



**HAL**  
open science

# Polymères à empreintes de protéines couplés à des nanoparticules magnétiques : de la synthèse aux applications en nanomédecine

Charlotte Boitard

► **To cite this version:**

Charlotte Boitard. Polymères à empreintes de protéines couplés à des nanoparticules magnétiques : de la synthèse aux applications en nanomédecine. Chimie analytique. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS032 . tel-02935870

**HAL Id: tel-02935870**

**<https://theses.hal.science/tel-02935870>**

Submitted on 10 Sep 2020

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

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

**THÈSE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITÉ**

**Spécialité : Chimie**

**École doctorale : « chimie physique et chimie analytique de Paris Centre »**

réalisée  
**au laboratoire PHENIX**  
présentée par  
**Charlotte BOITARD**

pour obtenir le grade de :  
**DOCTEUR DE SORBONNE UNIVERSITÉ**

Sujet de la thèse :

**Polymères à empreintes de protéines couplés à des  
nanoparticules magnétiques : de la synthèse aux  
applications en nanomédecine.**

**Soutenance prévue le 24 juin 2019**

devant un jury composé de :

<b>Serge Ravaine</b>	<b>Professeur – Université de Bordeaux</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Nicolas Tsapis</b>	<b>Directeur de Recherches – Université Paris-Sud</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Philippe Guegan</b>	<b>Professeur – Sorbonne Université</b>	<b>Examineur</b>
<b>Karsten Haupt</b>	<b>Professeur – Université Technologique de Compiègne</b>	<b>Examineur</b>
<b>Nathalie Mignet</b>	<b>Directrice de Recherches – Université Paris Descartes</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Nébéwia Griffete</b>	<b>Maître de conférences – Sorbonne Université</b>	<b>Encadrante de thèse</b>
<b>Christine Ménager</b>	<b>Professeur – Sorbonne Université</b>	<b>Directrice de thèse</b>



## Table des matières

<b>Table des abréviations</b> .....	1
<b>Introduction générale</b> .....	3
<b>Chapitre 1 : Les systèmes hybrides oxyde de fer – polymère à empreintes (macro)moléculaires et leur intérêt en nanomédecine</b> .....	7
1. Thérapies anti-cancéreuses.....	11
1.1. Les cellules cancéreuses .....	11
1.2. Détection et ciblage de cellules cancéreuses.....	11
1.3. Différentes thérapies et leurs limitations .....	13
1.4. Nécessité de nouveaux objets thérapeutiques .....	14
2. Les oxydes de fer magnétiques .....	14
2.1. Magnétite et maghémite .....	14
2.2. Synthèse de la maghémite .....	15
2.3. Leurs propriétés magnétiques.....	16
3. Les polymères imprimés.....	21
3.1. Les polymères à empreintes moléculaires .....	21
3.2. Les polymères à empreintes de protéines .....	23
3.3. Applications en santé des polymères à empreintes de protéines .....	26
3.4. Les polymères à empreintes de virus, bactéries ou cellules .....	31
4. Les systèmes hybrides oxyde de fer – polymère à empreintes de protéines (PEP).....	32
4.1. Les objets hybrides .....	32
4.2. Une synthèse déjà bien référencée dans la littérature.....	34
4.3. Applications des objets hybrides.....	35
4.4. Vers de nouvelles thérapies ciblées .....	36
<b>Chapitre 2 : Synthèse des nano-objets hybrides <math>\gamma</math>-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP</b> .....	39
1. Synthèse et caractérisations des nanoparticules de maghémite $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	43
1.1. Synthèse des particules.....	43

1.2.	Caractérisations des nanoparticules synthétisées .....	44
2.	Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules d'oxyde de fer $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	48
2.1.	L'agent de fonctionnalisation .....	48
2.2.	Une fonctionnalisation effective .....	49
3.	Obtention de polymères à empreintes de protéines (PEP) .....	51
3.1.	La BSA employée comme gabarit de synthèse.....	51
3.2.	La mise en œuvre d'une polymérisation contrôlée de type RAFT .....	51
3.3.	Synthèse des nano-objets hybrides.....	53
3.4.	Caractérisations des nano-objets hybrides $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP.....	59
4.	Conclusion sur la synthèse et la caractérisation des objets hybrides .....	65
5.	Matériels et méthodes .....	66
5.1.	Réactifs chimiques.....	66
5.2.	Techniques de caractérisations et appareils de mesure .....	66
5.3.	Synthèse des nanoparticules de maghémite .....	70
5.4.	Fonctionnalisation par l'agent Iniferter.....	72
5.5.	Synthèse du PEP et du PNI .....	72
5.6.	Réalisation d'isothermes d'adsorption .....	74
<b>Chapitre 3 : Ciblage de la GFP et sa dénaturation par hyperthermie magnétique .....</b>		<b>75</b>
1.	Les objets hybrides $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-GFP.....	79
1.1.	La protéine fluorescente verte (GFP) .....	79
1.2.	Caractérisations des objets hybrides.....	80
2.	Adsorption <i>in vitro</i> de la GFP.....	81
2.1.	Isothermes d'adsorption .....	81
2.2.	Visualisation de l'adsorption .....	84
2.3.	Cinétique d'adsorption.....	84
2.4.	Résilience de l'adsorption .....	87
2.5.	Sélectivité et compétition lors de l'adsorption .....	87
3.	Devenir <i>in vitro</i> de la GFP adsorbée .....	89
3.1.	Désorption .....	89

3.2.	Dénaturation .....	92
4.	Ciblage cellulaire de la protéine fluorescente verte (GFP).....	95
4.1.	Adsorption de protéines immobilisées en milieu de culture cellulaire.....	95
4.2.	Les objets biologiques employés.....	97
4.3.	Ciblage des cellules COS-7 transfectées TMD-PHluorin .....	98
4.4.	Ciblage des cellules HeLa transfectées TMD-PHluorin.....	98
4.5.	Dénaturation de la GFP sur-exprimée par les cellules HeLa .....	102
5.	Conclusion sur les performances des objets hybrides pour le ciblage et la dénaturation .....	103
6.	Matériels et méthodes .....	104
6.1.	Réactifs chimiques.....	104
6.2.	Appareils de mesure.....	105
6.3.	Détermination de la concentration en protéines.....	105
6.4.	Etudes de l'adsorption <i>in vitro</i> .....	106
6.5.	Devenir <i>in vitro</i> .....	108
6.6.	Ciblage cellulaire .....	109
6.7.	Dénaturation de la protéine exprimée par les cellules .....	111
<b>Chapitre 4 : Dégradation des hybrides <math>\gamma</math>-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP en amas cellulaires .....</b>		<b>113</b>
1.	Une dégradation déjà référencée dans la littérature .....	117
1.1.	Dégradation et toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer .....	117
1.2.	Dégradation et toxicité des polymères .....	120
2.	Etude de la dégradation en tampon lysosomal.....	122
2.1.	Choix des milieux d'étude .....	122
2.2.	Influence de la quantité d'acide citrique.....	123
2.3.	Influence du polymère imprimé.....	129
2.4.	Influence de l'enzyme .....	133
3.	Etude de la dégradation et de la toxicité en amas cellulaire .....	138
3.1.	Sphéroïdes de cellules souches mésenchymateuse humaines.....	138
3.2.	Etudes préliminaires sur les interactions particules - cellules .....	139
3.3.	Dégradation des nano-objets $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-GFP dans les sphéroïdes cellulaires .....	142

4.	Conclusion sur la dégradation des objets hybrides $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP .....	148
5.	Matériels et méthodes .....	150
5.1.	Réactifs chimiques.....	150
5.2.	Citratation des particules de maghémite .....	150
5.3.	Synthèse de nanoparticules de polyacrylamide.....	151
5.4.	Suivi de la dégradation en tampon lysosomal .....	151
5.5.	Culture des cellules .....	152
5.6.	Test de cytotoxicité AlamarBlue.....	152
5.7.	Suivi de la dégradation en amas cellulaires .....	154
 <b>Chapitre 5 : Vers l'impression d'une protéine d'intérêt pour la nanomédecine : CD44.....</b>		<b>157</b>
1.	La glycoprotéine transmembranaire CD44 .....	161
1.1.	Présentation de la protéine.....	161
1.2.	Nécessité d'un nouveau protocole de synthèse .....	162
2.	Les nouveaux objets hybrides $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP.....	163
2.1.	Fonctionnalisation de la maghémite avec un agent RAFT photo-polymérisable.....	163
2.2.	Photo-amorçage et dénaturation de protéines .....	164
2.3.	Optimisation du protocole de synthèse avec la GFP.....	165
3.	Ciblage de cellules sur-exprimant la glycoprotéine transmembranaire CD44.....	170
3.1.	Mesure de la capacité d'adsorption et du facteur d'impression .....	170
3.2.	Cellules cancéreuses humaines et toxicité des nano-objets hybrides .....	170
3.3.	Ciblage cellulaire .....	171
4.	Conclusion sur les performances des objets hybrides photo-polymérisés.....	173
5.	Matériels et méthodes .....	173
5.1.	Réactifs employés.....	173
5.2.	Appareils de mesure.....	174
5.3.	Fonctionnalisation de la maghémite par l'agent RAFT photo-polymérisable .....	174
5.4.	Synthèse du polymère.....	174
5.5.	Réalisation d'isothermes d'adsorption .....	175
5.6.	Mesure du facteur d'impression des objets hybrides $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-CD44 .....	176
5.7.	Culture des cellules .....	176

5.8.	Test de cytotoxicité MTT .....	176
5.9.	Ciblage cellulaire .....	178
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>		<b>181</b>
<b>Références .....</b>		<b>185</b>
<b>Annexes.....</b>		<b>209</b>
1.	Tableau récapitulatif des principaux objets hybrides $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP et PNI .....	213
2.	Relaxométrie .....	214
2.1.	Atomes, moment magnétique et spin.....	214
2.2.	Champs magnétiques et excitation des spins .....	214
2.3.	Relaxation des spins .....	215
2.4.	Mesure de T <sub>2</sub> par une séquence d'écho de spin .....	217
2.5.	Mesure d'un profil de T <sub>1</sub> .....	218
3.	Cytométrie en flux .....	219
3.1.	Principe de la méthode .....	219
3.2.	Protocole expérimental mis en œuvre.....	221
4.	Publication – Magnetic protein imprinted polymers: a review .....	225



## Table des abréviations

% wt	Pourcentage massique
AAS	Spectroscopie d'absorption atomique (atomic absorption spectroscopy)
AIBN	Aso-bis-iso-butyronitrile
AM	Acrylamide
AMF	Alternating Magnetic Field / Champ magnétique alternatif
APS	Persulfate d'ammonium
ATG	Analyse thermogravimétrique
BHb	Hémoglobine bovine
BSA	Albumine de sérum bovin
CD44	Complexe de différenciation 44 humain (glycoprotéine transmembranaire)
Cyt c	Cytochrome c
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
FBS	Fetal Bovine Serum (sérum de veau fœtal)
FTIR	Infra-rouge à transformée de Fourier
GFP	Protéine fluorescente verte
HSA	Albumine sérique humaine
HEPES	Acide N-(2-hydroxyethyl)-pipérazine-N'-(2-ethanesulfonique)
HHb	Hémoglobine humaine
HSA	Albumine de sérum humain
Lyz	Lysozyme
M	mol/L
MBAM	Méthylène-bis-acrylamide
MET	Microscopie électronique en transmission
mM	mmol/L
mmol	Millimole
OVA	Ovalbumine
PAM	Poly-acrylamide
PBS	Tampon phosphate (phosphate buffered saline)
PEP	Polymère à empreintes de protéines
PEP-protéine	Polymère à empreintes de protéines après extraction de celles-ci
PLL-PEG	Copolymère poly-lysine et polyéthylène glycol
PNI	Polymère non imprimé
Qmax	Capacité d'adsorption à saturation
RAFT	Reversible Addition-Fragmentation chain Transfert / Transfert de chaînes par addition-fragmentation réversibles
Rnase	Ribonucléase
rpm	Rotations par minute
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylènediamine
u.a	Unité arbitraire
UV	Ultra-violette
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Maghémite ; forme $\gamma$ de l'oxyde ferrique



# Introduction générale



## Introduction générale

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du développement de nanoparticules magnétiques hybrides pour des applications en nanomédecine. Un des enjeux de la nanomédecine est de pouvoir proposer des solutions innovantes dans le diagnostic et/ou le traitement de certaines pathologies qui sont des défis sociétaux comme le cancer, les maladies neurodégénératives et les maladies cardiovasculaires. L'idée de coupler les propriétés des nanoparticules magnétiques et celles des polymères à empreintes de protéines est de pouvoir proposer un nouveau système extrêmement pertinent pour aller cibler, détecter et pourquoi pas traiter *in vitro* puis *in vivo* des cellules d'intérêt.

Les nanoparticules magnétiques présentent des propriétés particulièrement intéressantes pour ce domaine d'application. En effet, elles possèdent des propriétés de relaxation qui en font de très bons agents de contraste en IRM, leur superparamagnétisme intrinsèque peut être mis à profit pour vectoriser des systèmes magnétiques du type liposomes, et enfin elles chauffent lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique alternatif (hyperthermie magnétique). La fonctionnalisation de surface des nanoparticules magnétiques est souvent délicate car il faut à la fois les rendre furtives en les couplant à un polymère de type poly-éthylène-glycol ou dextran, et les fonctionnaliser par des molécules de ciblage (sucre, peptide, anticorps...). Les polymères à empreintes moléculaires présentent une alternative très intéressante dans la mesure où il est a priori possible d'imprimer n'importe quelle molécule. Cependant, il nous est apparu pertinent de relever le défi de l'impression de protéines. Les protéines sont de grosses molécules fragiles. Ainsi, le greffage de polymère à empreintes de protéines à une particule magnétique tout en conservant la stabilité colloïdale et sans provoquer de dénaturation reste un défi. Le développement d'un système magnétique hybride permettant de cibler une protéine présente un attrait pour la manipulation de protéines d'intérêt dans la cellule (magnétogénétique) mais aussi pour le ciblage de cellules tumorales surexprimant une protéine à leur surface. La richesse des protéines exprimées par les cellules sur leur membrane plasmique externe est synonyme de nombreux systèmes d'intérêt en termes de ciblage, mais également de nombreux défis lors de la synthèse des polymères à empreintes de protéines.

Notre objectif pour ce doctorat était donc de développer de nouveaux systèmes hybrides nanoparticules magnétiques - Polymères à Empreintes de Protéines (PEP) afin d'effectuer du ciblage cellulaire et de la dénaturation de protéines sous champ magnétique alternatif, tout en envisageant le devenir *in vivo* de ces objets, en termes de toxicité et de dégradation. Après avoir optimisé les différents protocoles de synthèse à l'aide de l'albumine de sérum bovin ou de la protéine fluorescente verte, nous avons effectué des premiers tests de ciblage cellulaire et de dénaturation de protéines sous champ magnétique alternatif, et nous nous sommes proposés d'étudier le devenir des nano-objets hybrides après internalisation cellulaire. Enfin, des particules à empreintes de CD44, une glycoprotéine transmembranaire régulatrice de la croissance tissulaire, ont été synthétisées et employées avec succès pour détecter certaines cellules cibles.

Ce manuscrit est composé de cinq chapitres distincts.

Le premier chapitre présente le contexte général de l'étude. Il présente les nanoparticules de maghémite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , et les polymères à empreintes de protéines, en se focalisant principalement sur leurs applications possibles en nanomédecine. Il se propose également d'explicitier pourquoi les nano-objets hybrides couplant nanoparticules d'oxyde de fer magnétique et polymère à empreintes de protéines suscitent un fort intérêt dans le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses.

Le deuxième chapitre de cette thèse est consacré à la synthèse des objets hybrides, de l'obtention des nanoparticules de maghémite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  à la synthèse du polymère à empreintes de protéines. Les

différents objets sont également caractérisés de façon approfondie par différentes méthodes d'analyses.

Le troisième chapitre porte sur l'étude des performances des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  en termes de ciblage cellulaire et de dénaturation de protéines. Nous nous intéressons à la capacité de ces hybrides à adsorber des protéines cibles *in vitro* puis lorsque celles-ci sont surexprimées sur une membrane extracellulaire, et nous cherchons à mieux caractériser et comprendre cette adsorption, notamment en termes de cinétique, de résilience et de sélectivité. Nous avons également employé les propriétés d'hyperthermie magnétique des nano-objets hybrides afin de dénaturer les protéines adsorbées par ceux-ci.

Le quatrième chapitre est consacré à l'étude de la dégradation des objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ . Des études ont été menées *in vitro* puis en amas cellulaire, afin de déterminer si les nano-objets hybrides pouvaient être dégradés, à quelle vitesse, et si les résultats préliminaires obtenus dans un tampon lysosomal sont cohérents avec ceux obtenus pour la dégradation d'objets internalisés par des cellules.

Enfin, le cinquième chapitre porte sur l'étude des performances d'objets hybrides ayant imprimé une protéine d'intérêt en nanomédecine, le complexe de différenciation 44 (CD44). Après avoir optimisé le protocole de synthèse, la cytotoxicité de ces objets, ainsi que leur capacité à cibler une lignée cellulaire sur-exprimant ce complexe ont été déterminées.

La conclusion générale rappelle les principaux résultats de ce travail, ainsi que les principales pistes envisagées pour le développement de nouveaux objets hybrides, aussi bien au niveau de la synthèse que des applications envisagées, ou encore l'étude de leur dégradation et leur toxicité.

Cette thèse s'est déroulée au sein du laboratoire PHENIX, Physico-chimie des Electrolytes et Nanosystèmes Interfaciaux, dans l'équipe Colloïdes Inorganiques. J'ai pu bénéficier du savoir-faire de l'équipe dans la synthèse et l'étude des propriétés magnétiques des nanoparticules de maghémite, mais aussi des connaissances en polymères à empreintes moléculaires, sujet développé dans l'équipe par Nébéwia Griffete. Ce travail s'est également appuyé sur l'axe relaxométrie, axe transversal du laboratoire PHENIX avec l'aide d'Anne-Laure Rollet.

Ces études à l'interface entre la chimie et la nanomédecine ont été rendues possibles grâce à des collaborations. Les premiers essais de ciblage *in vitro* ont été réalisés en partenariat avec Cornelia Monzel, Elie Balloul et Maxime Dahan de l'équipe Physico-Chimie Curie (Institut Curie). Les études de dégradation ont été menées en collaboration avec Claire Wilhelm du laboratoire Matière et Systèmes Complexes (Université Paris Diderot). L'enthousiasme d'Elias Fatal et Hervé Hillaireau de l'Institut Galien (Université Paris-Sud) a rendu possible les premiers essais de ciblage *in vitro* de cellules d'intérêt en nanomédecine.

# Chapitre 1 :

## Les systèmes hybrides oxyde de fer – polymère à empreintes (macro)moléculaires et leur intérêt en nanomédecine



## Table des matières

1. Thérapies anti-cancéreuses.....	11
1.1. Les cellules cancéreuses .....	11
1.2. Détection et ciblage de cellules cancéreuses.....	11
1.3. Différentes thérapies et leurs limitations.....	13
1.3.1. Délivrance de drogues .....	13
1.3.2. Inhibition de la communication des récepteurs membranaires .....	14
1.4. Nécessité de nouveaux objets thérapeutiques .....	14
2. Les oxydes de fer magnétiques .....	14
2.1. Magnétite et maghémite.....	14
2.2. Synthèse de la maghémite .....	15
2.3. Leurs propriétés magnétiques.....	16
2.3.1. Superparamagnétisme .....	16
2.3.2. Hyperthermie magnétique .....	17
2.3.2.1. Principe.....	17
2.3.2.2. Mesure du pouvoir chauffant .....	18
2.3.2.3. Applications.....	19
3. Les polymères imprimés.....	21
3.1. Les polymères à empreintes moléculaires .....	21
3.2. Les polymères à empreintes de protéines .....	23
3.2.1. Les défis inhérents aux protéines lors de leur impression... ..	23
3.2.2. Ont mené à l'apparition de voies de synthèses innovantes.....	24
3.3. Applications en santé des polymères à empreintes de protéines .....	26
3.3.1. Détection et diagnostic.....	26
3.3.2. Délivrance ciblée de principe actif in vitro .....	29
3.3.3. Ciblage in vivo.....	29
3.4. Les polymères à empreintes de virus, bactéries ou cellules .....	31
4. Les systèmes hybrides oxyde de fer – polymère à empreintes de protéines (PEP).....	32

4.1.	Les objets hybrides .....	32
4.2.	Une synthèse déjà bien référencée dans la littérature .....	34
4.3.	Applications des objets hybrides .....	35
4.4.	Vers de nouvelles thérapies ciblées .....	36

Ce chapitre a pour objectif de présenter en détails les différentes composantes du système hybride avec lequel nous travaillerons par la suite, à savoir les nanoparticules d'oxyde de fer magnétique ainsi que les polymères à empreintes de protéines. Il se propose également de présenter pourquoi le développement de tels systèmes suscite un fort intérêt en nanomédecine, notamment dans le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses.

## 1. Thérapies anti-cancéreuses

### 1.1. Les cellules cancéreuses

Les cellules tumorales possèdent des propriétés particulières, par rapport aux cellules saines, à l'origine de leur malignité<sup>1</sup>. En effet, elles sont capables de produire elles-mêmes les facteurs de croissance nécessaires à leur division, et sur-expriment les récepteurs à ces signaux, ce qui induit leur prolifération rapide (Figure 1). Ce phénomène est renforcé par leur insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance. Pour supporter cette prolifération, les cellules cancéreuses vont également favoriser la production de vaisseaux sanguins par angiogenèse.

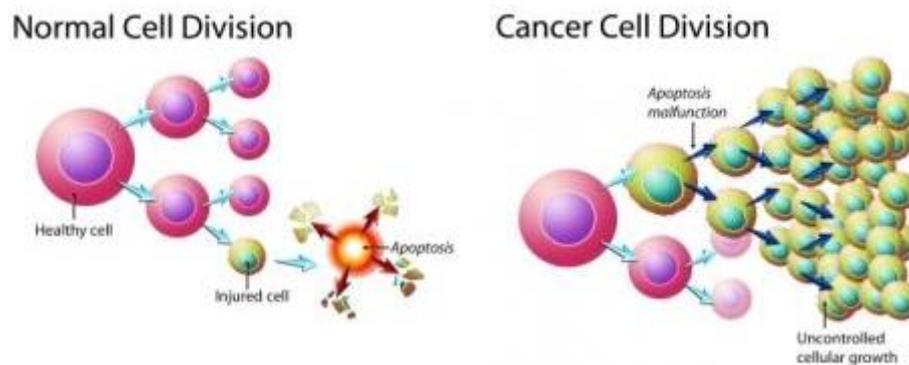


Figure 1 : Division cellulaire, pour des cellules saines ou cancéreuses<sup>2</sup>.

Lorsque ces cellules tumorales restent confinées, ne diffusant pas vers des tissus ou organes voisins, on parle d'une tumeur bénigne, potentiellement présente dans tous les tissus. Dans certains cas, ces cellules vont dégénérer. Elles vont proliférer de plus en plus vite, et devenir agressives. On parle alors de tumeur maligne, à l'origine d'un cancer.

### 1.2. Détection et ciblage de cellules cancéreuses

Lorsqu'un diagnostic médical doit être établi, notamment lorsque l'on suspecte un cancer, il est important de pouvoir détecter de façon rapide et précise les cellules cancéreuses. Cette détection se fait de manière générale par ciblage de marqueurs spécifiques exprimés à leur surface.

Alshaer *et al.* ont par exemple fonctionnalisé des liposomes à l'aide d'un aptamère anti-CD44 afin de reconnaître des cellules présentant cette glycoprotéine à leur surface<sup>3</sup>. Ce système a été employé avec succès afin de cibler deux lignées cellulaires distinctes, A549 (cancer du poumon) et MDA-MB 231 (cancer du sein), exprimant CD44.

Une autre manière de détecter des cellules cancéreuses emploie des anticorps spécifiques de certains marqueurs cellulaires<sup>4-6</sup>. Lv *et al.*<sup>7</sup> ont décoré des microbilles magnétiques commerciales avec des anticorps anti-EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) par le biais d'une synthèse multi-étapes (Figure 2).

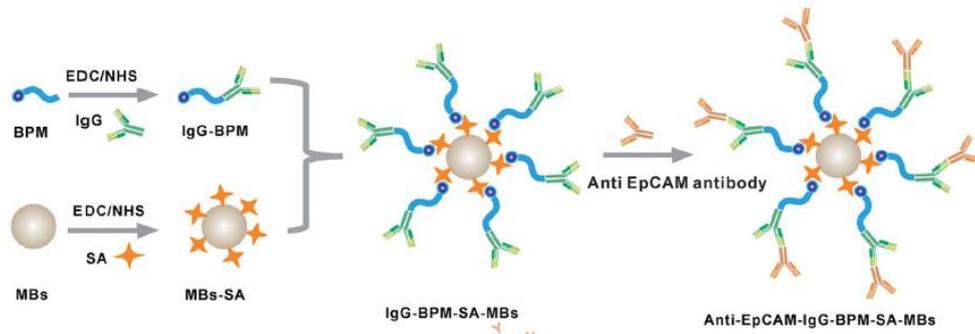


Figure 2 : Fonctionnalisation multi-étapes de nanobilles magnétiques (MBs) à l'aide d'anticorps anti-EpCAM<sup>7</sup>. BPM : molécule photosensible couplée à la biotine, IgG : immuno-globuline G, SA : streptavidine.

Ces microbilles fonctionnalisées par les anticorps anti-EpCAM ont ensuite été appliquées à la capture de cellules tumorales circulantes d'un patient souffrant d'un cancer des poumons métastatique. Pour ce faire, ils ont incubé leurs particules dans un échantillon sanguin avant d'observer la nature des cellules capturées par celles-ci (Figure 3). Afin de mieux observer les cellules capturées, ils ont choisi trois marqueurs de coloration. L'ADN était coloré en bleu afin de savoir si les cellules immobilisées étaient des globules rouges (absence de noyau) ou non. Les cyto-kératines étaient colorées en vert. Ces polymères de kératine étant des marqueurs de cellules épithéliales, ils sont présents à la surface des cellules tumorales circulantes (issus de tissus épithéliaux cancéreux)<sup>8-10</sup> mais absents des globules blancs. Enfin, le complexe de différenciation 45, ou CD45, était coloré en rouge. Ce complexe étant exprimé par les globules blancs mais pas par les cellules tumorales circulantes, cela permettait de confirmer la nature des cellules capturées.

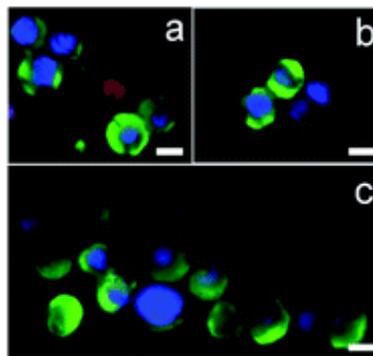


Figure 3 : Capture de cellules tumorales circulantes dans un échantillon sanguin<sup>7</sup>. (a) : cellules tumorales circulantes, (b) et (c) : amas de cellules tumorales circulantes. Bleu : coloration de l'ADN (noyau), vert : coloration des cyto-kératines (caractéristiques des tissus épithéliaux), rouge : coloration de CD45. Barre d'échelle : 10 µm.

La Figure 3 montre que les cellules capturées par les nano-objets développés par Lv *et al.* présentent à la fois des colorations bleues et vertes. Il s'agit donc bien de cellules tumorales circulantes. Une seule cellule compétitrice, un globule blanc (présentant une coloration rouge) a été capturée. Ce système est efficace, spécifique et sélectif, et donc adapté à la détection et à la capture de cellules tumorales circulantes.

Les méthodes actuelles de détection de cellules cancéreuses employant des anticorps ou des aptamères sont certes très efficaces, mais également coûteuses en temps et en moyens financiers lors de leur synthèse, et possèdent une durée de vie limitée. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux systèmes de reconnaissance cellulaire.

### 1.3. Différentes thérapies et leurs limitations

Afin de traiter un cancer, de nombreux traitements peuvent être mis en œuvre. Il est possible d'utiliser des radiothérapies pour détruire des cellules cancéreuses, plus sensibles aux rayonnements que les cellules saines, ou encore la chirurgie pour retirer les tumeurs. Ces techniques, dites physiques, ont une action locale et peuvent être combinées, entre elles ou avec d'autres thérapies faisant intervenir par exemple la chimiothérapie.

La chimiothérapie se caractérise par la délivrance systémique de principes actifs, afin de diminuer la taille des tumeurs, ou d'empêcher la prolifération de métastases et d'une rechute cancéreuse. Bien que très répandu, le traitement par chimiothérapie présente quelques inconvénients, notamment dans les deux cas de figure présentés ci-dessous.

#### 1.3.1. Délivrance de drogues

Les chimiothérapies classiques font appel à une administration systémique du principe actif. Celui-ci va donc se répartir au sein de l'organisme dans son ensemble, pouvant perturber le fonctionnement de tissus sains et entraînant l'apparition d'effets secondaires, et la dose réellement présente au sein de la tumeur sera bien inférieure à la dose initialement administrée. Il est ainsi nécessaire de développer de nouveaux vecteurs pour administrer ces principes actifs. Ceux-ci peuvent induire :

- Une délivrance ciblée de la drogue, par exemple en l'encapsulant au sein de micelles polymériques fonctionnalisées par de l'acide folique. Une fois adsorbé sur les cellules ciblées, les micelles seront internalisées, et le principe actif sera relargué par changement de pH de l'environnement<sup>11</sup>.
- Une délivrance contrôlée du principe actif. Celui-ci reste encapsulé, par exemple au sein d'un polymère, ou accroché à la surface de nanoparticules magnétiques, même après internalisation par les cellules. Sa libération est conditionnée par l'application d'un facteur externe, tel que l'application d'un champ magnétique<sup>12-14</sup> (Figure 4).

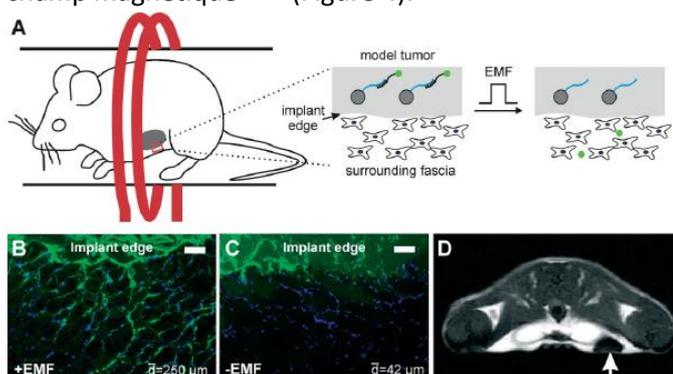


Figure 4 : Libération *in vivo* d'un principe actif modèle (fluorescéine) initialement couplé à des nanoparticules magnétiques, par application d'un champ magnétique (EMF)<sup>14</sup>. (A) : Schéma de principe de l'expérience ; (B) : diffusion de la fluorescéine depuis l'implant vers les profondeurs du tissu sous action du champ magnétique alternatif ; (C) : absence de diffusion de la fluorescéine en absence d'EMF ; (D) : IRM présentant la localisation des nanoparticules magnétiques (flèche).

### 1.3.2. Inhibition de la communication des récepteurs membranaires

La prolifération des cellules est dépendante d'un certain nombre de signaux extracellulaires, les facteurs de croissance, qui sont captés par des récepteurs membranaires. La mauvaise régulation de ces signaux entraîne une prolifération anormalement rapide, comme c'est le cas au niveau des tumeurs.

Récemment, le développement de nouvelles méthodes thérapeutiques porte plus sur l'inhibition de la communication entre les récepteurs membranaires et les facteurs de croissance, que sur le développement de nouveaux traitements anticancéreux par chimiothérapie. L'inhibition de la communication entre facteurs de croissance et récepteurs membranaires va diminuer la stimulation de la croissance cellulaire et donc ralentir le développement des tumeurs. Les récepteurs du facteur de croissance de l'épithélium (EGFR) sont particulièrement ciblés<sup>15</sup>.

### 1.4. Nécessité de nouveaux objets thérapeutiques

Les anticorps sont très fortement employés lorsque l'on cherche à cibler ou inhiber de nombreuses protéines. Bien que fortement sélectifs, ceux-ci sont chers et longs à produire. Ces dernières années ont vu le développement d'alternatives aux anticorps, telles que les aptamères, mais ces molécules restent également coûteuses. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles méthodes afin de cibler spécifiquement certaines cellules ou protéines. Les polymères à empreintes de protéines se prêtent particulièrement bien à cet objectif, comme nous le verrons par la suite.

De plus, les systèmes actuels de délivrance de principes actifs aux tumeurs permettent soit un relargage actif mais non ciblé, soit un relargage ciblé mais passif. Afin de réduire les doses nécessaires de principes actifs et donc diminuer les effets secondaires, il semble très intéressant de développer de nouveaux systèmes capables d'effectuer à la fois un relargage ciblé et contrôlé. Pour ce faire, il est possible d'employer de nouveaux systèmes de ciblage, tels que les polymères à empreintes moléculaires, et de contrôler le relargage grâce aux propriétés d'hyperthermie magnétique de nanoparticules d'oxyde de fer.

Par ailleurs, le développement de nanosystèmes permettant la manipulation de protéines à l'échelle de la cellule et à l'aide d'un champ magnétique est particulièrement intéressante dans le cadre de la magnéto-génétique.

## 2. Les oxydes de fer magnétiques

### 2.1. Magnétite et maghémite

Le terme oxyde de fer ne désigne pas un solide en particulier mais plusieurs oxydes différents. Ces oxydes peuvent différer aussi bien dans leur nature par le biais du degré d'oxydation du fer, que dans leur forme cristalline. Lorsque l'on s'intéresse uniquement à l'état d'oxydation du fer, les oxydes peuvent être classés en trois catégories : les oxydes ferreux de formule brute FeO, les sesquioxydes de fer Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> également nommés magnétites, et enfin les oxydes ferriques Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Le sesquioxyde de fer, de formule  $Fe_3O_4$ , est un oxyde contenant à la fois des ions ferreux  $Fe^{2+}$  et des ions ferriques  $Fe^{3+}$ . On peut également écrire sa formule brute de la manière suivante  $FeO.Fe_2O_3$  et sa forme naturelle est la magnétite, un oxyde noir cristallisé<sup>16</sup>. Au laboratoire il se présente sous forme de poudre noire, bien souvent également nommée magnétite par abus de langage.

La magnétite possède une structure spinelle. Les cations  $Fe^{2+}$  occupent la moitié des sites octaédriques. Les cations  $Fe^{3+}$  occupent l'autre moitié de ces sites et les sites tétraédriques. Ces deux types de cations sont organisés suivant le même réseau cubique faces centrées formé par les anions d'oxygène, ils peuvent donc facilement passer d'un site à l'autre<sup>16</sup>. Ainsi, la structure générale ne sera pas modifiée par un changement d'état d'oxydation d'un cation, ce qui explique la grande sensibilité de la magnétite à l'oxydation, et le passage facile de la magnétite à la maghémite de formule  $\gamma-Fe_2O_3$ <sup>16,17</sup>, qui possède également une structure spinelle. Par ailleurs, la magnétite possède un moment magnétique permanent, dû aux ions  $Fe^{2+}$ , les spins des cations ferriques  $Fe^{3+}$  s'annulant. Ce magnétisme lui donne son nom<sup>17</sup>.

Dans la suite de ce manuscrit, et sauf mention contraire, le terme oxyde de fer employé sans précision supplémentaire désignera par abus de langage la maghémite.

## 2.2. Synthèse de la maghémite

De nombreuses voies de synthèse existent pour l'obtention de nanoparticules de maghémite, telles que la décomposition thermique d'un précurseur, bien souvent un complexe de fer<sup>18</sup>, les synthèses de type « polyol » à partir de sels dans un poly-alcool<sup>19</sup>, la co-précipitation de précurseurs alcalins en micelles inverses qui agissent comme micro-réacteurs<sup>20-23</sup> ou encore la co-précipitation directe de sels en milieu aqueux pour donner de la magnétite qui sera ensuite oxydée en maghémite<sup>22,24,25</sup>.

Nous pouvons alors regrouper les caractéristiques principales des différentes voies de synthèse évoquées ci-dessus pour les nanoparticules d'oxyde de fer dans le Tableau 1.

Méthode	Taille moyenne (nm)	Dispersité	Avantages principaux	Inconvénients principaux
Décomposition d'un précurseur <sup>18</sup>	5 - 10	Faible	Faible dispersité	Précurseurs coûteux Haute température
Synthèse polyol <sup>19</sup>	10 - 100	Elevée	Simple à mettre en œuvre Production de grandes quantités	Dispersité élevée Haute température
Co-précipitation de sels en micelle inverse <sup>21</sup>	2 - 35	Faible	Faible dispersité	Production difficile de grandes quantités
Co-précipitation directe de sels <sup>24,25</sup>	2 - 12	Elevée	Simple à mettre en œuvre, rapide et peu coûteuse Production de grandes quantités Basse température	Dispersité élevée

Tableau 1 : Différentes voies de synthèse possibles pour l'obtention des oxydes de fer.

La synthèse de maghémite par co-précipitation directe de sels en milieu aqueux puis oxydation présente de nombreux avantages : elle est simple à mettre en œuvre, les précurseurs nécessaires sont peu coûteux, il n'est pas nécessaire de chauffer le milieu réactionnel à haute température, et elle permet la production de grandes quantités de nanoparticules. De plus, le laboratoire PHENIX possède

une grande expertise dans la synthèse de nanoparticules de maghémite par cette voie. C'est pourquoi celle-ci a été employée pour obtenir les particules magnétiques discutées dans ce manuscrit.

## 2.3. Leurs propriétés magnétiques

### 2.3.1. Superparamagnétisme

La maghémite est un oxyde ferrimagnétique, c'est-à-dire qu'au sein d'un domaine cristallin, les moments magnétiques atomiques vont s'aligner de façon antiparallèle suivant une direction cristalline spécifique, que l'on appelle axe de facile aimantation.

Lorsque les nanoparticules synthétisées sont suffisamment petites, généralement de taille inférieure à 30 nm<sup>26</sup>, elles sont monocristallines. Chaque particule est constituée d'un seul monodomaine ferrimagnétique. Les nanoparticules de maghémite sont alors superparamagnétiques, et on peut associer à chacune d'entre elle un moment magnétique (flèches blanches sur la Figure 5). Celui-ci résulte des moments magnétiques atomiques (flèches rouges sur la Figure 5) et peut être représenté par un dipôle orienté suivant l'axe de facile aimantation de la particule. Le moment magnétique de chaque particule peut alors s'écrire  $\mu = m_s V$ , avec V le volume de la particule et  $m_s$  l'aimantation volumique à saturation du matériau.

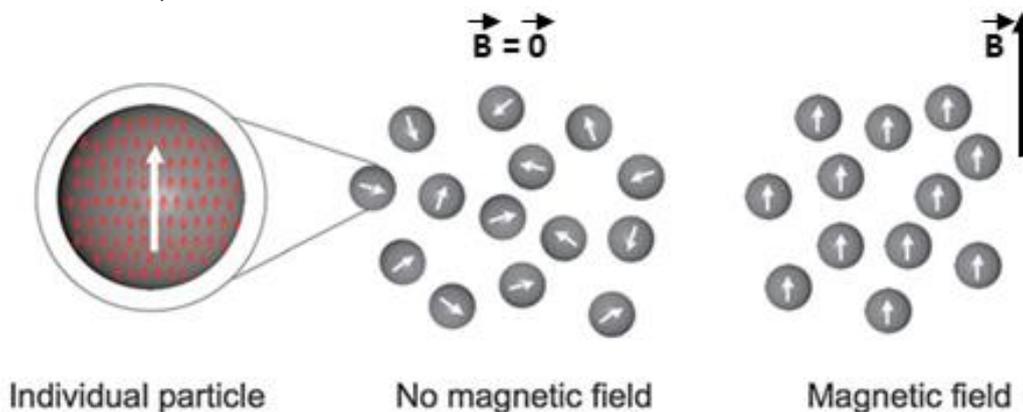


Figure 5 : Représentation schématique des moments magnétiques atomiques (flèches rouges) et du moment magnétique résultant des particules (flèches blanches)<sup>27</sup>.

A température ambiante et en l'absence de champ magnétique, les moments de différentes particules de maghémite sont orientés aléatoirement les uns par rapport aux autres. En effet, l'énergie des interactions dipolaires magnétiques est petite devant l'agitation thermique. Une suspension aqueuse de nanoparticules de maghémite a donc une aimantation nulle. Maintenant, si l'on place ces nanoparticules dans un champ magnétique, les moments magnétiques des différentes particules vont s'aligner en suivant la direction du champ appliqué. Il en découle une aimantation de la suspension, supérieure à celle qu'aurait un matériau paramagnétique, d'où le terme de superparamagnétisme. Un tel effet peut également être observé en abaissant fortement la température de l'échantillon jusqu'à passer sous une température dite de blocage.

Le superparamagnétisme des suspensions aqueuses de nanoparticules de maghémite est caractérisé notamment par l'enregistrement de courbes d'aimantation à l'aide d'un magnétomètre à échantillon vibrant (ou VSM pour Vibrating Sample Magnetometer). A haut champ magnétique, la

courbe d'aimantation obtenue tend vers une asymptote et peut parfois atteindre un palier (Figure 6). Les moments magnétiques de toutes les particules sont alors parallèles et alignés dans la direction du champ magnétique appliqué. L'aimantation de l'échantillon correspond alors à ce qu'on appelle aimantation à saturation,  $M_s$ .

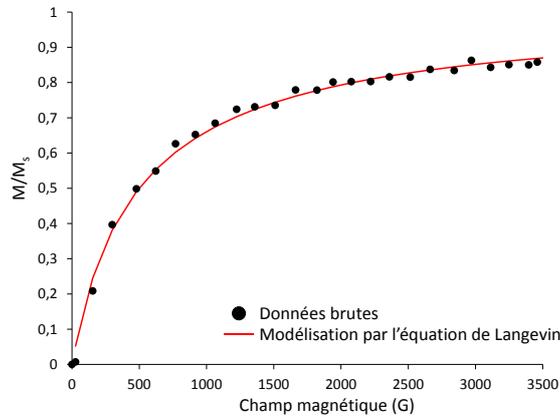


Figure 6: Courbe d'aimantation obtenue à l'aide d'un magnétomètre à échantillons vibrants, modélisée par une équation de Langevin.

Les courbes d'aimantation de suspensions de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques monodisperses peuvent être modélisées à l'aide d'une équation de Langevin :

$$M(H) = m_s \phi \left( \coth \xi(H) - \frac{1}{\xi(H)} \right)$$

Avec  $\xi(H) = \mu_0 m_s V H / kT$  le paramètre de Langevin,  $\mu_0$  la perméabilité magnétique du vide ( $4\pi \cdot 10^{-7} \text{ kg.m. A}^{-2}.\text{s}^{-2}$ ),  $m_s$  l'aimantation volumique du matériau à saturation,  $k$  la constante de Boltzmann ( $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2.\text{kg}.\text{s}^{-2}.\text{K}^{-1}$ ),  $T$  la température,  $V$  le volume d'une particule magnétique et  $\phi$  la fraction volumique en particules dans la suspension.  $\xi$  compare l'énergie d'un dipôle magnétique  $m_s V$  soumis à un champ  $H$  à l'énergie thermique  $kT$ .

Dans le cas d'une suspension de particules polydisperses, l'équation de Langevin précédente peut être pondérée en considérant une distribution log-normal pour le diamètre des particules telle que :

$$P(d) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma d} \exp\left(-\frac{\ln^2\left(\frac{d}{d_{\text{mag}}}\right)}{2\sigma^2}\right)$$

Avec  $d_{\text{mag}}$  le diamètre magnétique apparent et  $\sigma$  l'indice de polydispersité. Modéliser une courbe d'aimantation en combinant ces deux équations permet alors de déterminer  $d_{\text{mag}}$  et  $\sigma$ , paramètres qui nous intéresseront particulièrement par la suite.

### 2.3.2. Hyperthermie magnétique

#### 2.3.2.1. Principe

L'hyperthermie magnétique est la transformation d'une énergie électromagnétique en énergie thermique par des nanoparticules magnétiques soumises à un champ magnétique alternatif, oscillant à haute fréquence.

Comme nous l'avons vu précédemment, en présence d'un champ magnétique, les moments magnétiques des différentes particules vont s'aligner en suivant la direction du champ appliqué. Soit  $T$  la période d'excitation (période d'oscillation du champ magnétique) et  $\tau$  le temps de réorientation

du moment magnétique. Pour un champ magnétique continu, ou oscillant à basse fréquence,  $T$  est grand devant  $\tau$ . Les moments magnétiques ont le temps de suivre les changements de direction du champ et on peut alors observer une courbe d'aimantation sans hystérèse (Figure 7a).

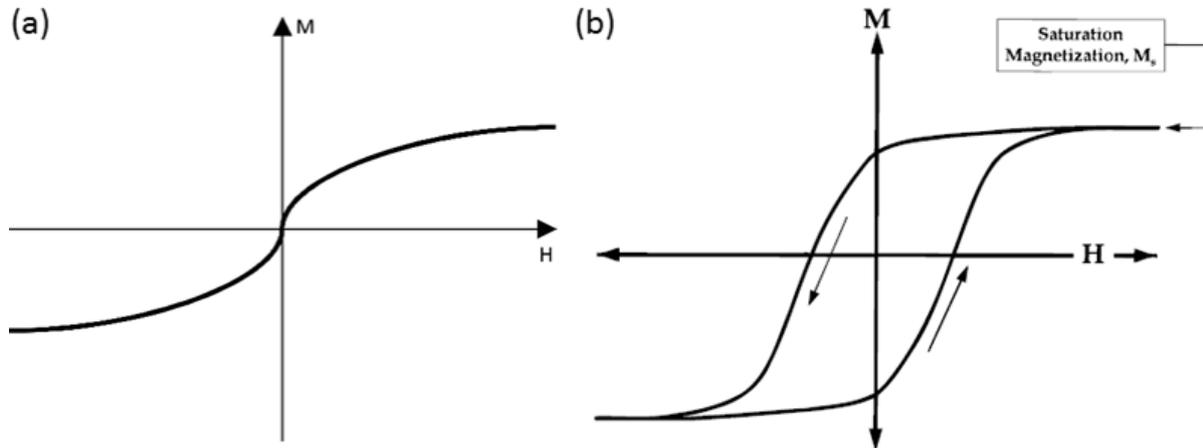


Figure 7 : Courbes d'aimantation obtenues avec un champ magnétique statique (a) ou alternatif à haute fréquence (b)<sup>28</sup>.  $M_s$  : aimantation à saturation.

Quand le champ oscille à très haute fréquence,  $T$  et  $\tau$  deviennent du même ordre de grandeur, voire  $T$  devient petit devant  $\tau$ . Les moments magnétiques ne peuvent pas changer instantanément de direction. Leur mouvement est soumis à des forces de friction, qui sont dissipatives et à l'origine de la conversion de l'énergie électromagnétique en chaleur. Un cycle d'hystérésis apparaît alors sur les courbes d'aimantation (Figure 7b), et l'aire de ce cycle correspond à l'énergie volumique dissipée sous forme de chaleur par les nanoparticules en un temps  $T$ .

La grandeur qu'il est important pour nous de calculer ici est la puissance dissipée par l'échantillon sous forme de chaleur. Afin de pouvoir comparer différents échantillons, cette puissance sera normalisée par la masse de nanoparticules de maghémite présentes dans le milieu. On parlera alors de vitesse spécifique d'adsorption, ou SAR (Specific Adsorption Rate) ou encore pouvoir chauffant.

### 2.3.2.2. Mesure du pouvoir chauffant

La mesure du pouvoir chauffant des nanoparticules de maghémite se déroule ainsi. Une suspension de nanoparticules est introduite dans un calorimètre, lui-même situé dans une bobine magnétique dans un thermostat mais en absence de champ. Une fois l'échantillon stabilisé à la température du thermostat, on applique un champ magnétique alternatif et on mesure en continu la température de la suspension. On obtient alors une courbe  $\Delta T$  (°C) =  $f$ (durée), telle que représentée sur la Figure 8.

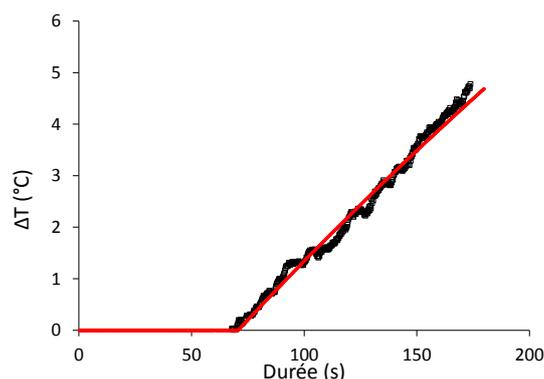


Figure 8 : Variation de température en fonction du temps pour une suspension colloïdale de nanoparticules de maghémite placée 5 min dans un champ magnétique créé par un courant de 3,4 A et une tension de 14 V à 335,3 kHz. Noir : données expérimentales et rouge : modélisation.

La courbe d'évolution de la température au cours du temps est alors modélisée à l'aide d'une équation de Box-Lucas<sup>29</sup> car cette méthode offre un bon compromis entre fiabilité de la valeur obtenue et difficulté de mise en œuvre<sup>30</sup> :

$$\Delta T = A(1 - e^{\lambda(t-t_0)})$$

Avec  $\Delta T$  la variation de température mesurée,  $t$  le temps et  $t_0$  l'instant de début d'application du champ magnétique. La capacité calorifique  $C_p$  de la solution est calculée de la manière suivante, avec  $w_t$  la fraction massique en %, afin de prendre en considération les contributions de l'eau et de la maghémite :

$$C_p = w_t^{eau} C_p^{eau} + w_t^{maghemite} C_p^{maghemite}$$

Une fois les paramètres  $A$  et  $\lambda$  de la modélisation de Box-Lucas déterminés, la SAR (en  $W/g_{maghemite}$ ) des nanoparticules est calculée comme suit :

$$SAR = A \cdot \lambda \cdot \frac{C_p}{C_m}$$

La SAR de nanoparticules magnétiques dépend de la fréquence et de l'intensité du champ magnétique appliqué, ainsi que de la taille des nanoparticules. Plus ces trois paramètres seront élevés et plus la SAR des matériaux sera importante.

### 2.3.2.3. Applications

La première application des nanoparticules magnétiques en nanomédecine fut pour détruire des tumeurs cancéreuses par hyperthermie<sup>31,32</sup> (Figure 9). Une thérapie faisant appel à ces particules a obtenu une certification européenne afin d'être appliquée en routine à des patients atteints d'un glioblastome<sup>33,34</sup>. En fonction de la température localement atteinte, le mode de traitement n'est pas le même. L'hyperthermie désigne uniquement des températures comprises entre 41°C et 44°C, et ce afin de ne pas endommager les tissus sains à proximité<sup>35</sup>. Cette élévation de température permet une fragilisation des cellules ciblées, ce qui a l'avantage de les rendre également plus sensibles à d'autres types de traitements plus classiques, tels que la radiothérapie<sup>36</sup> ou la chimiothérapie<sup>37</sup>. Une élévation de température au-delà de 45°C entraînera une destruction des cellules, par carbonisation ou nécrose<sup>35</sup>. On parle alors de thermoablation.

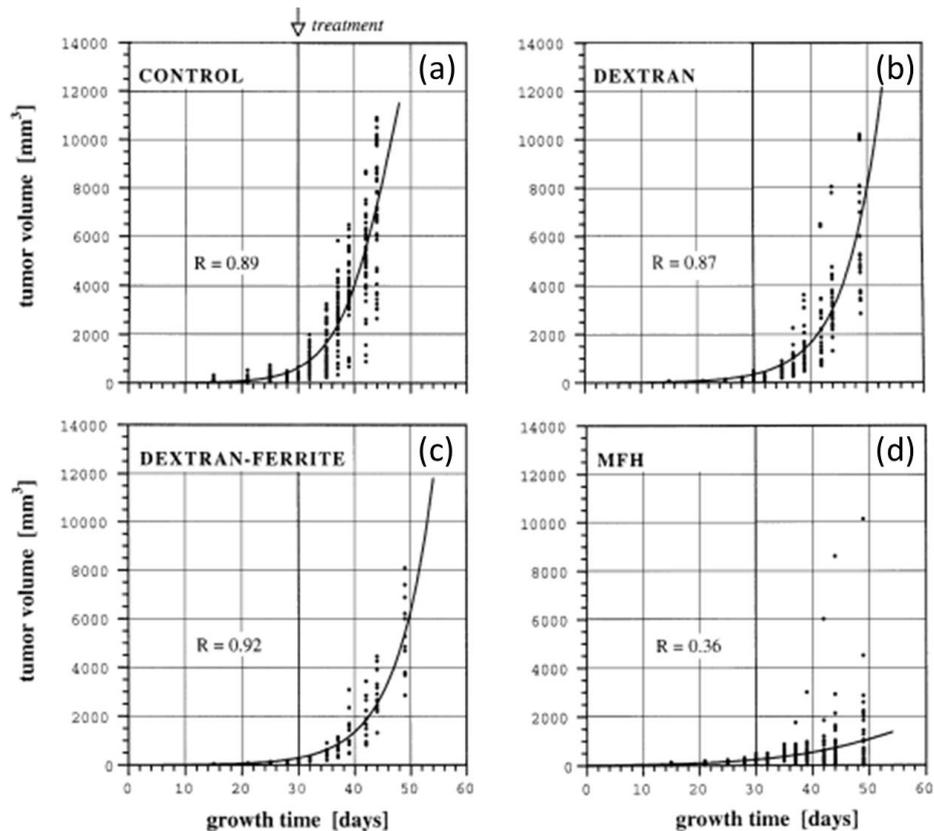


Figure 9 : Effet du dextran (b), de nanoparticules de ferrite recouvertes de dextran (c), et de ces mêmes particules avec en plus application d'un champ magnétique alternatif (d) sur le volume d'une tumeur cancéreuse comparé au témoin (a)<sup>32</sup>.

Il est possible dans certains cas de n'avoir aucun échauffement macroscopique du milieu, par exemple en jouant sur la concentration en nanoparticules ou la fréquence du champ magnétique, tout en conservant une dissipation locale de chaleur autour des nanoparticules (quelques nanomètres) en présence d'un champ radiofréquence. On parlera alors d'échauffement local ou de « hot spot »<sup>38</sup>. Une telle approche présente de nombreux avantages, le premier étant que cet effet local ne sera pas impacté par l'agrégation des nanoparticules de maghémite, comme c'est le cas lors d'un chauffage macroscopique<sup>39-41</sup>. De plus, le profil de température à proximité des nanoparticules peut induire un relargage de drogue<sup>12,42</sup> (Figure 10) ou activer des canaux ioniques cellulaires transmembranaires sans endommager les organites présents au sein des cellules<sup>43</sup>.

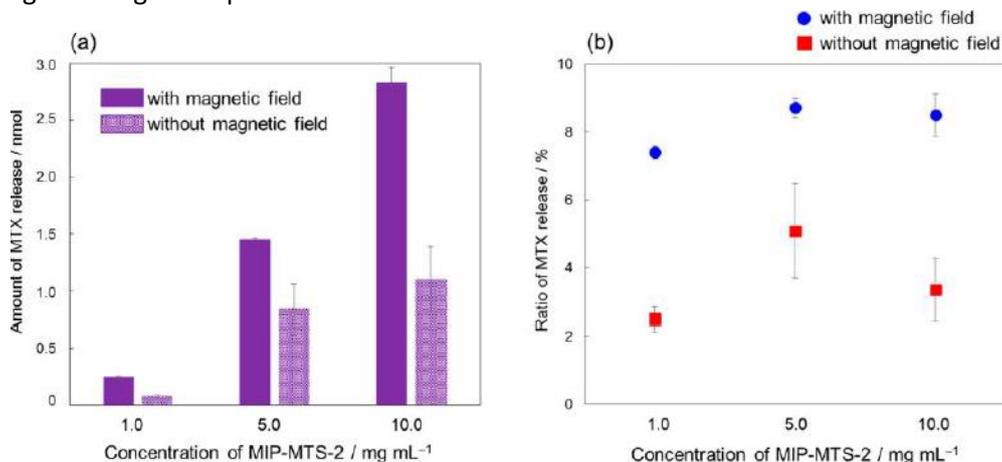


Figure 10 : Relargage de MTX (méthotrexate) encapsulé au sein d'un polymère imprimé thermosensible (MIP) contenant des nanoparticules magnétiques (MTS) sous action d'un champ magnétique alternatif<sup>42</sup>.

L'échauffement local des nanoparticules d'oxyde de fer est cependant compliqué à mettre en évidence. Bien qu'il ait été exploré de manière indirecte par l'observation de phénomènes macroscopiques découlant de ces échauffements locaux à l'échelle nanoscopique<sup>13,44</sup>, son évaluation directe n'est que très peu étudiée. La méthode la plus répandue pour ce faire est l'emploi de brins d'ADN comme thermomètres locaux. En effet, Gareau *et al.*<sup>45</sup> ont démontré que des brins d'ADN bon marché couplés à des fluorophores pouvaient être utilisés avec une bonne sensibilité (0,05°C) sur une large gamme de température (30°C à 85°C). De façon similaire, Dias *et al.*<sup>46</sup> ont tiré profit de l'hybridation de brins d'ADN pour mesurer de manière extrêmement précise la température à la surface de nanoparticules d'oxyde de fer (Figure 11).

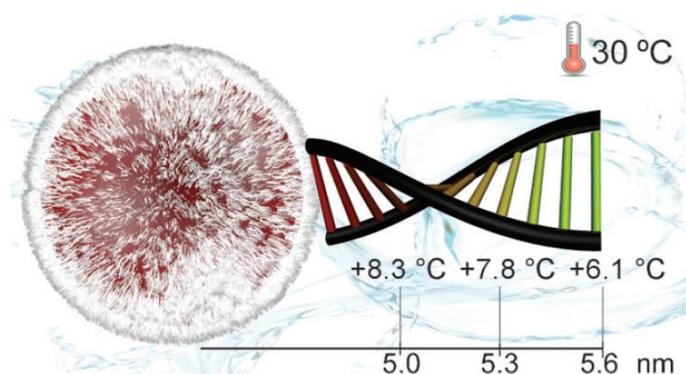


Figure 11 : Gradient de température déterminé au sein d'un brin d'ADN en fonction de sa distance à la surface d'une nanoparticule magnétique d'oxyde de fer<sup>46</sup>. 30°C : température macroscopique de la suspension.

### 3. Les polymères imprimés

#### 3.1. Les polymères à empreintes moléculaires

La dénomination polymère à empreintes de molécules désigne un polymère réticulé possédant des sites de reconnaissance extrêmement spécifiques d'une molécule particulière<sup>47,48</sup>. Les monomères, appelés monomères fonctionnels, interagissent avec la molécule cible, ou gabarit, par le biais de liaisons covalentes ou non<sup>49</sup>. La structure ainsi formée est appelée complexe de pré-polymérisation. La polymérisation est mise en œuvre dans le milieu réactionnel en présence de ce complexe, formant ainsi un réseau polymérique réticulé contenant la molécule gabarit. Une fois celle-ci extraite de la matrice polymère, des empreintes sont obtenues<sup>50</sup> (Figure 12). Il s'agit des sites de reconnaissance spécifique vis-à-vis de la molécule cible. Ces empreintes sont parfaitement complémentaires du gabarit, tant d'un point de vue physique que chimique. Le polymère à empreintes moléculaires est ainsi capable de reconnaître et adsorber de manière spécifique et sélective la molécule désirée, et ce même en présence d'un mélange de molécules analogues.



Figure 12 : Schématisation d'une empreinte moléculaire.

La technique de l'impression moléculaire n'est pas récente, puisque les premières mentions d'un tel phénomène de reconnaissance spécifique se retrouvent dans les travaux de Polyakov<sup>51</sup> datant du début des années 1930. En effet, il a montré que des gels de silice préparés dans des solvants non purs, contenant donc de petites molécules, présentaient par la suite une préférence pour ceux-ci face aux solvants purs. Cependant, ces travaux et ceux de Dickey<sup>52</sup> menés à la fin des années 1940, portant sur la synthèse de gels de silice en présence de colorants, ne furent que très peu repris par l'ensemble de la communauté scientifique.

Il a fallu attendre 1972 et la première grande innovation dans le domaine des polymères à empreintes moléculaires, lorsque Wulff *et al.*<sup>47,53</sup> parviennent à synthétiser les premiers polymères organiques imprimés, pour que ce domaine gagne en reconnaissance. Wulff *et al.* ont mis en œuvre ce qui sera plus tard appelée l'approche covalente (Figure 13b) : les monomères se lient de façon covalente à la molécule à imprimer, formant ce que l'on peut qualifier de super-monomère possédant plusieurs groupements polymérisables par la suite. La seconde grande innovation du domaine est l'apparition d'une approche dite non-covalente (Figure 13a), développée par Mosbach *et al.*<sup>54,55</sup> au début des années 1980 : les monomères fonctionnels forment un complexe auto-assemblé avec la molécule gabarit. Cette nouvelle approche de synthèse est à l'origine de l'essor des polymères à empreintes moléculaires. Enfin, il faut noter qu'en 1995, Whitcombe *et al.*<sup>56</sup> ont mis au point une troisième approche de synthèse, intermédiaire aux deux précédentes car l'interaction est covalente durant la polymérisation, et non-covalente lors des étapes suivantes d'adsorption spécifique.

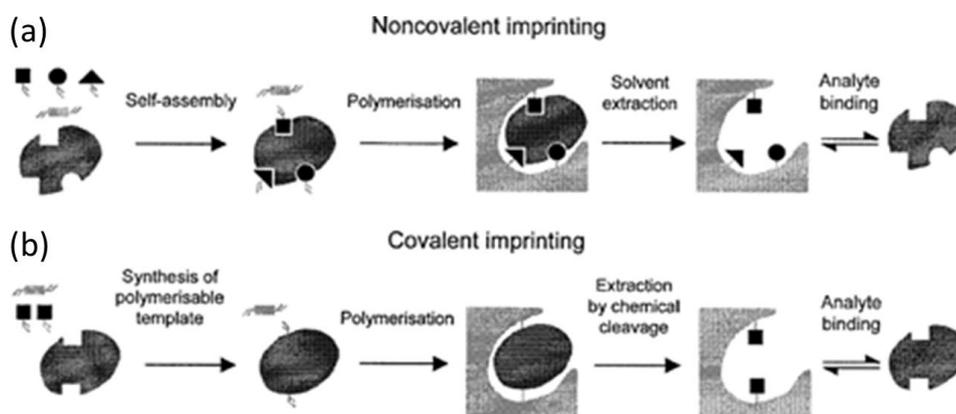


Figure 13: Elaboration de polymères à empreintes moléculaires<sup>49</sup>, par interactions covalentes (b) ou non-covalentes (a) entre la molécule à imprimer et les monomères fonctionnels.

L'approche covalente a pour intérêt majeur l'obtention de taux d'impression bien supérieurs à ceux des polymères à empreintes moléculaires obtenus par d'autres approches. Le terme taux d'impression désigne le nombre de sites de reconnaissance, ou empreintes, formés par particule de polymère, ou par masse de polymère.

Cependant, le choix du monomère et du gabarit est limité, ceux-ci devant être susceptibles de se coupler facilement, et les liaisons formées doivent en plus être susceptibles de se cliver dans des conditions n'impactant pas la matrice polymère. L'approche non-covalente offrant une plus grande liberté dans le choix du monomère fonctionnel, ou de la molécule à imprimer, est actuellement la plus employée. C'est d'ailleurs celle-ci que nous avons mis en œuvre au cours de cette thèse.

Les propriétés d'association – dissociation entre le polymère imprimé et le gabarit sont très proches des interactions entre bio macromolécules naturelles. C'est pourquoi les polymères à empreintes moléculaires sont fréquemment comparés à des anticorps synthétiques. Du fait de leur capacité de reconnaissance spécifique, les polymères à empreintes moléculaires trouvent leurs applications principales en tant qu'enzymes artificielles, par exemple pour obtenir préférentiellement un énantiomère plutôt que l'autre lors d'une synthèse<sup>57-59</sup> ou en tant qu'agent de dépollution, pour adsorber des colorants, tels que le méthyle orange<sup>52,60</sup> ou encore afin de mieux comprendre l'action de neurotransmetteurs, comme la morphine, en mimant leurs interaction avec leur récepteur<sup>60,61</sup>.

### 3.2. Les polymères à empreintes de protéines

#### *3.2.1. Les défis inhérents aux protéines lors de leur impression...*

La synthèse de polymères à empreintes de protéines reste encore aujourd'hui un domaine de recherche difficile mais stimulant<sup>49</sup>.

Lorsque l'on parle des défis apparaissant lors de l'impression de protéines, on fait principalement référence au fait que la synthèse de polymères à empreintes moléculaires a traditionnellement lieu dans un solvant organique<sup>62-64</sup>, avec un amorçage de polymérisation se faisant par chauffage<sup>65-67</sup>. Or les protéines sont des molécules biologiques, présentant une structure tertiaire particulière, très sensible aux différentes conditions expérimentales. Il est donc nécessaire d'adapter les conditions de synthèse afin de pouvoir travailler à des températures proches de l'ambiante dans des solvants aqueux<sup>68,69</sup>.

Les défis liés à l'impression des protéines sont également inhérents à leur taille<sup>70</sup>. En effet, les protéines sont de grosses molécules, en tout cas comparées à ce qui était imprimé auparavant<sup>52,57,60</sup>. En raison de cette taille, le transfert de masse des protéines au sein du polymère est très lent, et ce lors de leur adsorption ou extraction. Différentes stratégies de synthèse sont apparues afin de pallier ce problème, telles qu'un meilleur contrôle des polymérisations, l'impression non pas de protéines entières mais de parties de celles-ci nommées épitopes<sup>71,72</sup> (Figure 14), ainsi qu'une immobilisation des protéines sur une surface<sup>68,70,73</sup>. Cette deuxième stratégie est présentée plus en détails dans la partie suivante.

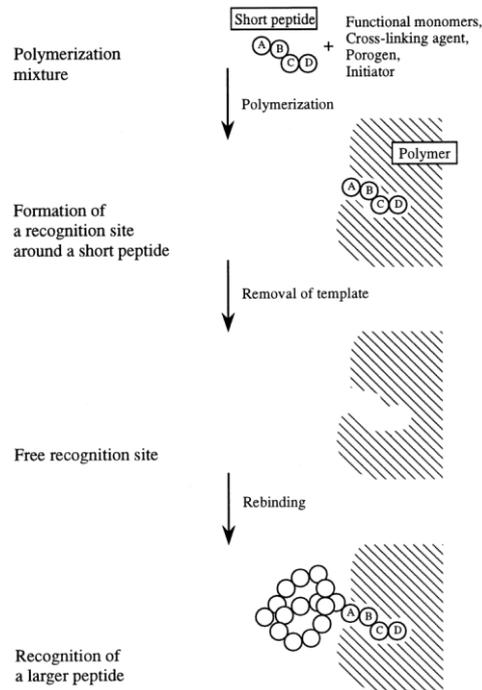


Figure 14 : Formation d'un polymère imprimé pour reconnaître une protéine à partir de l'impression d'un épitope<sup>72</sup>.

Enfin, le grand nombre de sites fonctionnels présents à la surface des protéines pouvant interagir avec les monomères est paradoxalement problématique à leur impression. En effet, la différence de nature entre tous ces sites va mener à l'obtention d'une grande hétérogénéité dans la nature des liaisons formées et donc des sites de reconnaissance, et augmenter les possibilités d'adsorption non spécifiques de protéines compétitrices<sup>70</sup>. Le risque d'adsorption non-spécifique augmentant avec l'emploi de monomères chargés et la formation d'interactions électrostatiques<sup>71,74</sup>, le choix des monomères fonctionnels se trouve réduit aux seuls monomères neutres et hydrosolubles<sup>69</sup>.

