égale environ à 13 % - 4 % = 9 %), il

n'est pas possible de statuer si celui-ci est supporté par les LT<sup>57</sup>NPOFs ou non. Ces résultats, en accord avec les résultats obtenus dans le sang, montrent que la majorité des LT<sup>57</sup>NPOFs accumulée dans le foie à une heure après injection ont perdu leur enrobage initial pour les deux doses, suggérant une dissociation précoce de celui-ci dans le sang. Néanmoins, une fraction de LT<sup>57</sup>NPOFs enrobées est également recouverte dans le foie à une heure après injection.

La fraction de Pol<sub>Coating</sub> augmente au bout d'une semaine après injection de la dose faible à un jour après injection de la dose élevée. Pendant ce même temps, on constate, d'une part, que la fraction de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> diminue une semaine après injection de la dose faible et reste constante à un jour après injection de la dose élevée, et d'autre part que la fraction de Pol<sub>CTL</sub> augmente également pour ces temps. Ces observations montrent une accumulation tardive du polymère. Ces résultats sont cohérents avec le mécanisme de dissociation dans le sang évoqué plus haut et donc d'enrobage circulant dans le sang à une heure après injection. Ainsi une partie de l'enrobage dissocié dans le sang est ensuite accumulé dans le foie entre un jour et une semaine après injection.

Enfin entre une semaine et trois mois, les fractions de Pol<sub>Coating</sub> et de Pol<sub>CTL</sub> diminuent, signe de l'excrétion progressive des polymères du foie. Néanmoins, d'après la [Figure 3.3](#) le rapport des masses de lanthanides  $m_{Gd}/m_{Tm}$  augmente dans le foie, signe d'une désolidarisation partielle des lanthanides. Ainsi il n'est pas possible de statuer quant à la nature des entités excrétées du foie entre trois et six mois après injection des deux doses.

#### *Effet de la dose*

L'évolution de la masse de polymère mesurée en HR-ICP-MS est donnée dans la [Figure 3.7 \(C\)](#) au cours du temps pour les deux doses. On constate d'une part que la quantité de Pol<sub>Coating</sub> localisée dans le foie après injection de la dose élevée est supérieure à celle après injection de la dose faible. En effet une heure après injection, celle-ci est égale à 0,15 µg (± 0,02 µg) et à 0,39 µg (± 0,10 µg) pour les doses faible et élevée, respectivement. On observe toutefois une tendance similaire pour les deux doses, à savoir une augmentation de la quantité de Pol<sub>Coating</sub> au bout d'une semaine après injection. D'après les résultats présentés dans la section précédente, cette augmentation est due à une internalisation tardive d'enrobage circulant dans le sang. Enfin les quantités de Pol<sub>Coating</sub> diminuent en fonction du temps jusqu'à atteindre, au bout de trois mois, une valeur similaire pour les deux doses égale à 0,09 µg (± 0,02 µg) pour la dose faible et 0,12 µg (± 0,02 µg) pour la dose élevée. Aussi la cinétique d'élimination de l'enrobage semble plus rapide suite à l'injection de la dose élevée, signe que les capacités de prise en charge de l'organisme s'adaptent en fonction de la dose injectée. Le rapport <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub>/Pol<sub>Coating</sub> permet d'évaluer la quantité d'enrobage par rapport à la quantité de cœur inorganique, et ainsi de comparer les quantités de LT<sup>57</sup>NPOFs nues et enrobées. Une heure après injection, le rapport <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub>/Pol<sub>Coating</sub> est égal à 171 (± 60) et 148 (± 83) pour les doses faible et élevée respectivement. Aussi, comme mentionné plus haut, la quantité de LT<sup>57</sup>NPOFs dans le foie est supérieure à celle polymère suggérant que la majorité

des  $LT^{57}NPOFs$  localisées dans le foie sont nues et ce pour les deux doses. Au bout d'une semaine, le rapport  $^{57}Fe_{sp}/Pol_{Coating}$  diminue jusqu'à  $16 (\pm 6)$  et  $40 (\pm 11)$  pour les doses faible et élevée. Pour la dose faible, le rapport au bout d'une semaine est inférieur à celui à l'injection, témoignant de la dégradation partielle des  $LT^{57}NPOFs$  enrobées. Pour la dose élevée, la valeur du rapport est comparable à celle de l'injection. Aussi, une hypothèse est que les  $LT^{57}NPOFs$  nues sont majoritairement dégradées, comparativement aux  $LT^{57}NPOFs$  enrobées, ainsi au bout d'une semaine, les  $LT^{57}NPOFs$  persistantes dans le foie, sont enrobées de polymère. Au bout d'un mois, le rapport diminue jusqu'à  $5 (\pm 2)$  et  $7 (\pm 1)$  pour la dose faible et élevée, respectivement, signe de la dégradation presque complète des  $LT^{57}NPOFs$  nues et enrobées.

Dans le foie, la quantité de polymère accumulée est supérieure dans le cas de la dose élevée, comparativement à la dose faible. La cinétique d'élimination de ceux-ci est également accélérée suite à l'injection de la dose élevée. Toutefois, le rapport  $^{57}Fe_{sp}/Pol_{Coating}$  montre que le ratio de  $LT^{57}NPOFs$  nue sur enrobées est similaire pour les deux doses.

En combinant ces résultats avec les résultats de la section précédente, nous pouvons affiner le mécanisme de prise en charge des  $LT^{57}NPOFs$  dans le foie, proposé dans la [Figure 2.15](#). On constate une internalisation des entités exogènes en deux temps. En premier lieu, les  $LT^{57}NPOFs$  enrobées et nues sont localisées dans le foie une heure après injection. Puis le polymère couplé aux lanthanides,  $Pol_{Coating}$  s'accumule au bout d'une semaine pour la dose faible et au bout d'un jour pour la dose élevée. Toutefois, les échantillons prélevés au bout d'un jour pour la dose faible n'ont pas pu être analysés, aussi, nous n'excluons pas l'accumulation du polymère à ce temps. Enfin, on constate pour la dose élevée, qu'une semaine après injection, la quantité de polymère est similaire à celle des  $LT^{57}NPOFs$  ([Figure 3.7 \(A\)](#)). Aussi, une hypothèse est que les  $LT^{57}NPOFs$  non enrobées se dégradent plus rapidement que celles enrobées. Enfin, après dégradation, des entités ferriques, correspondant probablement à des complexes protéiques contenant du fer, comme la ferritine ou la transferrine, sont excrétées du foie. On observe également l'excrétion d'entités constituées de lanthanides, cependant, nous ne pouvons conclure quant à la nature de celles-ci. Les processus de prise en charge des  $LT^{57}NPOFs$  dans le foie sont présentés dans la [Figure 3.8](#).

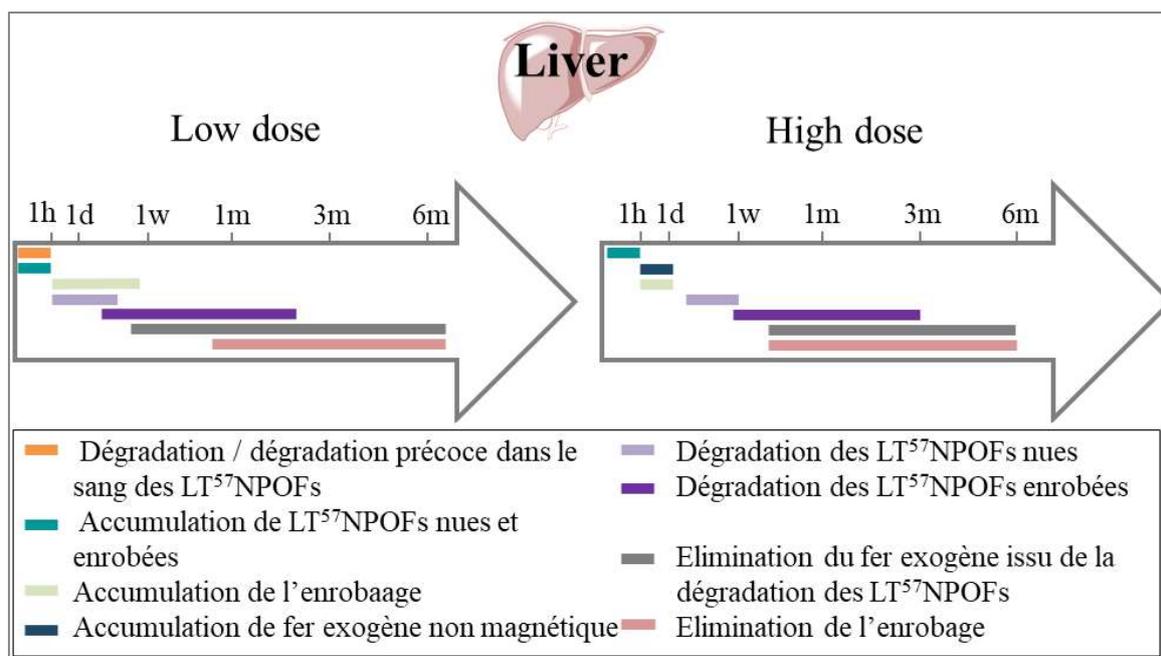


Figure 3.8 : Mécanisme de prise en charge des LT<sup>57</sup>NPOFs après injection intraveineuse. L'internalisation des espèces exogènes est réalisée en deux temps. En premier lieu les LT<sup>57</sup>NPOFs enrobées et nues sont localisées dans le foie au bout d'une heure. L'enrobage, issu de la dissociation précoce dans le sang s'accumule dans le foie entre un jour et une semaine pour la dose faible et entre une heure et un jour pour la dose élevée. Après dégradation, les complexes ferriques, sont éliminés du foie ainsi que des espèces comportant des lanthanides.

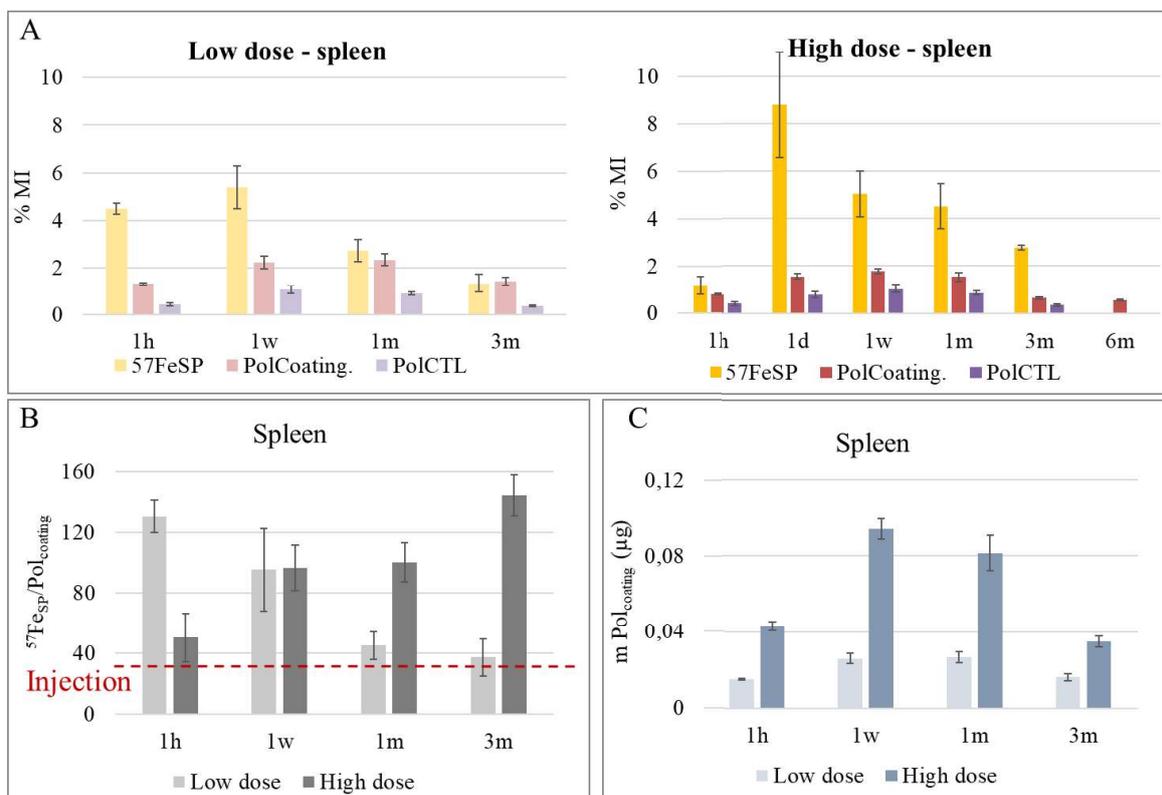
### 3.2.2.3 Intégrité dans la rate

La Figure 3.9 présente les fractions de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> mesurées en RFM et de Pol<sub>Coating</sub> et Pol<sub>CTL</sub> mesurées en HR-ICP-MS dans la rate ainsi que le rapport des masses <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub>/Pol<sub>Coating</sub> et l'évolution de la masse de Pol<sub>Coating</sub> au cours du temps pour les deux doses injectées.

#### Intégrité de l'enrobage

Pour la dose faible, la fraction de Pol<sub>Coating</sub> acheminée dans la rate est inférieure à celle de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> à une heure après injection. En effet, la fraction de Pol<sub>Coating</sub> représente 1,3 % (± 0.1 %) et celle de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> est égale à 4.5 % (± 0,2 %) de la masse injectée à une heure après injection. En outre, on constate que le rapport <sup>57</sup>Fe<sub>tot</sub>/Pol<sub>Coating</sub> égal à 130 (± 11) est supérieur au rapport de l'injection égal à 36 (± 3). Ces résultats montrent que les LT<sup>57</sup>NPOFs ne sont pas intègres et ainsi qu'une partie des LT<sup>57</sup>NPOFs accumulées dans le foie ont perdu leur enrobage présent initialement à leur surface. Afin d'évaluer si la fraction de Pol<sub>Coating</sub> détectée dans la rate est encore solidaire des LT<sup>57</sup>NPOFs, nous avons évalué l'évolution de la fraction Pol<sub>CTL</sub> au cours du temps. On constate que les fractions Pol<sub>Coating</sub> et Pol<sub>CTL</sub> sont respectivement égales à 1,3 % (± 0.1 %) et 0.4 % (± 0.1 %) de la masse injectée. Cette différence montre qu'une plus grande fraction de Pol<sub>Coating</sub> est accumulée dans la rate comparativement au Pol<sub>CTL</sub>, suggérant que l'enrobage est toujours supporté sur les LT<sup>57</sup>NPOFs. Néanmoins une fraction de Pol<sub>CTL</sub> est accumulée dans la rate. Ainsi pour une minorité de Pol<sub>Coating</sub> il n'est pas possible de statuer si celui-ci est

supporté par les LT<sup>57</sup>NPOFs ou non. Ces résultats, en accord avec les résultats obtenus dans le sang, montrent que la majorité des LT<sup>57</sup>NPOFs accumulée dans la rate à une heure après injection ont perdu leur enrobage initial pour les deux doses, confirmant la dissociation précoce de celui-ci dans le sang. Néanmoins, une fraction de LT<sup>57</sup>NPOFs enrobées est également recouverte dans la rate à une heure après injection.



**Figure 3.9 :** Fraction de de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> (jaune) mesurée en RFM et fractions de Pol<sub>Coating</sub> (rouge) et de Pol<sub>CTL</sub> (violet) et mesurées en HR-ICP-MS, dans la rate, exprimées en pourcentage de la masse injectée au cours du temps, pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) (A). Rapport des masses de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub>/Pol<sub>Coating</sub> de la solution d'injection (rouge pointillés) et au cours du temps (B). Masse de Pol<sub>Coating</sub> détectée en HR-ICP-MS au cours du temps pour les deux doses (C).

A l'inverse, pour la dose élevée, la fraction de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> égale à 1,2 % (± 0,4%) est comparable à celle de Pol<sub>Coating</sub> égale à 0,81 % (± 0,04 %) à une heure après injection. Néanmoins une fraction de Pol<sub>CTL</sub> égale à 0,4 % (± 0,1 %) est également recouverte dans la rate. Une partie des LT<sup>57</sup>NPOFs semble intègre dans la rate, cependant, une accumulation simultanée de LT<sup>57</sup>NPOFs nues et de polymère peut également être envisageable. Pour la dose élevée, on constate une augmentation de la fraction de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> et de Pol<sub>Coating</sub> entre une heure et un jour, passant, respectivement, de 1,2 % (± 0,4%) à 8,8 % (± 2,2 %) et de 0,81 % (± 0,04 %) à 1,6 % (± 0,1 %) de la masse injectée. Toutefois, l'augmentation de la fraction de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> est supérieure à celle des lanthanides, signe de l'accumulation majoritaire de LT<sup>57</sup>NPOFs nues. On constate également l'augmentation de la fraction de Pol<sub>CTL</sub> de 0,4 % (± 0,1 %) à 0,8 % (± 0,1 %) entre une heure et un jour après injection. Aussi l'augmentation de la fraction Pol<sub>Coating</sub> peut être due à

l'accumulation d'enrobage supporté sur les LT<sup>57</sup>NPOFs ou d'enrobage circulant. La fraction de Pol<sub>Coating</sub> semble constante entre une semaine et un mois pour la dose faible et entre un jour et un mois pour la dose élevée. A partir de trois mois on constate que le polymère (ou tout du moins les deux lanthanides) est excrété de la rate.

#### *Effet de la dose*

On constate également que la masse de Pol<sub>Coating</sub> localisée dans la rate est supérieure dans le cas de la dose élevée, comparativement à la dose faible (Figure 3.9 (C)). En effet, celle-ci est égale à 0,015 µg (± 0,001 µg) et 0,043 µg (± 0,002 µg) pour la dose faible et élevée, respectivement. Entre une heure et une semaine, elle augmente, passant respectivement de 0,015 µg (± 0,001 µg) à 0,026 µg (± 0,003 µg) et de 0,043 µg (± 0,002 µg) à 0,094 µg (± 0,005 µg). Comme mentionné précédemment, cette augmentation est due à l'accumulation tardive de l'enrobage supporté ou non sur les LT<sup>57</sup>NPOFs. On ne constate pas de variation significative entre une semaine et un mois, puis la masse de Pol<sub>Coating</sub> diminue au bout de trois mois pour les deux doses. On observe que la cinétique d'élimination des lanthanides suite à l'injection de la dose élevée est plus rapide comparativement à la dose faible. En effet, la différence de masse de Pol<sub>Coating</sub> entre un et trois mois est environ égale à 0,01 µg dans le cas de la dose faible et à 0,05 µg pour la dose élevée. Ces observations rejoignent les observations faites pour le foie, selon lesquelles les capacités d'élimination de l'organisme s'adaptent en fonction de la dose injectée. Pour la dose faible, on constate que le rapport <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub>/Pol<sub>Coating</sub> est égal à 130 (± 11) et est supérieur au rapport de l'injection égal à 36 (± 3). Aussi une majorité de LT<sup>57</sup>NPOFs nue sont localisées dans la rate. Au bout d'une semaine, la masse de Pol<sub>Coating</sub> augmente, ce qui explique la diminution du rapport <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub>/Pol<sub>Coating</sub>. Entre une semaine et un mois, ce rapport diminue à masse de Pol<sub>Coating</sub> constante. Ces résultats montrent que les LT<sup>57</sup>NPOFs nues sont dégradées préférentiellement. Enfin entre un mois et trois mois, la masse de Pol<sub>Coating</sub> et le rapport <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub>/Pol<sub>Coating</sub> diminuent simultanément, témoignant de la dégradation des LT<sup>57</sup>NPOFs enrobées et l'élimination consécutive de l'enrobage. Dans la rate on distingue un mécanisme de prise en charge en deux temps. Après internalisation, les LT<sup>57</sup>NPOFs nues sont dégradées en premier entre une heure et un mois. Puis à partir d'un mois, les LT<sup>57</sup>NPOFs enrobées sont dégradées et l'enrobage est éliminé de la rate.

Les résultats concernant le devenir du cœur inorganique dans la rate, présentés précédemment, montrent que les LT<sup>57</sup>NPOFs se dégradent au bout d'une semaine après injection. Aussi, au même titre que dans le foie, une première hypothèse est que les LT<sup>57</sup>NPOFs nues se dégradent plus rapidement que celles enrobées. Un et trois mois après injection, les fractions de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> et de Pol<sub>Coating</sub> sont similaires et diminuent simultanément entre ces temps. Une hypothèse est qu'une fois que les LT<sup>57</sup>NPOFs enrobées sont dégradées, l'enrobage est éliminé de la rate.

Grâce à l'ensemble des résultats obtenus pour le cœur inorganique et l'enrobage, nous proposons dans la Figure 3.10 un mécanisme potentiel de prise en charge des LT<sup>57</sup>NPOFs dans la rate, après

injection intraveineuse. Celles-ci sont internalisées dans la rate intègres et nues au bout d'une heure après injection. Une internalisation tardive de LT<sup>57</sup>NPOFs intègres ou d'enrobage et de LT<sup>57</sup>NPOFs nues est observée au bout d'une semaine pour la dose faible et au bout d'un jour pour la dose élevée. Une fois dans la rate, les LT<sup>57</sup>NPOFs sont stables et ce pendant une semaine pour les deux doses. Pour les deux doses les LT<sup>57</sup>NPOFs nues sont dégradées en premier à partir de la première semaine suivant l'injection, puis les LT<sup>57</sup>NPOFs enrobées sont dégradées entre une semaine et un mois et entre un et trois mois pour les doses faible et élevée, respectivement. Une première élimination des produits issus de la dégradation des LT<sup>57</sup>NPOFs a lieu entre une semaine et un mois pour la dose faible. On observe par la suite une accumulation tardive de fer exogène non magnétique issu de la dégradation d'autres organes, entre un et trois mois pour les deux doses. Enfin, l'enrobage issu de la dégradation des LT<sup>57</sup>NPOFs est éliminé de la rate entre un et trois mois.

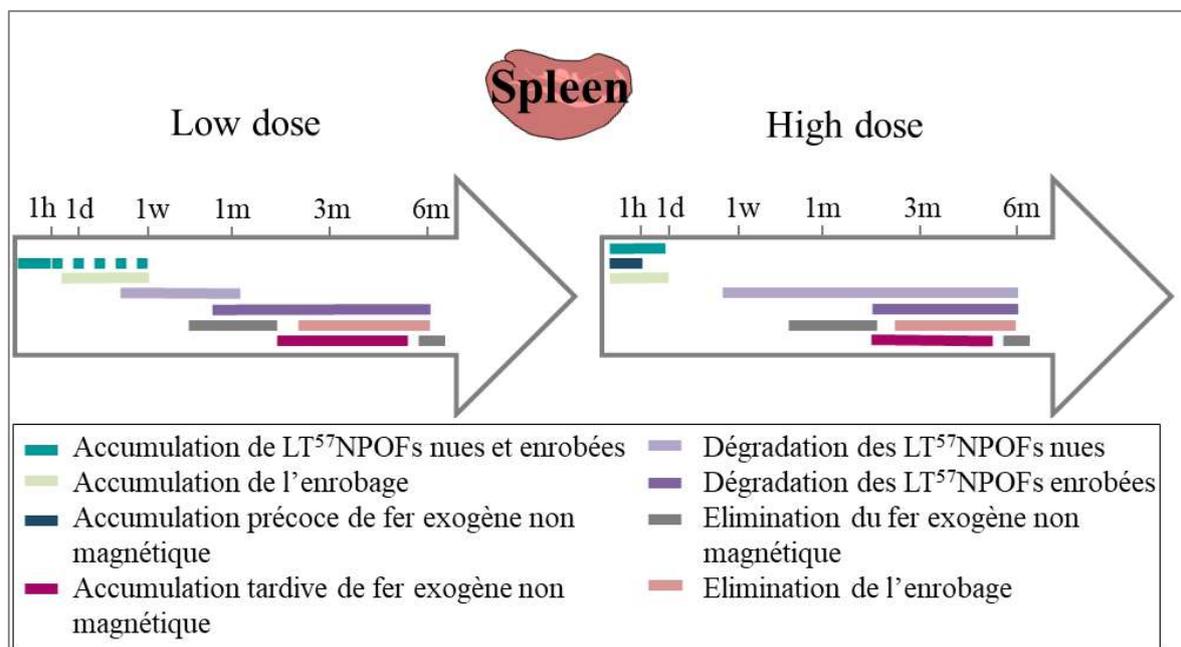


Figure 3.10 : Mécanisme de prise en charge de LT<sup>57</sup>NPOFs dans la rate. Après injection, les LT<sup>57</sup>NPOFs nues et enrobées sont internalisées dans la rate au bout d'une heure. Une internalisation tardive de LT<sup>57</sup>NPOFs enrobées ou de LT<sup>57</sup>NPOFs nues en présence de polymères marqué a lieu pour les temps supérieurs à une heure. Dans la rate, les LT<sup>57</sup>NPOFs nues et enrobées sont ensuite dégradées.

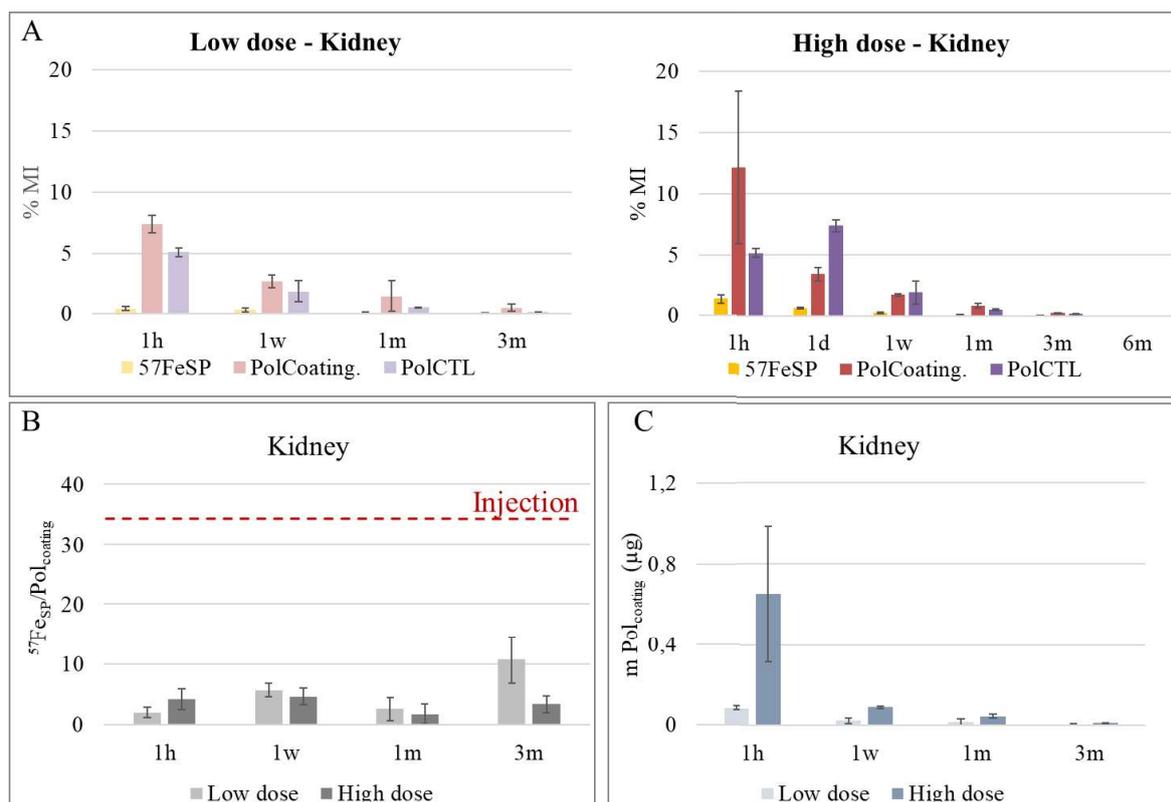
### 3.2.2.4 Intégrité dans les reins

La Figure 3.11 présente les fractions de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> mesurées en RFM et de Pol<sub>Coating</sub> et Pol<sub>CTL</sub> mesurées en HR-ICP-MS dans les reins ainsi que le rapport des masses <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub>/Pol<sub>Coating</sub> et l'évolution de la masse de Pol<sub>Coating</sub> au cours du temps pour les deux doses injectées.

#### Intégrité de l'enrobage

On constate que pour les deux doses, la fraction de Pol<sub>Coating</sub> est significativement supérieure à celle des <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub>. A titre d'exemple, la fraction de <sup>57</sup>Fe<sub>SP</sub> s'élève à 0,4 % (± 0,2 %) et celle de Pol<sub>Coating</sub> à

7,4 % ( $\pm 0,7$  %) de la masse injectée, à une heure après injection. Ces résultats suggèrent que l'enrobage circulant s'accumule préférentiellement dans les reins comparativement aux  $LT^{57}NPOFs$ . L'évolution de la fraction de  $Pol_{CTL}$  égale à 5,11 % ( $\pm 0,4$  %) confirme que le polymère marqué s'accumule également dans les reins. Ces résultats confirment, d'une part, la dissociation de l'enrobage des  $LT^{57}NPOFs$  dans le sang et montre, d'autre part, qu'après dissociation, l'enrobage s'accumule préférentiellement dans les reins. La fraction de  $Pol_{Coating}$  diminue jusqu'à atteindre une valeur de 0,5 % ( $\pm 0,3$  %) et 0,22 % ( $\pm 0,03$  %) trois mois après injection pour la dose faible et élevée, respectivement.