### 3.2.2. Ont mené à l'apparition de voies de synthèses innovantes

Afin de synthétiser des nanoparticules de polymère à empreintes de protéine possédant une bonne spécificité vis-à-vis de la protéine cible (i.e. une faible adsorption non-spécifique d'autres protéines), il est envisageable de réduire la taille des objets au strict minimum pour qu'ils possèdent une empreinte. Pour ce faire, le groupe de K. Haupt notamment immobilise les protéines à imprimer sur des billes de verre<sup>75,76</sup>. Lorsque le polymère est sensible aux variations de températures (par exemple lorsqu'il contient du N-isopropylacrylamide), l'extraction de la protéine se fait par simple changement de température du milieu (Figure 15).

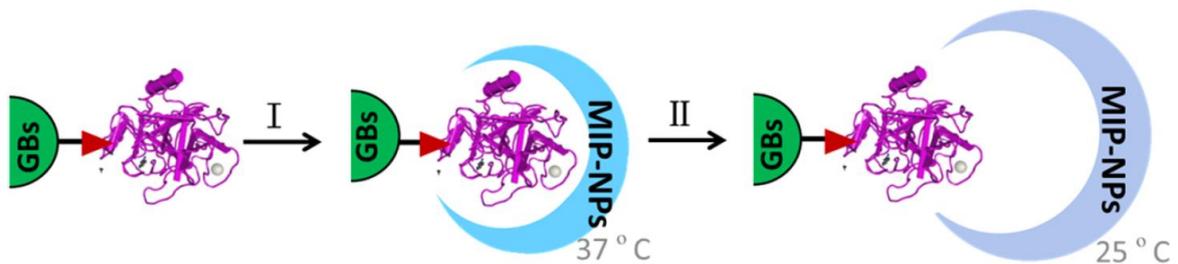


Figure 15 : Synthèse de polymères à empreintes de protéine (ici appelés MIP-NPs) lorsque celle-ci est immobilisée sur une bille de verre (GBs) et extraction par variation de température<sup>75</sup>.

Afin d'améliorer les performances des polymères imprimés, et notamment leur sélectivité vis-à-vis de la protéine cible, il est également possible de travailler avec des monomères non commerciaux. Certains auteurs produisent eux-mêmes leurs monomères<sup>77</sup> (réf revue). Par exemple, Koide *et al.* en 2017<sup>78</sup> ont effectué un important travail d'optimisation à la fois sur :

- sur la nature des monomères à employer. Les monomères de la colonne a sur la Figure 16 sont toujours employés, afin d'assurer les interactions de type hydrophobe, et la réticulation du polymère. L'optimisation s'est faite sur le choix du monomère anionique sulfate (Figure 16b). Le choix final s'est porté sur le monomère tri-sulfate présenté en rouge.

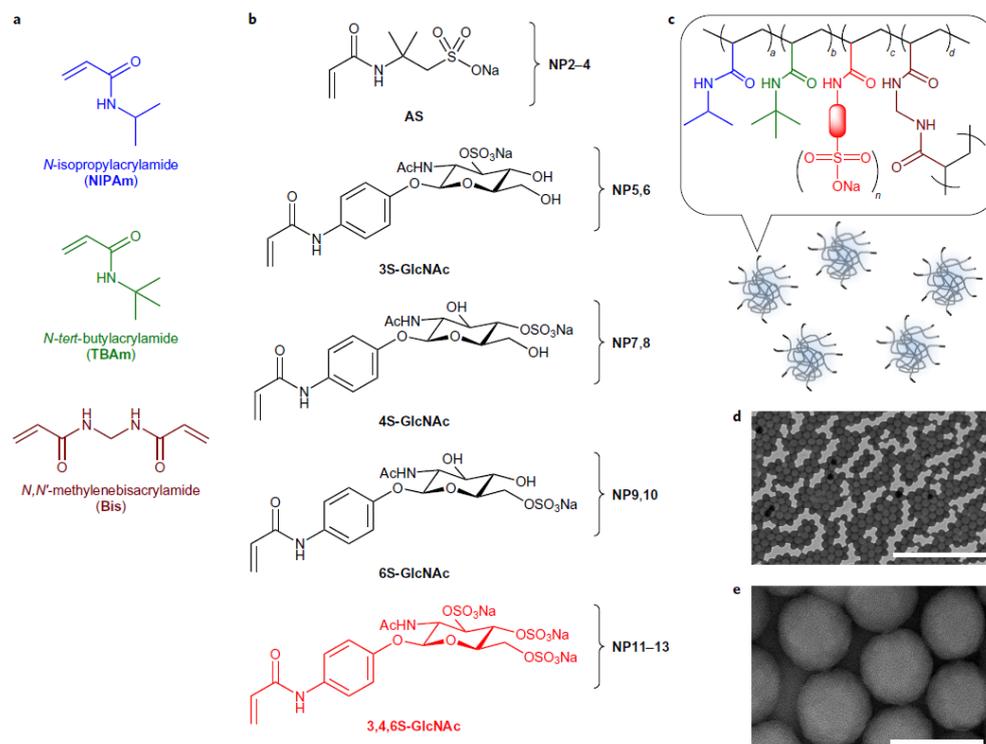


Figure 16 : Choix des monomères fonctionnels (a, b) pour obtenir un copolymère à bloc (c) et microscopie des particules obtenues (d : barre d'échelle 1 μm, e : barre d'échelle 100 nm)<sup>78</sup>.

- sur l'arrangement spatial des monomères au sein du polymère imprimé (Figure 17), afin de maximiser à la fois les interactions électrostatiques et de type hydrophobe. La solution retenue est celle présentée Figure 17d.

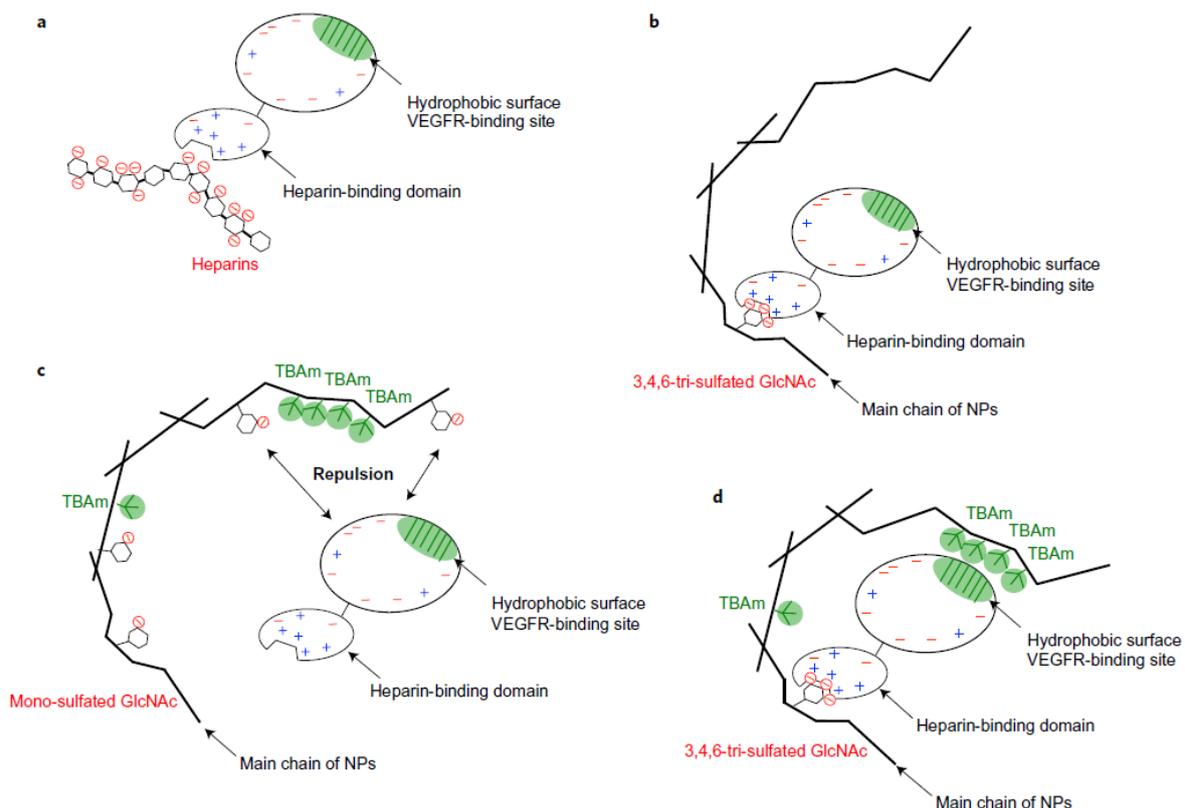


Figure 17 : Principales interactions entre la protéine à reconnaître et le polymère imprimé (NP)<sup>78</sup>. Les monomères et abréviations auxquels il est fait référence sont ceux de la figure précédente.

### 3.3. Applications en santé des polymères à empreintes de protéines

#### 3.3.1. Détection et diagnostic

Les polymères à empreintes de protéines trouvent leurs applications principales en séparation ou en diagnostic<sup>79</sup>. En effet, il est très intéressant d'avoir des systèmes capables d'isoler et d'identifier certaines protéines d'un milieu complexe, telles que les lipoprotéines de haute densité dont la concentration dans le sang peut être un marqueur de maladies cardio-vasculaires<sup>80</sup>.

Les polymères à empreintes de protéines peuvent être employés en tant que bio récepteurs dans un capteur<sup>81,82</sup>, qu'il soit électrochimique<sup>83</sup>, fluorescent<sup>84,85</sup> ou électro-chimiluminescent<sup>86</sup>. Ils présentent en effet toutes les caractéristiques pour ce faire, à savoir la possibilité de cibler spécifiquement un analyte avec une forte constante d'affinité, ainsi qu'une grande stabilité thermique et chimique permettant leur régénération et leur utilisation lors de nombreux tests. La méthode de détection couplée à l'emploi de polymères à empreintes de protéines la plus employée est la fluorescence (Figure 18), du fait de la rapidité de la réponse et de sa facilité d'usage, bien que d'autres méthodes possèdent des limites de détection, et surtout de quantification, plus basses. En effet, les capteurs fluorescents ne peuvent en général quantifier des concentrations inférieures à  $10^{-6}$  mol/L<sup>87</sup>, bien que cette limite ait été fortement abaissée par Piloto et al.<sup>88</sup> en 2018, tandis que certains capteurs électro-chimiluminescents possèdent une limite de quantification de l'ordre de  $10^{-12}$  mol/L<sup>86</sup>.

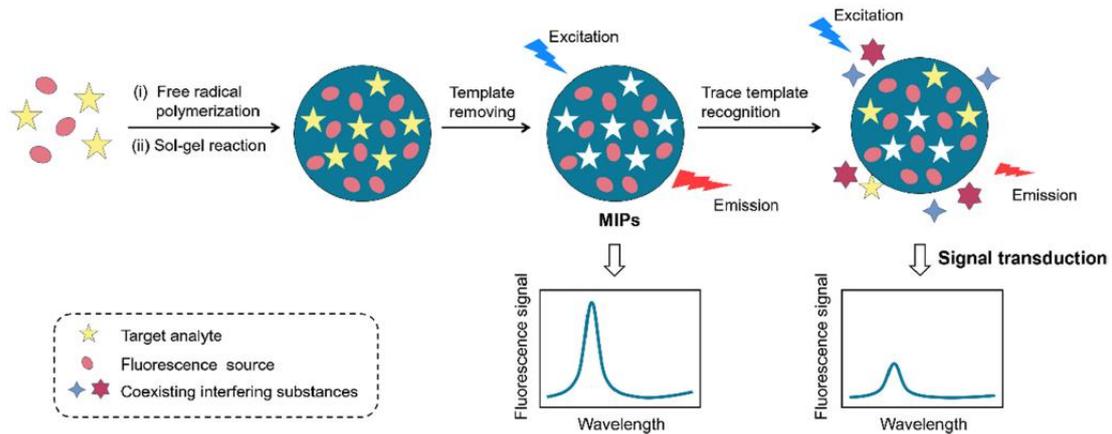


Figure 18 : Schéma de principe d'un capteur fluorescent dont le système de reconnaissance de l'analyte (template) est constitué d'un polymère à empreintes moléculaires (MIPs)<sup>84</sup>.

En 2015, Tang *et al.*<sup>89</sup> ont par exemple développé un système permettant la détection d'interleukine-8, une cytokine produite principalement par les cellules épithéliales dans la salive, une fois que celles-ci ont détecté la présence d'agents pathogènes. Des nanoparticules de magnétite, recouvertes d'oxyde de graphène puis de polymère imprimé, ont été déposées sur un film d'or afin de créer une électrode de travail, et donc un capteur électrochimique (Figure 19a à c). L'interleukine-8 est détectée par une modification du courant mesuré : plus la concentration en protéine est élevée et plus le courant diminue. Ce système peut quantitativement détecter des quantités d'interleukine-8 variant entre 0 et 10 pM (Figure 19d) et a été employé avec succès afin de mesurer la quantité de protéine présente dans des échantillons salivaires de 12 personnes.

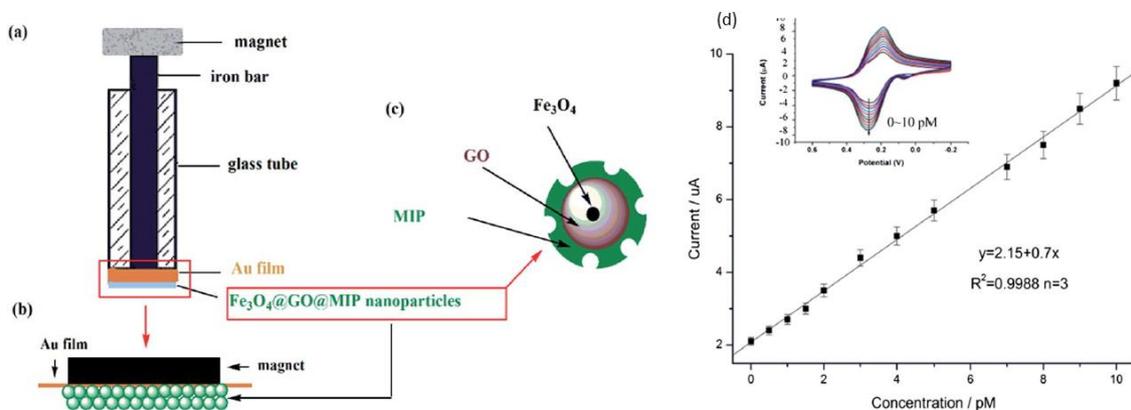


Figure 19 : Capteur électrochimique pour la détection d'interleukine-8<sup>89</sup>. Représentation schématique de l'électrode de travail (a), avec un grossissement de sa surface (b), et des nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de graphène (GO) et de polymère à empreintes de protéines (MIP) (c). (d) : courbe de calibration permettant de déterminer la concentration en interleukine-8 à partir du courant mesuré par l'électrode de travail.

Un autre capteur électrochimique a été produit par Lee *et al.* en 2017<sup>90</sup> en déposant un film polymère imprimé susceptible de reconnaître la protéine REG1B (regenerating protein 1B), un biomarqueur des cancers du pancréas, sur une électrode de travail. Le polymère a été obtenu en imprimant non pas la protéine à reconnaître mais trois courtes séquences peptidiques, suffisamment caractéristiques de celle-ci pour entraîner son adsorption sélective (Figure 20). Différents échantillons biologiques ont été analysés grâce à ce capteur et ont permis d'identifier les patients atteints d'un cancer du pancréas des patients sains, les résultats étant en accord parfaits avec ceux obtenus à l'aide d'un test de diagnostic classique.

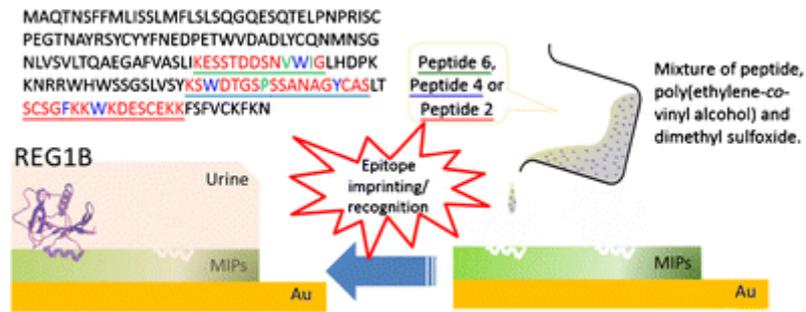


Figure 20 : Reconnaissance de la protéine REG1B dans l'urine à l'aide d'un capteur électrochimique<sup>90</sup> composé d'une couche d'or recouverte d'un polymère à empreintes moléculaires (MIPs) obtenus par impression d'épitopes (Peptide).

En 2018, c'est un capteur fluorescent pour la détection de myoglobine qui a été développé par Piloto *et al.*<sup>88</sup> en synthétisant un polymère imprimé autour de nanoparticules de tellure de cadmium. Une attention toute particulière a été portée sur l'optimisation du protocole de synthèse du polymère, afin d'améliorer le signal de fluorescence des nanoparticules. Cette optimisation a permis un abaissement de la limite de détection à  $7,6 \cdot 10^{-15}$  mol/L et surtout un abaissement de la limite de quantification à  $50,6 \cdot 10^{-15}$  mol/L, ce qui est, à notre connaissance, la meilleure performance obtenue à l'heure actuelle par un capteur fluorescent.

Les polymères à empreintes de protéines peuvent également être employés lors de dosages immuno-sérologiques, et notamment dans des tests ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Les tests ELISA existent sous trois principaux formats. Le premier est une détection directe : un anticorps, dit primaire, va se lier à l'analyte. L'anticorps est bien souvent couplé à une enzyme, à l'origine de la production du signal détectable. Le deuxième est une détection indirecte : le signal est produit par un anticorps secondaire qui va reconnaître un anticorps primaire, lui-même en interaction avec l'analyte. Enfin, le troisième format de test ELISA est dit sandwich, car l'analyte se lie en même temps à deux anticorps distincts.

Lors de ces tests ELISA, les anticorps peuvent être remplacés par des polymères à empreintes de l'analyte à détecter. Ceux-ci furent notamment employés avec succès par Bi et Liu en 2014<sup>91</sup> afin de quantifier l'alpha foeto-protéine d'un milieu complexe par un test ELISA dit sandwich (Figure 21). Pour ce faire, un polymère à empreintes de la protéine d'intérêt a été synthétisé au fond des puits de détection du test ELISA. Après incubation d'une solution de protéines, des anticorps anti-alpha foeto-protéine sont ajoutés et peuvent se lier spécifiquement à cette protéine. Ces anticorps produisent ensuite un signal détectable afin de quantifier la présence de l'alpha foeto-protéine. La BSA (albumine sérique bovine) est présente afin d'empêcher une adsorption non-spécifique de l'anticorps.

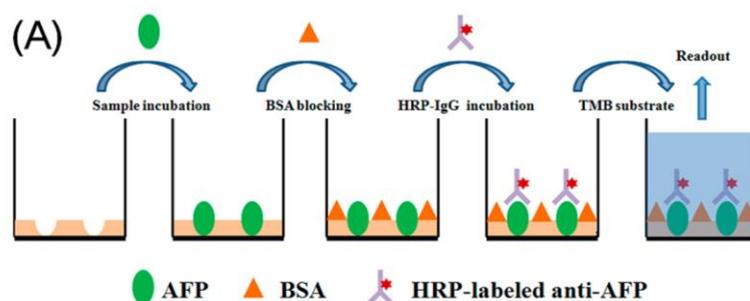


Figure 21 : Test ELISA dit sandwich pour la détection de l'alpha foeto-protéine (AFP)<sup>91</sup>. IgG : immunoglobuline G et TMB : 3,3',5',5'-tetraméthylbenzidine dihydrochloride.

### 3.3.2. Délivrance ciblée de principe actif *in vitro*

Les polymères à empreintes de protéines peuvent également servir en tant qu'agent de ciblage lorsque l'on cherche à effectuer une délivrance ciblée de principe actif, par exemple dans le cas d'une thérapie anti-cancéreuse. Canfarotta *et al.* ont démontré en 2018 qu'il était possible de délivrer sélectivement, de manière passive, de la doxorubicine à des cellules MDA-MB 468<sup>92</sup>. Ces cellules sont caractéristiques d'un cancer du sein et présentent à leur surface la protéine EGFR (récepteur du facteur de croissance de l'épiderme) qui a été imprimée. C'est l'impression de cette protéine qui assure le ciblage.

Quelques mois plus tard, ce sont des cellules sénescents qui ont été ciblées. Ekpenyong-Akiba, Canfarotta *et al.*<sup>93</sup> ont pour ce faire employé des polymères à empreintes de protéines (MIPs sur la Figure 22) caractéristiques de micro-globuline  $\beta_2$  (marqueur de la sénescence cellulaire<sup>94</sup>, Figure 22a) afin d'y améliorer la délivrance d'un principe actif, le Dasatinib (voir Figure 22b).

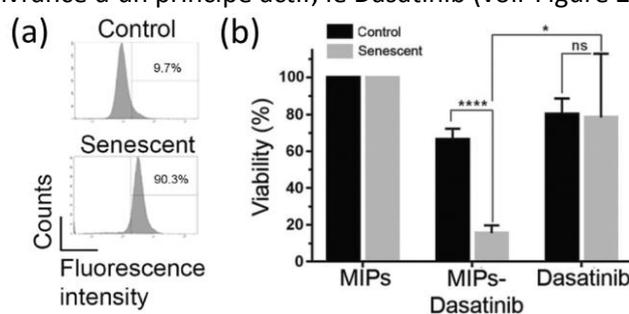


Figure 22 : Ciblage de cellules sénescents à l'aide de polymères à empreintes de protéines (MIPs), vérifié par cytométrie en flux (a) afin d'améliorer la délivrance du Dasatinib et induire une mort cellulaire (b), adapté de réf<sup>93</sup>.

### 3.3.3. Ciblage *in vivo*

Les applications des polymères à empreintes de protéines ne sont pas uniquement *in vitro* comme discuté précédemment. Ceux-ci ont également été utilisés pour des applications *in vivo*.

Lorsque des nanoparticules sont injectées *in vivo*, des biomolécules et principalement des apolipoprotéines et des immunoglobulines vont s'adsorber à leur surface en formant une « corona » ou couronne protéique. Celle-ci est à l'origine de la reconnaissance par le système immunitaire des nanoparticules comme corps étranger et de leur élimination. Afin de moduler cette réponse immunitaire, il est possible de jouer sur la nature de la surface des nanoparticules. Takeuchi *et al.*<sup>95</sup> ont démontré en 2017 que des nanoparticules à empreintes d'albumine sérique sont capables de se recouvrir d'une couche d'albumine après injection *in vivo*. La présence de l'albumine réduit l'adsorption d'autres protéines et donc la formation de la corona. Le temps de résidence dans le système sanguin des nanoparticules de polymère imprimé est plus important que celui de particules de polymère non imprimé (PNI, ici NIP : non-imprinted polymer). En effet, le temps de résidence des polymères imprimés est de presque 7h contre seulement 3h pour les polymères non-imprimés (Figure 23).

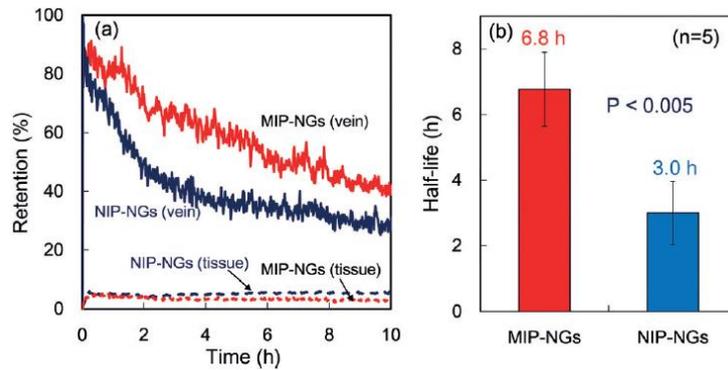


Figure 23 : Rétention (a) et temps de demi-résidence (b) de nanoparticules de polymères imprimés (MIP-NGs) et non imprimés (NIP-NGs) dans le système sanguin de souris<sup>95</sup>.

La présence de polymère à empreintes de protéines autour de nanoparticules en IRM peut donc être un moyen d’augmenter la furtivité, en empêchant la formation de la corona.

Des polymères à reconnaissance spécifique du facteur de croissance de l’endothélium vasculaire (VEGF, vascular endothelial growth factor) ont été synthétisés simultanément et avec succès en 2017 par deux groupes de recherche distincts<sup>78,96</sup>. Grâce à leurs polymères à empreintes, ces deux groupes ont obtenu un ciblage cellulaire spécifique et efficace *in vivo*, parvenant par là-même à ralentir la vascularisation de nouveaux tissus<sup>78</sup>. Les deux systèmes présentés ici présentent la particularité de ne pas utiliser la protéine complète en tant que gabarit, mais uniquement une petite partie de celle-ci, nommée épitope, peut-être à cause du coût trop élevé lié à l’obtention de la protéine, ou encore au fait que la protéine ciblée étant transmembranaire, seule la partie externe est intéressante pour effectuer du ciblage et il n’y avait donc pas de réel besoin de cibler la protéine entière.

En 2017, afin de démontrer le ciblage effectif ayant lieu grâce à ces objets imprimés, Koide *et al.* ont implanté des matrices de membranes basales, riches en protéines de matrice extracellulaire, et commercialisées sous le nom de matrigels, chez des souris saines puis ont suivi la vascularisation de ces matrices au cours du temps pour différentes combinaisons de conditions expérimentales<sup>78</sup>.

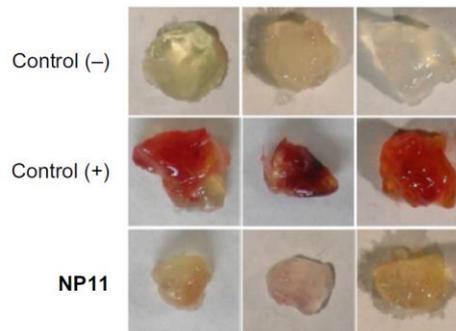


Figure 24 : Tumeurs retirées après 10 jours d’implantation, avec différentes combinaisons de paramètres expérimentaux, et photographiées sous différents angles. Control (-) : tumeur seule, Control (+) : tumeur et protéine VEGF, NP11 : tumeur, protéine VEGF et polymère à empreintes de protéines<sup>78</sup>.

Sur la Figure 24, les matrices identifiées comme «Control (-)» concernent des matrices implantées seules au sein des souris tandis que les matrices «Control (+)» concernent des matrices implantées en présence de VEGF. Enfin, NP11 identifie les matrices ayant été injectées en présence de VEGF et de polymère à empreintes de VEGF. On peut alors voir qu’en l’absence de VEGF, il n’y a pas de vascularisation (matrices «Control (-)»), tandis qu’il y a développement d’un circuit sanguin pour les matrices présentant cette protéine (matrices «Control (+)»). La protéine VEGF est donc bien

responsable de la vascularisation d'amas cellulaires. En présence du polymère (matrices « NP11 »), la vascularisation est très fortement ralentie, proche de ce que l'on obtient pour les matrices «Control (-)», et ce malgré la présence de la protéine VEGF. Le ciblage de la protéine VEGF par un PEP permet donc l'inhibition de la communication et la vascularisation du milieu.

En 2018, Koide *et al.* ont cette fois inoculé des cellules cancéreuses du côlon (Colon26 NL-17 carcinoma cells) chez des souris avant de mener le même type d'expérience avec leur polymère à empreintes de VEGF<sup>97</sup>. Le contrôle était effectué à l'aide de souris n'ayant pas subi d'injection de nanoparticules de polymères à empreintes de VEGF. Les résultats obtenus sont tout aussi probants que ceux présentés Figure 24. En effet, les nanoparticules de polymère à empreintes de VEGF (ici nommées NP1) permettent de ralentir la croissance de la tumeur (Figure 25b) en réduisant la quantité de vaisseaux sanguins (Figure 25d). Ainsi, le ciblage *in vivo* de la protéine d'intérêt est efficace, et entraîne son inhibition.

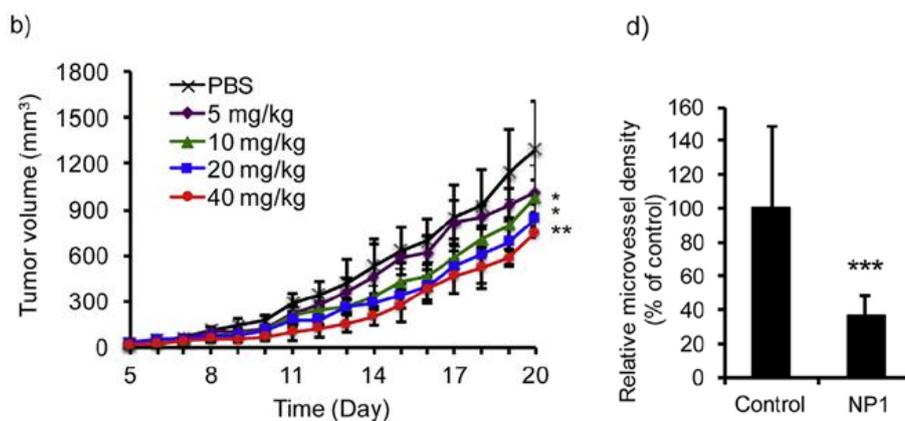


Figure 25 : Ralentissement de la croissance tumorale (b) par inhibition de l'angiogenèse (d) *in vivo*<sup>97</sup>, après injection de polymères à empreintes de protéines (NP1) à différentes concentrations dans un tampon PBS.

### 3.4. Les polymères à empreintes de virus, bactéries ou cellules

Les succès obtenus lors de la synthèse de polymères à empreintes de protéines indiquent que les problèmes inhérents à la taille des gabarits d'impression ne sont pas insurmontables. En effet, des systèmes encore plus volumineux et sensibles aux conditions expérimentales ont été imprimés avec succès dans des matrices polymères.

En effet, dès 2002, Dickert *et al.*<sup>98</sup> ont réussi à synthétiser des polymères à empreintes de levures, avant de poursuivre leurs travaux avec l'impression de virus<sup>99</sup>. Ces travaux, pionniers sur l'impression de cellules entières, ont ouvert la voie à l'impression de nombreux autres virus, tels que ceux de Cumbo *et al.* en 2013<sup>100</sup> (Figure 26). Un peu plus tard, ce sont les polymères à empreintes de bactéries, telles qu'*Escherichia coli* qui ont vu le jour<sup>101,102</sup>.

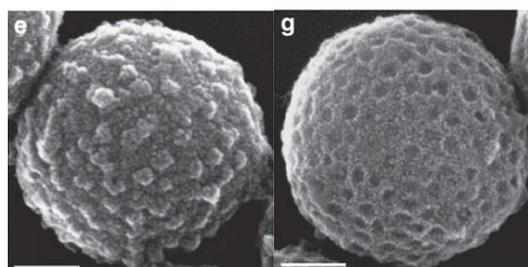
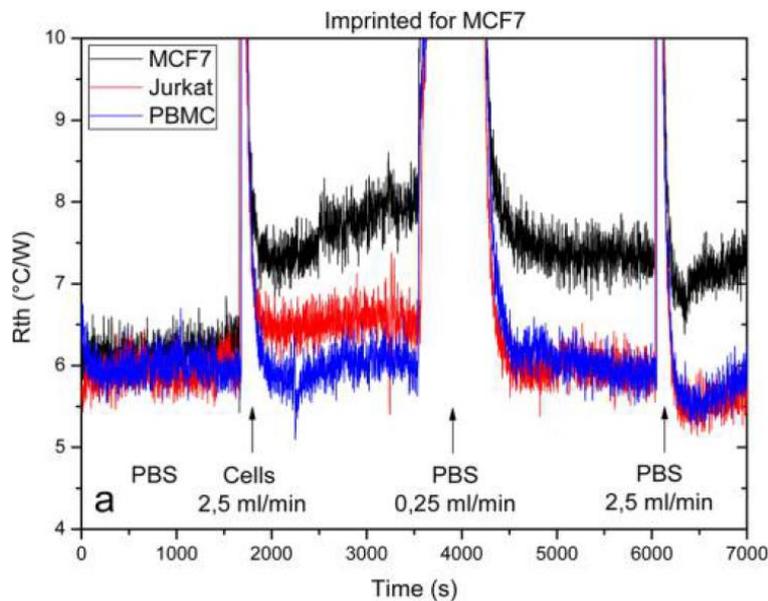


Figure 26 : Particules de polymère à empreintes de virus, avant (e) et après (g) extraction<sup>100</sup>. Barre d'échelle : 100 nm.

Enfin, des polymères à empreintes de cellules de mammifères ont été synthétisés avec succès au cours des dernières années. Bonakdar *et al.* ont réussi à moduler la différenciation de cellules souches en les faisant se développer sur un substrat à empreintes de chondrocytes<sup>103</sup>. Tandis que Eersels *et al.*<sup>104</sup> et Liu *et al.*<sup>105</sup> ont préféré employer leurs polymères imprimés pour identifier des cellules cancéreuses (Figure 27).



#### 4. Les systèmes hybrides oxyde de fer – polymère à empreintes de protéines (PEP)

##### 4.1. Les objets hybrides

Comme nous venons de le voir, les polymères à empreintes peuvent agir en tant que récepteurs pour la reconnaissance d'une molécule ou protéine spécifique. Du fait de leurs avantages certains en termes de facilité d'usage, sélectivité, et stabilité, ils sont fortement employés en tant qu'extracteurs solides ou capteurs<sup>106</sup> (Figure 28). Cependant, ils possèdent également quelques inconvénients, comme une récupération peu aisée. Afin d'élargir le champ des applications possibles, et faciliter les étapes de synthèse et récupération des objets, des polymères à empreintes moléculaires multifonctionnels se présentant sous forme d'une structure cœur-coquille ont été développés. Ceux-ci se classent généralement en deux catégories, suivant que le polymère à empreintes constitue le cœur ou la coquille<sup>107</sup>.

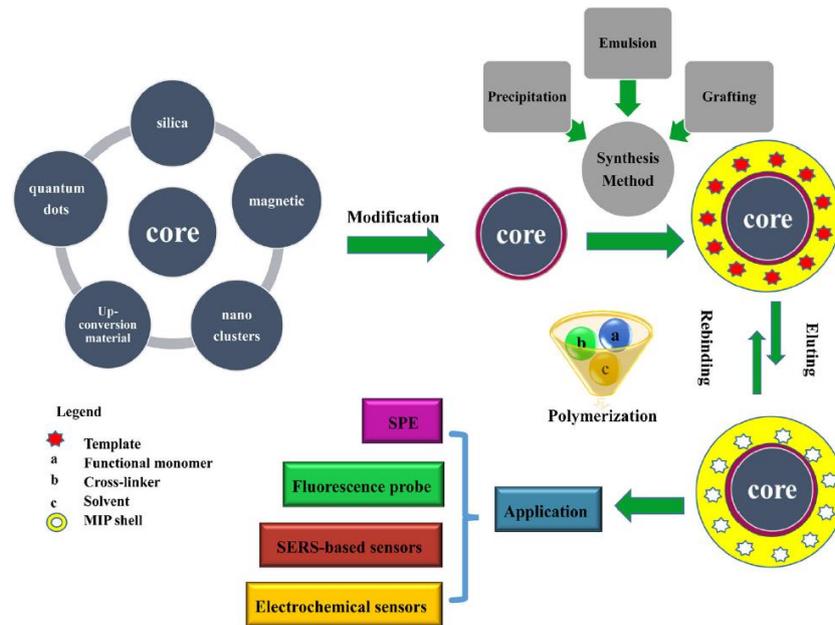


Figure 28 : Objets hybrides cœur-coquille possédant un polymère à empreintes de protéines (MIP) : nature du cœur, principe de la synthèse et applications principales<sup>106</sup>. SPE : extraction solide (solid-phase extraction), SERS : spectroscopie Raman (surface-enhanced Raman scattering).

Nous allons par la suite nous intéresser uniquement aux objets pour lesquels la partie inorganique est de l'oxyde de fer magnétique, magnétite ou maghémite, et dans lesquels le polymère à empreintes de protéines constitue la partie extérieure des nanosystèmes hybrides finaux.

Ces nanosystèmes hybrides peuvent être synthétisés sous différentes formes. En effet, trois morphologies différentes sont à distinguer. D'une part, on peut synthétiser des particules cœur-coquille dans lesquelles le cœur est constitué d'une unique nanoparticule d'oxyde de fer et la coquille est formée à l'aide du polymère à empreintes de protéines (Figure 29a). D'autre part, on peut synthétiser des particules cœur-coquille au sein desquelles le cœur est constitué de plusieurs nanoparticules d'oxyde de fer, agrégées (Figure 29b) ou bien dispersées au sein du polymère (Figure 29c).

Quand les protéines sont immobilisées à la surface des nanoparticules, et avec un bon contrôle de l'épaisseur de la couche de polymère synthétisée<sup>108-110</sup>, les empreintes obtenues sont plutôt bidimensionnelles, et non pas tridimensionnelles. L'idée d'empreintes bidimensionnelles fait référence à des cavités présentes à la surface du polymère : seulement une partie de la protéine est imprimée, et elle n'a pas besoin par la suite de diffuser au sein du polymère pour atteindre les sites de reconnaissance (Figure 29d). Au contraire, des empreintes tridimensionnelles sont totalement intégrées au sein du polymère et la structure complète de la protéine est imprimée (Figure 29e).

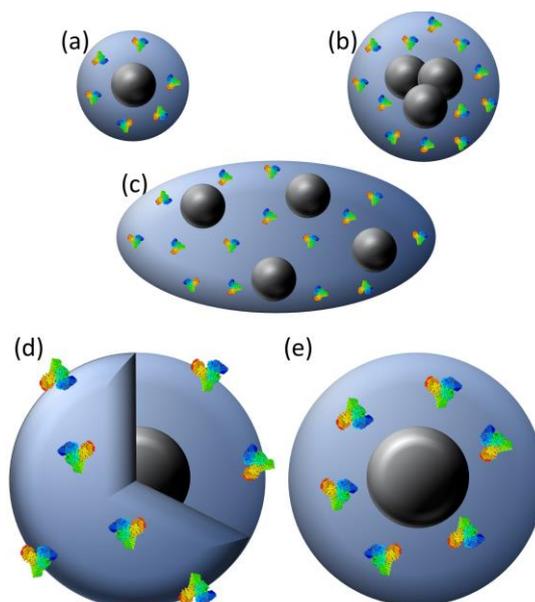


Figure 29 : Les trois principales morphologies d'objets hybrides : mono-cœur (a) ou multi-cœurs agrégés (b) ou dispersés (c) ; et les deux types d'empreintes : de surface (d) ou en volume (e). Bleu : PEP, noir : oxyde de fer magnétique, protéine modèle : BSA.

Les principaux intérêts à coupler des nanoparticules magnétiques et des polymères à empreintes de protéines pour des applications en santé sont développés un peu plus loin.

#### 4.2. Une synthèse déjà bien référencée dans la littérature

La synthèse de polymères à empreintes de protéines couplés à des nanoparticules magnétiques est un domaine de recherches encore très récent et actuellement en plein essor. Les premières études à ce sujet ont été menées en 2006 par Lu *et al.*<sup>111</sup> mais il faudra attendre 2010 pour véritablement voir apparaître un engouement pour le sujet, notamment avec les travaux de Kan *et al.*<sup>112</sup> La Figure 30 représente le dynamisme de ce domaine de recherche au cours des dernières années.

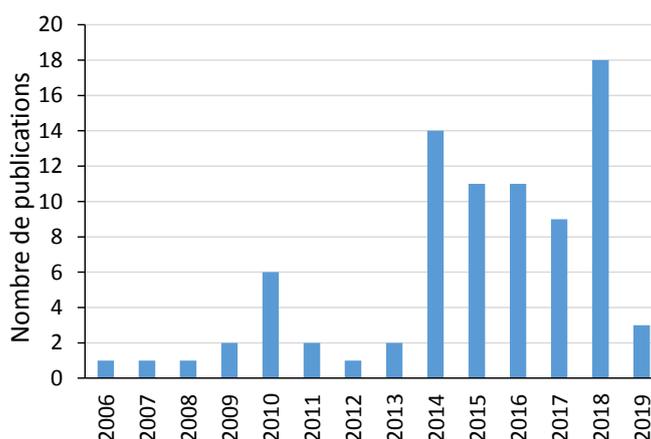


Figure 30 : Nombre de publications portant sur des systèmes hybrides nanoparticule d'oxyde de fer magnétique - polymère à empreintes de protéines, par année. (Données en avril 2019 compilées à partir de Google Scholar, Web of science, Scopus)

Un état de l'art de ce domaine a été réalisé en 2013 par Lv *et al.*<sup>113</sup> mais les nanoparticules d'oxyde de fer étaient présentées comme un support possible parmi d'autres à la synthèse de polymères à empreintes de bio-macromolécules. De plus, le choix de différents paramètres de synthèse tels que la

nature du monomère ou la méthode d'extraction à employer n'était pas abordé. Nous nous sommes alors proposées de réaliser un état de l'art plus complet des systèmes hybrides constitués de nanoparticules d'oxyde de fer magnétique et de polymère à empreintes de protéines<sup>114</sup>. Celui-ci a fait l'objet d'une revue publiée en 2018 chez *J. Mater. Chem. B* (copyright RSC). La revue complète est présentée en annexe 4 à partir de la page 225. Le lecteur est invité à s'y référer pour obtenir de plus amples informations sur la synthèse des polymères imprimés ainsi que sur la détermination de leurs performances *in vitro*. Les principales idées à retenir sont cependant résumées ci-dessous :

- Les oxydes de fer employés doivent être fonctionnalisés avant la synthèse du polymère à empreintes de protéines (Figure 31). Plusieurs fonctionnalisations de surface sont possibles, avec pour objectif de faciliter l'intégration des oxydes de fer au sein de la matrice polymère ou alors de fixer la protéine à imprimer à proximité de la surface des particules.

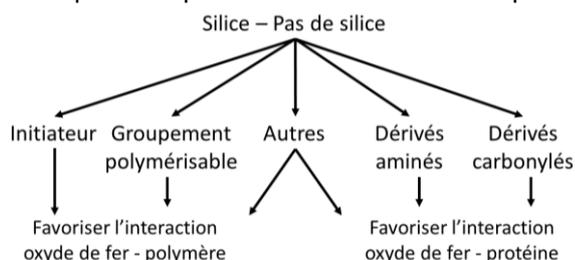


Figure 31 : Principales voies de fonctionnalisation de la surface des nanoparticules d'oxyde de fer.

- Différents monomères peuvent être employés pour former le polymère à empreintes de protéines. De manière générale, ceux-ci sont choisis suivant deux critères. D'une part, pour leur capacité à engager des liaisons hydrogènes avec les acides aminés et donc leur forte affinité avec les protéines. D'autre part, pour leur possibilité d'interaction avec la surface des nanoparticules. Ils peuvent être optimisés pour réduire l'adsorption non-spécifique d'autres protéines à la surface du polymère.
- Après synthèse, les protéines ayant servi de gabarit doivent être retirées du polymère. Les méthodes d'extraction des protéines sont variées et peuvent influencer les performances des objets hybrides synthétisés, notamment en modifiant la structure du polymère.
- La synthèse des PEP a lieu en milieu aqueux à basse température afin de respecter la nature fragile des protéines.
- L'optimisation des protocoles se fait dans le but d'obtenir des systèmes présentant une adsorption spécifique, sélective, et rapide.

#### 4.3. Applications des objets hybrides

A l'heure actuelle, l'ajout du magnétisme aux polymères à empreintes de protéines n'a pas induit de révolution dans leurs applications. Les propriétés magnétiques des oxydes de fer sont largement sous-utilisées, servant principalement à faciliter leur manipulation et à réduire le temps nécessaire aux étapes de lavage. Les protéines imprimées étant encore aujourd'hui majoritairement la BSA (albumine sérique bovine), l'hémoglobine bovine et le lysozyme, l'application principale des objets hybrides se trouve sous forme d'extracteurs solides (Figure 32). Ils sont employés afin d'analyser des milieux biologiques tels que le blanc d'œuf<sup>115,116</sup> ou le sang<sup>117,118</sup>, ou pour les purifier<sup>77,119</sup>.

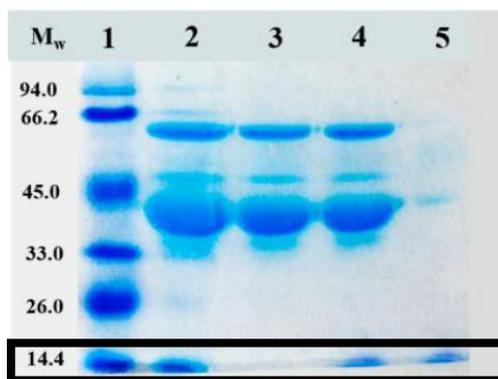


Figure 32 : Analyse SDS-PAGE de blanc d'œuf<sup>120</sup>. Ligne 1 : Marqueur de poids moléculaires de différentes protéines (14,4 kDa : lysozyme). Ligne 2 : Blanc d'œuf dilué 20 fois avant traitement. Ligne 3 : Blanc d'œuf dilué 20 fois après traitement par le PEP. Ligne 4 : Blanc d'œuf dilué 20 fois après traitement par le PNI. Ligne 5 : Eluat obtenu après extraction des PEP. SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du sodium dodécyle sulfate.

Ces systèmes présentent très peu d'applications en termes de récupération de protéines dans les cellules (une seule publication à notre connaissance<sup>121</sup>) et encore aucune en termes de ciblage cellulaire. Pour autant que l'on sache, les propriétés d'hyperthermie magnétique n'ont jamais été utilisées pour produire une élévation locale de température au sein des polymères et ainsi dénaturer les protéines adsorbées, ou encore pour effectuer un relargage contrôlé de principe actif après ciblage de la zone à traiter.

De nouvelles applications de ces systèmes hybrides sont donc envisageables, afin de tirer parti à la fois de la reconnaissance spécifique induite par le PEP, et des propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer.

#### 4.4. Vers de nouvelles thérapies ciblées

Au début de ce chapitre, nous avons abordé trois types de traitement pouvant être mis en œuvre lors d'une thérapie anti-cancéreuse, ainsi que leurs limitations principales. Les polymères à empreintes de protéines, couplés à des nanoparticules magnétiques, peuvent permettre de les surmonter :

- Concernant la délivrance de drogues, les systèmes actuels permettent soit un relargage contrôlé grâce aux propriétés d'hyperthermie magnétique des nanoparticules d'oxyde de fer<sup>12,13</sup>, soit un relargage ciblé à proximité des cellules cancéreuses grâce à un ciblage de celles-ci par un PEP<sup>92</sup>. Il est donc envisageable de créer de nouvelles plateformes pour effectuer une délivrance à la fois ciblée et contrôlée de ces principes actifs.
- Concernant l'inhibition de la communication entre récepteurs membranaires, Koide *et al.* ont montré qu'il était possible d'employer des polymères imprimés pour ce faire<sup>78,97</sup> (voir page 29). Cela constitue une alternative intéressante à l'emploi d'anticorps, car moins coûteuse, en temps de synthèse comme en moyens financiers, une fois le protocole d'obtention optimisé. Nous pouvons envisager d'aller encore plus loin, en combinant ces polymères avec des particules magnétiques afin de pouvoir les accumuler directement à proximité de la tumeur à traiter par application d'un champ magnétique externe, et ainsi réduire les risques pour les tissus sains.
- Une inhibition pouvant également être la conséquence d'une dénaturation de protéine, nous pouvons aussi envisager d'employer les propriétés d'hyperthermie magnétique des oxydes de fer pour dénaturer les protéines adsorbées au sein d'un PEP.

De nombreuses portes s'ouvrent alors quant à l'utilisation des objets hybrides particules magnétiques – polymère à empreintes de protéines en nanomédecine. Au cours de ce travail de doctorat, nous nous sommes concentrées sur le ciblage et la dénaturation par hyperthermie magnétique des protéines ciblées.



# Chapitre 2 : Synthèse des nano-objets hybrides $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP



## Table des matières

1.	Synthèse et caractérisations des nanoparticules de maghémite $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	43
1.1.	Synthèse des particules .....	43
1.2.	Caractérisations des nanoparticules synthétisées .....	44
1.2.1.	Structure et morphologie .....	44
1.2.2.	Propriétés magnétiques .....	46
1.2.3.	Nature de la surface .....	47
2.	Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules d'oxyde de fer $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	48
2.1.	L'agent de fonctionnalisation .....	48
2.2.	Une fonctionnalisation effective .....	49
2.2.1.	Modification de l'état de surface des particules .....	49
2.2.2.	Modification de la charge apparente des particules.....	50
3.	Obtention de polymères à empreintes de protéines (PEP) .....	51
3.1.	La BSA employée comme gabarit de synthèse.....	51
3.2.	La mise en œuvre d'une polymérisation contrôlée de type RAFT .....	51
3.2.1.	Pourquoi une polymérisation contrôlée .....	51
3.2.2.	Principe de la polymérisation RAFT .....	52
3.3.	Synthèse des nano-objets hybrides.....	53
3.3.1.	Principe générale de la synthèse.....	53
3.3.2.	La composition du milieu réactionnel .....	54
3.3.3.	Synthèse d'un polymère fluorescent .....	55
3.3.4.	Un amorçage thermique ou rédox ? .....	56
3.3.5.	Quelle durée de polymérisation ? .....	56
3.3.6.	Optimisation de la méthode d'extraction .....	57
3.4.	Caractérisations des nano-objets hybrides $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP.....	59
3.4.1.	Morphologie et taille des nano-objets hybrides .....	59
3.4.2.	Propriétés magnétiques .....	61
3.4.3.	Visualisation du couplage entre particules magnétiques et polymère .....	63

3.4.4.	Sélectivité du polymère obtenu .....	64
4.	Conclusion sur la synthèse et la caractérisation des objets hybrides .....	65
5.	Matériels et méthodes .....	66
5.1.	Réactifs chimiques.....	66
5.2.	Techniques de caractérisations et appareils de mesure .....	66
5.2.1.	Diffraction des rayons X .....	66
5.2.2.	Diffusion dynamique de la lumière .....	67
5.2.3.	Potentiométrie Zeta .....	68
5.2.4.	Analyse thermogravimétrique.....	68
5.2.5.	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier .....	68
5.2.6.	Relaxométrie .....	68
5.2.7.	Mesure de l'aimantation à saturation.....	68
5.2.8.	Hyperthermie magnétique .....	69
5.2.9.	Microscopie optique.....	69
5.2.10.	Spectroscopie UV-Visible.....	70
5.2.11.	Spectroscopie de fluorescence.....	70
5.3.	Synthèse des nanoparticules de maghémite .....	70
5.4.	Fonctionnalisation par l'agent Iniferter.....	72
5.5.	Synthèse du PEP et du PNI .....	72
5.6.	Réalisation d'isothermes d'adsorption .....	74

Ce chapitre s'intéresse à la synthèse des systèmes hybrides composés de nanoparticules d'oxyde de fer magnétique et de polymère à empreintes de protéines, qui seront ensuite nommés  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ . Cette synthèse s'effectue en trois étapes. Dans un premier temps, les nanoparticules d'oxyde de fer sont synthétisées, puis leur surface est fonctionnalisée avec un agent qui permet d'amorcer la polymérisation depuis leur surface, et enfin le polymère est synthétisé, en présence des protéines servant de gabarit. Une dernière étape consiste alors à extraire les protéines du PEP magnétique pour obtenir les empreintes. Les produits obtenus après chaque étape de synthèse sont caractérisés avec attention.

## 1. Synthèse et caractérisations des nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

L'intérêt de travailler avec des nanoparticules de maghémite a été discuté dans le chapitre précédent. Celles que nous souhaitons employer par la suite devront posséder un pouvoir chauffant conséquent pour des applications en nanomédecine. Des études antérieures menées au laboratoire ont montré que la taille optimale des nanoparticules était d'environ 11 nm<sup>122</sup> pour avoir un pouvoir chauffant intéressant à une fréquence de 335 kHz, soit une fréquence qui ne détruit pas les tissus sains *in vivo*. Cette taille de particules est obtenue par co-précipitation suivie d'un tri en taille.

### 1.1. Synthèse des particules

La synthèse des nanoparticules de maghémite s'est faite en deux étapes suivant un protocole optimisé par R. Massart<sup>25</sup>, à partir des travaux de J. LeFort portant sur la synthèse de la magnétite<sup>24</sup>, tel que schématisé sur la Figure 33.

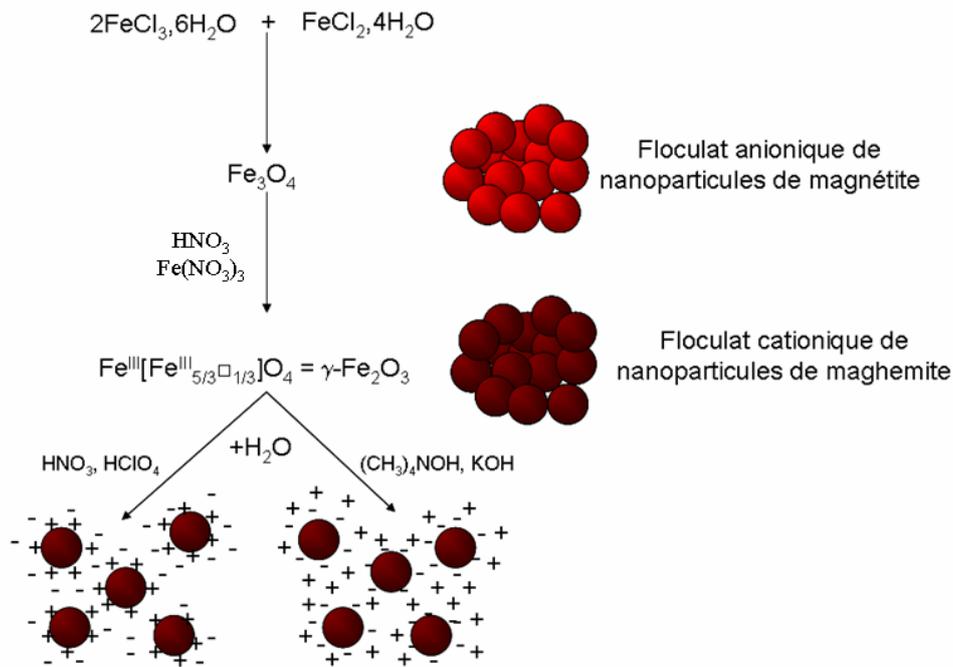


Figure 33 : Schéma de synthèse des nanoparticules de maghémite et dispersion stable en phase aqueuse.

La co-précipitation aqueuse des sels métalliques  $\text{FeCl}_2$  (chlorure ferreux) et  $\text{FeCl}_3$  (chlorure ferrique) en milieu basique conduit à l'obtention de nanoparticules de magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . La co-précipitation

ayant lieu en présence de soude dans notre cas, le flocculat de nanoparticules de magnétite est anionique (Figure 33). Celles-ci sont dispersées dans de l'acide nitrique  $\text{HNO}_3$  puis oxydée en maghémite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  par ajout d'une solution de nitrate ferrique  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ . Le flocculat obtenu de nanoparticules de maghémite est alors cationique. Après lavages, les nanoparticules obtenues sont dispersées dans l'eau.

Les nanoparticules de maghémite synthétisées sont ensuite triées en fonction de leur taille, afin de ne conserver que les plus grandes d'entre elles. En effet, ces dernières présentent une plus grande surface fonctionnalisable, ainsi qu'une capacité d'échauffement par hyperthermie magnétique plus importante (partie 2.3.2 page 17). Elles présentent donc un plus grand intérêt pour les applications envisagées de couplage à un polymère imprimé et de dénaturation de protéines par hyperthermie magnétique. Après tri en taille, les nanoparticules de maghémite sont de nouveau dispersées dans l'eau.

Pour obtenir une dispersion stable, il est nécessaire de compenser les interactions attractives de Van der Waals de type dipôle-dipôle entre particules ainsi que les interactions magnétiques, positives en moyenne. Pour ce faire, il faut introduire des interactions répulsives entre nanoparticules. Cette répulsion peut être stérique ou électrostatique. Comme nous chercherons par la suite à fonctionnaliser la surface des nanoparticules afin d'assurer leur couplage avec le polymère imprimé, nous avons préféré les répulsions électrostatiques pour assurer la dispersion des nanoparticules de maghémite et avons donc travaillé à pH proche de 2.

A pH acide (inférieur à 4), les particules sont chargées positivement par protonation des groupements OH à leur surface (voir Figure 34). A pH basique (supérieur à 10), les particules sont chargées négativement par déprotonation de ces mêmes groupements OH. Pour des pH plus proches de la neutralité, les nanoparticules sont neutres et vont alors flocculer (formation d'agrégats et déstabilisation de la suspension), leur point de charge nulle se situant à  $\text{pH} = 7,4$ .

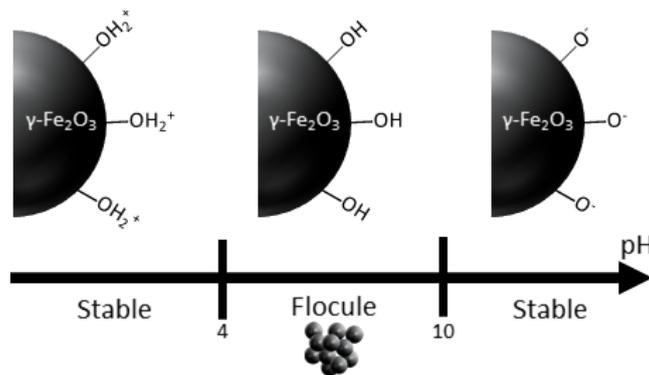


Figure 34 : Stabilité des nanoparticules de maghémite dans l'eau en fonction du pH.

## 1.2. Caractérisations des nanoparticules synthétisées

### 1.2.1. Structure et morphologie

Afin de savoir si les particules obtenues correspondent bien à de la maghémite, nous avons enregistré un diffractogramme sur poudre d'un échantillon de celles-ci (Figure 35). Ce diffractogramme

présente des raies relativement larges, ce qui laisse supposer la faible taille des cristallites synthétisées. Les pics de diffraction peuvent correspondre à ceux de la structure cubique de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de groupe d'espace P4<sub>1</sub>32 (fiche JCPDS 39-1346) ou à ceux de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (fiche JCPDS 79-0417). Le paramètre de maille  $a$  obtenu suite à l'affinement des raies est de 8,354 Å, ce qui est plus proche de ce que l'on peut trouver dans la littérature pour la maghémite ( $a = 8,346$  Å) que pour la magnétite ( $a = 8,396$  Å). Il semblerait donc que nous ayons obtenu de la maghémite, mais on ne peut pas exclure la présence de magnétite.

Ce résultat, courant pour ce type de synthèse, laisse supposer que l'oxydation de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> n'est pas complète. Initiée à la surface des particules, l'oxydation conduit à la formation d'une couche de maghémite autour d'un cœur de magnétite<sup>123,124</sup>. Par simplicité, dans la suite de ce document, il sera fait référence à l'oxyde de fer comme à de la maghémite, mais il ne faut pas oublier la présence de la phase secondaire et donc de fer au degré d'oxydation +II.

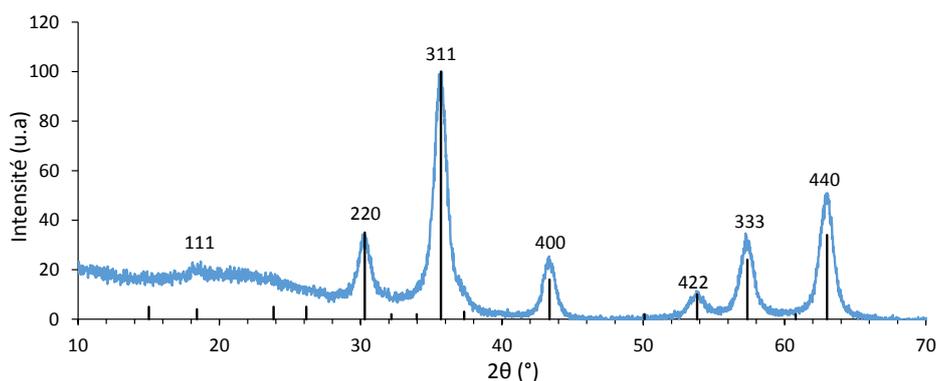


Figure 35 : Diagramme de diffraction de la poudre de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Le diagramme expérimental est en bleu, et l'identification de la phase à l'aide d'un fichier JCPDS est en noir (fiche JCPDS 39-1346).

De plus, les clichés obtenus en microscopie électronique en transmission (MET) présentent des particules sphériques de diamètre moyen 10,5 nm (Figure 36). Nous pouvons alors employer les méthodes de Williamson-Hall<sup>125</sup> et Scherrer<sup>126</sup> pour analyser plus précisément le diffractogramme de la Figure 35 afin d'obtenir la taille moyenne des cristallites. Nous trouvons alors 8,58 nm par la méthode Williamson-Hall et 8,16 nm par la méthode de Scherrer. Il semblerait donc que les particules obtenues soient monocristallines.

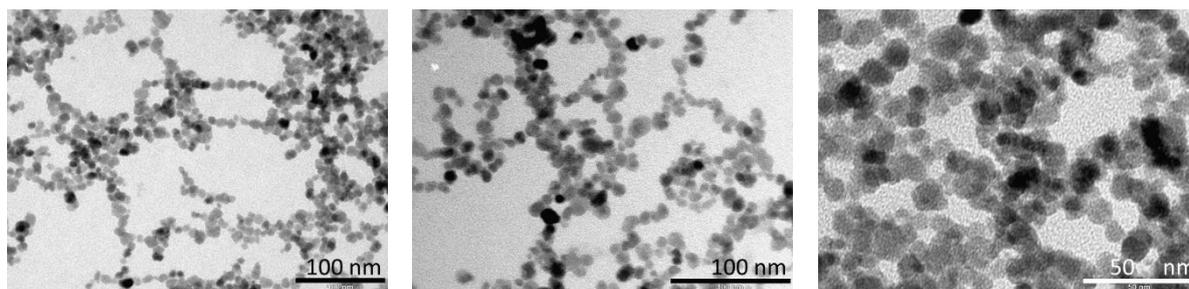


Figure 36 : Clichés MET des nanoparticules de maghémite (fraction contenant les plus grosses particules après tri en taille).

Les clichés MET présentent des nanoparticules plutôt agrégées. Cette agrégation pouvant avoir lieu lors du séchage de la grille d'observation, il est nécessaire d'effectuer une mesure du diamètre hydrodynamique des objets par diffusion dynamique de la lumière (DLS) afin d'avoir une idée de leur état d'agrégation en solution. La modélisation des distributions de tailles obtenues en intensité, en nombre et en volume par une loi log-normale permet de déterminer la taille des particules et l'écart type de la distribution (voir Figure 37).

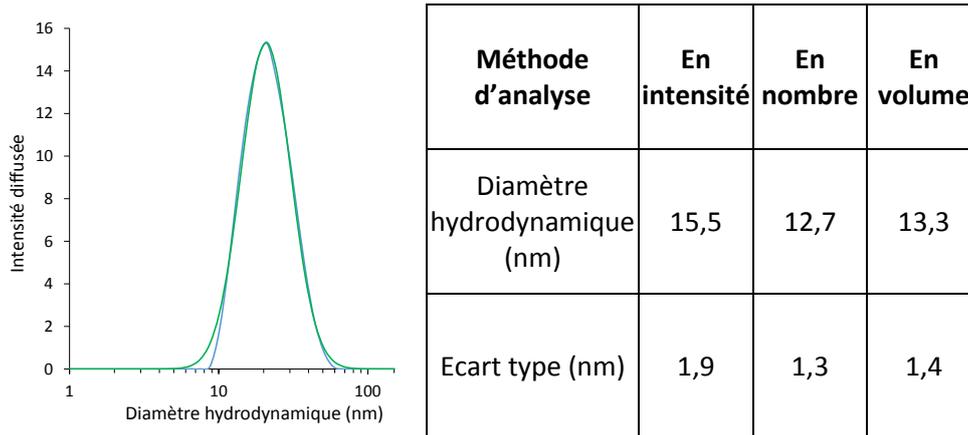


Figure 37 : Analyse DLS d'une suspension de nanoparticules de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Graphe : courbe en intensité (bleu) et modélisation par une loi log-normale (vert). Tableau : Diamètre hydrodynamique et écart type suivant les différents profils d'analyse.

La valeur de taille moyenne en nombre des nanoparticules de maghémite obtenue par cette méthode est en accord avec les observations effectuées en MET de la suspension de nanoparticules. Il n'y a pas d'aggrégation des particules en solution. La suspension est stable.

### 1.2.2. Propriétés magnétiques

La courbe d'aimantation d'une suspension de nanoparticules de maghémite est présentée Figure 38a, et nous pouvons y voir que l'aimantation à saturation  $M_s$  est de  $58 \text{ emu/g}_{\text{matériau}}$ . Une modélisation de cette courbe expérimentale avec une équation de Langevin (chapitre 1 partie 2.3.1) nous permet d'estimer que les nanoparticules ont un diamètre magnétique de  $8,78 \text{ nm}$  et un indice de polydispersité de  $0,27$ . Ce qui est cohérent avec les valeurs obtenues par MET et DLS.

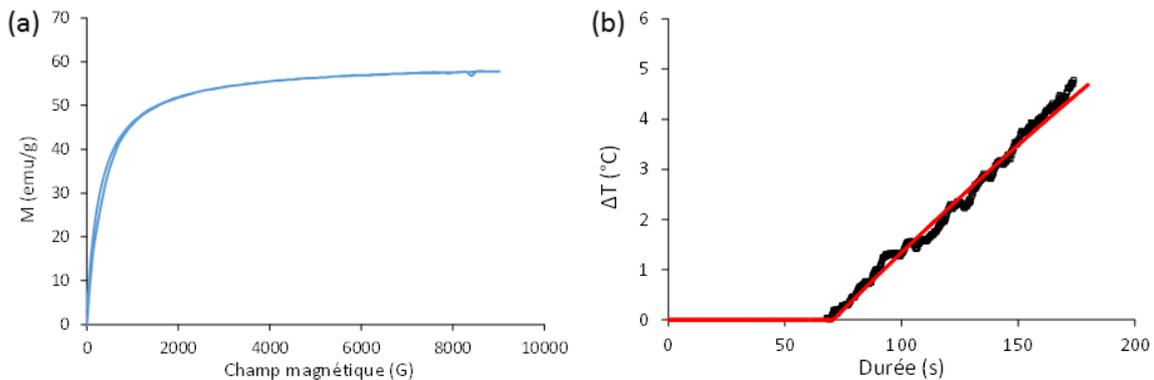


Figure 38 : Caractérisations magnétiques des nanoparticules. a : évolution de l'aimantation d'une suspension de nanoparticules de maghémite en fonction du champ magnétique appliqué. b : augmentation de température d'une dispersion de maghémite sous application d'un champ magnétique alternatif ( $335,3 \text{ kHz}$ ,  $1,5 \text{ A}$ ).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'échauffement possible d'une dispersion de maghémite sous champ magnétique alternatif (Figure 38b). Une analyse de la courbe d'échauffement indique que les nanoparticules de maghémite possèdent un pouvoir chauffant de  $10,46 \text{ W/g}_{\text{maghémite}}$ . Cela correspond à l'ordre de grandeur attendu pour des particules de cette taille soumise à un champ magnétique alternatif de fréquence proche de  $335 \text{ kHz}$ <sup>127</sup>.

## 1.2.3. Nature de la surface

Les nanoparticules de maghémite présentent un potentiel Zeta positif de  $51,3 \pm 0,8$  mV en solution à pH = 2. Ainsi, leur surface est chargée positivement. Aucun stabilisant organique ayant été ajouté lors de la synthèse des nanoparticules, la stabilisation a lieu par interactions électrostatiques répulsives entre les particules chargées.

Nous avons par la suite tenté de caractériser un peu mieux la nature de la surface de ces particules. La transformée de Fourier du spectre infrarouge (FTIR) des nanoparticules de maghémite présente deux bandes caractéristiques de la vibration des liaisons Fe-O à  $628\text{ cm}^{-1}$  et  $580\text{ cm}^{-1}$  (voir Figure 39a). La large bande présente autour de  $3300\text{ cm}^{-1}$  correspond à l'élongation de liaisons O-H de groupements de surface perturbés par la présence d'interactions hydrogènes, et donc d'eau à proximité, tandis que la bande autour de  $1630\text{ cm}^{-1}$  est caractéristique de molécules d'eau chimisorbées à la surface.

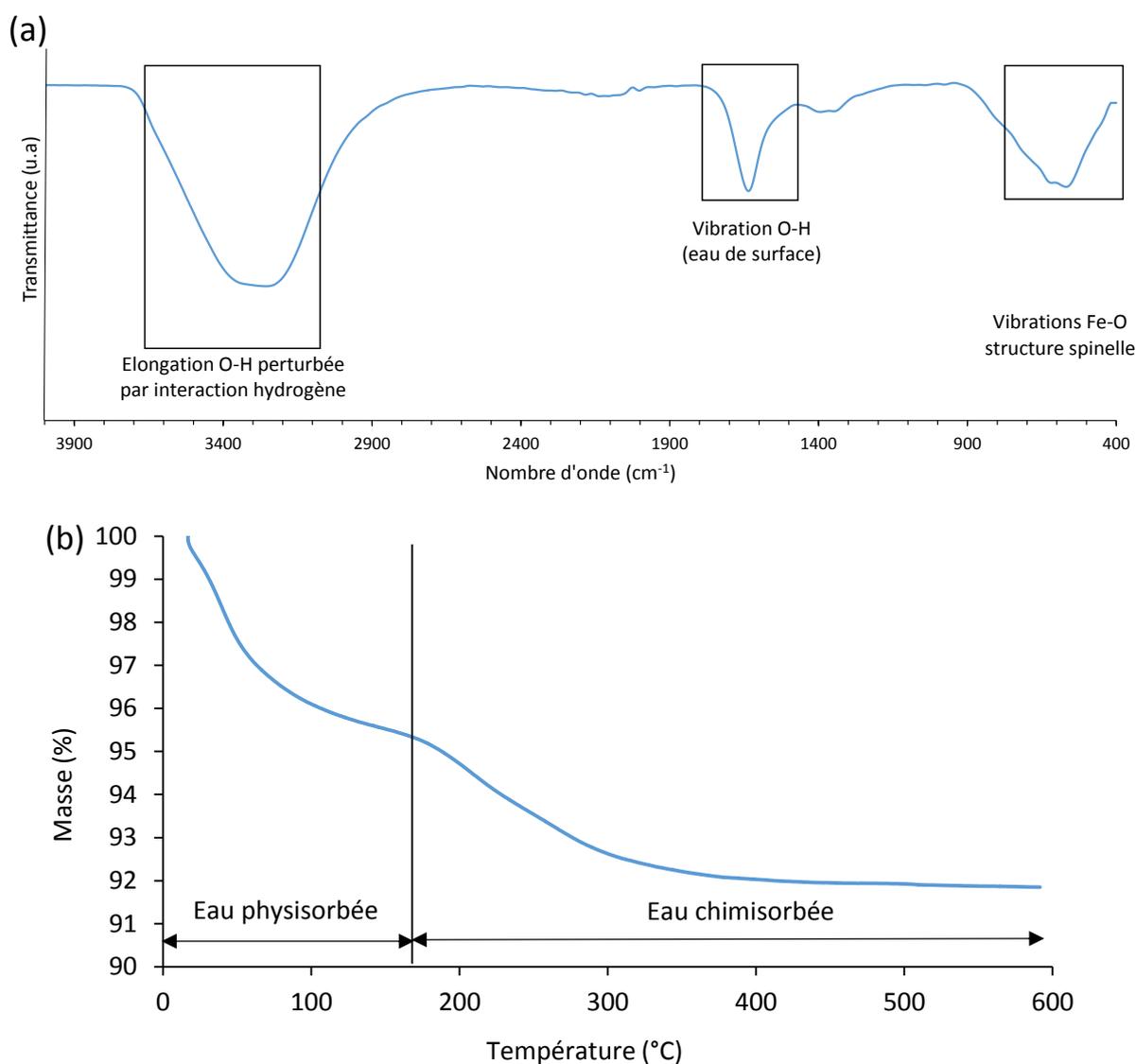


Figure 39 : Analyse de la surface des nanoparticules de maghémite. a : spectre FTIR et b : thermogramme.

La présence de l'eau chimisorbée à la surface est soutenue par les résultats obtenus lorsque l'on réalise une analyse thermogravimétrique (ATG) des nanoparticules de maghémite synthétisées. Comme nous le montre la Figure 39b, une première perte de masse de 4,5% a lieu avant 150  $^{\circ}\text{C}$ ,

correspondant à de l'eau physisorbée à la surface des nanoparticules. Une seconde perte de masse de 3,5 % a ensuite lieu, pour des températures comprises entre 200°C et 300°C, caractéristique de l'eau chimisorbée.

Ainsi, les nanoparticules présentent des atomes de fer à leur surface, engagés par interactions faibles de type liaison hydrogène avec des molécules d'eau. On a alors une surface qui ressemble à  $\text{Fe-OH}_2^+$  (Figure 40), ce qui assure la stabilité de la suspension colloïdale (voir Figure 34).

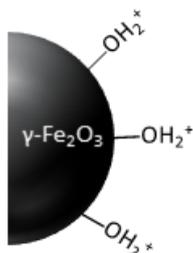


Figure 40 : Schématisation de la surface des nanoparticules de maghémite ici caractérisées.

## 2. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules d'oxyde de fer $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Les nanoparticules d'oxyde de fer ont été synthétisées et dispersées dans de l'eau distillée à  $\text{pH} \approx 2$ . Comme elles constitueront par la suite le cœur des systèmes hybrides que nous souhaitons synthétiser, il est nécessaire de pouvoir polymériser des monomères à leur surface. La stratégie choisie pour ce faire est de les fonctionnaliser par un agent de contrôle de polymérisation de type agent de transfert en polymérisation RAFT (Reversible Addition-Fragmentation chain Transfert). Les chaînes polymères vont alors croître entre les deux extrémités de cet agent, en assurant ainsi le couplage entre les particules magnétiques et le polymère imprimé.

### 2.1. L'agent de fonctionnalisation

L'agent de fonctionnalisation ici utilisé est un agent Iniferter. Les Iniferter sont des composés employés lors des polymérisations radicalaires contrôlées, qui agissent à la fois en tant qu'initiateur, agent de transfert et agent de terminaison<sup>128</sup>. Ces agents Iniferter induisent une polymérisation radicalaire comprenant les étapes d'initiation, propagation, terminaison par couplage radicalaire et transfert à l'initiateur. Les polymérisations ont lieu par insertion de monomères dans la fonction Iniferter, de façon similaire aux processus mis en œuvre lors d'une polymérisation par la méthode RAFT. Les polymères obtenus possèdent une sous-partie de l'agent Iniferter initial à chacune de leurs extrémités.

Les trois grandes familles d'agents Iniferter sont les thiocarbonylthios pour lesquels l'initiation sera photo ou thermo-induite, les azophényles avec une initiation thermo-induite et les tétraphényléthanes, pour lesquels l'initiation se fera par une réaction d'oxydo-réduction<sup>128</sup>.

Les agents Iniferter les plus efficaces sont les thiocarbonylthios, et c'est pourquoi l'agent employé au cours de nos synthèses entre dans cette catégorie. Il s'agit de l'acide 2-dodecylthiocarbonothioylthio-2-méthylpropanoïque (Figure 41), que l'on nommera par la suite uniquement Iniferter. La fonction acide carboxylique de celui-ci permet d'assurer sa complexation à la surface des nanoparticules de maghémite, et donc leur fonctionnalisation.

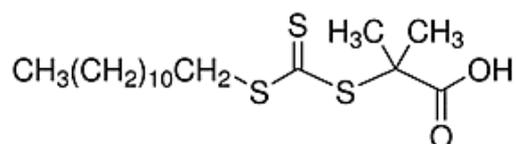


Figure 41 : Agent Iniferter employé lors de la synthèse de PEP, l'acide 2-dodecylthiocarbonothioylthio-2-méthylpropanoïque.

Notons ici que nous ne chercherons pas à employer l'agent Iniferter comme amorceur de polymérisation, mais uniquement en tant qu'agent de transfert afin d'assurer la croissance du polymère entre ses deux extrémités et donc le couplage des nanoparticules d'oxyde de fer magnétique au polymère.

## 2.2. Une fonctionnalisation effective

Comme nous venons de le voir, les nanoparticules de maghémite synthétisées possèdent à leur surface des groupements  $\text{-OH}_2^+$  résiduels à pH inférieur à 3, et présentent des atomes de fer possédant des lacunes électroniques. Ceux-ci peuvent alors être complexés par des ligands, possédant notamment des fonctions acides carboxyliques. L'agent Iniferter choisi possédant cette fonction, il peut alors complexer les atomes de fer de surface.

Le protocole expérimental mis en œuvre lors de la fonctionnalisation de la surface se compose de deux étapes successives : agitation durant 12h d'une dispersion de nanoparticules et d'agent Iniferter dans l'éthanol, l'agent étant insoluble en phase aqueuse, puis lavage des particules fonctionnalisées et re-dispersion dans l'eau distillé par dialyse, tel que schématisé sur la Figure 42. Les particules obtenues ont été caractérisées afin de mettre en évidence la fonctionnalisation.

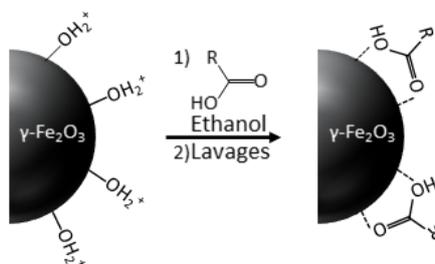
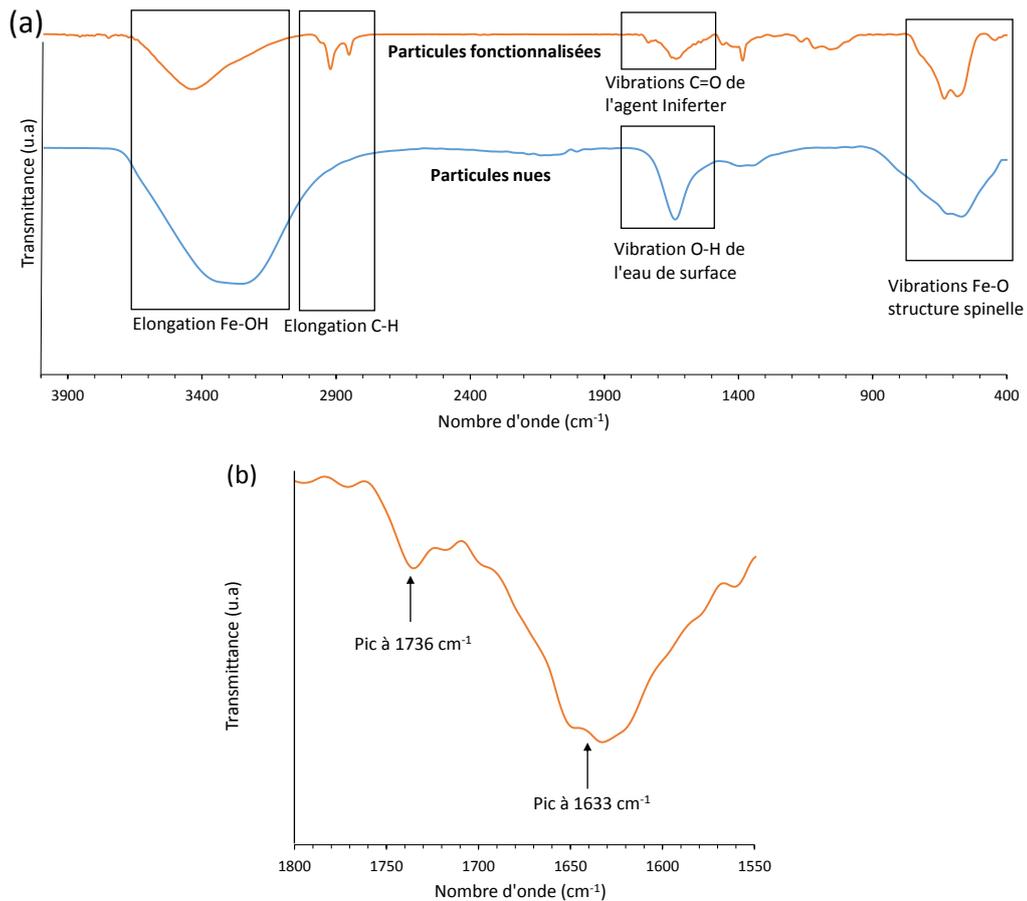


Figure 42 : Principe de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules de maghémite. RCOOH désigne l'agent Iniferter.

### 2.2.1. Modification de l'état de surface des particules

L'analyse du spectre FTIR des nanoparticules après fonctionnalisation met en évidence de nouvelles bandes à  $2900\text{ cm}^{-1}$  correspondant à l'élongation des liaisons C-H, ainsi qu'autour de  $1670\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations de la liaison C=O de la fonction acide carboxylique de l'agent Iniferter (Figure 43a). Cette dernière bande est en réalité constituée de deux bandes proches l'une de l'autre ce qui permet la détermination du type de complexe formé entre la surface des nanoparticules de maghémite et l'agent Iniferter (voir agrandissement Figure 43b).



**Figure 43** : Spectres FTIR des nanoparticules de maghémite nues et fonctionnalisées par l'agent Iniferter (a), avec un agrandissement de la zone correspondant aux vibrations de liaisons C=O de l'agent Iniferter à la surface des nanoparticules de maghémite (b).

### 2.2.2. Modification de la charge apparente des particules

Une suspension aqueuse de nanoparticules fonctionnalisées par l'agent Iniferter présente un potentiel Zeta proche de 0 mV. Comme nous l'avons vu précédemment, l'agent Iniferter peut interagir avec la surface des nanoparticules. Elle qui exprimait auparavant uniquement des groupements  $\text{-OH}_2^+$  présente maintenant une couche organique ayant pour conséquence une diminution de la charge apparente des nanoparticules et donc une variation du potentiel Zeta. La forte diminution de celui-ci induit des problèmes de stabilité des nanoparticules : une dispersion aqueuse de nanoparticules  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@Iniferter décante très rapidement (en moins de cinq minutes), et il y a agrégation des particules.

L'agrégation des particules peut également être reliée à la non-solubilité de l'agent Iniferter en phase aqueuse. Lors de la re-dispersion dans l'eau, les chaînes Iniferter vont se replier sur elles-mêmes, réduisant d'autant les interactions de répulsion stériques permettant la bonne dispersion des nanoparticules.

Par la suite, notamment lors de la synthèse du polymère imprimé, nous travaillerons donc probablement plus à partir d'agrégats de nanoparticules  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@Iniferter que de nanoparticules isolées.

### 3. Obtention de polymères à empreintes de protéines (PEP)

L'étape suivante consiste à synthétiser le polymère, à empreintes de protéines ou non imprimé en fonction de l'hybride désiré. Le protocole expérimental a été optimisé et la faisabilité des polymères à empreintes de protéines a été démontrée en employant la BSA (albumine de sérum bovin) comme gabarit, car il est possible de se procurer cette protéine en grande quantité à faible coût. Elle est d'ailleurs largement employée dans la littérature pour cela<sup>119,129</sup>.

Les caractérisations des principaux objets hybrides présentés dans cette partie sont résumées dans le tableau en annexe 1 page 213.

#### 3.1. La BSA employée comme gabarit de synthèse

L'albumine sérique bovine, ou BSA (Bovine Serum Albumin) est, comme son nom l'indique, une protéine extraite du sérum bovin. Elle est composée de 582 acides aminés<sup>130</sup> et a un poids moléculaire d'environ 66,5 kDa<sup>131</sup>. Elle est constituée de trois domaines équivalents (I, II et III), chacun formé de deux sous-parties (A et B)<sup>132</sup> comme schématisé sur la Figure 44. Ces sous-parties sont déterminées par la présence de ponts disulfures. En effet, ceux-ci n'ont lieu qu'entre acides aminés d'un même sous-domaine (A ou B). Les domaines A et B sont liés entre eux par interactions hydrophobes et des chaînes peptidiques très flexibles en comparaison du reste de la structure. Les domaines I, II et III respectivement sont reliés entre eux par des structures hélicoïdales déformées. La structure tridimensionnelle de la protéine est proche d'une ellipsoïde de dimensions 14x4x4 nm<sup>133</sup>.

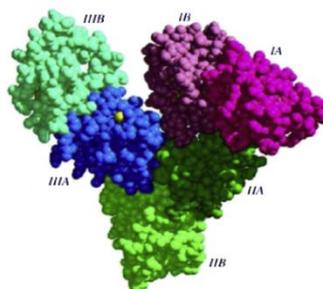


Figure 44 : Structure tridimensionnelle de la BSA<sup>134</sup>.

Le point isoélectrique de la BSA dans l'eau à 25°C est de 4,9<sup>131</sup>. Et elle présente un coefficient d'extinction molaire à 279 nm relativement important<sup>135</sup>, de 44.600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Ce qui signifie que la BSA présente une bande d'absorption de la lumière à cette longueur d'onde. Les solutions contenant cette protéine peuvent donc être analysées par spectrométrie d'absorbance UV-Visible afin de déterminer la concentration en protéine.

#### 3.2. La mise en œuvre d'une polymérisation contrôlée de type RAFT

##### 3.2.1. Pourquoi une polymérisation contrôlée

Deux grands mécanismes de polymérisation sont possibles, la polymérisation par étape (par addition ou condensation) ou la polymérisation en chaîne (polymérisation radicalaire par exemple).

Dans ce dernier cas, les réactions ont lieu suite à la formation de centres actifs radicalaires et se font majoritairement par réactions d'addition. Il n'y a pas d'élimination de petites molécules.

Les polymérisations radicalaires comportent trois grandes étapes : l'amorçage, afin de créer les centres actifs (radicaux), la propagation qui permet l'addition de nouveaux monomères sur la chaîne en croissance par le biais du centre actif, et la terminaison qui détruit le centre actif et arrête la croissance de la chaîne. Des réactions de transfert peuvent également avoir lieu : le centre actif est transféré de la chaîne en croissance à une autre molécule, arrêtant la croissance du polymère. Les polymérisations radicalaires présentent de nombreux avantages, tels qu'une très grande versatilité des monomères polymérisables, une large gamme de solvants et de températures utilisables, et une industrialisation facile des processus. Elles présentent néanmoins également des inconvénients, tels qu'une absence de contrôle sur la taille ou la morphologie des chaînes obtenues, et des indices de polymolécularité élevés. Afin de conserver les avantages d'une polymérisation radicalaire en évitant ses inconvénients, des méthodes de polymérisation radicalaire contrôlée ont été développées, visant à diminuer le nombre de réactions de terminaison ou de transfert en contrôlant le nombre de radicaux présents dans le milieu. Une fraction des radicaux est protégée sous forme inerte, et un équilibre d'activation-désactivation s'établit entre les chaînes actives en croissance et les chaînes dormantes. Dans l'idéal, les chaînes macromoléculaires sont toutes créées rapidement en début de polymérisation et croissent simultanément suivant ces cycles d'activation-désactivation.

Le plus souvent, les polymères à empreintes de protéines sont synthétisés à l'aide d'une polymérisation radicalaire libre, du fait de la large gamme de monomères envisageables. Il est cependant difficile de contrôler la croissance des chaînes, et de s'assurer une épaisseur homogène du polymère. L'homogénéité des PEP étant nécessaire à l'obtention de performances reproductibles, des méthodes de polymérisation radicalaires contrôlées ont été développées<sup>136</sup>, entre autres par notre équipe au sein du laboratoire PHENIX<sup>137</sup>.

Après un rappel du principe de polymérisation radicalaire contrôlée par la méthode RAFT, nous présenterons les protocoles expérimentaux mis en œuvre pour synthétiser des polymères à empreintes d'albumine sérique bovine (BSA) puis de protéine fluorescente verte (GFP).

### 3.2.2.Principe de la polymérisation RAFT

Mise au point à la fin des années 1990 par l'équipe du professeur E. Rizzardo<sup>138</sup>, une polymérisation radicalaire contrôlée par la méthode RAFT (Reversible Addition-Fragmentation chain Transfert) est constituée d'une succession de réactions d'addition-fragmentation réversibles de chaînes polymères en croissance sur un agent de contrôle (Figure 45).

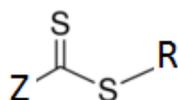


Figure 45 : Agent RAFT en représentation simplifiée, avec Z et R deux groupements organiques.

Le mécanisme de la polymérisation RAFT comporte cinq étapes, comme présenté sur la Figure 46 : les trois étapes de la polymérisation radicalaire conventionnelle (amorçage, propagation, terminaison) et deux équilibres d'addition-fragmentation réversibles.

Après amorçage d'un monomère M par l'amorceur I, il peut y avoir addition de cet oligomère sur l'agent de transfert thiocarbonylthio (Figure 45). Cette addition se fait sur la double liaison C=S de



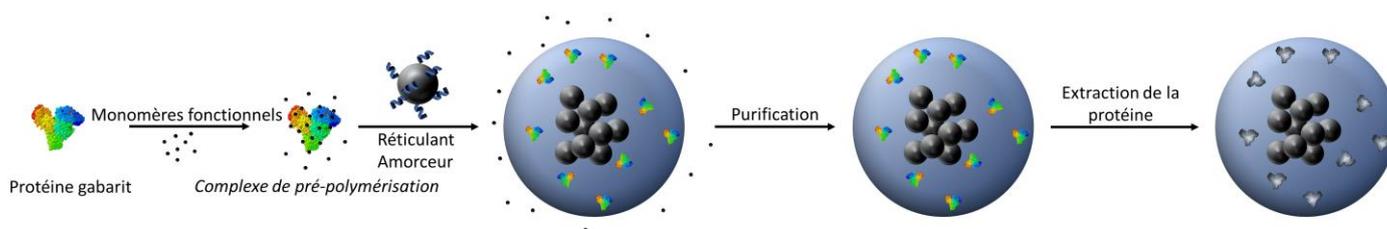


Figure 47 : Schéma de synthèse du polymère imprimé autour des nanoparticules de maghémite.

Dans un premier temps, les molécules de monomère fonctionnel sont mises en présence des protéines servant de gabarit, afin de former les complexes de pré-polymérisation. Puis on ajoute au milieu un agent réticulant, éventuellement un co-monomère fluorescent, les nanoparticules fonctionnalisées et un amorceur de polymérisation. Une fois la polymérisation finie, les particules obtenues sont lavées avec soin pour éliminer tout monomère résiduel. Enfin, les protéines ayant servi de gabarit sont extraites.

Les polymères non-imprimés (PNI) sont obtenus à l'aide d'un protocole de synthèse très similaire, la seule différence étant l'absence de protéines gabarits.

L'efficacité de l'impression de la BSA, et donc la détermination des paramètres expérimentaux optimaux, se fait par la réalisation d'isothermes d'adsorption. Les autres performances en adsorption, telles que la cinétique de celle-ci, sont discutés plus en détails dans l'article<sup>137</sup> publié en 2017 chez *Chem. Comm.* (Copyright RSC).

### 3.3.2. La composition du milieu réactionnel

Les structures du monomère, de l'agent réticulant, et de différents amorceurs possibles sont représentées sur la Figure 48.

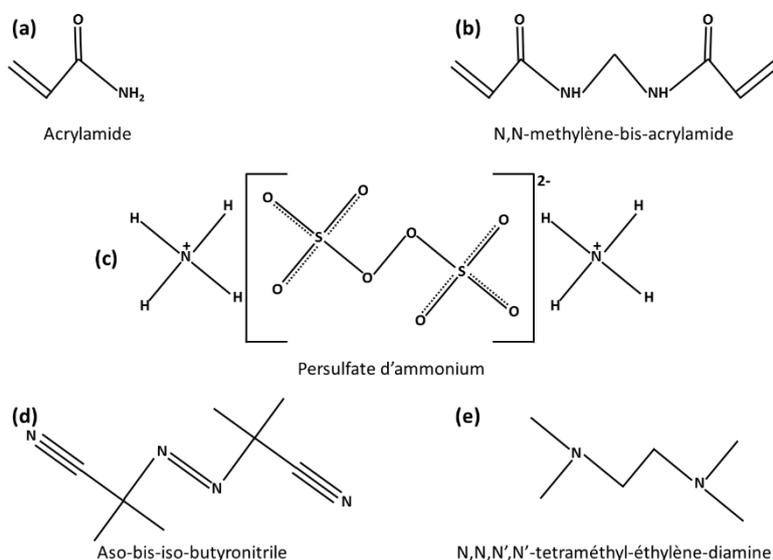


Figure 48 : Structure chimique du (a) monomère fonctionnel, l'acrylamide, (b) de l'agent réticulant, le N,N-méthylène-bis-acrylamide, (c, e) amorceurs rédox, (d) amorceur thermique. Persulfate d'ammonium : APS, Azo-bis-iso-butyronitrile : AIBN, N,N,N',N'-tetraméthyl-éthylène-diamine : TEMED.

Les rapports molaires entre protéine, monomère fonctionnel, agent réticulant et amorceurs ont été déterminés suite à une étude bibliographique. Aucun travail d'optimisation n'a porté sur cette partie du protocole de synthèse, par manque de temps et afin de pouvoir mener l'étude jusqu'aux tests cellulaires. Nous avons cependant cherché à optimiser deux paramètres de synthèse : la méthode d'amorçage de polymérisation, et sa durée. En effet, deux choix sont possibles quant au type

d'amorçage de polymérisation employé : soit la formation de radicaux se fait par réaction d'oxydo-réduction entre un amorceur et un catalyseur d'amorçage, on parlera d'un amorçage rédox ; soit la formation de radicaux se fait par décomposition thermique d'un amorceur, on parlera d'un amorçage thermique.

### 3.3.3. Synthèse d'un polymère fluorescent

A terme, les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  seront employés afin d'effectuer du ciblage cellulaire. Celui-ci pourra être mis en évidence par microscopie optique de fluorescence, ou par cytométrie en flux. Afin de détecter les objets hybrides, il est apparu nécessaire que ceux-ci soient fluorescents.

Le co-monomère fluorescent employé est l'acryloxyethylthiocarbamoyl-Rhodamine B (Figure 49), ultérieurement appelé simplement Rhodamine. La longueur d'onde d'excitation maximale de ce monomère est de  $\lambda_{\text{max,ex}} = 548 \text{ nm}$  et d'émission de  $\lambda_{\text{max,ex}} = 570 \text{ nm}$ .

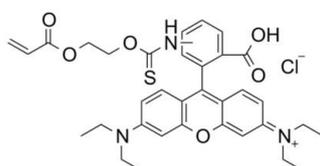


Figure 49 : Structure de l'acryloxyethylthiocarbamoyl-Rhodamine B

La présence de la double liaison C=C permet une copolymérisation de ce monomère avec l'acrylamide et le méthylène-bis-acrylamide lors de la réaction de polymérisation. Le protocole est le même que celui mis en œuvre pour la synthèse de PEP magnétiques non fluorescents, à la différence près que l'on remplace une partie du monomère acrylamide par de la Rhodamine.

L'incorporation effective du fluorophore a été vérifiée par mesure de la fluorescence émise par les polymères correspondant au pic d'émission principal de la Rhodamine. La Figure 50 regroupe les intensités des principaux pics de fluorescence observés pour différents polymères magnétiques imprimés fluorescents, ainsi que le diamètre hydrodynamique de ceux-ci.

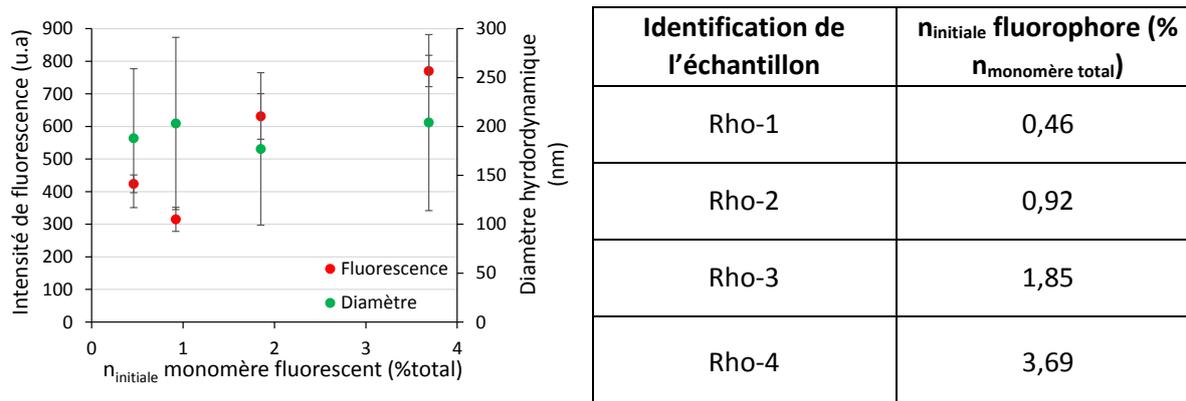


Figure 50 : Evolution du diamètre hydrodynamique et l'intensité de fluorescence de nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  synthétisés avec la quantité initiale de monomère fluorescent Rhodamine. Tableau : correspondances entre identification de l'échantillon et quantité initiale de monomère fluorescent employée lors de la synthèse.

Le diamètre des nano-objets obtenus ne varie pas de manière significative en fonction de la quantité initiale de monomères fluorescents présents dans le milieu réactionnel et intégrés dans le polymère. Comme on peut également le voir sur la Figure 50, augmenter la quantité de monomère fluorescent

dans le milieu réactionnel permet d'augmenter la quantité de fluorophore incorporé, et donc la fluorescence des objets. Cependant cette augmentation n'est pas linéaire, elle évolue plutôt par palier. Les échantillons Rho-3 et Rho-4 seront employés majoritairement par la suite, lors des tests d'adsorption de GFP cellulaire, avec une préférence pour l'échantillon Rho-3, moins coûteux en monomère fluorescent.

### 3.3.4. Un amorçage thermique ou rédox ?

Un des principaux paramètres expérimentaux à optimiser est la méthode d'amorçage, afin d'être certain d'imprimer la protéine dans sa configuration native. Des hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  et  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$  ont été synthétisés avec un amorçage thermique d'une part et avec un amorçage rédox d'autre part. Et ce avec la même durée de polymérisation. Des isothermes d'adsorption ont été réalisées pour ces quatre hybrides afin de déterminer la meilleure méthode d'amorçage.

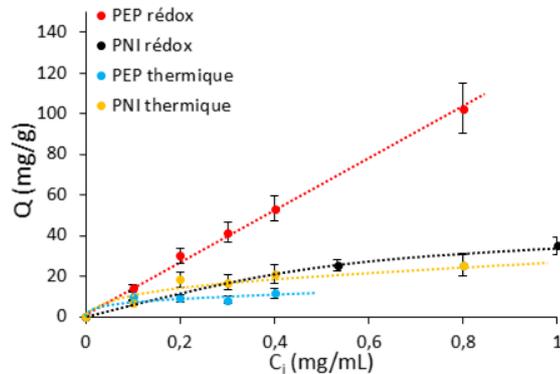


Figure 51 : Isothermes d'adsorption de la BSA sur des hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  obtenus avec différents amorçage.

Le PEP magnétique synthétisé par amorçage thermique présente une adsorption semblable à celle obtenue pour les PNI tandis que le PEP magnétique synthétisé par amorçage rédox possède une capacité d'adsorption très élevée envers la BSA (Figure 51). Ces résultats indiquent qu'un amorçage rédox est plus efficace pour obtenir un polymère imprimé. Les études ultérieures se feront donc sur des PEP obtenus à l'aide d'un amorçage rédox.

### 3.3.5. Quelle durée de polymérisation ?

Une fois la méthode d'amorçage choisie, nous avons déterminé la durée optimale de la polymérisation afin d'obtenir une couche polymère suffisamment épaisse pour avoir des empreintes, en un temps le plus court possible.

Plus la durée de polymérisation est élevée et meilleure est la capacité d'adsorption des polymères à empreintes de protéines obtenus, d'après les isothermes d'adsorption présentées Figure 52. Après 4h de polymérisation, une couche de polymère a bien été formée à la surface des nanoparticules de maghémite. Cependant, les capacités d'adsorption obtenues sont très similaires à celles du polymère non imprimé synthétisé dans les mêmes conditions ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$ ). On peut donc supposer que la formation d'un polymère est suffisante pour obtenir une adsorption non-spécifique de la protéine, sans que cette couche polymère soit suffisamment épaisse pour réellement contenir des empreintes. Pour cette raison, des temps de polymérisation plus courts n'ont pas été testés.

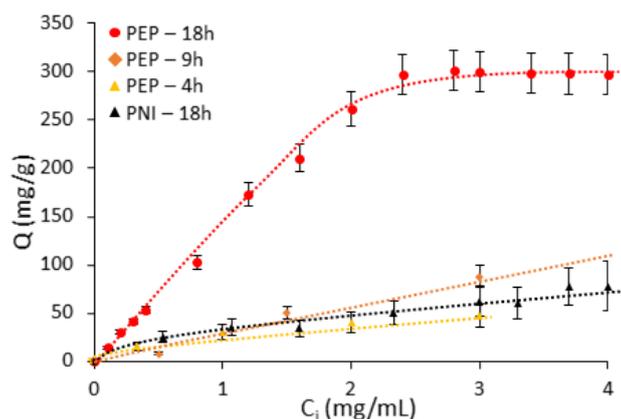


Figure 52 : Isothermes d'adsorption de la BSA sur des hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-BSA polymérisés durant différents temps, ainsi que sur un hybride  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PNI.

Lorsque la durée de polymérisation est de 18h, de très bonnes capacités d'adsorption sont obtenues, avec une capacité à saturation proche de 300 mg/g, et un facteur d'impression (IF) de 3,7. L'analyse du surnageant de synthèse indique une polymérisation complète au bout de 18h de réaction. Pour cette raison, des durées de polymérisation plus élevées n'ont pas été étudiées. En conclusion, afin d'obtenir de bonnes capacités d'adsorption pour les polymères à empreintes de protéines, la durée de polymérisation retenue pour la suite des études est de 18h, après avoir effectué un amorçage de type rédox.

### 3.3.6. Optimisation de la méthode d'extraction

Avant de pouvoir ré-adsorber des protéines, il faut s'assurer que les empreintes ont bien été libérées. C'est pourquoi nous avons également cherché à optimiser la méthode d'extraction. Une fois la protéine extraite, le PEP magnétique sera nommé PEP-protéine (par exemple PEP-BSA) pour signifier qu'il contient des empreintes de cette protéine.

Une base peut être employée afin de dénaturer la protéine ayant servi de gabarit lors de la synthèse et donc conduire à son extraction (voir la revue présentée en annexe 4 à partir de la page 225). Dans un premier temps, nous avons donc testé l'emploi de conditions basiques avec une solution de soude à 0,05 M pour extraire la protéine gabarit du polymère synthétisé.

	Absence de champ magnétique	Présence d'un champ magnétique
Avant extraction, dans de l'eau		
Après extraction et re-dispersion dans de l'eau (72h contre l'aimant)		

Figure 53 : Suspensions de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP avant et après extraction à l'aide d'une solution basique, en présence ou en l'absence d'un champ magnétique créé à l'aide d'un aimant permanent Néodyme-Fer-Bore.

Après re-dispersion dans de l'eau distillée, on obtient une suspension stable sous champ magnétique. Après l'étape d'extraction et 72h de contact avec un aimant permanent, il n'est pas possible de récupérer les particules par décantation magnétique, alors qu'il était possible de le faire avant l'étape d'extraction (Figure 53).

Une explication envisagée est la suivante. L'agent Iniferter, et donc le polymère, est maintenu à la surface des nanoparticules de maghémite en complexant celle-ci à l'aide de fonctions acide carboxylique (Figure 41 page 49). Le passage en milieu basique dans la solution de soude va transformer ses fonctions acide carboxylique en carboxylate, entraînant un décrochement du polymère de la surface des nanoparticules de maghémite. Si le polymère est suffisamment peu réticulé, les nanoparticules peuvent se libérer en passant au travers. Une fois celles-ci en suspension dans l'eau distillée, on obtient de nouveau une suspension stable de particules magnétiques, stabilisées non plus par des interactions électrostatiques positives mais négatives. La libération des nanoparticules de maghémite est mise en évidence par l'absence de polymère autour de celles-ci, telle que mesurée par analyse thermogravimétrique.

Une autre méthode possible pour extraire la protéine est l'emploi de solvants organiques, purs ou en mélange (annexe 4 à partir de la page 225). Nous avons ainsi testé dans un second temps l'emploi de conditions organiques faiblement acides, en utilisant une solution de méthanol et d'acide acétique (9:1 en volume). Les surnageants sont analysés par spectrométrie d'absorbance. Comme on peut le voir sur la Figure 54, au bout de 4 cycles d'extraction, plus aucune protéine n'est détectée dans le surnageant. Cette méthode d'extraction est donc efficace. Après re-dispersion dans l'eau distillée, la décantation magnétique des particules extraites est rapide et totale. Ainsi, le solvant le plus adapté pour extraire les protéines présentes est l'emploi d'une solution d'acide acétique dans le méthanol.

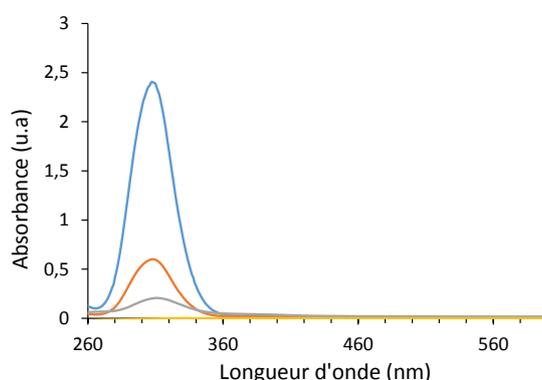


Figure 54 : Spectres d'absorbance des surnageants d'extraction. Bleu, orange, gris puis jaune : extractions 1 à 4 respectivement.

Il est important de noter que la succession de décantations magnétiques peut à terme empêcher la re-dispersion des nano-objets hybrides. En effet, à force de les décanter magnétiquement, une agrégation irréversible peut avoir lieu. C'est pourquoi après avoir optimisé le solvant d'extraction, nous avons cherché à employer un autre protocole pour mettre le solvant d'extraction en contact avec les objets hybrides, et séparer les protéines extraites de la matrice polymère. Notre choix s'est porté sur la dialyse. Bien que plus lente, cette méthode ne provoque pas d'agrégation. Elle sera la méthode privilégiée par la suite car elle permet l'obtention de suspensions plus stables que la méthode d'extraction précédente (visuellement : 1 semaine contre 1h). Après extraction, les objets hybrides sont notés  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-protéine, afin de mettre en évidence la présence d'empreintes de cette protéine au sein de ceux-ci.

3.4. Caractérisations des nano-objets hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP

Les caractérisations présentées dans cette partie sont résumées dans le tableau présenté en annexe 1 page 213.

## 3.4.1. Morphologie et taille des nano-objets hybrides

Les particules obtenues après polymérisation de l'acrylamide ont d'abord été analysées par DLS. Comme l'indice de réfraction et l'adsorption du polymère ne sont pas connus avec précision, il n'est pas possible d'établir des profils en nombre et en volume pertinents pour les suspensions étudiées. Seuls les profils obtenus en intensité ont été analysés et comparés. Les nanoparticules hybrides présentent un diamètre hydrodynamique moyen bien plus important que les nanoparticules nues (Figure 55). L'augmentation de la taille des objets hybrides avec la durée de réaction indique qu'un temps de polymérisation plus long permet bien d'augmenter la quantité de polymère formé. La couche polymère est d'autant plus épaisse que la durée de réaction est élevée et son avancement important.

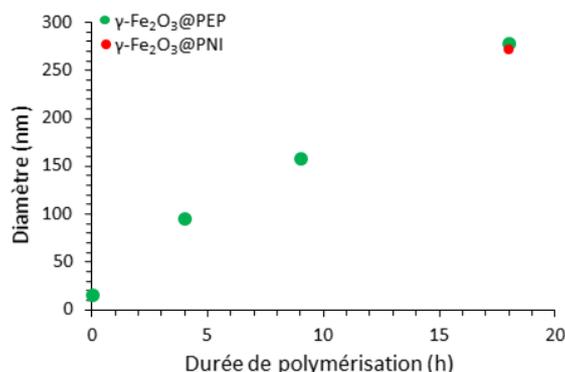


Figure 55 : Diamètre hydrodynamique des nanoparticules hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-BSA et  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PNI en fonction de la durée de polymérisation.

Nous avons ensuite voulu utiliser la MET pour imager ces objets. L'observation de polymères par MET est souvent difficile, du fait de la nature des grilles employées (cuivre recouvert de carbone) et du faible contraste qu'elles offrent avec le polymère. Afin d'améliorer ce contraste, nous avons optimisé le dépôt de l'échantillon sur les grilles, en jouant notamment sur la concentration en particules et leur coloration à l'aide d'Uranylex (Delta Microscopie) selon les revendications du fournisseur.

La Figure 56 présente les clichés obtenus pour des objets hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-BSA, obtenus après 18h de polymérisation. On peut voir des particules de polymère (taches grises, flèches blanches), des nanoparticules de maghémite isolées (points noirs, flèches jaunes) ainsi que des objets hybrides présentant des nanoparticules de maghémite au sein du polymère. A partir des clichés MET, la taille des objets hybrides est estimée entre 93 nm et 350 nm, ce qui est cohérent avec leur diamètre hydrodynamique moyen mesuré par diffusion dynamique de la lumière (Figure 55). Afin de s'assurer que les taches grises autour des nanoparticules de maghémite sont bien du polymère, les particules ont été observées en MET haute résolution (Figure 56c). On distingue les plans cristallins des particules d'oxyde de fer, ainsi qu'une zone amorphe entre et autour des nanoparticules. Il s'agit du polymère, dont la formation a bien été initiée sur la totalité de la surface des nanoparticules, bien qu'il se soit par la suite développé dans une direction privilégiée, ne formant pas de couche d'épaisseur homogène

autour des nanoparticules de maghémite. On constate également que les nanoparticules sont agrégées au sein du polymère.

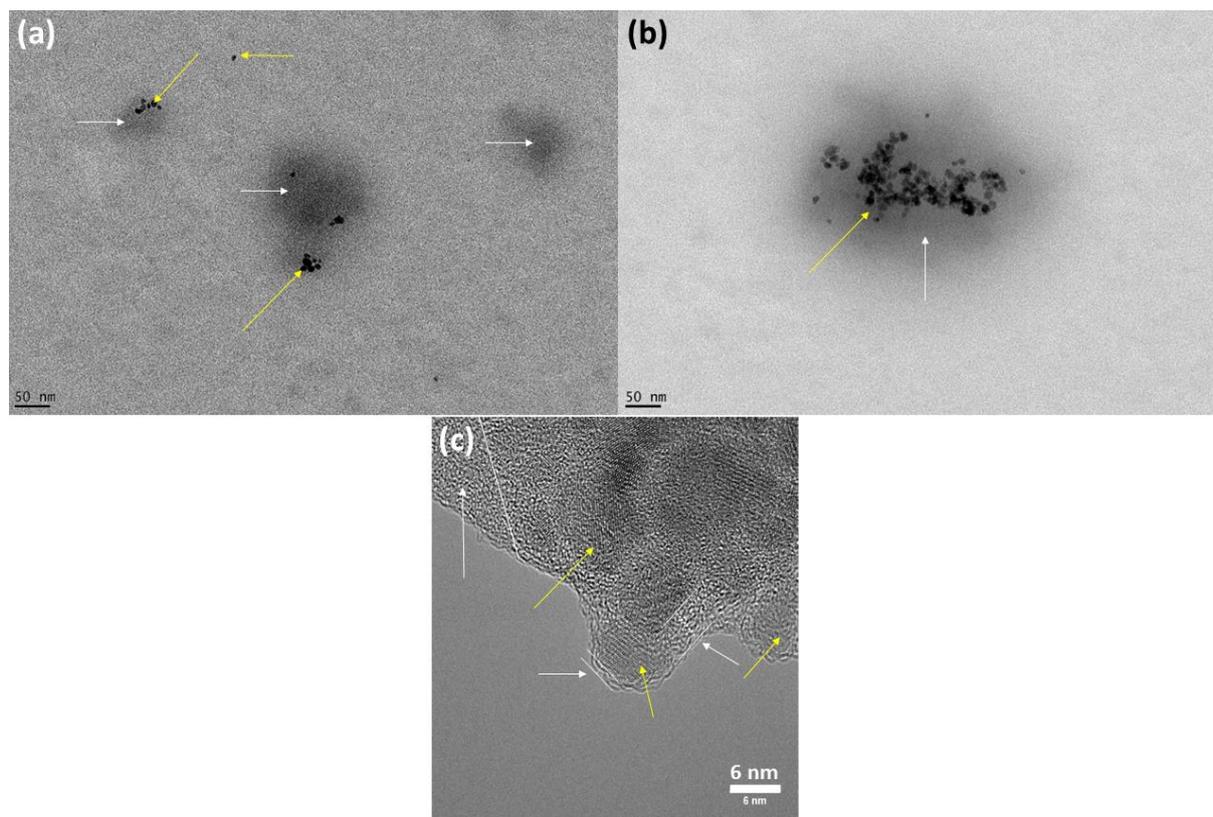


Figure 56 : Clichés de nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  obtenus par MET ou MET haute résolution. Flèche blanche : polymère. Flèche jaune : nanoparticules de maghémite.

Ainsi, les nano-objets hybrides obtenus présentent un diamètre hydrodynamique compris entre 100 et 500 nm, et sont constitués d'un cœur composé de plusieurs dizaines de nanoparticules de maghémite agrégées et d'une coquille de polymère à empreintes de protéines, tel que représenté sur la Figure 57. Ces objets sont stables en suspension pendant minimum 10 jours après synthèse.

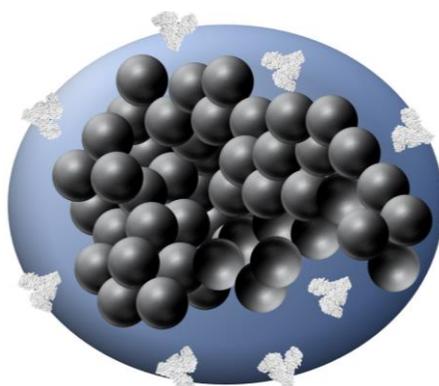


Figure 57 : Morphologie des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  obtenus.

Nous avons ensuite fait appel à la spectroscopie FTIR et à l'ATG afin d'identifier avec certitude la couche amorphe visible autour des nanoparticules de maghémite comme étant du polymère. Le spectre FTIR des nanoparticules recouvertes d'une couche de polymère présente une nouvelle bande à  $1521\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations de la liaison C=O de la fonction amide de l'acrylamide (Figure

58a), ainsi qu'une bande à  $1670\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations de cisaillement des liaisons C-H des chaînes polymères. Ces deux bandes confirment la formation du polymère.

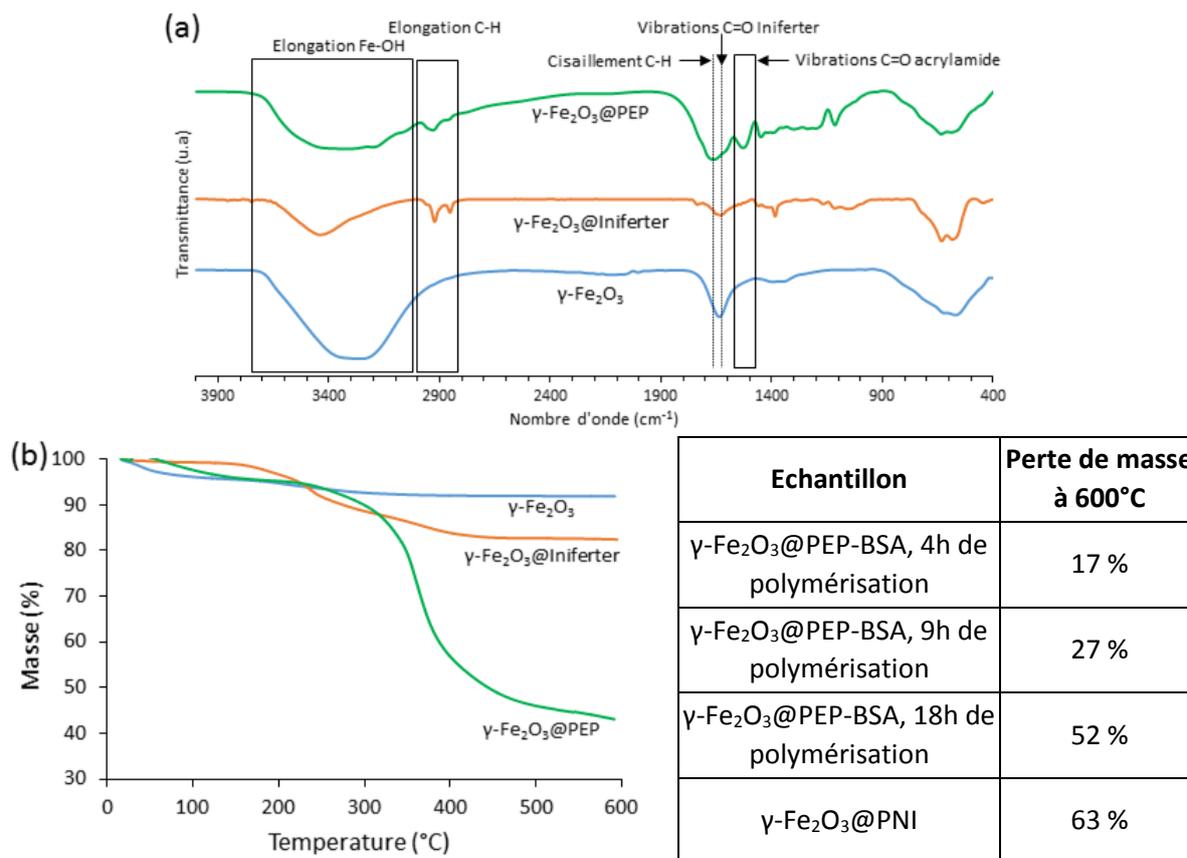


Figure 58 : Spectres FTIR (a) et analyse thermogravimétrique (b) des nanoparticules de maghémite nues, fonctionnalisées par l'agent Iniferter, et recouvertes d'une couche de polymère.

En ATG ( $200\text{-}600^{\circ}\text{C}$ ), les nanoparticules nues présentent une perte de masse nulle tandis que les nanoparticules fonctionnalisées par l'agent Iniferter présentent une perte de masse de 17%, deux valeurs très inférieures aux pertes de masses obtenues pour les particules recouvertes d'une couche de polymère, à empreintes de protéines ou non imprimé (Figure 58 tableau). Les nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-BSA}$  obtenus après 18h de polymérisation présentent une perte de masse de 52% (Figure 58b).

Une couche de polyacrylamide est donc bien formée autour d'agrégats de nanoparticules de maghémite.

### 3.4.2. Propriétés magnétiques

La courbe d'aimantation des nano-objets hybrides est plus bruitée que celle obtenue précédemment pour les particules nues (Figure 59). Cela peut être dû à une plus faible stabilité colloïdale des nanoparticules recouvertes de polymère, sous champ magnétique. En effet, lorsque celui-ci est trop important, les nano-objets hybrides ont tendance à s'aligner pour former des chaînes, qui vont précipiter au fond du tube d'analyse, et ce malgré l'action du vibreur.

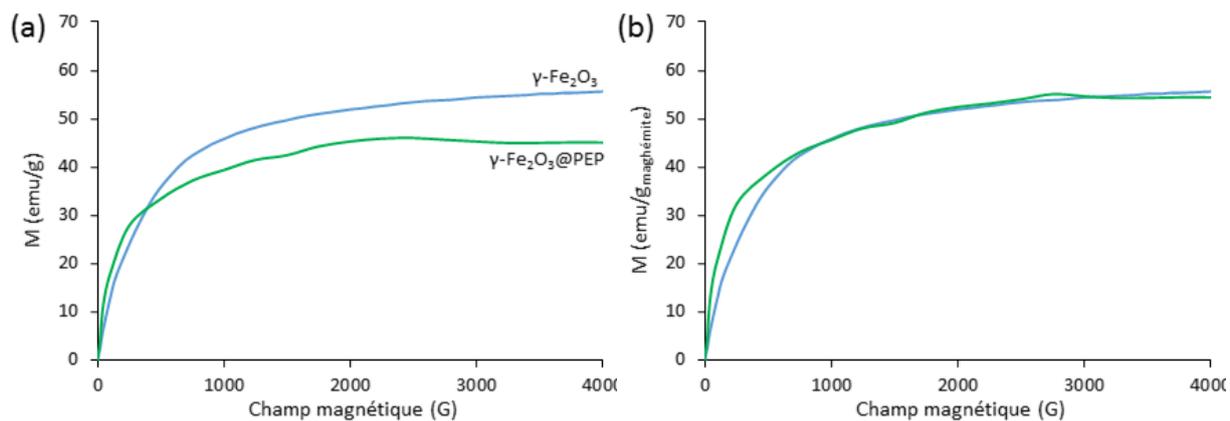


Figure 59 : Evolution de l'aimantation des nanoparticules en fonction du champ magnétique, par masse d'objet hybride (a) ou normalisée par la masse de maghémite (b).

L'aimantation des nanoparticules apparaît comme bien plus faible après synthèse du PEP (Figure 59a). En effet, elle est de 44 emu/g<sub>matériau</sub> contre 58 emu/g<sub>matériau</sub> pour les nanoparticules nues. En effet, pour une même masse de nanoparticules nues ou d'objets hybrides, les particules recouvertes de polymère contiennent une quantité de fer magnétique inférieure aux particules fonctionnalisées, et a fortiori bien inférieure aux particules nues, et ce lié à la présence d'un revêtement organique. Ce qui entraîne une diminution de la valeur de l'aimantation à saturation par gramme de matériau. Si l'on calcule maintenant cette aimantation par gramme de maghémite, on retrouve la même valeur d'aimantation à saturation pour les nanoparticules nues et couplées au polymère à empreintes de protéines (voir la Figure 59b).

Ainsi, les nanoparticules de maghémite conservent leurs propriétés superparamagnétiques au sein des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ .

Une autre méthode originale pour caractériser le polymère des nanoparticules magnétiques est de mesurer le temps de relaxation transversal  $T_2$  des protons  $^1\text{H}$  de l'eau par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (voir annexe 2, page 214). Dans la suite de ce travail, dès qu'il sera fait référence à un temps de relaxation, il s'agira d'un temps de relaxation en RMN.

La littérature nous indique que le superparamagnétisme des nanoparticules d'oxyde de fer induit une forte augmentation de la relaxation RMN<sup>140-142</sup> (diminution des temps de relaxation). L'interaction dipolaire responsable de la relaxation a une dépendance en  $1/r^3$ , avec  $r$  la distance entre les protons  $^1\text{H}$  et les nanoparticules superparamagnétiques<sup>141-144</sup>. La présence d'une couche de polymère change la dynamique des nanoparticules et la distance minimale d'approche entre l'eau et les particules. Des études précédentes concernant l'effet du revêtement de nanoparticules montrent que celui-ci a une forte influence sur la relaxivité<sup>145,146</sup>.

Nous avons alors mesuré le temps de relaxation transverse pour des nanoparticules nues et des nanoparticules hybrides, à différentes concentrations en fer. Les nanoparticules hybrides présentent des temps de relaxation bien plus élevés que les nanoparticules nues (Figure 60). La disparité de valeurs entre les particules recouvertes de polymères n'est pas significative, et peut être due à des inhomogénéités de champ magnétique ou inhérentes à l'échantillon. Mais les temps de relaxation étant bien plus élevés pour les particules recouvertes d'une couche polymère que pour les nanoparticules nues, nous pouvons en déduire la présence effective d'une couche organique.

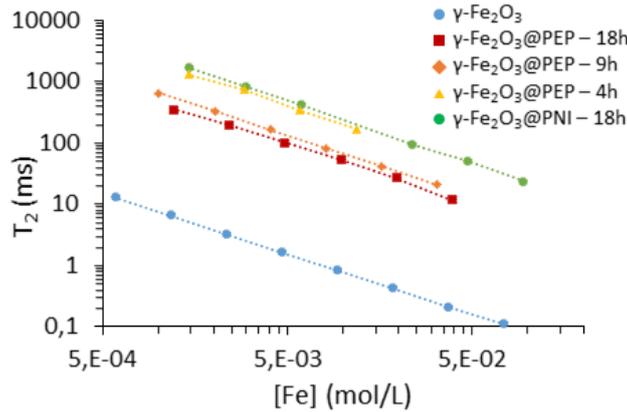


Figure 60 : Evolution du temps de relaxation transverse  $T_2$  en fonction de la concentration en fer pour différents hybrides.

### 3.4.3. Visualisation du couplage entre particules magnétiques et polymère

Certains nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  synthétisés sont fluorescents, afin de pouvoir par la suite les reconnaître lors des tests de ciblage. Nous avons alors décidé d'employer la microscopie optique afin de vérifier que fluorescence et magnétisme sont co-localisés.

Dans un premier temps, nous avons placé une goutte de suspension de nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  fluorescentes sur une lame de verre sous l'objectif d'un microscope avec un grossissement de 10. Une feuille de carton noire est placée sur la partie droite de la zone imagée, c'est-à-dire sur la goutte où les particules sont regroupées en début d'expérience. La fluorescence initiale de cette zone saturait le capteur de la caméra et il a donc été décidé de la masquer. Puis un aimant Néodyme-Fer-Bore a été placé à proximité de la goutte, à gauche de celle-ci, et des photographies ont été prises afin de suivre l'évolution de la fluorescence. Comme on peut le voir sur la Figure 61, le front de fluorescence avance vers l'aimant au cours du temps. Or le polymère en soit n'est pas magnétique, ce sont les nanoparticules qu'il contient qui le sont, ce qui nous permet d'affirmer que le polymère fluorescent est bien lié aux particules de maghémite.

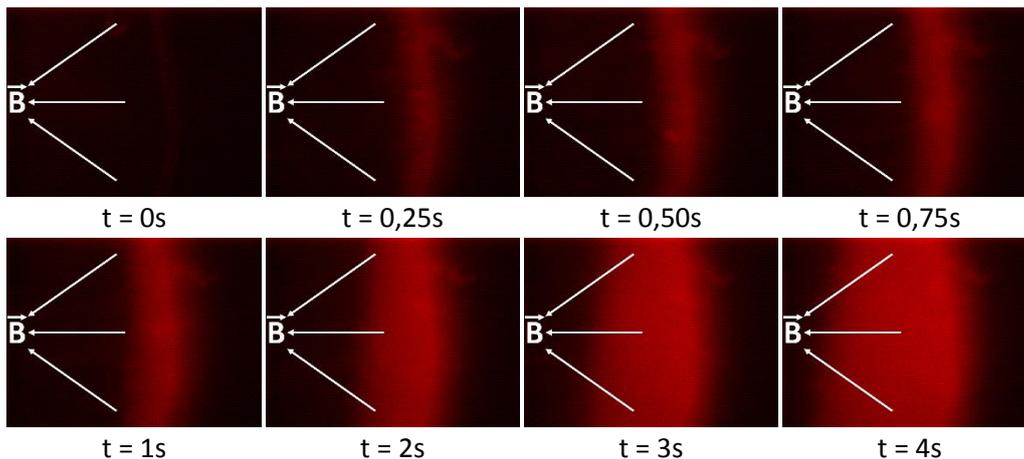


Figure 61 : Clichés de microscopie optique des nano-objets hybrides fluorescents au cours du temps en présence d'un aimant. Grossissement  $\times 10$ .

Dans un second temps, nous avons réalisé une émulsion de type eau dans huile, la phase aqueuse comprenant des nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  fluorescents. On peut observer sur la Figure 62 que les gouttes d'émulsion sont initialement plutôt bien dispersées dans le capillaire, éloignées les unes des autres. Après l'approche de l'aimant, de nombreuses gouttes sont attirées par celui-ci, et viennent se

placer dans la zone observée par le microscope. Les gouttes les plus petites forment une chaîne dans la direction du champ magnétique. L'observation des gouttes, fluorescentes et répondant au champ magnétique, nous permet donc de co-localiser les nanoparticules de maghémite et le polymère.

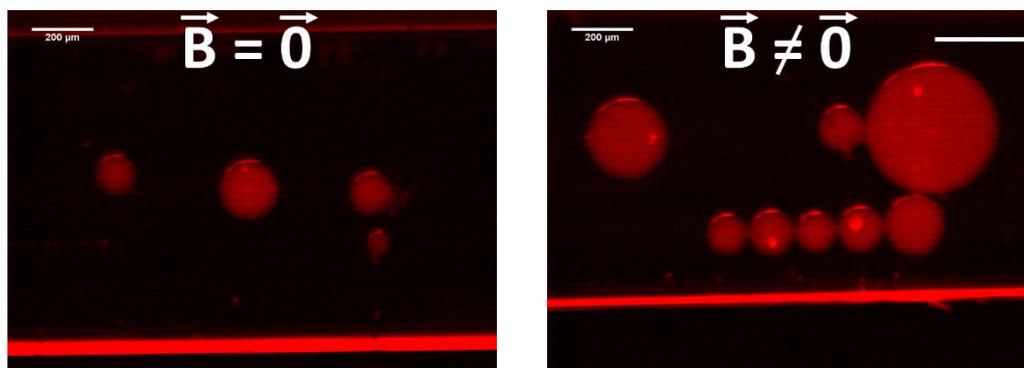


Figure 62 : Clichés de microscopie optique des nano-objets hybrides fluorescents présents dans une macro-émulsion, avant (gauche) ou après (droite) application d'un champ magnétique.

La microscopie optique nous permet également de confirmer le coulage entre polymère et nanoparticules magnétiques.

#### 3.4.4. Sélectivité du polymère obtenu

Nous cherchons à synthétiser un polymère capable de reconnaître la protéine employé en tant que gabarit, et uniquement celle-ci. Afin de tester la sélectivité des PEP magnétiques synthétisés vis-à-vis de la BSA, des études d'adsorption ont été menées en employant l'albumine de sérum humain (HSA) et l'ovalbumine (OVA) comme protéines compétitrices. Ces protéines étant semblables à la BSA (voir Tableau 2<sup>131,133,147-150</sup>), elles constituent de bons candidats pour déterminer la sélectivité des objets synthétisés.

Protéine	Nombre d'acides aminés	Masse moléculaire (kDa)	Taille (nm)	Point isoélectrique
BSA	583	66,43	14x4x4	4,9
HSA	585	66,5	8,5	5,85
OVA	385	42,7	7x3,6x3	4,7

Tableau 2 : Principales caractéristiques de la BSA, la HSA et l'OVA.

Les isothermes d'adsorption présentées Figure 63 ont été réalisées en ayant à chaque fois une seule protéine en solution. Les protéines ayant des masses molaires différentes, il est plus pertinent de parler de capacité d'adsorption en  $\mu\text{mol/g}$  et non plus en  $\text{mg/g}$ , ainsi que de concentrations initiales en  $\mu\text{M}$  et non plus en  $\text{mg/mL}$ . Les nanoparticules hybrides présentent une capacité d'adsorption envers la BSA bien supérieure à celles obtenues envers la HSA ou l'OVA ( $4,5 \mu\text{mol/g}$  face à  $1,6 \mu\text{mol/g}$  et  $1,1 \mu\text{mol/g}$  respectivement, dans les gammes de concentration qui nous intéressent). Les hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-BSA}$  sont donc capables de discriminer entre différentes albumines, et sont sélectifs de la BSA.

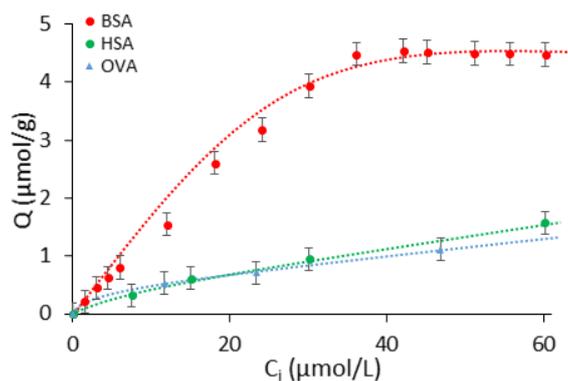


Figure 63: Isotherme d'adsorption de différentes albumines sur les hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-BSA}$ .

Ainsi, le protocole de synthèse mis en œuvre ici permet l'obtention de polymères imprimés spécifiques et sélectifs de la protéine ayant servi de gabarit.

#### 4. Conclusion sur la synthèse et la caractérisation des objets hybrides

Le protocole de synthèse mis en œuvre pour la synthèse des nanoparticules de maghémite consistait en une co-précipitation en milieu basique de chlorures ferriques et ferreux, suivi d'une étape d'oxydation. Les particules obtenues sont monocristallines et superparamagnétiques. Elles mesurent environ 10 nm, et présentent un fort pouvoir chauffant ( $10,46 \text{ W/g}_{\text{maghémite}}$ ), ainsi qu'une charge de surface positive permettant l'obtention d'une dispersion stable.

Nous avons par la suite réalisé une fonctionnalisation effective de la surface de ces nanoparticules de maghémite à l'aide d'un agent Iniferter, l'acide 2-dodecylthiocarbonothioylthio-2-méthylpropanoïque. La mesure par spectroscopie infrarouge réalisée sur l'échantillon atteste de la présence d'une composante organique et donc de la fonctionnalisation de la surface de la maghémite. Elle permet également de déduire que cette fonctionnalisation se fait par formation d'un complexe bidentate chélatant entre l'agent Iniferter et les nanoparticules magnétiques. La diminution du potentiel Zeta mesuré confirme la modification de la surface des nanoparticules, tandis qu'elles conservent des propriétés superparamagnétiques.

La polymérisation de l'acrylamide autour des nanoparticules de maghémite fonctionnalisées a eu lieu en présence de protéines gabarits (ici la BSA comme gabarit modèle) pour obtenir des PEP, ou en l'absence de celles-ci pour obtenir des PNI. Une analyse thermogravimétrique a mis en évidence la présence d'une forte composante organique au sein des objets formés. La mesure du rayon hydrodynamique a montré une augmentation de la taille des particules par rapport à celle des nanoparticules de maghémite. La microscopie électronique en transmission et la spectroscopie infrarouge nous ont permis de montrer que cette augmentation de taille est liée à la présence du polymère autour de l'oxyde de fer. Ce résultat est soutenu également par les mesures de pouvoir chauffant, aimantation à saturation et temps de relaxation effectuées.

Les objets obtenus mesurent entre 90 et 500 nm, et sont constitués d'un cœur composé de plusieurs dizaines de nanoparticules de maghémite agrégées et d'une coquille de polymère à empreintes de protéines, tel que représenté sur la Figure 57.

Une amélioration de la synthèse ici présentée peut être envisagée. L'agent fonctionnalisant la surface des nanoparticules est un agent de type Iniferter non soluble dans l'eau. Ainsi, lorsque les particules fonctionnalisées sont remises en phase aqueuse pour la synthèse du PEP, les nanoparticules de maghémite vont s'agréger, ce qui est à l'origine de la taille importante des objets obtenus. Afin d'obtenir des objets plus petits, ou une meilleure dispersion des particules d'oxyde de fer, il serait intéressant d'employer un agent Iniferter hydrosoluble, tel que celui synthétisé par Bonomi *et al.* en 2016<sup>151</sup>.

Il pourrait également être intéressant de modéliser de façon plus précise les interactions entre monomères et protéines afin de mieux comprendre les interactions non-spécifiques des PEP, afin de trouver le bon monomère fonctionnel, ou le bon mélange de monomères, dans le but de réduire l'adsorption non-spécifique et augmenter la sélectivité des nano-objets hybrides.