**Figure 3.11** : Fraction de  $^{57}Fe_{SP}$  (jaune) mesurée en RFM et fractions de  $Pol_{Coating}$  (rouge) et de  $Pol_{CTL}$  (violet) et mesurées en HR-ICP-MS, dans les reins, exprimées en pourcentage de la masse injectée au cours du temps, pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) (A). Rapport des masses de  $^{57}Fe_{SP}/Pol_{Coating}$  de la solution d'injection (rouge pointillés) et au cours du temps (B). Masse de  $Pol_{Coating}$  détectée en HR-ICP-MS au cours du temps pour les deux doses (C).

On constate également que les cinétiques d'élimination de la fraction de  $Pol_{Coating}$  comparativement à la fraction de  $Pol_{CTL}$  semblent similaires, confirmant la présence de l'enrobage dans les reins. L'enrobage est ensuite progressivement excrété des reins au cours du temps pour les deux doses.

#### *Effet de la dose*

La fraction de  $Pol_{Coating}$  localisée dans les reins est supérieure pour la dose élevée, comparativement à la dose faible (Figure 3.11). L'enrobage est ensuite éliminé des reins entre une

semaine et trois mois après injection. On constate également que la cinétique d'élimination est plus rapide pour la dose élevée que pour la dose faible. En effet entre une semaine et trois mois, environ 0,02  $\mu\text{g}$  de  $\text{Pol}_{\text{Coating}}$  sont éliminés suite à l'injection de la dose faible contre environ 0,08  $\mu\text{g}$  pour la dose élevée. Les rapports  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}/\text{Pol}_{\text{Coating}}$  des deux doses sont significativement inférieurs à celui de l'injection, témoignant de l'accumulation préférentielle de l'enrobage « flottant » comparativement aux  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ . On constate également que ceux-ci sont comparables pour les deux doses. A titre d'exemple, ils sont égaux à 5,8 ( $\pm 1,2$ ) et 4,7 ( $\pm 1,4$ ) pour les doses faible et élevée, respectivement, à une semaine après injection.

L'ensemble des résultats obtenus a permis de proposer un mécanisme de prise en charge des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans les reins après injection (Figure 3.12). Après injection intraveineuse, une minorité des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  enrobées sont localisées dans les reins, et sont dégradées dans ceux-ci. Les produits de dégradation persistent dans les reins jusqu'à six mois après injection. L'enrobage issu de la perte d'intégrité précoce des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans le sang est majoritairement localisé dans les reins. On constate également l'accumulation de fer non magnétique issus de la dégradation des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  à une heure après injection. Une fois les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dégradées, l'enrobage est ensuite progressivement excrété des reins entre une heure et une semaine pour la dose faible et entre une heure et un jour pour la dose élevée.

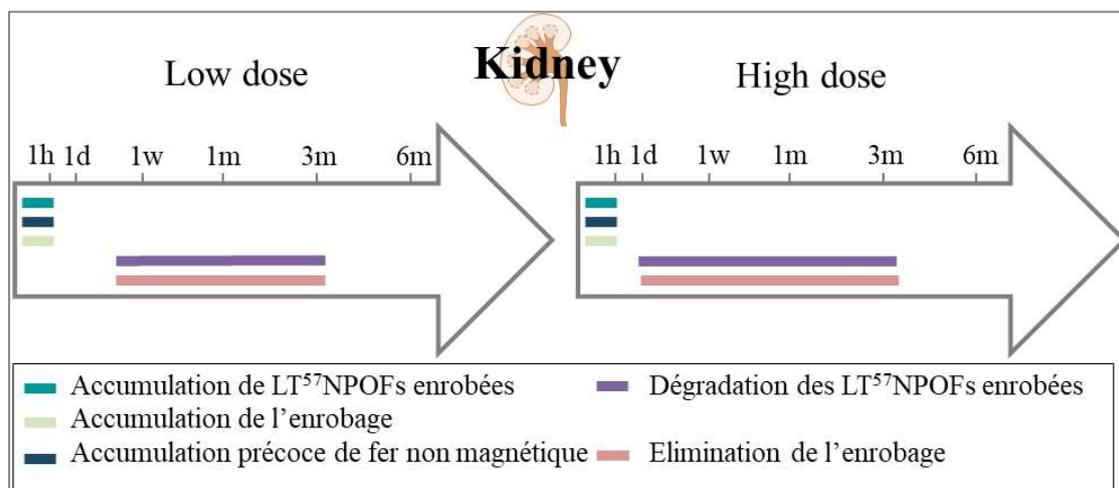


Figure 3.12 : Mécanisme de prise en charge des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  dans les reins. Une minorité des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  est internalisée dans les reins. Celles-ci sont ensuite dégradées et les produits de dégradation persistent dans les reins. L'enrobage est accumulé dans les reins au bout d'une heure après injection et excrété progressivement de ceux-ci à partir d'une semaine après injection.

### 3.2.2.5 Intégrité dans les poumons

La Figure 3.13 présente les fractions de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  mesurées en RFM et de  $\text{Pol}_{\text{Coating}}$  et  $\text{Pol}_{\text{CTL}}$  mesurées en HR-ICP-MS dans les poumons ainsi que le rapport des masses  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}/\text{Pol}_{\text{Coating}}$  et l'évolution de la masse de  $\text{Pol}_{\text{Coating}}$  au cours du temps pour les deux doses injectées.

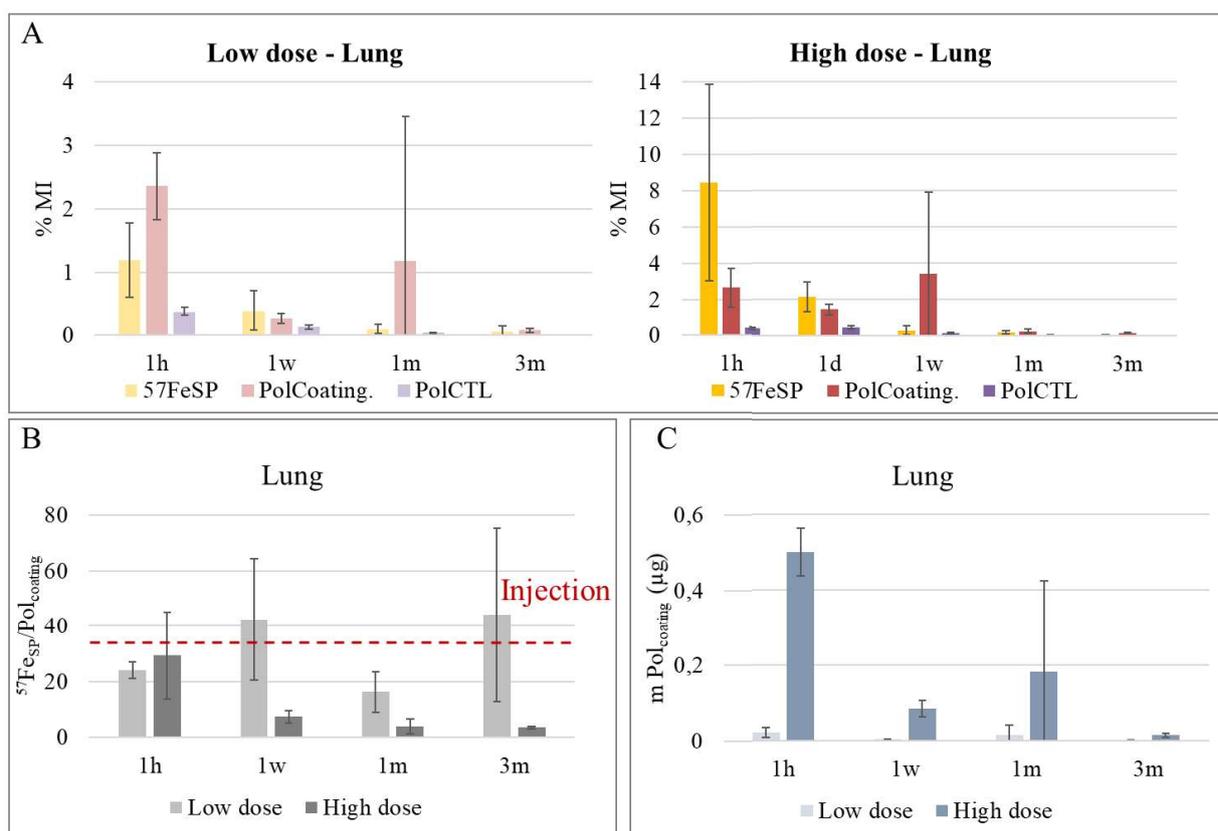


Figure 3.13 : Fraction de de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  (jaune) mesurée en RFM et fractions de Pol<sub>Coating</sub> (rouge) et de Pol<sub>CTL</sub> (violet) et mesurées en HR-ICP-MS, dans les poumons, exprimées en pourcentage de la masse injectée au cours du temps, pour la dose faible (gauche) et élevée (droite) (A). Rapport des masses de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}/\text{Pol}_{\text{Coating}}$  de l'injection (rouge pointillés) et au cours du temps (B). Masse de Pol<sub>Coating</sub> détectée en HR-ICP-MS au cours du temps pour les deux doses (C).

### Intégrité de l'enrobage

Pour la dose faible, les fractions de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  et de Pol<sub>Coating</sub> sont respectivement égales à 1,2 % ( $\pm 0,6$  %) et 2,4 % ( $\pm 0,5$  %) de la masse injectée à une heure après injection. Ainsi seule une minorité des LT<sup>57</sup>NPOFs sont localisées dans les poumons. On constate néanmoins que la fraction de Pol<sub>Coating</sub> est légèrement supérieure à celle des  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$ , signe de l'accumulation de polymère « flottant ». Ces résultats sont confirmés par la fraction de Pol<sub>CTL</sub> égale à 0,4 % ( $\pm 0,1$  %) accumulée dans les poumons une heure après injection. Néanmoins celle-ci étant plus faible que la fraction de Pol<sub>Coating</sub> ce qui suggère que la majorité de l'enrobage accumulé dans les poumons est supporté sur les LT<sup>57</sup>NPOFs. Au bout d'une semaine, l'intégralité des LT<sup>57</sup>NPOFs est dégradée et l'enrobage est éliminé des poumons. Pour la dose élevée, on a signifié précédemment que les échantillons prélevés une heure après injection ont été contaminés par le sang. Au bout d'un jour, on constate que la fraction de Pol<sub>Coating</sub> s'élevant à 1,4 % ( $\pm 0,3$  %) est comparable à celle de  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$  égale à 2,1 % ( $\pm 0,8$  %). Aussi une première hypothèse est que le polymère est supporté sur les LT<sup>57</sup>NPOFs après injection de la dose élevée. Cette hypothèse est confirmée par la fraction de Pol<sub>CTL</sub> égale à 0,5 % ( $\pm 0,1$  %) et significativement inférieure à celle de Pol<sub>Coating</sub>.

### Effet de la dose

Dans les poumons on constate également que la fraction de Pol<sub>Coating</sub> est plus élevée suite à l'injection de la dose élevée comparativement à la dose faible (Figure 3.13 (C)). Les fractions de Pol<sub>Coating</sub> diminuent et deviennent négligeables à partir d'une semaine après injection pour les deux doses. En outre, les barres d'erreurs étant importantes, le rapport  $^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}/\text{Pol}_{\text{Coating}}$  ne sera pas évalué au-delà d'une heure après injection. Pour la dose faible, on constate qu'une heure après injection, ce rapport est légèrement inférieur à celui de l'injection, signifiant qu'un surplus d'enrobage a également été accumulé dans les poumons. Pour la dose élevée, on a mentionné précédemment que les poumons avaient été contaminés par le sang dans lequel des agrégats sont probablement filtrés par les poumons. Dans les poumons, les LT<sup>57</sup>NPOFs sont majoritairement intègres, avec néanmoins un surplus d'enrobage issu de la perte d'intégrité des LT<sup>57</sup>NPOFs précoce dans le sang.

La combinaison des résultats du devenir du cœur et de l'enrobage des LT<sup>57</sup>NPOFs, nous a permis de proposer un mécanisme de la prise en charge de celles-ci dans les poumons (Figure 3.14). Seule une minorité des LT<sup>57</sup>NPOFs est localisée dans les poumons. Celles-ci, y sont accumulées intègres et dégradées. L'enrobage « flottant » est également localisé dans les poumons au bout d'une heure après injection. Les produits de dégradation issus des LT<sup>57</sup>NPOFs ainsi que l'enrobage sont excrétés des poumons entre une heure et une semaine pour la dose faible et entre une heure et un jour pour la dose élevée.

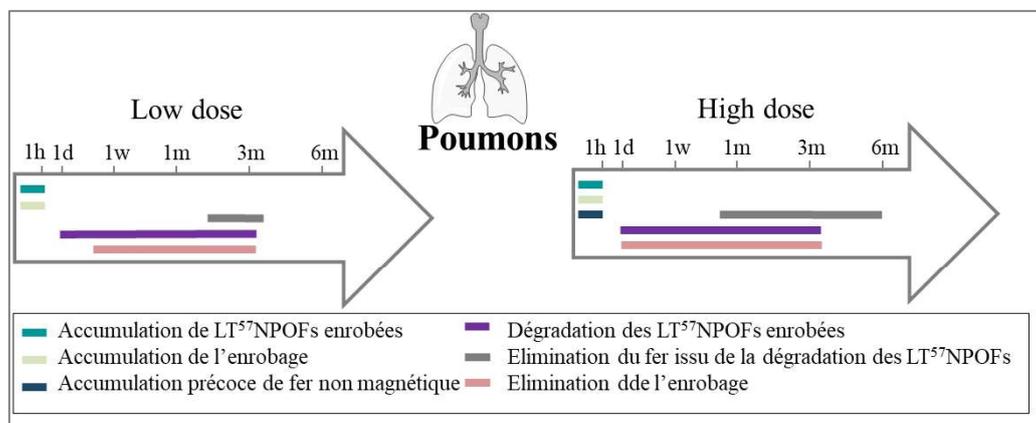


Figure 3.14 : Mécanisme de prise en charge des LT<sup>57</sup>NPOFs dans les poumons. Une minorité d'entre elles sont localisées dans ceux-ci. Les LT<sup>57</sup>NPOFs sont accumulées intègres dans les poumons ainsi que l'enrobage issu de la dissociation précoce dans le sang au bout d'une heure après injection. Les LT<sup>57</sup>NPOFs sont ensuite dégradées dans les poumons. Les produits de la dégradation sont ensuite excrétés des poumons.

### 3.3 Discussion

Le suivi de l'enrobage a permis d'apporter des informations complémentaires quant aux devenir des LT<sup>57</sup>NPOFs dans l'organisme. Une première observation est que l'enrobage des LT<sup>57</sup>NPOFs semble se dissocier partiellement des nanoparticules dès une heure après injection dans le sang. Kreyling *et al.*

ont étudié l'intégrité de nanoparticules d'or et de leur enrobage, marqué avec de l'indium.<sup>6</sup> Ils ont également montré qu'après leur injection intraveineuse chez un modèle murin, le polymère se dissocie partiellement des nanoparticules et est détecté à court terme dans les reins et dans les urines. Une première hypothèse alors proposée est que les nanoparticules sont accumulées intègres dans le foie où elles sont confinées dans les compartiments endo/lysosomaux. Dans ces derniers, l'enrobage est dégradé par différentes enzymes telles que des protéases.<sup>7</sup> Cependant, dans le foie, nos résultats montrent, et en particulier après injection de la dose élevée, qu'un surplus d'enrobage s'accumule à un jour après injection, à quantité de fer exogène constante. Aussi ces résultats ne sont pas cohérents avec l'hypothèse susmentionnée. L'hypothèse que nous proposons, et déjà envisagée dans l'article de revue écrit par Feliu *et al.*<sup>8</sup>, est que cette dissociation a lieu précocement dans le sang. En effet, plusieurs enzymes contenues dans le sang comme les estérases pourraient être à l'origine de cette dissociation. La manipulation des souris provoque un stress qui pourrait induire également l'augmentation de la concentration d'adrénaline dans le sang. Or, l'adrénaline possède un groupement catéchol similaire à celui de la dopamine (Figure 3.15). Ainsi une autre hypothèse est qu'il y a un échange de ligands *in vivo* entre l'enrobage et l'adrénaline endogène *via* les groupements catéchols.

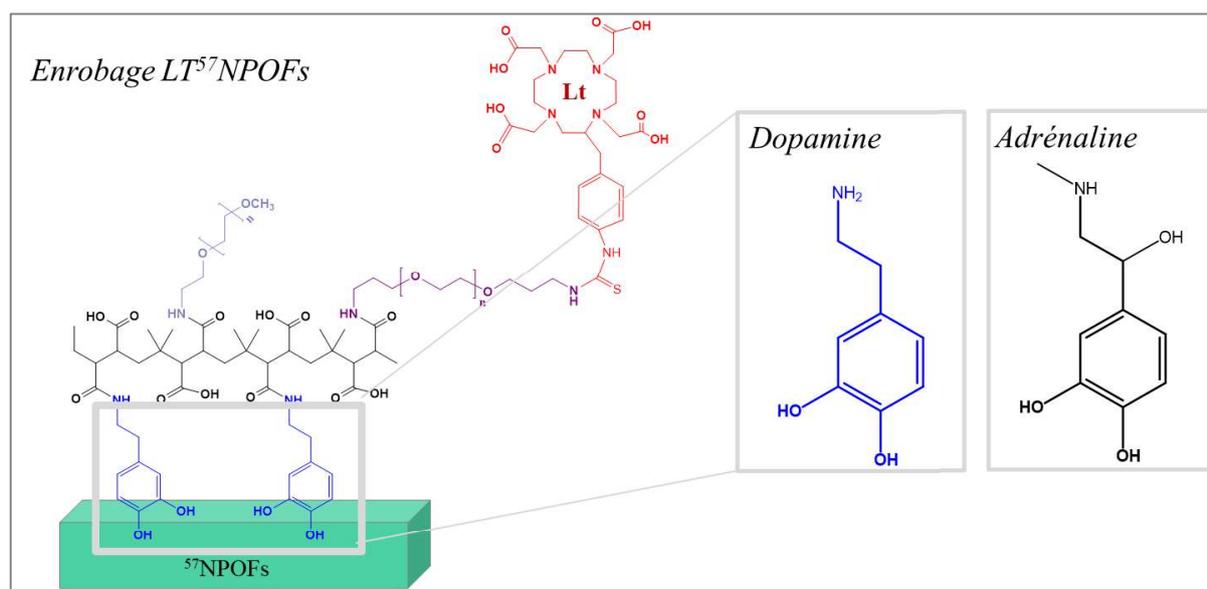


Figure 3.15 : Hypothèse d'un mécanisme de dissociation de l'enrobage dans le sang. Structure de la dopamine et de l'adrénaline.

Grâce au suivi du rapport des signaux des lanthanides Gd/Tm nous avons pu également montrer que les lanthanides restent solidaires du polymère et que l'enrobage complet se dissocie des LT<sup>57</sup>NPOFs. H. Wang *et al.* ont également étudié la nature des potentielles entités issues de la dissociation de NPOFs marquées avec du <sup>59</sup>Fe et enrobées d'un polymère DMPE-DTPA fonctionnalisé avec le radioisotope <sup>111</sup>In. Ils ont montré que les biodistributions des NPOFs est similaire à celles du polymère DMPE-DTPA-<sup>111</sup>In, comparativement aux groupes additionnels <sup>111</sup>In sous forme ionique et DTPA-<sup>111</sup>In. Aussi,

s'il y a une dissociation, celle-ci a lieu à la frontière entre les nanoparticules et l'enrobage et libère des espèces DMPE-DTPA-<sup>111</sup>In.

Après injection intraveineuse des LT<sup>57</sup>NPOFs, trois entités distinctes coexistent, les LT<sup>57</sup>NPOFs intègres, les LT<sup>57</sup>NPOFs nues, et l'enrobage issu de la dissociation. Les LT<sup>57</sup>NPOFs enrobées et nues sont préférentiellement dirigées vers le foie et la rate, tandis que l'enrobage issu de la dissociation est majoritairement excrété par le système rénal. Suite aux résultats obtenus, une question demeure, celle de l'élimination des lanthanides. En effet, ceux-ci sont excrétés du foie et de la rate mais ne sont pas, à l'inverse du fer exogène non magnétique, détectés dans d'autres organes ni dans le sang au cours du temps. Or nous constatons la diminution au cours du temps de la fraction de Pol<sub>Coating</sub> des organes analysés, suggérant une recirculation de celles-ci. Une première hypothèse est qu'après excrétion, ceux-ci sont acheminés dans les reins et éliminés par les urines et les temps d'analyse sont trop éloignés pour permettre leur détection dans le sang ou dans les reins. Une autre hypothèse est que ceux-ci sont acheminés vers des organes non analysés. Bien que l'élimination de l'enrobage des organes analysés soit évidente, nous ne pouvons statuer quant à son parcours intra et inter tissulaire.

## 4. Conclusion

---

Le marquage du cœur inorganique avec un isotope stable du fer et le marquage de l'enrobage avec des lanthanides a permis de suivre de manière indépendante le devenir des  $LT^{57}NPOFs$  dans l'organisme au cours du temps. En combinant tous les résultats obtenus précédemment, nous proposons un premier mécanisme de prise en charge de celles-ci après injection intraveineuse.

Plusieurs indices semblent converger sur un mécanisme précoce de dissociation de l'enrobage et de dégradation des  $LT^{57}NPOFs$  dans le sang. Bien que nous n'ayons pas les données de RFM dans le sang, une fraction non négligeable de fer exogène non magnétique est accumulée dans différents organes tels que la rate ou les reins, seulement une heure après injection. Après la dissociation partielle des  $LT^{57}NPOFs$  dans le sang, quatre entités coexistent, les  $LT^{57}NPOFs$  enrobées et nues, le fer exogène non magnétique et l'enrobage des  $LT^{57}NPOFs$ . On constate par la suite une accumulation différentielle de celles-ci dans les différents organes analysés. Dans la suite de ce paragraphe nous proposons de lister les informations essentielles mises en valeur grâce à cette expérience.

Le foie semble être l'organe où a majoritairement lieu la dégradation magnétique et cristalline des  $LT^{57}NPOFs$ . Après injection intraveineuse les  $LT^{57}NPOFs$  nues et enrobées sont localisées dans celui-ci. Le suivi de l'enrobage de polymère a permis de montrer que les  $LT^{57}NPOFs$  nues sont dégradées plus vite que les  $LT^{57}NPOFs$  enrobées. Le rôle de l'enrobage dans la dégradation des NPOFs a déjà été étudié au laboratoire. Lartigue *et al.* ont pu montrer que la nature du polymère influe sur la dégradation, en solution, de NPOFs cubiques.<sup>5</sup> En effet, le suivi des propriétés morphologiques en MET haute résolution de NPOFs cubiques montre que celles enrobées de PEG se dissolvent plus vite que celles enrobées d'un polymère amphiphile. En outre, ils ont montré que la dissolution des NPOFs cubiques dépend du taux d'enrobage de celles-ci. Les faces et arêtes des cubes où le taux d'enrobage est le plus faible semblent se dégrader plus rapidement. Nous avons pu également observer l'influence de l'enrobage sur la dégradation *in vivo*. Une étude réalisée précédemment au laboratoire a montré que des nanoparticules hybrides constituées d'or et de fer et enrobées d'un polymère amphiphile persistent plus longtemps dans le foie et dans la rate, comparativement à ces mêmes particules enrobées de PEG.<sup>4</sup> Les résultats de ces deux études ainsi que ceux de notre étude semblent converger vers un mécanisme de dégradation du cœur inorganique dépendant d'une part de la nature de l'enrobage et, d'autre part, de son homogénéité autour des NPOFs. Dans notre étude un seul enrobage a été testé, cependant on observe une dissociation partielle de celui-ci dans le sang. Les NPOFs sont ainsi qualifiées de nues ce qui suggère que leur surface est exposée aux différentes enzymes, protéines et agents de chélation du milieu biologique ce qui favorise leur dégradation. Le rôle de l'enrobage est double puisqu'il permet de moduler la biodistribution des nanoparticules *in vivo*,<sup>9-11</sup> et constitue également une couche protectrice autour des nanoparticules qui permet de retarder leur dégradation. Aussi, le choix de l'enrobage détermine leur efficacité en tant qu'agent thérapeutique ou de diagnostic au cours du temps.<sup>12,13</sup>

Après dégradation des  $LT^{57}NPOFs$ , le fer exogène non magnétique est excrété du foie et acheminé en partie vers la rate. La rate semble être à l'inverse du foie, un organe de stockage du fer exogène. En effet, les  $LT^{57}NPOFs$  semblent être stables dans celles-ci durant la première semaine après injection puis dégradées pour une minorité d'entre elles. Comme pour le foie, les  $LT^{57}NPOFs$  nues semblent se dégrader plus rapidement que les enrobées. Entre un et trois mois on constate une augmentation significative du fer exogène non magnétique témoignant du stockage des produits issus de la dégradation des  $LT^{57}NPOFs$ . Weisslederr *et al.* ont pu montrer qu'après injection intraveineuse de  $NPOFs$  marquées avec le radioisotope  $^{59}Fe$ , celui-ci était incorporée dans l'hémoglobine des érythrocytes (globule rouge) après dégradation des  $NPOFs$ .<sup>14</sup> Or, la rate est constituée d'une pulpe blanche contenant des cellules immunitaires et une pulpe rouge contenant majoritairement des érythrocytes. Aussi une hypothèse est que le  $^{57}Fe$  issu de la dégradation des  $LT^{57}NPOFs$  est dans un premier temps incorporé dans l'hémoglobine des érythrocytes, comme l'ont montré Weissleder *et al.*, puis les érythrocytes sont transférés vers la rate, ce qui augmente significativement la fraction de fer non superparamagnétique recouvrée dans celle-ci.

Les reins semblent eux être dédiés à la prise en charge de l'enrobage issu de la dissociation précoce dans le sang. On constate également dans ceux-ci ainsi que dans les poumons la localisation d'une minorité de  $LT^{57}NPOFs$ . Néanmoins, dans ces organes, elles sont prises en charges et dégradées. La [Figure 4.1](#) présente un bilan des différents mécanismes de prise en charge des  $LT^{57}NPOFs$  dans les différents organes en fonction du temps.

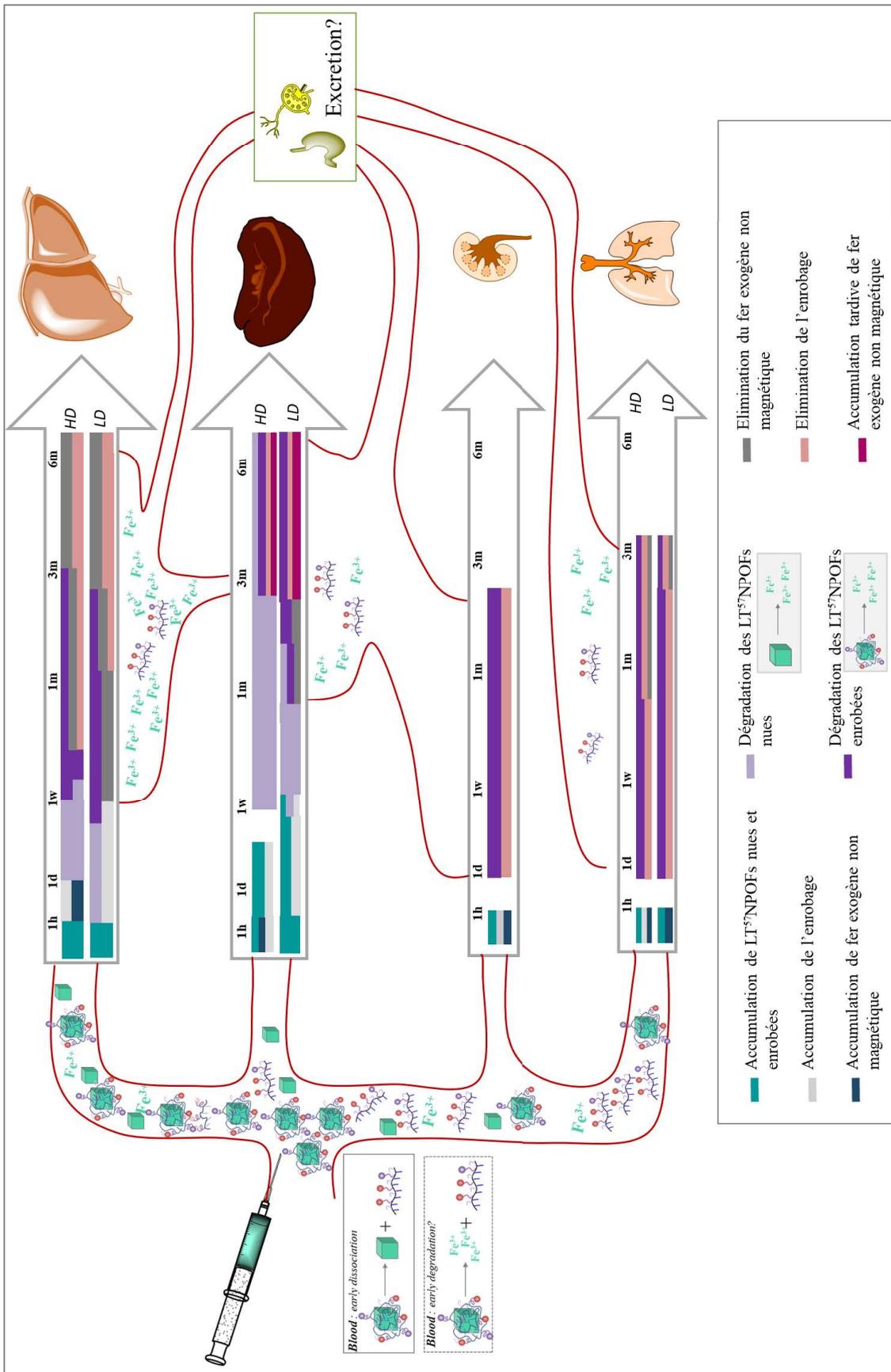


Figure 4.1 : Bilan des processus de prise en charge des LT<sup>57</sup>NPOFs en fonction du temps dans les différents organes pour les deux doses. Les hypothèses sont signalées par les encadrés ou lignes en pointillés.