## 5. Matériels et méthodes

### 5.1. Réactifs chimiques

Les réactifs chimiques employés ont été obtenus auprès des fournisseurs suivants :  
Acide 2-dodecylthiocarbonothioylthio-2-méthylpropanoïque, acrylamide, méthylène-bis-acrylamide, HEPES, APS, TEMED, BSA, OVA, HSA, AIBN : Sigma.  
Chlorure ferrique, chlorure ferreux, nitrate ferrique, acétone, éther diéthylique, éthanol 96%, méthanol, acide nitrique 68%, chloroforme : VWR.  
Ammoniaque 22,5%, acide acétique : Calo Erba.  
Acryloylthiocarbonyl-Rhodamine B : Polysciences Inc. ; L- $\alpha$ -phosphatidylcholine d'œuf : Avanti ; Acide chlorhydrique 37% : Merck.  
Membranes de dialyse de porosité 10kDa et 100kDa : Spectrum Labs.

### 5.2. Techniques de caractérisations et appareils de mesure

#### 5.2.1. Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X est la technique de caractérisation majeure permettant l'identification des phases cristallines synthétisées. Cette technique repose sur le fait que lorsqu'un rayonnement X arrive avec un angle d'incidence  $\theta$  sur une famille de plans cristallins parallèles (hkl) d'un échantillon, le rayonnement réfléchi par cette famille de plans va sortir de l'échantillon avec le même angle  $\theta$ . Ceci constitue la loi de Bragg :  $2d_{hkl}\sin\theta = n\lambda$ .

Le diffractogramme enregistré est alors formé de pics correspondant aux réflexions sur les différents plans (hkl). La position des pics correspond à l'angle  $2\theta$  de diffraction et l'aire mesurée sous le pic est proportionnelle à l'intensité  $I$  diffractée par la famille de plans correspondants. Par comparaison des valeurs d'intensité et de positions ( $I$ ,  $2\theta$ ) avec celles d'une base de données (fichiers JCPDS : Joint Committee on Powder Diffraction Standard), on peut identifier la (ou les) phase cristalline présente.

Une partie du ferrofluide synthétisé a été séchée dans une étuve à 70°C durant 24h, puis finement broyée et placée dans un porte échantillon en alumine. L'enregistrement des diagrammes de diffraction X s'est fait avec un diffractomètre à poudre PANALYTICAL X'pert Pro MPD équipé d'un filtre Nickel et d'une anticathode Cuivre (raie K $\alpha$  à 1,5418 Å). Les enregistrements ont été effectués à température ambiante entre 10° et 70° en 2 $\theta$  avec un pas de 0,02° et un temps de comptage de 2,4 s par pas, et ce afin d'obtenir une résolution satisfaisante pour le diagramme.

A partir de l'identification des pics du diffractogramme, il est possible de remonter au paramètre de maille (mode de réseau cubique) grâce à l'équation suivante :

$$a = \frac{n \cdot \lambda \cdot \sqrt{h^2 + k^2 + l^2}}{2 \cdot \sin\theta}$$

L'équation dite de Scherrer permettant de remonter à la taille des cristallites (suivant un plan précis) est présentée ci-dessous :

$$d = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Avec d la taille des cristallites en Å,  $\lambda$  la longueur d'onde de la source du rayonnement X en Å,  $\theta$  et  $\beta$  respectivement la position et la largeur à mi-hauteur du pic de diffraction considéré, et K un facteur de forme. Les nanoparticules considérées étant sphériques, le facteur de forme est pris égal à 0,89<sup>152</sup>.

### 5.2.2. Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière est une technique d'analyse employée pour connaître le rayon hydrodynamique de nanoparticules en suspension. Ce rayon tient compte de la couche de solvatation existant autour des nanoparticules. En général, il est supérieur à la taille réelle des objets analysés.

Afin de ne pas réduire la couche de solvatation autour des nanoparticules, la suspension de maghémite obtenue à la fin de la synthèse est diluée : deux gouttes de la solution de maghémite sont diluées dans 2 mL d'une solution d'acide nitrique à pH=2. L'acide nitrique est employé comme solvant de dilution pour que les particules restent dans un milieu de force ionique proche de celui dans lequel elles étaient suspendues. Une sédimentation des particules due à un changement de force ionique fausserait la mesure et est donc à éviter.

Les mesures ont été réalisées avec un appareil Malvern Nanosizer, fonctionnant avec un laser Hélium-Néon à 633 nm, et à un angle fixe de 173° dans une cuve à base carrée. Une fonction d'autocorrélation permet ensuite de relier l'intensité diffusée par une particule du milieu au coefficient de diffusion de cette particule. Cela permet ensuite de calculer une taille hydrodynamique des particules, en formulant l'hypothèse qu'elles sont sphériques.

Une fois les mesures enregistrées, trois types d'analyse sont possibles : en intensité, en volume et en nombre. Lorsque l'on choisit d'effectuer une analyse en intensité, les plus grosses particules sont favorisées. En effet, le signal diffusé est plus intense pour ces particules puisqu'il varie comme d<sup>4</sup> avec d le diamètre des particules. Lorsque l'on effectue une analyse en nombre, ce sont les particules les plus nombreuses les plus avantagées. Enfin, lorsque l'on choisit d'effectuer une analyse en volume, on obtient une bonne moyenne des analyses précédentes, car les particules les plus nombreuses sont souvent les plus petites. Lorsque les trois méthodes d'analyse donnent des résultats proches, les particules ont une faible distribution en taille (monodispersité).

### *5.2.3. Potentiométrie Zeta*

La mesure du potentiel Zeta d'une suspension de nanoparticules fournit une information sur leur charge de surface. Afin d'effectuer la mesure en condition suffisamment diluée pour être dans la gamme de l'appareil tout en restant dans les mêmes conditions de milieu et de force ionique qu'après la synthèse pour ne pas perturber les nanoparticules de maghémite, celles-ci ont été dispersées dans une solution aqueuse d'acide nitrique à pH = 2. La mesure du potentiel Zeta a ensuite été réalisée à l'aide d'un Zetasizer commercialisé par Malvern, qui fournit directement une valeur en mV.

### *5.2.4. Analyse thermogravimétrique*

Les analyses thermogravimétriques ont été effectuées sur un appareil SDT-Q600, TA Instruments. Un échantillon préalablement séché à l'étuve à 70°C durant 1 semaine est ensuite analysé sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>), avec une rampe de température de 10°C/min allant jusqu'à 600°C.

### *5.2.5. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier*

La spectroscopie FTIR (Fourier-Transform Infra-Red spectroscopy) permet de déterminer la nature de la surface des nanoparticules. Une partie de la suspension de particules à analyser est placée dans une étuve à 70°C durant une semaine. La poudre récupérée est finement broyée en présence de KBr et le tout est pressé sous forme de pastille (application d'une pression équivalente à une masse de 10 tonnes durant 20 secondes). La mesure est faite avec un Tensor 27 commercialisé par Bruker, et analysé avec le logiciel OPUS.

### *5.2.6. Relaxométrie*

Pour mesurer leur temps de relaxation T<sub>2</sub>, les échantillons sont placés dans un relaxomètre Minispec Bruker, fonctionnant à 25°C et de fréquence de résonance de 20 MHz. 4 balayages sont effectués par échantillon, avec un gain de 55 dB et un délai de cyclage de 5 s entre deux mesures, une impulsion à 90° de 9 µs et une impulsion à 180° de 16,4 µs séparés de 0,04s (voir annexe 2 page 217 pour plus de détails sur la séquence de mesure).

### *5.2.7. Mesure de l'aimantation à saturation*

Les courbes d'aimantation ont été enregistrées à l'aide d'un magnétomètre à échantillons vibrants développé au laboratoire à partir d'une alimentation commercialisée par Caylor.

Un magnétomètre à échantillons vibrants (ou VSM) se présente tel que schématisé sur la Figure 64. Deux bobines imposent un champ magnétique H uniforme à l'échantillon, généralement compris entre 0 et 5.000 Gauss (10.000 Gauss = 1 T). L'échantillon va alors acquérir une aimantation M, qui va perturber le flux magnétique traversant les bobines de détection. Celles-ci constituant une boucle

supraconductrice, ce flux magnétique doit rester constant et quantifié. Un courant électrique est alors induit dans le système afin de compenser la variation de flux magnétique due à l'aimantation de l'échantillon, et c'est ce courant qui est mesuré. Puis le champ magnétique H imposé varie et une nouvelle mesure a lieu. Des courbes de calibration permettent ensuite de remonter aux valeurs d'aimantation M de l'échantillon pour chaque champ magnétique appliqué et de tracer la courbe d'aimantation de l'échantillon.

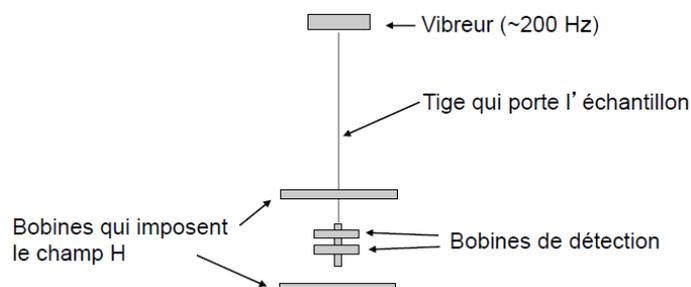


Figure 64 : Schéma de principe d'un magnétomètre à échantillons vibrants.

Les courbes d'aimantation ici présentées ont été obtenues en appliquant un champ magnétique croissant de 0 G à 4.000 G (ou 10.000 G) puis décroissant de 4.000 G (ou 10.000 G) à 0 G. Le champ magnétique varie par pas de 25 G et l'échantillon s'équilibre durant 5 s avant la mesure. Ces mesures permettent aussi de déterminer la taille magnétique des nanoparticules par modélisation de la courbe d'aimantation obtenue par une équation de Langevin (chapitre 1 page 16).

#### 5.2.8. Hyperthermie magnétique

L'échauffement de suspensions de nanoparticules de maghémite ainsi que leur pouvoir chauffant a été mesuré à l'aide d'un MagneTherm, commercialisé par Nanotherics (Royaume-Uni), équipé d'une fibre optique. L'échantillon est à température ambiante avant application d'un champ magnétique alternatif (335 kHz ; 0 - 15 mT).

La capacité calorifique de la solution ainsi que le pouvoir chauffant sont calculés suivant les équations présentées au chapitre 1, page 18.

#### 5.2.9. Microscopie optique

Le microscope employé est un microscope de fluorescence de type Axiovert 200, équipé d'une lampe à vapeur de mercure et de deux filtres. Le premier a une bande passante d'excitation de  $546 \pm 12$  nm, un séparateur de faisceau à 580 nm, et il laisse passer les signaux émis au-dessus de 590 nm. Il permet de visualiser le signal dû à la Rhodamine. Le second a une bande passante d'excitation de  $470 \pm 20$  nm, un séparateur de faisceau à 510 nm, et une bande passante d'émission de  $540 \pm 25$  nm. Il permet de visualiser le signal dû à la GFP. Les observations effectuées au microscope sont collectées par une caméra Manta, commercialisée par Allied Vision, prenant des clichés à une fréquence de 16 images/seconde. Les paramètres d'acquisition des clichés sont : un temps d'exposition de 60 ms et un gain de 33.

Les nano-objets hybrides fluorescents imagés sont en suspension dans le l'eau à une concentration de 6 mg/mL.

Une émulsion eau dans chloroforme a été réalisée en employant de la L- $\alpha$ -phosphatidylcholine d'œuf comme tensioactif. La phase aqueuse est constituée de 250  $\mu$ L de la suspension précédente, que l'on ajoute à 742  $\mu$ L de chloroforme et 8  $\mu$ L de L- $\alpha$ -phosphatidylcholine d'œuf (environ 1% massique de tensio-actif). Un capillaire mesurant 0,1 mm d'épaisseur et 1 mm de largeur a été rempli de cette émulsion, puis observé en microscopie optique comme l'ont été précédemment les nano-objets hybrides en suspension. Des clichés sont pris avant et après l'application d'un champ magnétique (aimant Néodyme-Fer-Bore).

#### 5.2.10. Spectroscopie UV-Visible

La concentration en protéines en solution a été déterminée par enregistrement de spectres d'absorption UV-Visible à l'aide d'un spectromètre UVIKON XL, vendu par SECOMAM. En effet, nombre de protéines présentent une bande d'absorption dans la gamme spectrale UV-Visible du fait des cycles aromatiques de certains acides aminés.

Les spectres sont enregistrés pour des solutions présentes dans des cuves en quartz. Ils ont été analysés à l'aide de courbes d'étalonnage réalisées à partir de solutions de protéines de concentration connues avec précision.

#### 5.2.11. Spectroscopie de fluorescence

L'incorporation effective du fluorophore au sein du polymère a été déterminée par enregistrement de spectres de fluorescence à l'aide d'un appareil Cary Eclipse commercialisé par Agilent. Nous l'avons utilisé en mode spectroscopie d'émission, et donc enregistré le spectre de lumière émis par fluorescence après excitation à une longueur d'onde donnée. Cette longueur d'onde a été choisie égale à 550 nm, car il s'agit de la longueur d'onde avec laquelle les nano-objets considérés seront observés en milieu biologique (voir Chapitre 3).

### 5.3. Synthèse des nanoparticules de maghémite

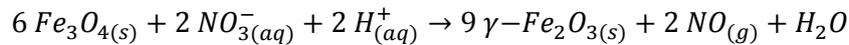
- Synthèse de la magnétite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> :

Dans un premier temps, 180 g de chlorure ferreux sont dissouts dans un mélange contenant 100 mL d'une solution d'acide chlorhydrique à 37 %wt et 500 mL d'eau distillée, à température ambiante et sous agitation magnétique. La solution est transparente et jaune pâle. Elle est ensuite placée dans un bécher de 5 L, toujours sous agitation magnétique à température ambiante, et on lui ajoute 1,59 mol de chlorure ferrique avant d'ajouter une quantité d'eau distillée suffisante pour obtenir un volume total de 3L. La solution obtenue prend alors une couleur rougeâtre.

Dans un second temps, 1 L d'ammoniaque à 22,5 %wt est ajouté au milieu, sous forte agitation. Le milieu réactionnel devient opaque et noir. L'agitation se poursuit durant 30 minutes avant que les nanoparticules de magnétite obtenues ne soient lavées avec de l'eau distillée.

- Oxydation en maghémite  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> :

La magnétite obtenue précédemment en milieu acide est oxydée en maghémite grâce à l'ajout de nitrate ferrique, suivant la réaction d'oxydo-réduction suivante :



La magnétite obtenue est placée en milieu acide, dans une solution composée de 2L d'eau distillée et 360 mL d'acide nitrique à 52,5 %wt. Une solution de nitrate ferrique est préparée en dissolvant 323 g de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> dans de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 800 mL de solution, puis portée à ébullition. Cette solution est par la suite ajoutée au précipité puis le milieu réactionnel est chauffé à 100 °C et placé sous agitation magnétique durant 30 minutes. L'oxydation se traduit par un changement de couleur du milieu, qui passe de noire à rouille.

- Purification :

Une fois la maghémite obtenue, celle-ci est déstabilisée par passage en milieu acide afin de faciliter par la suite les lavages. Cela se fait de la même manière que précédemment, les particules sont placées dans une solution composée de 2 l d'eau distillée et 360 mL d'acide nitrique à 52,5%, puis elles sont lavées, avec successivement trois fois 1L d'acétone et deux fois 500 mL de diéthyléther, en agitant 10 minutes sur plaque magnétique avant d'éliminer chacun des solvants.

Les nanoparticules de maghémite obtenues sont alors dispersées dans 1L d'eau distillée. Le diéthyléther résiduel est éliminé par évaporation en laissant la suspension de maghémite sous agitation magnétique sous une sorbonne en fonctionnement.

- Tri en taille

Les nanoparticules de maghémite obtenues par co-précipitation puis oxydation sont très polydisperses. Il est nécessaire d'effectuer un tri en taille sur celles-ci, afin d'une part de sélectionner que les particules les plus grosses, et d'autre part améliorer la monodispersité de la suspension de maghémite qui servira pour toutes les synthèses ultérieures.

Pour ce faire, nous procédons par déstabilisation fractionnée de la suspension stable obtenue précédemment. 40 mL d'acide nitrique à 68% sont ajoutés à la suspension. Une séparation de phase apparaît, entre une phase dense riche en grosses particules (fond du bécher) et une phase plus diluée riche en petites particules (surnageant).

Les particules dans le fond du bécher sont récupérées puis lavées avec 400 mL d'acétone avant d'être dispersées dans 500 mL d'eau distillée. Une seconde étape de déstabilisation fractionnée a lieu, en employant cette fois 10 mL d'acide nitrique à 68%. Les particules se trouvant alors au fond du bécher sont lavées avec successivement trois fois 400 mL d'acétone et deux fois 200 mL de diéthyléther avant d'être dispersées dans 250 mL d'eau distillée.

Ce sont ces particules triées qui seront utilisées pour tout le travail de thèse.

- Caractérisation de la dispersion de nanoparticules obtenues

Concentration massique en particules de maghémite : 185 g/L

Concentration molaire en fer : 2,32 mol/L

#### 5.4. Fonctionnalisation par l'agent Iniferter

La première étape consiste à préparer une suspension contenant 60 mg d'agent Iniferter pour 150 mg de nanoparticules de maghémite (811  $\mu$ L de la dispersion caractérisée dans la partie précédente). Le ratio entre particules et agent Iniferter a été défini à partir d'une étude bibliographique.

Agent Iniferter et particules de maghémite sont ajoutés à une solution contenant 4 mL d'éthanol et 23 mL d'eau distillée. L'emploi d'éthanol est nécessaire pour assurer la solubilisation de l'agent Iniferter et la dispersion de nanoparticules de maghémite est encore stable dans ce milieu. Le mélange réactionnel est placé sous agitation orbitale durant 12 heures. Après agitation, on peut visuellement reconnaître qu'une réaction a eu lieu car les nanoparticules ne sont plus stables en suspension : elles précipitent dès arrêt de l'agitation.

La deuxième étape consiste à dialyser durant 24 heures la suspension obtenue afin d'éliminer l'excès d'agent Iniferter en solution. Les dialyses ont successivement lieu dans de l'éthanol technique (5 minutes, 10 minutes, 20 minutes et 40 minutes), puis dans un mélange éthanol technique – eau distillée 50:50 volumique (80 minutes et 3 heures), et enfin dans de l'eau distillée (4 heures puis 14 heures). Le passage éthanol technique vers eau distillée se fait pour éviter un assèchement complet de la membrane de dialyse, ainsi que pour re-disperser les particules obtenues en phase aqueuse.

#### 5.5. Synthèse du PEP et du PNI

- Formation du complexe de pré-polymérisation :

Dans un ballon de 100 mL contenant une olive aimantée, on introduit 24 mL d'eau distillée. On dissout dans le milieu 6,5 mmol de monomère acrylamide et 6  $\mu$ mol de protéine. Le milieu est agité magnétiquement durant 1 heure.

- Polymérisation :

##### Par amorçage thermique

Dans le ballon précédent, on ajoute 0,65 mmol d'agent réticulant, le N,N-méthylène-bis-acrylamide, et 80 mg de nanoparticules de maghémite fonctionnalisées à leur surface par l'Agent Iniferter puis 60  $\mu$ mol d'AIBN, l'Azo-bis-Iso-ButyroNitrile et 8 mL d'éthanol technique à 96%. Le ballon est fermé hermétiquement par un septum, scellé avec du Parafilm. Le milieu est dégazé par bullage d'azote durant 15 minutes. Le milieu est chauffé à 60°C par un bain-marie. L'albumine de sérum bovin initialement employée étant stable jusque 63°C, le chauffage n'est pas problématique. Le milieu est ensuite laissé sous agitation magnétique le temps voulu pour la polymérisation. Enfin, le ballon est ouvert et l'oxygène pénétrant arrête la réaction de polymérisation.

##### Par amorçage rédox

Dans le ballon précédent, on ajoute 0,65 mmol d'agent réticulant, le N,N-méthylène-bis-acrylamide, et 80 mg de nanoparticules de maghémite fonctionnalisées à leur surface par l'Agent Iniferter, puis 5 mg d'APS (Ammonium PerSulfate). Le ballon est fermé hermétiquement par un septum, scellé avec du Parafilm. Le milieu est dégazé par bullage d'azote durant 15 minutes. On introduit ensuite dans le ballon 2  $\mu$ L de TEMED (N,N,N',N'-TetraMéthyl-EthylèneDiamine)<sup>153</sup> à l'aide d'une aiguille plantée au

travers du septum. Le milieu est ensuite laissé sous agitation magnétique le temps voulu pour la polymérisation. Enfin, le ballon est ouvert et l'oxygène pénétrant arrête la réaction de polymérisation.

- Purification :

La suspension obtenue est placée dans un bécher. Le surnageant de synthèse est récupéré par décantation magnétique. Les nanoparticules sont lavées trois fois en appliquant le protocole suivant. 20 mL d'eau distillée sont ajoutés aux particules et la suspension est agitée manuellement durant 3 minutes. Puis les particules sont récupérées par décantation magnétique et le processus est répété.

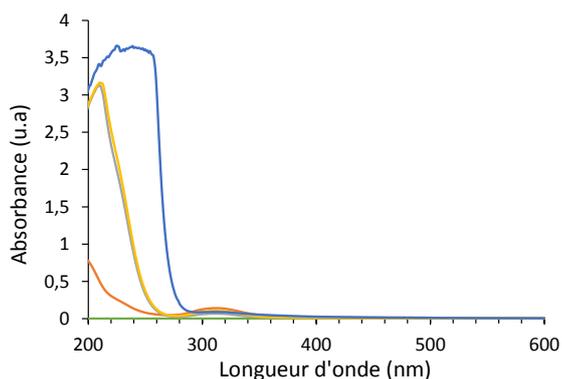


Figure 65 : Spectres d'absorbance des surnageants de lavage des hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP, dans le cas où la protéine employée lors de la synthèse est de l'albumine de sérum bovin, réalisés dans des cuves en quartz. Bleu foncé : surnageant initial ; jaune : lavage 1 ; gris : lavage 2 ; orange : lavage 3 ; vert : lavage 4.

Les surnageants sont analysés par spectrométrie d'absorbance UV-Visible. Ceux-ci peuvent contenir des protéines non imprimées, ainsi que de l'acrylamide (AM) et du méthylène-bis-acrylamide (MBAM) non polymérisés. Les protéines absorbent aux alentours de 280 - 320 nm, du fait de cycles aromatiques présents sur certains de leurs acides aminés (et peuvent présenter d'autres bandes d'absorbance dues à des propriétés particulières, telles que de la fluorescence), de leur conformation tridimensionnelle et de leur état de dégradation. L'AM et le MBAM quant à eux absorbent aux alentours de 220 nm. Lorsque les particules sont propres, le surnageant de lavage ne présente plus aucune bande d'absorption.

- Extraction :

Trois jeux de conditions expérimentales ont été testés pour extraire la protéine après son impression dans le polymère :

#### Solution basique et décantation magnétique

Une solution d'hydroxyde de sodium (soude) est préparée en dissolvant 500 mg de NaOH dans 250 mL d'eau distillée pour obtenir une concentration de 0,05 mol/L. Les nanoparticules recouvertes du polymère à empreintes de protéines, après lavage, sont dispersées dans 10 mL de cette solution. L'ensemble est placé sous agitation orbitale durant 2 heures. Une décantation magnétique permet de récupérer le surnageant, puis les particules sont placées dans de l'eau distillée.

#### Solvant organique faiblement acide et décantations magnétiques

D'abord, les particules sont dispersées dans 10mL d'un mélange méthanol et acide acétique (MeOH:AcOH) 9:1 en volume. La suspension est placée sous agitation orbitale durant 1h30. Le surnageant est récupéré par décantation magnétique. Puis 10mL d'eau distillée sont ajoutés au milieu,

afin de récupérer les protéines dénaturées par le solvant précédent mais non solubles dans celui-ci. La suspension est également agitée orbitalement durant 1h30 avant récupération du surnageant par décantation magnétique. Les deux étapes sont répétées jusqu'à extraction totale de la protéine.

#### Solvant organique faiblement acide et dialyse

Les nano-objets hybrides en suspension desquels il faut extraire la protéine gabarit sont placés dans une membrane de dialyse, elle-même mise dans un béccher rempli d'un mélange eau distillée/méthanol/acide acétique 50:45:5 en volume, sous faible agitation magnétique. Le solvant de dialyse est changé régulièrement jusqu'à ce qu'aucun signal n'y soit détecté par spectroscopie UV-Visible.

Les polymères non imprimés sont synthétisés de la même manière, la seule différence étant l'absence de la protéine gabarit et donc de l'étape du complexe de pré-polymérisation. L'acrylamide est ajouté en même temps que l'agent réticulant.

### 5.6. Réalisation d'isothermes d'adsorption

Le protocole expérimental mis en œuvre pour effectuer les isothermes est le suivant.

Dans des flacons de verre d'une contenance de 4,5 mL on introduit une masse connue avec précision de nanoparticules hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-BSA. Cette masse est proche de 20 mg. On ajoute ensuite 3 mL d'une solution de BSA (ou de HSA ou d'OVA) dans de l'eau distillée à des concentrations variées. Celles-ci sont comprises entre 0 mg/mL et 4 mg/mL. Les flacons sont placés sur un agitateur orbitaire à 480 rpm durant 24h. Puis les flacons sont positionnés sur un aimant afin d'effectuer une décantation magnétique. Les surnageants sont récupérés et analysés par spectrométrie d'adsorption UV-Visible. Cela permet de déterminer la quantité de protéine encore présente en solution. Et de là, déduire la quantité de BSA adsorbée à la surface des hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-BSA.

# Chapitre 3 : Ciblage de la GFP et sa dénaturation par hyperthermie magnétique



## Table des matières

1. Les objets hybrides $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-GFP.....	79
1.1. La protéine fluorescente verte (GFP) .....	79
1.2. Caractérisations des objets hybrides.....	80
2. Adsorption <i>in vitro</i> de la GFP.....	81
2.1. Isothermes d'adsorption .....	81
2.1.1. Isothermes d'adsorption de la GFP sur les PEP et PNI .....	81
2.1.2. Comparaison avec les isothermes d'adsorption de la BSA .....	83
2.2. Visualisation de l'adsorption .....	84
2.3. Cinétique d'adsorption.....	84
2.3.1. Temps d'équilibre des études <i>in vitro</i> .....	85
2.3.2. Temps d'équilibre des tests de ciblage cellulaire.....	86
2.4. Résilience de l'adsorption .....	87
2.5. Sélectivité et compétition lors de l'adsorption .....	87
2.5.1. Tests de sélectivité .....	87
2.5.2. Tests de compétitivité .....	88
2.5.3. Adsorption de GFP après pré-saturation de surface par de l'ovalbumine.....	89
3. Devenir <i>in vitro</i> de la GFP adsorbée.....	89
3.1. Désorption.....	89
3.1.1. Désorption passive .....	90
3.1.2. Désorption par chauffage au bain-marie .....	90
3.1.3. Désorption sous champ magnétique alternatif.....	91
3.2. Dénaturation .....	92
3.2.1. Chauffage par hyperthermie magnétique.....	92
3.2.2. Comparaison avec le chauffage au bain-marie .....	93
3.2.3. Combinaison des deux méthodes de chauffage .....	94
4. Ciblage cellulaire de la protéine fluorescente verte (GFP).....	95

4.1.	Adsorption de protéines immobilisées en milieu de culture cellulaire.....	95
4.2.	Les objets biologiques employés.....	97
4.2.1.	Le plasmide TMD-pHluorin.....	97
4.2.2.	Les cellules COS-7.....	97
4.2.3.	Les cellules HeLa.....	97
4.3.	Ciblage des cellules COS-7 transfectées TMD-PHluorin.....	98
4.4.	Ciblage des cellules HeLa transfectées TMD-PHluorin.....	98
4.4.1.	Influence de la durée d'incubation des particules.....	98
4.4.2.	Ciblage et adsorption compétitrice.....	100
4.5.	Dénaturation de la GFP sur-exprimée par les cellules HeLa.....	102
5.	Conclusion sur les performances des objets hybrides pour le ciblage et la dénaturation.....	103
6.	Matériels et méthodes.....	104
6.1.	Réactifs chimiques.....	104
6.2.	Appareils de mesure.....	105
6.3.	Détermination de la concentration en protéines.....	105
6.4.	Etudes de l'adsorption <i>in vitro</i> .....	106
6.4.1.	Isothermes.....	106
6.4.2.	Visualisation de l'adsorption.....	106
6.4.3.	Cinétique.....	106
6.4.4.	Sélectivité.....	107
6.4.5.	Résilience.....	108
6.5.	Devenir <i>in vitro</i> .....	108
6.5.1.	Désorption.....	108
6.5.2.	Dénaturation.....	108
6.6.	Ciblage cellulaire.....	109
6.6.1.	Adsorption de GFP immobilisée.....	109
6.6.2.	Culture des cellules et transfection.....	110
6.6.3.	Réalisation du ciblage.....	110
6.6.4.	Analyse des résultats obtenus.....	110
6.7.	Dénaturation de la protéine exprimée par les cellules.....	111

La synthèse des objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  effectuée, nous nous sommes ensuite concentrés sur l'obtention de nano-objets dont le polymère imprimé est susceptible de cibler une protéine présente sur une membrane extracellulaire. Nous nous sommes également penchés sur la possible utilisation de leurs propriétés d'hyperthermie magnétique afin de dénaturer les protéines ciblées après leur adsorption. Notre choix s'est porté sur la synthèse de polymères à empreintes de GFP, la protéine fluorescente verte. Cette protéine présente l'avantage de pouvoir être produite en grandes quantités à faible coût. Elle est donc facilement disponible pour effectuer les différents tests *in vitro*. Cette protéine est également facilement exprimable par de nombreuses lignées cellulaires. Il est donc envisageable de l'employer pour étudier les performances en termes de ciblage des nano-objets hybrides. Enfin, sa dénaturation est très visuelle car elle entraîne une perte de fluorescence, ce qui est facilement quantifiable.

## 1. Les objets hybrides $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$

### 1.1. La protéine fluorescente verte (GFP)

La protéine fluorescente verte, ou GFP (Green Fluorescent Protein) est une protéine naturelle présente dans les méduses *Aequorea Victoria* (Figure 66)<sup>154</sup>. Un processus de bioluminescence a lieu : la présence de calcium active une photoprotéine, l'aequorine, qui émet de l'énergie sous forme de lumière bleutée. La GFP absorbe cette énergie et la réémet à son tour sous forme de lumière verte.



Figure 66 : Méduses *Aequorea Victoria*<sup>154</sup>.

La GFP est composée de 238 acides aminés<sup>155</sup> pour une masse molaire de 27 kDa environ<sup>156</sup>. Elle est très stable dans des tampons neutres jusqu'à 65°C<sup>157</sup> mais également dans une large gamme de pH, de 5,5 à 12 à des températures proches de 25°C. Son point isoélectrique est compris en 4,6 et 5,1<sup>158</sup>. Elle se présente sous forme d'un cylindre de 4,2 nm de hauteur pour 2,4 nm de diamètre<sup>156</sup>.

La protéine est intensément fluorescente, avec un rendement quantique d'environ 80% et un coefficient d'extinction molaire qui varie entre  $9,5 \cdot 10^3$  et  $14 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  pour le pic d'excitation à 475nm<sup>157</sup>. La fluorescence intrinsèque de la protéine est due à la présence d'un chromophore unique, formé après la traduction de celle-ci lors de la cyclisation et l'oxydation des acides aminés 65 à 67, Ser-Tyr-Gly<sup>159</sup> (Figure 67).



Figure 67 : Structure tridimensionnelle de la GFP<sup>160</sup>. Les rubans représentent les chaînes d'acides aminés, et la molécule au centre est le fluorophore lié de façon covalente à la protéine.

La GFP naturelle possède deux pics d'excitation, le plus important à 395 nm et le second à 475 nm ainsi qu'un pic d'émission à 509 nm. Afin de visualiser la GFP *in cellulo*, des filtres de microscopie de fluorescence sont appliqués. Ils ne sont cependant pas suffisamment performants pour permettre une bonne visualisation de cette GFP. Afin de contourner ce problème, des protéines ont été créées en substituant un acide aminé thréonine à la sérine initialement présente en position 65 chez la GFP. Les nouvelles protéines se nomment E-GFP (enhanced green fluorescent protein) ou protéine fluorescente verte à fluorescence accrue et possèdent une fluorescence augmentée d'un facteur 5. Ce faisant, le pic principal d'excitation a été déplacé aux alentours de 490 nm. C'est cette protéine qui a été utilisée au cours de notre étude. Toutefois, par abus de langage et pour des raisons de simplicité, nous parlerons de GFP et non pas d'E-GFP.

Par la suite, d'autres modifications ont été apportées au gène codant pour la synthèse de la GFP, ou toute autre protéine fluorescente, afin d'obtenir des protéines d'intérêt biologique fluorescentes. Cela permet l'obtention d'une fluorescence *in vivo*, pouvant facilement être suivie par microscopie. Une des applications les plus usitées est la visualisation de compartiments intracellulaires grâce au couplage entre une protéine spécifique de cet organite cellulaire et la GFP. Par exemple, Runions *et al.* ont réalisé en 2005 des images du réticulum endoplasmique exprimant une protéine fluorescente verte, et de l'appareil de Golgi, exprimant une protéine fluorescente rouge, de feuilles de tabac par microscopie confocale de fluorescence (Figure 68)<sup>161</sup>.

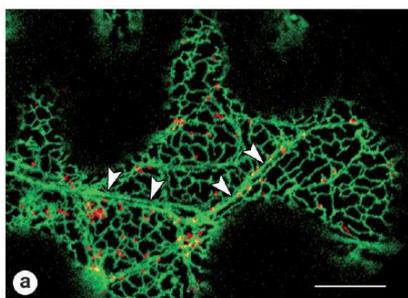


Figure 68 : Clichés de microscopie confocale d'une feuille de tabac<sup>161</sup>. Vert : réticulum endoplasmique. Rouge : appareil de Golgi. Barre d'échelle : 20 $\mu$ m.

## 1.2. Caractérisations des objets hybrides

Les nano-objets hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-GFP, possédant une matrice polymère fluorescente (Rhodamine) ou non, ont été synthétisés en appliquant le protocole optimisé au chapitre précédent. Une mesure du diamètre hydrodynamique des nano-objets obtenus, ainsi que de leur perte de masse à 600°C ont mis en évidence la présence du PEP (Tableau 3).

Echantillon	Diamètre hydrodynamique (nm)	Perte de masse (200°C - 600°C)
Nanoparticules nues	15,5 ± 2	0 %
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-GFP	415 ± 75	23 %
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-GFP fluorescent (Rhodamine)	177 ± 78 182 ± 90 (24h dans DMEM:FBS)	18 %
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PNI fluorescent (Rhodamine)	212 ± 80	19 %

Tableau 3 : Diamètre hydrodynamique et perte de masse à 600°C de différents nano-objets hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-GFP et  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PNI. DMEM:FBS : milieu de culture des cellules HeLa.

Les nanoparticules hybrides présentent un diamètre hydrodynamique moyen bien plus important que les nanoparticules nues. Ceci peut être d'une part lié à l'agrégation des nanoparticules

fonctionnalisées (cf. clichés de microscopie des objets hybrides Figure 56 page 60), mais également à la présence du polymère. Celle-ci est validée par la perte de masse d'environ 20 % pour les différents nano-objets hybrides alors que la perte de masse des nanoparticules nues sur la plage de température considérée est de 0% (Tableau 3).

Par ailleurs, lors des tests de ciblage cellulaire les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  fluorescents sont en solution dans du milieu de culture cellulaire (ici DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium suppléé au FBS, sérum fœtal de veau) avant d'être mis au contact des cellules. Après 24h à température ambiante au laboratoire, nous avons mesuré le diamètre hydrodynamique des particules. Le changement de milieu n'induit pas d'agrégation des nano-objets, car le diamètre hydrodynamique n'évolue pas de manière significative (Tableau 3). Les hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  sont stables au sein du milieu de culture cellulaire.

Une des applications envisagées pour ces nano-objets hybrides étant la dénaturation de protéines par échauffement local grâce à l'hyperthermie magnétique, il était essentiel de s'assurer que les nano-objets hybrides possédaient également cette propriété, à l'instar des nanoparticules de maghémite non fonctionnalisées.

L'augmentation de température d'une suspension de nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  a été enregistrée lors de l'application d'un champ magnétique alternatif, ce qui nous a permis de calculer un pouvoir chauffant de l'ordre de  $6,2 \text{ W/g}_{\text{maghémite}}$ , contre  $10,5 \text{ W/g}_{\text{maghémite}}$  pour les nanoparticules nues. La diminution observée pour les particules hybrides par rapport aux nanoparticules d'oxyde de fer nues put être attribuée à leur agrégation au sein du polymère<sup>40</sup>. La mesure d'un pouvoir chauffant non nul pour les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  confirme cependant un certain maintien des propriétés d'hyperthermie magnétique des particules d'oxyde de fer même au sein du polymère, et donc la possible utilisation de celles-ci pour induire une augmentation de température.

## 2. Adsorption *in vitro* de la GFP

Nous avons ensuite cherché à caractériser les performances en adsorption des hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ . Pour cela, nous nous sommes intéressés à leur capacité d'adsorption qu'à la spécificité, la sélectivité et la cinétique de l'adsorption.

### 2.1. Isothermes d'adsorption

#### 2.1.1. Isothermes d'adsorption de la GFP sur les PEP et PNI

Les isothermes d'adsorption réalisées pour la GFP sur les PEP ou PNI magnétiques synthétisés dans l'eau sont présentées sur la Figure 69. Les polymères à empreintes de GFP adsorbent plus de protéines que les polymères non imprimés. En effet, les capacités d'adsorption à saturation varient d'un facteur 2,3 avec  $Q_{\text{max,PEP}} = 57,5 \text{ mg/g}$  et  $Q_{\text{max,PNI}} = 24,9 \text{ mg/g}$ .

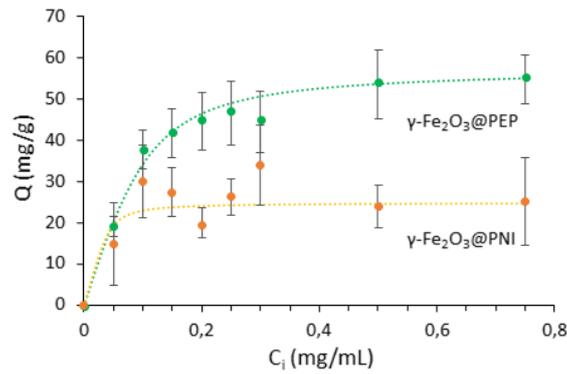


Figure 69 : Isothermes d'adsorption de la GFP à la surface d'hybrides maghémite – polymère à empreintes de GFP ou non imprimé, ainsi que les modélisations correspondantes par des isothermes de Langmuir.

Classiquement, deux modèles d'adsorption sont employés afin de modéliser les résultats expérimentaux : le modèle de Langmuir<sup>162</sup> ou le modèle de Freundlich<sup>163</sup> (voir la revue présentée en annexe 4). Ces deux modèles ont été appliqués aux mesures expérimentales correspondant à l'adsorption de la GFP sur les polymères à empreintes de GFP d'une part, et sur les polymères non imprimés d'autre part. Les facteurs de corrélation ainsi que les différents paramètres obtenus sont présentés dans le Tableau 4.

Echantillon	$Q_{max,exp}$ (mg/g)	$R^2$	$Q_{max,theo}$ (mg/g)	K	m
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ , Langmuir	57,5	0,998	57	$1,14 \mu\text{M}^{-1}$	-
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$ , Langmuir	24,9	0,982	25	$0,62 \mu\text{M}^{-1}$	-
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ , Freundlich	57,5	0,990	60	$1.10^{13} (\text{mg/g})(\text{mL/mg})^{0,13}$	0,13
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$ , Freundlich	24,9	0,239	29	$5,28.10^{16} (\text{mg/g})(\text{mL/mg})^{0,09}$	0,09

Tableau 4 : Paramètres obtenus lors de la modélisation des isothermes d'adsorption par les équations linéarisées de Langmuir et Freundlich.

L'adsorption de la GFP peut être caractérisée à l'aide d'un modèle de Langmuir, et le protocole de synthèse développé pour l'impression de BSA est robuste car transposable à l'impression de GFP. L'adsorption est spécifique, due à la présence d'empreintes.

Cependant, le modèle de Langmuir peut apparaître comme limité lorsque l'on s'intéresse à l'adsorption de protéines sur des PEP magnétiques. En effet, ce modèle considère un seul type de sites d'adsorption, alors que nous savons qu'il en existe au moins deux : les empreintes (sites d'adsorption spécifique) et les sites d'adsorption non-spécifique. Afin de mettre en évidence la présence de ces deux types de sites distincts, les données expérimentales peuvent être analysées suivant le modèle de Scatchard – Rosenthal<sup>164</sup>. La courbe obtenue en appliquant ce modèle est présentée Figure 70.

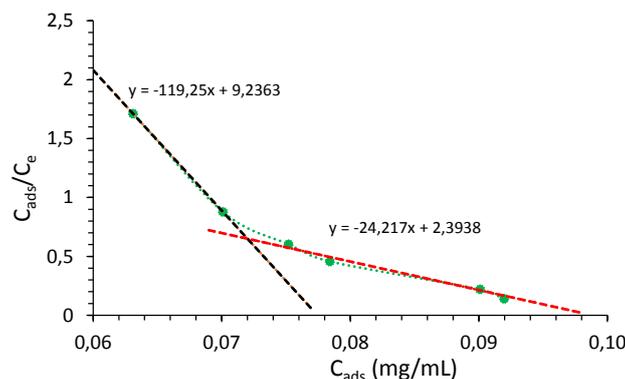


Figure 70 : Analyse Scatchard de l'adsorption de la GFP sur les nano-hybrides PEP magnétiques.

Les points expérimentaux obtenus semblent s’aligner suivant deux portions de droites, indiquant la présence de deux types de sites de reconnaissance protéique distincts au sein de la matrice polymère, de constantes d’associations intrinsèques respectives  $3,22 \mu\text{M}^{-1}$  et  $0,65 \mu\text{M}^{-1}$ . L’hypothèse retenue pour expliquer les deux valeurs de constantes d’association, et donc d’affinité protéine – polymère, est la présence de deux types de sites d’interaction différents. D’une part, les empreintes ayant une forte affinité pour les protéines ciblées, et d’autre part le polymère en lui-même, responsable de l’adsorption non spécifique. Lorsque l’on réalise la même analyse des données obtenues sur le polymère non imprimé, on obtient une seule constante d’affinité qui vaut  $0,59 \mu\text{M}^{-1}$  et est donc comparable au  $0,65 \mu\text{M}^{-1}$  obtenu pour les hybrides PEP magnétiques. L’autre constante déterminée précédemment pour les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  caractérise donc la présence de sites d’adsorption spécifique, i.e. les empreintes de protéines.

### 2.1.2. Comparaison avec les isothermes d’adsorption de la BSA

Il est intéressant de comparer les performances en adsorption des polymères à empreintes de BSA et ceux à empreintes de GFP. Les protéines n’ayant pas le même poids moléculaire, il est plus pertinent d’exprimer les capacités d’adsorption en  $\mu\text{mol/g}$  qu’en  $\text{mg/g}$ . De plus, les conditions expérimentales étant légèrement différentes lors de la réalisation des différentes isothermes, la concentration initiale en protéines à prendre en compte doit se faire en  $\text{nmol}$  par  $\text{mg}$  de particules, et non plus en  $\text{mg/mL}$ .

On peut voir sur la Figure 71 que les nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-BSA}$  présentent une capacité d’adsorption bien supérieure à celle des objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  ( $4,5 \mu\text{mol/g}$  contre  $1,7 \mu\text{mol/g}$ ), mais surtout un facteur d’impression plus élevé ( $3,75$  contre  $2,3$ ), alors que la même quantité initiale de protéine ( $6 \mu\text{mol}$ ) était à imprimer.

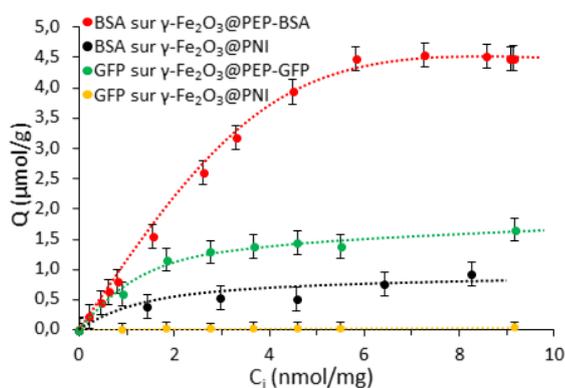


Figure 71 : Comparaison des performances obtenues pour les polymères à empreintes de BSA ou de GFP vis-à-vis de la protéine utilisée comme gabarit.

Afin de comprendre cette différence, il faut se poser la question de la surface des protéines, c’est-à-dire la nature des acides aminés accessibles aux monomères puis au polymère afin d’effectuer une impression puis une reconnaissance spécifique. Pour ce faire, nous nous sommes aidés de la méthode d’analyse metapocket développée par Huang en 2009<sup>165</sup>, permettant l’obtention de la séquence des acides aminés de surface de la GFP et de la BSA. Nous avons ensuite classé ces acides aminés en deux catégories : polaire et non polaire, afin d’avoir une idée de la polarité relative de leur surface.

Protéine	BSA	GFP
Nombre d’acides aminés de surface	301	125
% d’acides aminés polaires	55,5%	63,2%
% d’acides aminés non polaires	44,5%	36,8%

Tableau 5 : Composition relative de la surface extérieure de deux protéines, BSA et GFP.

Le Tableau 5 nous indique que la surface de la BSA est moins polaire que la surface de la GFP. Plus une surface est polaire, et plus il y a de molécules d'eau en interaction avec celle-ci. Lors de la synthèse du polymère imprimé, les monomères fonctionnels ont alors plus de difficultés à former des complexes de pré-polymérisation avec les protéines, du fait de la présence des molécules d'eau, et moins de protéines sont imprimées. Il y aura donc moins de sites de reconnaissance, conduisant à une capacité d'adsorption plus faible. Cette hypothèse de différence d'interactions monomère - protéine due à la polarité est soutenue par une adsorption non-spécifique plus faible pour la GFP que pour la BSA : les monomères se sont liés dans une moindre mesure, et le polymère fait de même.

## 2.2. Visualisation de l'adsorption

D'après les résultats précédents, les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  sont capables d'adsorber de la GFP. Nous voulions avoir une preuve visuelle de cette adsorption et pour ce faire avons décidé d'employer la microscopie optique de fluorescence. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 72. Les objets hybrides étant trop petits pour être imagés directement, nous avons commencé par déstabiliser une suspension de particules, conduisant à l'agrégation des nano-objets.

Après adsorption de la protéine par les nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ , aucun lavage des particules n'a été effectué, et la solution initiale de GFP n'a pas été retirée, ce qui explique une fluorescence de l'ensemble de la zone imagée, comme nous pouvons le voir sur la Figure 72, milieu. Cependant, les zones de fluorescence correspondant à la rhodamine (fluorophore couplé au polymère imprimé) se superposent parfaitement aux zones de forte intensité de fluorescence correspondant à la GFP (Figure 72, droite). Ainsi, les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  sont bien capables d'adsorber la protéine ciblée.

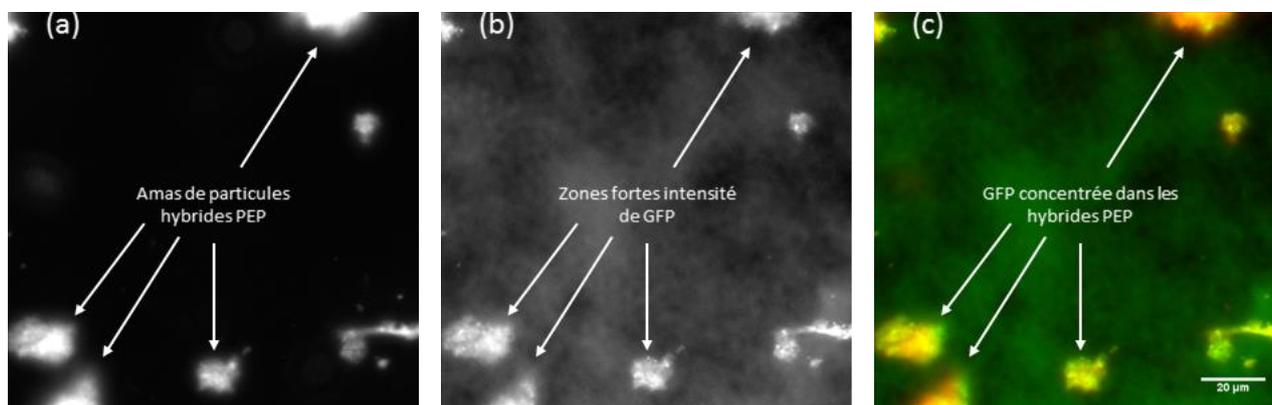


Figure 72 : Clichés de microscopie optique montrant les nano-objets hybrides et les protéines. (a) : filtre Rhodamine, (b) : filtre GFP, (c) : superposition. La barre d'échelle est valide pour les trois clichés.

## 2.3. Cinétique d'adsorption

Une cinétique d'adsorption dépend de nombreux facteurs. La probabilité de rencontre entre polymère et protéine, et donc d'adsorption, sera d'autant plus faible que le volume total de solution sera élevé et les quantités de protéine et de nano-objets hybrides seront faibles.

Les tests d'adsorption menés *in vitro* emploient majoritairement 5 mg de particules hybrides dans 3 mL d'une solution de protéine à des concentrations variant entre 0 et 0,75 mg/mL. Les tests de ciblage cellulaire emploient 60  $\mu\text{g}$  de particules hybrides dans 1 mL de milieu de culture contenant les cellules exprimant la GFP à leur surface. On est alors dans des conditions beaucoup plus diluées en

termes de particules hybrides et de protéine. Les temps d'équilibre d'adsorption peuvent alors fortement varier et il est nécessaire d'effectuer deux études cinétiques. La première pour déterminer le temps d'équilibre nécessaire aux études in vitro. La seconde pour déterminer le temps d'équilibre nécessaire aux études de ciblage cellulaire.

### 2.3.1. Temps d'équilibre des études in vitro

L'équilibre d'adsorption de la GFP par les particules hybrides à cette concentration est atteint au bout de 2h (Figure 73).

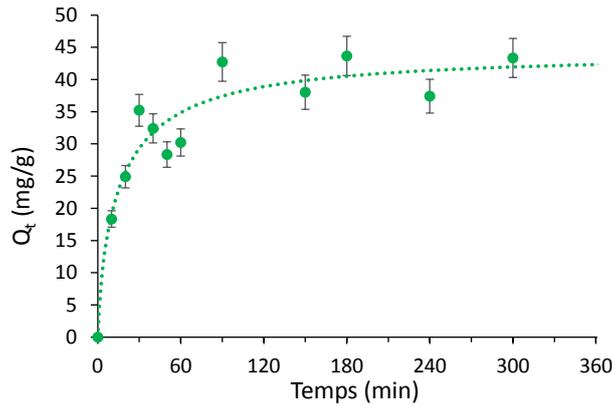


Figure 73 : Cinétique d'adsorption de la GFP à la surface des nanoparticules hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  (5 mg dans 3 mL de GFP à 0,15 mg/mL). Points : données expérimentales, trait : modélisation.

Afin de mieux comprendre cette cinétique, nous avons cherché sa loi de vitesse. Il nous faut prendre en compte la présence de deux types de sites d'interaction d'énergie différente : les sites d'adsorption spécifique, et les sites d'adsorption non spécifique. Au vu de la taille des objets hybrides face à la taille des protéines (300 nm vs 10 nm environ), ces deux types de sites d'interaction peuvent être considérés comme deux ligands distincts, présents simultanément au sein du milieu mais parfaitement indépendant l'un de l'autre. Il faut juste considérer le fait que pour un site d'adsorption non-spécifique il y a IF empreintes, IF étant le facteur d'impression déterminé à l'aide des isothermes d'adsorption, et calculé suivant l'équation (1) présentée ci-dessous. La cinétique d'adsorption globale peut alors être approximée par une somme pondérée des cinétiques des deux ligands telle que présentée en équation (2).

$$IF = \frac{Q_{\max,PEP}}{Q_{\max,PNI}} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$Q(t) = \frac{IF}{1+IF} \cdot f_{\text{spécifique}}(Q(t)) + \frac{1}{1+IF} \cdot f_{\text{non-spécifique}}(Q(t)) \quad \text{Eq. (2)}$$

Avec  $Q_{\max,PEP}$  et  $Q_{\max,PNI}$  les capacités d'adsorption des objets hybrides magnétiques PEP et PNI respectivement (en mg/g) et  $f_{\text{spécifique}}$  et  $f_{\text{non-spécifique}}$  deux fonctions correspondant à l'adsorption de la protéine sur les sites de reconnaissance spécifique et non-spécifique respectivement, traditionnellement décrites par des modèles de type pseudo-1<sup>er</sup> ou pseudo-2<sup>nd</sup> ordre<sup>166,167</sup>. On suppose ici que  $f_{\text{spécifique}}$  et  $f_{\text{non-spécifique}}$  tendent vers la même valeur à l'équilibre. Plusieurs cas de figures peuvent alors avoir lieu, en fonction de la nature de  $f_{\text{spécifique}}$  et  $f_{\text{non-spécifique}}$ . Elles peuvent correspondre toutes deux à des lois du même type, ou de type différent. Les différents modèles ont été appliqués aux données expérimentales, et les paramètres obtenus sont regroupés dans le Tableau 6.

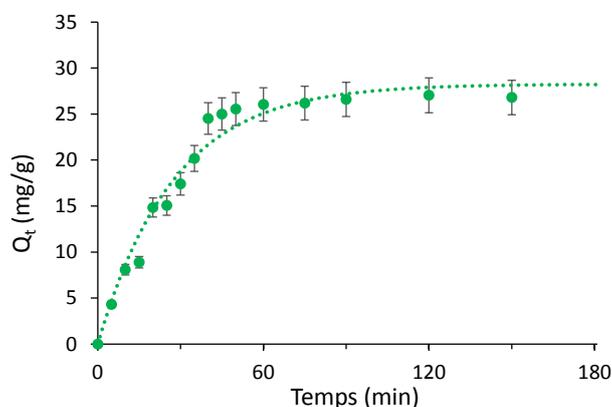
Au vu des paramètres obtenus lors de la modélisation des courbes, l'adsorption de la GFP sur les hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  suit un modèle de pseudo-second ordre pour les sites d'adsorption spécifique et de type pseudo-premier ordre pour les sites d'adsorption non-spécifique. L'équilibre est atteint au bout de deux heures, avec un temps de demi-équilibre de 19 min.

Modèle adsorption spécifique	Modèle adsorption non-spécifique	R <sup>2</sup>	Q <sub>e,exp</sub> (mg/g)	Q <sub>e,théo</sub> (mg/g)	k <sub>spécifique</sub>	k <sub>non-spécifique</sub>
Pseudo 1 <sup>er</sup> ordre	Pseudo 1 <sup>er</sup> ordre	0,904	44	41,6	2,6.10 <sup>-2</sup> min <sup>-1</sup>	2,8.10 <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>
Pseudo 2 <sup>ème</sup> ordre	Pseudo 2 <sup>ème</sup> ordre	0,922	44	45	1,4.10 <sup>-3</sup> g.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	2,1.10 <sup>-2</sup> g.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>
Pseudo 1 <sup>er</sup> ordre	Pseudo 2 <sup>ème</sup> ordre	0,913	44	41,6	2,6.10 <sup>-2</sup> min <sup>-1</sup>	3,6.10 <sup>-2</sup> g.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>
<b>Pseudo 2<sup>ème</sup> ordre</b>	<b>Pseudo 1<sup>er</sup> ordre</b>	<b>0,941</b>	<b>44</b>	<b>44,6</b>	<b>1,4.10<sup>-2</sup> g.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup></b>	<b>4,8.10<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup></b>

Tableau 6 : Paramètres obtenus lors de la modélisation de la cinétique d'adsorption de la GFP sur les PEP magnétiques.

### 2.3.2. Temps d'équilibre des tests de ciblage cellulaire

Afin de se placer dans des conditions expérimentales proches de celles mises en œuvre lors des tests de ciblage cellulaire, nous avons réalisé une seconde étude cinétique en condition bien plus diluée. En effet, l'équilibre d'adsorption de la GFP à cette concentration est atteint après 40 min (Figure 74). Afin d'avoir une idée plus précise de la cinétique d'adsorption, les données expérimentales obtenues ont été modélisées comme précédemment par différentes lois.


 Figure 74 : Cinétique d'adsorption de la GFP sur des nano-objets hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-GFP (conditions très diluées : 50  $\mu$ g dans 1 mL de GFP à 42  $\mu$ g/mL).

Modèle adsorption spécifique	Modèle adsorption non-spécifique	R <sup>2</sup>	Q <sub>e,exp</sub> (mg/g)	Q <sub>e,théo</sub> (mg/g)	k <sub>spécifique</sub>	k <sub>non-spécifique</sub>
<b>Pseudo 1<sup>er</sup> ordre</b>	<b>Pseudo 1<sup>er</sup> ordre</b>	<b>0,972</b>	<b>26,8</b>	<b>28,3</b>	<b>3,6.10<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup></b>	<b>3,6.10<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup></b>
Pseudo 2 <sup>ème</sup> ordre	Pseudo 2 <sup>ème</sup> ordre	0,948	26,8	35,1	1,5.10 <sup>-3</sup> g.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	3,5.10 <sup>-3</sup> g.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>
Pseudo 1 <sup>er</sup> ordre	Pseudo 2 <sup>ème</sup> ordre	0,956	26,8	30,5	3,9.10 <sup>-2</sup> min <sup>-1</sup>	2,8.10 <sup>-3</sup> g.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>
Pseudo 2 <sup>ème</sup> ordre	Pseudo 1 <sup>er</sup> ordre	0,959	26,8	33	2,2.10 <sup>-2</sup> g.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	1,4.10 <sup>-3</sup> min <sup>-1</sup>

Tableau 7 : Paramètres obtenus lors de la modélisation de la cinétique d'adsorption de la GFP sur les PEP magnétiques en conditions très diluées.

L'adsorption de la GFP suit un modèle de type pseudo-premier ordre, à la fois pour l'adsorption spécifique et l'adsorption non-spécifique (Tableau 7). L'équilibre est atteint après 40 min, avec un temps de demi-équilibre de 19 min, comme lors de l'étude cinétique en employant de plus grandes quantités de particules.

On peut remarquer qu'ici la cinétique d'adsorption au sein des empreintes obéit à une loi de type pseudo-premier ordre : l'adsorption est limitée par la probabilité de rencontre entre la GFP et l'empreinte au sein du polymère. Lorsque le milieu contient beaucoup plus de particules hybrides et de protéines, la probabilité de rencontre entre les deux augmentera fortement. Ce ne sera donc plus le facteur limitant l'adsorption, et la cinétique de celle-ci obéira alors à une loi de type pseudo-second ordre.

## 2.4. Résilience de l'adsorption

Comme présenté sur la Figure 75, aucun changement significatif dans la capacité d'adsorption des hybrides n'est visible après 8 cycles d'adsorption – désorption. Les empreintes possèdent donc une forte capacité de régénération et les conditions expérimentales employées n'induisent pas de dégradation de la matrice polymère.

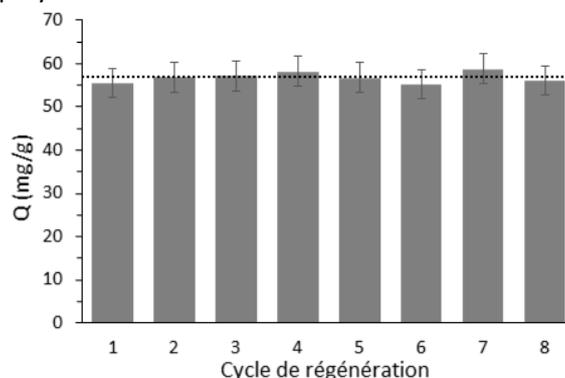


Figure 75 : Influence du nombre de cycle de régénération des polymères magnétiques à empreintes de GFP sur leur capacité à adsorber la protéine cible.

## 2.5. Sélectivité et compétition lors de l'adsorption

Nous nous sommes ensuite intéressés à la sélectivité des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  synthétisés. Pour ce faire, des études d'adsorption ont été menées en employant du lysozyme (Lyz) et de l'ovalbumine (OVA). Le choix s'est porté sur ces deux protéines car elles étaient disponibles au laboratoire, et car le lysozyme étant bien plus petit que la GFP et l'ovalbumine étant bien plus grosse, nous pouvions voir l'influence de la taille et de la charge des protéines sur l'adsorption non spécifique. En effet, nous travaillons à  $\text{pH}=8$ , soit au-dessus du point isoélectrique de la GFP et de l'OVA mais en dessous de celui du lysozyme. Ce dernier n'a donc pas la même charge de surface que les autres protéines étudiées.

Les caractéristiques principales de ces protéines, ayant une influence sur leur adsorption, sont présentées dans le Tableau 8. Les protéines ayant des masses molaires très différentes, il devient plus pertinent de parler de capacités d'adsorption en  $\mu\text{mol/g}$  ainsi que de concentrations initiales en  $\mu\text{M}$ .

Protéine	Nombre d'acides aminés	Masse moléculaire (kDa)	Taille (nm)	Point isoélectrique
GFP	238	27	4,2x2,4	5,7
Lyz	129	14,3	6x2,4	11,35
OVA	385	42,7	7x3,6x3	4,7

Tableau 8 : Principales caractéristiques de la GFP, le lysozyme et l'ovalbumine<sup>131,148,150,155,156,158,168-171</sup>.

### 2.5.1. Tests de sélectivité

Dans un premier temps, des tests de sélectivité ont été effectués. Les deux protéines choisies comme compétitrices étaient alors seules en solution lors de la réalisation des isothermes d'adsorption sur les nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ .

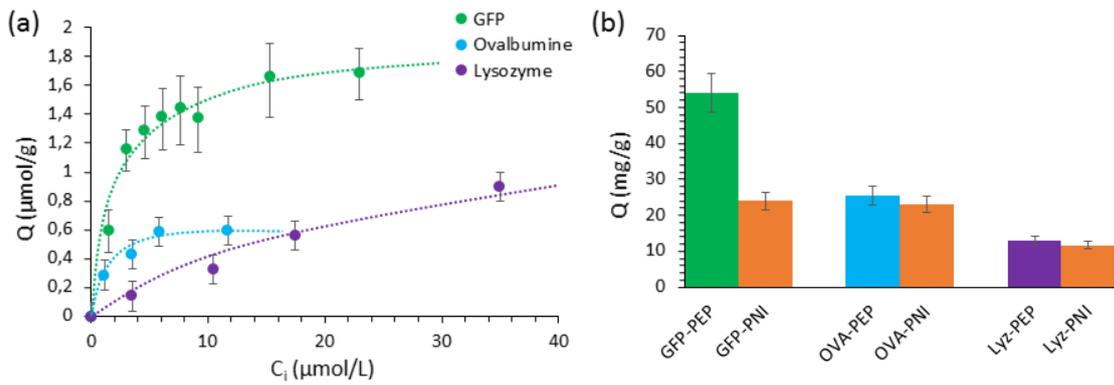


Figure 76 : Sélectivité de l'adsorption sur les hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  (a) et comparaison de l'adsorption sur les hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$  (b). Sur la figure b, PEP se réfère à  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  et PNI se réfère à  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$ . Chaque protéine est seule en solution.

Comme on peut le voir sur la Figure 76a, les objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  adsorbent plus de GFP, la protéine gabarit, que de lysozyme ou d'ovalbumine, protéines compétitrices, sur la gamme de concentration étudiée. Le polymère ici synthétisé est bien sélectif de la GFP. On peut de plus remarquer que sur la plage de concentration 0-10  $\mu\text{mol/L}$ , les PEP magnétiques adsorbent plus d'OVA que de Lyz. Il semblerait donc que la taille des protéines ne soit pas le facteur premier influençant l'adsorption non spécifique, mais que ce soit plutôt leur charge et donc leur point isoélectrique.

La Figure 76b montre de plus une absence de différences significatives dans les capacités d'adsorption des polymères magnétiques à empreintes de GFP et non-imprimés pour les deux protéines compétitrices. Ainsi, l'adsorption de ces protéines est une adsorption non spécifique, simplement liée à la nature du polymère et non pas à la présence des empreintes.

### 2.5.2. Tests de compétitivité

Nous avons d'abord effectué des tests de compétitivité entre le lysozyme et la GFP. Comme on peut le voir sur la Figure 77a, les nano-objets hybrides présentent une bonne sélectivité d'adsorption envers la GFP. Il faut cependant noter la diminution d'adsorption de la GFP par le PEP magnétique en présence de lysozyme. Il est intéressant de voir que cette diminution d'adsorption est proche des valeurs obtenues pour l'adsorption non-spécifique de la GFP (adsorption sur le PNI). Ainsi, une hypothèse probable est que le lysozyme présent va se lier aux sites d'adsorption non-spécifique du polymère, et la GFP ne s'adsorbent que dans les empreintes.

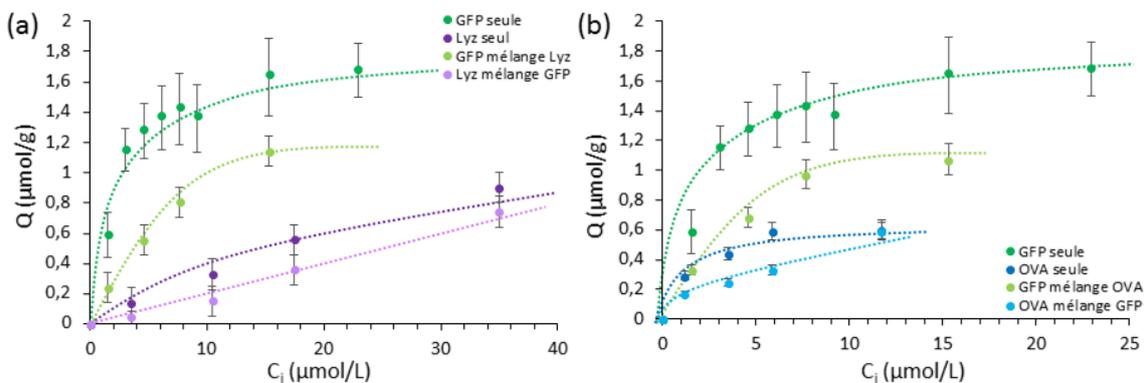


Figure 77 : Compétitivité de l'adsorption avec (a) le lysozyme et (b) l'ovalbumine sur des objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ .

Nous pouvons observer la même chose en présence d'ovalbumine (voir Figure 77b). En effet, les polymères à empreintes adsorbent plus de GFP que de la protéine compétitrice, même si la présence de celle-ci entraîne une diminution de la quantité de GFP adsorbée. Cette diminution est encore une

fois similaire aux valeurs d'adsorption obtenues sur le PNI, et laisse à penser que l'ovalbumine s'adsorbe sur les sites de reconnaissance non-spécifique du polymère, laissant uniquement les empreintes à la GFP pour pouvoir s'adsorber.

### 2.5.3. Adsorption de GFP après pré-saturation de surface par de l'ovalbumine

Lors des tests de ciblage cellulaire, les particules sont dispersées dans du milieu de culture. Celui-ci contient un grand nombre de protéines compétitrices qui vont venir s'adsorber à la surface des objets-hybrides, ce qui peut bloquer l'accès aux empreintes, empêchant ainsi tout ciblage. Voilà pourquoi nous avons voulu déterminer si la GFP était capable d'accéder aux sites d'adsorption spécifique (i.e. les empreintes) même après adsorption non-spécifique de protéines compétitrices. Nous avons choisi de saturer la surface des objets avec de l'OVA avant de réaliser une isotherme d'adsorption de la GFP.

Comme nous pouvons le remarquer sur la Figure 78, la quantité de GFP adsorbée par les hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  après saturation de leur surface par l'OVA n'est pas significativement différente de celle adsorbée lorsque les objets hybrides sont « nus ». La GFP peut donc bien s'adsorber sur le polymère, et ce au sein des empreintes, même en présence de protéines compétitrices.

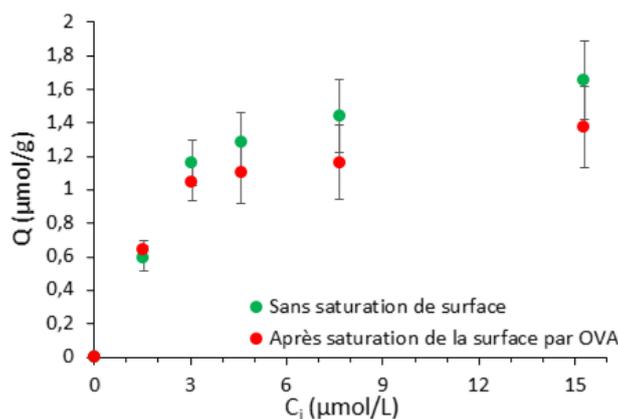


Figure 78 : Adsorption de GFP sur des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  avant ou après saturation de leur surface par une protéine compétitrice, l'ovalbumine.

## 3. Devenir *in vitro* de la GFP adsorbée

Après avoir étudié l'adsorption de protéines par les hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ , notre attention s'est portée sur le devenir des protéines adsorbées, en termes de désorption et de dénaturation possible, notamment grâce aux propriétés d'hyperthermie magnétique des nanoparticules de maghémite.

### 3.1. Désorption

Nous venons donc de voir que nous avons synthétisé avec succès des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ , ceux-ci étant capables d'adsorber sélectivement cette protéine cible. Une fois la protéine adsorbée, nous souhaitons que celle-ci reste piégée le plus longtemps possible au sein du polymère.

Il nous faut donc nous intéresser à la désorption des protéines, et ce dans différentes conditions. Nous avons ainsi étudié la désorption passive de la GFP, et également caractérisé la désorption induite par chauffage, au bain-marie ou résultant de l'application d'un champ magnétique alternatif. Les expériences sont menées en duplicata et pour chaque jeu de conditions expérimentales, le résultat présenté est la moyenne des deux mesures.

### 3.1.1. Désorption passive

Dans un premier temps, nous nous intéressons à la désorption passive. L'évolution de celle-ci au cours du temps est présentée sur la Figure 79. Il faut dans un premier temps remarquer que les résultats sont très bruités, mais les valeurs des quantités de GFP désorbée au cours du temps par les polymères magnétiques à empreintes de GFP et non imprimés ne varient pas de manière significative, chaque point étant couvert par la barre d'erreur des autres. Ensuite, la quantité de GFP désorbée par les hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  est d'environ 1,4 mg/g (Figure 79). Cette quantité reste bien inférieure à la quantité maximale désorbable, qui est de 57,5 mg/g car cela représente 2,5% de la quantité maximale. La faible valeur de la quantité de protéine désorbée laisse à penser que la GFP se libérant de manière passive interagissait avec le polymère uniquement de façon non-spécifique, et ne se trouvait pas au sein des empreintes. La quantité de GFP désorbée des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$  au cours du temps, de l'ordre de 4,6 mg/g soit près de 20% de la quantité maximale adsorbée (Figure 79) confirme le fait que des protéines en interaction non-spécifique avec le polymère sont plus susceptibles de se détacher en l'absence d'un stimulus extérieur, bien qu'une désorption totale n'ait pas lieu.

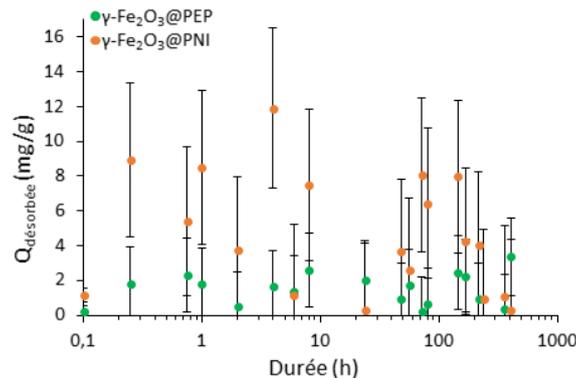


Figure 79 : Quantité de GFP désorbée au cours du temps. Quantités maximales désorbables : 57,5 mg/g pour l'hybride magnétique PEP et 24,9 mg/g pour l'hybride magnétique PNI.

En conclusion, l'adsorption de la protéine est irréversible en l'absence de stimuli extérieurs.

### 3.1.2. Désorption par chauffage au bain-marie

Dans un second temps, nous nous intéressons à la désorption par chauffage employant un bain-marie. L'évolution de celle-ci en fonction de la température de chauffage est présentée sur la Figure 80.

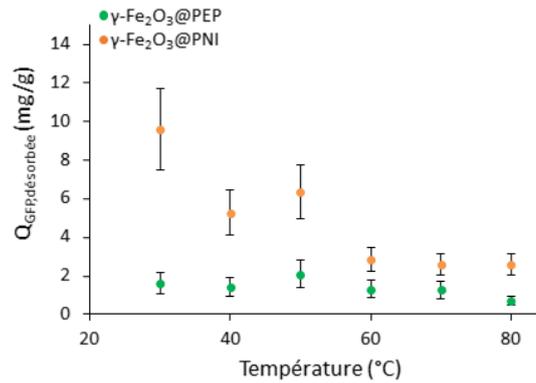


Figure 80 : Evolution de la quantité de GFP désorbée par les nano-objets hybrides, 5 min après le chauffage. Quantités maximales désorbables : 57,5 mg/g pour l'hybride magnétique PEP et 24,9 mg/g pour l'hybride magnétique PNI.

La quantité de GFP désorbée à partir des objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  ne varie que très peu en fonction de la température appliquée (Figure 80). Elle oscille autour de 1,4 mg/g, bien loin des 57,5 mg/g adsorbés, mais identique à la valeur obtenue lors de la précédente étude de désorption passive. Ainsi, chauffer les nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  au bain-marie ne semble pas induire de désorption de la protéine présente dans les empreintes. Comme précédemment, la quantité de protéine désorbée par les PNI magnétiques est supérieure à celle désorbée par les PEP magnétiques, et fluctue beaucoup plus.

Les échantillons ont ensuite été placés sous agitation orbitale durant 2h à température ambiante, qui est le temps nécessaire à l'établissement d'un équilibre entre le polymère et le milieu environnant. Puis de nouvelles analyses ont été menées afin de déterminer la nouvelle quantité de protéines présentes dans le surnageant. Les résultats obtenus ne différaient pas de manière significative de ceux-ci, nous pouvons bien conclure sur le fait que le chauffage au bain-marie des échantillons ne permet pas une désorption importante des protéines qu'ils ont au préalable adsorbées.

### 3.1.3. Désorption sous champ magnétique alternatif

Dans un troisième temps, nous nous intéressons à la désorption par application d'un champ magnétique alternatif. L'évolution de la concentration en GFP en fonction de l'intensité du champ magnétique alternatif appliqué est présentée sur la Figure 81.

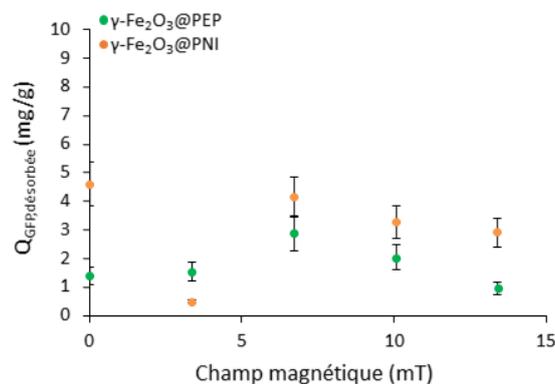


Figure 81 : Evolution de la quantité de GFP désorbée par les nano-objets hybrides en fonction de l'intensité du champ magnétique alternatif appliqué (335 kHz, 3 pulses de 5 min séparés par 1 min), 5 min après l'arrêt de celui-ci. Quantités maximales désorbables : 57,5 mg/g pour l'hybride PEP magnétique et 24,9 mg/g pour l'hybride PNI magnétique.

Sur la Figure 81, les données expérimentales pour un champ magnétique nul sont celles obtenues pour la désorption passive (valeurs moyennes). On peut à nouveau voir que si les valeurs des quantités de protéines désorbées fluctuent beaucoup en fonction de l'intensité du champ magnétique appliqué,

elles restent très faibles par rapport aux quantités de protéines adsorbées. Cette méthode de chauffage n'induit pas non plus de désorption des protéines.

A nouveau, les suspensions ont été placées sous agitation orbitale durant deux heures avant d'effectuer de nouveau les analyses des surnageants. Comme lors du chauffage au bain-marie, les résultats obtenus ne diffèrent pas de manière significative de ceux présentés ici. Nous pouvons donc à nouveau conclure que le chauffage des échantillons, cette fois par hyperthermie magnétique, ne permet pas une désorption importante des protéines qu'ils ont au préalable adsorbées.

Ainsi, l'application d'un champ magnétique alternatif ne permet pas de déstabiliser suffisamment les interactions faibles de type hydrogène existant entre la matrice polymère et les protéines adsorbées au sein des sites de reconnaissance spécifique, contrairement à ce qui peut se faire pour des molécules plus petites, comme la doxorubicine<sup>12</sup>. La grande différence de taille entre la GFP et la doxorubicine, ainsi que le nombre beaucoup plus important de liaisons hydrogènes formées par cette première peut être à l'origine de cette différence de comportement. Il est donc nécessaire de passer par une extraction avec un stimulus chimique tel qu'un solvant comme employé au chapitre 2 pour libérer les empreintes. Ce résultat est important pour les applications envisagées en nanomédecine : une fois la protéine ciblée adsorbée au sein d'une empreinte, le nano-objet hybride restera à la surface de la cellule.

### 3.2. Dénaturation

Comme nous venons de le voir, les polymères magnétiques sont capables d'adsorber de la GFP au sein de leurs empreintes. Celle-ci ne peut se désorber en l'absence de stimulus chimique, comme l'ont prouvé les études précédentes.

Le chauffage peut cependant induire une dénaturation des protéines adsorbées par rupture de ponts disulfure, ou de liaisons hydrogènes. Cette dénaturation, partielle ou totale, s'accompagne d'une diminution voire d'une disparition du signal de fluorescence de la GFP<sup>172-174</sup>. Ainsi, mesurer l'intensité du pic principal de fluorescence de la GFP adsorbée par les nano-objets hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP avant et après chauffage est un bon moyen de suivre cette dénaturation de façon qualitative.

#### 3.2.1. Chauffage par hyperthermie magnétique

La GFP adsorbée par les nano-objets hybrides est dénaturée de façon relativement importante au bout de seulement 15 minutes de chauffage, comme on peut le voir Figure 82a, bien qu'aucune élévation macroscopique de la température de la solution n'ait été enregistrée. En effet, quelle que soit l'intensité du champ appliqué, la perte de fluorescence est au minimum de 48%. La GFP seule en solution est également sensible au champ magnétique appliqué, bien que sa dénaturation soit plus faible en absence de particules magnétiques. Ainsi, la plus forte perte de fluorescence des protéines présentes au sein des nano-objets  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP, et donc la dénaturation plus importante, est bien due à l'augmentation de température induite par hyperthermie magnétique. Nous travaillerons par la suite avec des champs magnétiques inférieurs à 3,5 mT afin de s'affranchir au maximum de l'effet de celui-ci sur les protéines, et supposer que la perte de fluorescence obtenue est uniquement due à une augmentation locale de température induite par l'hyperthermie magnétique de la magnémité.

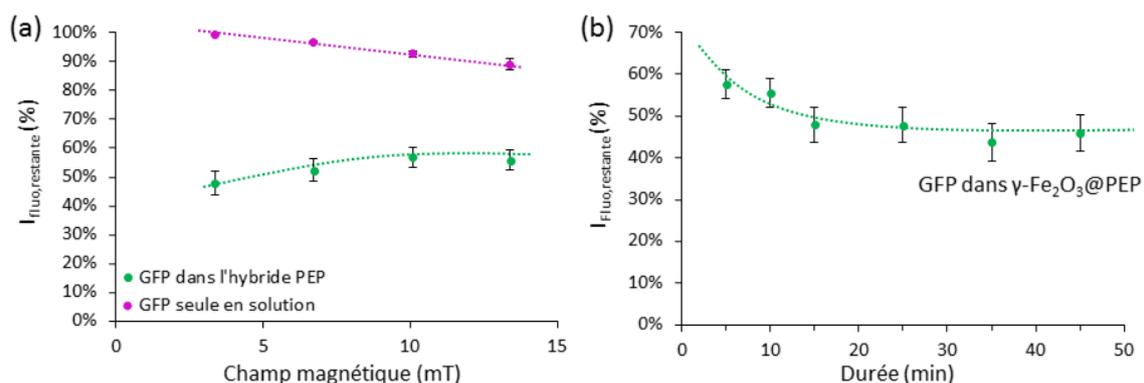


Figure 82 : Variations de fluorescence de la GFP induites par des champs magnétiques alternatifs à 335,1 kHz : (a) d'intensités différentes appliqué durant 15 min ou (b) durant différentes durées (3,35 mT).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence de la durée d'application de l'AMF sur la dénaturation de la GFP. Celle-ci variait entre 5 et 45 min, par impulsions de 5 minutes séparées d'une minute (donc pour 45 minutes de chauffage : 9 cycles de 5 minutes). La Figure 82b indique que varier la durée d'application de l'AMF n'a pas de grande influence sur la diminution du signal de fluorescence.

En effet, chauffer plus de 15 minutes les échantillons n'augmente pas la perte de signal de fluorescence, et on peut observer l'apparition d'un plateau. Toutes les protéines adsorbées ne sont pas dénaturées. C'est peut-être dû au fait que le chauffage provient du cœur magnétique des objets hybrides. Les particules magnétiques permettent de chauffer le polymère à leur proximité, entraînant une dénaturation des protéines proches, tandis que les protéines plus éloignées sont isolées de la source de chaleur, et peuvent conserver leur fluorescence. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le chauffage par hyperthermie est très localisé à l'environnement immédiat des nanoparticules magnétiques, et donc peu susceptible de concerner les protéines éloignées de celles-ci<sup>45,46</sup>.

### 3.2.2. Comparaison avec le chauffage au bain-marie

Afin de se faire une idée de la température induite à la surface des nanoparticules de maghémite lors de l'application d'un champ magnétique alternatif, nous nous sommes intéressés au devenir de la GFP piégée au sein des nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  chauffés au bain-marie. Des particules saturées en GFP sont placées durant différents temps dans un bain-marie à différentes températures, avant de mesurer l'intensité de fluorescence résiduelle. La quantité de protéine dénaturée par chauffage augmente plus fortement au cours des deux premières heures qu'au cours des quatre suivantes, car la diminution de l'intensité de la fluorescence y est plus rapide (Figure 83). Pour chacune des températures testées, nous semblons atteindre un plateau après 2h de chauffage, plateau également observé lors de l'étude précédente, après 15 min seulement (chauffage par hyperthermie magnétique, Figure 82).

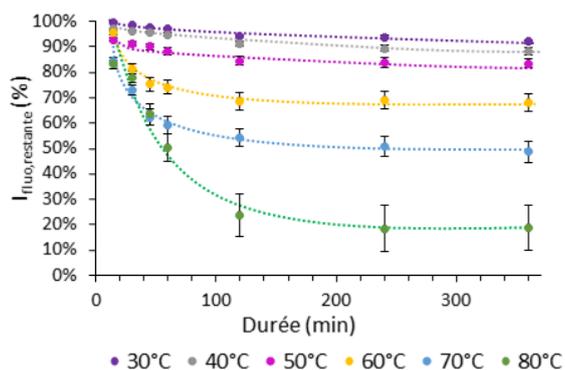


Figure 83 : Evolution de l'intensité de fluorescence de la GFP dans les objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  en fonction de la durée du chauffage et de la température appliquée.

On retrouve la trace d'un tel plateau dans la littérature, dans des études de dénaturation de la GFP par chauffage<sup>173,174</sup>. Ce plateau est atteint plus rapidement lors des études menées sur la GFP seule en solution que ce que l'on peut observer ici Figure 83 pour la GFP adsorbée au sein du polymère (5 min contre 15 min ou 100 min). Le polymère imprimé étant épais et les empreintes se trouvant à l'intérieur de celui-ci, il se peut qu'il agisse comme un isolant léger vis-à-vis du milieu extérieur ou des nanoparticules de maghémite, empêchant ou du moins ralentissant la diffusion de la chaleur, ce qui explique l'établissement plus tardif du plateau.

Une étude plus précise des pertes de fluorescence après 1 h de chauffage est en accord avec ce qui a pu être observé dans la littérature, pour de la GFP seule en solution et non pas au sein d'un polymère imprimé. En effet, le groupe d'Ashraf a démontré que chauffer de la GFP à 70°C entraînait une perte de fluorescence de 45% à pH = 8,5 et de 50 % à pH = 7,5<sup>173</sup>. La perte observée ici de presque 40% à pH = 8 est donc en accord avec ce qui se trouve dans la littérature. L'écart observé peut être dû à un léger effet isolant du polymère imprimé : la température au sein de celui-ci n'est pas exactement de 70°C comme dans la solution surnageante, ou alors à l'emploi de solvants différents, ici l'HEPES contre le tampon Tris dans les travaux du groupe d'Ashraf, qui peuvent influencer le dépliement des protéines.

Enfin, si nous comparons les résultats obtenus en chauffant par hyperthermie magnétique à ceux obtenus en chauffant au bain-marie, nous pouvons remarquer qu'appliquer un champ magnétique alternatif à 335,1 kHz et 3,35 mT durant 15 min correspond à un chauffage au bain-marie de 80°C durant 1h. Nous pouvons donc atteindre des hautes températures à proximité des nanoparticules de maghémite sans induire d'échauffement macroscopique de la solution.

### 3.2.3. Combinaison des deux méthodes de chauffage

Afin de voir s'il était possible d'induire une perte de fluorescence totale de la GFP par chauffage, nous avons effectué un double chauffage pour certains nano-objets hybrides saturés en protéine. C'est-à-dire qu'ils étaient chauffés à la fois au bain-marie (80°C, 1h) et par application d'un champ magnétique alternatif (3,35 mT, 335,1 kHz, 15 min).

Méthode de chauffage	% I <sub>fluo</sub> restante
Bain-marie seul	50,3%
Hyperthermie seule	47,9%
Bain-marie puis hyperthermie magnétique	11,9%
Hyperthermie magnétique puis bain-marie	13,6%

Tableau 9 : Variation de fluorescence de la GFP en fonction de la méthode de chauffage appliquée.

Comme on peut le voir dans le Tableau 9, combiner les deux méthodes de chauffage permet une plus grande diminution de l'intensité de fluorescence résiduelle. Cependant, combiner les deux méthodes ne semble pas engendrer un effet égal à la somme des effets obtenus pour chacune des deux méthodes de chauffage appliquées séparément. On s'attendait à voir une disparition totale du signal de fluorescence, or ce n'est pas le cas. Quelle que soit la manière de chauffer les échantillons, au moins une partie des protéines adsorbées est confinée au sein des empreintes, ce qui peut limiter leur perte de structure tridimensionnelle, et donc la diminution de fluorescence observée.

#### 4. Ciblage cellulaire de la protéine fluorescente verte (GFP)

Après avoir étudié les propriétés d'adsorption des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  *in vitro*, nous nous sommes intéressés à sa capacité d'adsorber la protéine cible en milieu biologique. Deux types d'adsorption sont possibles : adsorption d'une GFP intracellulaire ou adsorption d'une GFP liée à la membrane extérieure de cellules. Nous nous sommes concentrés dans un premier temps sur l'étude de l'adsorption d'une GFP liée à la membrane extérieure de cellules. Celles-ci sont modifiées afin d'exprimer une protéine transmembranaire couplée à de la GFP.

Afin de mener à bien ces études de ciblage en milieu biologique, les nano-objets hybrides employés sont les objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  fluorescents déterminés comme étant les plus performants au chapitre 2, partie 3. Leur capacité d'adsorption déterminée *in vitro* est de 58 mg/g, soit une valeur très proche de celle obtenue pour les polymères non fluorescents. L'ajout de rhodamine ne perturbe donc pas l'adsorption de la GFP par le polymère imprimé.

Les études présentées dans la suite de cette partie ont été réalisées en collaboration avec Elie Balloul et Cornelia Monzel, de l'équipe physico-chimie Curie de l'Institut Curie, qui ont cultivé et transfecté les cellules, et ont effectué les observations au microscope. Elie Balloul a également préparé les plaques avec de la GFP immobilisée à leur surface.

##### 4.1. Adsorption de protéines immobilisées en milieu de culture cellulaire

La première étape avant d'accéder aux tests cellulaires était de vérifier que les particules hybrides sont capables d'adsorber de la GFP immobilisée, comme celle qui sera plus tard sur la membrane externe de cellules. En effet, le protocole employé étant celui d'une synthèse de type bulk, les empreintes de protéines sont en partie au sein du polymère et inaccessibles à des protéines présentes en surface de cellules. Il était également nécessaire de vérifier la stabilité des nano-objets hybrides au sein du milieu de culture cellulaire.

C'est pourquoi nous avons dans un premier temps tenté d'adsorber les nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  dispersés dans du milieu de culture cellulaire (DMEM supplé en FBS) sur de la GFP immobilisées sur une surface de verre. Dispersées dans le milieu de culture, aucune agrégation des nanoparticules n'est visible à l'œil nu, ce qui semble indiquer une stabilité de celles-ci au sein de ce milieu. Cette stabilité a par la suite été validée par mesure du rayon hydrodynamique des nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ . En effet, il est de  $170 \pm 73$  nm dans l'HEPES 200 mM à pH = 8, puis de  $182 \pm 90$  nm 24 h après dilution dans le sérum de culture cellulaire. La légère augmentation de taille observée peut être due à la formation d'une couronne protéique autour des particules.

La Figure 84 présente les principaux résultats obtenus après 1h d'incubation des nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  sur des plaques recouvertes de PLL-PEG, un copolymère poly-lysine et polyéthylène glycol afin de limiter l'adsorption non spécifique des particules. Les plaques contrôles sont employées telles qu'elles, tandis que les plaques de ciblage présentent également de la GFP à leur surface. Aucun lavage n'a été effectué entre l'incubation des nano-objets hybrides et l'observation au microscope optique.

Si l'on s'intéresse dans un premier temps aux clichés obtenus pour le puits de contrôle on peut tout d'abord remarquer l'absence de signal dans le canal de la GFP. Il n'y a effectivement pas de protéine présente. Le fait de ne pas avoir lavé les puits avant observation de ceux-ci induit la présence de nombreux objets hybrides en suspension, et donc un signal de fluorescence de fond dû à la Rhodamine important. Cela confirme la présence des particules en suspension. L'absence visible de gros agrégats confirme bien leur stabilité dans le milieu de culture cellulaire.

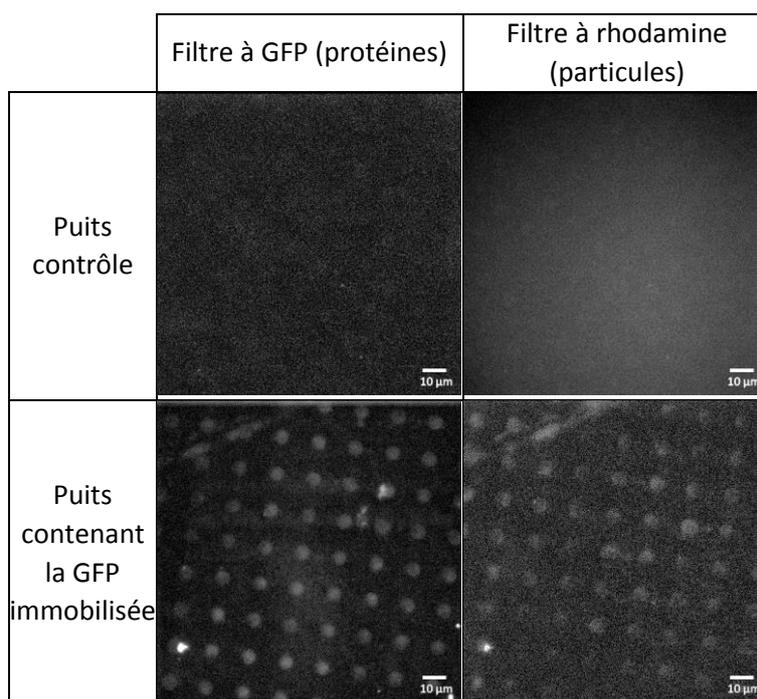


Figure 84 : Clichés de microscopie optique de GFP immobilisée sur une plaque de verre, après incubation avec des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ .

Si l'on s'intéresse maintenant aux clichés obtenus pour le puits contenant la GFP immobilisée (Figure 84, dernière ligne), on peut d'abord observer que la protéine s'est bien adsorbée sur les zones de verre non protégées par le PLL-PEG. Il faut également noter la présence d'une fluorescence diffuse recouvrant la totalité du puits. Une partie de la GFP incubée sur la plaque de verre a pu se retrouver piégée au sein des chaînes polymère du PLL-PEG, et ne pas être éliminée lors des lavages avant ajout des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ . Les clichés obtenus dans le canal de la Rhodamine présentent également cette fluorescence diffuse, due à l'absence de lavages des puits avant observation. On voit également de façon très nette les zones rondes du verre sur lesquelles la GFP est immobilisée, bien plus qu'en absence de GFP. Ainsi, l'accumulation des nano-objets hybrides au sein des zones non protégées par le PLL-PEG est favorisée par la présence de la GFP.

Les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  sont donc bien capables d'adsorber la GFP, même lorsque celle-ci est immobilisée sur une surface de verre. Nous allons donc maintenant nous intéresser au ciblage de cette protéine immobilisée cette fois à la surface de cellules, car surexprimée par celles-ci sur leur membrane plasmique extracellulaire.

## 4.2. Les objets biologiques employés

### 4.2.1. Le plasmide TMD-pHluorin

Le TMD, ou domaine transmembranaire, est une protéine couplée à la pHluorin, qui permet l'expression de celle-ci à la surface externe de la membrane cellulaire. La pHluorin est une forme mutante de la GFP<sup>175,176</sup>. Les séquences d'acides aminés ne diffèrent que par 6 à 9 d'entre eux, en fonction de la protéine mutante considérée. Ici, la différence était de 8 acides aminés, soit 3,3 % de variation, permettant une plus grande sensibilité de la protéine aux variations de pH. Ces mutations interviennent sur des acides aminés se trouvant au cœur de la protéine après repliement de celle-ci, sans modifier sa structure tridimensionnelle. GFP et pHluorin sont donc parfaitement équivalentes en termes de taille, forme et points d'interactions. La pHluorin pourra être reconnue par les empreintes du PEP magnétique comme étant de la GFP. Par abus de langage, la pHluorin sera nommée GFP par la suite.

### 4.2.2. Les cellules COS-7

Les COS (abréviation de «CV-1 in Origin with SV40 genes») sont des lignées cellulaires de type fibroblaste dérivées du tissu rénal du singe. En effet, la lignée cellulaire CV-1, originellement présente au sein des reins du singe vert africain, a été rendue immortelle à l'aide du virus SV40 (Sarcoma Virus 40) qui présente un défaut de réplication génomique<sup>177,178</sup>. Deux formes de lignées cellulaires COS couramment utilisées sont COS-1 et COS-7, notamment car elles peuvent être facilement modifiées pour produire des protéines recombinantes<sup>179</sup>.

Les cellules COS employées ici sont des cellules de type COS-7, car elles peuvent croître en adhérant sur des plaques de verre, ce qui est très utile lors des observations en microscopie optique. Il est de plus aisé de les modifier à l'aide d'un plasmide TMD-pHluorin. La culture cellulaire et la transfection ont été réalisées par Cornelia Monzel de l'équipe physico-chimie Curie de l'Institut Curie.

### 4.2.3. Les cellules HeLa

Les cellules HeLa sont une lignée cellulaire cancéreuse immortelle. Prélevées en 1951 chez une patiente, Henrietta Lacks, par George Gey, ces cellules constituent la première lignée cellulaire immortelle d'origine humaine<sup>180,181</sup>. Cultivées dans les bonnes conditions, elles peuvent se reproduire indéfiniment : l'absence d'un système de régulation empêche leur sénescence<sup>182,183</sup>. Très fortement employée en biologie cellulaire et en recherche médicale, les cellules HeLa ont par exemple permis le développement d'un vaccin contre la poliomyélite<sup>184</sup>, et sont utilisées pour de nouveaux traitements anti-cancéreux ou pour essayer de comprendre la résistance de certaines tumeurs aux rayons et à la chimiothérapie<sup>185</sup>.

Nous avons choisi d'employer des cellules HeLa car elles sont faciles à se procurer, et car Elie Balloul, de l'équipe physico-chimie Curie de l'Institut Curie, qui nous a aidé pour l'établissement des tests de ciblage cellulaire, travaillait dessus et en cultivait en permanence.

### 4.3. Ciblage des cellules COS-7 transfectées TMD-PHluorin

La Figure 85 présente les principaux résultats obtenus par microscopie optique après 1h d'incubation des cellules en présence des nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  à une concentration équivalente en fer de  $390 \mu\text{M}$ , et après lavages à l'aide du milieu de culture cellulaire. Comme on peut le voir, la transfection des cellules est un succès. En effet, lorsque l'on emploie le filtre à GFP, l'on peut voir que les cellules sont bien fluorescentes, même si l'intensité de celle-ci, et donc l'expression de la pHLuorin, n'est pas homogène à leur surface.

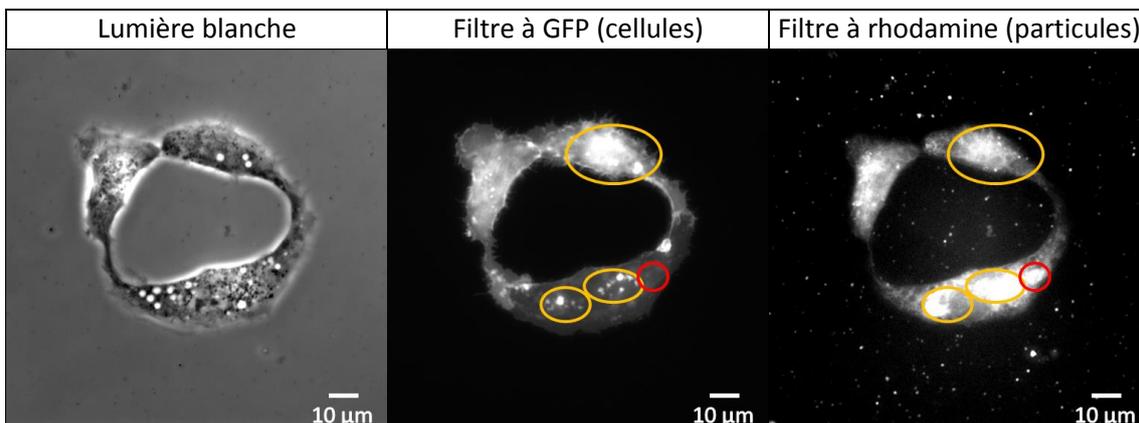


Figure 85 : Clichés de microscopie optique des cellules COS-7 après incubation avec les nano-objets hybrides, en lumière blanche ou filtrée afin de voir les protéines ou les particules fluorescentes.

Si l'on s'intéresse maintenant au signal de fluorescence émis par la rhodamine, et donc les nano-objets hybrides, on peut observer quelques agrégats de particules sur la plaque de verre. Mais la plupart des objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  sont présents à la surface des cellules. Les zones de forte intensité de fluorescence de la GFP correspondent aux zones de forte intensité de fluorescence de la rhodamine et donc des nano-objets (Figure 85 cercles jaunes). On peut également remarquer la présence d'une faible adsorption non-spécifique des nano-objets (Figure 85, cercle rouge).

Ainsi, les nano-objets hybrides sont susceptibles de se fixer à la surface de cellules sur-exprimant la GFP. Afin de vérifier la sélectivité du ciblage, il faut maintenant également s'intéresser au comportement des particules hybrides avec des cellules contrôle, non transfectées.

Ce test n'ayant pu être fait avec Cornelia Monzel, nous avons par la suite contacté Elie Balloul pour le faire. Ces deux étudiants ne travaillant pas sur le même sujet de recherche, ils emploient des lignées cellulaires différentes, ce qui explique que la suite des tests de ciblage aient été effectués avec des cellules de type HeLa, et non plus COS-7.

### 4.4. Ciblage des cellules HeLa transfectées TMD-PHluorin

#### 4.4.1. Influence de la durée d'incubation des particules

Des essais ont été effectués afin de déterminer la durée d'incubation nécessaire aux nano-objets pour cibler les cellules exprimant la GFP, sans les laisser en contact trop longtemps pour tenter de minimiser l'adsorption non-spécifique sur les autres cellules. Deux temps d'incubation (15 min et 1h) ont été testés avec des nano-objets hybrides à une concentration de  $190 \mu\text{M}$  en fer.

La première chose à observer sur la Figure 86 est le succès de la transfection du plasmide TMD-pHluorin dans les cellules HeLa. Nombre d'entre elles expriment la GFP à leur surface, et le taux de succès de la transfection est d'environ 80 %, ce qui correspond à la valeur attendue avec l'agent d'infection employé. Par abus de langage, dans la suite de cette étude, toutes les cellules ayant été au contact de l'agent de transfection seront appelées « transfectées ». Une distinction sera ensuite effectuée entre cellules fluorescentes (transfection effective) et cellules non fluorescentes (transfection ratée).

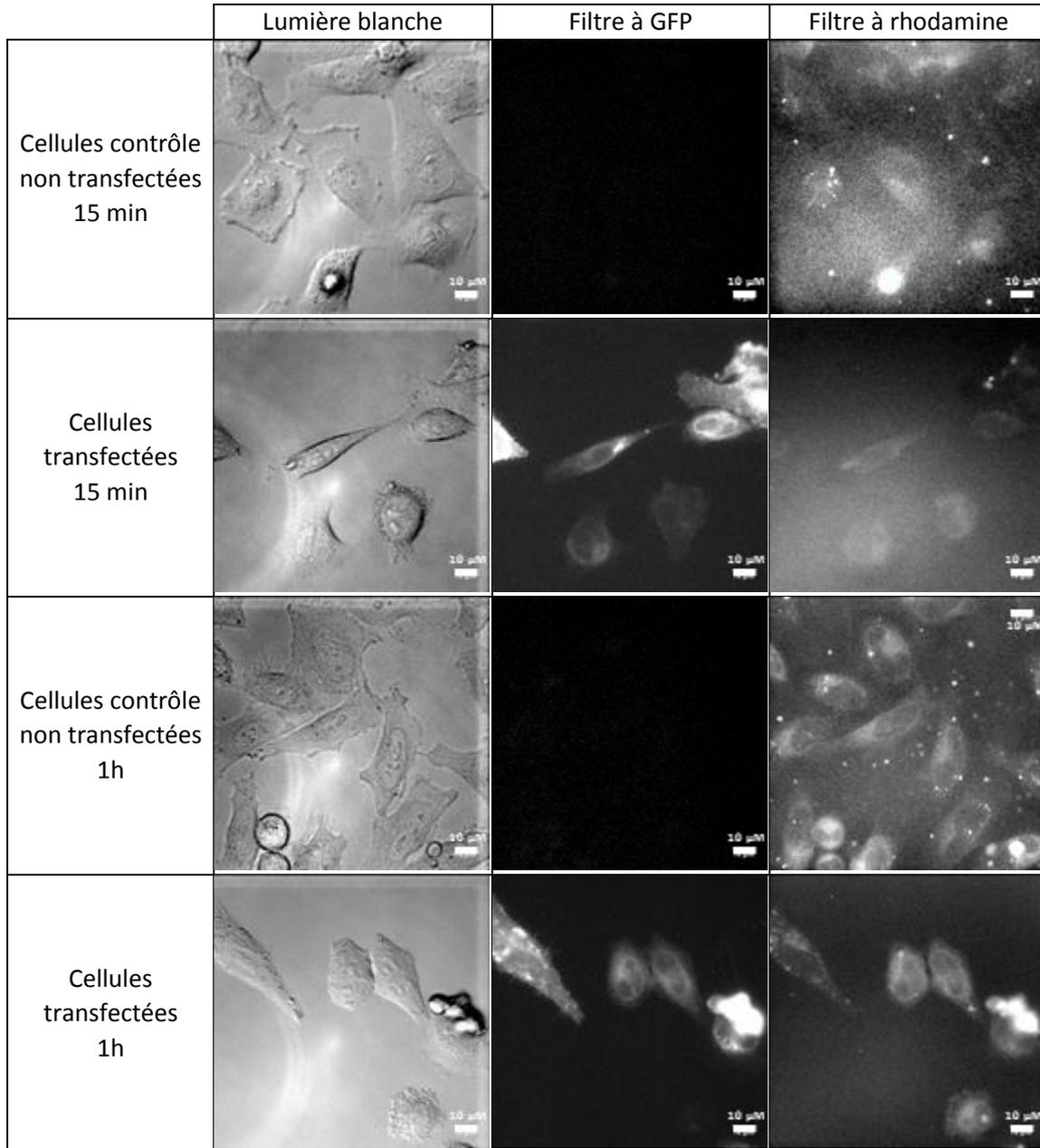
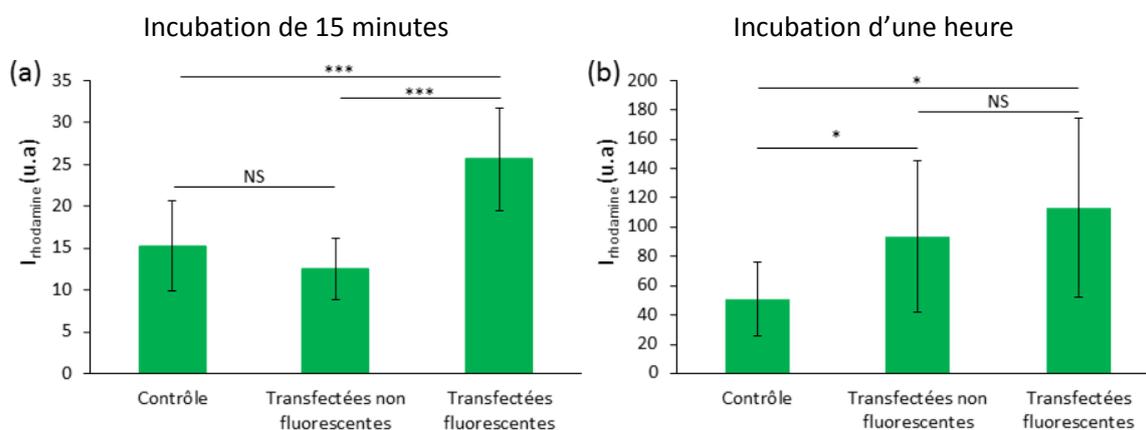


Figure 86 : Clichés de microscopie optique des cellules HeLa après incubation durant 15 min ou 1h avec les nano-objets hybrides, en lumière blanche ou filtrée afin de voir les protéines ou les particules fluorescentes. Barre d'échelle : 10 µm.

Une observation rapide des clichés présentés Figure 86 indique une augmentation du signal de fluorescence de la rhodamine avec la durée d'incubation, et ce que les cellules soient transfectées ou non.

Après 15 min d'incubation des nano-objets hybrides sur les cellules, le polymère imprimé s'adsorbe partout, aussi bien sur les cellules contrôle (Figure 86, 1<sup>ère</sup> ligne) que sur les cellules ayant été en contact avec l'agent de transfection, fluorescentes ou non (Figure 86, 2<sup>ème</sup> ligne). Il y a donc de l'adsorption non spécifique.

Si nous nous intéressons maintenant de plus près aux valeurs moyennes des intensités de fluorescence des cellules observées avec le filtre à Rhodamine, on peut remarquer que les cellules fluorescentes exprimant la variante de la GFP à leur surface adsorbent significativement plus de particules que les cellules non fluorescentes (Figure 87a). Un ciblage effectif a donc lieu.



**Figure 87: Intensité de fluorescence des nano-objets hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-GFP adsorbés sur des cellules HeLa suivant différentes conditions expérimentales (a : 15 min d'incubation et b : 1h d'incubation). NS : non significatif, \* :  $p < 0,05$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ .**

Après 1h d'incubation, les résultats obtenus sont similaires. En effet, les particules s'adsorbent bien sur tous types de cellules, exprimant ou non la protéine fluorescente à leur surface (Figure 86, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> ligne). Il est cependant important de noter que la différence d'adsorption des nano-objets entre cellules fluorescentes et non fluorescentes perd en significativité (Figure 87b). Ainsi, plus les particules seront longtemps en contact avec les cellules et plus l'adsorption non-spécifique augmentera, réduisant l'efficacité du ciblage des objets. Il est donc avantageux de limiter le temps d'incubation des particules à 15 minutes.

Il y a bien un ciblage des particules envers les cellules sur-exprimant la GFP mais leur adsorption non-spécifique n'est pas négligeable et nécessitera toujours la présence de cellules contrôle afin de déterminer la significativité du ciblage. De plus, il n'est pour l'instant pas certain que l'augmentation de l'adsorption sur les cellules transfectées est due à la présence de la GFP, et non pas uniquement à la présence de protéines du stress, produites par les cellules au cours de la transfection. Il est donc nécessaire d'effectuer un test de compétitivité.

#### 4.4.2. Ciblage et adsorption compétitive

Afin de déterminer si l'augmentation de l'adsorption des particules sur les cellules transfectées est due à la présence de la GFP ou à celle de protéines du stress, un test de compétition a été effectué. Les cellules transfectées ont été incubées avec un « GFP-nanobody » préalablement à l'ajout des nano-objets hybrides. Celui-ci va se fixer sur la GFP, la rendant inaccessible aux empreintes des particules.

Les nano-objets initiaux ont été incubés durant 15 min à la concentration de 190  $\mu$ M avec des cellules transfectées sans nanobody et des cellules transfectées avec nanobody. Les cellules utilisées lors des différents tests étaient en culture depuis plus ou moins longtemps. Or nous savons que cultiver trop longtemps un même lot de cellules initiales peut induire des modifications du phénotype de celles-ci, ce qui peut expliquer les différences de morphologies entre les cellules (Figure 88a et e). Les cellules incubées avec les particules expriment bien la variante de la GFP à leur surface (Figure 88b et

f), avec un taux de réussite pour la transfection proche de 80% comme précédemment. En absence de GFP-nanobody, aucun signal de fluorescence n'est détecté grâce au filtre correspondant (Figure 88c). L'efficacité du ciblage à l'aide du GFP-nanobody peut se voir sur la Figure 88g. En effet, deux cellules sont présentes dans la zone imagée (Figure 88e) mais le nanobody s'est adsorbé uniquement en surface de la cellule exprimant la GFP (Figure 88f et g).

Par ailleurs, toutes les cellules sont visibles dans le canal d'observation de la rhodamine (Figure 88d et h). Ainsi, les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  s'adsorbent sur toutes les cellules, fluorescentes ou non, préalablement ciblées avec le nanobody ou non. Ce résultat est cohérent avec ce que nous avons pu observer précédemment. En effet, il subsiste toujours une part d'adsorption non-spécifique pour ces objets. Cependant, la cellule exprimant la GFP préalablement incubée avec le nanobody semble avoir adsorbé à sa surface moins de particules que les cellules sans nanobody (Figure 88d et h).

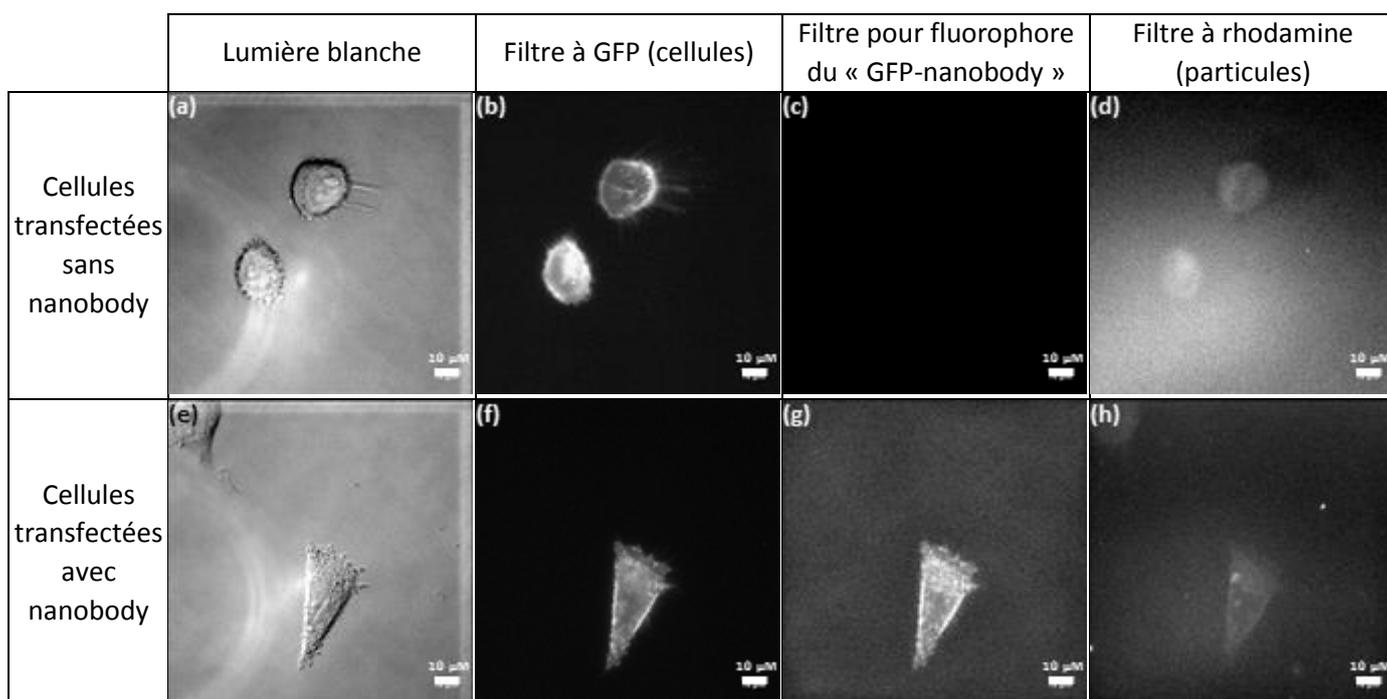


Figure 88 : Clichés de microscopie optique des cellules HeLa après incubation avec les nano-objets hybrides et éventuellement un « GFP-nanobody », en lumière blanche (a, e) ou filtrée afin de voir les protéines (b, f), le nanobody (c, g), et les particules fluorescentes (d, h).

Afin de confirmer cette observation, les clichés de microscopie obtenus ont été analysés grâce au logiciel ImageJ, comme précédemment. Cette étude plus approfondie de l'intensité du signal de fluorescence correspondant à la rhodamine nous permet de mettre en évidence une différence significative entre cellules fluorescentes en absence du nanobody d'une part, et en présence de celui-ci d'autre part (Figure 89). La présence du compétiteur d'adsorption induit une réduction de la fluorescence en rhodamine des cellules, et donc de la quantité de nano-objets adsorbés, jusqu'à des niveaux proches de ceux que l'on avait pour des cellules contrôle non transfectées. Le signal résiduel mesuré pour les cellules ayant été préalablement incubées avec le GFP-nanobody est donc du uniquement à de l'adsorption non spécifique. Le ciblage à l'aide des nano-objets hybrides est bien relié à la présence de GFP à la surface des cellules.

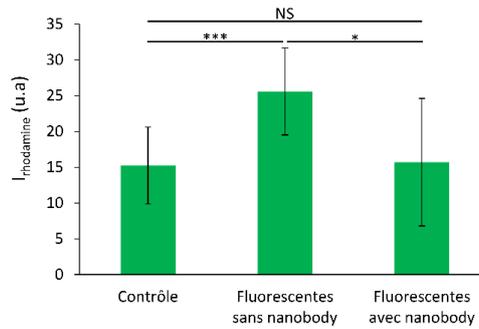


Figure 89 : Intensité de fluorescence des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  adsorbés sur des cellules HeLa suivant différentes conditions expérimentales. NS : non significatif, \* :  $p < 0,05$  et \*\*\* :  $p < 0,001$ .

Le ciblage des cellules HeLa par les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  est donc efficace, et lié à la présence des protéines fluorescentes accessibles à la surface de celles-ci.

#### 4.5. Dénaturation de la GFP sur-exprimée par les cellules HeLa

Une fois la protéine ciblée par les nano-objets hybrides, il peut être intéressant de la dénaturer, afin d'assurer l'inhibition complète de ses fonctions. Nous avons montré qu'il était possible d'employer les propriétés magnétiques des oxydes de fer, et notamment l'hyperthermie, afin de dénaturer de la GFP initialement libre en solution après adsorption de celle-ci par un hybride  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  (partie 3.2 du présent chapitre). Nous cherchons maintenant à déterminer si la GFP adsorbée peut toujours être dénaturée, dans le cas où elle est exprimée à la surface de cellules.

Après incubation des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  avec des cellules transfectées TMD-pHluorin, celles-ci ont été fixées avec du para-formaldéhyde. Une mesure du signal de fluorescence est effectuée, puis un champ magnétique alternatif est appliqué, avant d'effectuer une seconde mesure de fluorescence.

La Figure 90 présente les résultats obtenus lors de ce test de dénaturation de la GFP surexprimée à la surface de cellules à l'aide des nano-objets hybrides.

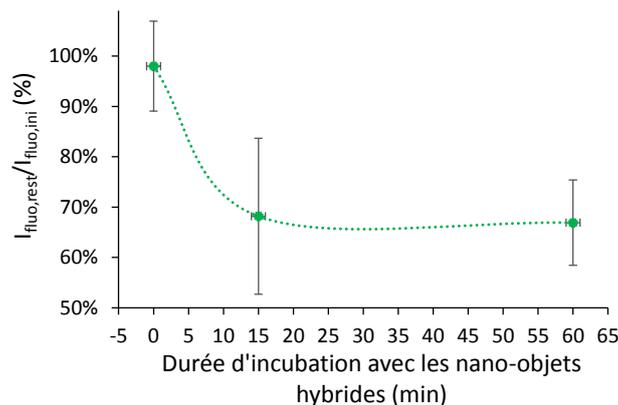


Figure 90 : Evolution de l'intensité de fluorescence des cellules transfectées TMD-pHluorin après application d'un champ magnétique alternatif (332 kHz, 3,35 mT, 5 min), en fonction de la durée d'incubation des cellules avec les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ .

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 90, l'intensité de fluorescence des cellules transfectées TMD-pHluorin ayant été préalablement incubées durant 15 ou 60 minutes avec les nano-objets hybrides diminue de manière significative après application du champ magnétique alternatif. En s'intéressant de plus près à l'intensité du signal de fluorescence des cellules après application du

champ magnétique alternatif, on peut voir qu'elle est d'environ 67% de la valeur initiale. L'absence de diminution de la fluorescence des cellules soumises à ce même champ en absence des nano-objets hybrides nous permet d'affirmer que c'est bien la présence des oxydes de fer magnétiques qui induit la dénaturation de la protéine. Lors des tests de dénaturation de la GFP adsorbée par les nano-objets hybrides effectués *in vitro*, l'intensité de fluorescence résiduelle était de 58% après 5 min d'application du champ magnétique alternatif (partie 3.2.1 de ce chapitre). Deux explications sont envisageables pour expliquer cette différence :

- Lors des tests *in vitro*, la totalité des protéines se trouve adsorbée par le polymère, de manière spécifique ou non. Alors qu'ici, il peut exister des protéines à la surface des cellules sans contact avec les nano-objets hybrides. L'échauffement des particules de maghémite étant très localisé, ces protéines ne sont soumises à aucune source de chaleur, elles conservent alors toute leur fluorescence.
- Par ailleurs, des études récentes ont montré la perte d'efficacité du chauffage par hyperthermie magnétique lorsque les particules sont en interaction avec des cellules, et notamment fixées à leur membrane<sup>39,186,187</sup>. Les nano-objets hybrides, après avoir adsorbé la GFP extracellulaire se retrouvent accrochés sur les cellules, ce qui peut influencer leur capacité de chauffage. Et si les particules chauffent moins, la perte de fluorescence, et donc la dénaturation est moindre.

## 5. Conclusion sur les performances des objets hybrides pour le ciblage et la dénaturation

Après synthèse des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ , nous les avons caractérisés pour déduire qu'ils avaient un rayon hydrodynamique en général inférieur à 300 nm et étaient composés pour environ 25 % de PEP. Nous nous sommes ensuite intéressés à leur capacité à ré-adsorber la GFP. Des tests d'adsorption menés *in vitro* ont montré que bien que la capacité d'adsorption et la spécificité soient plus faibles que ce que l'on avait obtenu pour les polymères à empreintes de BSA, ces résultats restent très positifs, et le facteur d'impression de 2,3 est cohérent avec ce qui se fait dans la littérature pour d'autres protéines. Par ailleurs, la sélectivité de l'adsorption est importante et nous a permis de déterminer que la taille des protéines compétitrices a moins d'influence que leur charge de surface et également que l'adsorption de celles-ci est intrinsèque au polymère, non aux empreintes.

Nous nous sommes ensuite intéressés au devenir des protéines capturées par le PEP magnétique. Une fois adsorbées, celles-ci ne se désorbent pas au cours du temps, et même le chauffage ne permet pas de rompre les interactions afin de les libérer. L'adsorption de la GFP par les nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  est donc une chimisorption, et il est nécessaire d'employer un stimulus chimique afin de désorber les protéines. Il est cependant possible de les dénaturer, par chauffage au bain-marie ou par application d'un champ magnétique alternatif. Ce résultat ouvre des portes en termes d'applications biomédicales, afin par exemple de ralentir ou prévenir une cascade de transduction par dénaturation d'un chaînon de celle-ci, piégé par ces nouveaux nano-objets.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux performances des objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  en termes d'adsorption protéique en milieu biologique. Ces objets sont stables dans le milieu de culture cellulaire. Ils sont capables d'adsorber de la GFP immobilisée à la surface d'une plaque de verre et de cibler les protéines présentes sur la membrane externe de cellules de type HeLa ou COS-7, sans induire de stress cellulaire visible. L'application d'un champ magnétique alternatif à des cellules de type HeLa transfectées pour exprimer la GFP, après ciblage par des objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ , permet de diminuer

leur intensité de fluorescence. On est donc capable de dénaturer les protéines surexprimées sur une membrane plasmique extracellulaire une fois qu'elles sont adsorbées au sein des empreintes.

Cette étude de dénaturation de la GFP par application d'un champ magnétique alternatif est cependant très superficielle : nous avons testé une seule durée d'application du champ, sur des cellules préalablement fixées au para-formaldéhyde. Il aurait été intéressant de poursuivre les tests, en augmentant par exemple la durée d'application du champ magnétique alternatif, ou en les effectuant sur des cellules non fixées. Dans ce cas, il serait utile de pouvoir imager les cellules avant et après application du champ magnétique alternatif, afin de déterminer s'il induit des dommages visibles, voire la lyse des cellules. Il serait également intéressant de déterminer la toxicité des nano-objets  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-GFP ici employés.

Par ailleurs, aucun travail d'optimisation n'a eu lieu lors de la synthèse des nanoparticules de maghémite afin d'améliorer leur propriété d'hyperthermie magnétique. Il serait alors intéressant de travailler sur les particules d'oxyde de fer, notamment sur leur taille et leur morphologie, pour augmenter le pouvoir chauffant des nano-objets hybrides et améliorer la dénaturation des protéines adsorbées.

Enfin, afin d'augmenter la biocompatibilité des nano-objets et réduire l'adsorption non-spécifique à leur surface, les particules sont bien souvent fonctionnalisées à l'aide de longues chaînes polymères, par exemple le poly-éthylène-glycol<sup>188,189</sup> (ou PEG). Pour ne pas compliquer d'avantage le système considéré, nous avons choisi de ne pas employer de chaînes de PEG mais plutôt des chaînes de polyacrylamide. Celles-ci ont permis de fortement diminuer l'adsorption non-spécifique de protéines, mais ont conduit à une impossibilité d'accéder aux empreintes. Il est donc nécessaire de retravailler la chimie du polymère afin de réduire l'adsorption non spécifique sans bloquer les sites de reconnaissance spécifique.

Les idées à retenir de ce chapitre sont les suivantes :

- le protocole de synthèse ici mis en œuvre permet l'obtention de nano-objets hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-GFP
- Il est possible d'utiliser ceux-ci à la fois pour cibler des cellules sur-exprimant cette protéine afin de la dénaturer.
- Les études menées *in vitro* ont mis en évidence une absence de désorption de la GFP après application du champ magnétique alternatif.

Les nano-objets hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-GFP resteront donc très probablement à la surface des cellules ciblées après application du champ magnétique, et seront alors à terme internalisées par les cellules. Il est donc important d'avoir une idée de leur toxicité et de leur dégradation.

## 6. Matériels et méthodes

### 6.1. Réactifs chimiques

Les nano-objets hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-GFP et  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PNI employés ont été obtenus à l'aide du protocole de synthèse développé au chapitre 2. Leurs caractérisations principales se retrouvent en annexe 1 page 213. Les autres réactifs employés provenaient des fournisseurs suivants :

Lysozyme, OVA, HEPES (Acide N-(2-hydroxyethyl)-pipérazine-N'-(2-ethanesulfonique)), milieu de culture DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium with nutriment mixture F12), FBS, mélange d'antibiotiques Pénicilline-Streptomycine, PBS, paraformaldéhyde : Sigma.

GFP : produite par l'Institut Curie ; méthanol : VWR ; acide acétique : Carlo Erba ; milieu de culture Opti-MEM : Gibco, Viafect : Promega, plasmide TMD-Phluorin : Aaddgene, cellules HeLa et COS-7 : ATCC, GFP-nanobody couplé à la cyanine : Chromotek, PLL-PEG : Alamnda Polymers.

## 6.2. Appareils de mesure

Les appareils employés pour caractériser les nano-objets hybrides sont présentés plus en détails au chapitre 2, page 66.

La concentration de protéines en solution a été déterminée par enregistrement de spectres d'absorption UV-Visible à l'aide d'un spectromètre UVIKON XL, vendu par SECOMAM. Les spectres étaient enregistrés pour des solutions présentes au sein de cuves en quartz. Ils étaient analysés à l'aide de courbes d'étalonnage réalisées à partir de solutions de protéines de concentration connues avec précision.

La concentration en GFP en solution pouvait également être déterminée par enregistrement de spectres de fluorescence à l'aide d'un appareil Cary Eclipse commercialisé par Agilent. Celui-ci a également été employé pour déterminer la perte de fluorescence de la GFP après chauffage.

La mesure de l'échauffement de suspensions de nano-objets hybrides ainsi que l'étude de la possible dénaturation de protéine par hyperthermie magnétique ont été réalisées à l'aide d'un MagneTherm, commercialisé par Nanotherics, équipé d'une fibre optique. L'échantillon se trouvait à température ambiante avant application d'un champ magnétique alternatif (335,1 kHz ; 0 - 15 mT). La capacité calorifique d'une suspension de nano-objets hybrides à la concentration massique de 16,5 mg/g a été prise égale à 4,17 J/g/K (équation au chapitre 1 page 18).

L'efficacité du ciblage cellulaire a été observée à l'aide d'un microscope de fluorescence Olympus IX71 présent à l'Institut Curie. Celui-ci est équipé d'une lampe d'halogénure métallique et de deux filtres principaux. Le premier a une bande passante d'excitation de  $470 \pm 25$  nm, une bande passante d'émission de  $525 \pm 25$  nm et un filtre dichroïque servant de séparateur de faisceau à 500 nm afin d'observer la fluorescence due à la GFP. Le second a une bande passante d'excitation de  $560 \pm 25$  nm, une bande passante d'émission de  $630 \pm 40$  nm et un filtre dichroïque servant de séparateur de faisceau à 580 nm afin d'observer la fluorescence due à la Rhodamine.

## 6.3. Détermination de la concentration en protéines

Concernant l'étalonnage pour remonter à la concentration à partir de la spectroscopie, la température au sein du laboratoire a fortement varié lors des études. Or la fluorescence de la protéine et donc l'intensité de sa bande d'absorption à 488 nm varie avec la température. Afin de s'affranchir de ce problème, des solutions étalons ont été préparées suivant le même protocole et soumises aux mêmes conditions expérimentales que les solutions contenant les nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  lors de chaque étude. Après agitation en présence ou en l'absence de particules de polymère magnétique à empreintes, les solutions ont été comparées deux à deux (par spectrométrie UV-Visible ou

spectroscopie de fluorescence) afin de déterminer la quantité de protéine adsorbée par les nano-objets.

#### 6.4. Etudes de l'adsorption *in vitro*

##### 6.4.1. Isothermes

Dans des flacons en plastique d'une contenance de 4,5 mL on introduit une masse connue avec précision de nanoparticules hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ . Cette masse est proche de 5 mg. On ajoute ensuite 2 mL d'une solution de GFP dans l'HEPES à des concentrations variées. Celles-ci sont comprises entre 0 mg/mL et 0,8 mg/mL. Les flacons sont placés sur un agitateur orbitalaire à 480 rpm durant 24h puis positionnés sur un aimant afin d'effectuer une décantation magnétique. Les surnageants sont récupérés et analysés par spectrométrie d'adsorption UV-Visible à 488 nm. Cela permet de déterminer la quantité de protéine encore présente en solution, et de là déduire la quantité de GFP adsorbée à la surface des hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ .

##### 6.4.2. Visualisation de l'adsorption

Les objets hybrides étant trop petits pour être imagés directement, nous avons commencé par déstabiliser 10 mL de suspension soit 20 mg de particules en la centrifugeant 10 min à 5000 rpm, conduisant à une agrégation des nano-objets. Puis 8 mg de GFP ont été ajoutés, soit suffisamment pour saturer les particules, et le mélange a été placé sous agitation orbitalaire à 250 rpm durant 4h. Ensuite nous avons observé les particules à l'aide d'un microscope optique de fluorescence, équipé de deux filtres. Le premier a une bande passante d'excitation de  $546 \pm 12$  nm, un séparateur de faisceau à 580 nm, et il laisse passer les signaux émis au-dessus de 590 nm. Il permet de visualiser le signal dû à la Rhodamine. Le second a une bande passante d'excitation de  $470 \pm 20$  nm, un séparateur de faisceau à 510 nm, et une bande passante d'émission de  $540 \pm 25$  nm. Il permet de visualiser le signal dû à la GFP. Les observations effectuées au microscope étaient collectées par une caméra Manta, commercialisée par Allied Vision, permettant l'enregistrement de clichés avec un temps d'exposition de 60 ms et un gain de 33.

##### 6.4.3. Cinétique

Les études ont été réalisées sur 5 mg de particules hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  dispersées dans 3 mL d'une solution de protéine à 0,15 mg/mL. Le protocole expérimental mis en œuvre s'inspire de celui employé lors de la réalisation des isothermes d'adsorption. Brièvement, l'étude se déroule ainsi. Dans des flacons en plastique de 3,5 mL on introduit une masse connue proche de 5 mg de nanoparticules hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ . On ajoute ensuite 3 mL d'une solution de GFP dans l'HEPES à la concentration 0,15 mg/mL. Les flacons sont placés sur un agitateur orbitalaire à 480 rpm durant le temps désiré, entre 5 min et 5 h. Puis les flacons sont placés durant 2 min sur un aimant afin d'effectuer une décantation magnétique. Les surnageants sont récupérés et analysés par spectrométrie d'adsorption UV-Visible comme précédemment.

Une autre étude cinétique en conditions bien plus diluées a été effectuée en employant uniquement 50  $\mu\text{g}$  de particules hybrides dans 1 mL de solution de GFP dans l'HEPES à 42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Cette concentration en protéine étant trop faible pour obtenir un signal ne se confondant pas avec le bruit de notre appareil de mesure, il n'était pas possible d'analyser les surnageants par spectroscopie d'adsorption UV-Visible. C'est pourquoi, après décantation magnétique, 500  $\mu\text{L}$  du surnageant étaient dilués dans 2,5 mL d'HEPES (pour ne pas saturer l'appareil de mesures), puis analysés à l'aide d'un spectrofluorimètre (enregistrement de l'intensité émise à 509 nm après excitation sur la gamme de 480 - 500 nm).

#### 6.4.4. Sélectivité

Dans un premier temps, nous avons réalisé des isothermes d'adsorption sur les objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  suivant le protocole décrit précédemment en employant au choix de l'ovalbumine ou du lysozyme comme protéine compétitrice à la place de la GFP. Lors des tests de sélectivité, il y avait une seule protéine présente en solution. Lors des tests de compétitivité, on ajoutait une deuxième protéine à une solution initiale de GFP, les deux protéines étant présentes à la même concentration massique initiale.

Dans ce dernier cas, lors de l'analyse des surnageants par spectroscopie UV-Visible, la GFP et la protéine compétitrice participaient toutes deux au pic autour de 280 nm. Nous avons commencé par déterminer la quantité de GFP restant en solution à partir de la zone du spectre correspondant aux pics de fluorescence. A partir de là, il était possible de déduire la contribution de la GFP au pic commun, et donc de connaître ensuite la quantité de protéine compétitrice restant dans le milieu.

Un autre test de sélectivité a été effectué, avec cette fois des particules hybrides PEP et PNI magnétiques. 5mg de particules hybrides ont été placées dans 3 mL d'une solution de protéine contenant soit de l'ovalbumine soit du lysozyme à 0,5 mg/mL. Après 2h d'agitation orbitaire à température ambiante, les suspensions ont subi une décantation magnétique et les surnageants ont été analysés, afin de déterminer la quantité de protéine adsorbée dans chaque cas de figure (différents objets et différentes protéines).

Le dernier test de sélectivité mené permettait de déterminer si la GFP pouvait s'adsorber au sein des empreintes même après adsorption non-spécifique d'autres protéines en surface des objets hybrides. Pour ce faire, nous avons d'abord saturé la surface de nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  par de l'ovalbumine. Ils ont été placés dans une solution d'ovalbumine à la concentration  $C_i = 20 \mu\text{mol}/\text{L}$ , et ce durant 72h. Puis le surnageant a été éliminé par décantation magnétique et la quantité d'ovalbumine adsorbée a été déduite par une mesure spectrométrique réalisée sur ce surnageant. On trouve  $Q_{\text{OVA}} = 0,59 \mu\text{mol}/\text{g}$ , soit une valeur très proche de ce que l'on a pu voir lors des tests de sélectivité (Figure 76). Le PEP magnétique semble saturé par de l'ovalbumine. Ensuite, une solution de GFP de concentration croissante en protéine a été ajoutée aux nano-objets précédemment récupérés. Ils étaient placés deux heures sous agitation orbitaire, temps nécessaire à l'équilibre de l'adsorption de la GFP, comme déterminé lors des études cinétiques. Le surnageant était alors de nouveau récupéré grâce à une étape de décantation magnétique et analysé par spectrométrie UV-Visible pour calculer la quantité de GFP adsorbée.

#### 6.4.5. Résilience

Afin d'étudier les capacités régénératives des polymères magnétiques à empreintes de protéines, plusieurs cycles d'adsorption – extraction de la GFP ont été réalisés sur un même échantillon de particules hybrides. Les extractions ont été réalisées par dialyse dans un mélange de méthanol et d'acide acétique. Les adsorptions suivaient le même protocole que celui décrit précédemment, avec 5 mg de particules hybrides dans 3 mL d'une solution de GFP à 0,5 mg/mL, et un temps d'agitation de 24h avant décantation magnétique.

### 6.5. Devenir *in vitro*

#### 6.5.1. Désorption

La **désorption passive** a été étudiée ainsi : 50 mg de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  ou PNI ayant adsorbé une quantité de protéine égale à leur capacité d'adsorption à saturation (57,5 mg/g et 24,9 mg/g respectivement) sont placés dans 30 mL d'HEPES. Une partie de la suspension (1 mL à chaque fois) est prélevée à certains temps. Les particules sont séparées par décantation magnétique et le surnageant est analysé par spectroscopie UV-Visible afin de déterminer la quantité de GFP désorbée.