L'étude de la dégradation de NPOFs est une thématique développée au laboratoire depuis plusieurs années. Dans un premier temps, celle-ci a été modélisée dans des milieux simplifiés afin de comprendre les mécanismes de dégradation caractérisée essentiellement par une perte de leurs propriétés magnétiques et structurelles.<sup>5,15,16</sup> Par la suite, des études *in vivo* ont permis d'une part de caractériser les cinétiques des processus de dégradation *in vivo*.<sup>3,4,17</sup> Elles ont également mis en évidence un potentiel mécanisme de prise en charge des produits issus de la dégradation des NPOFs par les ferritines endogènes, ce qui a été présenté dans le premier chapitre de ce manuscrit. Au-delà du suivi de la dégradation des NPOFs, l'objectif de notre étude présentée dans ce chapitre était de caractériser les dynamiques de circulation des produits issus de la dégradation des NPOFs. Ces produits de dégradation non magnétiques et constitués majoritairement de fer doivent être distingués du fond endogène en fer. A cet égard nous avons enrichi les NPOFs avec du <sup>57</sup>Fe pour distinguer le fer exogène du fer endogène. Le double suivi élémentaire et magnétique a permis pour la première fois de suivre simultanément les NPOFs et leurs produits de dégradation *in vivo* sur le long terme.

Il semble qu'une partie d'entre eux soient éliminés de l'organisme tandis qu'une autre partie soit en partie recyclée dans la réserve de fer endogène, en accord avec l'étude de Weissleder *et al.*. Notre étude a également montré pour la première fois les dynamiques de circulation des produits issus de la dégradation à l'échelle de l'organisme, sur le long terme. Ces derniers résultats mettent en évidence des processus de métabolisation et de détoxification des entités exogènes issues des nanoparticules.

Grâce au double marquage de l'enrobage avec des lanthanides, nous avons également pu suivre le devenir de celui-ci après injection intraveineuse. Comme nous l'avons présenté dans l'introduction, l'enrobage permet de moduler les interactions avec les protéines endogènes et ainsi moduler la reconnaissance phagocytaire des nanoparticules ainsi que leur biodistribution. Néanmoins, nous avons montré qu'après injection intraveineuse, il semble qu'une partie de l'enrobage se dissocie des NPOFs dans le sang. Suite à la dissociation de l'enrobage, les NPOFs nues se dégradent plus rapidement que celles enrobées. Ces résultats confirment ainsi *in vivo* le rôle du polymère dans la dégradation du cœur magnétique des NPOFs, étudié précédemment en solution au laboratoire.<sup>5</sup> Aussi grâce à ces résultats, il est possible de définir des études systématiques à réaliser en amont sur la stabilité des nanoparticules, et en particulier dans le sang dans le but d'améliorer le ciblage et l'efficacité des nanomatériaux conçus pour des applications thérapeutiques.

Ces expériences réalisées sur un modèle de NPOFs ont apporté d'une part des informations précieuses quant à l'interaction entre celles-ci et l'organisme et d'autre part une méthodologie robuste pour suivre l'intégrité de NPOFs dans l'organisme sur le long terme.



1. Wang, W. *et al.* Design of a Multi-Dopamine-Modified Polymer Ligand Optimally Suited for Interfacing Magnetic Nanoparticles with Biological Systems. *Langmuir* **30**, 6197–6208 (2014).
2. Joos, A., Löwa, N., Wiekhorst, F., Gleich, B. & Haase, A. Size-dependent MR relaxivities of magnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **427**, 122–126 (2017).
3. Levy, M. *et al.* Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 3988–3999 (2011).
4. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* The One Year Fate of Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles in Mice. *ACS Nano* **9**, 7925–7939 (2015).
5. Lartigue, L. *et al.* Biodegradation of Iron Oxide Nanocubes: High-Resolution In Situ Monitoring. *ACS Nano* **7**, 3939–3952 (2013).
6. Kreyling, W. G. *et al.* In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 619–623 (2015).
7. Wang, F. *et al.* The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **9**, 1159–1168 (2013).
8. Feliu, N. *et al.* In vivo degeneration and the fate of inorganic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 2440–2457 (2016).
9. Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 428–437 (2009).
10. Karmali, P. P. & Simberg, D. Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **8**, 343–357 (2011).
11. Kreuter, J. *et al.* Apolipoprotein-mediated Transport of Nanoparticle-bound Drugs Across the Blood-Brain Barrier. *J. Drug Target.* **10**, 317–325 (2002).
12. Soenen, S. J. H. *et al.* Intracellular nanoparticle coating stability determines nanoparticle diagnostics efficacy and cell functionality. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* **6**, 2136–2145 (2010).
13. Barrow, M., Taylor, A., Murray, P., J. Rosseinsky, M. & J. Adams, D. Design considerations for the synthesis of polymer coated iron oxide nanoparticles for stem cell labelling and tracking using MRI. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 6733–6748 (2015).
14. Weissleder, R. *et al.* Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am. J. Roentgenol.* **152**, 167–173 (1989).
15. Lévy, M. *et al.* Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties. *Nanotechnology* **21**, 395103 (2010).
16. Javed, Y. *et al.* Biodegradation Mechanisms of Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers and Tunable Shield Effect of Gold Coating. *Small* **10**, 3325–3337 (2014).

17. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle “Destructurators” of the Tumoral Microenvironment. *ACS Nano* **8**, 4268–4283 (2014).

# Conclusion générale et perspectives

---

Durant les quarante dernières années, le nombre de recherches visant à exploiter les propriétés magnétiques des NPOFs à des fins médicales n'a cessé d'augmenter. Leurs propriétés magnétiques, pouvant être utilisées aussi bien pour convertir une source magnétique en chaleur que pour l'imagerie médicale, les placent parmi les très bons candidats pour les thérapies anti-cancéreuses ou pour le diagnostic. En ce sens, les NPOFs constituent de véritables agents polyvalents et font d'ores et déjà l'objet de nombreux essais cliniques.

Cependant, nous manquons indubitablement de recul sur la toxicité et le devenir à long terme de ces nanomatériaux dans l'organisme. Ceux-ci possèdent des propriétés intermédiaires entre la molécule et le matériau, ce qui modifie considérablement leurs interactions avec le milieu biologique ainsi que leurs cinétiques de circulation, de dégradation et d'élimination de l'organisme.

Dans ce contexte, une des thématiques développées au laboratoire Matière et Systèmes Complexes a été d'une part d'évaluer les performances de plusieurs NPOFs en tant qu'agent thérapeutique et de diagnostic, et, d'autre part, d'étudier leur cycle de vie dans différents modèles *in vitro* et *in vivo*. A travers ces études, de nouvelles approches multi-échelles ont été développées afin de caractériser le cycle de vie des NPOFs dans des milieux biologiques complexes.<sup>1-5</sup> Ces recherches, précurseurs de mes travaux de thèse, ont mis en évidence qu'après injection intraveineuse, les NPOFs se dégradent dans les compartiments lysosomaux des macrophages du foie et de la rate majoritairement.

Mes travaux de thèse se sont articulés autour de l'étude du cycle de vie des NPOFs à différentes échelles, de l'échelle moléculaire à l'échelle de l'organisme. La ligne directrice a été de suivre en parallèle les NPOFs et leurs produits de dégradation dans différents modèles. Pour cela, nous avons développé de nouvelles méthodes adaptées à ce double suivi à différentes échelles.

## **Prise en charge des produits de dégradation – suivi à l'échelle moléculaire**

La première partie de cette thèse, et présentée dans le chapitre 1, a été consacrée à l'étude à l'échelle moléculaire de la prise en charge des produits de dégradations issus de NPOFs et de ferrites de cobalt. Et en particulier aux mécanismes de transfert de métaux issus de la dégradation des nanoparticules vers une protéine de stockage du fer, la ferritine. Nous avons en outre étudié l'influence de celle-ci sur les processus de dégradation des NPOFs. Dans un premier temps, des expériences menées dans un milieu mimant les conditions lysosomales ont mis en évidence la capacité des ferritines à stocker le fer issu de la dégradation de NPOFs. En suivant l'évolution de la dégradation des NPOFs en présence de ferritines, nous avons constaté que celles-ci modifiaient considérablement leurs cinétiques de dégradation. En effet, les ferritines forment une couronne autour des NPOFs, ce qui les protège de la

dégradation induite par les ligands citrates. Le rôle des ferritines est ambivalent puisque d'une part celles-ci protègent les NPOFs de la dégradation et, d'autre part, nous avons montré qu'elles pouvaient directement dégrader les NPOFs sans intermédiaires de chélation. Néanmoins, ce processus est caractérisé par une cinétique lente, comparativement à la dégradation des NPOFs en présence de ligands citrates.<sup>6</sup>

Des études, réalisées par mes prédécesseurs, montrent qu'après injection de NPOFs par voie intraveineuse, celles-ci sont confinées dans les lysosomes en présence d'une quantité croissante de ferritine unique ou sous forme de clusters.<sup>1,3,7</sup> En outre, les NPOFs qui initialement étaient sous forme d'agrégats dans les lysosomes sont isolées progressivement, favorisant ainsi leur dégradation. Ces observations suggèrent des mécanismes subcellulaires de régulation de la dégradation des NPOFs et de prise en charge de leurs produits de dégradation. En effet, la dégradation des NPOFs ainsi que les échanges de fer sont cantonnés au sein des lysosomes et un recrutement de ferritines est observé suggérant un mécanisme de transfert de fer des NPOFs vers les ferritines *in vivo*. Cependant, avec les méthodes utilisées il n'est pas possible de faire la distinction entre le fer endogène et celui issu des NPOFs, et donc de montrer formellement que ce transfert a lieu *in vivo*.

Une stratégie possible pour tracer ce transfert *in vivo* est de considérer un métal non présent de manière naturelle dans les ferritines comme traceur. A cet égard, nous avons choisi de détecter le transfert de cobalt issu de ferrites de cobalt vers les ferritines. Après avoir montré que le cobalt issu de la dégradation de ferrites de cobalt pouvait être incorporé dans la ferritine en solution, les ferrites de cobalt ont été injectées par voie intraveineuse, chez un modèle murin. Le suivi par MET et par spectroscopie EDX a montré la présence de ferritines, à proximité de ferrites de cobalt dégradées dans les lysosomes, contenant du fer et du cobalt. Il n'est pas possible de statuer quant à la provenance du fer dans ces ferritines, néanmoins, le cobalt, qui n'est pas présent *a priori* dans les ferritines endogènes, est issu de la dégradation des ferrites de cobalt.<sup>8</sup>

Le stockage de métaux exogènes issus de la dégradation de nanoparticules par les ferritines met en évidence un mécanisme de prise en charge et de détoxification de ceux-ci *in vivo*. En stockant les métaux sous forme redox non active, la ferritine constitue un véritable régulateur de l'état redox du lysosome et protège la cellule du stress oxydant induit par la présence de métaux labiles.

La dégradation ainsi que la détoxification des nanoparticules au sein des cellules induisent une succession de réactions en chaîne dont un maillon est la prise en charge par les ferritines. On pourra notamment se référer à l'étude réalisée par D. Elgrabli *et al.* qui présente un mécanisme biologique complet des processus de dégradation de nanotubes de carbone *in vitro*. Aussi une perspective intéressante de ces travaux sera d'investiguer les différents processus biologiques intervenant dans la dégradation et la prise en charge des NPOFs *in vitro*. En outre, il serait intéressant d'évaluer les conséquences de la présence de nanoparticules sur la machinerie cellulaire. En particulier, Stern *et al.*

ont montré que la présence de nanomatériaux pouvait déréguler les fonctions lysosomales, ce qui pourrait être à l'origine de maladies de surcharge lysosomale pouvant affecter de nombreux organes, en particulier, le système nerveux.<sup>9</sup> A cet égard, deux projet CycCar et CycLys ont été soumis auprès de l'ANSES et l'ANR, respectivement, en collaboration avec Bruno Gasnier du laboratoire Neurophotonique, Elias Fattal de l'Institut Galien Paris Sud et Damien Alloyeau du laboratoire MPQ, afin d'évaluer l'intégrité des lysosomes en présence de nanoparticules variées. A travers ce projet, la biogenèse des lysosomes, leur fonction de dégradation de protéines endogènes ainsi que leur intégrité structurelle seront évaluées en présence de nanoparticules d'or de taille variées et en présence de nanoparticules d'oxyde de fer.

### **Suivi des NPOFs et de leurs produits de dégradation – échelle de l'organisme**

La seconde partie de cette thèse, et présentée à travers les chapitres 2 3 et 4, a été consacrée au suivi des dynamique de dégradation spatiale et temporelle des NPOFs à l'échelle de l'organisme. A cet égard, nous avons développé une méthode analytique permettant de suivre en parallèle les NPOFs et leurs produits de dégradation. Les NPOFs superparamagnétiques peuvent être aisément détectées dans un environnement biologique par mesure magnétique. En revanche, pour distinguer les produits de dégradations exogènes du fer endogène, majoritairement constitué de <sup>56</sup>Fe, il est nécessaire d'utiliser des isotopes minoritaires du fer. Nous avons donc synthétisé des NPOFs enrichie en <sup>57</sup>Fe d'abondance naturelle égale à 2.12 %. Le <sup>57</sup>Fe non magnétique issu de la dégradation des NPOFs se distingue alors du fond endogène en fer et peut être mesuré par ICP-MS. Les NPOFs synthétisées possèdent en outre des propriétés magnétiques satisfaisantes comme agent de contraste pour l'imagerie médicale.

En premier lieu nous avons testé cette méthode analytique *ex vivo*, sur des matrices biologiques. Ces expériences préliminaires ont permis d'une part de valider la méthode analytique pour un suivi *in vivo* et, d'autre part, d'évaluer la sensibilité de détection des NPOFs dans ces matrices. Nous avons par la suite associé des mesures magnétiques aux mesures par ICP-MS pour la double détection des NPOFs et de leurs produits de dégradation. Cette étude pilote a été réalisée *in vivo*, sur un nombre réduit de souris sur une période de 24 heures afin d'évaluer les performances du double suivi. Les principaux résultats obtenus montrent d'une part que les <sup>57</sup>NPOFs sont majoritairement localisées dans la rate et dans le foie après injection intraveineuse, et d'autre part, que les <sup>57</sup>NPOFs se dégradent dans le foie dès une heure après l'injection, comparativement à la rate, où elles sont stables durant le temps de l'expérience. Grâce à cette étude pilote, nous avons pu montrer la pertinence et l'efficacité de ce double suivi, et également d'observer des phénomènes de dégradation précoce dans le foie.

Nous avons par la suite transposé cette méthode analytique pour suivre le cycle de vie des NPOFs *in vivo* sur le long terme. Nous avons également couplé l'enrichissement des <sup>57</sup>NPOFs avec un marquage de leur enrobage grâce à des lanthanides, afin de suivre l'intégrité des NPOFs. En effet, grâce à ce double marquage, nous avons pu suivre indépendamment les NPOFs, leurs produits de dégradation, et leur

enrobage. Après injection intraveineuse, l'enrobage des NPOFs se dissocie partiellement dans le sang durant la première heure et est acheminé dans les reins où il est excrété de l'organisme. En accord avec des études précédentes, et avec notre étude pilote, les NPOFs sont localisées majoritairement dans le foie et dans la rate. On constate également une cinétique de dégradation rapide dans le foie comparativement à la rate. Les produits de dégradation issus du foie sont ensuite en partie stockés dans la rate. Ce résultat, mis en évidence pour la première fois souligne les dynamiques de circulation et de recyclage des produits de dégradation issus des NPOFs. En lien avec le premier chapitre de ce manuscrit, une hypothèse est que le fer issu de la dégradation des NPOFs dans le foie, rejoint la réserve de fer endogène, et est pris en charge par différentes protéines avant d'être acheminé dans la rate où il est stocké au sein de ferritines. A travers cette expérience, nous avons établi une méthode de suivi de l'intégrité des NPOFs robuste et adaptée pour les études sur le long terme.

Nous avons constaté au cours de cette expérience que la quantité de lanthanides diminue au cours du temps dans la rate et le foie, sans être détectée par la suite dans le sang ou dans d'autres organes. De la même manière, une partie des produits de dégradation des NPOFs issus du foie sont détectés dans la rate, et une quantité non négligeable n'est plus détectée. Une première hypothèse est que ceux-ci sont éliminés de l'organisme ou stockés au sein d'organes qui n'ont pas été analysés. Ainsi une perspective de ces travaux consisterait à faire des cinétiques sur des temps rapprochés afin d'évaluer ces dynamiques de circulation et d'excrétion. En outre, une sélection de tissus additionnels tels que les ganglions, le colon et éventuellement les urines permettrait de répondre aux questions susmentionnées.

Cette expérience suscite plusieurs questions, et en particulier celle de la différence de dégradation observée dans le foie et dans la rate. Une perspective de ces travaux, consisterait donc à étudier les phénomènes de dégradation *in vitro*, dans des cellules spécifiques de la rate, tels que des lymphocytes B et T, et spécifiques du foie, telles que les cellules de Kupffer. Une seconde observation étonnante est la dissociation précoce de l'enrobage des NPOFs dans le sang. Or l'enrobage Dopa-PIMA-PEG possède différents points d'ancrages caractérisés par une forte affinité pour les NPOFs et reliés à une chaîne principale, ce qui a pour effet d'augmenter sa stabilité. De nombreuses recherches s'attachent à développer un enrobage permettant d'améliorer la biodistribution et de cibler des cellules spécifiques, comme les cellules tumorales. Se pose alors la question de la stabilité dans le sang de ces enrobages. Aussi la méthode de marquage avec des lanthanides pourrait être transposée aux études de stabilité de l'enrobage dans le sang, dans le but d'élaborer des enrobages robustes permettant un ciblage efficace.

Un aspect qui n'a pas été abordé dans cette thèse est la question de la toxicité de ces nanomatériaux après injection intraveineuse. Comme abordé dans l'introduction, la présence de nanoparticules peut induire différentes réponses physiologiques telles que l'augmentation du stress oxydant, la mort cellulaire, l'altération de l'ADN ou une inflammation locale. Lors du prélèvement des organes des souris pour l'expérience présentée dans le chapitre 4, nous avons réservé des échantillons

pour l'analyse de l'évolution de l'expression des gènes dans les différents organes, et en particulier les gènes liés au stress oxydant, au métabolisme du fer et à l'inflammation. En effet, le fer superparamagnétique issu de la dégradation est transféré du foie vers la rate. Une première hypothèse proposée, en accord avec les résultats de Weissleder *et al.* est que celui-ci est incorporé dans l'hémoglobine des érythrocytes qui transitent vers la rate.<sup>10</sup> Une autre hypothèse, en lien avec le premier chapitre de cette thèse est que le fer issu de la dégradation soit pris en charge par des protéines intervenant dans le métabolisme du fer, telles que les ferritines ou les transferrines. Nous n'excluons pas la combinaison de ces deux scénarii, à savoir une prise en charge par les protéines du métabolisme du fer puis un transfert vers les érythrocytes. L'analyse de l'évolution des gènes n'a pas encore été réalisée. Une perspective intéressante serait aussi d'évaluer les processus de dégradation des NPOFs et la toxicité induite par celles-ci dans le cas de certaines pathologies. A titre d'exemple dans le cas d'une hémochromatose qui est une maladie du métabolisme du fer caractérisée par une surcharge en fer, la dégradation, la toxicité des NPOFs ainsi que la métabolisation de celles-ci pourrait être modifiées. Ces questions se posent également dans le cas de maladies lysosomales, citées plus haut, qui altèrent les fonctions de dégradation des lysosomes.

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le processus d'évaluation de NPOFs pour des applications médicales. En effet, la compréhension de leur devenir sur le court et le long terme permet d'optimiser leurs propriétés, en amont, afin d'élaborer un objet robuste et sûr d'utilisation. En effet, au même titre que les études de toxicité, l'évaluation de la dégradation des nanoparticules devient progressivement systématique lors de l'élaboration de nanomatériaux pour la thérapie ou le diagnostic.

En lien avec ces problématiques, j'ai également eu la chance de participer à deux projets visant à concevoir des nanoparticules pour des thérapies anti-cancéreuses. Le premier projet NoCanTher est un projet européen alliant chimistes, biologistes, physiciens, ingénieurs, cliniciens et médecins. Il consiste à développer un traitement dans le cas du cancer du pancréas en associant un traitement par hyperthermie magnétique à une chimiothérapie. En effet l'hyperthermie magnétique induit une déstructuration du tissu tumoral, ce qui permettrait d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie.<sup>11</sup> Ce projet prépare l'essai clinique visant à injecter localement les nanoparticules dans la tumeur du pancréas puis à la traiter par hyperthermie magnétique comme traitement adjuvant des chimiothérapies. La préparation du dossier réglementaire pour la mise sur le marché des nanoparticules est également en cours. Dans le cadre de ce projet, nous évaluons la dégradation des NPOFs sur le court et long terme chez un modèle de souris saines et malades. Les doses de NPOFs injectées localement dans les tumeurs pour l'hyperthermie magnétique sont bien plus élevées comparativement à celles administrées dans ces travaux de thèse. Ainsi à travers ce projet nous évaluerons la dégradation et la toxicité des NPOFs pour des doses élevées, de l'ordre de  $900 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ . Deux réunions par an ont lieu, réunissant l'ensemble des collaborateurs de ce projet, ce qui m'a permis d'apprécier le processus de développement d'un médicament depuis la synthèse chimique jusqu'au essais cliniques. Le second projet, en collaboration avec Stéphane Roux de

l'Institut Utinam, consiste à évaluer l'effet radiosensibilisant combiné à l'hyperthermie magnétique sur des tumeurs développées à partir de cellules mélanomes et implantées sur un modèle de murin. Afin de combiner ces deux traitements, des nanoparticules constituées d'oxyde de fer sur lesquelles sont greffées des nanoparticules d'or ont été élaborées par nos collaborateurs. Dans le cadre de ce projet, nous évaluons d'une part la dégradation de ces nanoparticules dans le milieu mimant les conditions lysosomales puis sur le long terme chez un modèle de souris saines.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont nécessité de faire appel à des domaines variés. Cette pluridisciplinarité souvent présente dans le domaine des nanosciences, m'a permis développer mon profil de chimiste tout en explorant des sujets physiques et biologiques jusqu'à la manipulation animale. La nature pluridisciplinaire de ce sujet a nécessité une approche multi échelle utilisant des techniques variées telles que l'analyse isotopique, magnétique, la microscopie électronique haute résolution. Ce sujet m'a donc permis de rencontrer de nombreux spécialistes de domaines variés dans le cadre de plusieurs collaborations.

1. Levy, M. *et al.* Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 3988–3999 (2011).
2. Lévy, M. *et al.* Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties. *Nanotechnology* **21**, 395103 (2010).
3. Lartigue, L. *et al.* Biodegradation of Iron Oxide Nanocubes: High-Resolution In Situ Monitoring. *ACS Nano* **7**, 3939–3952 (2013).
4. Javed, Y. *et al.* Biodegradation Mechanisms of Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers and Tunable Shield Effect of Gold Coating. *Small* **10**, 3325–3337 (2014).
5. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* The One Year Fate of Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles in Mice. *ACS Nano* **9**, 7925–7939 (2015).
6. Volatron, J. *et al.* Ferritin Protein Regulates the Degradation of Iron Oxide Nanoparticles. *Small* **13**, n/a-n/a (2017).
7. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* Cycle de vie de nanoparticules magnétiques dans l'organisme. *Biol. Aujourd'hui* **208**, 177–190 (2014).
8. Volatron, J. *et al.* Physiological Remediation of Cobalt Ferrite Nanoparticles by Ferritin. *Sci. Rep.* **7**, 40075 (2017).
9. Stern, S. T., Adisheshaiah, P. P. & Crist, R. M. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part. Fibre Toxicol.* **9**, 20 (2012).
10. Weissleder, R. *et al.* Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am. J. Roentgenol.* **152**, 167–173 (1989).
11. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle “Destructurators” of the Tumoral Microenvironment. *ACS Nano* **8**, 4268–4283 (2014).



# Partie expérimentale

---

La partie expérimentale ci-dessous concerne l'ensemble des expériences réalisées dans le cadre des chapitres 2 et 3.

# 1. Synthèse et caractérisation des nanoparticules isotopiquement marquées

---

## 1.1 Synthèse des nanoparticules $^{57}\text{NPOFs}$ (chapitre 2 & 3)

Les  $^{57}\text{NPOFs}$  ont été synthétisées à partir du précurseur  $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$  sous forme de poudre micrométrique et enrichi en  $^{57}\text{Fe}$  à 95,47 % (Isoflex USA, San Francisco, USA). Dans un premier temps le précurseur  $^{57}\text{FeCl}_3$  a été obtenu par digestion de la poudre  $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$  puis par extraction liquide-liquide en milieu organique selon le protocole de Dodson *et al.*<sup>1</sup> Les nanoparticules  $^{57}\text{NPOFs}$  furent par la suite synthétisées par décomposition thermique suivant le protocole de J.Park *et al.*<sup>2</sup> avec quelques modifications. Enfin les  $^{57}\text{NPOFs}$  ont été fonctionnalisées le polymère Dopa-PIMA-PEG par échange de ligand, décrit par Wang *et al.*<sup>3</sup>

### Précurseur $^{57}\text{FeCl}_3$

La poudre  $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$  (1 mmol, 160 mg) enrichie en  $^{57}\text{Fe}$  a été dissoute dans un erlenmeyer de 50 mL par une solution d'acide chlorhydrique (6 M, 15 mL). Après dissolution complète, 15 mL d'éther diéthylique ont été ajoutés. Après agitation de la solution, deux phases sont obtenues. La phase aqueuse est écartée et la phase organique, présentant un couleur jaune, caractéristique de la présence de fer est récupérée. Cette étape d'extraction du fer avec 15 mL d'éther diéthylique est répétée trois fois. Après avoir éliminé l'éther diéthylique sous vide grâce à un évaporateur rotatif, une solution contenant 1,5 mL d'eau distillé et 3 mL de NaOH (1 M) a été ajoutée afin d'obtenir le précurseur  $^{57}\text{FeCl}_3$  en solution acide. Sans ajout de NaOH, le complexe fer-oléate ne se forme pas.

### Synthèse du complexe $^{57}\text{Fe}$ -oléate

La synthèse du complexe  $^{57}\text{Fe}$ -oléate a été réalisée en suivant le protocole de Park *et al.* avec quelques modifications. Dans un ballon tricol de 100 mL, 1,82 g d'oléate de sodium (6 mmol) ont été dissous dans un solvant constitué de 1,5 mL d'eau distillée et 4 mL d'éthanol. La solution de  $^{57}\text{FeCl}_3$  obtenue précédemment est ensuite ajoutée en présence de 7 mL d'hexane. La solution biphasique obtenue est ensuite chauffée à 70°C et maintenue à cette température pendant 4 heures. Après réaction les deux phases furent séparées grâce à une ampoule à décanter. La phase la moins dense et colorée fut récupérée et lavée trois fois avec de l'eau distillée, formant ainsi une émulsion eau-hexane. Après centrifugation de l'émulsion (4000 rpm, 5 min), la phase aqueuse fut écartée et l'hexane évaporé. Après évaporation, une huile brune constituée du complexe  $^{57}\text{Fe}$ -oléate est obtenue.

### Synthèse des $^{57}\text{NPOFs}$

Les  $^{57}\text{NPOFs}$  ont été synthétisée en ajoutant au complexe  $^{57}\text{Fe}$ -oléate précédemment obtenu 0,28 g d'acide oléique (1 mmol) dans 10 g d'octadécène. La solution est ensuite chauffée jusqu'à 320°C.

Lors de la montée en température, une baisse abrupte de température est observée vers 315°C, allant jusqu'à une baisse de 10°C, la solution noircit. Cette baisse de température correspond à la dissociation des deux derniers ligands oléates du complexe. La croissance des nanoparticules est alors initiée et caractérisée par l'assombrissement de la solution. A partir de la baisse de température, la solution est chauffée pendant 30 minutes. La solution contenant les <sup>57</sup>NPOFs est ensuite refroidie jusqu'à température puis 6 mL de chloroforme sont ajoutés. Les <sup>57</sup>NPOFs sont ensuite précipitées par ajout d'un excès d'éthanol. Le surnageant est écarté et le culot redispersé dans 5 mL d'hexane. Ce processus de lavage est répété trois fois. Les <sup>57</sup>NPOFs sont ensuite dispersées dans une solution contenant 10 mL d'hexane et 32 µL de butylamine (0.1 eq en acide oléique). La butylamine est ajoutée afin de complexer l'excès d'acide oléique et éviter la formation d'une couche bilipidique à la surface des <sup>57</sup>NPOFs. La solution est enfin soniquée et filtrée à l'aide d'un filtre jetable à membrane PES (polyethersulfone).

## 1.2 Enrobage des <sup>57</sup>NPOFs (chapitre 2 & 3)

Les <sup>57</sup>NPOFs précédemment synthétisées sont ensuite enrobées d'un polymère Dopa-PIMA-PEG synthétisé en suivant le protocole proposé par Wang *et al.* avec quelques modifications.