Le protocole suivant a été mis en œuvre pour étudier la **désorption par chauffage au bain-marie**. Pour ce faire, le protocole expérimental est le suivant : 5 mg de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  ou PNI ayant adsorbé une quantité de protéine égale à leur capacité d'adsorption à saturation (57,5 mg/g et 24,9 mg/g respectivement) sont placés dans 2 mL d'HEPES. Les suspensions sont chauffées durant une heure à différentes températures allant de 20°C à 80°C puis une décantation magnétique est effectuée afin de pouvoir déterminer la quantité de protéines présentes dans le surnageant. La protéine pouvant subir une dénaturation par chauffage, la détermination de la quantité de protéines désorbées à chaque température se faisant en comparant le spectre UV-Visible obtenue pour les surnageants des solutions de nano-objets hybrides avec des spectres obtenus pour des solutions de protéines à une concentration initiale connue avec précision ayant subi le même traitement thermique.

Enfin, l'étude de la **désorption par chauffage grâce à l'hyperthermie magnétique** s'est déroulée de la sorte. Le protocole mis en œuvre est très semblable à celui décrit précédemment : les suspensions sont placées dans un champ magnétique alternatif d'intensité variable entre 0 et 13,4 mT à la fréquence de 335,1 kHz durant 15 min, au lieu d'être placées dans un bain-marie. Les intensités du champ magnétique et la concentration en particules ont été choisies afin de se placer dans le cas du « hot-spot » et non pas de l'échauffement macroscopique de la solution. Le champ magnétique appliqué est bien inférieur à 200 mT, valeur minimale aujourd'hui employée dans les antennes d'imagerie par résonance magnétique, ce qui permet de limiter ses effets secondaires dans l'optique d'applications futures en nanomédecine.

#### 6.5.2. Dénaturation

Le protocole expérimental mis en œuvre est le suivant : 1,2 mg d'objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  ayant adsorbé de la GFP sans avoir atteint la saturation ( $Q = 16 \text{ mg/g}$ , soit  $m_{\text{GFP}} = 19,2 \text{ }\mu\text{g}$  dans le milieu) sont dispersés dans 2 mL d'HEPES à 200 mM et pH=8. L'intensité de fluorescence est enregistrée puis les

particules sont chauffées au bain-marie ou par hyperthermie magnétique, durant un certain temps à une certaine température. Après chauffage, la nouvelle intensité de fluorescence est enregistrée et comparée à la précédente. Il faut bien noter qu'au pH de travail, proche de 8, lors du retour à la température ambiante, une renaturation de la protéine est possible<sup>173,174,190,191</sup>. Celle-ci est rapide, c'est pourquoi les mesures de fluorescence doivent être effectuées directement après la fin du chauffage. Le surnageant est ensuite récupéré par décantation magnétique et également analysé, afin de s'assurer que la fluorescence mesurée est bien celle des protéines se trouvant au sein des particules hybrides. Les expériences sont menées en duplicata et pour chaque jeu de conditions expérimentales, le résultat présenté est la moyenne des deux résultats obtenus.

Les échantillons sont principalement chauffés par application d'un champ magnétique alternatif. Les bobines employées pour produire le champ présentant une efficacité maximale à la fréquence de 335,1 kHz, ce paramètre est fixé. Nous nous sommes intéressés à l'influence de l'intensité de l'AMF appliqué durant 15 min (par séquences de 5 min séparées par 1 minute de repos des bobines) sur la dénaturation de la GFP piégée au sein des nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ . Le même traitement a été appliqué à une solution d'HEPES contenant uniquement de la GFP. Le chauffage pouvait également se faire au bain-marie, entre 30°C et 80°C durant 15 min à 6h.

L'intensité de la fluorescence est mesurée par un spectrofluorimètre, par enregistrement de l'intensité émise à 509 nm après excitation sur une gamme allant de 480 nm à 500 nm, centrée sur  $\lambda_{\text{max,excitation}}$  pour la protéine E-GFP.

### 6.6. Ciblage cellulaire

#### 6.6.1. Adsorption de GFP immobilisée

Les supports d'immobilisation de la GFP ont été préparés de la manière suivante. Des plaques de verre ont été nettoyées avec attention à l'éthanol à 70% puis soumises à un rayonnement plasma. Elles ont ensuite été recouvertes de PLL-PEG (un copolymère poly-lysine et polyéthylène glycol) afin de passiver la surface. Puis un cache troué a été appliqué, et les plaques de verre ont été illuminées : le PLL-PEG a été détruit aux endroits non recouverts par le cache. Les plaques de contrôle ont été employées telles qu'elles tandis que les autres ont été incubées en présence de GFP à 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durant 30 min. La GFP comme de nombreuses protéines pouvant interagir avec le verre par le biais d'interactions hydrogènes (silanol du verre – acide aminé de la protéine), elle se fixait alors sur les surfaces non passivées par les chaînes PLL-PEG. Enfin, les supports de verre ont été soigneusement lavés au PBS, afin d'éliminer la GFP non fixée.

La suspension de nano-objets hybrides dans de l'HEPES 200 mM à pH = 8 a été diluée au sein du sérum de culture cellulaire de la manière suivante : 100  $\mu\text{L}$  de l'échantillon a été placé dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) suppléé avec 10 % de sérum fœtal bovin (FBS) pour obtenir un volume total de 4 mL.

La solution de nano-objets dilués dans le milieu de culture a ensuite été placée au sein des puits contenant les plaques de verres sur lesquelles la GFP avait préalablement été immobilisée (2 puits, 1 mL par puits) ou contenant les plaques de verres de contrôle (2 puits, 1 mL par puits). Après 30 min d'incubation, les plaques ont été observées. Les observations ont eu lieu grâce au microscope de fluorescence de l'Institut Curie équipé des filtres à GFP et à Rhodamine (voir page 105) sans lavages préalables des puits, et donc sans élimination des particules non adsorbées.

### 6.6.2. Culture des cellules et transfection

Les cellules, COS-7 ou HeLa, ont été cultivées dans le DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suppléé avec un mélange de nutriments dit F12, auquel on avait ajouté 10% de sérum fœtal bovin et 1% de pénicilline et de streptomycine (commercialisés en mélange sous le nom PenStrep). Afin de les rendre fluorescentes, le plasmide TMD-pHluorin a été transfecté à l'aide de Viafect (un agent de transfection d'ADN couramment utilisé pour modifier les cellules COS et HeLa), suivant les recommandations du fournisseur. La transfection a eu lieu dans un autre milieu de culture cellulaire, appelé Opti-MEM (une autre version modifiée du milieu de culture d'Eagle), auquel on avait ajouté à nouveau 10% de sérum fœtal bovin et 1% de PenStrep. Après 3h d'incubation, les cellules ont été soigneusement lavées à l'aide de DMEM, et conservées dans un incubateur jusqu'aux tests de ciblage.

### 6.6.3. Réalisation du ciblage

Le protocole expérimental mis en œuvre lors des tests d'adsorption est le suivant. Les cellules, cultivées et modifiées par Cornelia Monzel ou Elie Balloul, sont placées sur une plaque de microscope dans des puits contenant du milieu de culture cellulaire. Certaines cellules transfectées sont incubées avec un « GFP-nanobody », un anticorps mono-domaine (une seule chaîne protéique) anti-GFP qui va rendre la protéine inaccessible pour les empreintes<sup>192</sup>. Cela permet d'effectuer un test d'adsorption compétitive et de voir si les particules se fixent toujours aux cellules transfectées.

Ensuite, la suspension de nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  fluorescents est comme précédemment diluée dans du sérum de culture cellulaire (DMEM suppléé en FBS) à différentes concentrations. Pour les nano-objets hybrides, la concentration testée avec les cellules COS-7 a été obtenue en mélangeant 800  $\mu\text{L}$  de milieu et 200  $\mu\text{L}$  de suspension de particules à la concentration initiale en fer magnétique de 1,95 mM (concentration finale : 390  $\mu\text{M}$ ), tandis que pour les concentrations testées avec les cellules HeLa, on a mélangé 1 mL de milieu avec 100  $\mu\text{L}$  de suspension de particules hybrides, également à la concentration initiale de 1,95 mM en fer (concentration finale : 190  $\mu\text{M}$ ).

Puis ces suspensions sont ajoutées aux puits contenant les cellules, transfectées ou non, qui sont placés à l'incubateur durant un temps total variable, allant de 15 min à 1h. Ils sont régulièrement sortis de l'incubateur afin d'effectuer des observations de l'état des cellules grâce à un microscope optique. Enfin, les puits sont lavés 3 fois avec du milieu de culture afin d'éliminer les nanoparticules hybrides non adsorbées à la surface des cellules. Puis les cellules sont imagées grâce au microscope optique de fluorescence de l'Institut Curie, équipé de filtre à GFP et à Rhodamine (voir matériel et méthode page page 105), afin de visualiser respectivement la pHluorin (GFP) et la rhodamine couplée au polymère magnétique. Un troisième filtre a été utilisé, afin de visualiser le fluorophore couplé au GFP-nanobody (une cyanine), et l'efficacité de cet anticorps pour cibler les cellules transfectées. Ce filtre possède une bande passante d'excitation de  $640 \pm 30$  nm, une bande passante d'émission de  $690 \pm 50$  nm et un filtre dichroïque servant de séparateur de faisceau à 660 nm afin d'observer la fluorescence.

### 6.6.4. Analyse des résultats obtenus

Dans un premier temps, nous avons pris des clichés en microscopie optique. Dans un second temps, nous avons cherché à analyser de manière plus précise les clichés obtenus. Pour ce faire, à l'aide du logiciel d'analyse d'images ImageJ, nous avons mesuré l'intensité de fluorescence moyenne des

cellules (pour la rhodamine) en fonction de la nature des cellules : cellules contrôle, cellules ayant été transfectées mais n'exprimant pas la GFP et cellules ayant été transfectées et exprimant la GFP. Ces intensités ont été normalisées par celle des pixels entourant la cellule, car la source lumineuse n'était pas homogène (halo plus intense en bas à droite, clichés de la Figure 91 entre autres) et la valeur du bruit de fond variait en fonction de la position dans le champ d'observation. En pratique, l'analyse se déroule ainsi :

- sur une image en lumière blanche, on entoure une cellule (Figure 91 gauche) ;
- la forme est répliquée à l'identique sur l'image obtenue avec le filtre à rhodamine (Figure 91 milieu) ;
- on mesure l'intensité moyenne des pixels dans cette zone à l'aide d'ImageJ : on obtient alors  $I_{\text{cellule}}$  ;
- une forme semblable à la première mais plus large que celle-ci de  $2 \mu\text{m}$  sur tout le contour est ajoutée sur le cliché obtenu avec le filtre à rhodamine (Figure 91 droite) ;
- à l'aide d'ImageJ, on calcule l'intensité moyenne des pixels présents entre les deux formes : on obtient  $I_{\text{fond}}$  ;
- on calcule alors l'intensité que l'on considérera par la suite  $I = I_{\text{cellule}} - I_{\text{fond}}$ .

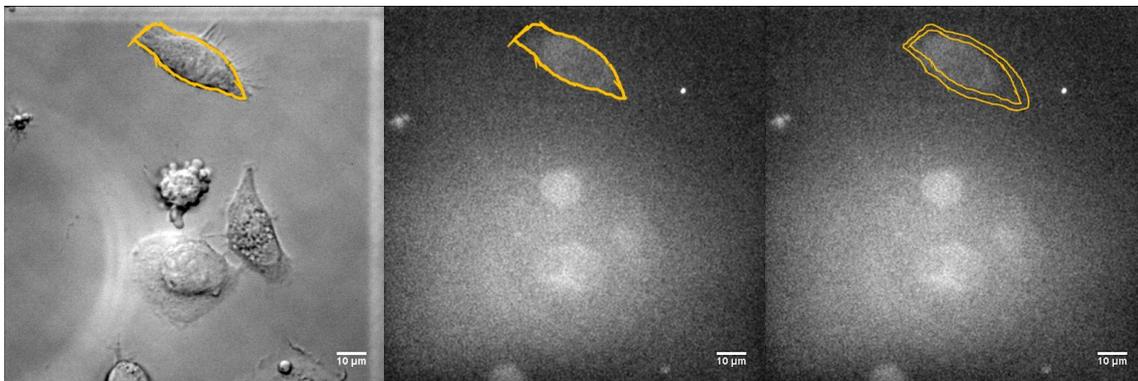


Figure 91 : Analyse des clichés de microscopie optique à l'aide d'ImageJ. Gauche : lumière blanche ; centre et droite : filtre à rhodamine.

Pour chaque catégorie de cellules (ayant été en contact ou non avec l'agent de transfection, fluorescentes ou non), la moyenne des intensités  $I$  est calculée. Cette moyenne se fait sur 15 à 20 cellules. Afin de déterminer si les différences d'intensité obtenues sont significatives, un test statistique de type Kolmogorov-Smirnov pour deux échantillons est appliqué et la valeur- $p$  est déterminée. L'écart est considéré comme significatif pour des valeurs- $p$  inférieures à 0,05. Ce test a été préféré à un test plus classique de type Student car il permet de comparer deux distributions quelconques sans faire d'hypothèse de normalité de celles-ci.

### 6.7. Dénaturation de la protéine exprimée par les cellules

Dans un premier temps, des cellules HeLa transfectées TMD-pHluorin ont été incubées avec des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  fluorescents, suivant le protocole des tests de ciblage décrit dans la partie précédente. Après lavages au PBS, les cellules accrochées sur une lame de verre ont été fixées avec du para-formaldéhyde, puis de nouveau lavées avec attention au PBS.

La lame de verre constituant le fond des puits contenant les différentes cellules incubées durant 15 min ou 1h avec les nano-objets hybrides a été découpée afin de pouvoir manipuler chacun des puits séparément. Les puits ont ensuite été placés dans des cuves optiques remplies de PBS. Une attention

toute particulière a été portée au positionnement du puits dans la cuve afin de s'assurer du passage du laser du spectrofluorimètre au sein de celui-ci. Une mesure de l'intensité de fluorescence due à la pHluorin extracellulaire a été effectuée (excitation : 395 nm, pic principal de la pHluorin au pH de travail ; émission 508 nm) puis la cuve a été introduite au sein du Magnetherm, appareil servant à appliquer le champ magnétique alternatif. Le milieu a été soumis à un champ magnétique de 3,35 mT oscillant à 332 kHz durant 5 min, puis une nouvelle mesure de l'intensité de fluorescence a ensuite été effectuée. Le ratio entre les intensités mesurées avant et après application du champ magnétique alternatif permet de savoir s'il y a eu dénaturation de la GFP.

Le microscope optique du laboratoire n'étant pas adapté pour l'observation et la mesure de fluorescence des cellules (le grossissement n'étant pas suffisamment performant), la dénaturation de la GFP induite par les propriétés d'hyperthermie des nanoparticules de maghémite sous champ magnétique alternatif a uniquement été caractérisée par la mesure du signal de fluorescence avec le spectrofluorimètre.

# Chapitre 4 : Dégradation des hybrides $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ en amas cellulaires



## Table des matières

1.	Une dégradation déjà référencée dans la littérature .....	117
1.1.	Dégradation et toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer .....	117
1.1.1.	Influence de la surface des nanoparticules sur leur dégradation .....	117
1.1.2.	Internalisation des nanoparticules .....	118
1.1.3.	Dégradation des nanoparticules dans les lysosomes .....	119
1.2.	Dégradation et toxicité des polymères .....	120
1.2.1.	Biocompatibilité, internalisation et dégradation de polymères .....	120
1.2.2.	Toxicité du polyacrylamide .....	122
2.	Etude de la dégradation en tampon lysosomal .....	122
2.1.	Choix des milieux d'étude .....	122
2.2.	Influence de la quantité d'acide citrique .....	123
2.2.1.	La dégradation peut être suivie classiquement .....	123
2.2.2.	Ou de façon originale par relaxométrie .....	127
2.2.2.1.	Principe de la méthode de suivi .....	127
2.2.2.2.	Résultats obtenus .....	128
2.3.	Influence du polymère imprimé .....	129
2.4.	Influence de l'enzyme .....	133
3.	Etude de la dégradation et de la toxicité en amas cellulaire .....	138
3.1.	Sphéroïdes de cellules souches mésenchymateuse humaines .....	138
3.1.1.	Les cellules souches mésenchymateuses .....	138
3.1.2.	Intérêt de travailler avec des sphéroïdes de cellules .....	139
3.2.	Etudes préliminaires sur les interactions particules - cellules .....	139
3.2.1.	Entrée des particules dans les cellules .....	139
3.2.2.	Cytotoxicité des nano-objets hybrides et test de viabilité cellulaire .....	140
3.3.	Dégradation des nano-objets $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ dans les sphéroïdes cellulaires .....	142
4.	Conclusion sur la dégradation des objets hybrides $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ .....	148

5. Matériels et méthodes .....	150
5.1. Réactifs chimiques.....	150
5.2. Citration des particules de maghémite .....	150
5.3. Synthèse de nanoparticules de polyacrylamide.....	151
5.4. Suivi de la dégradation en tampon lysosomal .....	151
5.5. Culture des cellules .....	152
5.6. Test de cytotoxicité AlamarBlue.....	152
5.6.1. Description du test de viabilité cellulaire .....	152
5.6.2. Cellules employées, nature et concentration des particules évaluées .....	153
5.7. Suivi de la dégradation en amas cellulaires .....	154
5.7.1. Incubation des particules et formation des sphéroïdes de cellules.....	154
5.7.2. Les méthodes de suivi de la dégradation .....	155

Malgré l'intérêt croissant porté à l'utilisation en nanomédecine des objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ , très peu d'études existent dans la littérature sur leur biocompatibilité et leur devenir à long terme. Ces sujets doivent pourtant être abordés avant d'envisager des applications cliniques. Afin de pallier ce manque de données, nous nous sommes penchés sur la toxicité des objets hybrides et leur dégradation, aussi bien dans un tampon lysosomal que dans un tissu modèle composé de cellules souches mésenchymateuses humaines. Pour ce faire, nous avons employé des systèmes hybrides nanoparticule de maghémite – polymère à empreintes de GFP ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ ).

Nous avons fait le choix de travailler avec des hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  (après extraction des protéines gabarits) car la GFP n'est pas censée être présente au sein du milieu de culture ni exprimée par les cellules employées pour les tests de dégradation en amas cellulaires. La dégradation et la toxicité des objets hybrides seront alors uniquement dues à leur présence, et non pas à des interactions spécifiques avec les cellules.

## 1. Une dégradation déjà référencée dans la littérature

Une des applications envisagées à plus long terme pour les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  est d'effectuer du ciblage protéique *in vivo*. Ce qui soulève de nombreuses questions au sujet de la toxicité des nanoparticules de maghémite et du PEP qui leur est couplé. Des interrogations apparaissent également au sujet de leur devenir *in vivo*, de leur dégradation et leur bioaccumulation possible. Cette partie se propose de résumer les informations principales que l'on peut trouver dans la littérature à propos de la dégradation et de la toxicité des nanoparticules d'une part et du polymère d'autre part.

### 1.1. Dégradation et toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer

#### 1.1.1. Influence de la surface des nanoparticules sur leur dégradation

La fonctionnalisation de surface (*coating*) des nanoparticules influence fortement la reconnaissance de celles-ci par l'organisme et la réponse immunitaire, modulant ainsi leur toxicité. En effet, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, liées souvent à leur *coating*, les nanoparticules peuvent interagir avec les cellules et les protéines pour induire différentes réponses immunitaires, en stimulant ou supprimant celles-ci, influençant ainsi la biocompatibilité des particules. Les principaux facteurs à considérer sont bien évidemment la taille des nanoparticules, mais également leur forme, et leur hydrophobicité<sup>193</sup>. En effet, plus la surface des nanoparticules sera hydrophobe et plus celles-ci seront internalisées par des macrophages : le système immunitaire les reconnaît plus rapidement comme un corps étranger à éliminer, ce qui diminue leur biocompatibilité<sup>194</sup>. Au contraire, la modification de la surface par des chaînes de poly-éthylène-glycol va entraîner un changement dans la nature des protéines formant une corona autour des nanoparticules, en s'adsorbant de manière non-spécifique sur celles-ci, ce qui augmente leur furtivité et leur temps de résidence dans le système sanguin<sup>195</sup>. La charge de surface des nanoparticules a également un rôle important dans l'interaction de celles-ci avec le système immunitaire. En effet, des nanoparticules chargées positivement subissent une attraction électrostatique plus forte envers les membranes cellulaires, favorisant leur internalisation<sup>196,197</sup>.

Ensuite, le *coating* présent autour des nanoparticules permet de modifier la cinétique de dégradation de celles-ci une fois internalisées par les cellules. La présence d'une couche à la surface

peut permettre soit de ralentir, soit de retarder leur dégradation<sup>198,199</sup>. Par exemple, une couche d'or peut réduire la dégradation des nanoparticules qu'elle entoure<sup>198,200</sup>. Concernant les *coatings* organiques, une monocouche hydrophile est rapidement dégradée *in vivo*. Par exemple, une couche de poly-éthylène-glycol se dégrade bien plus rapidement qu'une bicouche amphiphile. La surface des nanoparticules sera alors plus rapidement accessible, et elles seront donc dégradées plus rapidement<sup>199</sup>.

### 1.1.2. Internalisation des nanoparticules

Les nanoparticules pénètrent au sein des cellules par endocytose. En fonction de leur taille et de leurs autres caractéristiques telles que leur forme, leur charge de surface ou leur rigidité, différents mécanismes d'endocytose sont possibles. Les quatre principaux sont les suivants<sup>201</sup> : endocytose par intermédiaire de récepteurs (la clathrine), endocytose par cavéole, macropinocytose et phagocytose (Figure 92).

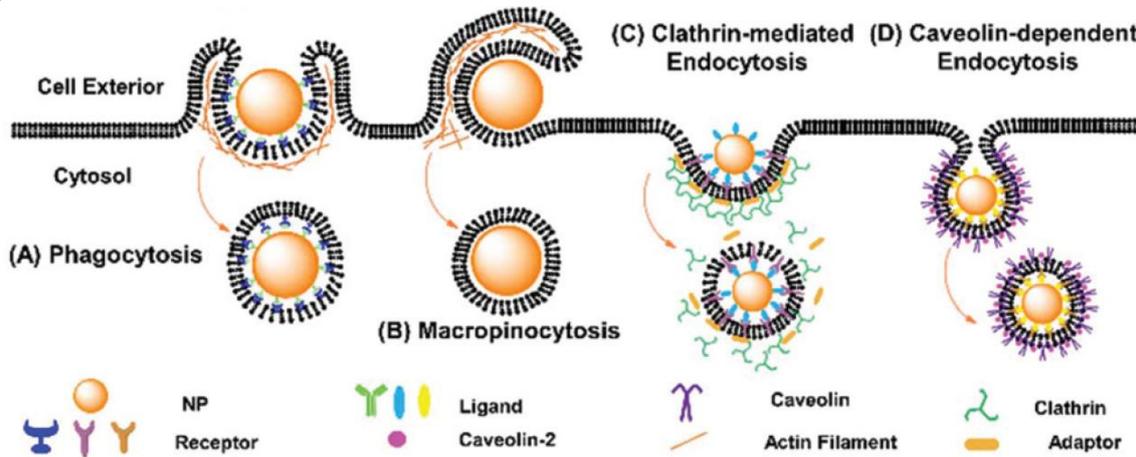


Figure 92 : Les différentes voies d'endocytose possibles<sup>202</sup>. (A) : phagocytose, (B) : macropinocytose, (C) : endocytose par intermédiaire de récepteurs, et (D) : endocytose par cavéole.

La phagocytose est la voie d'entrée privilégiée des grosses particules (de taille supérieure à 500 nm), et elle est principalement employée par quelques types de phagocytes, tels que les macrophages et les neutrophiles, qui sont spécialisés dans l'ingestion des agents pathogènes, mais également des cellules mortes et des débris cellulaires<sup>203</sup> (Figure 92, A).

La macropinocytose est l'autre voie d'entrée des grosses nanoparticules mais également celle des macromolécules et des agents pathogènes microbiens<sup>204,205</sup>. La membrane plasmique se déforme afin d'englober une grande partie du fluide extracellulaire et tout ce qu'il contient, en formant de larges vésicules appelées macropinosomes<sup>203,205</sup> (Figure 92, B). Les nanoparticules sont ainsi encapsulées au sein de ces vésicules et de fait internalisées par les cellules.

L'endocytose par intermédiaire de la clathrine est la principale voie d'endocytose exploitée par les virus<sup>206</sup>. Les nanoparticules vont développer des interactions spécifiques ou non avec la membrane plasmique des cellules, ce qui va finir par déclencher leur internalisation. Dans le cas où l'interaction est spécifique, l'interaction entre le ligand et le récepteur va déclencher l'invagination de la membrane, et le recouvrement de la partie cytoplasmique de celle-ci par de la clathrine<sup>207,208</sup> (Figure 92, C). Les nanoparticules internalisées par cette voie sont bien souvent directement conduites au sein des lysosomes, afin d'y être dégradées<sup>209</sup>.

Enfin, lors de l'endocytose par cavéole, une cavité se forme par invagination de la membrane vers l'intérieur du cytosol<sup>210,211</sup>. Cette invagination est déclenchée par la présence d'une protéine dimérique, la cavéoline (Figure 92, D). Les nanoparticules internalisées de cette manière peuvent

parfois échapper aux lysosomes, et donc ne pas subir de dégradation<sup>209</sup>, ce qui présente de nombreux avantages lorsque l'on cherche à effectuer de la délivrance ciblée de gènes ou de médicaments.

Ainsi, les nanoparticules se retrouvent confinées dans des endosomes au sein des cellules. C'est dans ces endosomes que leur dégradation aura lieu, et plus particulièrement dans des endosomes tardifs également appelés lysosomes (Figure 93).

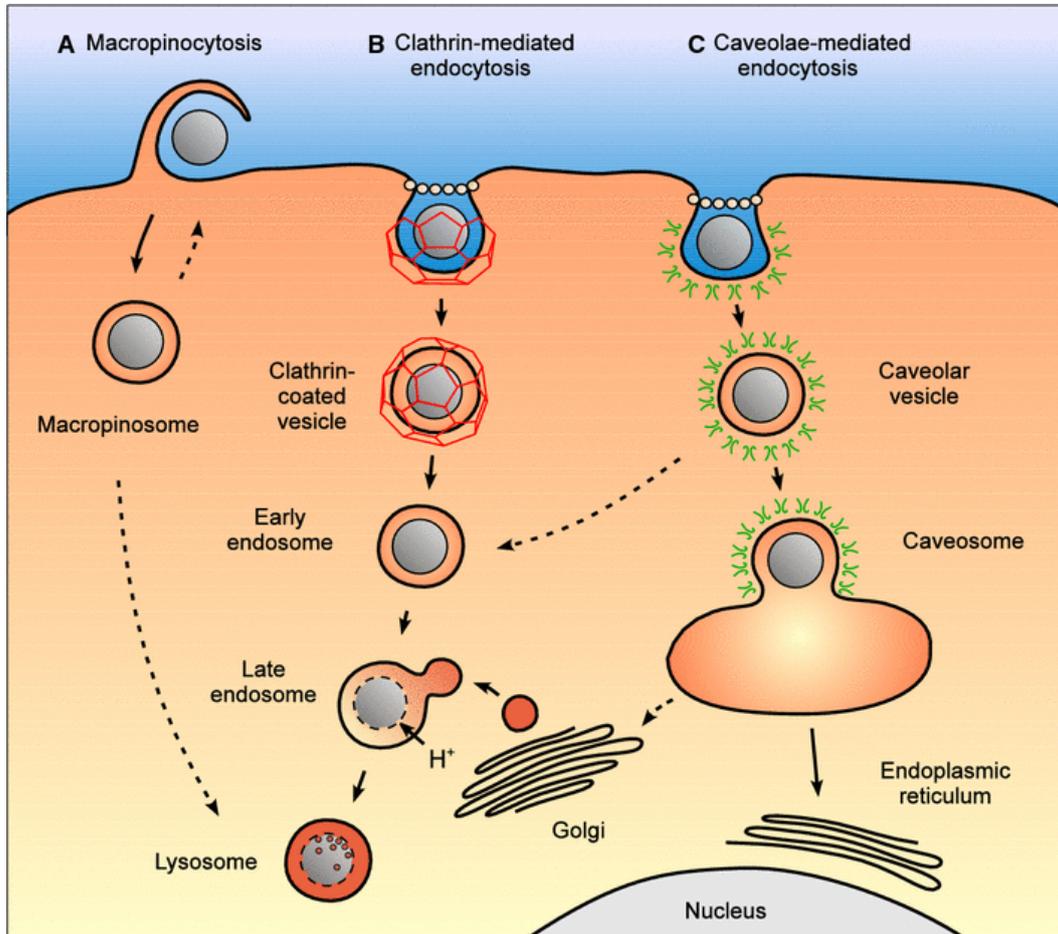


Figure 93 : Représentation schématique des différents types d'endosomes<sup>212</sup>.

### 1.1.3. Dégradation des nanoparticules dans les lysosomes

Les lysosomes sont des compartiments cellulaires spécialisés dans la digestion de macromolécules ou de nanoparticules<sup>213,214</sup>. Ils peuvent aussi bien dégrader des corps étrangers à l'organisme (endocytose) que les composants obsolètes de la cellule elle-même (autophagie)<sup>213</sup>. Les lysosomes contiennent plus de 40 enzymes différentes. La plupart d'entre elles sont des hydrolases acides (Figure 94), dont l'optimum d'activité se situe pour des pH inférieurs à 6. Le pH des lysosomes étant d'environ 5 les hydrolases sont actives au sein de ceux-ci, sans l'être dans le cytosol des cellules, dont le pH neutre est proche de 7,2<sup>213,214</sup>. Le conditionnement de l'activité des hydrolases à un pH acide permet une protection face à une digestion non contrôlée du contenu du cytosol dans le cas où la membrane du lysosome viendrait à se rompre<sup>213</sup>. Par ailleurs, le cytosol des cellules contient des protéines susceptibles de complexer le fer, les ferritines<sup>215</sup>. Les ferritines sont des protéines capables de chélater la surface des nanoparticules d'oxyde, d'induire leur dégradation et de stocker le fer ainsi obtenu<sup>199,216</sup>. Des échanges perpétuels ont lieu entre cytosol et lysosome. Les ferritines chargées en fer peuvent

pénétrer dans ce dernier par autophagie en cas de déficit ferrique, afin d'y être dégradées et ainsi libérer le fer<sup>215,217</sup>. Lorsqu'au contraire la charge en fer est trop importante, comme c'est le cas lors de l'accumulation de nanoparticules de maghémite, des ferritines libres peuvent cette fois pénétrer à l'intérieur des lysosomes ou être produites directement à l'intérieur de ceux-ci afin de complexer le fer libéré lors de la dégradation et fixer celui-ci<sup>215,218</sup>. Le fer sous forme ionique, cytotoxique, est ainsi uniquement relargué dans les lysosomes à proximité de ferritines et directement pris en charge par celles-ci. De fait, la toxicité du fer est fortement diminuée, voire annulée. Le fer récupéré peut ensuite être transmis aux cellules hépatiques parenchymateuses via ces mêmes protéines de stockage. Ce transfert peut également avoir lieu vers la rate.

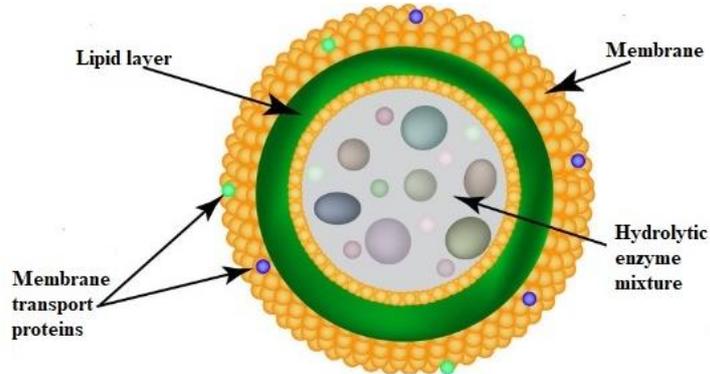


Figure 94 : Représentation schématique d'un lysosome<sup>219</sup>.

Afin de mieux comprendre le mécanisme de dégradation des oxydes de fer dans les lysosomes, des études ont été menées *in vitro* dans un milieu appelé « tampon lysosomal »<sup>220</sup>. Il s'agit d'une solution tampon de citrate et d'acide citrique à pH = 4,8. Le citrate et l'acide citrique sont des molécules susceptibles de chélater le fer, et donc la surface des nanoparticules de maghémite. Les ions citrates sont parfois employés afin de stabiliser des suspensions de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ <sup>221,222</sup>. Mais l'acide citrique peut entraîner une consommation de la surface des nanoparticules et donc leur dégradation, du fait de son caractère réducteur puissant.

Un des mécanismes probables pour expliquer la dégradation des nanoparticules d'oxyde de fer par l'acide citrique est le suivant. Une fois l'acide complexé à la surface des nanoparticules, un transfert d'électron par mécanisme de sphère interne a lieu, conduisant à l'oxydation de l'acide citrique et à une réduction de l'atome de fer III en fer II<sup>223</sup>. Celui-ci passe alors en solution, selon deux mécanismes possibles : une dissolution assistée par la présence de protons ou une dissolution assistée par la présence de ligands<sup>223,224</sup>. Le citrate étant un réducteur moins fort que l'acide citrique, le transfert d'électrons n'a pas lieu à température ambiante, assurant la stabilité des suspensions de nanoparticules de maghémite citratées.

## 1.2. Dégradation et toxicité des polymères

### 1.2.1. Biocompatibilité, internalisation et dégradation de polymères

La compréhension de la dégradation de polymère à la surface de nanoparticules *in vivo* ou même à l'échelle des cellules reste à ce jour incomplète. D'après une revue publiée par Feliu *et al.*<sup>198</sup>, certains polymères sont dégradés *in vivo* : des enzymes peuvent cliver les liens peptidiques, et d'autres dégradent les polysaccharides. Il s'agit principalement de polymères amphiphiles, dégradés par des enzymes protéolytiques, lors de leur passage dans des endosomes<sup>198,225,226</sup>. En général, cette

dégradation consiste en une simple séparation du polymère de la particule (Figure 95b). C'est le cas par exemple du poly(isobutylène-alt-maleic anhydride) greffé dodécyle présent à la surface de nanoparticules d'or dans un milieu contenant différentes enzymes telles que la trypsine ou la cathepsine G<sup>226</sup>. Parfois le polymère en surface peut être clivé en éléments plus petits (Figure 95a et c). C'est notamment le cas de petites séquences peptidiques en présence de cathepsine L<sup>225</sup>. Il est important de noter que la cathepsine L est capable à elle-seule de cliver un tiers des protéines humaines. Concernant les biopolymères, ou plus exactement les polymères biosourcés à base de chitosane, d'alginate ou encore de dextran, ceux-ci ne présentent pas de toxicité aigüe<sup>227-229</sup> mais ne peuvent pas tous être dégradés *in vivo*<sup>230-232</sup>.

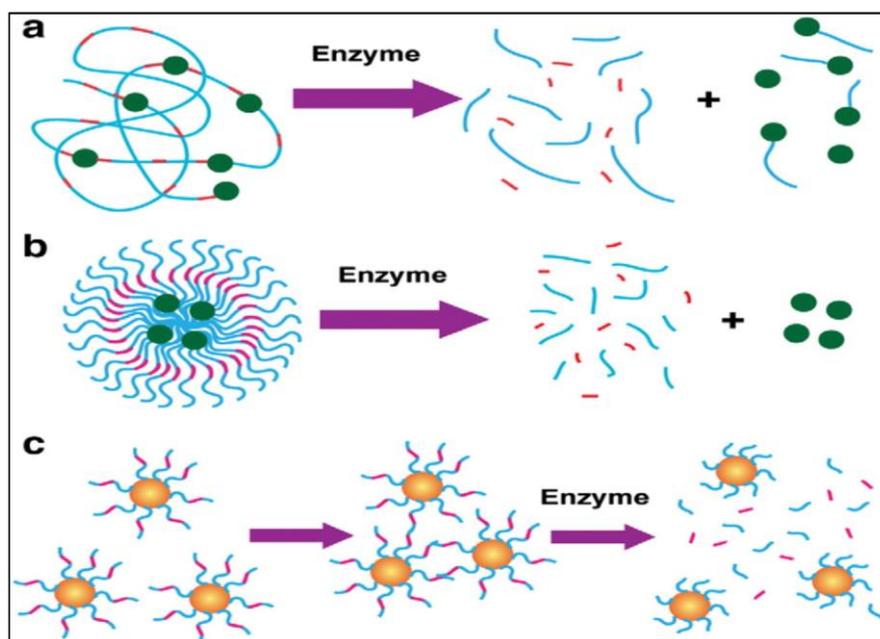


Figure 95 : Différentes dégradations possibles de polymères fonctionnalisant des nanoparticules, sous l'action d'enzymes<sup>233</sup>.

Cependant, les études portant sur la dégradation des polymères par des enzymes ne sont pas encore complètes à ce jour. On ne sait pas s'il existe des revêtements capables de résister à une dégradation<sup>198</sup> ou si les protéines présentes dans les lysosomes sont susceptibles de cliver un polymère tel que le polyacrylamide ou de le séparer de la surface de nanoparticules de maghémite.

Il faudra donc effectuer au laboratoire des études de dégradation *in vitro* des PEP employés, dans un milieu comportant au moins une enzyme protéolytique.

De plus, à notre connaissance, un seul article traite actuellement de la biocompatibilité et de l'internalisation de polymères à empreintes moléculaires. Canfarotta *et al.*<sup>234</sup> ont étudié la toxicité de nanoparticules de polymère à empreintes de mélamine, recouvertes ou non de poly-éthylène-glycol de différentes tailles, sur quatre lignées cellulaires. Aucune des particules étudiées n'a réduit de façon significative la viabilité cellulaire des différentes lignées, bien que celles-ci ne présentent pas la même réponse face aux particules recouvertes des chaînes polymères les plus longues. L'évaluation de la toxicité cellulaire des polymères à empreintes doit se faire sur plusieurs lignées afin d'obtenir les résultats les plus précis possibles. Cependant, cette étude démontre bien la biocompatibilité des polymères à empreintes moléculaires, ainsi que leur internalisation possible par les cellules, pouvant par la suite mener à leur dégradation.

### 1.2.2. Toxicité du polyacrylamide

McCollister *et al.*<sup>235</sup> se sont penchés sur la question de la toxicité de l'acrylamide. L'ingestion, l'adsorption par pénétration cutanée, l'injection intraveineuse et l'inhalation entraîne une mort rapide des animaux testés (rats, lapins et cochons d'Inde) pour des doses LD50 relativement faibles variant entre 150mg/kg (ingestion, injection intraveineuse) à 1 g/kg (adsorption cutanée). La LD50, ou dose létale médiane, correspond à la quantité de principe actif suffisante pour tuer la moitié de la population considérée. Pour qu'il n'y ait aucun effet de l'acrylamide sur la santé, les doses ingérées ou injectées ne doivent pas dépasser 3mg/kg/jour (étude sur un an). On sait aussi qu'en plus d'être fortement toxique, l'acrylamide est classé comme étant CMR (Cancérigène, Mutagène, Reprotoxique).

Cependant, une fois polymérisé l'acrylamide ne présente plus de toxicité majeure. D'autres études de McCollister *et al.*<sup>236</sup> ont démontré une absence de toxicité du polyacrylamide par ingestion durant plusieurs années sur différents sujets (rats, chiens et poissons). Sjöholm et Edman ont quant à eux mené des études sur le devenir de microparticules de polyacrylamide après injection intraveineuse chez des rats<sup>237</sup>. Les particules s'accumulent rapidement dans le foie et la rate, où elles sont métabolisées. Aucun effet toxique à long terme n'est détecté pour des doses allant jusqu'à 490 mg/kg<sup>237</sup>.

Le polyacrylamide est donc un polymère de choix pour la synthèse des PEP envisagés, car il ne présente pas de toxicité significative après ingestion ou injection intraveineuse, et il même considéré par certains comme biocompatible<sup>238,239</sup>. La seule limite à son utilisation est de s'assurer que la polymérisation est totale, ou que les monomères acrylamide résiduels sont parfaitement éliminés, ce que nous avons vérifié lors des étapes de purification des nano-hybrides présentés dans ce manuscrit.

## 2. Etude de la dégradation en tampon lysosomal

### 2.1. Choix des milieux d'étude

La dégradation *in vivo* des nanoparticules de maghémite a lieu dans les lysosomes de cellules hépatiques. Les lysosomes sont des compartiments cellulaires acides, contenant de très nombreuses enzymes hydrolases et, lors d'une suraccumulation de fer, des ferritines. Nous avons donc fait le choix de travailler dans un tampon citrate<sup>240-242</sup>. Le choix des citrates est fait pour mimer l'effet des protéines chélatantes, capables de complexer le fer dans les cellules<sup>220</sup>. Deux pH de la solution tampon ont été testés : un pH acide proche de 4,8 et un pH neutre proche de 7. Le pH neutre reflète le pH du cytosol, tandis que le pH acide se rapproche du pH interne des lysosomes.

Par ailleurs, des études ont montré que les enzymes protéolytiques, capables de cliver les protéines, peuvent être également capables de cliver des polymères<sup>230</sup>. Afin d'effectuer l'étude la plus pertinente possible de la dégradation *in vitro* des systèmes  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ , il faudrait donc ajouter au milieu d'étude une ou plusieurs enzymes protéolytiques, à des concentrations proches des concentrations cellulaires<sup>225</sup>. Ces enzymes se classant en deux grandes catégories, capables de cliver une matrice polymère en différents morceaux plus petits (ex. la cathepsine L<sup>225</sup>) ou capables de détacher le polymère de la surface des nanoparticules (ex. l' $\alpha$ -glucosidase<sup>230</sup>). Ces différentes enzymes pouvant se trouver à l'intérieur des lysosomes, nous avons décidé de travailler avec l'une d'entre elles, l' $\alpha$ -glucosidase.

En résumé, afin de mimer les conditions biologiques de l'intérieur d'un lysosome, nous proposons d'étudier la dégradation des objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  dans les conditions suivantes. Les particules sont placées dans un tampon citrate à pH=4,8 ou pH=7. A ce tampon citrate pourront être ajoutés de l'acide citrique à une concentration de 20 mM (afin d'obtenir une concentration en agents chélatants proche de celle que l'on peut trouver au sein des lysosomes), ou une enzyme à une concentration de 0,5 mg/mL. Des polymères de différentes épaisseurs seront étudiés afin de déterminer leur influence sur la dégradation du cœur magnétique.

Les enzymes étudiées sont :

- l' $\alpha$ -glucosidase car présente dans les lysosomes en tant qu'enzyme hydrolase
- le pronase E car présent dans les lysosomes, sans action d'hydrolase
- le lysozyme non présent dans les lysosomes pour comparaison

Les différents milieux employés lors de cette étude de dégradation sont présentés dans le Tableau 10. Des nanoparticules de maghémite ou des nano-objets hybrides  $\gamma$  sont ajoutés afin d'obtenir une concentration en fer magnétique de l'ordre de 9 mM, mais connue avec précision par spectroscopie d'absorption atomique (ou AAS : atomic absorption spectroscopy). Le milieu C correspond à un milieu témoin de pH neutre et nous cherchons à vérifier que dans ces conditions, les nanoparticules de maghémite ne sont pas dégradées.

Nom du milieu	Concentration en citrate (mM)	Concentration en acide citrique (mM)	Enzyme à 0,5 mg/mL	Valeur initiale de pH
C	0,04	$10^{-8}$	Aucune	6,9
E	5,6	4,4	Aucune	4,8
A	5,6	24,4	Aucune	4,55
B	5,6	24,4	Lysozyme	N/M
F	5,6	24,4	Pronase	N/M
G	5,6	24,4	Glucosidase	N/M

Tableau 10 : Caractéristiques principales des milieux de dégradation employés (N/M : non mesuré).

Les études ont été menées en duplicata dans chaque milieu de dégradation.

## 2.2. Influence de la quantité d'acide citrique

### 2.2.1. La dégradation peut être suivie classiquement...

Comme nous l'avons vu un peu plus tôt dans ce chapitre, l'acide citrique, puissant réducteur, est capable de chélater la surface de la maghémite et de la consommer. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'influence de la concentration en acide citrique sur la dégradation de nanoparticules d'oxyde de fer, stabilisées de deux manières différentes. Trois concentrations en acide citrique dans le milieu de dégradation ont été testées (voir Tableau 10).

Les nanoparticules pouvaient être dites « acides », stabilisées uniquement par répulsions électrostatiques entre charges positives, ou dites « citratées », stabilisées par complexation de la surface à l'aide d'ions citrates. Les particules magnétiques ayant été recouvertes du polymère à empreintes de protéines étant les particules acides (chapitre 2), il est important de comprendre leur mécanisme de dégradation, et l'influence de la concentration en acide citrique sur celle-ci, avant de s'intéresser aux hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ . Cependant, les nanoparticules de maghémite qui serviront de témoin lors des tests de dégradation en amas cellulaire sont les particules citratées, il est

donc nécessaire de s’y intéresser également ici. En effet, pour effectuer les tests cellulaires, les particules doivent être stables à pH physiologique (proche de 7), nous ne pouvons donc pas employer les nanoparticules « acides » stabilisées par répulsions électrostatiques et avons donc choisi de les stabiliser par complexation d’ions citrates.

Particules	Milieu de dégradation	Pourquoi ?
Particules acides	Milieus A, E et C	Afin de comprendre l’influence de la concentration en acide citrique / agent chélatant sur la dégradation.
Particules citratées	Milieu A	Afin d’appréhender si la citration des particules modifie leur cinétique de dégradation.

Tableau 11 : Récapitulatif des milieux employés lors de l’étude de la dégradation des nanoparticules de maghémite stabilisées de deux manières distinctes.

Les solutions de nanoparticules de maghémite dans ces trois milieux de dégradation étant fortement colorées, un premier suivi s’effectue par observation à l’œil nu de la couleur des suspensions. Comme observé sur les photographies Figure 96, le changement de couleur est rapide pour les particules présentes dans le milieu A (pH = 4,55). Au bout de 7 jours pour les particules acides et 8 jours pour les particules citratées, la solution est devenue vert pâle, signe d’une dégradation totale des nanoparticules et d’une libération d’ions fer II.

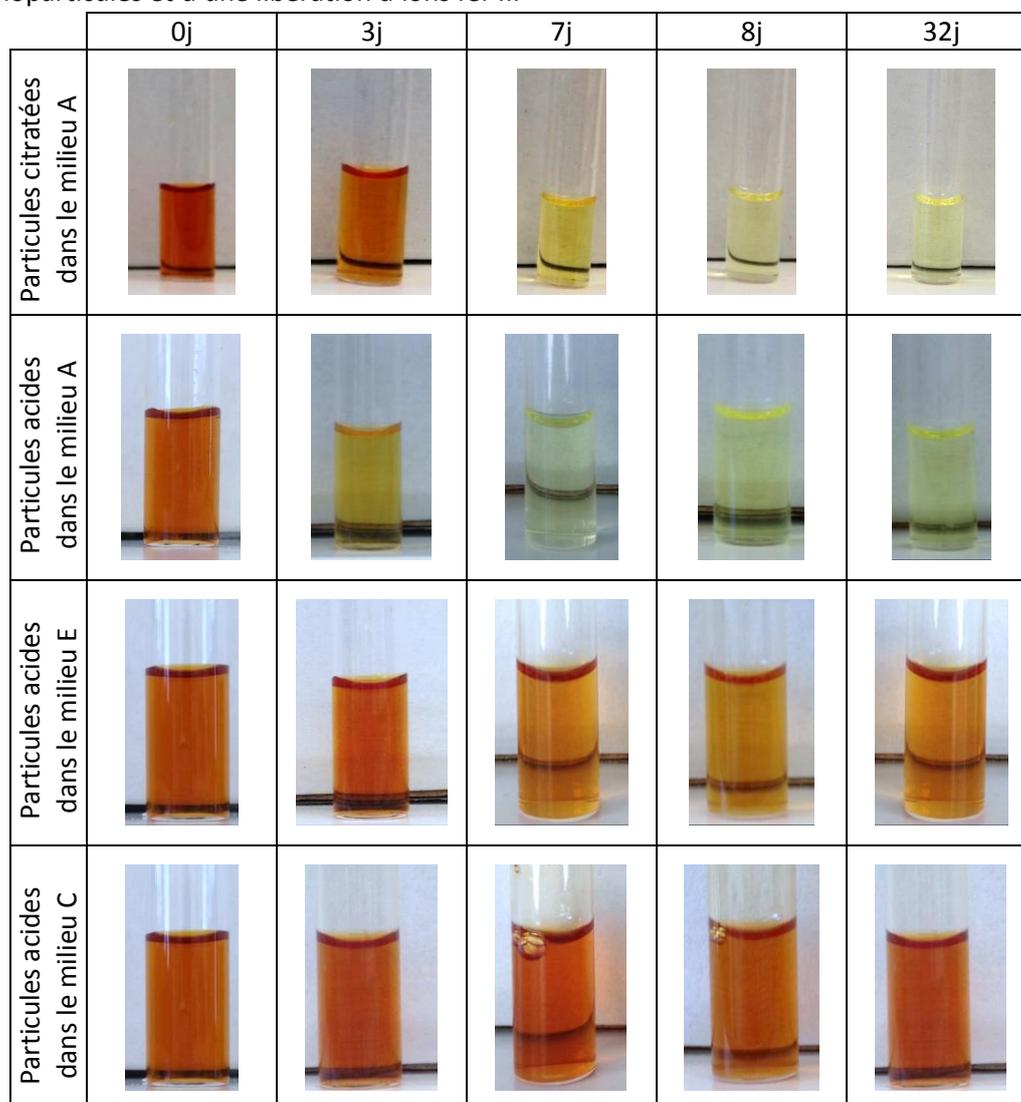


Figure 96 : Photographies des suspensions de maghémite dans différents milieux dégradants au cours du temps. Milieu A : beaucoup d’acide citrique (24,4 mM), milieu E : moyennement d’acide citrique (4,4 mM), milieu C : quasi-absence d’acide citrique ( $10^{-8}$  mM).

Dans le milieu E (pH = 4,8), on n'observe pas de décoloration totale de la suspension, même après 32 jours, mais seulement une décoloration partielle de la solution (Figure 96). La dégradation des nanoparticules n'est donc pas totale. Cela peut s'expliquer par la présence d'une quantité insuffisante d'acide citrique pour réduire la totalité du fer contenu dans les nanoparticules de maghémite. Enfin, aucun changement de couleur n'est observé, même après 32 jours, pour les nanoparticules placées dans le milieu C (pH = 6,9). L'acide citrique est donc responsable de la dégradation des nanoparticules de maghémite, et cette dégradation sera d'autant plus rapide que la quantité d'acide dans le milieu sera élevée.

L'évolution du pH des suspensions de nanoparticules acides et citratées au cours de la dégradation dans le milieu A a été mesurée. Nous nous sommes uniquement intéressés au milieu A car c'est celui qui présente le plus d'intérêt pour la suite de l'étude. Comme nous pouvons le remarquer sur la Figure 97a, le pH des suspensions n'évolue pas de manière significative au cours de la dégradation des nanoparticules de maghémite. Le maintien d'un pH explique également l'absence de précipitation du fer libéré sous forme d'hydroxyde.

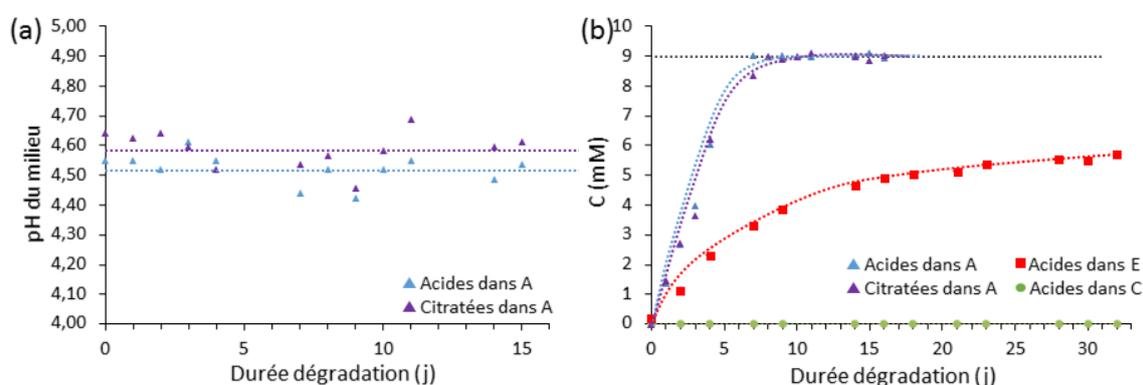


Figure 97 : Evolution du pH (a) et de la quantité de fer libre en solution (b) pour des nanoparticules de maghémite placées dans différents milieux. Milieu A : grande quantité d'acide citrique (24,4 mM) ; milieu E : quantité intermédiaire d'acide citrique (4,4 mM) ; milieu C : peu d'acide citrique ( $10^{-8}$  mM). Noir : quantité maximale de fer libérable. « Acides » et « Citratées » se réfèrent aux nanoparticules dites acides ou citratées respectivement.

Le fer libre présent en solution, issu de la dégradation des nanoparticules de maghémite, a été dosé par AAS (spectroscopie d'absorption atomique). Comme on peut le remarquer sur la Figure 97b, plus le milieu de dégradation est concentré en acide citrique, et plus la quantité de fer libre présent en solution augmente. Dans le milieu C, solution témoin à pH=7, la quantité de fer libre est nulle, ou trop faible pour être détectée par la méthode de dosage (Figure 97, vert). Il n'y a pas de fer libéré en solution et donc pas de dégradation des nanoparticules. Dans le milieu A, solution contenant le plus d'acide citrique, la concentration en fer libre est de 9 mM dès le 7<sup>ème</sup> jour de dégradation pour les particules acides (Figure 97, bleu) et le 8<sup>ème</sup> pour les particules citratées (violet). Ainsi, après 8 jours, la totalité des nanoparticules d'oxyde de fer est consommée. La complexation des particules par des ions citrates ne semble pas modifier significativement leur résistance à la dégradation. Dans le milieu E, la concentration en fer libre augmente progressivement, jusqu'à atteindre un plateau proche de 5 mM (Figure 97, rouge). Ce qui confirme l'hypothèse d'une dégradation partielle des nanoparticules de maghémite.

La taille des nanoparticules a alors été mesurée au cours du temps par DLS. La Figure 98 montre que la taille des particules de maghémite dans les milieux de dégradation E et C est plutôt constante au fil des jours. Une légère diminution du diamètre hydrodynamique des nanoparticules acides et citratées s'amorce dans le milieu A, avant que celui-ci ne s'annule brutalement au bout d'une dizaine de jours. Il n'y a alors plus de nanoparticules détectables.

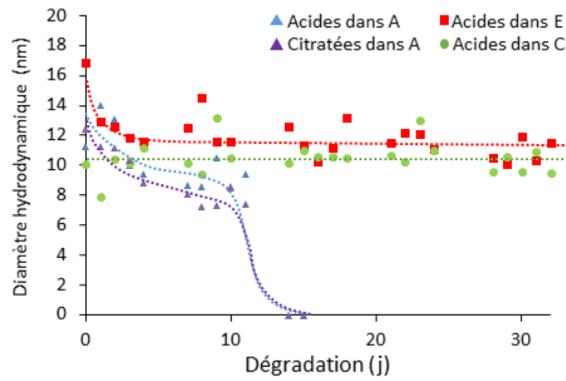


Figure 98 : Evolution du diamètre hydrodynamique (mesure en intensité) de nanoparticules de maghémite dans différents milieux de dégradation. Milieu A : grande quantité d'acide citrique (24,4 mM) ; milieu E : quantité intermédiaire d'acide citrique (4,4 mM) ; milieu C : peu d'acide citrique ( $10^{-8}$  mM).

Ensuite, la dégradation des nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  a été suivie par mesure de l'aimantation à saturation du milieu (mesure sur magnétomètre à échantillons vibrants). Comme nous le montre la Figure 99a, celle-ci n'évolue pas de manière significative dans le milieu C (pH proche de 7), alors qu'elle chute brutalement pour s'annuler dans le milieu A (pH = 4,55) pour les nanoparticules acides et citratées, et qu'elle se stabilise à une valeur non nulle dans le milieu E (pH = 4,8). L'absence de diminution significative d'aimantation dans le milieu C indique une absence de dégradation tandis que l'annulation de l'aimantation dans le milieu A indique une dégradation totale. L'évolution intermédiaire observée dans le milieu E indique une dégradation partielle des nanoparticules d'oxyde de fer.

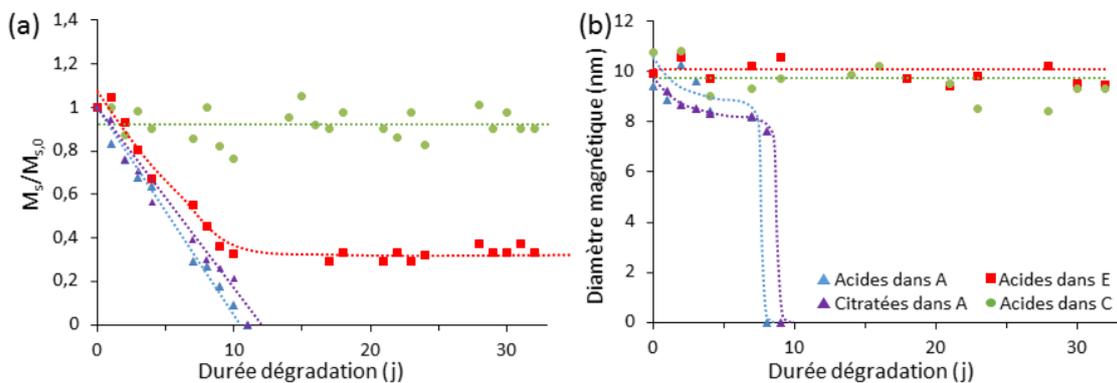


Figure 99 : Evolution de l'aimantation à saturation normalisée (a) et du diamètre magnétique (b) des nanoparticules de maghémite dans différents milieux de dégradation. Milieu A : grande quantité d'acide citrique (24,4 mM ; pH = 4,55) ; milieu E : quantité intermédiaire d'acide citrique (4,4 mM ; pH = 4,8) ; milieu C : peu d'acide citrique ( $10^{-8}$  mM ; pH = 6,9).

De plus, comme nous l'avons vu aux chapitres 1 et 2, les mesures d'aimantation peuvent également donner accès au diamètre magnétique des nanoparticules. Celui-ci est constant aux cours du temps dans les milieux de dégradation C et E, comme observé sur la Figure 99b, alors qu'il semblerait qu'il diminue légèrement au cours du temps pour les nanoparticules acides et citratées dans le milieu A, avant de chuter brutalement et de s'annuler au bout de 8j (particules acides) ou 9j (particules citratées).

### 2.2.2. Ou de façon originale par relaxométrie

#### 2.2.2.1. Principe de la méthode de suivi

Classiquement, le suivi de la dégradation des nanoparticules d'oxyde de fer magnétique se fait telle que présentée dans la partie précédente, et notamment par mesure de l'aimantation à saturation<sup>199,200,243</sup>. Or il est également possible de suivre les propriétés magnétiques de ces particules par relaxométrie. En effet, le temps de relaxation des protons de l'eau dépend de la concentration en particules magnétiques présentes, de leur nature et de leur taille, ainsi que de leur fonctionnalisation<sup>141,144,244</sup>. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir identifier le degré d'oxydation des ions fer libérés. En effet, des solutions de  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  à la même concentration ne possèdent pas le même temps de relaxation  $T_2$ <sup>245</sup>.

Nous nous sommes donc proposés de développer une nouvelle méthode originale pour le suivi de la dégradation des nanoparticules de maghémite en tampon lysosomal, en faisant appel à la relaxométrie. Pour ce faire, nous mesurons le temps de relaxation  $T_2$  des protons de l'eau (solvant de base des tampons citratés au sein desquels la dégradation est étudiée) au cours du temps. A partir de ces mesures, il est possible de déduire les valeurs de relaxivité réelle  $r_2$  et modifiée  $r_2'$ , qui se calculent ainsi :

$$r_2 = \frac{1}{[\text{Fe}]_{\text{totale}} T_2}$$

$$r_2' = \frac{1}{[\text{Fe}]_{\text{magnétique}} T_2}$$

Avec les définitions suivantes concernant les concentrations en fer. La concentration en fer initiale ainsi que le fer libre sont dosés par AAS :

$$[\text{Fe}]_{\text{totale}} = [\text{Fe}]_{\text{dans les particules de maghémite}} + [\text{Fe}]_{\text{libre}} = [\text{Fe}]_{\text{initiale}}$$

$$[\text{Fe}]_{\text{magnétique}} = [\text{Fe}]_{\text{dans les particules de maghémite}} = [\text{Fe}]_{\text{initiale}} - [\text{Fe}]_{\text{libre}}$$

Le temps de relaxation  $T_2$  dépend à la fois de la taille des nanoparticules et de la concentration en fer magnétique (au sein des particules de maghémite) dans le milieu. Ainsi, une augmentation de  $T_2$  est corrélée à une diminution de la concentration en fer magnétique, ou à une diminution parfois simultanée de la taille des nanoparticules<sup>140,142</sup>. L'évolution de  $T_2$  peut donc nous renseigner sur la possible dégradation des nanoparticules mais pas sur le mécanisme de celle-ci.

En effet, la dégradation peut se faire suivant deux types de mécanisme :

- Soit un mécanisme de type « tout ou rien » pour lequel la taille moyenne des nanoparticules ne varie pas : lorsqu'une particule est attaquée, elle est entièrement consommée, et la variation de taille n'est pas observable à l'échelle temporelle à laquelle les mesures sont effectuées.
- Soit un mécanisme de type « progressif » pour lequel toutes les nanoparticules présentes sont dégradées à la même vitesse, entraînant une diminution de la taille moyenne des nanoparticules.

Comme la concentration en fer totale ne varie pas au cours de la dégradation, la relaxivité réelle  $r_2$  est simplement inversement proportionnelle à  $T_2$  et ses variations ne nous apportent pas plus d'indications. En revanche, l'évolution de la relaxivité modifiée  $r_2'$  fournit des informations sur le type de mécanisme à l'œuvre. En effet, dans le cas d'un mécanisme de type « tout ou rien », elle reste

constante. Tandis que dans le cas d'un mécanisme de dégradation de type « progressif »,  $r_2'$  va augmenter au fur et à mesure que la dégradation avance.

### 2.2.2.2. Résultats obtenus

Afin de caractériser la dégradation des nanoparticules de maghémite par relaxométrie, nous nous sommes intéressés à l'influence de celle-ci sur le temps de relaxation  $T_2$  des protons de l'eau, et l'évolution de celui-ci au cours du temps dans les différents milieux A, E et C. Nous avons ensuite tracé l'évolution du temps de relaxation brut  $T_2$ , ainsi que celles de la relaxivité réelle  $r_2$  et modifiée  $r_2'$ , au cours de la dégradation. La relaxivité modifiée est calculée en considérant la concentration en fer magnétique encore présent en solution, à partir du dosage du fer libre (partie précédente page 125).

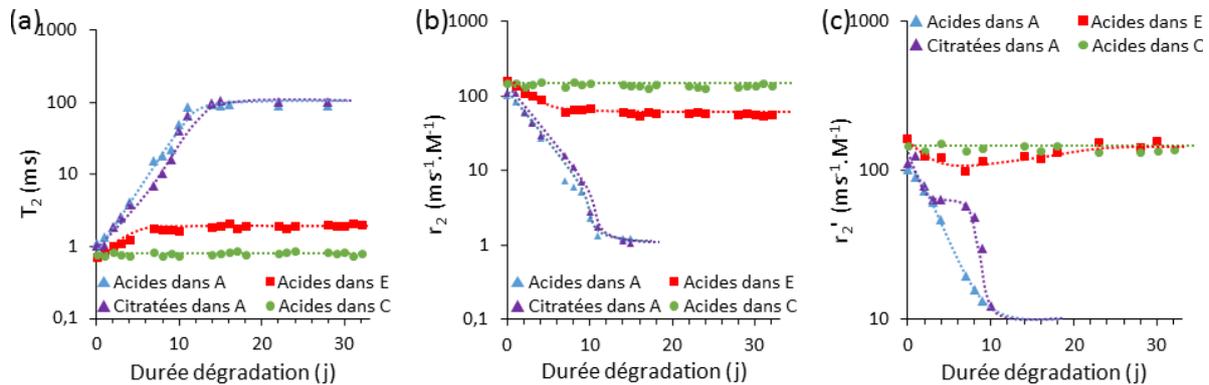


Figure 100 : Evolution de  $T_2$  (a),  $r_2$  (b) et  $r_2'$  (c) au cours du temps pour des suspensions de nanoparticules de maghémite dans différents milieux de dégradation. Milieu A : grande quantité d'acide citrique (24,4 mM) ; milieu E : quantité intermédiaire d'acide citrique (4,4 mM) ; milieu C : peu d'acide citrique ( $10^{-8}$  mM).

Le temps de relaxation transverse  $T_2$  dans le milieu A augmente fortement avant de se stabiliser aux alentours de 100 ms au bout de 14j, et ce pour les nanoparticules de maghémite acides et citratées (Figure 100a). Cette valeur est une valeur intermédiaire aux temps de relaxation mesurés pour des solutions de fer II et fer III à la concentration de 9 mM (245 ms et 10 ms respectivement pour  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ ). Nous considérons une concentration de 9 mM car c'est la concentration en fer initialement introduite au sein des milieux de dégradation : c'est donc la concentration en fer libre que nous devons avoir après dégradation totale des nanoparticules de maghémite dans le milieu A.

L'explication envisagée à cette valeur intermédiaire est la suivante : au cours de la dégradation, du fer II est libéré en solution. L'oxygène dissout dans le milieu peut alors oxyder celui-ci en fer III, ce qui induit une diminution du temps de relaxation  $T_2$  par rapport à celui d'une solution de fer II pur. Cependant, les tubes étant scellés au parafilm, la quantité d'oxygène présent au sein du milieu est limitée. Tout le fer II ne peut pas être transformé en fer III. La solution finale est alors un mélange d'ions  $\text{Fe}^{2+}$  et d'ions  $\text{Fe}^{3+}$ , à une concentration en fer totale de 9 mM, et possédant donc un temps de relaxation intermédiaire à ceux des ions purs en solution. La dégradation des nanoparticules de maghémite peut alors être considérée comme complète, une partie du fer II libéré au cours de la dégradation s'étant transformé en fer III sous action de l'oxygène dissout dans le milieu.

Par ailleurs, le temps de relaxation transverse augmente moins rapidement dans le milieu E avant de se stabiliser à une valeur inférieure à celle obtenue dans le milieu A, aux alentours de 2 ms. Il y a donc dégradation des nanoparticules dans ce milieu, mais dégradation seulement partielle. Enfin, dans le milieu C, le temps de relaxation transverse n'évolue pas de façon significative, indiquant une absence de dégradation.

De plus, la Figure 100b indique que la relaxivité réelle  $r_2$  diminue au cours de la dégradation dans les milieux A et E, alors qu'elle est constante dans le milieu C. Ce qui est cohérent avec l'évolution des temps de relaxation  $T_2$  dans les différents milieux et l'absence de variation de la concentration totale en fer. Si l'on veut prendre en compte les variations de concentration en fer magnétique, responsable du changement de vitesse de relaxation des protons de l'eau, il faut considérer la relaxivité modifiée,  $r_2'$ . Comme observé sur la Figure 100c, celle-ci est constante dans le milieu C, comme la relaxivité réelle  $r_2$ . Ce résultat est cohérent avec une absence de dégradation des nanoparticules de maghémite. Au contraire, dans le milieu A, cette relaxivité modifiée  $r_2'$  diminue fortement au cours de la dégradation. Cette évolution laisse supposer une dégradation de type progressif, au cours de laquelle toutes les particules sont consommées en même temps par l'acide citrique, et ce suffisamment lentement pour qu'une modification de leur taille influence le signal mesuré par relaxométrie<sup>246</sup>. En effet, si le mécanisme de dégradation était de type « tout ou rien »,  $r_2'$  resterait constant. Cette tendance observée, associée à l'évolution des diamètres hydrodynamiques et magnétiques des particules, nous permet de dire que la taille évolue au cours de la dégradation et que les nanoparticules sont dégradées petit à petit.

En conclusion, la concentration en acide citrique et donc le pH initial (4,55 ; 4,8 ou 6,9) du milieu ont une forte influence sur la dégradation des nanoparticules. A très faible concentration en citrate (autour de  $10^{-8}$  mM) à pH neutre, les nanoparticules de maghémite ne sont pas dégradées. L'augmentation de la concentration en acide citrique à pH acide va entraîner une accélération de la vitesse de dégradation des nanoparticules. A concentration en agent chélatant du fer équivalente à celle des lysosomes (24,4 mM), les nanoparticules de maghémite sont totalement dégradées au bout de 14 jours. C'est cette concentration qui va nous intéresser pour la suite.

Dans la suite de l'étude, l'expression particules nues fera référence à l'absence de polymère couplé à celles-ci et désignera par abus de langage les nanoparticules de maghémite acides (partie 2.3) ou citratées (partie 3).

### 2.3. Influence du polymère imprimé

Nous venons donc de voir que l'acide citrique, agent chélatant du fer, était capable de dégrader les nanoparticules de maghémite. Pour ce faire, il a besoin d'avoir accès à la surface des nanoparticules. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'influence du PEP sur la vitesse de dégradation du cœur d'oxydes de fer. Pour ce faire, nous avons placé dans le milieu A (pH = 4,55 ; [acide citrique] = 24,4 mM) des nanoparticules nues, ou alors hybrides possédant un polymère de différentes épaisseurs comportant des empreintes de GFP.

Les comportements de deux nano-objets hybrides différents ont été étudiés. Les objets les plus petits possèdent la plus petite composante organique (Tableau 12), et ont été considérés comme ayant le polymère le plus fin. Par la suite, les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  fluorescents seront appelés uniquement PEP f (fin) et PEP e (épais).

Dénomination	Diamètre (nm) (DLS)	Perte de masse (%) (ATG, 200-600°C)
Particule nues	13,9 ± 1,9	0%
PEP f	256 ± 45	20%
PEP e	494 ± 147	24%

Tableau 12 : Caractéristiques des différents nano-objets hybrides ayant des épaisseurs de polymère différentes.

La dégradation de la maghémite a été suivie en employant les méthodes suivantes : suivi visuel direct, dosage du fer libre en solution et mesure de temps de relaxation transverse, pour avoir accès à la relaxivité modifiée  $r_2'$ , ainsi que mesure du rayon hydrodynamique par DLS.

Les solutions de nanoparticules de maghémite recouvertes PEP-GFP étant fortement colorées, un premier suivi de la dégradation a de nouveau été fait par observation à l'œil nu de la couleur des suspensions. Comme les images de la Figure 101 le montre, le changement de couleur est bien plus rapide pour les nanoparticules nues que pour les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ . En effet, à 7 jours la décoloration est totale pour les nanoparticules nues tandis qu'il faut attendre 22 jours pour les hybrides au polymère fin, et 28 jours pour les hybrides au polymère épais, dans le même milieu de dégradation (pH = 4,55 ; [acide citrique] = 24,4 mM). La présence du polymère permet donc de ralentir la dégradation des oxydes de fer. Cependant, le polymère étant poreux, l'acide citrique finit par parvenir jusqu'aux nanoparticules magnétiques, induisant in fine leur dégradation, à l'origine du changement de couleur de la suspension.

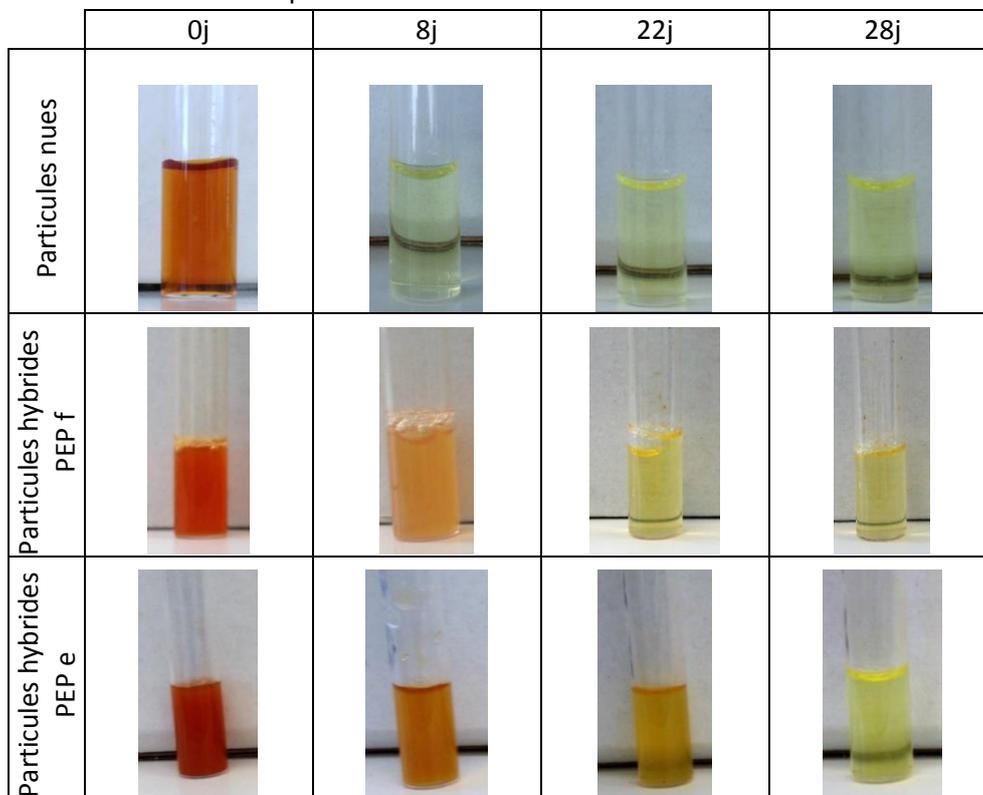


Figure 101 : Photographie des suspensions de nanoparticules nues et  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  au cours de la dégradation.

Le fer libre en solution, issu de la dégradation et séparé des particules en suspension par filtration, a été dosé par AAS. Sur la Figure 102a, on peut voir que la quantité de fer libre présent en solution augmente moins rapidement pour les nano-objets hybrides que pour les nanoparticules nues, atteignant le palier de fin de dégradation au bout de 14 jours environ pour les hybrides au polymère fin (turquoise) et 20 jours pour les hybrides au polymère épais (orange) contre 7 jours pour les nanoparticules nues (bleu). Ce qui confirme l'hypothèse formulée précédemment concernant une dégradation totale mais ralentie par la présence du polymère imprimé des nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .

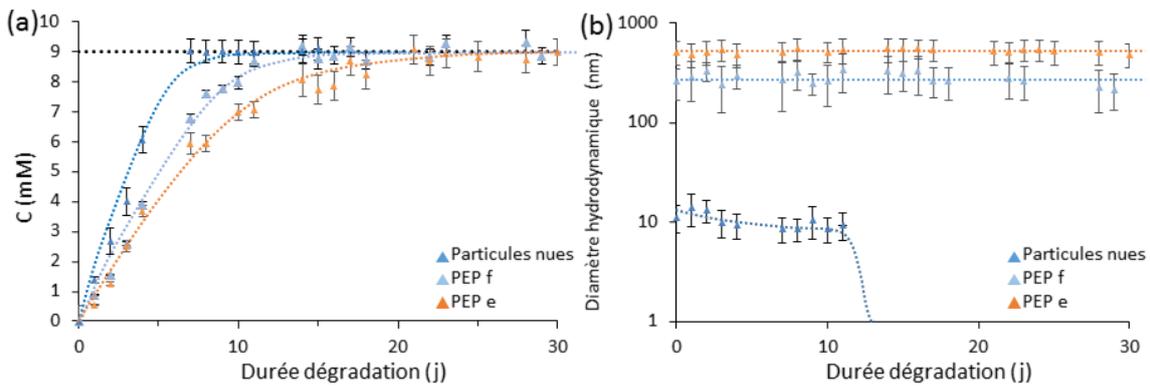


Figure 102 : Evolution au cours de la dégradation de la quantité de fer libre en solution (a) et du diamètre hydrodynamique (b) pour des nanoparticules de maghémite nues ou associées à un polymère à empreintes d'épaisseur variable (f : fin, e : épais). Noir : quantité maximale de fer libérable.

La Figure 102b montre que la taille des nano-objets hybrides reste constante au cours du temps. L'acide citrique seul n'induit pas de dégradation du polymère.

Comme on peut le voir sur la Figure 103a, les temps de relaxation  $T_2$  des suspensions de nanoparticules nues ou hybrides n'évoluent pas du tout de la même manière au cours de la dégradation. En effet, pour les nanoparticules nues,  $T_2$  ne fait qu'augmenter avant de se stabiliser aux alentours de 100 ms au bout de 14 jours. Tandis que pour les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ , le temps  $T_2$  commence par diminuer puis cette tendance va s'inverser et  $T_2$  va augmenter avant de se stabiliser, au bout de 18 jours pour le PEP f et de 25 jours pour le PEP e. Le fait d'obtenir, dans tous les cas, un plateau pour des valeurs de  $T_2$  très similaires nous laisse penser que l'évolution du temps de relaxation présentée ici confirme la dégradation des nanoparticules de maghémite, déjà supportée par les observations directes et les dosages de la quantité de fer libre effectués. Nous avons cependant cherché à comprendre un peu plus en détails les phénomènes à l'origine de la différence d'allure des courbes d'évolution de  $T_2$  au cours de la dégradation.

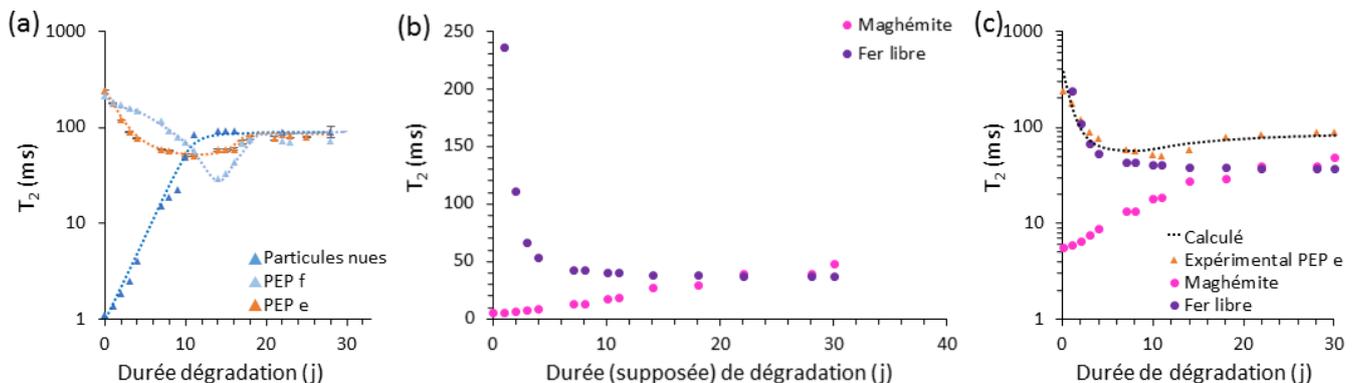


Figure 103 : Evolution de  $T_2$  au cours du temps. (a) Suspensions de nanoparticules de maghémite nues ou associées à un polymère à empreintes. (b) Solutions d'ions  $\text{Fe}^{2+}$  ou de nanoparticules de maghémite dont on fait varier la concentration au cours du temps afin de mimer la dégradation des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ . (c) Modélisation de l'évolution de  $T_2$  et comparaison avec les données expérimentales.

Au cours de la dégradation, les solutions étudiées par relaxométrie contiennent à la fois des nanoparticules de maghémite, et donc du fer dit magnétique, et des ions ferreux (et ferriques). La concentration en fer magnétique diminue au fur et à mesure que les particules sont dégradées, tandis que la concentration en ions libres augmente. Afin de mieux appréhender l'influence de ces deux phénomènes sur l'évolution du temps de relaxation  $T_2$ , nous avons réalisé les deux expériences suivantes :

- Un premier tube contient du milieu de dégradation A (pH = 4,55) auquel des ions Fe<sup>2+</sup> sont ajoutés graduellement de façon à avoir, chaque jour de dégradation supposée, une concentration totale équivalente à la concentration en fer libre mesurée par AAS. Comme on peut le voir sur la Figure 103b en violet, T<sub>2</sub> diminue lorsque la quantité de fer libre augmente, et donc lorsque l'on avance dans la dégradation.
- Dans un second tube, nous avons préparé une solution de nanoparticules de maghémite (pour une concentration en fer de 9 mM) dans le milieu A. Cette solution est diluée chaque jour afin d'obtenir une concentration en fer magnétique (i.e. en fer encore présent au sein des nanoparticules) équivalente à celle déduite des dosages AAS, avant de mesurer le temps de relaxation T<sub>2</sub>. Ceci permet de modéliser très simplement l'influence du fer magnétique sur le temps de relaxation. Comme on peut le voir sur la Figure 103b en fuchsia, T<sub>2</sub> augmente lorsque la quantité de fer magnétique diminue, et donc lorsque l'on avance dans la dégradation.

Au vu de ces deux expériences nous pouvons en conclure que la libération d'ions Fe<sup>2+</sup> va induire une diminution de T<sub>2</sub>. C'est l'effet dominant au début de la dégradation. Tandis que la diminution de la quantité de fer magnétique dans les nanoparticules de maghémite va induire une augmentation de celui-ci, et sera l'effet prédominant les derniers jours de dégradation. On propose alors le phénomène suivant pour expliquer l'évolution du temps de relaxation des suspensions de nano-objets hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-GFP :

- Aux premiers jours de la dégradation, les nanoparticules de maghémite sont emprisonnées au sein du polymère, qui agit comme une couche isolante vis-à-vis de l'eau extérieure. Ce sont alors les ions ferreux libérés au cours de la dégradation (et les ions ferriques résultants), libres de diffuser où bon leur semble, qui domineront l'évolution de T<sub>2</sub>.
- Puis les nanoparticules de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> deviennent suffisamment petites pour diffuser au sein du polymère, très poreux rappelons-le car il laisse diffuser des protéines. Ces particules peuvent alors sortir du PEP et se retrouvent en solution. On se rapproche alors d'un système contenant simplement des nanoparticules nues en cours de dégradation avec un T<sub>2</sub> qui augmente avant de se stabiliser une fois toutes les particules consommées.
- La transition entre les deux régimes est beaucoup plus franche pour les nano-objets hybrides PEP f que pour les PEP e. Cela peut s'expliquer par l'épaisseur des polymères. Dans le premier cas, le polymère est relativement fin : les nanoparticules peuvent le traverser rapidement et toutes d'un coup. Tandis que dans le cas d'un polymère plus épais, les particules de maghémite les plus proches du bord du polymère atteignent le milieu extérieur avant les autres. La libération est plus progressive, de même que le changement de régime.

Intéressons-nous maintenant à l'évolution des relaxivités réelle  $r_2$  et modifiée  $r_2'$ . La relaxivité réelle  $r_2$  (Figure 104a) prenant en compte la concentration totale en fer, libre ou magnétique au sein des nanoparticules de maghémite, est inversement proportionnelle au temps de relaxation transverse T<sub>2</sub>, ce qui explique son évolution au cours du temps. Nous pouvons ensuite observer Figure 104b que la relaxivité modifiée  $r_2'$  des nano-objets hybrides augmente durant les 15 premiers jours avant de se stabiliser, à une valeur près de dix fois supérieure à la valeur initiale. Il semblerait donc que cette fois encore le mécanisme de dégradation corresponde plutôt à une situation dans laquelle plusieurs particules sont attaquées en même temps, entraînant une diminution de leur taille. Cela se comprend d'autant plus ici que l'accès aux particules est rendu difficile par le polymère. Seules quelques molécules d'acide citrique peuvent avoir simultanément accès à une particule, ce qui réduit la vitesse de dégradation, et laisse le temps de percevoir une évolution de la taille de la maghémite.

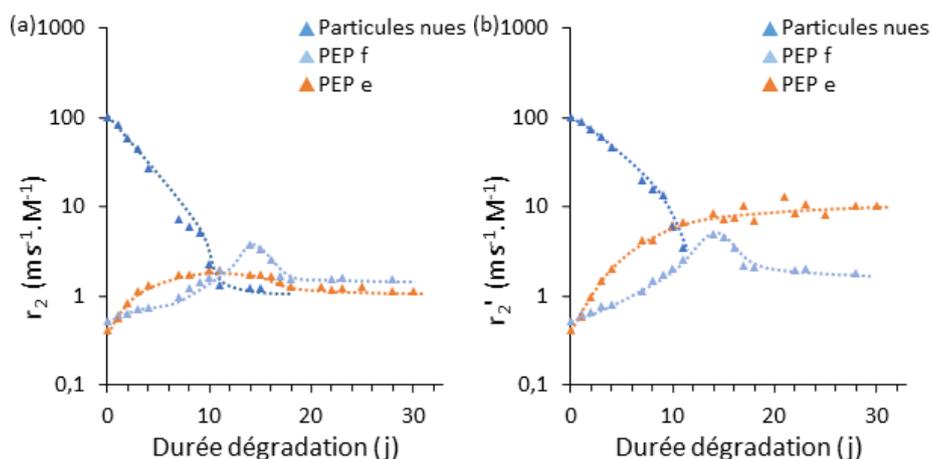


Figure 104 : Evolution de  $r_2$  (a) et  $r_2'$  (b) au cours du temps pour des suspensions de nanoparticules de maghémite nues (bleu) ou associées à un polymère à empreintes de protéines (turquoise : fin et orange : épais).

En conclusion, le polymère a une forte influence sur la dégradation des nanoparticules. La couche polymère présente à la surface des nanoparticules isole le cœur maghémite du milieu de dégradation et de l'acide citrique environnant. Plus le polymère sera épais et plus cet effet sera important, se traduisant par une dégradation plus lente. Cependant, cette couche étant poreuse, l'acide citrique finit par pénétrer dans le polymère et atteindre le cœur, induisant tout de même une dégradation totale des nanoparticules de maghémite.

#### 2.4. Influence de l'enzyme

Comme nous venons de le voir, la présence d'un polymère permet d'isoler le cœur de maghémite en présence d'acide citrique dans le milieu de dégradation. Cependant, nous savons qu'il existe des enzymes hydrolases dans les lysosomes, lieu de dégradation intracellulaire des oxydes de fer. Ces enzymes sont susceptibles de dégrader le polymère et c'est pourquoi nous nous intéressons maintenant à leur influence sur la dégradation des hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ .

Pour ce faire, nous avons placé des nanoparticules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  dans des milieux de dégradation contenant différentes enzymes, pouvant être présentes au sein des lysosomes telles que le pronase et la glucosidase. Les particules étudiées ici sont celles présentant la couche polymère la plus épaisse (Tableau 12) et pour lesquelles l'effet du polymère sur la dégradation des nanoparticules de maghémite était le plus marqué. Les différentes enzymes étudiées sont le lysozyme (milieu B), le pronase (milieu F) et une glucosidase (milieu G). Les résultats obtenus en absence d'enzyme (milieu A), déjà présentés en partie 2.4 sont rappelés ici à titre de comparaison. Les milieux de dégradation sont décrits plus en détails à la partie 2.1 du présent chapitre.

Comme le montre les images ci-dessous (Figure 105), la décoloration des suspensions est plus rapide dans le milieu G que dans le milieu A. Ainsi, la présence de glucosidase accélère la dégradation des nanoparticules de maghémite, probablement en dégradant le polymère. La décoloration apparaît également plus rapide dans le milieu F que dans le milieu A, même si cette différence est moins flagrante qu'avec le milieu G. Au contraire, la décoloration des suspensions est ralentie en présence de lysozyme (milieu B) comparativement à l'absence d'enzyme (milieu A), comme si celle-ci empêchait l'acide citrique d'accéder aux nanoparticules d'oxyde de fer magnétique.

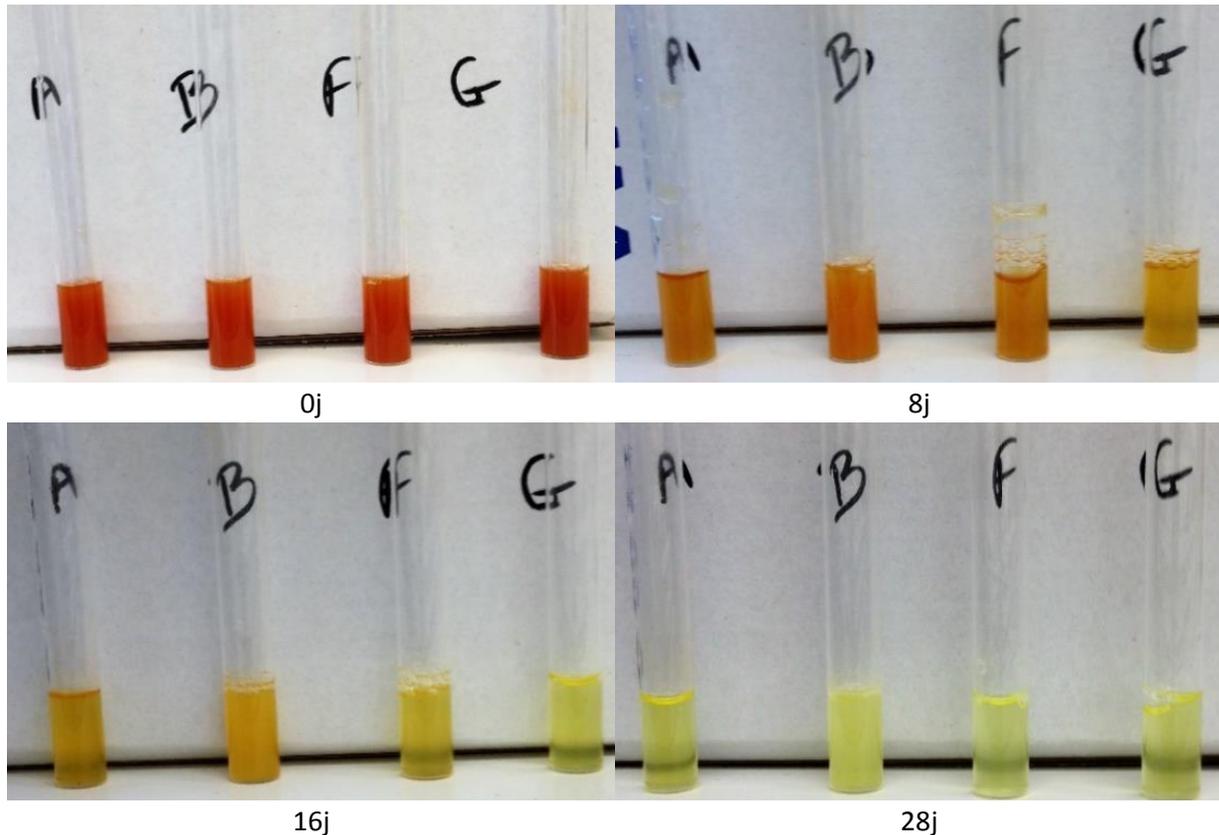


Figure 105 : Photographie des suspensions de nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  dans des milieux de dégradation contenant différentes enzymes au cours du temps. A : absence d'enzyme, B : lysozyme, F : pronase, G : glucosidase.

Afin d'infirmer ou confirmer l'hypothèse formulée ci-dessus sur les vitesses de dégradation relatives des nano-objets hybrides en fonction de l'enzyme présente dans le milieu, le fer libre en solution, a été dosé par AAS. Comme observable sur la Figure 106a, la quantité de fer libre présent en solution augmente au cours du temps avant d'atteindre un plateau. Celui-ci est atteint plus ou moins vite en fonction de la nature de l'enzyme. En présence de glucosidase, la quantité de fer libre évolue plus rapidement que pour les nano-objets en absence d'enzyme. Cependant, en présence de lysozyme ou de pronase, cette dégradation est ralentie. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène est la suivante. La glucosidase, en tant qu'enzyme hydrolase, va cliver le polymère et ainsi libérer l'accès à la surface des nanoparticules de maghémite. Tandis que le pronase, n'étant pas une enzyme hydrolase, et le lysozyme, ne se trouvant pas à son pH d'action optimal, n'auront pas d'effet dégradant sur le polymère. Ils peuvent cependant induire une obstruction partielle de la porosité du PEP, augmentant la difficulté pour l'acide citrique d'accéder aux nanoparticules d'oxyde de fer magnétique.

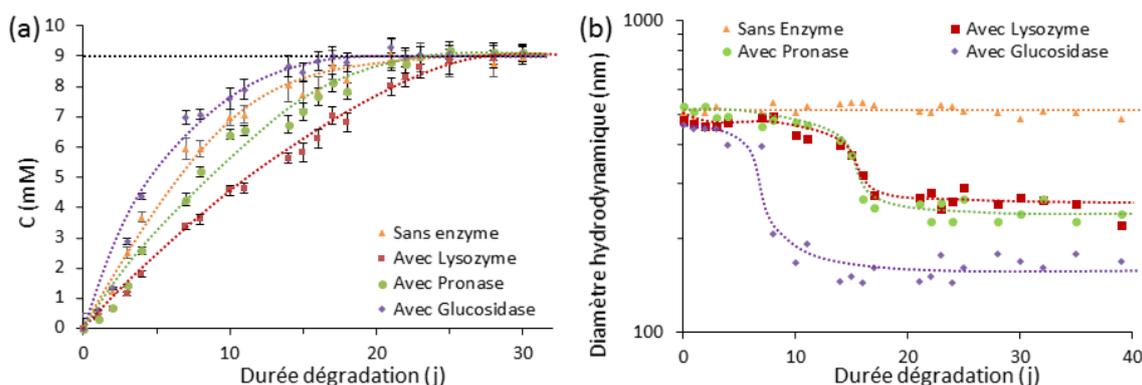


Figure 106 : Evolution au cours du temps de la quantité de fer libre en solution (a) et du diamètre hydrodynamique (b) pour des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  en présence de différentes enzymes. Noir : quantité maximale de fer libérable.

Ensuite, le diamètre des nanoparticules hybrides a été mesuré par DLS. La Figure 106b montre que la présence d'enzymes dans le milieu de dégradation entraîne une diminution de la taille des nano-objets hybrides, de manière plus ou moins rapide en fonction de la nature de l'enzyme. En effet, la diminution de taille est significative dès le 9<sup>ème</sup> jour de dégradation en présence de glucosidase, alors qu'il faut attendre le 15<sup>ème</sup> jour pour que cet effet soit clairement observable en présence de lysozyme ou de pronase. Cette diminution de la taille peut être due à un clivage du polyacrylamide, mais elle peut également être un artefact de mesure.

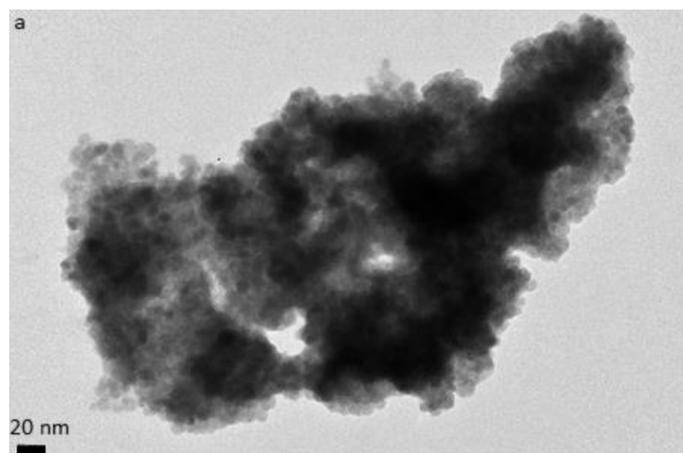
En effet, les distributions de taille mesurée par DLS sont monomodales mais très larges. Elles peuvent moyenniser les effets, et donc les distributions de tailles, dus :

- Aux nano-objets hybrides en cours de dégradation, ayant gardé leur diamètre initial ou dont le polymère a été clivé
- A des agrégats de nanoparticules libérés du polymère au cours de leur dégradation
- A des petits morceaux de polymère, détachés par l'action des enzymes.

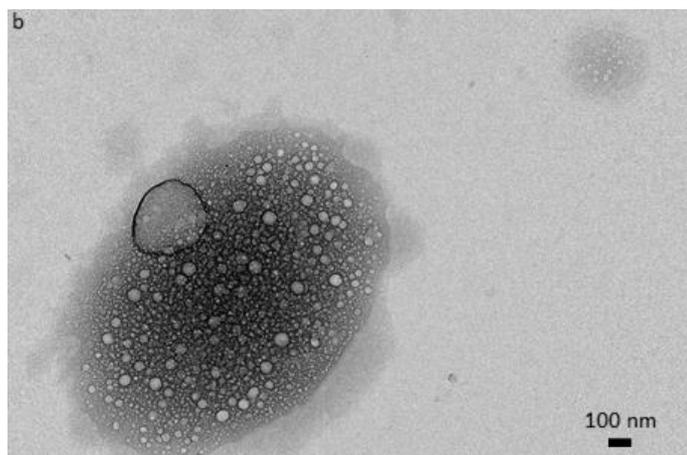
La seule évolution des diamètres hydrodynamiques des nano-objets hybrides ne permet donc pas de conclure sur une éventuelle dégradation du polymère sous l'action des enzymes présentes dans le milieu.

Afin de confirmer la découpe du polymère par les enzymes, les nano-objets hybrides ont été observés en MET avant et après dégradation dans les milieux ne contenant pas d'enzyme ou alors contenant de la glucosidase (Figure 107). Les grilles de microscopie étant en carbone, nous avons cherché à améliorer le contraste du polymère, en employant un colorant commercial, nommé Uranyless (Delta Microscopie), suivant le protocole décrit sur le site du fournisseur<sup>247</sup>.

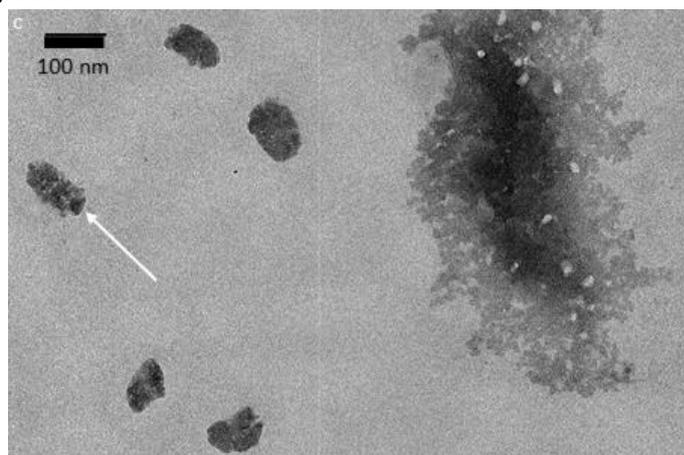
Avant dégradation, les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  ont une taille moyenne de 430 nm (Figure 107a), ce qui est cohérent avec le diamètre hydrodynamique mesuré de 494 nm. Après dégradation dans le milieu A, en absence d'enzyme, on observe des particules de polymère d'environ 500 nm, ce qui est cohérent avec les diamètres hydrodynamiques mesurés (Figure 107b). Cela conforte le fait que l'acide citrique et les citrates ne peuvent induire une dégradation du polymère. On observe également sur les clichés de microscopie des trous au sein du polymère, de diamètre proche de 10 nm. Il peut s'agir des cavités laissées par les nanoparticules de maghémite après leur dégradation par l'acide citrique.



Avant dégradation



Après dégradation dans A (absence d'enzyme)



Après dégradation dans G (présence de glucosidase)

**Figure 107 : Images MET des particules avant (a) et après dégradation dans différents milieux, contenant (c) ou non (b) une enzyme.**

Après dégradation dans le milieu G, en présence de glucosidase, on peut observer deux familles de particules polymère de tailles distinctes (Figure 107c). D'une part, nous pouvons voir de nombreuses petites particules de taille variant entre 100 nm et 150 nm (flèche sur la Figure 107c). D'autre part, des grosses particules de taille proche de 700 nm sont également observables, en quantité bien plus faible. Ainsi, la glucosidase est susceptible de cliver le polymère, et l'évolution du diamètre hydrodynamique moyen mesuré par DLS (Figure 106b) rend compte de cette dégradation du PEP. La MET permet de confirmer la disparition des nanoparticules de maghémite, et la possible dégradation du polymère par la glucosidase.

Nous nous sommes également intéressés à l'influence de la dégradation des nanoparticules sur le temps de relaxation  $T_2$  des protons de l'eau, et l'évolution de celui-ci au cours du temps en présence des différentes enzymes. Afin de s'affranchir des différences éventuelles dans les quantités initiales de fer magnétique présent, et des modifications du temps de relaxation dues à la présence de celles-ci, nous allons nous concentrer sur les valeurs de relaxivité modifiée, en plus du temps de relaxation transverse  $T_2$ . Les valeurs de  $r_2'$  sont calculées à partir de la quantité de fer magnétique encore présent en solution, déduite des dosages présentés Figure 106.

La Figure 108a nous montre que le temps de relaxation  $T_2$  des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  évolue de la même manière dans les différents milieux de dégradation, mais suivant des vitesses différentes. Le temps de relaxation  $T_2$  diminue, se stabilise plus ou moins longtemps à sa valeur minimale avant d'augmenter de nouveau et d'atteindre un plateau aux alentours de 100 ms. D'après

les résultats de la section 2.2 du présent chapitre, la diminution de  $T_2$  signifie que la dégradation des nanoparticules a bien lieu. L'évolution du temps de relaxation transverse peut être interprétée comme précédemment en l'absence d'enzymes. Au début de la dégradation, les particules de maghémite sont au sein du polymère. Celui-ci les isole, au moins en partie, du milieu extérieur, et l'évolution du temps de relaxation est surtout liée aux ions fer (II ou III) présents dans le milieu. Une fois la dégradation suffisamment avancée, les nanoparticules de maghémite deviennent suffisamment petites pour diffuser au sein du polymère et s'en libérer. On se retrouve dans une situation similaire à celle que l'on avait pour les nanoparticules nues, et l'évolution du temps de relaxation est alors principalement liée à la dégradation de ces particules d'oxyde de fer. Si l'on s'intéresse maintenant de plus près à l'influence de chacune des enzymes, on peut remarquer que  $T_2$  atteint son plateau plus lentement en présence de lysozyme qu'en absence d'enzyme, ou qu'en présence de pronase ou de glucosidase. On peut donc supposer que la présence de glucosidase ou de pronase facilite la dégradation de la maghémite, au contraire du lysozyme, même si la dégradation des nanoparticules reste totale en leur présence.

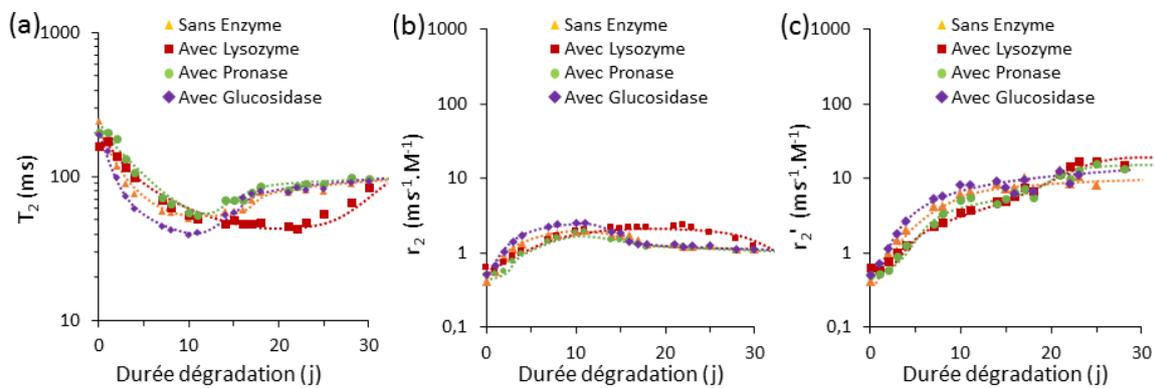


Figure 108 : Evolution de  $T_2$  (a),  $r_2$  (b) et  $r_2'$  (c) au cours du temps pour des suspensions de nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  en présence de différentes enzymes.

La présence d'enzymes dans le milieu de dégradation ne modifie pas l'allure de l'évolution de la relativité  $r_2$ . Celle-ci va augmenter plus ou moins fortement avant de redescendre et de se stabiliser aux alentours de  $1,1 \text{ M}^{-1}.\text{ms}^{-1}$  (Figure 108b). Cette évolution de  $r_2$  est cohérente avec celle de  $T_2$  car l'on considère ici la concentration totale en fer, qu'il soit libre en solution ou encore présent sous forme de fer magnétique au sein des nanoparticules de maghémite. Cette concentration est donc constante et l'évolution de  $r_2$  est inversement proportionnelle à celle de  $T_2$ .

Si l'on regarde maintenant l'évolution de la relaxivité modifiée  $r_2'$  des nano-objets, nous pouvons voir Figure 108c qu'elle augmente plus ou moins rapidement en fonction de la nature de l'enzyme présente dans le milieu de dégradation, avant d'atteindre un plateau. L'évolution perceptible des valeurs de  $r_2'$  au cours du temps confirme l'hypothèse formulée d'un mécanisme de dégradation permettant de percevoir une évolution de la taille des nanoparticules. En effet, si le mécanisme de dégradation était de type « tout ou rien »,  $r_2'$  serait constant. L'augmentation de  $r_2'$  traduit donc un mécanisme de dégradation « progressif » pour lequel toutes les nanoparticules présentes sont dégradées à la même vitesse, entraînant une diminution de leur taille moyenne.

En conclusion, la présence d'enzymes dans le milieu de dégradation peut modifier celle-ci. De manière générale, certaines enzymes peuvent cliver le polymère, comme nous avons pu l'observer lors des mesures DLS, facilitant l'accès de l'acide citrique aux nanoparticules de maghémite.

### 3. Etude de la dégradation et de la toxicité en amas cellulaire

Les études précédentes, réalisées *in vitro*, nous ont permis d'avoir une idée du mécanisme et surtout de la cinétique de dégradation des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ . Nous cherchons maintenant à comprendre la dégradation de ces objets en amas cellulaires. Pour ce faire, les particules hybrides dénotées PEP f dans la partie précédente ainsi que des nanoparticules citratées (appelées nues pas abus de langage et par référence à l'absence de polymère) ont été incubées avec des cellules souches mésenchymateuse humaines, puis leur dégradation a été suivie au cours du temps.

Lors de l'étude en tampon lysosomal, nous n'avions pas observé de variations significatives dans les vitesses de dégradation des particules de maghémite acides et citratées. Ainsi, les nanoparticules citratées peuvent servir de contrôle lors de l'étude de la dégradation des objets hybrides en amas cellulaires, bien que ceux-ci aient été synthétisés à partir des nanoparticules acides. De plus, nous avons fait le choix de travailler avec l'objet hybride PEP f car il possède une couche de polymère suffisamment épaisse pour ralentir la dégradation des nanoparticules de maghémite tout en étant assez petit pour être stable en solution le temps d'éviter la formation d'agrégats avant internalisation par les cellules.

Les résultats présentés ici ont été obtenus en collaboration avec Claire Wilhelm et Alberto Curcio, du laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC), de l'Université Paris Diderot, qui ont cultivé les cellules, formé les sphéroïdes et effectué les études préliminaires sur les interactions particule-cellule.

#### 3.1. Sphéroïdes de cellules souches mésenchymateuse humaines

##### 3.1.1. Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules non encore différenciées présentes dans certains tissus de l'organisme adulte, tels que la moelle osseuse<sup>248</sup>, les tissus adipeux<sup>249</sup>, le sang du cordon ombilical<sup>250</sup> ou dans le fluide amniotique<sup>251</sup>. Ces cellules sont par la suite capables de se différencier en cellules osseuses (ostéoblastes), cartilagineuses (chondrocytes), ou adipeuses<sup>252-254</sup>. Isolées à la fin des années 1960 par Friedenstein<sup>255</sup>, les cellules souches mésenchymateuses font depuis l'objet d'études intensives, afin de déterminer *in vitro* les mécanismes de leur différenciation, et de développer des thérapies personnalisées, par exemple pour des pathologies ayant entraîné la perte d'une grande masse osseuse<sup>256,257</sup>. Lorsque l'on observe ces cellules en microscopie optique, on peut remarquer qu'elles sont très fines et allongées<sup>249</sup>.

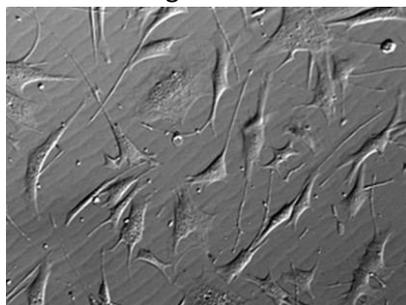


Figure 109 : Cellules souches mésenchymateuses humaines. Grossissement x40.

### 3.1.2. Intérêt de travailler avec des sphéroïdes de cellules

La dégradation des nanoparticules magnétiques est le plus souvent étudiée dans des milieux trop simples ou trop complexes. Il faut alors envisager un nouveau modèle biologique intermédiaire. Récemment, de plus en plus de groupes ont proposé de complexifier les études *in vitro* en étudiant certains phénomènes non plus sur cellules uniques mais sur amas cellulaires, ou sphéroïdes. Formé suivant un mécanisme proche de la différenciation chondrogénique, des sphéroïdes sont composés d'environ 200.000 cellules ayant au préalable été incubées avec les nanoparticules dont on souhaite étudier la dégradation. Un tel système permet l'étude de la dégradation en temps réel de nanoparticules à l'échelle de la cellule de façon quantitative et sur le long terme<sup>243</sup>.

Les avantages des sphéroïdes sont les suivants. Une fois ceux-ci formés, les cellules arrêtent de se reproduire et commencent à produire une matrice extracellulaire riche en collagène et en fibronectine. Les cellules seront ainsi proches de leur état dans les tissus, en contact entre elles et en présence de matrice extracellulaire. Cette dernière va également permettre leur survie jusqu'à deux mois et donc la réalisation d'études sur le long terme. Enfin, le système considéré est un système fermé. Les cellules ne pouvant pas se reproduire, il n'y aura pas de variations de leur nombre au cours du temps. Les mesures effectuées seront alors quantitatives, et les variations des signaux observées dues uniquement à la dégradation des nanoparticules et non pas aux cellules elles-mêmes.

## 3.2. Etudes préliminaires sur les interactions particules - cellules

### 3.2.1. Entrée des particules dans les cellules

Des premiers tests ont été effectués par Claire Wilhelm et Alberto Curcio au laboratoire MSC (Paris Diderot). Ils ont pour ce faire dilué les nano-objets hybrides dans un milieu de culture cellulaire très largement employé lors de l'incubation de nanoparticules de maghémite, le RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium), à différentes concentrations allant de 0,05 à 1 mM en fer. Les particules ont été incubées avec des cellules souches mésenchymateuses durant 4h puis ces dernières ont été lavées afin d'éliminer les particules non internalisées mais fixées sur la membrane plasmique externe, avant d'être observées par microscopie optique et analysées par magnétophorèse pour déterminer la quantité de fer magnétique au sein de chaque cellule.

Après 4h d'incubation, une partie des cellules incubées avec les particules hybrides aux concentrations 0,5 mM et 1 mM sont mortes, contrairement à ce qui a été obtenu pour les nanoparticules de maghémite citratées. A ces deux concentrations avec ce temps d'incubation, les nano-objets hybrides sont fortement toxiques pour les cellules. Cependant, les concentrations inférieures (de 0,05 mM à 0,25 mM) n'ont engendré aucune mort cellulaire visible. On se focalisera donc sur des concentrations appartenant à cette gamme pour la suite de notre étude.

Les mesures de la charge en fer des cellules par magnétophorèse ont démontré une bonne internalisation des nano-objets. En effet, comme on peut le voir sur la Figure 110, la masse de fer magnétique par cellule augmente avec la concentration initiale en fer présente au début de l'incubation. La Figure 110 nous indique également que les nanoparticules hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  pénètrent au sein des cellules aussi bien que les nanoparticules citratées de maghémite, car il n'y a pas de différences significatives de la charge en fer des cellules dans les deux cas. Enfin, on peut remarquer

la quantité élevée de fer présente au sein des cellules après incubation, trop importante pour pouvoir ensuite suivre la dégradation des oxydes de fer. En effet, pour ce faire, il faut usuellement des quantités de fer comprises entre 2 et 10 pg par cellule, selon une étude préliminaire menée par Claire Wilhelm (résultats non publiés).

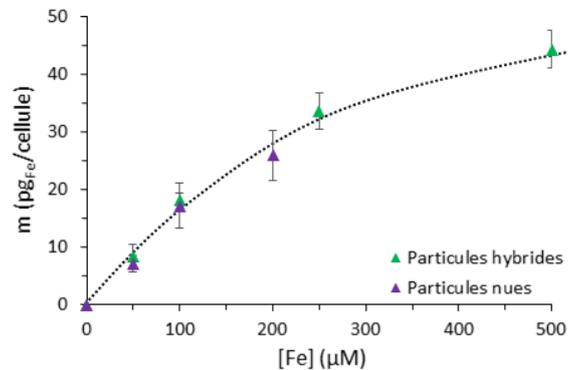


Figure 110 : Evolution de la charge en fer par cellule en fonction de la concentration initiale en fer ayant été incubée.

Ainsi, les études préliminaires ont permis d'arriver à trois conclusions :

- Les concentrations en fer allant de 0,05 mM à 0,25 mM pour les particules hybrides ne présentent pas de toxicité aigüe.
- Les particules hybrides pénètrent à l'intérieur des cellules aussi facilement que les nanoparticules citratées.
- 4h d'incubation conduit à l'obtention d'une charge en fer beaucoup trop importante.

Au vu de ces résultats, il a été décidé que pour l'étude de la dégradation, les particules (hybrides ou citratées pour le contrôle) seraient incubées uniquement 30 minutes avec les cellules, et que trois concentrations seraient étudiées : 0,05 mM, 0,1 mM et 0,2 mM.

### 3.2.2. Cytotoxicité des nano-objets hybrides et test de viabilité cellulaire

La cytotoxicité des nanoparticules de maghémite, recouvertes ou non de polymère à empreintes de protéines, ainsi que du polyacrylamide sous forme de nanoparticules, a été déterminée par mesure du signal de fluorescence émis par la résorufine, après formation de celle-ci au sein des mitochondries des cellules viables. Ces résultats ont été obtenus par Alberto Curcio. La Figure 111 présente l'activité métabolique résiduelle de cellules ayant été en contact avec les différents objets étudiés et suivant différentes conditions expérimentales :

- La nature des cellules en contact avec les nano-objets (cellules souches mésenchymateuses ou PC3 : cellules cancéreuses human prostate adenocarcinoma)
- La durée d'incubation des nano-objets (30 min ou 2h)
- La concentration des nano-objets dans le milieu de culture ( $C_a$  : 0,05 mM en fer ou 6,1 mg/mL en polymère ;  $C_b$  : 0,1 mM en fer ou 12,2 mg/mL en polymère ;  $C_c$  : 0,2 mM en fer ou 24,4 mg/mL en polymère)

Dans un premier temps, nous cherchons à déterminer l'influence des concentrations initiales, des temps d'incubation, et des lignées cellulaires employées sur la toxicité des différentes particules. La première observation que l'on peut faire en regardant la Figure 111, c'est que quelle que soit la concentration initiale en particules ou le temps d'incubation de celles-ci, la perte d'activité métabolique est plus faible pour les cellules cancéreuses de type PC3 (colonne de droite) que pour les cellules souches mésenchymateuses (colonne de gauche). Les cellules cancéreuses sont plus résistantes aux agressions extérieures que les cellules souches. La deuxième observation à faire, c'est qu'à lignée cellulaire et temps d'incubation identique, l'activité métabolique des cellules diminue

lorsque la concentration initiale en particules augmente. Comme attendu, la toxicité des différentes particules dépend de leur concentration, et sera d'autant plus élevée que la concentration est forte. Il en va de même pour la durée d'incubation des particules. Lorsque celle-ci dure plus longtemps, les cellules vont en internaliser plus, ce qui peut expliquer une augmentation de leur toxicité. Ici, ce n'est pas la nature des particules qui est influente mais plus leur concentration. Il est intéressant de remarquer que pour les particules à la concentration  $C_a$ , varier le temps d'incubation ne semble pas avoir d'effet sur l'activité métabolique des cellules.

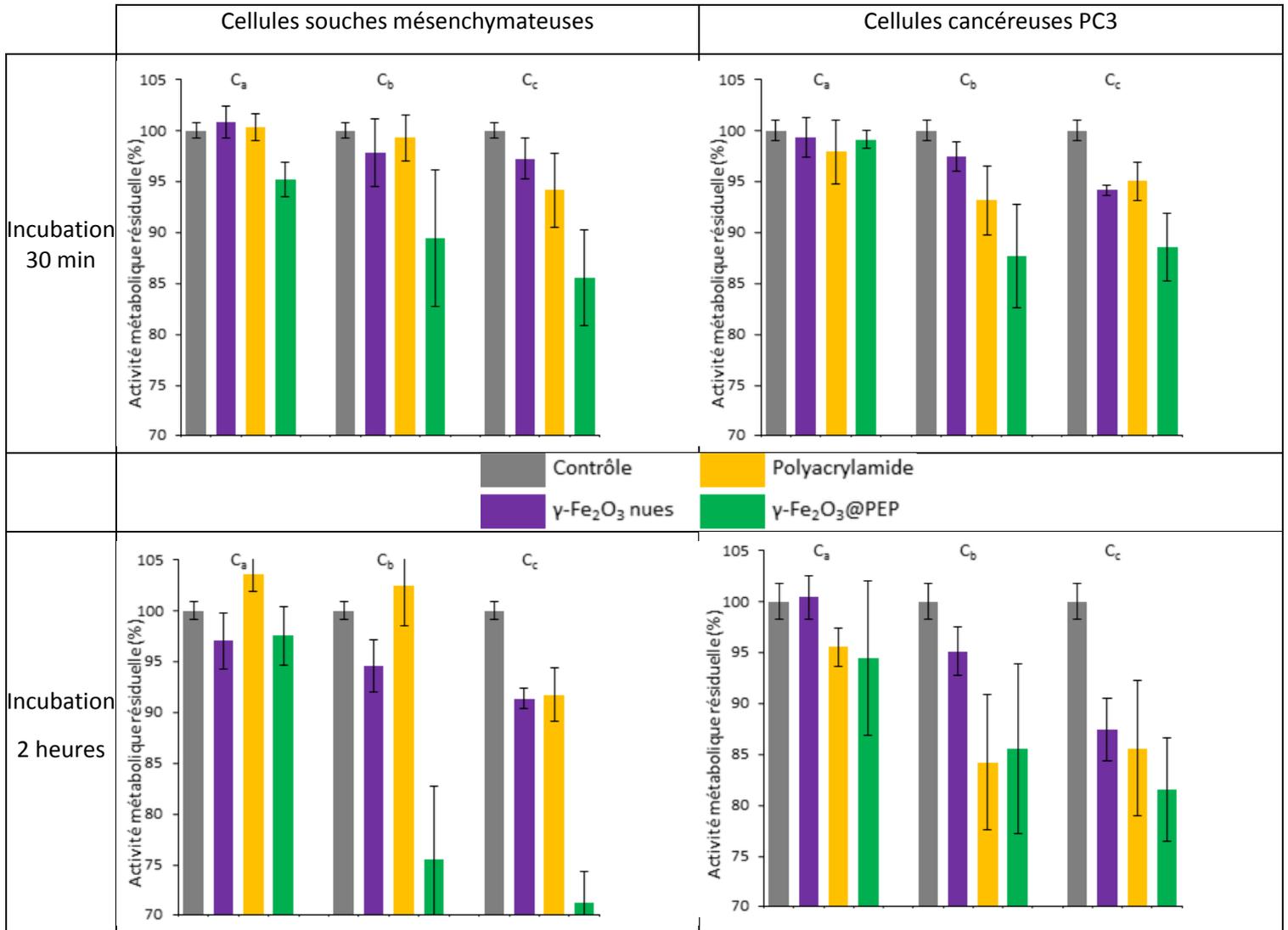


Figure 111 : Viabilité cellulaire à 24h de différentes lignées après incubation avec plusieurs types de particules ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ , polyacrylamide) comparativement aux cellules contrôle suivant différentes conditions expérimentales (concentration  $C_a$ ,  $C_b$  ou  $C_c$  ; incubation durant 30 min ou 2h).

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés de façon plus précise à la toxicité des différentes nanoparticules sur les cellules souches mésenchymateuses après une incubation de 30 min, car il s'agit des conditions expérimentales qui seront par la suite mises en œuvre lors de la formation des sphéroïdes cellulaires pour l'étude de dégradation (Figure 111, en haut à gauche). On peut tout d'abord remarquer que les nanoparticules nues ne présentent pas de toxicité significative vis-à-vis des cellules souches et cancéreuses (en violet sur la figure). En effet, même avec une concentration initiale  $C_c$  les cellules conservent au minimum 97% de leur activité métabolique. Les particules de polyacrylamide ont un effet légèrement plus marqué car pour la concentration  $C_c$  l'activité métabolique résiduelle descend à 94% de l'activité initiale (en jaune sur la Figure 111). Mais aucun effet n'est visible pour les concentrations inférieures. Enfin, la cytotoxicité des nano-objets hybrides

(en vert sur la figure) semble se manifester pour des concentrations plus faibles que pour chacune de ses composantes considérées séparément. En effet, dès la concentration  $C_b$ , les nano-objets hybrides font diminuer l'activité métabolique des cellules de façon importante. L'explication envisagée est la suivante : les cellules savent gérer l'afflux d'oxyde de fer sous forme de nanoparticules de maghémite, et comment les métaboliser afin de réduire leur effet nocif, mais la présence du polymère autour de celles-ci diminue leur accessibilité. Les agents de dégradation intracellulaire auront alors plus de mal à atteindre les oxydes pour les métaboliser, augmentant alors leur toxicité.

Il est classiquement considéré que les nanoparticules ne présentent pas de cytotoxicité aigue tant que l'activité métabolique résiduelle est de plus de 75%. Pour les trois concentrations testées ici et un temps d'incubation de 30 min, la perte d'activité métabolique est au maximum de 15%. La toxicité des nano-objets hybrides étant jugée suffisamment faible, il a été décidé de former des sphéroïdes cellulaires contenant ces objets pour étudier leur dégradation sur plusieurs jours avec les conditions expérimentale suivantes :

- Cellules souches mésenchymateuses
- Incubation durant 30 min avec des particules de maghémite citratées ou des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$
- Trois concentrations initiales différentes des nano-objets dans le milieu de culture ( $C_a$  : 0,05 mM en fer ou 6,1 mg/mL en polymère ;  $C_b$  : 0,1 mM en fer ou 12,2 mg/mL en polymère ;  $C_c$  : 0,2 mM en fer ou 24,4 mg/mL en polymère)

### 3.3. Dégradation des nano-objets $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ dans les sphéroïdes cellulaires

Nous avons dans un premier temps cherché à vérifier la formation des sphéroïdes cellulaires et pour ce faire avons pris des clichés à l'aide d'un appareil photo. On peut observer sur la Figure 112 qu'au cours des premiers jours de maturation, le culot cellulaire obtenu après centrifugation se compacte et s'arrondit pour former un sphéroïde, comme précédemment reporté dans la littérature<sup>243</sup>. Ainsi, les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  n'interfèrent pas avec l'adhérence et le processus de maturation des cellules souches. Il sera donc pertinent d'étudier ces sphéroïdes cellulaires pour s'intéresser à la dégradation des nano-objets.

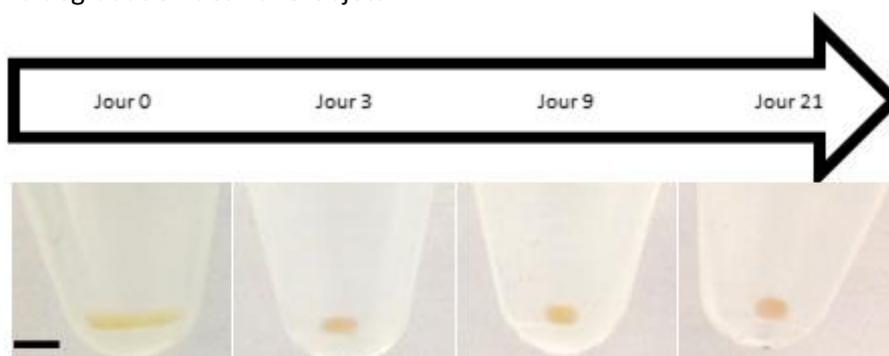


Figure 112 : Photographies de la formation et la maturation d'un sphéroïde au cours du temps, dans un tube en plastique rempli de milieu de culture. Barre d'échelle : 2 mm.

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré les temps de relaxation transverse  $T_2$  de sphéroïdes cellulaires (un à la fois) plongés dans un tampon PBS (phosphate buffered saline). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 113.

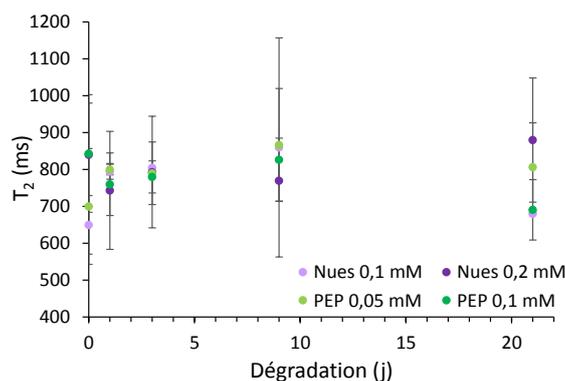


Figure 113 : Evolution du temps de relaxation  $T_2$  des sphéroïdes cellulaires à différents jours au cours de la dégradation des oxydes de fer.

Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 113, au vu des barres d'erreur correspondant aux déviations standards entre sphéroïdes, il n'est pas possible de conclure sur la dégradation des oxydes de fer avec cette méthode de suivi. La taille imposante des barres d'erreur peut s'expliquer par une sensibilité trop faible de la sonde de mesure, et par le manque de dispositif de mesure adapté à des échantillons de si petite taille. En effet, la sonde actuelle se présente telle que schématisée sur la Figure 114a. Dans le cas de l'étude de la dégradation en tampon lysosomal, l'échantillon occupe la totalité de la zone sondée, la mesure est pertinente. Dans le cas de la dégradation en sphéroïdes, l'échantillon occupe une infime partie de la zone sondée (Figure 114b). Le signal mesuré correspond alors principalement au PBS présent dans le tube et non pas aux protons à proximité du fer au sein des cellules.

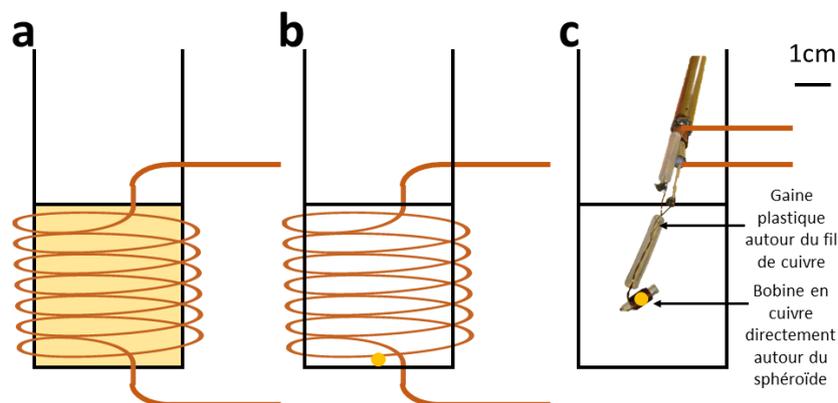


Figure 114 : Représentation schématique des tubes contenant les échantillons placés dans le relaxomètre, et plus précisément au sein de la bobine permettant les mesures de temps de relaxation. (a, b) : schéma de l'état actuel des bobines commerciales, employées lors de l'étude de la dégradation en tampon lysosomal (a) puis en sphéroïde cellulaire (b). (c) : nouvelle sonde et bobine développées pour augmenter la sensibilité lors de l'étude de la dégradation en sphéroïdes cellulaires. Un sphéroïde est représenté par la sphère jaune sur le schéma.

C'est pourquoi il était nécessaire de développer une nouvelle sonde de mesure, adaptée à la taille de l'échantillon, et donc de réduire la taille de la bobine employée. Cette sonde (Figure 114c), a été mise au point par Nicolas Birlirakis du département de chimie de l'Ecole Normale Supérieure, et Anne-Laure Rollet, du laboratoire PHENIX. Cette nouvelle sonde possède une sensibilité suffisante pour enregistrer un signal pertinent. Cependant, un nouveau problème s'est alors présenté. Le porte-échantillon n'était pas fermé de manière hermétique et le sphéroïde cellulaire se desséchait au cours de la mesure. Or la relaxométrie mesure l'influence des oxydes de fer magnétique sur la relaxation de l'eau. Des variations de la quantité d'eau induisent des variations de mesures de temps de relaxation. Malgré plusieurs essais, nous ne sommes pas parvenus à fermer le porte-échantillon de manière hermétique. La dégradation des nano-objets hybrides ne pouvait alors pas être suivie par relaxométrie. Il a fallu se tourner vers une autre méthode d'analyse.

Une méthode de suivi de la dégradation, très souvent employée dans la littérature<sup>243,258</sup>, est le suivi de l'aimantation à saturation des sphéroïdes cellulaires. Leur aimantation, directement reliée à la concentration en fer magnétique au sein des cellules, a été mesurée à l'aide d'un magnétomètre vibrant. Le Tableau 13 regroupe les valeurs d'aimantation au jour 0 de la dégradation pour les différents sphéroïdes cellulaires.

Concentration en fer lors de l'incubation	$M_{\text{Sphéroïde}}$ nanoparticules nues (emu)	$M_{\text{Sphéroïde}}$ nano-objets hybrides (emu)
0,05 mM	$5,32 \cdot 10^{-6}$	$1,33 \cdot 10^{-5}$
0,1 mM	$1,51 \cdot 10^{-5}$	$4,07 \cdot 10^{-5}$
0,2 mM	$3,18 \cdot 10^{-5}$	$6,37 \cdot 10^{-5}$

**Tableau 13 : Aimantation à saturation de sphéroïdes cellulaires formés après incubation avec des nanoparticules de maghémite, nues ou présentes au sein de polymères à empreintes de GFP.**

On peut observer dans un premier temps que la valeur de cette aimantation augmente avec la concentration de la solution de particules ayant été incubée avec les cellules, ce qui est cohérent avec ce à quoi on s'attendait. Mais on peut également remarquer que contrairement aux résultats obtenus lors des tests préliminaires, les nanoparticules nues et les nano-objets hybrides ne pénètrent pas au sein des cellules à la même vitesse. En effet, les sphéroïdes contenant les particules hybrides présentent une aimantation plus élevée, à concentration initiale en fer des particules incubées équivalente. Cette différence peut s'expliquer par le temps d'incubation. En effet, lors des tests préliminaires, celui-ci était de quatre heures, alors qu'il était ici uniquement de trente minutes. Elle peut également être reliée à la composition même des nano-objets hybrides. Le cœur de ceux-ci est constitué de plusieurs dizaines de nanoparticules magnétiques, fortement agrégées. Dans un même volume de milieu extracellulaire internalisé par la formation d'un endosome, il y aura donc plus de particules magnétiques si celles-ci sont groupées dans un PEP que lorsque celles-ci sont libres.

Afin de pouvoir comparer uniquement l'influence de la présence du polymère sur la dégradation des oxydes de fer, il nous est apparu pertinent de comparer des sphéroïdes cellulaires ayant des charges en fer initiales similaires, et donc des aimantations à saturation au jour 0 de la dégradation proches, indépendamment de la concentration en fer du milieu de culture cellulaire lors de l'incubation. C'est pourquoi les différents objets seront par la suite comparés suivants les nouveaux couples définis dans le Tableau 14.

Description des objets comparables		Nouvelle dénomination
Sphéroïdes obtenus avec les nanoparticules nues à 0,1 mM	Sphéroïdes obtenus avec les nano-objets hybrides à 0,05 mM	Couple d'objet à la <b>concentration équivalente <math>C_1</math></b>
Sphéroïdes obtenus avec les nanoparticules nues à 0,2 mM	Sphéroïdes obtenus avec les nano-objets hybrides à 0,1 mM	Couple d'objet à la <b>concentration équivalente <math>C_2</math></b>

**Tableau 14 : Etablissement d'une nouvelle dénomination pour définir les conditions expérimentales et appellation des différents sphéroïdes cellulaires comparables en termes de concentration initiale en oxyde de fer.**

Lors des mesures d'aimantation, nous avons également enregistré les courbes d'aimantation de sphéroïdes uniques, contenant des nanoparticules de maghémite nues ou des nano-objets hybrides, à différentes concentrations initiales, et ce pour différents jours au cours de la dégradation (Figure 115).

Pour chacune des quatre conditions expérimentales étudiées plus en détails, on peut remarquer que les courbes d'aimantation sont de plus en plus plates au cours du temps, et que la valeur d'aimantation à 1500 G diminue. L'aimantation des sphéroïdes étant directement reliée à la

concentration en fer magnétique au sein de ceux-ci, une diminution de l'aimantation traduit une dégradation des nanoparticules de maghémite. Cette diminution est observable aussi bien pour les sphéroïdes dont les cellules ont internalisé les nanoparticules nues que pour ceux dont les cellules ont internalisé les nano-objets hybrides. On peut en conclure que ces cellules sont bien capables de dégrader les nanoparticules de maghémite, et que la présence du polymère autour de celles-ci ne va pas empêcher leur dégradation.

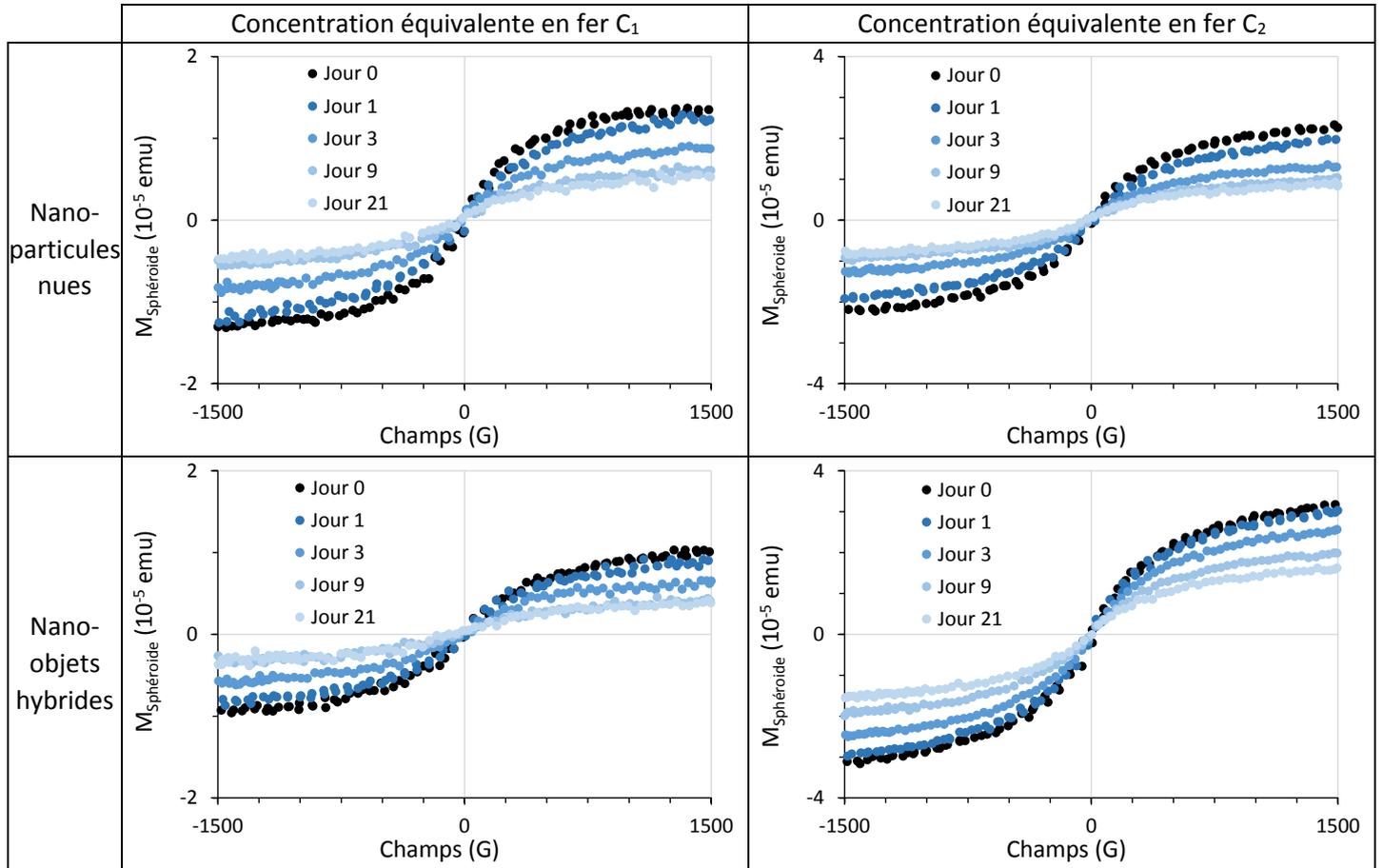


Figure 115 : Courbes d'aimantation obtenues au cours de la dégradation pour des sphéroïdes uniques dont les cellules ont internalisé des nanoparticules de maghémite ou des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  à différentes concentrations.