### Synthèse du polymère Dopa-PIMA-PEG (chapitre 2 & 3)

Dans un ballon tricol de 100 mL, 0,308 g (2 mmol) de poly(isobuthylène-alt-maleic-anhydride, Mw = 6000 g/mol, Sigma Aldrich) sont dissous dans 8 mL de DMF. La solution est ensuite purgée sous atmosphère inerte et chauffée à 70°C. Dans un ballon de 100 mL muni d'une tubulure latérale à robinet, 0,192 g de dopamine (1 mmol) activée avec de la triéthylamine et 0,560 g de méthoxypolyéthylène glycol amine (Mw = 750 g/mol, Sigma Aldrich) (0,7 mmol) sont dissous dans 4 mL de DMF. Après dissolution complète et purge sous atmosphère inerte, la solution est ajoutée goutte à goutte à la solution de PIMA. Ce mélange est agité pendant 3 heures à 70°C. Puis 0,452 g de poly(éthylène glycol)bis(3-aminopropyl) (Mw = 1500 g/mol, Sigma Aldrich) (0,3 mmol) sont dissous dans 2 mL de DMF et ajoutés goutte à goutte à la solution de Dopa-PIMA-PEG. La solution est agitée pendant une nuit à 70°C sous atmosphère inerte. Elle est ensuite refroidie jusqu'à température ambiante et le DMF est évaporé sous vide formant une huile jaune contenant le polymère Dopa-PIMA-PEG. Cette huile est ensuite dispersée dans 22 mL de THF.

### Fonctionnalisation du polymère Dopa-PIMA-PEG avec les lanthanides Gd et Tm (chapitre 3)

Dans un erlenmeyer de 50 mL, 29,4 mg (35,7 µmoles) du complexe Tm-p-SCN-Bn-DOTA (Mw : 831,6 g/mol, Macrocyclics, USA) et 29,8 mg (35,7 µmoles) du complexe Gd-p-SCN-DOTA (Mw : 819,9 g/mol, Macrocyclics, USA) sont dissous dans 3 mL d'un mélange 1:1 de DMSO et DMF. Dans un ballon bicol de 100 mL, 2 g (71,5 µmoles) de polymère Dopa-PIMA-PEG précédemment synthétisé sont dissous dans 13 mL de THF. A cette solution est ajouté 10 µL de triéthylamine (1 eq. en lanthanide,

soit 71,5  $\mu$ moles). Enfin la solution de lanthanides précédemment préparée est ajoutée goutte à goutte à l'aide d'une ampoule à brome. La solution est agitée pendant une nuit à température ambiante.

#### Enrobage des $^{57}\text{NPOFs}$ avec le polymère Dopa-PIMA-PEG (chapitre 2)

La fonctionnalisation des  $^{57}\text{NPOFs}$  par le polymère Dopa-PIMA-PEG et Dopa-PIMA-PEG-Lt a été réalisée en suivant le protocole de Wang *et al.*<sup>3</sup> Dans un volume de 5 mL de la solution de  $^{57}\text{NPOFs}$  dans l'hexane précédemment obtenue, un excès d'éthanol est ajouté afin de précipiter les  $^{57}\text{NPOFs}$ . Après centrifugation (4500 rpm, 10 min), le surnageant est écarté et un culot de 245 mg de  $^{57}\text{NPOFs}$  est obtenu. Le précipité est ensuite redispersé dans 24,5 mL de THF afin d'obtenir une solution de  $^{57}\text{NPOFs}$  de concentration massique égale à 10 mg/mL. Puis 24,5 mL de THF contenant 1,225 g de polymère Dopa-PIMA-PEG sont ajoutés à la solution de  $^{57}\text{NPOFs}$  et agités à 50°C pendant une nuit. Les  $^{57}\text{NPOFs}$  sont ensuite précipitées avec un excès d'hexane puis centrifugées (4000 rpm, 5 min). Après avoir écarté le surnageant, le culot de  $^{57}\text{NPOFs}$  est redispersé dans un solvant constitué de 2 mL de THF et 1,2 mL d'éthanol puis précipité de nouveau en ajoutant un excès d'hexane. Après centrifugation, (4000 rpm, 5 min), le culot de  $^{57}\text{NPOFs}$  est dispersé dans 20 mL d'eau distillée. Après sonication, la solution est filtrées grâce à un filtre MES 0,22  $\mu\text{m}$ . L'excès de ligand est ensuite éliminé par des cycles de concentration/dilution dans l'eau distillé grâce à un dispositif de filtration (Millipore, Mw = 100 kDa).

#### Enrobage des $^{57}\text{NPOFs}$ avec le polymère Dopa-PIMA-PEG Lt(chapitre 3)

La fonctionnalisation des  $^{57}\text{NPOFs}$  par le polymère Dopa-PIMA-PEG-Lt a été réalisée en suivant le protocole de Wang *et al.*<sup>3</sup> Dans un volume de 10 mL de la solution de  $^{57}\text{NPOFs}$  dans l'hexane précédemment obtenue, un excès d'éthanol est ajouté afin de précipiter les  $^{57}\text{NPOFs}$ . Après centrifugation (4500 rpm, 10 min), le surnageant est écarté et un culot de 264 mg de  $^{57}\text{NPOFs}$  est obtenu. Le précipité est ensuite redispersé dans 26,4 mL de THF afin d'obtenir une solution de  $^{57}\text{NPOFs}$  de concentration massique égale à 10 mg/mL. Puis 22 mL de THF contenant 1,32 g de polymère Dopa-PIMA-PEG sont ajoutés goutte à goutte à la solution de  $^{57}\text{NPOFs}$  et agités à 50°C pendant une nuit. Les Lt $^{57}\text{NPOFs}$  sont ensuite précipitées avec un excès d'hexane puis centrifugées (2500 rpm, 10 min). Après avoir écarté le surnageant, le culot de Lt $^{57}\text{NPOFs}$  est redispersé dans un solvant constitué de 2 mL de THF et 1,2 mL d'éthanol puis précipité de nouveau en ajoutant un excès d'hexane. Après centrifugation, (2500 rpm, 10 min), le culot de Lt $^{57}\text{NPOFs}$  est dispersé dans 20 mL d'eau distillée. Après sonication, la solution est filtrées grâce à un filtre MES 0,22  $\mu\text{m}$ . L'excès de ligand est ensuite éliminé par des cycles de concentration/dilution dans l'eau distillé grâce à un dispositif Amicon de filtration (Millipore, Mw = 100 kDa).

### **1.3 Caractérisation des $^{57}\text{NPOFs}$**

#### Microscopie électronique en transmission (MET)

Les solutions de  $^{57}\text{NPOFs}$  dans l'hexane ont été déposées sur des grilles de microscopie de cuivre recouvertes d'un film mince de carbone amorphe. Les clichés de microscopie ont été réalisés avec un appareil Tecnai 12 opérant à 80 kV et équipé d'une caméra 1K x K Keen View.

#### Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les mesures DLS ont été réalisées à 25 °C sur un appareil Zéta Sizer Nano ZS (Malvern, France) équipé d'un laser He-Ne opérant à 632,8 nm et un détecteur photodiode Avalanche.

#### Mesures magnétiques

Les mesures magnétiques ont été réalisées par Yves Gossuin et Quoc Lam Vuong à l'Université de Mons. Elles ont été réalisées sur un appareil VSM (vibrating sample magnetometer) de Cryogenic Limited (London, UK). Les courbes d'aimantation en fonction du champ appliqué des solutions aqueuses de  $^{57}\text{NPOFs}$  ont été acquises pour des températures égales à 298 K, 200 K et 4 K, pour un champ compris entre -5 T et 5 T. Les contributions diamagnétiques de l'échantillon et de l'eau, représentant plus d'un pourcent du moment magnétique total, ne sont pas négligeables et ont été soustraites des données brutes. Les courbes ZFC (Zero Field Cooled) ont été réalisées par refroidissement de l'échantillon à 5 K sans champ magnétique extérieur, puis en appliquant un champ magnétique de 10 mT lors de l'augmentation de température entre 5 K et 293 K. Les courbes FC (Field Cooled) ont été réalisées en refroidissant l'échantillon jusqu'à 5 K sous un champ magnétique de 10 mT.

#### Mesures de relaxivités et de résonance magnétique nucléaire en dispersion (NMRD).

Les courbes représentant la variation du taux de relaxation longitudinal du proton  $^1\text{H}$  en fonction de la fréquence de Larmor protonique ont été acquises pour une gamme de fréquences comprise entre 0,015 MHz et 40 MHz grâce à un spectromètre RMN Spinmaster FFC-2000 (Stelar SRL, Mede, Italie). La température des échantillons est maintenue à 37°C durant l'expérience. Les taux de relaxation  $R_2$  ont également été mesurés en utilisant des séquences CPMG (Carr Purcell Meiboom Gill) avec un temps interécho de 1 ms sur des Minispec MQ (Bruker) à 20 MHz et 60 MHz. Les mesures ont été réalisées pour des échantillons de concentration égale à 1 mM préparés par dilution dans l'eau distillé.

Les clichés des suspensions des  $^{57}\text{NPOFs}$  ont été obtenus grâce à un appareil Biospec 47/40 USR (Bruker) possédant un aimant de champ magnétique de 4,7 tesla (200 mHz) utilisant des séquences en écho de spin. Pour la mesure du temps de relaxation transversal,  $T_2$ , deux séquences en écho de spin MSME (MultiSliceMultiEcho) avec un temps d'écho  $T_E$  variable et un temps de répétition  $T_R$  long ont été utilisées. La première séquence est caractérisée par un  $T_R = 10$  s et un  $T_E$  variant de 9 ms à 576 ms par pas de 9 ms, cette séquence est adaptée à la mesure de  $T_2$  court. La seconde séquence est caractérisée par un  $T_R = 12$  s et un  $T_E$  variant de 50 ms à 3200 ms, et est adaptée à la mesure de  $T_2$  long. Pour mesurer le temps de relaxation longitudinal  $T_1$ , une séquence en écho de spin RAREVTR a été utilisée. Celle-ci est caractérisée par un  $T_E$  fixe, égal à 11 ms et un  $T_R$  variable, variant de 80 ms à 10 000 ms. Les temps

de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  sont déduit de la courbe mono exponentielle représentant le signal magnétique en fonction de  $T_R$  et  $T_E$ , respectivement, par le logiciel ParaVision.

### ICP-MS

Les solutions de  $^{57}\text{NPOFs}$  et  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  (pour les deux doses) ont été analysées en ICP-MS (HR-ICP-MS Element II de ThermoScientific). Un volume de 285  $\mu\text{L}$  d'acide nitrique à 69 % a été ajouté à 60  $\mu\text{L}$  de chaque solution stock. Après la dissolution complète des nanoparticules, 10 mL d'eau distillée ont été ajoutés afin d'obtenir une solution concentrée à 1 % en masse d'acide nitrique. La solution ainsi obtenue est ensuite diluée afin d'obtenir des solutions de concentrations totale en fer égales à 100 ppb, 10 ppb et 1 ppb. Ces solutions sont ensuite analysées en ICP-MS.

# 1. Matrices de validation (chapitre 2)

---

Quatre matrices biologiques complexes ont été sélectionnées : le foie, les selles, les urines et le sang. L'objectif de ces expériences est d'évaluer l'efficacité du marquage des  $^{57}\text{NPOFs}$  avec le  $^{57}\text{Fe}$  et de leur détection dans des milieux biologiques. Dans cette section nous allons décrire les étapes de préparation des échantillons depuis leur prélèvement jusqu'à l'ajout contrôlé de  $^{57}\text{NPOFs}$ . L'analyse sera décrite dans une section suivante consacrée à la description des différentes analyses réalisées sur les organes.

## 1.1 Prélèvement des matrices

Les matrices ont été prélevées sur des souris femelles Balb/c âgées de six semaines (Janvier, France). Avant sacrifice, une solution de kétamine-xylazine est administrée aux souris en intrapéritonéale qui permet analgésie et sédation suffisantes pour des procédures chirurgicales. Les souris sont ensuite sacrifiées par ponction cardiaque, permettant de prélever le sang. Les urines sont également collectées au moment du sacrifice des souris. Après sacrifice de la souris le foie est prélevé. Les selles sont collectées directement dans la cage des souris.

Les matrices sont ensuite divisées et chaque partie est minutieusement pesée.

## 1.2 Ajout des $^{57}\text{NPOFs}$ aux matrices

On distingue deux catégories d'échantillons : les échantillons Val-m représentant les matrices contrôles, et les échantillons Val-x dans lesquels une quantité connue de  $^{57}\text{NPOFs}$  a été ajoutée. Les quantités de  $^{57}\text{NPOFs}$  à ajouter dans chaque matrice couvrent plusieurs décades. La gamme de concentrations étudiée se situe entre 1/10000 et 10 fois la concentration d'accumulation maximale des  $^{57}\text{NPOFs}$  dans chaque matrice. Celle-ci est calculée en considérant que la totalité des  $^{57}\text{NPOFs}$  est localisée dans un organe en particulier après injection intraveineuse. Par exemple, si on considère que la dose injectée par voie intraveineuse est de 56  $\mu\text{g}$  en fer pour une souris de 20 g (soit une dose de 50  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ). En faisant l'hypothèse que la totalité des  $^{57}\text{NPOFs}$  s'est accumulée dans le foie, d'une masse moyenne de 1,37 g, la concentration en fer exogène s'élève à 43,6  $\mu\text{g}/\text{g}$  soit 43,6 ppm dans le foie. Ainsi les concentrations théoriques testées pour le foie couvrent la gamme de concentration allant de 436 ppm à 0,00436 ppm. Pour chaque matrice, six quantités différentes de  $^{57}\text{NPOFs}$  ont été ajoutées (Figure 1.1).

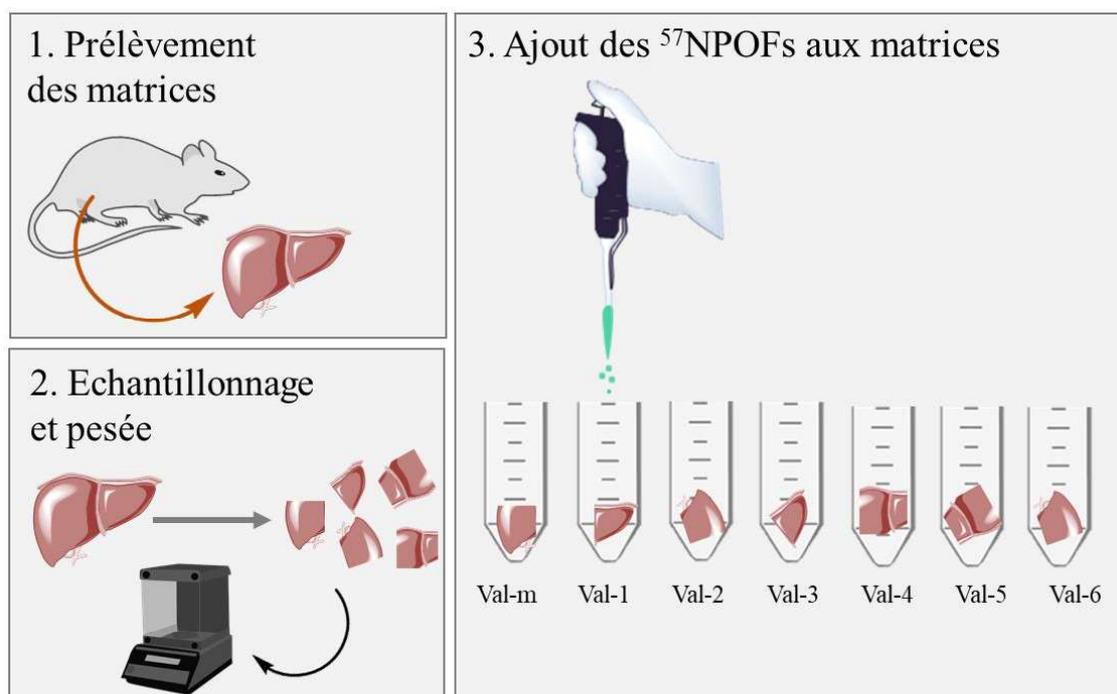


Figure 1.1 : Préparation des échantillons Val-x et Val-m.

Les concentrations expérimentales pour les échantillons Val-x de chaque matrice sont données dans la Figure 1.2.

	<b>Val-1</b>	<b>Val-2</b>	<b>Val-3</b>	<b>Val-4</b>	<b>Val-5</b>	<b>Val-6</b>
Foie	338	36,5	3,48	0,344	0,0329	0,00362
Selles	2410	232,1	23,65	2,365	0,2507	0,02457
Urines	401	40,1	4,01	0,401	0,0401	0,00401
Sang	318	31,5	3,15	0,315	0,0315	0,00315

Figure 1.2 : Concentration en ppm des <sup>57</sup>NPOFs pour les échantillons Val-x dans les matrices foie, selles, urine et sang.

Après préparation des échantillons Val-x et Val-m, ceux-ci sont analysés en HR-ICP-MS. Le protocole de préparation des échantillons ainsi que de l'analyse de ceux-ci en HR-ICP-MS est décrit dans la section dédiée à l'HR-ICP-MS.

## 2. Expériences *in vivo* (chapitre 2 & 3)

Les expériences *in vivo* ont été validées par le Comité d'éthique en expérimentation animale n°34. Elles ont été menées dans les animaleries de la plateforme d'Imagerie du Petit Animal de l'Institut Cochin (numéro d'agrément A751406) et du PARCC – Elevage Rongeurs Inserm (numéro d'agrément A751532). Les expériences ont été réalisées selon la réglementation institutionnelle sur l'utilisation et la prise en charge des animaux de l'animalerie du Centre de Recherche Cardiovasculaire de Paris. Avant les expériences, les animaux se sont acclimatés à l'animalerie pendant au moins une semaine et ont été nourri avec un régime standard tout au long des expériences.

Dans cette section nous regroupons les souris de l'étude pilote réalisée dans le chapitre 2 et les souris de l'étude *in vivo* sur le long terme, décrite à travers le chapitre 3. Nous considérons ainsi quatre produits injectés : les  $^{57}\text{NPOFs}$  (chapitre 2), les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ , le polymère  $\text{LT-Dopa-PIMA-PEG}$  et les complexes de gadolinium et de thulium (chapitre 3). L'injection de ces produits a été réalisées sous anesthésie par voie gazeuse avec de l'isoflurane, au sinus rétro-orbital. Les conditions d'injection sont présentées dans la Figure 2.1.

		Chapitre 2					
Groupe		1	2	3	4	5	6
Nbre de souris		5	5	5	5	5	5
Age		6 sem	6 mois	6 sem	6 mois	6 sem	6 mois
Produits d'injection		$^{57}\text{NPOFs}$	$^{57}\text{NPOFs}$	$^{57}\text{NPOFs}$	$^{57}\text{NPOFs}$	-	-
Dose	Fer ( $\mu\text{g}$ )	50	50	50	50	-	-
	Gd ( $\mu\text{g}$ )	-	-	-	-	-	-
	Tm ( $\mu\text{g}$ )	-	-	-	-	-	-

		Chapitre 3				
Groupe		1	2	3	4	5
		(a, b, c, d, e, f)	(a, b, c, d, e, f)	(a, b, c, d, e, f)	(a, b, c, d, e, f)	(a, b, c, d, e, f)
Nbre de souris		5	5	5	5	4
Age		6 sem	6 sem	6 sem	6 sem	6 sem
Produits d'injection		$\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$	$\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$	Lt	$\text{Dopa-PIMA-PEG-Lt}$	-
Dose	Fer ( $\mu\text{g}$ )	44	182	-	-	-
	Gd ( $\mu\text{g}$ )	1,14	5,34	1,52	0,5	-
	Tm ( $\mu\text{g}$ )	1,33	6,37	1,82	0,68	-

Figure 2.1 : Conditions d'injection pour l'expérience pilote *in vivo* présentée dans le chapitre 2 et pour l'expérience *in vivo* sur le long terme présentée dans le chapitre 3.

L'étude pilote (chapitre 2) a été réalisée sur une période de 24 heures. Les souris des groupes 1 et 2 ont été sacrifiées une heure après injection, et celles des groupes 3 et 4 à un jour après injection. Les groupes 5 et 6 représentent les souris contrôles et ont été sacrifiées en même temps.

L'étude sur le long terme (chapitre 3) a été réalisée sur une période de six mois. Les souris des groupes 1 à 5 ont été sacrifiées 1h (groupes 1a à 5a), 1 jour (groupes 1b à 5b), 1 semaine (groupes 1c à 5c), un mois (groupes 1d à 5d), trois mois (groupes 1e à 5e) et six mois (groupes 1f à 5f) après injection.

Avant sacrifice, 200  $\mu$ L d'une solution de kétamine-xylazine sont administrés aux souris en intrapéritonéale ce qui permet une analgésie et sédation suffisantes pour des procédures chirurgicales. Les souris sont ensuite sacrifiées par ponction cardiaque, permettant de prélever le sang. Les organes foie, rate, reins et poumons sont ensuite prélevés.

Chaque organe prélevé est ensuite minutieusement pesé et divisé en plusieurs morceaux (Figure 2.2) afin de réaliser les analyses nécessaires présentées ci-dessous.

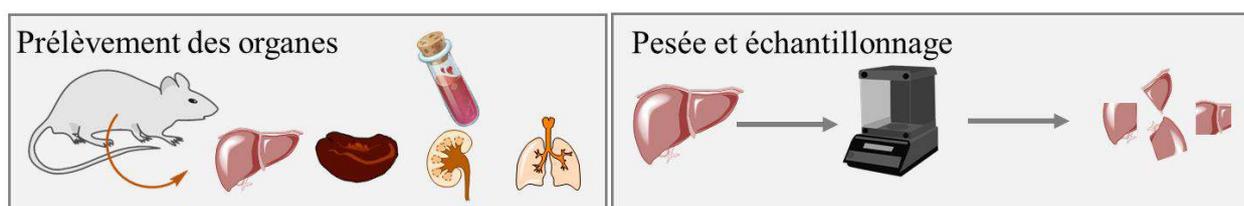


Figure 2.2 : Etapes de préparation des organes pour les analyses.

### 3. Analyse des organes

Nous présenterons le traitement des organes pour les trois campagnes d'expériences c'est-à-dire l'analyse des organes dans le cadre des matrices de validation, de l'étude *in vivo* pilote et de l'étude *in vivo* sur le long terme. Les analyses effectuées pour chaque organe en fonction de la campagne d'expérience sont données dans le Tableau 12.

Expérience \ Analyses	Matrices de validation	Etude pilote	Etude sur le long terme
ICP-MS			
RFM			
MET			
Histologie			

Tableau 12: Récapitulatif des analyses effectuées sur les organes en fonction de la campagne d'expérience. En vert les analyses effectuées sur les organes et en rouge celles qui n'ont pas été réalisées.

#### 3.1 Analyses HR-ICP-MS

##### 3.1.1 Préparation des échantillons

Après échantillonnage des organes, un morceau est prélevé pour les analyses HR-ICP-MS, pesé et conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les organes sont ensuite digérés dans des tubes Falcon fermés de 50 mL en présence de 3 mL d'acide nitrique à 69 % à  $80^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes dans un bain d'huile. Après digestion complète, les tubes Falcon sont ouverts et l'acide nitrique est évaporé à  $95^{\circ}\text{C}$  pendant trois heures. Après évaporation complète de l'acide nitrique, on obtient un résidu d'organe qui est redissous dans 143  $\mu\text{L}$  d'acide nitrique. Enfin 10 mL d'eau distillé sont ajoutés aux échantillons afin d'obtenir une solution à 1 % en masse d'acide nitrique. Ces solutions sont ensuite diluées afin d'obtenir des solutions de concentration totale en fer inférieure ou égale à 100 ppb. Les étapes de préparation des échantillons pour l'analyse ICP-MS sont présentées dans la Figure 3.1.

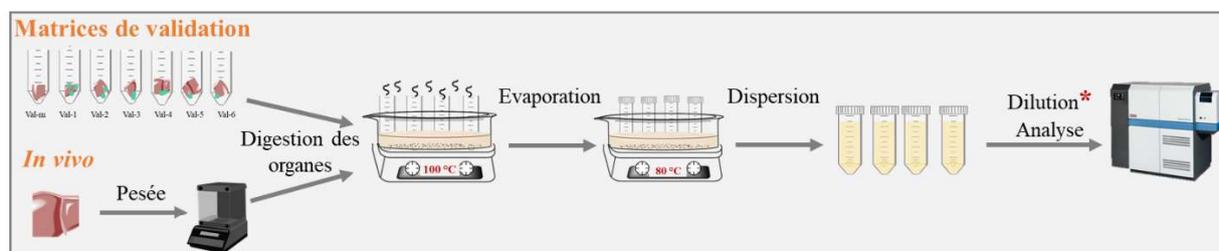


Figure 3.1 : Etapes de préparation des échantillons pour l'analyse HR-ICP-MS.

Avant l'analyse, chaque solution est diluée afin d'obtenir une concentration en fer total inférieure à 100 ppb. Le calcul de la concentration en fer dépend d'une part de la quantité de <sup>57</sup>NPOFs et d'autre part de la concentration endogène en fer dans l'organe considéré (Tableau 13).

	Age de la souris	Concentration fer endogène (ppm)
Foie	6 semaines	110 (± 14)
	6 mois	215 (± 49)
Rate	6 semaines	300 (± 48)
	6 mois	1400 (± 272)
Poumons	6 semaines	120 (± 20)
	6 mois	172 (± 10)
Reins	6 semaines	70 (± 24)
	6 mois	95 (± 12)
Sang	6 semaines	215 (± 22)
	6 mois	222 (± 27)

Tableau 13 : Tableau des concentrations en fer endogène dans les différents organes prélevés en fonction de l'âge de la souris.

*Exemple de calcul des facteurs de dilution :*

- On considère un foie d'une souris âgée de six semaines, prélevé lors des expériences *in vivo* pilote et sur le long terme. Supposons que le morceau de foie dédié aux analyses ICP-MS pèse 0,5 g. Alors la masse de fer endogène est égale à  $0,5 \text{ g} \times 110 \text{ ppm} (\mu\text{g/g}) = 55 \mu\text{g}$ . Après évaporation de l'acide nitrique, les résidus d'organes ont été dissous dans 143  $\mu\text{L}$  d'acide nitrique puis 10 mL d'eau distillée ont été ajoutés. Aussi la concentration en fer endogène de cette solution est de 5,4  $\mu\text{g/mL}$  soit 5400 ppb. Le facteur de dilution appliqué pour obtenir une solution à une concentration est égal à 54.
- On considère maintenant l'échantillon Val-1 pour un morceau de foie égal à 0,5 g. La concentration en fer exogène est égale à 338 ppm (Figure 1.2). La masse de fer exogène est donc égale à  $0,5 \text{ g} \times 338 \text{ ppm} (= \mu\text{g/g}) = 169 \mu\text{g}$ . En reprenant le calcul ci-dessus, la masse totale de fer (endogène + exogène) est égale à  $169 \mu\text{g} + 5,4 \text{ g}$  soit 174,4  $\mu\text{g}$ . Après digestion,

évaporation et redispersion, la concentration est de 17 440 ppb. Aussi le facteur de dilution est égal à 174,4.

Grâce à ces calculs, on observe que les facteurs de dilution à appliquer avant l'analyse des échantillons dépend de la concentration endogène des organes, de la masse d'organe prélevée pour l'analyse ICP-MS et de la quantité de <sup>57</sup>NPOFs contenue dans l'organe (qui n'est pas évidente à déterminer mis à part pour les matrices de validation).

Une fois les dilutions effectuées, les solutions sont analysées en ICP-MS.

### 3.1.2 Courbes d'étalonnage

Avant les analyses des échantillons, des courbes d'étalonnage sont réalisées à partir d'échantillons standards ayant une abondance isotopique naturelle pour des gammes de concentrations allant de 0,01 ppb à 100 ppb. Ces droites d'étalonnage représentent l'intensité d'un isotope du fer en fonction de sa concentration et permet de calculer la concentration en chaque isotope dans les échantillons analysés. Néanmoins, le <sup>57</sup>Fe ayant une abondance naturelle faible égale à 2,2 %, les gammes de concentrations accessibles par les courbes d'étalonnage de ces standards (allant jusqu'à 2,2 % x 100 ppb = 2,2 ppb) ne couvrent pas les concentrations testées pour les matrices de validation ou obtenue *in vivo*. Aussi des courbes d'étalonnage additionnelles ont été réalisées à partir de standards enrichis en <sup>57</sup>Fe pour une gamme de concentration allant jusqu'à 100 ppb. Le précurseur utilisé est enrichi à 95,57 % en <sup>57</sup>Fe et à 1,95 % en <sup>58</sup>Fe. On constate que l'abondance du <sup>58</sup>Fe pour ce standard est supérieure à l'abondance naturelle du <sup>58</sup>Fe égale à 0,28 %. Aussi les courbes d'étalonnage du <sup>58</sup>Fe seront également tracées à partir du standard enrichi en <sup>57</sup>Fe.

La régression linéaire des courbes d'étalonnage selon l'équation :  $I^{\text{Fe}} = a (C^{\text{Fe}})$  permettent de calculer la concentration en chaque isotope dans les différents échantillons. La concentration des <sup>57</sup>NPOFs est ensuite calculée à partir des équations présentées dans le chapitre 2.

L'ensemble des analyses des organes pour les trois campagnes d'expériences a nécessité 22 créneaux d'ICP-MS d'une durée de 24 heures. Aussi 22 courbes d'étalonnage pour les isotopes <sup>54</sup>Fe et <sup>56</sup>Fe ont été réalisées. La quantité de précurseur enrichi ne nous a pas permis d'effectuer des analyses systématiques de ces standards. Pour des analyses proches dans le temps, une courbe d'étalonnage pour le <sup>57</sup>Fe et pour le <sup>58</sup>Fe est utilisée pour déterminer la concentration en <sup>57</sup>Fe et en <sup>58</sup>Fe, respectivement. La [Figure 3.2](#) présente un exemple de courbes d'étalonnage obtenues pour les quatre isotopes du fer soit le <sup>54</sup>Fe, le <sup>56</sup>Fe, le <sup>57</sup>Fe et le <sup>58</sup>Fe.

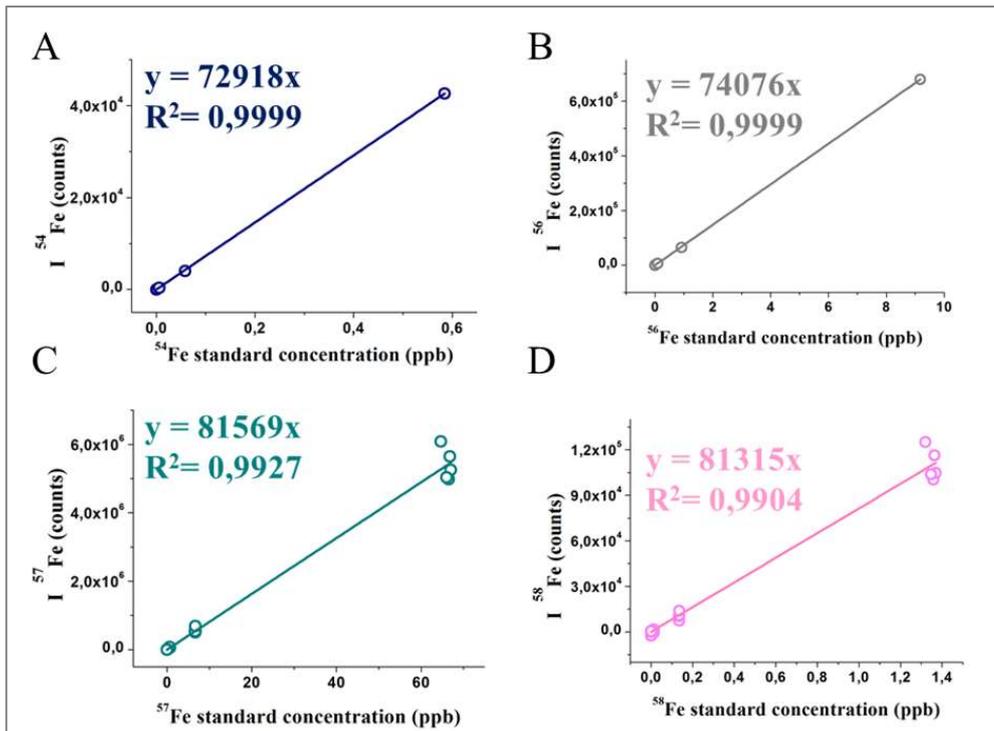


Figure 3.2 : Exemple de courbes d'étalonnage  $I^X \text{Fe} = a(C^X \text{Fe})$  pour le  $^{54}\text{Fe}$  (A), le  $^{56}\text{Fe}$  (B), le  $^{57}\text{Fe}$  (C) et le  $^{58}\text{Fe}$  (D). Les courbes des graphes A et B ont été réalisées à partir d'un standard ayant une abondance isotopique en fer naturelle et les courbes des graphes C et D à partir de standard enrichi en  $^{57}\text{Fe}$ .

### 3.2 Analyse RFM

On rappelle que les analyses RFM ont été effectuées pour les études in vivo pilote et sur le long terme (Tableau 12).

Les analyses IRM ont été réalisées sur un spectromètre E500 EPR (Electron Paramagnetic Resonance) opérant dans la gamme de fréquence correspondant à la bande X (9,5 GHz). La première dérivée de l'absorption  $dW(B)/dB$  est mesurée en fonction du champ B appliqué, compris entre 0 et 10 kGauss, avec une puissance micro-onde de 1 mW. L'aire sous la courbe, calculée par une double intégration du signal  $dW(B)/dB$  est directement proportionnelle à la quantité de  $^{57}\text{NPOFs}$  dans l'échantillon. Aussi avant les analyses des organes, une courbe d'étalonnage est réalisée sur la solution stock de  $^{57}\text{NPOFs}$  dont la concentration a été déterminée au préalable par ICP-MS.

#### 3.2.1 Courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage est réalisée pour les solution de  $^{57}\text{NPOFs}$  et  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  (dose faible et dose élevée) pour différentes concentrations (Tableau 14).

Gamme de concentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Expérience pilote	Etude sur le long terme	
	$^{57}\text{NPOFs}$	$\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$	
	0,072 - 0,72	low dose 0,052 - 0,52	High dose 0,182 - 1,82

Tableau 14 : Gamme de concentration utilisée pour réaliser les courbes d'étalonnage des  $^{57}\text{NPOFs}$  et  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  en RFM.

Un volume de 2  $\mu\text{L}$  des solutions est inséré dans des dans des capillaires Wiretrol II 1-5  $\mu\text{L}$  (VWR, France). Les capillaires sont ensuite placés dans des tubes en quartz pour l'analyse RFM. Les signaux RFM des différentes solutions sont représentés Figure 3.3 ainsi que leur courbe d'étalonnage.

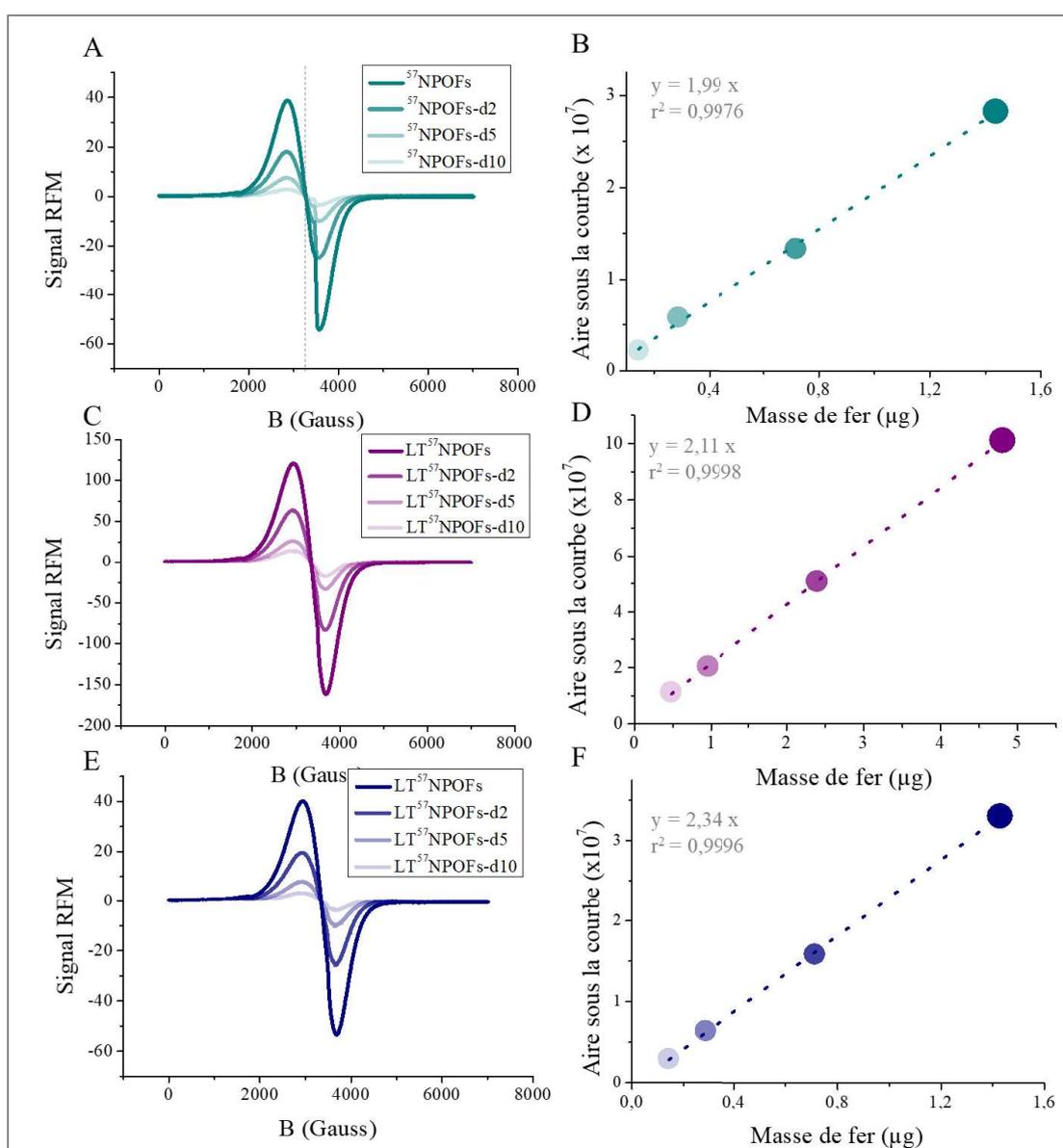


Figure 3.3 : Les signaux RFM sont représentés en fonction du champ magnétique appliqué pour les solutions de  $^{57}\text{NPOFs}$  (A) et  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  (high dose (C) et low dose (E)) à différentes concentrations. Les courbes d'étalonnage sont obtenues en représentant l'aire sous la courbe en fonction de la masse de fer dans

l'échantillon. Elles sont tracées pour les solutions de  $^{57}\text{NPOFs}$  (B) et  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  (high dose (D) et low dose (F))

### 3.2.2 Analyse des organes

Après prélèvement et échantillonnage des organes, le morceau prélevé pour les analyses RFM est pesé puis conservé à  $-80^\circ\text{C}$ . Les échantillons d'organes sont ensuite séchés à l'étuve à  $50^\circ\text{C}$  pendant une nuit. Cette étape permet d'éliminer l'eau contenue dans les échantillons et ainsi de les concentrer. Après séchage les échantillons d'organes sont pesés, afin d'obtenir le rapport des masses sèches/humides puis broyés à l'aide d'un mortier. Une partie du broyat d'organe est ensuite insérée dans des tubes en quartz. Ceux-ci sont ensuite analysés en RFM. Les étapes de préparation des échantillons pour l'analyse RFM sont présentées dans la [Figure 3.4](#).



Figure 3.4 : Etapes de préparation des échantillons d'organes pour l'analyse RFM.

### 3.3 Microscopie électrique en transmission

Contrairement aux solutions de nanoparticules, l'analyse en MET de coupes d'organes nécessite une fixation de ceux-ci puis plusieurs étapes de coloration et de découpe. Afin d'optimiser la fixation, l'échantillon d'organe prélevé ne doit pas excéder un volume de  $1\text{ mm}^3$ . Celui-ci est immédiatement plongé dans une solution à 2 % en glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate de sodium à 0,2 M pendant une nuit à  $+4^\circ\text{C}$ . Les échantillons sont ensuite rincés deux fois en tampon cacodylate de sodium 0,1 M. Enfin ils sont conservés dans un solution à 0,1 M en cacodylate de sodium et 0,2 M de sucrose.

Les échantillons sont traités dans un appareil à micro-onde (KOS-Milestone, Microm-Microtech, France), ce qui permet de réaliser l'ensemble de la préparation en 3h15. Les prélèvements sont contrastés à l'OTE à 0,5 % (Oolong Tea Extract – Delta microscopie – Labège, France) en tampon cacodylate de sodium à 0,1 M. Ils sont ensuite post-fixés au tétroxyde d'osmium 1 % contenant 1,5 % de ferrocyanate de potassium. Puis, ils sont déshydratés dans des bains de concentrations croissante d'éthanol (30 % à 100 %) et d'acétone. Avant l'inclusion en résine, ils sont substitués dans un mélange epon-acétone puis inclus en epon et polymérisés pendant 48 heures à  $56^\circ\text{C}$ .

Les coupes de  $0,5\ \mu\text{m}$  sont recueillies sur des lames de verres, colorées avec un mélange de bleu de méthylène et d'Azur. Ces coupes permettent de localiser les zones d'intérêt. Les coupes de 70 nm sont collectées sur des grilles de cuivre 200 mesh et contre-colorées au citrate de plomb avant l'examen au microscope électronique Hitachi HT7700 opérant à 80 kV (MIMA2-UMR1131 GABI – Plateau de

Microscopie Electronique 78352 Jouy en Josas, France). Les images ont été acquises avec une caméra CDD : AMT – Hitachi (Milexia – Verrière le Buisson – France).

Les étapes de coloration, d'inclusion en résine et de coupes ont été réalisées par Christine Longin de la plateforme MIMA2-UMR 1131 GABI.

### **3.4 Histologie**

Pour les analyses en histologie, l'échantillon d'organe ne doit pas excéder un volume de 4 mm<sup>3</sup>. Il est ensuite placé dans une solution de PFA (paraformaldéhyde) à 4 % pendant une nuit à 4°C. Le PFA permet de fixer les échantillons d'organes prélevés. Les échantillons sont ensuite rincés avec du PBS puis conservé à + 4°C dans du PBS.

Les échantillons sont ensuite mis en cassettes qui sont ensuite conservées dans de l'éthanol à 70° dans un récipient fermé.

Les cassettes sont ensuite envoyées à la plateforme HistIM de l'institut Cochin. Les échantillons y sont inclus en paraffine. Des coupes des échantillons inclus en paraffine sont réalisées au microtome puis elles sont colorées au Pearls, permettant de révéler le fer.

## 4. Suivi de la biodistribution en IRM

---

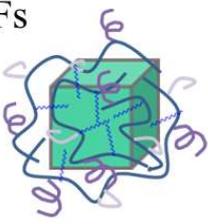
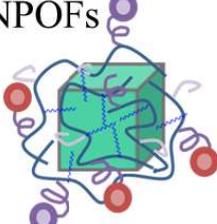
Les souris des études *in vivo* pilote et sur le long terme ont été analysées en IRM.

Pour l'étude pilote, une souris a été imagée par IRM 20 minutes avant injection puis 40 min, 73 min, 107 min et un jour après injection (chapitre 2).

Pour l'étude sur le long terme, trois souris contrôle, trois souris injectées avec la faible dose et trois souris injectées avec la dose élevée ont été imagées par IRM 1h, 1 jour, 1 semaine, 1 mois, 3 mois et 6 mois après injection (chapitre 3).

Le suivi IRM a été réalisé sur un appareil Biospec 47/40 USR (Bruker) possédant un aimant de champ magnétique de 4,7 T. L'intégralité de la souris a été imagée en utilisant une séquence en écho de gradient FSPGR pondérée T2\* (TR/TE = 300/5 ms, angle de bascule = 30°, dimension de l'image = 5\*4 cm, avec une résolution de 156 x 156 µm) sur 21 coupes coronales d'épaisseur de 1 mm positionnées sur le foie, la rate et les reins. Lors de l'analyse, les souris sont anesthésiées par voie gazeuse avec de l'isoflurane. Leur température est maintenue constante par un circuit d'eau chaude thermostatée et leur rythme cardiaque est également suivi par électrocardiogramme.

## 5. Fiche identité des $^{57}\text{NPOFs}$ et $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$

Fiche identité des NPOFs		$^{57}\text{NPOFs}$		$\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$	
					
<b>Marquage</b>					
Cœur inorganique	$^{57}\text{Fe}$		$^{57}\text{Fe}$		
Enrobage			Gd, Tm		
<b>Taille</b>					
Cœur inorganique (MET)	9,4 nm ( $\pm$ 2,6 nm)		8,7 nm ( $\pm$ 1,6 nm)		
Diamètre hydrodynamique (DLS)	10,6 nm ( $\pm$ 2,1 nm)		14,4 nm ( $\pm$ 4,1 nm)		
<b>Propriétés magnétiques</b>					
	$r_1$	$r_2$	$r_1$	$r_2$	
Relaxivité	0,86 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	81 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	0,84 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	137 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	
Température de blocage	84 K				
<b>Composition</b>					
Concentration $^{57}\text{Fe}$	12,8 mM		32,61 mM		
Nombre de Fe/NPOFs*	33		26		
Nombre de polymère/NPOFs*	5,7		5,7		
Nombre de dopamine/NPOFs*	111,5		111,5		
Densité surfacique de la dopamine (nombre/nm <sup>2</sup> )*	0,25		0,25		
Concentration en lanthanides			Gd	Tm	
			0,34 mM	0,38 mM	
Nombre de lanthanide/polymère*			0,095		
Nombre de lanthanide/fer			0,022		
Nombre de lanthanide/NPOFs*			0,6		
<b>Dose injectée</b>					
$^{57}\text{Fe}$	50 $\mu\text{g}$		LD	HD	
			44 $\mu\text{g}$	182 $\mu\text{g}$	
Gd			1,14 $\mu\text{g}$	5,34 $\mu\text{g}$	
Tm			1,33 $\mu\text{g}$	6,37 $\mu\text{g}$	
<b>Entités détectées - notation</b>					
Fer exogène total (HR-ICM-MS)	$^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$		$^{57}\text{Fe}_{\text{tot}}$		
Fer superparamagnétique (RFM)	$^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$		$^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$		
Fer non superparamagnétique ( $^{57}\text{Fe}_{\text{tot}} - ^{57}\text{Fe}_{\text{SP}}$ )	$^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$		$^{57}\text{Fe}_{\text{NSP}}$		
Enrobage (HR-ICP-MS)			PolCoating		



# Annexes

---



# 1. Student test

---

La limite de detection (LOD) est définie comme la concentration de reference la plus basse de <sup>57</sup>NPOFs a partir de laquelle la concentration en <sup>57</sup>NPOFs détectée peut être discernée du blanc avec un degré de confiance à 99 %. Pour estimer la LOD, un test de student (two sided t-test) ont été réalisé entre les moyennes des concentrations prédites des contrôles (Val-m) et la moyenne pour chaque échantillon Val-x. Les paramètres du t-test sont les suivants :

- $\bar{x}_m$ : Concentration moyenne prédite dans les échantillons contrôles Val-m.
- $s_m$ : Déviation standard calculée à partir des concentrations prédites pour les échantillons Val-m.
- $n_m$ : Nombre de degré de liberté pour les échantillons Val-m, égal au nombre d'échantillons Val-m.
- $\bar{x}_x$ : La moyenne des concentrations des échantillons Val-x n'a pu être calculée car chaque échantillon Val-x ne possède qu'un seul réplica. La concentration prédite moyenne a donc été estimée à partir de la valeur attendue selon le modèle de régression  $C_{pred}$  vs.  $C_{ref}$ .
- $s_x$ : Déviation standard des échantillons Val-x, estimé à partir du résidu moyen RMSE du modèle de régression  $C_{pred}$  vs.  $C_{ref}$ .
- $n_x$ : Nombre de degrés de liberté pour chaque échantillon Val-x, égal au nombre de degrés de liberté utilisé pour calculer le résidu moyen, soit le nombre de points constituant la droite  $C_{pred}$  vs.  $C_{ref}$  moins le nombre de degrés de liberté pour calculer le coefficient de regression.

Une estimation groupée de l'écart type a été calculée à partir de l'écart-type des deux échantillons :

$$s^2 = \frac{(n_x - 1)s_x^2 + (n_m - 1)s_m^2}{(n_x + n_m - 2)}$$

La statistique t est calculée à partir de:

$$t = \frac{\bar{x}_x - \bar{x}_m}{s \sqrt{\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_m}}}$$

Ce calcul a été effectué avec une approximation où la valeur moyenne de  $\bar{x}_x$  est la valeur du réplica. Les valeurs de t pour les différentes matrices sont données dans la [Table 1](#).

	Val-1	Val-2	Val-3	Val-4	Val-5	Val-6	Critical t value
--	-------	-------	-------	-------	-------	-------	------------------

Liver Spleen		165	<b>15.75</b>	1.56	0.15	0.016	3.71
Lung Kidney	-	-	161	<b>16.01</b>	1.52	0.17	4.03
Blood	-	-	-	<b>9.07</b>	0.91	0.09	2.98

Table 1: Valeurs de t pour les échantillons Val-x pour le foie et la rate, les poumons et les reins et le sang.

Ces valeurs sont ensuite comparées à la table suivante (Table 2).

**t Table**

cum. prob	$t_{.50}$	$t_{.75}$	$t_{.80}$	$t_{.85}$	$t_{.90}$	$t_{.95}$	$t_{.975}$	$t_{.99}$	$t_{.995}$	$t_{.999}$	$t_{.9995}$
one-tail	<b>0.50</b>	<b>0.25</b>	<b>0.20</b>	<b>0.15</b>	<b>0.10</b>	<b>0.05</b>	<b>0.025</b>	<b>0.01</b>	<b>0.005</b>	<b>0.001</b>	<b>0.0005</b>
two-tails	<b>1.00</b>	<b>0.50</b>	<b>0.40</b>	<b>0.30</b>	<b>0.20</b>	<b>0.10</b>	<b>0.05</b>	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>	<b>0.002</b>	<b>0.001</b>
df											
1	0.000	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	318.31	636.62
2	0.000	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.327	31.599
3	0.000	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.215	12.924
4	0.000	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	0.000	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893	6.869
6	0.000	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	0.000	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	0.000	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	0.000	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	0.000	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	0.000	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	0.000	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	0.000	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	0.000	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	0.000	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	0.000	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	0.000	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	0.000	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	0.000	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	0.000	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21	0.000	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	0.000	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	0.000	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.768
24	0.000	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	0.000	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	0.000	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	0.000	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.690
28	0.000	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29	0.000	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.659
30	0.000	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40	0.000	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
60	0.000	0.679	0.848	1.045	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460
80	0.000	0.678	0.846	1.043	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195	3.416
100	0.000	0.677	0.845	1.042	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174	3.390
1000	0.000	0.675	0.842	1.037	1.282	1.646	1.962	2.330	2.581	3.098	3.300
<b>Z</b>	0.000	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090	3.291
	0%	50%	60%	70%	80%	90%	95%	98%	99%	99.8%	99.9%
	<b>Confidence Level</b>										

Table 2 : t Table, San Jose State University

## 2. Mesures isotopiques : détection du fer

- Interférences isobariques

Les interférences isobariques correspondent aux interférences entre les isotopes du fer et des isotopes stables d'autres éléments ayant des masses atomiques identiques. D'après l'extrait de la table recensant les différents nucléides stables ou radioactifs,<sup>31</sup> on observe que le  $^{56}\text{Fe}$  et le  $^{57}\text{Fe}$  ne sont pas interférés par d'autres isotopes stables. Cependant, le  $^{54}\text{Fe}$  est interféré par le  $^{54}\text{Cr}$  et le  $^{58}\text{Fe}$  par le  $^{58}\text{Ni}$ .

$^{57}\text{Zn}$	$^{58}\text{Zn}$	$^{59}\text{Zn}$	$^{60}\text{Zn}$	$^{61}\text{Zn}$	$^{62}\text{Zn}$	$^{63}\text{Zn}$	$^{64}\text{Zn}$
$^{56}\text{Cu}$	$^{57}\text{Cu}$	$^{58}\text{Cu}$	$^{59}\text{Cu}$	$^{60}\text{Cu}$	$^{61}\text{Cu}$	$^{62}\text{Cu}$	$^{63}\text{Cu}$
$^{55}\text{Ni}$	$^{56}\text{Ni}$	$^{57}\text{Ni}$	$^{58}\text{Ni}$	$^{59}\text{Ni}$	$^{60}\text{Ni}$	$^{61}\text{Ni}$	$^{62}\text{Ni}$
$^{54}\text{Co}$	$^{55}\text{Co}$	$^{56}\text{Co}$	$^{57}\text{Co}$	$^{58}\text{Co}$	$^{59}\text{Co}$	$^{60}\text{Co}$	$^{61}\text{Co}$
$^{53}\text{Fe}$	$^{54}\text{Fe}$	$^{55}\text{Fe}$	$^{56}\text{Fe}$	$^{57}\text{Fe}$	$^{58}\text{Fe}$	$^{59}\text{Fe}$	$^{60}\text{Fe}$
$^{52}\text{Mn}$	$^{53}\text{Mn}$	$^{54}\text{Mn}$	$^{55}\text{Mn}$	$^{56}\text{Mn}$	$^{57}\text{Mn}$	$^{58}\text{Mn}$	$^{59}\text{Mn}$
$^{51}\text{Cr}$	$^{52}\text{Cr}$	$^{53}\text{Cr}$	$^{54}\text{Cr}$	$^{55}\text{Cr}$	$^{56}\text{Cr}$	$^{57}\text{Cr}$	$^{58}\text{Cr}$
$^{50}\text{V}$	$^{51}\text{V}$	$^{52}\text{V}$	$^{53}\text{V}$	$^{54}\text{V}$	$^{55}\text{V}$	$^{56}\text{V}$	$^{57}\text{V}$
$^{49}\text{Ti}$	$^{50}\text{Ti}$	$^{51}\text{Ti}$	$^{52}\text{Ti}$	$^{53}\text{Ti}$	$^{54}\text{Ti}$	$^{55}\text{Ti}$	$^{56}\text{Ti}$
$^{48}\text{Sc}$	$^{49}\text{Sc}$	$^{50}\text{Sc}$	$^{51}\text{Sc}$	$^{52}\text{Sc}$	$^{53}\text{Sc}$	$^{54}\text{Sc}$	$^{55}\text{Sc}$

Figure 2.1 : Extrait de la table des nucléides. En noir, les isotopes stables et en bleu et vert les isotopes radioactifs. Les isotopes  $^{54}\text{Cr}$  et  $^{58}\text{Ni}$  (encadrés rouge) interfèrent avec les isotopes du fer  $^{54}\text{Fe}$  et  $^{58}\text{Fe}$ , respectivement.

A quelques exceptions près, il est impossible de résoudre physiquement les interférences isobariques à l'aide d'un HR-ICP-MS. Pour quantifier la contribution de l'interférence isobarique, on mesure l'isotope le plus abondant de l'élément interférent puis, e, supposant que cet élément a bien la composition isotopique naturelle, on recalcule la concentration de son isotope minoritaire qui cause une interférence isobarique. On peut ainsi soustraire cette contribution interférente du signal brut pour estimer la contribution au signal propre de l'isotope d'intérêt. A noter que l'abondance d'un isotope peut être considéré comme le rapport de l'intensité mesurée par HR-ICP-MS d'un isotope sur la somme des intensités des isotopes de l'élément,<sup>32</sup> telle que :

$$A^i(E) = \frac{\text{Intensité}^i(E)}{\sum_j \text{Intensité}^j(E)} = I_{\text{tot}} \quad (\text{Eq.2.1})$$

Prenons l'exemple de l'interférence entre le  $^{54}\text{Fe}$  et le  $^{54}\text{Cr}$ . Le chrome possède quatre isotopes stables,  $^{50}\text{Cr}$ ,  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{53}\text{Cr}$  et  $^{54}\text{Cr}$  d'abondances naturelles respectives égales à 4,345%, 83,789%, 9,501% et 2,365%. D'après l'équation ci-dessus, on peut exprimer les abondances naturelles de chaque isotope en fonction des intensités mesurées en HR-ICP-MS telle que :

$$A^{50}\text{Cr} = \frac{I^{50}\text{Cr}}{I^{\text{Cr}}} ; A^{52}\text{Cr} = \frac{I^{52}\text{Cr}}{I^{\text{Cr}}} ; A^{53}\text{Cr} = \frac{I^{53}\text{Cr}}{I^{\text{Cr}}} ; A^{54}\text{Cr} = \frac{I^{54}\text{Cr}}{I^{\text{Cr}}} \quad (\text{Eq.2.2})$$

En exprimant l'intensité totale en fonction de l'intensité et de l'abondance de chaque isotope, il vient :

$$I^{\text{Cr}} = \frac{I^{50}\text{Cr}}{A^{50}\text{Cr}} = \frac{I^{52}\text{Cr}}{A^{52}\text{Cr}} = \frac{I^{53}\text{Cr}}{A^{53}\text{Cr}} = \frac{I^{54}\text{Cr}}{A^{54}\text{Cr}} \quad (\text{Eq.2.3})$$

On peut exprimer l'intensité de l'isotope  $^{54}\text{Cr}$  en fonction des intensités et des abondances des autres isotopes. Afin d'obtenir le meilleur signal en HR-ICP-MS, l'intensité du  $^{52}\text{Cr}$  (isotope du chrome non interféré le plus abondant) est mesurée pour quantifier la contribution du  $^{54}\text{Cr}$ . On exprime l'intensité du  $^{54}\text{Cr}$  telle que :

$$I^{54}\text{Cr} = I^{52}\text{Cr} \times \frac{A^{54}\text{Cr}}{A^{52}\text{Cr}} \quad (\text{Eq.2.4})$$

Le même raisonnement est appliqué pour les interférences entre le  $^{58}\text{Fe}$  et le  $^{58}\text{Ni}$ . Le Nickel possède cinq isotopes stables,  $^{58}\text{Ni}$ ,  $^{60}\text{Ni}$ ,  $^{61}\text{Ni}$ ,  $^{62}\text{Ni}$  et  $^{64}\text{Ni}$  d'abondance naturelle égale à 68,077%, 26,223%, 1,140%, 3,625% et 0,926% respectivement. L'isotope le plus abondant, après le  $^{58}\text{Ni}$  qui est l'isotope interférent, est le  $^{60}\text{Ni}$ . On peut ainsi exprimer l'intensité du  $^{58}\text{Ni}$  telle que :

$$I^{58}\text{Ni} = I^{60}\text{Ni} \times \frac{A^{58}\text{Ni}}{A^{60}\text{Ni}} \quad (\text{Eq.2.5})$$

En mesurant les intensités des isotopes  $^{52}\text{Cr}$  et  $^{60}\text{Ni}$ , il est possible de distinguer les contributions du  $^{54}\text{Fe}$  et  $^{54}\text{Cr}$  et celles du  $^{58}\text{Fe}$  et du  $^{58}\text{Ni}$  dans les signaux HR-ICP-MS mesurés pour les masses atomiques 54 et 58 respectivement.

- Interférences Polyatomiques

Les interférences polyatomiques sont dues à la formation d'ions polyatomiques de masses atomiques proches de celle des ions d'intérêt et sont généralement solvables par HR-ICP-MS en choisissant la résolution adaptée. Pour les isotopes du fer, du chrome  $^{52}\text{Cr}$  ainsi que du nickel  $^{60}\text{Ni}$ , les interférences polyatomiques sont référencées dans le Tableau 15<sup>33</sup>

<sup>54</sup> Fe	<sup>56</sup> Fe	<sup>57</sup> Fe	<sup>58</sup> Fe	<sup>60</sup> Ni	<sup>52</sup> Cr
<sup>37</sup> Cl <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	<sup>40</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	<sup>40</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	<sup>40</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>+</sup>	<sup>44</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	<sup>35</sup> Cl <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>
<sup>40</sup> Ar <sup>14</sup> N	<sup>40</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	<sup>40</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	<sup>40</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	<sup>23</sup> Na <sup>37</sup> Cl <sup>+</sup>	<sup>40</sup> Ar <sup>12</sup> C <sup>+</sup>
<sup>38</sup> Ar <sup>15</sup> N <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	<sup>40</sup> Ar <sup>15</sup> N <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	<sup>40</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>+</sup>		<sup>43</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	<sup>36</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>+</sup>
<sup>36</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>+</sup>	<sup>38</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>+</sup>	<sup>38</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>			<sup>37</sup> Cl <sup>15</sup> N <sup>+</sup>
<sup>38</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	<sup>38</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	<sup>38</sup> Ar <sup>19</sup> F <sup>+</sup>			<sup>34</sup> S <sup>18</sup> O <sup>+</sup>
<sup>36</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	<sup>37</sup> Cl <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>				<sup>36</sup> S <sup>16</sup> O <sup>+</sup>
<sup>36</sup> S <sup>18</sup> O <sup>+</sup>					<sup>38</sup> Ar <sup>14</sup> N <sup>+</sup>
<sup>35</sup> Cl <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>					<sup>36</sup> Ar <sup>15</sup> N <sup>1</sup> H <sup>+</sup>
<sup>37</sup> Cl <sup>17</sup> O <sup>+</sup>					<sup>35</sup> Cl <sup>17</sup> O <sup>+</sup>

Tableau 15 : Interférences polyatomiques pour les isotopes du fer ainsi que pour l'isotope du <sup>52</sup>Cr et du <sup>60</sup>Ni.

- Résolution

Le choix de la résolution est déterminé par calcul des rapports  $m/\Delta m$  pour chaque type d'interférence. Les rapports  $m/\Delta m$  ont été calculés pour chaque isotope en fonction des possibles interférences<sup>33</sup> et sont recensés dans le Tableau 16.

	<sup>54</sup> Fe	$m/\Delta m$	<sup>56</sup> Fe	$m/\Delta m$	<sup>57</sup> Fe	$m/\Delta m$	<sup>58</sup> Fe	$m/\Delta m$	<sup>60</sup> Ni	$m/\Delta m$	<sup>52</sup> Cr	$m/\Delta m$
Interférences polyatomiques	<sup>37</sup> Cl <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	1860	<sup>40</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	2497	<sup>40</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	1917	<sup>40</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>+</sup>	2047	<sup>44</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	3058	<sup>35</sup> Cl <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	1670
	<sup>40</sup> Ar <sup>14</sup> N	2083	<sup>40</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	2475	<sup>40</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	1904	<sup>40</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	1609	<sup>23</sup> Na <sup>37</sup> Cl <sup>+</sup>	2407	<sup>40</sup> Ar <sup>12</sup> C <sup>+</sup>	2372
	<sup>38</sup> Ar <sup>15</sup> N <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	1740	<sup>40</sup> Ar <sup>15</sup> N <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	1580	<sup>40</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>+</sup>	2181			<sup>43</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	1952	<sup>36</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	2372
	<sup>36</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>+</sup>	1990	<sup>38</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>+</sup>	2072	<sup>38</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	1660					<sup>37</sup> Cl <sup>15</sup> N <sup>+</sup>	2037
	<sup>38</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	2997	<sup>38</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	1612	<sup>38</sup> Ar <sup>19</sup> F <sup>+</sup>	2215					<sup>34</sup> S <sup>18</sup> O <sup>+</sup>	1953
	<sup>36</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	1550	<sup>37</sup> Cl <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	1472							<sup>36</sup> S <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	2416
	<sup>36</sup> S <sup>18</sup> O <sup>+</sup>	2020									<sup>38</sup> Ar <sup>14</sup> N <sup>+</sup>	2053
	<sup>35</sup> Cl <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	1486									<sup>36</sup> Ar <sup>15</sup> N <sup>1</sup> H <sup>+</sup>	1488
	<sup>37</sup> Cl <sup>17</sup> O <sup>+</sup>	2124									<sup>35</sup> Cl <sup>17</sup> O <sup>+</sup>	1889
	Interférences isobariques	<sup>54</sup> Cr	<b>77057</b>					<sup>58</sup> Ni	<b>28967</b>			

Tableau 16 : Calcul du rapport  $m/\Delta m$  pour chaque isotope en fonction des possibles interférences

On observe que les valeurs des rapports  $m/\Delta m$  sont comprises entre 1400 et 3100 pour l'ensemble des interférences polyatomiques. Ainsi la moyenne résolution ( $m/\Delta m = 4000$ ) permettra de s'affranchir de ces interférences lors de l'analyse de l'échantillon. Les rapports  $m/\Delta m$  correspondant aux interférences isobariques étant supérieurs à 25 000, la haute résolution ( $m/\Delta m = 10\ 000$ ) ne permettra pas de séparer ces ions lors de l'analyse. Il est donc impératif de mesurer les intensités des isotopes <sup>52</sup>Cr et <sup>60</sup>Ni afin de soustraire la contribution du <sup>54</sup>Cr et <sup>58</sup>Ni du signal correspondant à ces masses atomiques.

- Standard interne

L'analyse de chaque échantillon dure entre dix et vingt minutes, ainsi à grand nombre d'échantillon, la sensibilité de l'appareil peut être modifiée. L'ajout d'un standard interne à chaque échantillon permet de prendre en compte les potentielles fluctuations du signal et permet également de corriger les potentiels effets de matrice. Le standard interne ajouté est un isotope de l'indium, le <sup>115</sup>In.

- Bilan des isotopes mesurés

L'analyse de NPOFs en matrice biologique nécessite la mesure de 7 isotopes listés dans le Tableau 17. Tous les isotopes sont mesurés en moyenne résolution afin de résoudre les interférences polyatomiques.

Isotope du fer	<sup>54</sup> Fe	<sup>56</sup> Fe	<sup>57</sup> Fe	<sup>58</sup> Fe
Interférences isobariques	<sup>52</sup> Cr			<sup>60</sup> Ni
Standard interne	<sup>115</sup> In			

Tableau 17 : Isotopes mesurés pour chaque solution. Les isotopes du fer sont mesurés pour détecter les NPOFs dans une matrice biologique complexe, les isotopes du chrome et du nickel pour corriger les interférences isobariques et celui de l'indium pour prendre en compte les fluctuations du signal dues à la matrice.

### 2.1.1.1 Calcul de l'intensité corrigée

Pour chaque analyse HR-ICP-MS, on distingue les solutions à analyser des blancs. L'analyse des blancs permet d'une part de corriger le bruit de fond et de s'affranchir des éventuelles contaminations liées à l'appareil et d'autre part de s'assurer qu'il n'y a pas de contaminations entre les échantillons à analyser. Elle est effectuée en début d'analyse (t=0) et répétée tous les dix échantillons. La mesure de l'intensité du blanc en début d'analyse permet de définir une valeur de référence pour le standard interne (<sup>115</sup>In (t=0)). Les blancs réalisés avant chaque gamme d'échantillons analysés permettent de corriger le bruit de fond des différents isotopes (Figure 2.2).

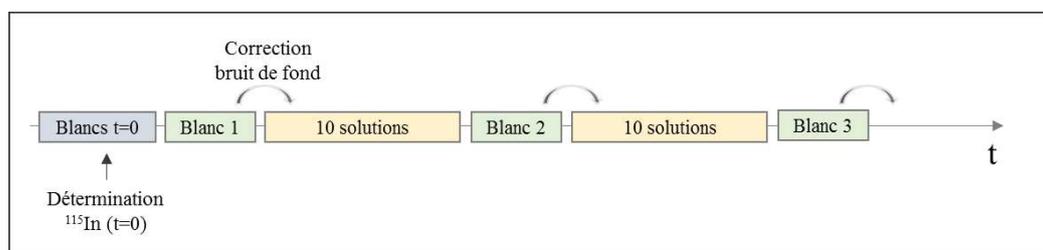


Figure 2.2 : Etapes de l'analyse HR-ICP-MS constituées de la mesure de la composition isotopique de solutions et de blancs.

Afin de calculer la contribution de chaque isotope du fer, il est nécessaire de normaliser le signal brut à l'aide de l'étalon interne, puis de soustraire le bruit de fond ainsi que le signal provenant des interférences isobariques. Prenons l'exemple du <sup>54</sup>Fe, l'intensité corrigée est calculée comme suit :

$$I_{\text{corr}}^{54} = I_{\text{Ech}}^{54} \times \alpha - I_{\text{Blanc}}^{54} \times \alpha_{\text{blanc}} \quad (\text{Eq.2.6})$$

Avec  $I_{Ech}^{54}$  l'intensité brute mesurée pour la masse atomique 54,  $I_{Blanc}^{54}$  l'intensité du blanc mesurée pour la masse 54,  $\alpha$  le facteur de normalisation de l'étalon interne à l'instant t pour l'échantillon, et  $\alpha_{blanc}$  le facteur de normalisation de l'étalon interne à l'instant t pour le blanc tels que :

$$\alpha = \frac{I^{115}In(t=0)}{I_{Ech}^{115}In(t)}, \quad \alpha_{blanc} = \frac{I^{115}In(t=0)}{I_{Blanc}^{115}In(t)} \quad (Eq.2.7)$$

A la masse atomique 54, l'intensité corrigée correspond à la somme des intensités corrigées du chrome et du fer, soit :

$$I_{corr}^{54} = I_{corr}^{54}Fe + I_{corr}^{54}Cr \quad (Eq.2.8)$$

La contribution du chrome est calculée d'après l'équation (2.4) en mesurant l'intensité de l'isotope  $^{52}Cr$  normalisée par les abondances naturelles ( $A_{nat}$ ) du  $^{52}Cr$  et  $^{54}Cr$  telle que :

$$I_{Corr}^{54}Cr = I_{Corr}^{52}Cr \times \frac{A_{nat}^{54}Cr}{A_{nat}^{52}Cr} \quad (Eq.2.9)$$

D'après l'équation (2.6), l'intensité corrigée du  $^{52}Cr$  s'exprime telle que :

$$I_{corr}^{52}Cr = I_{Ech}^{52}Cr \times \alpha - I_{Blanc}^{52}Cr \times \alpha_{blanc} \quad (Eq.2.10)$$

En remplaçant l'expression de l'intensité corrigée du  $^{52}Cr$  dans l'équation (2.9), l'intensité du  $^{54}Cr$  est donnée par :

$$I_{Corr}^{54}Cr = (I_{Ech}^{52}Cr \times \alpha - I_{Blanc}^{52}Cr \times \alpha_{blanc}) \times \frac{A_{nat}^{54}Cr}{A_{nat}^{52}Cr} \quad (Eq.2.11)$$

En combinant les équations (2.6), (2.8) et (2.11), l'intensité corrigée du  $^{54}Fe$  s'exprime telle que :

$$I_{corr}^{54}Fe = I_{Ech}^{54} \times \alpha - I_{Blanc}^{54} \times \alpha_{blanc} - (I_{Ech}^{52}Cr \times \alpha - I_{Blanc}^{52}Cr \times \alpha_{blanc}) \times \frac{A_{nat}^{54}Cr}{A_{nat}^{52}Cr} \quad (Eq.2.12)$$

Par un raisonnement identique, l'intensité corrigée de l'isotope  $^{58}Fe$  est calculée en prenant en compte l'interférence de l'isotope 58 du nickel selon l'équation (2.13).

$$I_{corr}^{58}Fe = I_{Ech}^{58} \times \alpha - I_{Blanc}^{58} \times \alpha_{blanc} - (I_{Ech}^{60}Ni \times \alpha - I_{Blanc}^{60}Ni \times \alpha_{blanc}) \times \frac{A_{nat}^{58}Ni}{A_{nat}^{60}Ni} \quad (Eq.2.13)$$

Les isotopes  $^{56}Fe$  et  $^{57}Fe$  ne sont pas interférés par d'autres éléments, ainsi leurs intensités corrigées sont calculées comme suit :

$$I_{\text{corr}}^{56}\text{Fe} = I_{\text{Ech}}^{56} \times \alpha - I_{\text{Blanc}}^{56} \times \alpha_{\text{blanc}} \quad (\text{Eq.2.14})$$

$$I_{\text{corr}}^{57}\text{Fe} = I_{\text{Ech}}^{57} \times \alpha - I_{\text{Blanc}}^{57} \times \alpha_{\text{blanc}} \quad (\text{Eq.2.15})$$

### 2.1.1.2 Traitement du signal

A l'issue des calculs présentés dans la section précédente, la contribution de chaque isotope est obtenue sous la forme d'une intensité qu'il faut convertir en concentration. A cet égard, des solutions étalons sont analysées afin de tracer une courbe d'étalonnage pour chaque isotope du fer. Grâce à ces solutions de concentrations connues, il est possible de tracer la droite représentant l'intensité corrigée de chaque isotope du fer en fonction de la concentration de l'isotope considéré pour chaque solution étalon, et ainsi de déterminer les concentrations inconnues en chaque isotope dans l'échantillon considéré (Figure 2.3). Les courbes d'étalonnage sont réalisées au début de chaque analyse.

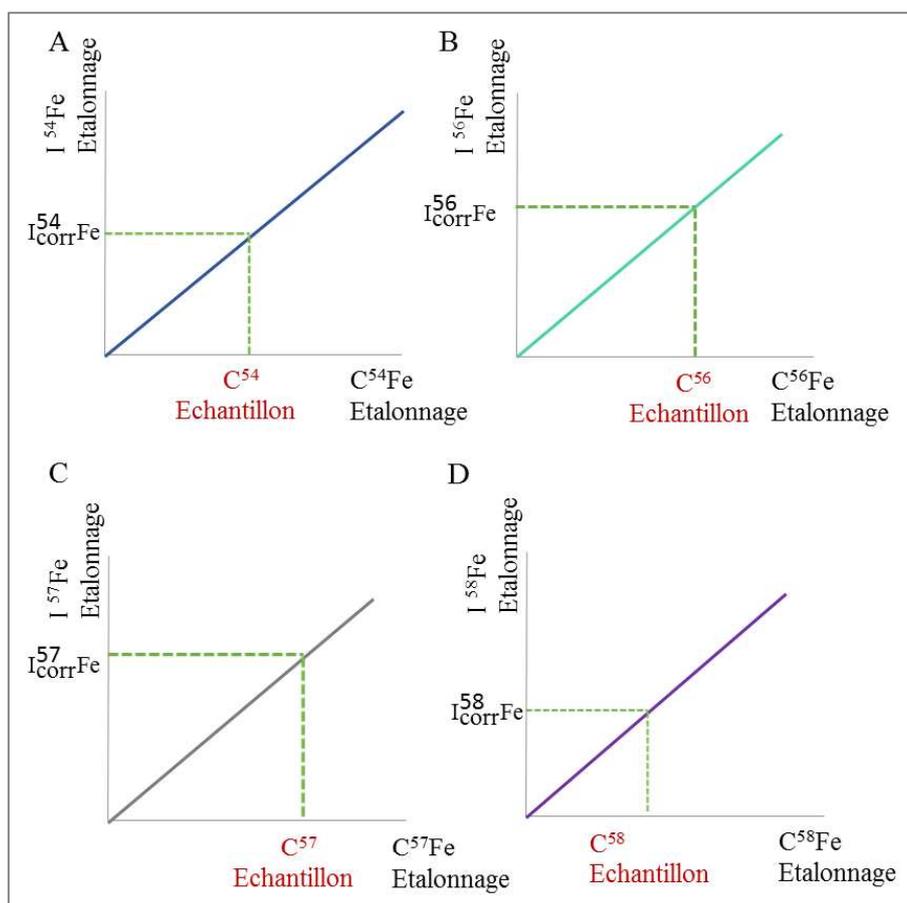


Figure 2.3 : Courbe de calibration représentant l'intensité d'un isotope en fonction de la concentration de cet isotope pour les solutions étalons. Les courbes de calibration sont tracées pour les isotopes  $^{54}\text{Fe}$  (A),  $^{56}\text{Fe}$  (B),  $^{57}\text{Fe}$  (C) et  $^{58}\text{Fe}$  (D).

### 3. Analyses histologiques

#### 3.1 Etude pilote (chapitre 2)

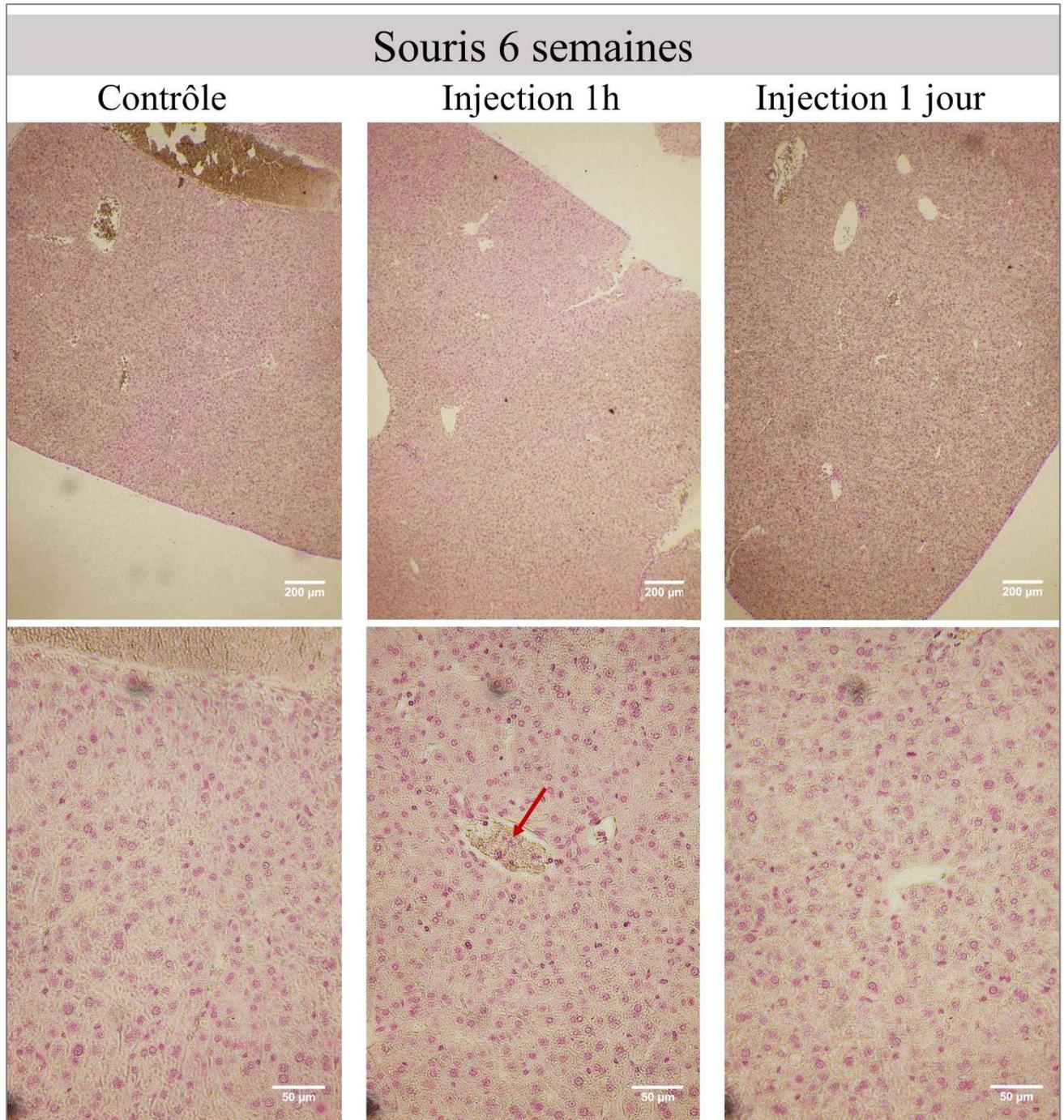


Figure 3.1 : Clichés de coupes de foie des souris âgées de six semaines avant, une heure et un jour après injection d'une dose de 50 µg en fer après coloration PEARLS. Clichés pris avec un grandissement 4x (haut) et 20 x (bas). Les vaisseaux sanguins sont indiqués par une flèche rouge.

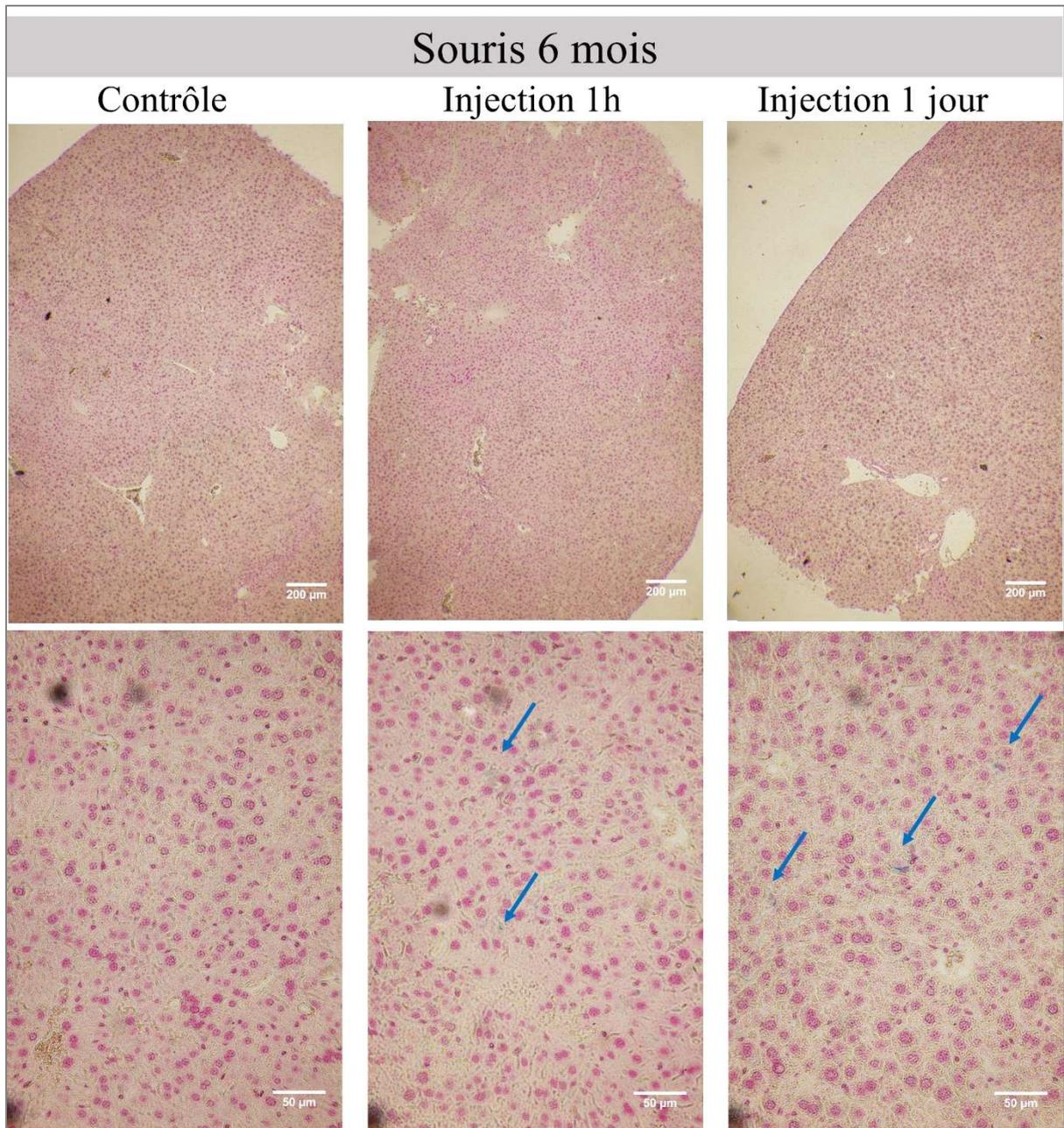


Figure 3.2 : Clichés de coupes de foie des souris âgées de six mois avant, une heure et un jour après injection d'une dose de 50 µg en fer après coloration PEARLS. Clichés pris avec un grandissement 4x (haut) et 20 x (bas). Le fer est indiqué par une flèche bleue.

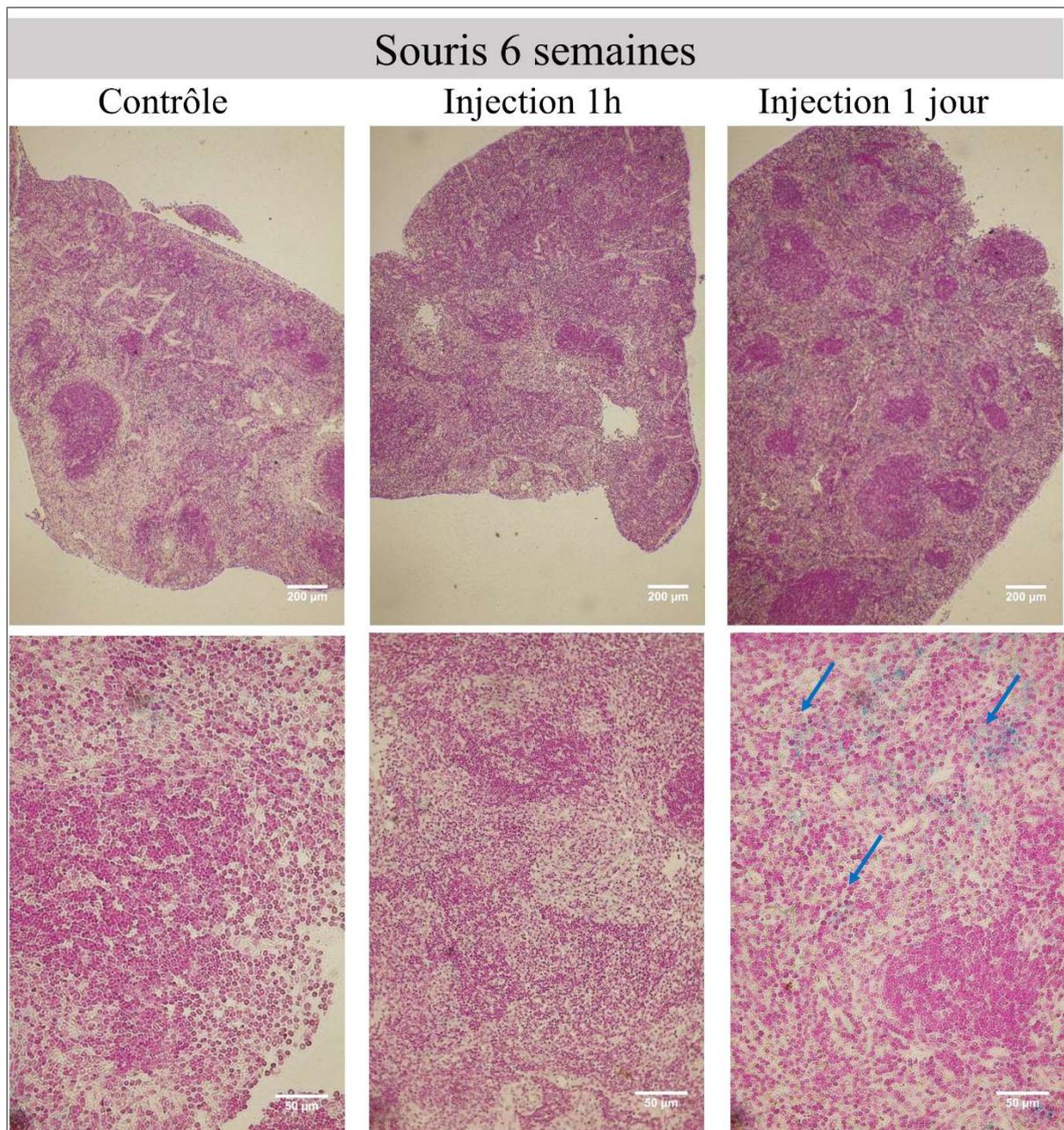


Figure 3.3 : Clichés de coupes de rate des souris âgées de six semaines avant, une heure et un jour après injection d'une dose de 50 µg en fer après coloration PEARLS. Clichés pris avec un grandissement 4x (haut) et 20 x (bas). Le fer est indiqué par une flèche bleue.

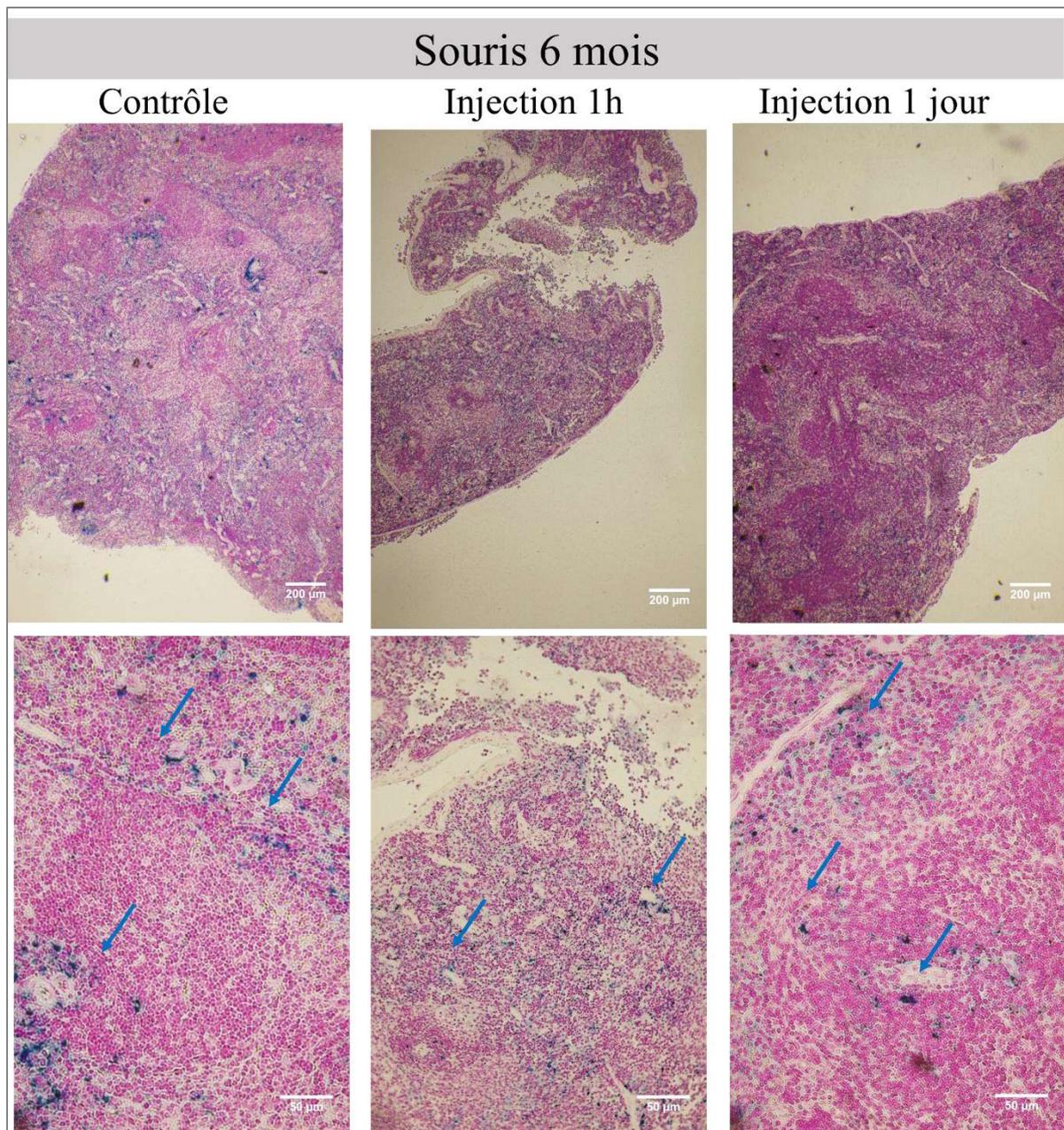


Figure 3.4 : Clichés de coupes de rate des souris âgées de six mois avant, une heure et un jour après injection d'une dose de 50 µg en fer après coloration PEARLS. Clichés pris avec un grandissement 4x (haut) et 20 x (bas). Le fer est indiqué par une flèche bleue.

### 3.2 Etude *in vivo* sur le long terme (chapitre 3)

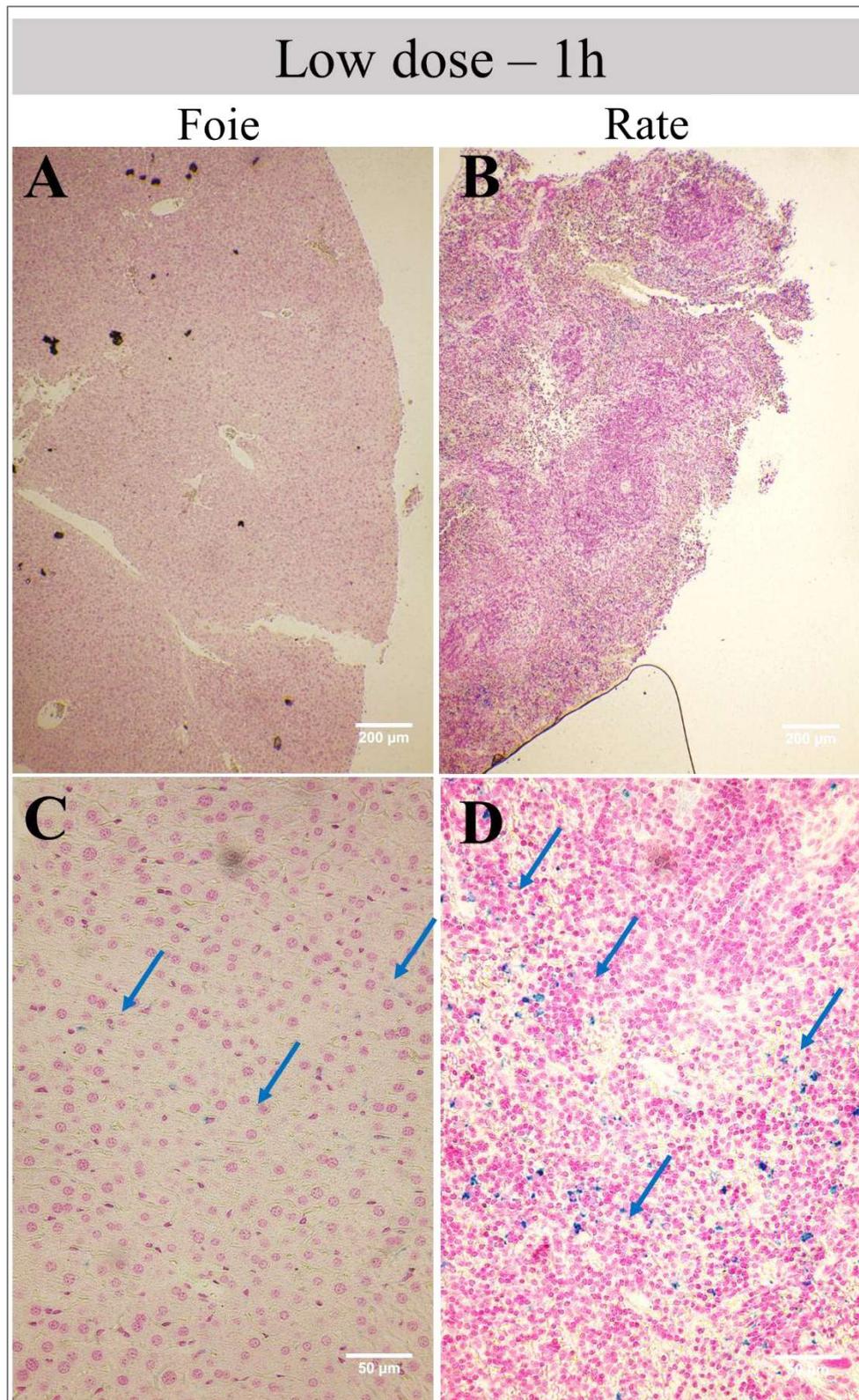


Figure 3.5 : Clichés de coupes de foie (A & C) et de rate (B & D) à une heure après injection de la dose faible après coloration PEARLS. Clichés pris avec un grandissement 4x (haut) et 20 x (bas). Le fer est indiqué par une flèche bleue.

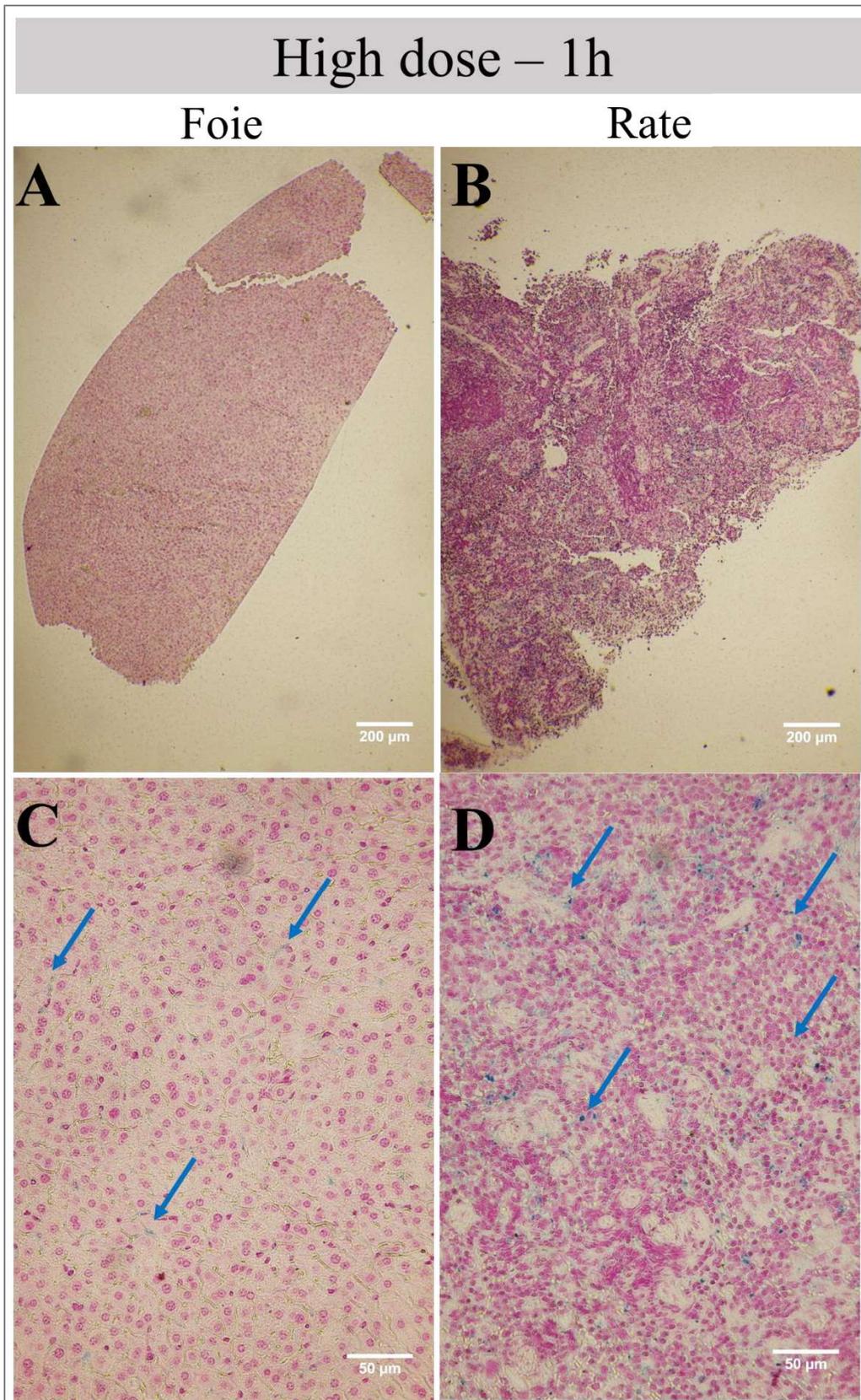
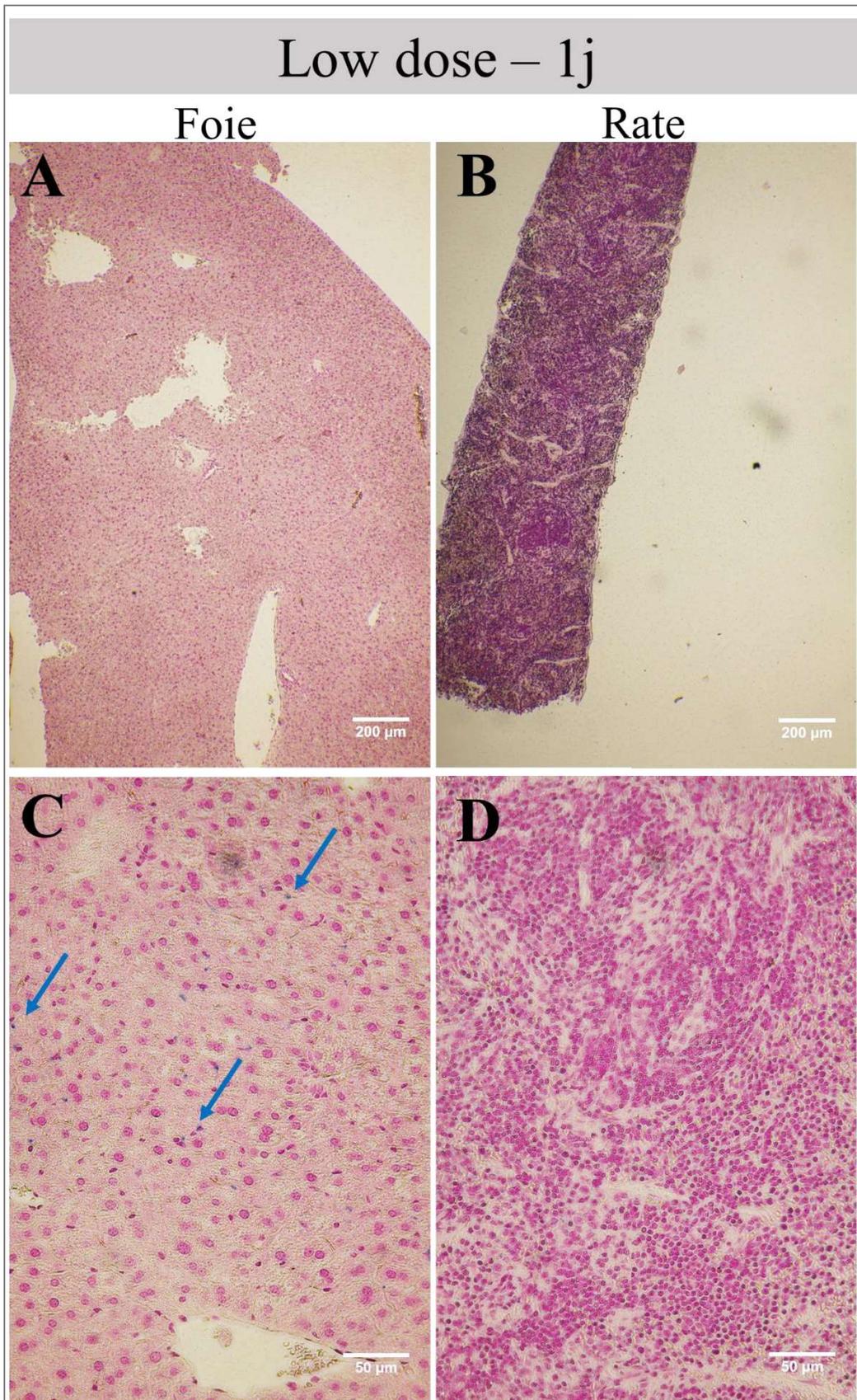
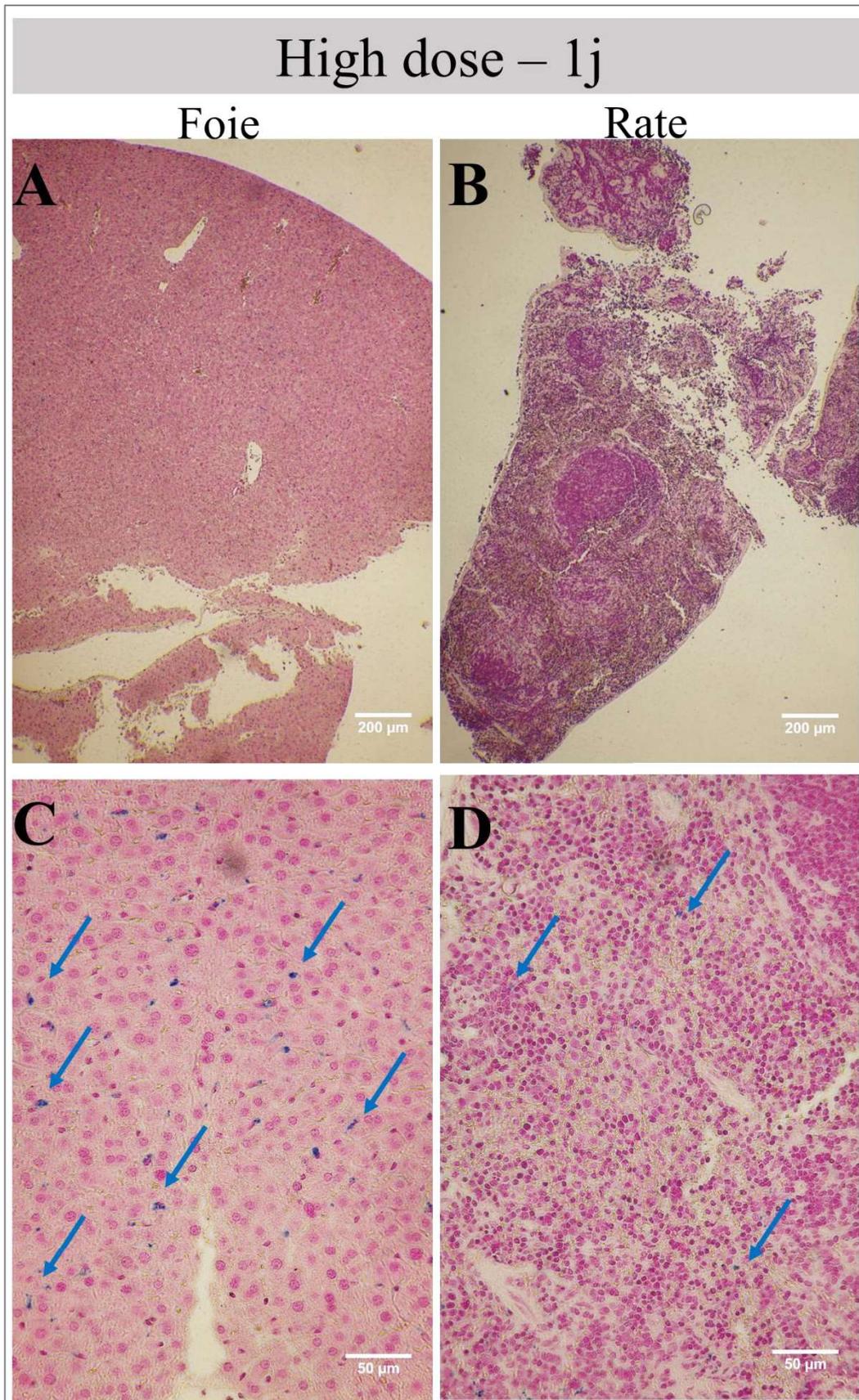


Figure 3.6 : Clichés de coupes de foie (A & C) et de rate (B & D) à une heure après injection de la dose élevée après coloration PEARLS. Clichés pris avec un grossissement 4x (haut) et 20 x (bas). Le fer est indiqué par une flèche bleue.



**Figure 3.7 :** Clichés de coupes de foie (A & C) et de rate (B & D) à un jour après injection de la dose faible après coloration PEARLS. Clichés pris avec un grandissement 4x (haut) et 20 x (bas). Le fer est indiqué par une flèche bleue.



**Figure 3.8** : Clichés de coupes de foie (A & C) et de rate (B & D) à un jour après injection de la dose élevée après coloration PEARLS. Clichés pris avec un grandissement 4x (haut) et 20 x (bas). Le fer est indiqué par une flèche bleue.

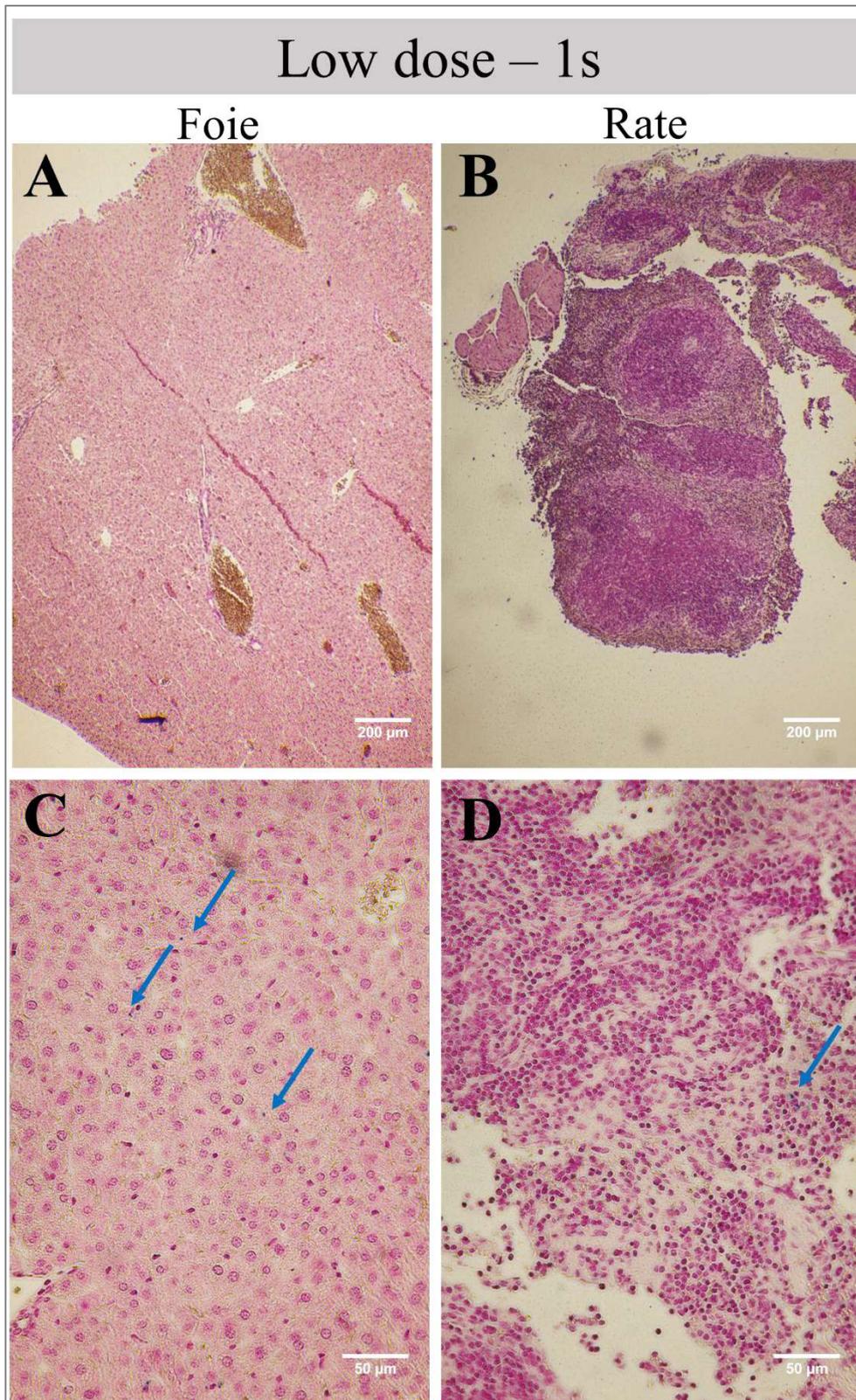


Figure 3.9 : Clichés de coupes de foie (A & C) et de rate (B & D) à une semaine après injection de la dose faible après coloration PEARLS. Clichés pris avec un grandissement 4x (haut) et 20 x (bas). Le fer est indiqué par une flèche bleue.

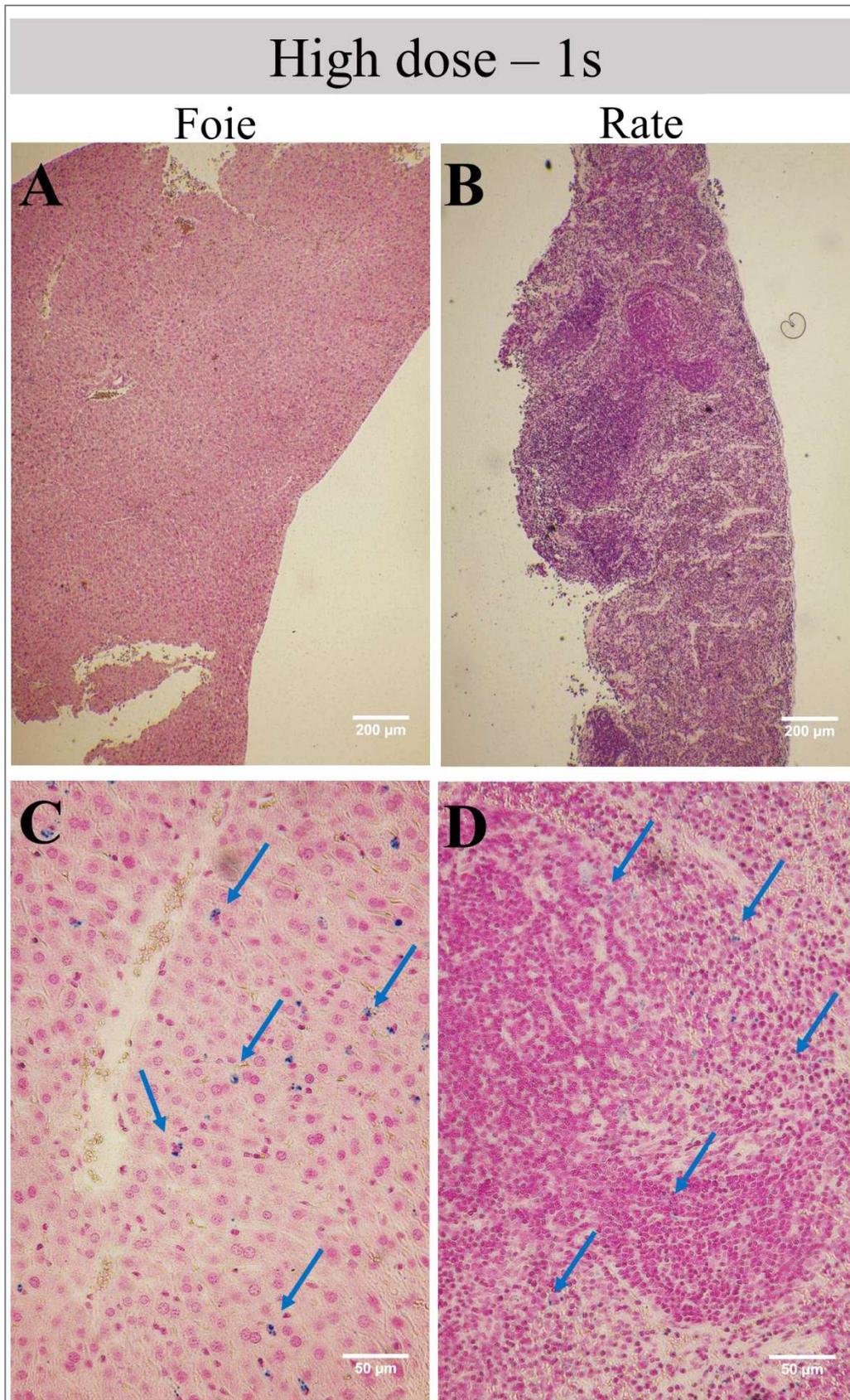


Figure 3.10 : Clichés de coupes de foie (A & C) et de rate (B & D) à une semaine après injection de la dose élevée après coloration PEARLS. Clichés pris avec un grossissement 4x (haut) et 20 x (bas). Le fer est indiqué par une flèche bleue.

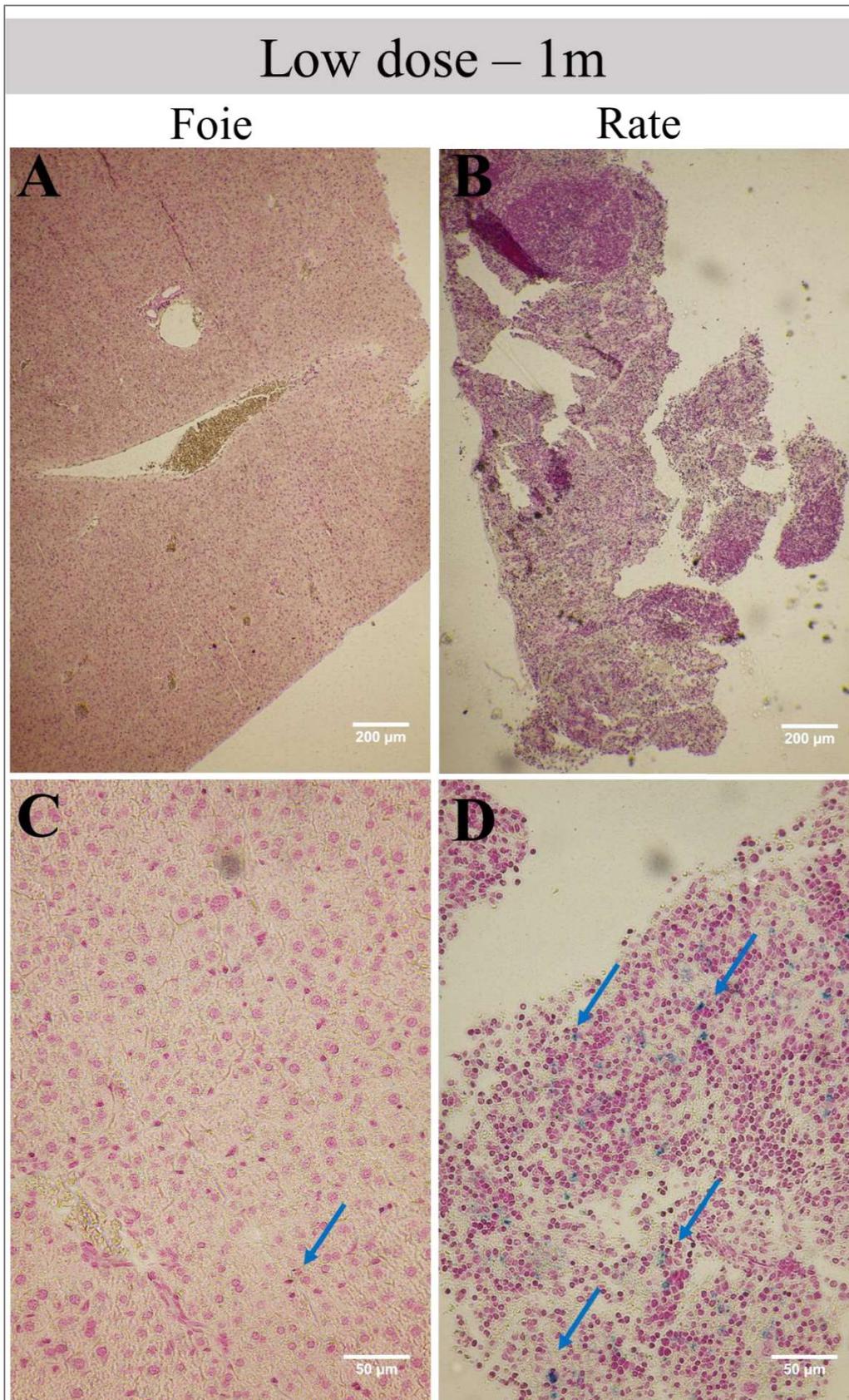


Figure 3.11 : Clichés de coupes de foie (A & C) et de rate (B & D) à un mois après injection de la dose faible après coloration PEARLS. Clichés pris avec un grandissement 4x (haut) et 20 x (bas). Le fer est indiqué par une flèche bleue.

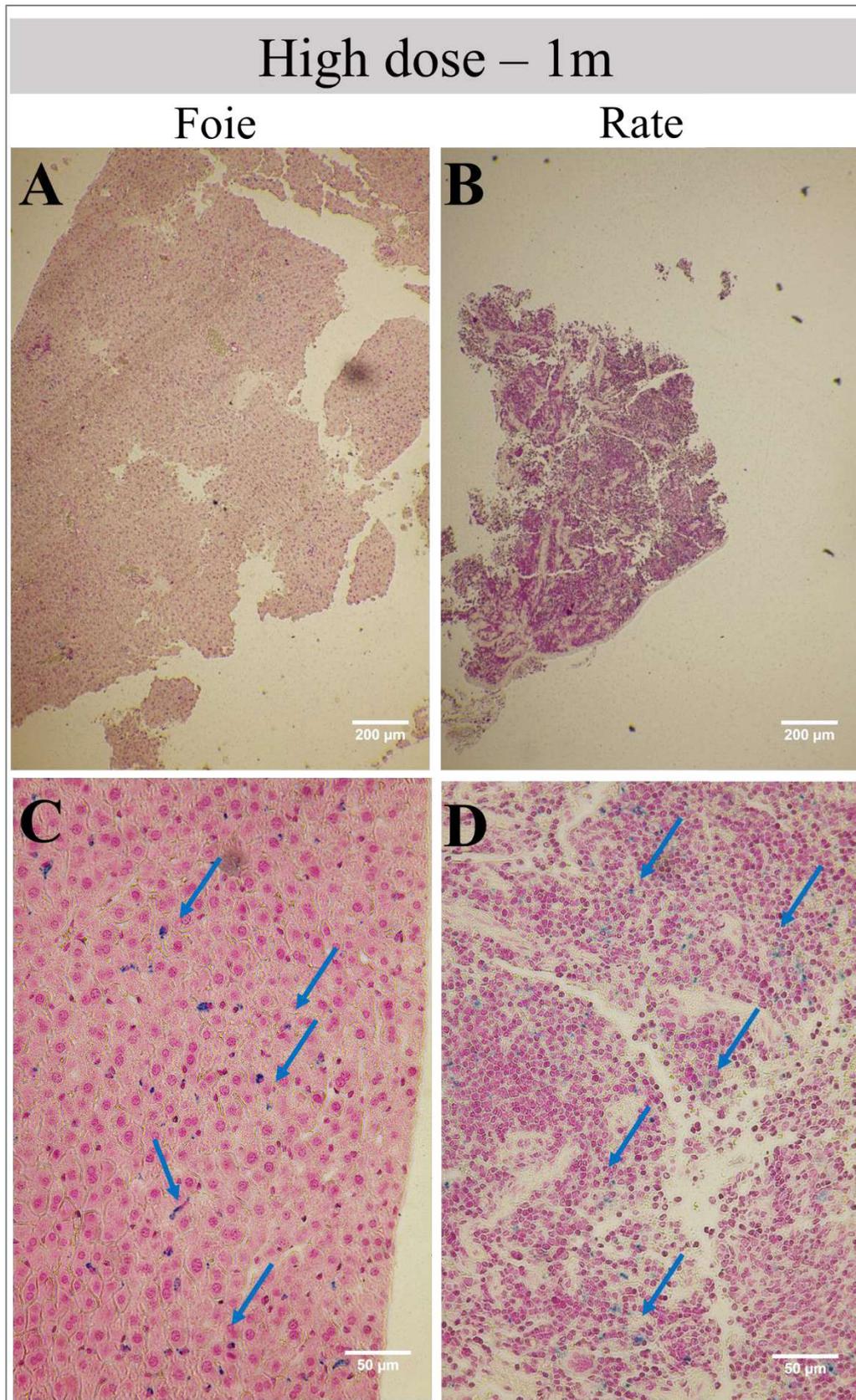


Figure 3.12 : Clichés de coupes de foie (A & C) et de rate (B & D) à un mois après injection de la dose élevée après coloration PEARLS. Clichés pris avec un grossissement 4x (haut) et 20 x (bas). Le fer est indiqué par une flèche bleue.

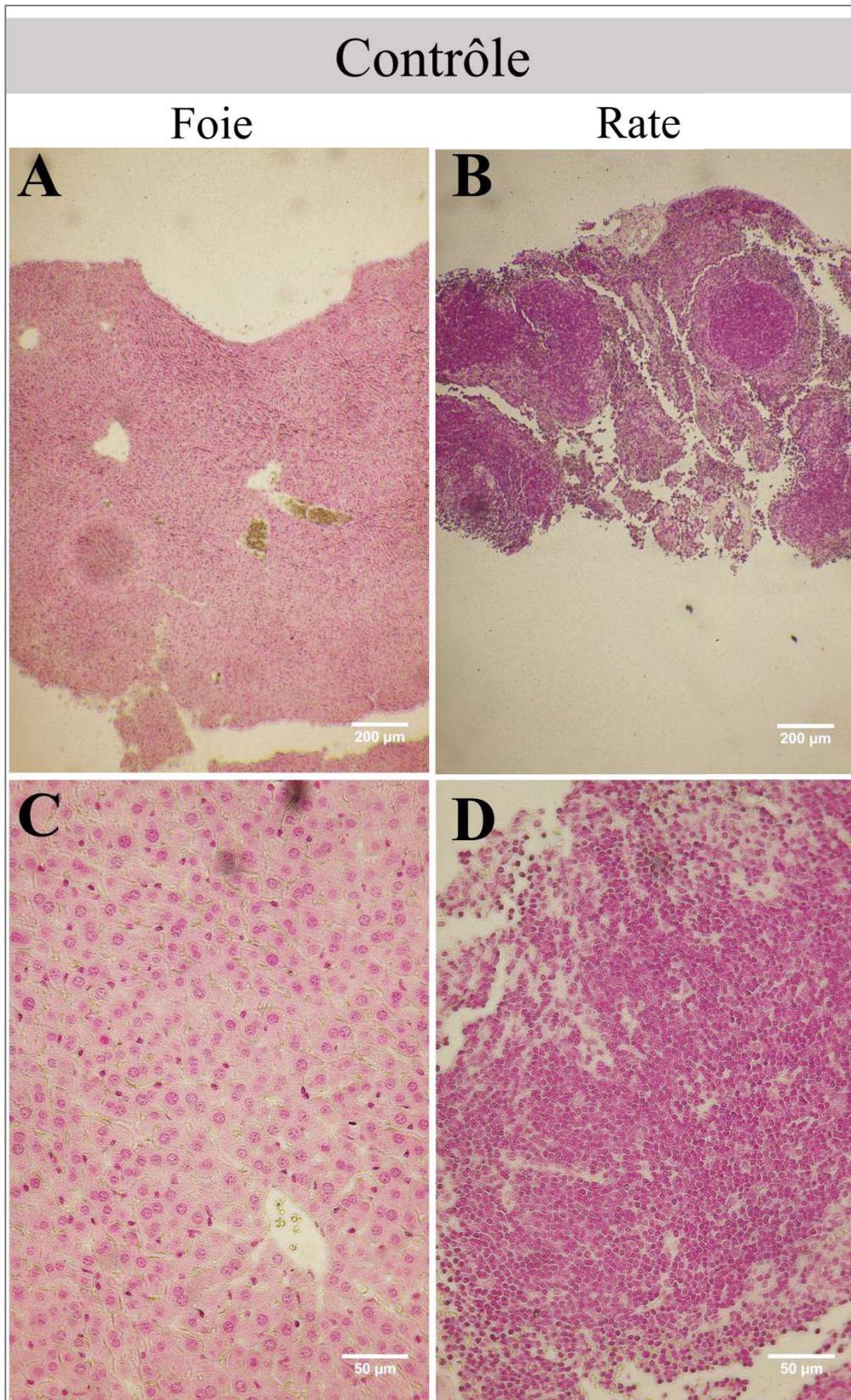


Figure 3.13 : Clichés de coupes de foie (A & C) et de rate (B & D) des souris contrôles. Clichés pris avec un grandissement 4x (haut) et 20 x (bas).

## 4. Mesures isotopiques : détection des lanthanides

Il est nécessaire de préciser les potentielles interférences pour les lanthanides afin de définir la résolution nécessaire pour leurs analyses. La Figure 4.1 présente un extrait de la table recensant les différents nucléides.<sup>5</sup>

<sup>159</sup> Yb	<sup>160</sup> Yb	<sup>161</sup> Yb	<sup>162</sup> Yb	<sup>163</sup> Yb	<sup>164</sup> Yb	<sup>165</sup> Yb	<sup>166</sup> Yb	<sup>167</sup> Yb	<sup>168</sup> Yb	<sup>169</sup> Yb	<sup>170</sup> Yb	<sup>171</sup> Yb
<sup>158</sup> Tm	<sup>159</sup> Tm	<sup>160</sup> Tm	<sup>161</sup> Tm	<sup>162</sup> Tm	<sup>163</sup> Tm	<sup>164</sup> Tm	<sup>165</sup> Tm	<sup>166</sup> Tm	<sup>167</sup> Tm	<sup>168</sup> Tm	<sup>169</sup> Tm	<sup>170</sup> Tm
<sup>157</sup> Er	<sup>158</sup> Er	<sup>159</sup> Er	<sup>160</sup> Er	<sup>161</sup> Er	<sup>162</sup> Er	<sup>163</sup> Er	<sup>164</sup> Er	<sup>165</sup> Er	<sup>166</sup> Er	<sup>167</sup> Er	<sup>168</sup> Er	<sup>169</sup> Er
<sup>156</sup> Ho	<sup>157</sup> Ho	<sup>158</sup> Ho	<sup>159</sup> Ho	<sup>160</sup> Ho	<sup>161</sup> Ho	<sup>162</sup> Ho	<sup>163</sup> Ho	<sup>164</sup> Ho	<sup>165</sup> Ho	<sup>166</sup> Ho	<sup>167</sup> Ho	<sup>168</sup> Ho
<sup>155</sup> Dy	<sup>156</sup> Dy	<sup>157</sup> Dy	<sup>158</sup> Dy	<sup>159</sup> Dy	<sup>160</sup> Dy	<sup>161</sup> Dy	<sup>162</sup> Dy	<sup>163</sup> Dy	<sup>164</sup> Dy	<sup>165</sup> Dy	<sup>166</sup> Dy	<sup>167</sup> Dy
<sup>154</sup> Tb	<sup>155</sup> Tb	<sup>156</sup> Tb	<sup>157</sup> Tb	<sup>158</sup> Tb	<sup>159</sup> Tb	<sup>160</sup> Tb	<sup>161</sup> Tb	<sup>162</sup> Tb	<sup>163</sup> Tb	<sup>164</sup> Tb	<sup>165</sup> Tb	<sup>166</sup> Tb
<sup>153</sup> Gd	<sup>154</sup> Gd	<sup>155</sup> Gd	<sup>156</sup> Gd	<sup>157</sup> Gd	<sup>158</sup> Gd	<sup>159</sup> Gd	<sup>160</sup> Gd	<sup>161</sup> Gd	<sup>162</sup> Gd	<sup>163</sup> Gd	<sup>164</sup> Gd	<sup>165</sup> Gd
<sup>152</sup> Eu	<sup>153</sup> Eu	<sup>154</sup> Eu	<sup>155</sup> Eu	<sup>156</sup> Eu	<sup>157</sup> Eu	<sup>158</sup> Eu	<sup>159</sup> Eu	<sup>160</sup> Eu	<sup>161</sup> Eu	<sup>162</sup> Eu	<sup>163</sup> Eu	<sup>164</sup> Eu

Figure 4.1 : Extrait de la table des nucléides. En noir les isotopes stables et en bleu, vert et jaune, les isotopes radioactifs.

On constate que le thulium possède un unique isotope stable le <sup>169</sup>Tm. Celui-ci sera donc aussi analysé durant les analyses ICP-MS. Le gadolinium quant à lui possède six isotopes stables : <sup>154</sup>Gd, <sup>155</sup>Gd, <sup>156</sup>Gd, <sup>157</sup>Gd, <sup>158</sup>Gd et <sup>160</sup>Gd, d'abondances naturelles respectives égales à 2,18 %, 14,8 %, 20,47 %, 15,65 %, 24,84 % et 21,86 %. D'après l'extrait de la table des nucléides, on constate que certains isotopes du gadolinium sont interférés par des isotopes du dysprosium (Dy). En particulier, le <sup>158</sup>Gd et <sup>160</sup>Gd sont interférés par le <sup>158</sup>Dy et <sup>160</sup>Dy, respectivement. Contrairement au code couleur indiqué dans la table, le <sup>156</sup>Dy est considéré comme un isotope stable, d'abondance naturelle égale à 0,056 % et constitue une interférence isobarique du <sup>156</sup>Gd. L'isotope le plus abondant, le <sup>157</sup>Gd, ne possède pas d'interférences isobariques, il sera donc analysé pour quantifier le gadolinium dans l'ensemble des échantillons.

Le choix de la résolution est ensuite déterminé par les rapports  $m/\Delta m$  pour chaque interférence polyatomiques. Le Tableau 4-1 référence les interférences polyatomiques<sup>6</sup> du <sup>157</sup>Gd et <sup>169</sup>Tm ainsi que le rapport  $m/\Delta m$ .

<sup>157</sup> Gd	$m/\Delta m$	<sup>169</sup> Tm	$m/\Delta m$
<sup>138</sup> Ba <sup>19</sup> F <sup>+</sup>	7724	<sup>153</sup> Eu <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	9341
<sup>141</sup> Pr <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	7330		

Tableau 4-1 : Liste des interférences polyatomiques du <sup>157</sup>Gd et <sup>169</sup>Tm et calculs de leurs rapports  $m/\Delta m$  respectifs.

Afin de s'affranchir des interférences polyatomiques citées ci-dessus, il est nécessaire de réaliser l'analyse en haute résolution (HR-ICP-MS :  $m/\Delta m = 10\,000$ ). Aussi, l'analyse des isotopes du fer ainsi que des isotopes permettant de corriger les interférences isobariques ( $^{54}\text{Cr}$  et  $^{58}\text{Ni}$ ) est réalisée en moyenne résolution (MR), et l'analyse des isotopes  $^{157}\text{Gd}$  et  $^{169}\text{Tm}$  est réalisée en haute résolution (HR).

## 5. Fiche identité des NPOFs – Calculs

---

### 5.1 Calcul du nombre de fer par NPOFs

#### Données :

Masse volumique de la maghémite :  $\mu_{\text{maghémite}} = 5,24 \cdot 10^3 \text{ g.m}^{-3}$

Masse molaire de la maghémite  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  :  $M(\text{Fe}_2\text{O}_3) = 159,69 \text{ g.mol}^{-1}$

Tailles des  $^{57}\text{NPOFs}$  : 9,4 nm ( $\pm 2,6$  nm)

Taille des  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  : 8,7 nm ( $\pm 1,6$  nm)

#### Mise en équation

Masse molaire des NPOFs :  $M_{\text{NPOFs}} = \mu_{\text{Fe}_2\text{O}_3} \times V_{\text{NPOFs}} \times N_A$ , avec  $N_A$  le nombre d'Avogadro

Nombre de motifs  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  par NPOFs:  $N_{\text{Fe}_2\text{O}_3} = \frac{M_{\text{NPOFs}}}{M_{\text{Fe}_2\text{O}_3}}$

Nombre de fer par NPOFs :  $N_{\text{Fe}} = 2 N_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$

Finalement on calcule le nombre de fer par NPOFs par :

$$N_{\text{Fe}} = 2 \times \frac{\mu_{\text{Fe}_2\text{O}_3} \times V_{\text{NPOFs}} \times N_A}{M_{\text{Fe}_2\text{O}_3}} \quad (\text{Eq.5.1})$$

### 5.2 Calcul du nombre de lanthanides par brin de polymère

Ce calcul a été réalisé sur une solution de polymère doublement marqué. La purification de cette solution a consisté à réaliser plusieurs étapes de filtration afin d'éliminer les complexes de lanthanides en excès. Aussi la quantité de matière de polymères synthétisé est égale à la quantité de matière en réactif PIMA initiale.

#### Notations

On note la quantité de matière en polymère  $n_{\text{Pol}}$

La quantité de matière en lanthanides est mesurée par HR-ICP-MS et est notée  $n_{\text{Lt}}$

#### Mise en équation

On définit  $x$  le nombre de lanthanides par polymère avec

$$x = \frac{n_{Lt}}{n_{Pol}} \quad (\text{Eq.5.2})$$

### 5.3 Calcul du nombre de lanthanides par amines disponibles

#### Notations

On note la quantité de matière en amines disponibles  $n_{NH_2}$

La quantité de matière en lanthanides est mesurée par HR-ICP-MS et est notée  $n_{Lt}$

#### Mise en équation

On définit  $x$  le nombre de lanthanides par polymère avec

$$x = \frac{n_{Lt}}{n_{NH_2}} \quad (\text{Eq.5.3})$$

### 5.4 Calcul du nombre de brins de polymère par NPOFs

Calcul réalisé sur la solution de  $LT^{57}NPOFs$ .

#### Notation

$n_{Fe}$  : quantité de matière en fer dans la solution de  $LT^{57}NPOFs$  (mesurée par HR-ICP-MS)

$n_{lantha}$  : quantité de matière en lanthanides dans la solution de  $LT^{57}NPOFs$  (HR-ICP-MS)

$x$  : nombre de lanthanides par brins de polymère (Eq. 6.3)

$n_{Pol}$  : quantité de matière de brins de polymère dans la solution (à calculer)

$N_{Fe}$  : nombre de fer par  $LT^{57}NPOFs$  (Eq. 6.1)

$nNPOFs$  : quantité de matière de  $LT^{57}NPOFs$  (à calculer)

$N_{Pol-to-NPs}$  : Nombre de brins de polymère par  $LT^{57}NPOFs$

#### Mise en équation

La quantité de matière  $nNPOFs$  est calculée selon :

$$n_{NPOFs} = \frac{n_{Fe}}{N_{Fe}} \quad (\text{Eq.5.4})$$

La quantité de matière de brins de polymère dans la solution est calculé par :

$$n_{\text{Pol}} = \frac{n_{\text{Lt}}}{x} \quad (\text{Eq.5.5})$$

Enfin, le nombre de brin de polymère par LT57NPOFs est calculé par :

$$N_{\text{Pol-to-NPs}} = \frac{n_{\text{Pol}}}{n_{\text{NPOFs}}} \quad (\text{Eq.5.6})$$

## 5.5 Calcul du nombre de dopamine par LT<sup>57</sup>NPOFs

### Notations

$M_{\text{PIMA,Pol}}$  : masse molaire du polymère PIMA

$M_{\text{PIMA,mono}}$  : masse molaire du monomère constituant le PIMA

$N_{\text{PIMA,mono}}$  : nombre de monomère par brin de polymère PIMA

$N_{\text{PIMA,mono-to-NPs}}$  : nombre de monomère par NPOFs (à déterminer)

$N_{\text{Pol-to-NPs}}$  : Nombre de brins de polymère par LT<sup>57</sup>NPOFs (Eq. 6.6)

$x_{\text{dopa}}$  : fraction de réactif dopamine initiale

$N_{\text{dopa-to-NPs}}$  : nombre de dopamines par NPOFs

$S_{\text{NPOFs}}$  : surface des NPOFs

$\sigma_{\text{dopa}}$  : densité surfacique de la dopamine sur les NPOFs

### Mise en équation

Le nombre de monomères présents sur le polymère PIMA est défini tel que :

$$N_{\text{PIMA,mono}} = \frac{M_{\text{PIMA,Pol}}}{M_{\text{PIMA,mono}}} \quad (\text{Eq.5.7})$$

On peut calculer ensuite le nombre de monomère par NPOFs selon :

$$N_{\text{PIMA,mono-to-NPs}} = N_{\text{PIMA,mono}} \times N_{\text{Pol-to-NPs}} \quad (\text{Eq.5.8})$$

Puis on calcule le nombre de dopamine par NPOFs par :

$$N_{\text{dopa-to-NPs}} = x_{\text{dopa}} \times N_{\text{PIMA,mono-to-NPs}} \quad (\text{Eq.5.9})$$

La densité surfacique de dopamine sur les NPOFs se calcule grâce à la surface des NPOFs telle que :

$$\sigma_{\text{dopa}} = \frac{N_{\text{dopa-to-NPs}}}{S_{\text{NPOFs}}} \quad (\text{Eq.5.10})$$

Les calculs ont été réalisés à partir d'une solution de polymère doublement marqué et de la solution de  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$ . Nous avons fait une première approximation en transposant les valeurs relatives au nombre de lanthanides par polymère aux  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  afin de calculer le nombre de polymère par  $\text{NPOFs}$ . La seconde approximation a été de transposer les résultats obtenus pour les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  aux  $^{57}\text{NPOFs}$ . En effet, les synthèses ont été réalisées selon le même protocole et la différence de taille entre les  $\text{LT}^{57}\text{NPOFs}$  et  $^{57}\text{NPOFs}$  n'est pas significativement différente, aussi les ordres de grandeurs concernant le nombre de polymère par  $\text{NPOFs}$  devraient être similaires.

## 6. Estimation de l'incertitude sur la détection de NPOFs sur l'ensemble de la souris

---

La quantité de  $^{57}\text{Fe}$ -NPOFs détectée en HR-ICP-MS, une heure après injection de la dose faible s'élève à 111 % ( $\pm 10\%$ ). Par ce calcul d'incertitude, nous avons voulu évaluer si la quantité élevée de  $^{57}\text{Fe}$ -NPOFs détectée était due à des erreurs sur les mesures. Ce calcul est mené pour le groupe de souris injecté avec la dose faible à une heure après injection.

### Notations

Organes analysés : Foie (F), rate, (Ra), reins (Re), poumons (P) et sang (S).

$m_x$  : masse de l'organe x

$m_{\text{souris}}^{\text{det}}$  = masse de  $^{57}\text{Fe}$  exogène détecté sur l'ensemble de la souris

$m_{\text{souris}}^{\text{inj}}$  = masse de  $^{57}\text{Fe}$  exogène injectée pour la dose faible

$\sigma$  : incertitude sur la mesure

% MI<sup>souris</sup> = pourcentage de la masse injectée sur l'ensemble de la souris

La masse de  $^{57}\text{Fe}$  détectée sur l'ensemble de la souris est égale à la somme des masses de  $^{57}\text{Fe}$  détectées pour chaque organe analysé telle que :

$$m_{\text{souris}}^{\text{det}} = m_F + m_{\text{Ra}} + m_{\text{Re}} + m_P + m_S \quad (\text{Eq.6.1})$$

L'incertitude sur la masse de  $^{57}\text{Fe}$  détectée sur l'ensemble de la souris est définie telle que :

$$\sigma_{\text{souris}}^{\text{det}} = \sqrt{\sigma(m_F)^2 + \sigma(m_{\text{Ra}})^2 + \sigma(m_{\text{Re}})^2 + \sigma(m_P)^2 + \sigma(m_S)^2} \quad (\text{Eq.6.2})$$

Avec  $\sigma(m_x) = \text{RMSE}(C_x) \times m_x^{\text{tot}}$

Avec RMSE ( $C_x$ ) la déviation standard sur la détermination de la concentration en  $^{57}\text{Fe}$  exogène pour les différents organes analysés. Celle-ci a été déterminée dans le chapitre 2 lors des expériences de matrices de validation. Pour ce calcul, le RMSE a été calculé sur 5 décades de concentrations pour le foie et le sang et est égal à 0,5 ppm et 0,048 ppm, respectivement. Les matrices de validation ont été réalisées sur le foie, les selles, les urines et le sang. Aussi nous avons fait l'approximation d'utiliser le RMSE obtenu pour le foie pour les organes rate, reins et poumons.

On peut exprimer le pourcentage de la masse injectée sur l'ensemble de la souris, % MI<sup>souris</sup> ainsi que l'incertitude sur celui-ci tel que :

$$\% \text{ MI}^{\text{souris}} = \frac{m_{\text{souris}}^{\text{det}}}{m_{\text{souris}}^{\text{inj}}} ; \quad (\text{Eq.6.3})$$

$$\sigma (\% \text{ MI}^{\text{souris}}) = \sqrt{\left(\frac{\sigma(m_{\text{souris}}^{\text{det}})}{m_{\text{souris}}^{\text{det}}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma(m_{\text{souris}}^{\text{inj}})}{m_{\text{souris}}^{\text{inj}}}\right)^2} \times \% \text{ MI}^{\text{souris}} \quad (\text{Eq.6.4})$$

Le pourcentage de la masse injectée % MI<sup>souris</sup> ainsi que l'incertitude  $\sigma (\% \text{ MI}^{\text{souris}})$  sont déterminés pour chaque souris du groupe injecté avec la dose faible à une heure après injection, soit sur quatre souris. La moyenne et l'incertitude sur la moyenne sont déterminés selon :

$$\text{moyenne } (\% \text{ MI}^{\text{souris}}) = \frac{\sum_i \% \text{ MI}^{\text{souris}}}{n_{\text{souris}}=4} \quad (\text{Eq.6.5})$$

$$\sigma_{\text{moyenne}} (\% \text{ MI}^{\text{souris}}) = \sqrt{\frac{\sum_i \sigma_i (\% \text{ MI}^{\text{souris}})^2}{n_{\text{souris}}^2}} \quad (\text{Eq.6.6})$$

La Figure 6.1 représente les incertitudes liées à l'hétérogénéité des souris analysées ou liée à la mesure sur le pourcentage de masse injecté, mesuré en ICP-MS à une heure après injection de la dose faible. On constate que les incertitudes sur la mesure sont inférieures à celles dues à l'hétérogénéité des souris analysées et ne permettent pas d'expliquer les valeurs élevées pour ce temps.

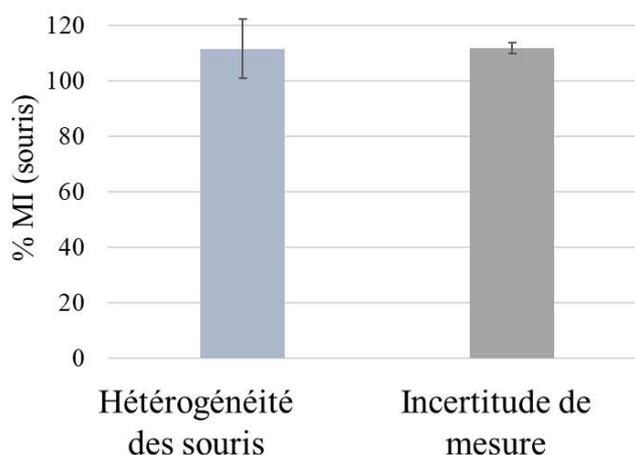


Figure 6.1 : Incertitude liée à l'hétérogénéité des souris analysées et incertitude liée à la mesure sur le pourcentage de la masse injectée mesuré en HR-ICP-MS sur l'ensemble de la souris à une heure après injection de la dose faible.