Une analyse plus approfondie des courbes d'aimantation, en particulier une modélisation à l'aide d'une équation de Langevin, nous permet de déterminer la taille magnétique des particules de maghémite, nues ou au sein du PEP-GFP magnétique, au cours de la dégradation.

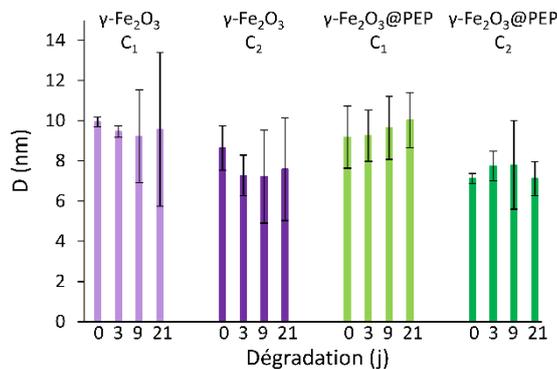


Figure 116 : Evolution de la taille magnétique des nanoparticules de maghémite au cours de la dégradation en sphéroïdes de cellules souches mésenchymateuses, suivant différentes conditions expérimentales.

La Figure 116 représente la taille magnétique (diamètre) mesurée pour les particules de maghémite dans différentes conditions expérimentales à différents instants au cours de la dégradation. Il est intéressant de noter que bien que provenant toutes d'une même synthèse initiale, les nanoparticules d'oxyde de fer semblent être plus petites quand elles ont été incubées à la concentration équivalente  $C_2$ . Peut-être celle-ci induit-elle une plus forte agrégation des particules au sein des lysosomes, ce qui perturbe la mesure. Pour chaque jeu de conditions expérimentales, on peut remarquer une absence d'évolution significative de la taille magnétique des particules. Il semblerait donc que le mécanisme de dégradation soit de type tout-ou-rien : les nanoparticules sont totalement dégradées ou alors laissées intactes. Ce qui est concordant avec ce qui a déjà été observé dans la littérature<sup>243</sup>, mais contraire aux résultats obtenus lors de notre étude en tampon lysosomal, notamment pour les nanoparticules nues. Cette différence peut s'expliquer par la simplicité du milieu lysosomal choisi, qui ne peut rendre compte de la totalité des mécanismes ayant lieu lors de la dégradation en cellules, et donc influencer sur le type de mécanisme de dégradation.

Nous avons ensuite cherché à savoir si les mesures d'aimantation effectuées permettaient de mettre en évidence un ralentissement de la vitesse de dégradation des nanoparticules de maghémite du fait de la présence d'un polymère autour d'elles. Nous avons pour ce faire comparé l'aimantation résiduelle au cours de la dégradation de sphéroïdes dont les cellules avaient internalisé des nanoparticules de maghémite nues ou des nano-objets hybrides. La Figure 117 présente l'évolution de l'aimantation à saturation des sphéroïdes cellulaires formés après incubation avec les nanoparticules nues (violet) ou hybrides (vert) à la concentration équivalente  $C_2$ . Les cellules n'ayant pas internalisé exactement la même quantité initiale d'oxyde de fer, il a été décidé de normaliser les valeurs d'aimantation par les aimantations initiales mesurées à  $J=0$ .

Comme on peut le voir sur la Figure 117, l'aimantation à saturation de tous les sphéroïdes de cellules étudiés diminue au cours du temps, ce qui traduit une dégradation des oxydes de fer magnétiques. On peut également observer une différence de comportement entre nanoparticules nues et nano-objets hybrides. L'aimantation des sphéroïdes de cellules ayant internalisé des nano-objets hybrides diminue plus lentement que celle des sphéroïdes dont les cellules ont internalisé des nanoparticules de maghémite nues. Ainsi, le polymère à empreintes de protéines est tout de même capable de ralentir la dégradation des oxydes de fer, sans pour autant l'en empêcher, en accord avec les études précédemment menées en tampon lysosomal.

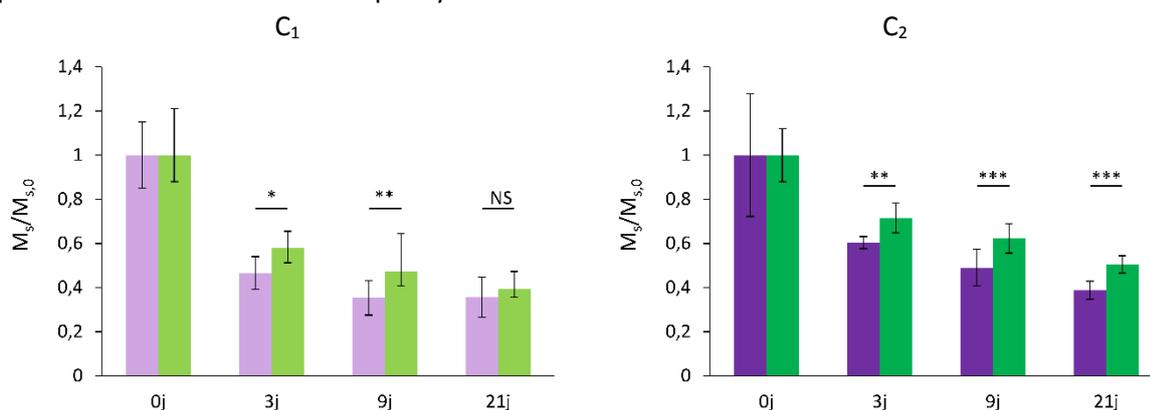


Figure 117 : Evolution au cours du temps de l'aimantation à saturation, normalisée par l'aimantation initiale, pour les sphéroïdes cellulaires ayant été formés après incubation avec les nanoparticules nues (violet) ou hybrides (vert) aux concentrations équivalentes  $C_1$  et  $C_2$ . Significativité des écarts déterminée à l'aide d'un test de Student. NS : non significatif ; \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  et \*\*\* :  $p < 0,001$ .

Enfin, des clichés MET ont été pris sur des coupes de sphéroïdes cellulaires. Les résultats majeurs sont présentés sur la Figure 118. Intéressons-nous dans un premier temps aux clichés obtenus pour

les nanoparticules nues. Au 1<sup>er</sup> jour de la dégradation, on observe au sein des cellules de nombreuses nanoparticules regroupées dans des endosomes. Il y a bien eu internalisation des nanoparticules. Le cytoplasme est clair, même si l'on y détecte parfois de petits points noirs (Figure 118, première ligne, dernière colonne). Ceux-ci n'étant pas bien définis, il ne s'agit pas de particules cristallines, ce ne sont donc pas des ferritines. A noter qu'il en va de même pour le cytosol des cellules ayant internalisé les nano-objets hybrides au 1<sup>er</sup> jour (troisième ligne, 2<sup>ème</sup> colonne). Au 9<sup>ème</sup> jour au contraire, un grand nombre de points très contrastés apparaissent dans le cytoplasme, identifiables comme étant des ferritines chargées en fer<sup>199,259</sup>. Celles-ci peuvent se trouver dans les endosomes ou dans le cytosol. Dans quelques endosomes, on peut observer à la fois des nanoparticules d'oxyde de fer non encore dégradées après 9j de maturation et des ferritines chargées. La visualisation possible des ferritines au 9<sup>ème</sup> jour confirme la dégradation des particules de maghémite et le stockage du fer issu de celle-ci au sein de ces protéines<sup>243,260</sup>.

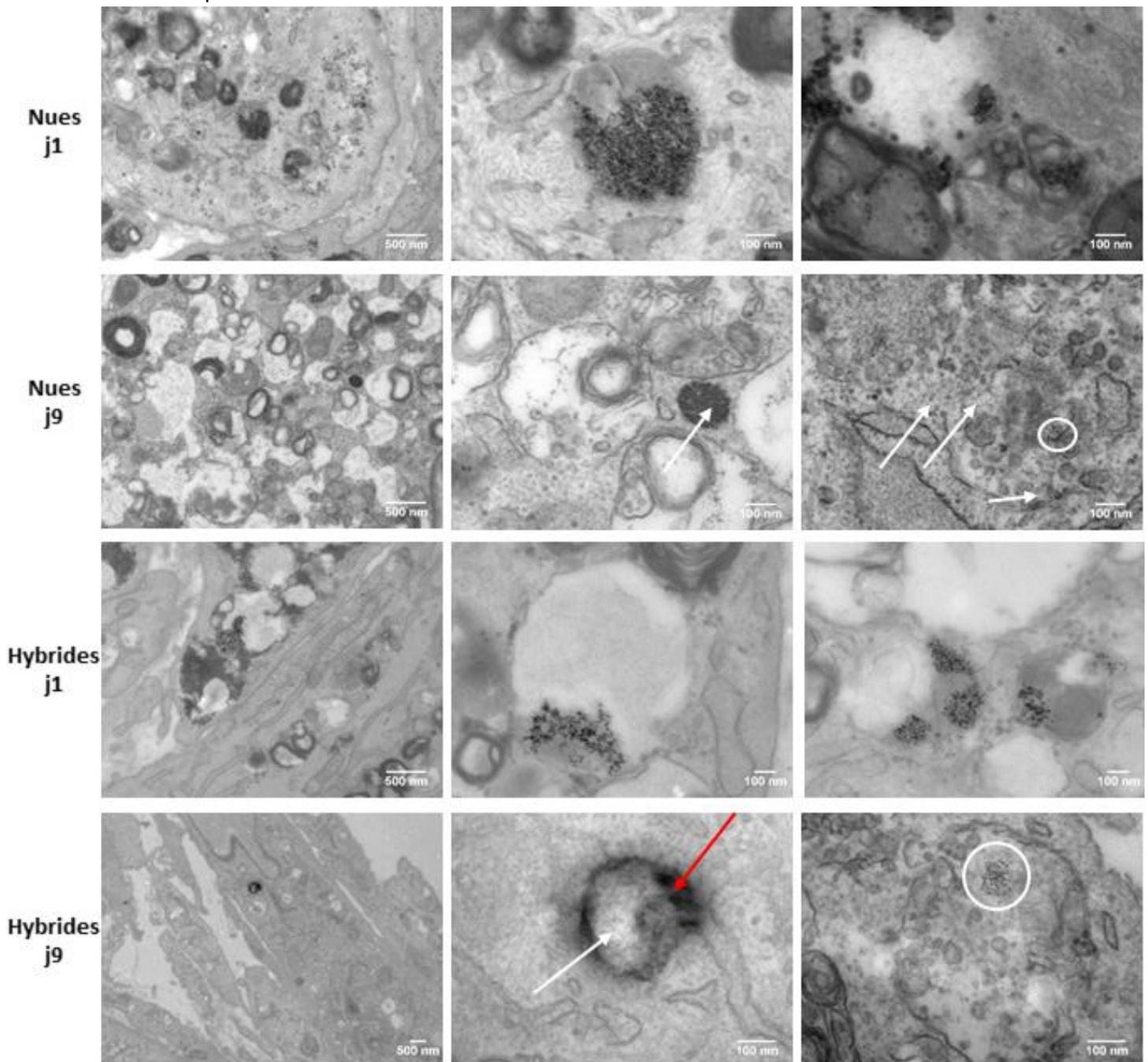


Figure 118: Clichés TEM des nanoparticules nues et hybrides dans les sphéroïdes cellulaires. (Coloration par contact 5 min avec de l'acétate d'uranyle). Flèches blanches : ferritines, ronds blancs : zones chargées en ferritines, flèche rouge : PEP.

Si l'on s'intéresse maintenant aux clichés obtenus pour les nano-objets hybrides, on peut voir au 1er jour de la dégradation la présence de taches sombres au sein des endosomes, elles-mêmes contenant des agrégats de nanoparticules d'oxyde de fer. Il s'agit des nano-objets hybrides, qui ont été internalisés avec succès. Il peut y avoir plusieurs nano-objets hybrides au sein d'un même endosome, comme nous pouvons l'observer Figure 118, 3<sup>ème</sup> ligne. Après 9 jours de maturation, les particules d'oxyde de fer sont bien plus compliquées à détecter, tandis que le polymère est toujours visible. Il s'agit des zones fortement contrastées mais floues, observables en bordure d'endosomes, par exemple sur le cliché présenté en dernière ligne, deuxième colonne de la Figure 118 (flèche rouge). On observe également l'apparition de points fortement contrastés caractéristiques des ferritines chargées en fer (Figure 118, ronds et flèches blanches). Ces deux observations impliquent une dégradation des nanoparticules de maghémite même lorsque celles-ci sont couplées au polymère à empreintes de protéines.

Ainsi, les différentes méthodes d'analyses appliquées à l'étude de la dégradation de nanoparticules de maghémite, nues ou recouvertes de polymère à empreintes de protéines, dans des cellules soutiennent l'hypothèse formulée précédemment : la présence du PEP permet de ralentir la dégradation des oxydes de fer, sans toutefois parvenir à l'empêcher.

#### 4. Conclusion sur la dégradation des objets hybrides $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$

Les oxydes de fer magnétiques, tels que la maghémite, peuvent être naturellement dégradés au sein de l'organisme, et notamment dans des compartiments cellulaires appelés lysosomes. Cependant, très peu d'études portent sur le devenir, et la toxicité, de ces nanoparticules lorsqu'elles sont couplées à des polymères à empreintes de protéines. Au vu de ce manque d'informations à différents niveaux, il est apparu comme nécessaire de considérer, au cours de ce travail de doctorat, le devenir des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ . Et donc d'étudier leur dégradation et leur toxicité.

Dans un premier temps, des études de dégradation ont été menées *in vitro*, dans des milieux de dégradation contenant un agent réducteur chélatant du fer (l'acide citrique) ainsi que différents enzymes, le tout à des concentrations proches du contenu des lysosomes cellulaires. Et ce afin de mieux appréhender le mécanisme de dégradation à l'œuvre.

Ces études ont démontré que l'acide citrique peut induire une dégradation des nanoparticules de maghémite nues en 14 jours, quand il est présent à une concentration proche de celle des agents chélatants du fer dans les lysosomes. L'évolution de la taille magnétique des nanoparticules de maghémite, et dans une moindre mesure de leur diamètre hydrodynamique indique une consommation progressive de celles-ci au cours du temps, et donc une dégradation graduelle.

La présence du PEP, du fait de sa porosité, ne permet pas d'empêcher la dégradation des nanoparticules de maghémite, mais seulement de la ralentir. Ce ralentissement sera d'autant plus important que la part organique des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  sera élevée, et donc a priori que le polymère sera épais.

De plus, différentes enzymes peuvent avoir différents effets sur la dégradation de la maghémite et du polymère. Certaines comme la glucosidase peuvent accélérer celle-ci, probablement en attaquant rapidement le polymère et facilitant l'accès de l'acide citrique aux particules de maghémite. D'autres telles que le lysozyme n'auront pas d'effet visible. Il semble donc compliqué, voire utopique, de

chercher à prédire l'influence des enzymes intracellulaires sur la dégradation du PEP, et donc leur effet sur la dégradation des nanoparticules de maghémite, à partir de ces études en tampon lysosomal.

Dans un second temps, des études portant sur la dégradation et la toxicité des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  ont été menées dans des amas cellulaires.

L'entrée des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  au sein des cellules souches mésenchymateuses ne présente pas de difficultés. Pour de longs temps d'incubation, elles sont internalisées de la même manière (en termes de charge en fer finale) que les nanoparticules de maghémite citratées. L'internalisation des hybrides semble cependant se faire suivant une cinétique initiale plus rapide, peut-être liée à la taille des objets, et à l'agrégation des oxydes de fer au sein du PEP. En contrôlant la concentration initiale des nano-objets hybrides lors de leur incubation avec les cellules, ainsi que la durée de celle-ci, il est possible de ne pas modifier l'activité métabolique des cellules. La toxicité des nano-objets est faible, et peut être considérée comme non-significative si les bonnes conditions expérimentales sont choisies.

Après internalisation des nanoparticules, nues ou hybrides, caractérisées par une forte aimantation des sphéroïdes cellulaires, leur dégradation a été suivie de différentes manières. La diminution de l'aimantation à saturation des sphéroïdes cellulaires a permis de mettre en évidence une diminution de la quantité de fer magnétique et donc une dégradation des oxydes de fer. Ceux-ci sont métabolisés sous l'action des ferritines, dont la concentration intracellulaire augmente fortement au cours du temps, comme observé sur les clichés de microscopie électronique. Les résultats obtenus par mesure de l'aimantation des sphéroïdes cellulaires mettent en avant un effet, faible mais non négligeable, du polymère. La présence de celui-ci va permettre de ralentir la dégradation des nanoparticules de maghémite, sans parvenir à l'empêcher.

En conclusion, les études menées à la fois en tampon lysosomal et en sphéroïdes cellulaires concernant la dégradation des nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  concordent. Les agents chélatant le fer sont toujours capables de consommer les nanoparticules de maghémite lorsque celles-ci se trouvent au sein d'un polymère à empreintes de protéines, bien que ce dernier ralentisse cette dégradation.

Ces travaux pourraient cependant aller plus loin. Lors des études de toxicité présentées ici, nous nous sommes juste intéressés à la modification de l'activité métabolique des cellules 24h après leur incubation avec les nano-objets. Si nous avons eu plus de temps, il aurait été bien d'investiguer plus en détails cette toxicité. Nous aurions par exemple pu poursuivre l'étude de l'influence des nano-objets sur l'activité métabolique des cellules à plus long terme, par exemple jusqu'à 21j qui est la plus grande durée ici mise en œuvre pour la maturation des sphéroïdes. Nous aurions également pu envisager de mesurer le niveau d'expression des gènes de la ferritine au cours de la dégradation, afin de vérifier que les cellules sont bien capables, par elles-mêmes, de prendre en charge la surcharge de fer liée aux nanoparticules de maghémite. Par ailleurs, les cellules employées lors des études présentées dans ce chapitre étant majoritairement des cellules souches mésenchymateuses, il pourrait également être intéressant d'étudier leur capacité à se différencier en ostéoblastes, chondrocytes ou adipocytes, après internalisation des nanoparticules hybrides, et l'influence de celles-ci sur les mécanismes de différenciation.

De plus, nous ne nous sommes pas du tout intéressés au devenir du polymère après internalisation des nano-objets hybrides, et à sa dégradation dans les cellules. Il aurait été intéressant de le faire, notamment en trouvant comment l'imager de façon nette en MET. Cela permettrait de savoir si au sein des cellules, il est effectivement clivé par des enzymes, et où il s'accumule par la suite. Une piste

à explorer pour ce faire pourrait être d'incorporer des nanoparticules d'or au sein du polymère par couplage covalent entre ces particules et le monomère fonctionnel employé. Les nanoparticules d'or étant facile à imager en TEM, ne subissant pas de dégradation *in vivo*<sup>261</sup> et n'étant pas présentes naturellement au sein des cellules, la position de celles-ci nous renseignerait alors précisément sur la position du polymère, et nous permettrait de savoir s'il reste co-localisé avec le fer.

Enfin, nous pourrions aussi étudier l'influence de la porosité et de la rigidité du PEP sur sa dégradation, *in vitro* ou en amas cellulaires. Pour cela, il faudrait faire varier le taux de réticulation des polymères étudiés, le nombre d'empreintes au sein de ceux-ci et également étudier la dégradation de nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$ .

Il serait également très intéressant de poursuivre les études concernant le suivi de la dégradation par relaxométrie, et notamment la dégradation au sein des sphéroïdes. La sonde de mesure ayant été développée, les efforts devront dans un premier temps se porter sur la réalisation d'un porte-échantillon fermant de façon hermétique et permettant la réalisation de mesures pertinentes du temps de relaxation de l'eau présente au sein des cellules.

## 5. Matériels et méthodes

### 5.1. Réactifs chimiques

Les nanoparticules de maghémite et les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  ont été synthétisés comme décrit au chapitre 2. Leurs caractérisations principales se retrouvent en annexe 1 page 213.

Les autres réactifs employés provenaient des fournisseurs suivants :

Citrate de sodium, pronase, glucosidase, lysozyme, PBS, dexaméthasone, pyruvate de sodium, acide ascorbique 2-phosphate, L-proline, RPMI (Roswell Park Memorial Institute), FBS, Penicilline-Streptomycine, glutaraldéhyde, résine Epon, acrylamide, méthylène-bis-acrylamide, HEPES, APS, TEMED, acide 2-dodecylthiocarbonothioylthio-2-méthylpropanoïque (Iniferter) : Sigma.

DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium), trypsine : Gibco.

Acide citrique : Carlo Erba ; acide chlorhydrique à 37% : Merck ; acide nitrique à 68% : VWR ; MSCBM (Mesenchymal Stem Cell Basal Medium) : Lonza ; ITS Premix : BD Biosciences ; TGF- $\beta_3$  : Oncogene ; cellules PC3 (Human prostate adenocarcinoma) : ATCC® CRL-1435™ ; réactif AlamarBlue : Invitrogen ; acétate d'uranyle : Fisher Scientific.

### 5.2. Citratation des particules de maghémite

662 mg de citrate de sodium est dispersé dans 15 mL d'une suspension de nanoparticules de maghémite dites « acides » à 1,15 M pour avoir un ratio  $\frac{n_{\text{citratés}}}{n_{\text{fer}}} = 0,13$  puis le mélange est chauffé durant 40 minutes à 100 °C sous agitation magnétique. Une décantation magnétique a lieu pour récupérer les particules, puis celles-ci sont lavées avec trois rinçages à l'acétone et deux à l'éther diéthylique (10 min d'agitation à chaque fois et séparation du surnageant par décantation magnétique) avant d'être re-dispersées dans 15 mL d'eau distillée.

Une mesure du diamètre hydrodynamique donne  $20,5 \pm 4$  nm contre  $15,5 \pm 2$  pour les particules avant citratation. La fonctionnalisation est effective.

### 5.3. Synthèse de nanoparticules de polyacrylamide

Des nanoparticules de polyacrylamide ont été synthétisées de la manière suivante. Dans un ballon de 100 mL contenant une olive aimantée, on introduit 24 mL de solvant HEPES (acide N-(2-hydroxyethyl)-pipérazine-N'-(2-ethanesulfonique)) à 200 mM et à pH=8. On dissout dans le milieu 6,5 mmol de monomère acrylamide, 0,65 mmol d'agent réticulant, le N,N-méthylène-bis-acrylamide, et 35 mg d'agent Iniferter puis 5 mg d'APS (Ammonium PerSulfate). Le ballon est fermé hermétiquement par un septum, scellé avec du Parafilm. Le milieu est dégazé par bullage d'azote durant 15 minutes. On introduit ensuite dans le ballon 2  $\mu$ L de TEMED (N,N,N',N'-TetraMéthyl-EthylèneDiamine)<sup>153</sup> à l'aide d'une aiguille plantée au travers du septum. Le milieu est ensuite laissé sous agitation magnétique le temps voulu pour la polymérisation. Enfin, le ballon est ouvert et l'oxygène pénétrant arrête la réaction de polymérisation. Les particules obtenues sont purifiées par dialyse, afin d'éliminer l'excès de monomères.

### 5.4. Suivi de la dégradation en tampon lysosomal

L'étude de la dégradation des systèmes hybrides s'axait principalement sur le suivi de la dégradation des nanoparticules d'oxyde de fer par suivi visuel direct, par mesure du diamètre hydrodynamique, par suivi du temps de relaxation T<sub>2</sub>, par mesure de la concentration en fer libre en solution, et par suivi de l'aimantation à saturation. Le polymère, quand il était présent, était analysé de façon directe par mesure de la taille hydrodynamique. Chaque échantillon nécessite jusqu'à 5 caractérisations différentes par jour au cours de la dégradation, caractérisations présentées ci-dessous.

Dans un premier temps, un suivi visuel direct a été réalisé, les solutions de nanoparticules de maghémite étant brunes tandis que les solutions de fer II sont vert pâle. Les solutions peuvent également devenir jaunes, du fait de la non-stabilité du fer II en solution et de son oxydation en fer III en présence d'oxygène dissout dans l'eau. Les contenants employés pour la dégradation sont donc fermés hermétiquement au début de celle-ci afin de réduire au maximum les échanges gazeux avec l'extérieur et donc le renouvellement de l'oxygène pour tenter de conserver le fer sous forme Fe<sup>2+</sup>. Des photographies des suspensions ont été prises avec l'appareil photo intégré à un iPhone 5 datant de 2012.

Dans un deuxième temps, le fer libre présent en solution est dosé par AAS. Pour ce faire, les suspensions de nanoparticules dans les différents milieux de dégradation sont placées dans un tube d'ultrafiltration, puis 10 min dans une centrifugeuse tournant à 5000 tours/min. Le liquide filtré, contenant le fer libre en solution mais pas les nanoparticules de maghémite non dégradées, est ensuite dilué dans une solution d'acide nitrique à 2 % puis dosé par spectroscopie d'absorption atomique à l'aide d'un appareil Analyst 100 commercialisé par PerkinElmer .

Puis, l'étude peut se faire par mesure du temps de relaxation T<sub>2</sub> des protons de l'eau. Pour ce faire, les échantillons sont placés dans un relaxomètre Minispec Bruker, fonctionnant à 25°C et de fréquence de résonance de 20 MHz. 4 balayages sont effectués par échantillon, avec un gain de 55 dB et un délai de cyclage de 5 s entre deux mesures, une impulsion à 90° de 9  $\mu$ s et une impulsion à 180° de 16,4  $\mu$ s séparés de 0,04s (voir annexe 2 page 217 pour plus de détails).

Ensuite, la dégradation des nanoparticules peut être caractérisée par mesure du diamètre hydrodynamique de celles-ci. Ce diamètre est mesuré à l'aide d'un appareil DLS Malvern. On trace

alors l'évolution du diamètre des nanoparticules en fonction de la durée écoulée depuis le début de la dégradation.

Enfin, nous avons suivi la dégradation des nanoparticules d'oxyde de fer par mesure de leur aimantation à saturation. Pour ce faire, chaque échantillon est placé dans un magnétomètre vibrant, qui applique un champ magnétique croissant de 0 à 4000 G puis décroissant de 4000 à 0 G. Le champ magnétique varie par pas de 25 G et l'échantillon s'équilibre durant 5 s avant la mesure. Ces mesures permettent aussi de déterminer la taille magnétique des nanoparticules par modélisation de la courbe d'aimantation obtenue par une équation de Langevin (chapitre 1 page 16). Le magnétomètre à échantillons vibrants ici employé a été développé au laboratoire.

Par ailleurs, l'évolution du pH de certaines suspensions a également été enregistrée au cours du temps, à l'aide d'un pH-mètre vendu par Metler-Toledo, tandis que quelques échantillons ont été imagés par MT avant et après dégradation grâce à un microscope JEOL-100 CX.

## 5.5. Culture des cellules

Lors de leur culture en flasque, les cellules vont se reproduire et recouvrir petit à petit la surface de celle-ci. Une fois qu'un taux de recouvrement critique est atteint, les cellules vont périr. Le taux de recouvrement, ou confluence, critique est de 70-80%. A partir de ce moment, les cellules seront trop proches les unes des autres, et vont mourir. Il est donc essentiel de les répartir dans de nouvelles flasques de culture. Pour ce faire, elles sont détachées de la flasque à l'aide d'une protéase, la trypsine, avant d'être diluées dans du milieu de culture neuf et réparties dans de nouvelles flasques. Ces opérations sont appelées passage, et notées P. Lorsque des cellules sont à P0, elles n'ont encore jamais été reproduites en laboratoire. Lorsque des cellules sont à P1, elles se sont multipliées dans une flasque de culture, ont été détachées de celle-ci puis ont pu croître de nouveau dans une seconde boîte.

Les cellules employées pour l'étude menée au cours de ce doctorat ont été décongelées à P1 et ont été cultivées par Alberto Curcio dans du MSCBM (Mesenchymal Stem Cell Basal Medium), milieu de culture particulièrement adapté aux cellules souches car il assure leur non différenciation et la conservation de leur pluri-potentialité. Les cellules employées par la suite pour les tests préliminaires et l'étude de la dégradation étaient à P5.

## 5.6. Test de cytotoxicité AlamarBlue

### 5.6.1. Description du test de viabilité cellulaire

Le test de viabilité cellulaire employé ici est le test couramment nommé « AlamarBlue »<sup>262</sup>. Ce test est un test dit « à révélation retardé » car il ne dose pas directement un composé présent dans le milieu, comme c'est le cas par exemple des tests LDH qui dosent la lactate déshydrogénase relarguée lors d'une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique, et donc la mort cellulaire<sup>263</sup>. En effet, il évalue l'activité métabolique résiduelle de la population cellulaire employée, et permet de là de déduire le nombre de cellules mortes.

Un colorant bleu, la résazurine (commercialisée sous le nom AlamarBlue qui donne par abus de langage son nom à ce test) est ajouté au milieu de culture à différents temps après incubation des cellules avec les nanoparticules à tester. Au sein des cellules encore vivantes, la résazurine est réduite

dans les mitochondries sous l'action de différentes enzymes<sup>264</sup>. Le produit de dégradation est une molécule fluorescente, la résorufine (Figure 119). Une mesure du signal de fluorescence à l'aide d'un spectrofluorimètre permet alors de déterminer la quantité de cellules encore en vie, et donc d'estimer la toxicité de nanoparticules après différentes durées d'incubation.<sup>265</sup>

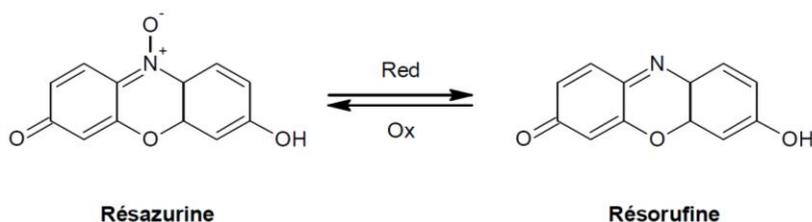


Figure 119 : Structures moléculaires de la résazurine et de la résorufine. Le premier est un colorant bleu non fluorescent, le second est fluorescent (excitation : 560 nm, émission : 590 nm).

### 5.6.2. Cellules employées, nature et concentration des particules évaluées

Alberto Curcio a cultivé des cellules souches mésenchymateuses, ainsi que des cellules cancéreuses (lignée PC3, human prostate adenocarcinoma), suivant un protocole tel que décrit précédemment. Nous avons choisi d'évaluer la toxicité des nanoparticules nues et hybrides sur des cellules souches mésenchymateuses d'une part, car c'est au sein de celles-ci que nous étudierons également la dégradation des nano-objets, et sur des cellules cancéreuses d'autre part afin d'obtenir plus d'informations sur la cytotoxicité des particules.

Après croissance des cellules, celles-ci sontensemencées dans les puits de plaques de culture puis incubées avec les particules dont on souhaite déterminer la toxicité. Les différentes conditions initiales mises en œuvre lors de l'incubation des cellules avec les particules sont résumées dans le Tableau 15. Les concentrations en polyacrylamide ont été choisies car elles correspondent aux concentrations équivalentes en polymère des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ . Pour les résultats, on parlera de concentration  $C_a$  pour la concentration 0,05 mM en fer (6,1 mg/L de polymère), de concentration  $C_b$  pour la concentration 0,1 mM en fer (12,2 mg/L de polymère), et de concentration  $C_c$  pour la concentration 0,2 mM en fer (24,4 mg/L de polymère).

Cellules	Particules	Concentration (dépendant de la nature des particules)	Durée d'incubation
Cellules souches mésenchymateuses <b>Ou</b> Cellules cancéreuses de type PC3	Nanoparticules de maghémite	0,05 mM en fer / 6,1 mg/L en polymère	30 min
			2h
	Nano-objets hybrides	0,1 mM en fer / 12,2 mg/L en polymère	30 min
			2h
	Polyacrylamide	0,2 mM en fer / 24,4 mg/L en polymère	30 min
			2h

Tableau 15 : Conditions expérimentales mises en œuvre lors de l'incubation des différentes particules avec les deux lignées cellulaires choisies en vue de la détermination de leur cytotoxicité.

Le test de viabilité cellulaire a ensuite été mis en œuvre tel que préconisé par le fournisseur de résazurine. Brièvement, 24h après l'incubation des particules avec les cellules, le milieu de culture des cellules dans leur puits est remplacé par une solution de colorant AlamarBlue à 10 % en volume. Après 2h, le milieu est analysé par spectrofluorimétrie : il est excité à 570 nm et l'intensité du signal émis à 585 nm est mesurée. La même mesure est effectuée pour des puits contrôle, contenant des cellules

n'ayant été incubées avec aucune des différentes particules. On peut alors déduire l'écart entre les cellules contrôles et ayant internalisé des particules de la manière suivante :

$$\% \text{ activité métabolique résiduelle} = 100 * \frac{I_{585, \text{cellules incubées}}}{I_{585, \text{cellules contrôles}}}$$

Avec  $I_{585, \text{cellules incubées}}$  l'intensité de fluorescence des puits contenant les cellules ayant initialement été incubées avec les différentes particules, et  $I_{585, \text{cellules contrôles}}$  l'intensité de fluorescence des puits contenant les cellules contrôles.

Tous les tests sont effectués en quadruplication.

## 5.7. Suivi de la dégradation en amas cellulaires

### 5.7.1. Incubation des particules et formation des sphéroïdes de cellules

Au cours de cette étude, nous avons testé la dégradation d'un objet hybride  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ , et ce à plusieurs concentrations différentes (0,05 mM, 0,1 mM et 0,2 mM). Afin d'avoir des informations sur l'influence du polymère sur cette dégradation, nous avons également étudié la dégradation de nanoparticules citratées de maghémite, aux mêmes concentrations. La préparation des sphéroïdes de cellules ayant internalisé les particules à dégrader est décrite ci-dessous.

Après culture des cellules souches (paragraphe 3.1.1 page 138), celles-ci sont mises à incuber durant 30 min avec les particules voulues à la concentration désirée, diluées dans du RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) afin d'avoir un volume total de 6 mL. L'incubation a lieu à 37°C sous atmosphère saturée en humidité contenant 5% de  $\text{CO}_2$ . Après incubation, plusieurs centaines de cellules sont observées par microscopie optique. Aucune cellule morte ou déformée n'est détectée, ce qui valide l'absence de toxicité visible des nano-objets hybrides aux concentrations choisies. On observe également la présence de nombreux endosomes : les cellules ont bien internalisé les particules. Au cours de ces observations, on remarque également la présence d'agrégats de particules sur la membrane de certaines cellules. Il va être nécessaire de les chasser, afin de ne pas fausser les mesures de cinétique de dégradation effectuées ensuite. Pour ce faire, le milieu contenant les particules non internalisées est retiré et les cellules sont lavées avec du RPMI puis placées dans leur milieu de culture MSCBM (Mesenchymal Stem Cell Basal Medium) à l'incubateur durant 2h.

Une fois la chasse terminée, il faut former les sphéroïdes de cellules. Celles-ci sont lavées avec du DPBS (Dulbecco's phosphated buffered saline) puis décollées de la flasque dans laquelle elles se trouvent par ajout de 3 mL de Trypsine-EDTA à 0,05% et incubation 5 min. L'enzyme est par la suite désactivée par ajout de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant un inhibiteur de la Trypsine. Les cellules sont bien dispersées dans ce milieu, puis on détermine leur concentration. Pour ce faire, on observe avec un microscope optique un prélèvement (généralement 10  $\mu\text{L}$ ) de la suspension de cellules et on compte le nombre de cellules présentes dans 1  $\mu\text{L}$  à l'aide d'une lame de numération KOVA-Slide. On en déduit ensuite le nombre total de cellules dans le DMEM. Comme on voudra ensuite former au minimum 15 sphéroïdes contenant chacun minimum 200.000 cellules, on peut calculer le nombre de sphéroïdes que l'on pourra former. La suspension dans le DMEM est alors centrifugée puis les cellules re-dispersées dans un volume de milieu chondrogène égal à 1,5 mL fois le nombre de sphéroïdes à former. Le milieu chondrogène est du DMEM contenant du dexaméthasone

(0,1  $\mu\text{M}$ ), du pyruvate de sodium (1mM), de l'acide ascorbique 2-phosphate (50  $\mu\text{M}$ ), de la L-proline (0,35 mM), de l'ITS Premix (1%) et du TGF- $\beta$ 33 (10 ng/mL). On place ensuite 1,5 mL de cette nouvelle suspension de cellules par tube. Les tubes sont centrifugés 4 min à 1300 rpm et les sphéroïdes de cellules sont formés. Ils sont conservés dans l'incubateur. Le Tableau 16 regroupe la composition cellulaire des sphéroïdes formés dans chaque condition.

	<b>Concentration</b>	<b>0,05 mM</b>	<b>0,1 mM</b>	<b>0,2 mM</b>
<b>Particules citratées</b>	Nombre de cellules par sphéroïde	220.000	215.000	220.000
	Nombre de sphéroïdes	17	16	17
<b>Particules hybrides</b>	Nombre de cellules par sphéroïde	277.000	207.000	224.000
	Nombre de sphéroïdes	17	16	15

Tableau 16 : Nombre de cellules par sphéroïde et nombre de sphéroïdes formés par couple de conditions expérimentales.

### 5.7.2. Les méthodes de suivi de la dégradation

Les mesures de suivi de dégradation des oxydes de fer au sein des cellules ne pouvaient pas se faire en routine au laboratoire tous les jours. C'est pourquoi, certains jours prédéfinis trois sphéroïdes par couple de conditions expérimentales « nature – concentration des particules » ont été fixés avec du glutaraldéhyde à 50% durant 12h à 4°C. Les cellules ont ensuite été transférées dans du PBS (phosphate buffered saline) et conservées à 4°C jusqu'à analyse. Les différents sphéroïdes ont été fixés respectivement 0, 1, 3, 9 et 21 après leur formation. La dégradation a ensuite été attestée et étudiée de plusieurs manières différentes.

Dans un premier temps, afin de vérifier la formation et la maturation des sphéroïdes, nous avons effectué un suivi visuel direct en prenant des photographies, à l'aide de l'appareil photo intégré à un iPhone 5 de 2012.

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré le temps de relaxation transverse  $T_2$  des sphéroïdes cellulaires, figés à différents jours après le début de l'étude de dégradation. Pour ce faire, un sphéroïde était placé au fond d'un tube de mesure en verre rempli de PBS. Le tube était ensuite placé dans un Minispec Bruker (le même que celui employé lors de l'étude de la dégradation en tampon lysosomal). Cette étude ayant été réalisée en été, et au vu des fortes chaleurs dans le laboratoire, il a été décidé d'effectuer les mesures à 30°C afin de faciliter l'équilibre en température de l'échantillon. Les mesures se faisaient à 20 MHz, 4 balayages étaient effectués par échantillon, avec un gain de 52 dB et un délai de cyclage de 5 s entre deux mesures, une impulsion à 90° de 9  $\mu\text{s}$  et une impulsion à 180° de 16,4  $\mu\text{s}$  séparés de 0,04s (voir annexe 2 page 217 pour plus de détails).

Nous avons également cherché à enregistrer les profils de temps de relaxation  $T_1$  des sphéroïdes cellulaires fixés à différents jours de maturation. Le montage expérimental ainsi que le protocole de mesures ont été développés par Anne-Laure Rollet en collaboration avec Nicolas Birlirakis du département de chimie de l'Ecole Normale Supérieure. Les mesures de temps de relaxation longitudinaux  $T_1$  se faisaient à 25°C entre 0,05 MHz et 30 MHz (20 mesures de  $T_1$  sur cette plage de fréquences) avec 64 balayages de l'échantillon à chaque fréquence, et un délai de cyclage de 1 s entre deux mesures. La relaxation avait lieu après avoir soumis l'échantillon à un champ  $B_{\text{rel}}$  fonction de la fréquence étudiée et l'acquisition du signal se faisait après avoir appliqué une impulsion à 90° et 15,5 MHz durant 0,68  $\mu\text{s}$  (voir annexe 2 page 218 pour plus de détails).

Dans un troisième temps, nous avons effectué des mesures d'aimantation des sphéroïdes, afin notamment d'avoir une idée de leur charge en fer magnétique initiale. Les courbes d'aimantation ont été obtenues à l'aide d'un magnétomètre à échantillons vibrants Quantum Design de Versalab en utilisant la séquence suivante : le champ magnétique appliqué diminuait de +15000 G à - 15000 G avant de croître à nouveau jusque +15000 G et ce avec un pas de 40 G par seconde. L'aimantation à saturation, quant à elle, était mesurée avec cette séquence : le champ magnétique appliqué augmentait progressivement de 0 G à 5000 G avec un pas de 80 G par seconde, puis de 5000 G à 25000 G avec un pas de 170 G par seconde. Les données brutes obtenues étaient traitées afin d'éliminer la composante diamagnétique de l'aimantation mesurée.

Enfin, nous avons pris des clichés MET de certains sphéroïdes aux jours clés de la dégradation. Il s'agit des sphéroïdes formés après incubation avec des nanoparticules nues à la concentration de 0,1 mM en fer, et ceux formés après incubation des cellules avec les nano-objets hybrides à une concentration en fer de 0,05 mM, et fixés 1 jour ou 9 jours après début de la dégradation. Ces sphéroïdes ont été déshydratés puis incorporés au sein d'une résine Epon (une résine de type époxy à base de glycérol). Des tranches de 70 nm d'épaisseur ont été découpées, colorées à l'acétate d'uranyle (temps de contact variable) puis imagées par MET grâce à un microscope Phillips Tecnai 12.

# Chapitre 5 :

## Vers l'impression d'une protéine d'intérêt pour la nanomédecine : CD44



## Table des matières

1. La glycoprotéine transmembranaire CD44 .....	161
1.1. Présentation de la protéine.....	161
1.2. Nécessité d'un nouveau protocole de synthèse .....	162
2. Les nouveaux objets hybrides $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP.....	163
2.1. Fonctionnalisation de la maghémite avec un agent RAFT photo-polymérisable.....	163
2.1.1. Agent de fonctionnalisation .....	163
2.1.2. Mise en évidence de la fonctionnalisation.....	164
2.2. Photo-amorçage et dénaturation de protéines .....	164
2.3. Optimisation du protocole de synthèse avec la GFP.....	165
2.3.1. Composition du mélange de pré-polymérisation.....	165
2.3.2. Durée d'illumination.....	166
2.3.3. Caractérisations des objets obtenus $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP photo-polymérisés .....	168
2.3.3.1. Structure et morphologie.....	168
2.3.3.2. Le polymère est sélectif du gabarit .....	168
2.3.3.3. Robustesse du protocole de synthèse .....	169
3. Ciblage de cellules sur-exprimant la glycoprotéine transmembranaire CD44.....	170
3.1. Mesure de la capacité d'adsorption et du facteur d'impression .....	170
3.2. Cellules cancéreuses humaines et toxicité des nano-objets hybrides .....	170
3.2.1. Les cellules MDA-MB 231 .....	170
3.2.2. Cytotoxicité des nano-objets hybrides.....	171
3.3. Ciblage cellulaire .....	171
4. Conclusion sur les performances des objets hybrides photo-polymérisés.....	173
5. Matériels et méthodes .....	173
5.1. Réactifs employés.....	173

5.2.	Appareils de mesure.....	174
5.3.	Fonctionnalisation de la maghémite par l'agent RAFT photo-polymérisable.....	174
5.4.	Synthèse du polymère.....	174
5.5.	Réalisation d'isothermes d'adsorption .....	175
5.6.	Mesure du facteur d'impression des objets hybrides $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-CD44 .....	176
5.7.	Culture des cellules .....	176
5.8.	Test de cytotoxicité MTT .....	176
5.8.1.	Le test MTT .....	176
5.8.2.	Mise en œuvre du test .....	177
5.9.	Ciblage cellulaire .....	178
5.9.1.	Possibles biais expérimentaux lors du ciblage .....	178
5.9.2.	Optimisation des conditions expérimentales – contrôle du ciblage avec $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PNI	178

Au cours des chapitre précédents, notamment des chapitres 2 et 3, nous avons montré qu'il était possible d'obtenir des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  et de les employer afin d'effectuer un ciblage cellulaire. Nous nous sommes alors intéressés à l'impression d'une protéine présentant un fort intérêt en nanomédecine, le complexe de différenciation 44, ou CD44, afin de développer un système capable de cibler spécifiquement des cellules exprimant cette protéine à leur surface. CD44 est une protéine notamment présente sur des cellules cancéreuses dites « triples négatives » et détectables par aucune méthode conventionnelle de diagnostic.

## 1. La glycoprotéine transmembranaire CD44

### 1.1. Présentation de la protéine

Le complexe de différenciation 44, ou CD44, est une glycoprotéine transmembranaire identifiée au début des années 1980 à la surface de leucocytes à l'aide d'anticorps monoclonaux<sup>266</sup>. C'est une protéine transmembranaire de type I, i.e. la terminaison N de la protéine est à l'extérieur de la cellule, tandis que la terminaison C est intracellulaire, constituée d'une seule chaîne flexible d'acides aminés (Figure 120). La partie extracellulaire est composée de 270 acides aminés, tandis que la partie membranaire en compte 21, et que le résidu intracellulaire en comporte 72<sup>267,268</sup>. Les acides aminés extracellulaires peuvent subir un nombre plus ou moins important de glycosylation, par liaison O (attachement d'un sucre à un oxygène d'un acide aminé) ou par liaison N, ce qui fait varier la masse molaire de la protéine entre 37 kDa et 200 kDa<sup>268,269</sup>.

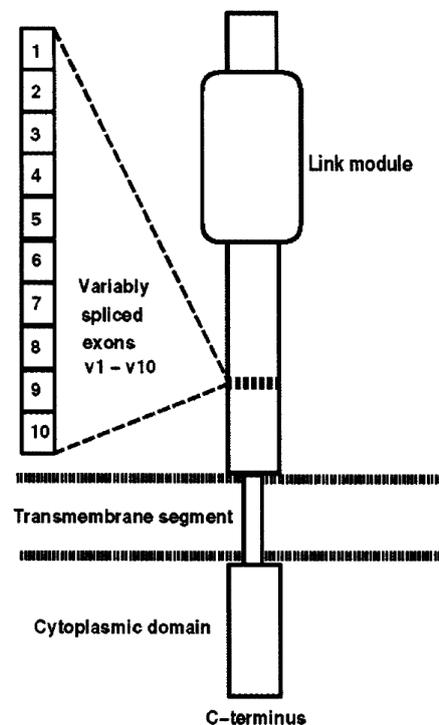


Figure 120 : Représentation schématique de la glycoprotéine transmembranaire CD44<sup>270</sup>.

Présente chez un grand nombre de mammifères, chez les humains CD44 est codée par le gène du même nom présent sur le chromosome 11<sup>271</sup>. Les différents épissages alternatifs possibles de ce gène donnent lieu à des différences observables dans les 10 exons variables présentés Figure 120, et à ce jour au moins 30 isomorphes différents de CD44 ont été identifiés<sup>270</sup>. Ceux-ci auront des fonctions

différentes dans l'organisme, et il a notamment été démontré que les isomorphes exprimant l'exon v6 sont fortement impliqués dans les métastases cancéreuses<sup>272</sup>.

Le rôle physiologique majeur de CD44 est de maintenir la structure tridimensionnelle des organes et des tissus via la régulation de l'adhérence cellule-cellule et cellule-matrice<sup>273,274</sup>. Certains isomorphes peuvent également être impliqués dans la régulation de l'activation de lymphocytes, ainsi que dans la motilité cellulaire et la migration, la différenciation, la signalisation de cellules et la transcription de gènes<sup>275</sup>. Ces fonctions sont assurées par les interactions de CD44 avec différents ligands.

Le ligand principal de CD44 est l'hyaluronate, un polysaccharide très abondant dans le milieu extracellulaire mammalien. Celui-ci va interagir avec la protéine à la fois par le biais du domaine de fixation (ou link module) et par deux autres domaines plus petits, codés par l'exon 5<sup>276</sup>. En fixant de longues chaînes (polymères) d'hyaluronate, CD44 assure l'adhérence entre cellule et matrice extracellulaire<sup>277</sup> mais peut aussi conduire à la formation d'agrégats cellulaires, si un même polysaccharide est reconnu par plusieurs protéines exprimées par différentes cellules<sup>278</sup>. Au contraire, lorsque CD44 fixe de petits fragments d'hyaluronate, pouvant être issus d'une dégradation de la matrice extracellulaire, cela va déclencher une cascade de signalisation ayant pour conséquence l'activation du système immunitaire et l'arrivée de leucocytes<sup>279,280</sup>.

CD44 est également capable de digérer lui-même l'hyaluronate<sup>281</sup>, ce qui peut entraîner le détachement des cellules<sup>274,282</sup>. Celles-ci, devenues circulantes, pourront ensuite coloniser un autre tissu en s'y fixant par le biais des interactions entre CD44 et ses différents ligands mais également en y proliférant rapidement. En effet, ces interactions protéine-ligand peuvent également stimuler la production de facteurs de croissance. Enfin, des interactions entre CD44 et des fragments d'hyaluronate sont impliquées dans l'angiogenèse<sup>274,283</sup>. Tout ceci peut conduire à la formation de métastases cancéreuses.

Ces différents mécanismes (libération des cellules, colonisation, et angiogenèse) étant liés à la quantité de protéine exprimée par la cellule, plus la quantité de CD44 à leur surface sera élevée et plus ces phénomènes seront probables. A cause de cela, il est couramment supposé que le CD44 est impliqué dans la formation de métastases cancéreuses, et que les cellules cancéreuses circulantes l'expriment très fortement.

Ainsi, avoir un système de détection capable d'identifier la présence de telles cellules cancéreuses par ciblage de la glycoprotéine transmembranaire CD44 serait très intéressant en termes de diagnostic précoce de métastases cancéreuses. C'est pourquoi nous avons cherché à développer un tel outil par le biais d'objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$ .

## 1.2. Nécessité d'un nouveau protocole de synthèse

Le protocole de synthèse précédemment mis en œuvre pour l'obtention des polymères magnétiques à empreintes de BSA ou de GFP est une synthèse conduisant à l'obtention de couches polymères relativement épaisses autour d'agrégats de nanoparticules de maghémite (Figure 56 page 60). Les empreintes situées dans l'épaisseur de la couche polymère sont donc inaccessibles pour des protéines immobilisées sur des surfaces, telles que des protéines membranaires.

La GFP, et à plus forte raison la BSA, pouvant être obtenues et employées en relativement grande quantité en tant que gabarit lors des synthèses, cette approche était alors adaptée pour obtenir les nano-hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ . Les protéines d'intérêt en nanomédecine, telles que la glycoprotéine transmembranaire CD44 étant beaucoup plus difficile à produire ou à se procurer, il est nécessaire de s'assurer que chaque protéine conduira à la formation d'une empreinte dite de surface (Figure 29d page 34), exploitable lors du ciblage cellulaire. Aucune (ou presque) ne doit être imprimée dans un site inaccessible par la suite. Il faut donc repenser le protocole de synthèse pour obtenir plus d'empreintes de surface. Ce second protocole a été mis au point en imprimant de la GFP car cette protéine est plus proche de CD44 que la BSA en termes de taille et de polarité de surface.

## 2. Les nouveaux objets hybrides $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$

### 2.1. Fonctionnalisation de la maghémite avec un agent RAFT photo-polymérisable

#### 2.1.1. Agent de fonctionnalisation

Les agents RAFT photo-polymérisables sont des composés chimiques employés lors de polymérisations radicalaires contrôlées qui agissent d'une part en tant qu'agents de transfert et qui sont capables d'amorcer la polymérisation par formation de radicaux libres lorsqu'ils sont soumis à une illumination ultra-violette. La formation des chaînes polymères aura lieu par incorporation de monomères au sein de l'agent RAFT et les polymères obtenus posséderont une sous-partie de cet agent à chacune de leurs extrémités.

L'agent RAFT photo-polymérisable que nous avons utilisé au cours de ce travail de doctorat est le tétrafluoroborate de benzyl-diazonium modifié par le N,N-diethyldithiocarbamate (DEDTC) (Figure 121). Ce sel de diazonium possède une fonction dithiocarbamate, ce qui lui confère ses propriétés d'agents de transfert. Cette molécule a été préparée par Aazdine Lamouri du laboratoire ITODYS (Université Paris Diderot) suivant un protocole publié par Griffete *et al.* en 2012<sup>284</sup>.

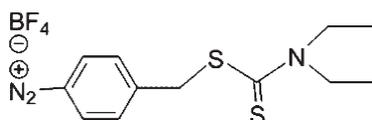


Figure 121 : Tétrahydroborate de benzyl-diazonium modifié par le N,N-diethyldithiocarbamate.

Pour que le couplage puisse avoir lieu, il faut que le milieu réactionnel contienne un réducteur. Il est alors intéressant d'exploiter le fait que la totalité des nanoparticules d'oxyde de fer n'a précédemment pas été oxydée en maghémite, mais qu'il reste de la magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  et donc du fer au degré d'oxydation +II. Les sels de diazonium étant des oxydants<sup>285</sup>, l'ajout du tétrafluoroborate de benzyl-diazonium-DEDTC va permettre d'oxyder la magnétite restante, et d'attacher l'agent fonctionnalisant à la surface des oxydes de fer. Bien que cette réaction soit principalement décrite en milieu basique<sup>284,286,287</sup>, elle peut également avoir lieu spontanément en milieu acide<sup>288</sup>.

Par la suite, nous chercherons à employer l'agent de fonctionnalisation présenté Figure 121 en tant qu'amorceur de polymérisation par illumination ultra-violette, et en tant qu'agent de transfert afin d'assurer le couplage entre les nanoparticules d'oxyde de fer et le polymère en croissance.

### 2.1.2. Mise en évidence de la fonctionnalisation

Le protocole de fonctionnalisation de surface étant nouveau au laboratoire, il fallait déterminer la bonne quantité d'agent fonctionnalisant à utiliser pour recouvrir le plus possible la surface des particules d'oxyde de fer tout en assurant leur stabilité dans l'eau. La mesure du rayon hydrodynamique des particules fonctionnalisées nous a permis de déterminer s'il y avait ou non agrégation, et donc de déterminer avec quelles quantités d'agent fonctionnalisant travailler. Afin de faciliter la comparaison entre particules, nous avons défini un facteur R tel que  $R = \frac{m_{RAFT}}{m_{maghémite}}$  en % que l'on nommera aussi parfois %<sub>RAFT</sub> wt.

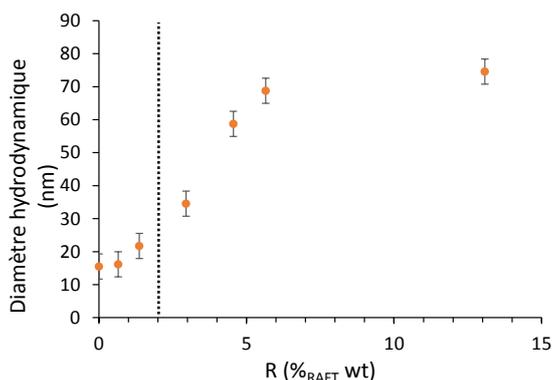


Figure 122 : Evolution du diamètre hydrodynamique des nanoparticules fonctionnalisées en fonction de la quantité initiale d'agent RAFT photo-polymérisable.

Comme on peut le voir sur la Figure 122, la taille moyenne des nanoparticules augmente légèrement en présence de l'agent RAFT photo-polymérisable pour des facteurs R compris entre 0 et 1,37 %. En effet, le diamètre hydrodynamique passe de 14 nm à 20 nm, soit une augmentation de 6 nm, ou encore une couronne de 3 nm d'épaisseur autour des particules. Ce qui est cohérent avec la présence autour des nanoparticules de l'agent RAFT photo-polymérisable employé lors de la fonctionnalisation. Au-delà, on peut observer une forte augmentation du rayon hydrodynamique des particules. En effet, il passe de 20 nm à 75 nm. Afin d'assurer la stabilité des particules fonctionnalisées, on travaillera avec un facteur R inférieur ou égal à 1,4%.

La présence d'une composante organique à la surface de la maghémite a été confirmée par la suite par détermination du potentiel Zeta des suspensions et mesure de la perte de masse à 600°C (ATG). En effet, le potentiel Zeta diminue (de  $51,3 \pm 0,8$  mV à  $44 \pm 1,3$  mV) et la perte de masse augmente légèrement (de 2%).

## 2.2. Photo-amorçage et dénaturation de protéines

L'amorçage que l'on envisage de mettre en œuvre lors de ce protocole de synthèse est un photo-amorçage faisant appel à une illumination ultra-violette (UV). Les cycles aromatiques de certains acides aminés, notamment Tyrosine, Tryptophane et Phénylalanine absorbent les rayonnements ultraviolets<sup>289</sup>, et peuvent alors être photo-ionisés, conduisant à la libération d'espèces radicalaires<sup>290-292</sup>. Creed s'est intéressé en 1984 plus spécifiquement aux phénomènes physico-chimiques pouvant avoir lieu pour le Tryptophane<sup>293</sup> et la Tyrosine<sup>294</sup> après illumination UV. Cette revue mentionne que la photo-ionisation de ces acides aminés n'a jamais été observée après l'emploi de rayonnements UV de longueur d'onde supérieure à 300 nm. Quelques décennies plus tard, en 2016, Panikkanvalappil *et al.*<sup>295</sup> ont démontré qu'une exposition continue aux UV de type C (UV-C) à 254 nm de différentes lignées cellulaires pouvait endommager les protéines intracellulaires, tandis qu'après une exposition

dans les mêmes conditions aux UV de type A (UV-A) à 365 nm, ces effets n'ont pas été observés. Xie *et al.* ont quant à eux exposé quatre protéines différentes (BSA, OVA, hémoglobine bovine et myoglobine) à des UV-A à 365 nm durant 2h sans observer de dénaturation de celles-ci<sup>296</sup>.

Les UV-C (100 - 280 nm) étant très énergétiques (4,4 – 12,4 eV), ils pourront induire la photo-ionisation de certains acides aminés, causant des lésions sévères aux protéines. Les UV-A (315 – 400 nm) étant quant à eux moins énergétiques (3,1 – 3,9 eV), ils auront beaucoup moins d'effets sur celles-ci. On peut alors envisager que les protéines soient capables de maintenir leur conformation tridimensionnelle le temps d'être imprimées au sein de polymères sous application d'UV-A.

C'est pourquoi la longueur d'onde de la lampe UV choisie afin d'amorcer la polymérisation autour des nanoparticules de maghémite est de 365 nm.

### 2.3. Optimisation du protocole de synthèse avec la GFP

Comme précédemment au chapitre 2, de nombreux paramètres de synthèse peuvent être optimisés. A nouveau, nous avons fait le choix de ne travailler que sur certains d'entre eux, et de n'optimiser que les deux paramètres suivants :

- Composition du mélange de pré-polymérisation.
- Durée de l'illumination UV

Les meilleures conditions de synthèse ont été déterminées par la réalisation d'isothermes d'adsorption. La masse totale de particules disponibles pouvant varier entre les différentes synthèses, pour les concentrations initiales en GFP nous raisonnerons ici plutôt en mg/mol<sub>fer</sub>, et non en mg/mL.

#### 2.3.1. Composition du mélange de pré-polymérisation

L'agent réticulant ne fait normalement pas partie du mélange de pré-polymérisation, et nous avons cherché à déterminer si cela influençait sur les propriétés finales des PEP magnétiques obtenus. Des isothermes d'adsorption ont été réalisées sur des objets hybrides imprimés et non-imprimés obtenus après 5h d'illumination UV et dont le milieu de pré-polymérisation différait par la présence potentielle de l'agent réticulant. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 123 (MBAM initial : MBAM dans le mélange de pré-polymérisation).

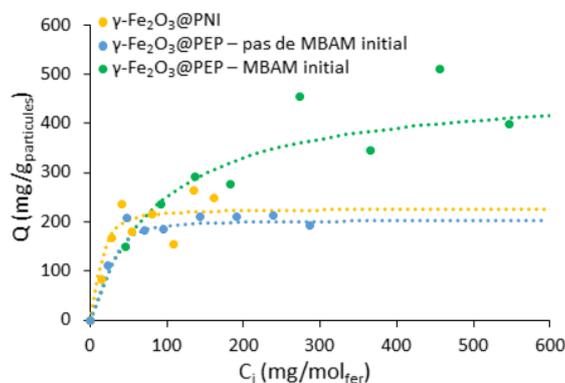


Figure 123 : Isothermes d'adsorption par des objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$ , ou  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ -GFP obtenus avec différents mélanges de pré-polymérisation, contenant ou non l'agent réticulant (le MBAM : méthylène-bis-acrylamide).

Les polymères imprimés synthétisés à partir d'un mélange de pré-polymérisation ne contenant pas l'agent réticulant adsorbent autant de GFP que les polymères non imprimés (courbes bleue et jaune respectivement sur la Figure 123) tandis que les polymères imprimés synthétisés à partir d'un mélange

de pré-polymérisation contenant l'agent réticulant présentent une meilleure capacité d'adsorption vis-à-vis de la GFP (courbe verte). En l'absence de l'agent réticulant dans le milieu de pré-polymérisation), la dénaturation de la protéine sous action des rayons ultra-violet peut intervenir avant la formation d'un polymère suffisamment rigide pour conserver la forme de la protéine native, bien que le polymère final soit tout de même réticulé. En présence des monomères d'agent réticulant, ceux-ci vont également s'organiser autour de la protéine lors de la formation des complexes de pré-polymérisation. Une structure réticulée rigide peut alors apparaître dès les premiers instants de l'illumination UV, permettant de maintenir la conformation de la protéine native et donc de former les empreintes.

En conclusion, il semble nécessaire d'ajouter l'agent réticulant au milieu de pré-polymérisation, pour que celui-ci puisse également s'organiser autour de la protéine à imprimer.

### 2.3.2. Durée d'illumination

Nous avons ensuite cherché à optimiser la durée d'illumination UV, pour synthétiser un polymère suffisamment épais pour contenir des empreintes, en un temps suffisamment court pour ne pas modifier la structure tridimensionnelle des protéines à imprimer.

Nous nous sommes d'abord intéressés à l'influence de la durée d'illumination sur la capacité d'adsorption de nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$ . Comme nous pouvons le voir sur la Figure 124, les isothermes d'adsorption ne diffèrent pas significativement les unes des autres. Une fois le polymère formé autour des nanoparticules magnétiques, son épaisseur n'influence que peut le nombre de sites potentiels d'adsorption non-spécifique. Nous avons décidé pour la suite de l'étude de ne faire apparaître qu'une isotherme d'adsorption sur les objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$ , pour ne pas surcharger les figures.

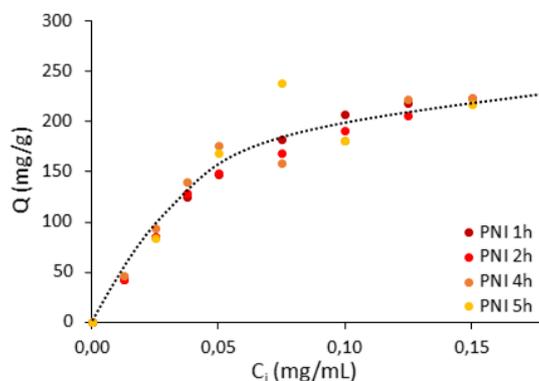


Figure 124 : Isothermes d'adsorption de la GFP sur des polymères non imprimés obtenus en faisant varier le temps d'illumination UV lors de la synthèse.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence de la durée d'illumination sur la capacité d'adsorption des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ . Après formation des complexes de pré-polymérisation en présence de l'agent réticulant, la synthèse du polymère se fait sous illumination UV durant 1h à 5h. Les résultats obtenus sont regroupés sur la Figure 125 sous forme d'isothermes d'adsorption. La Figure 125a est un agrandissement des isothermes globales (Figure 125b) afin de mieux appréhender l'adsorption de la GFP aux petites concentrations ( $C_i$  compris entre 0 et 200 mg/mol<sub>fer</sub>).

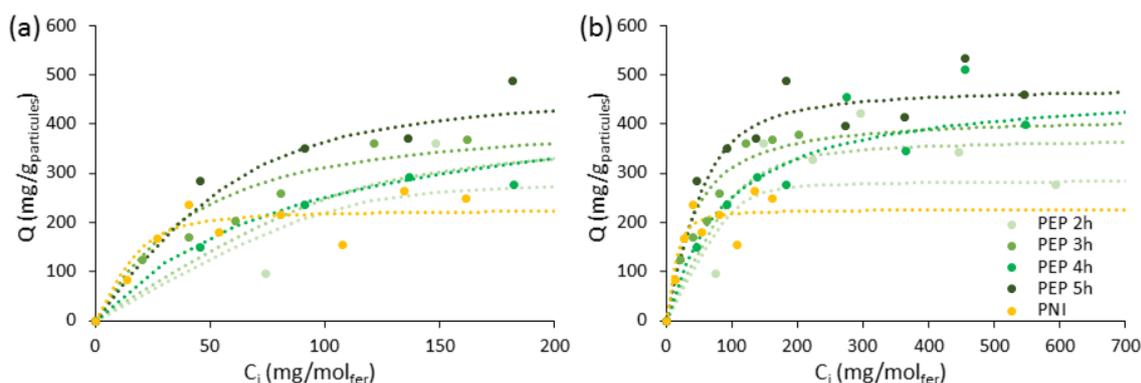


Figure 125 : Isothermes d'adsorption sur des polymères magnétiques non imprimés ou à empreintes de GFP obtenus après différentes durées d'illumination. Pointillés : modélisations par des équations de Langmuir.

La Figure 125 nous indique que la capacité d'adsorption des polymères à empreintes de GFP augmente avec la durée d'illumination du mélange réactionnel. En effet elle passe de 285 mg/g pour des PEP magnétiques obtenus avec 1h d'illumination, à 498 mg/g pour des PEP magnétiques obtenus après 5h d'illumination. Lorsque la durée d'illumination est faible, une couche polymère peu épaisse commence à se former. Après extraction, les protéines laisseront des cavités insuffisamment profondes pour être considérées comme des empreintes. La présence du polymère fournit cependant des points d'interaction pour de l'adsorption non-spécifique. Lorsque la durée d'illumination augmente, la couche de polymère s'épaissit, jusqu'à pouvoir effectivement contenir des empreintes, qui participeront alors activement à la reconnaissance des protéines et augmenteront drastiquement la capacité d'adsorption des nano-objets hybrides.

Revenons maintenant un instant aux résultats présentés au chapitre 3. Certains d'entre eux concernent aussi les performances en adsorption de nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ , obtenus à l'aide d'un autre protocole de synthèse. Il nous est alors apparu intéressant de regarder si la méthode d'amorçage du polymère influait sur la spécificité (Tableau 17).

Méthode d'amorçage	Type de polymère	Q <sub>max</sub> (mg/g)	IF
Décomposition rédox 18h de polymérisation	PEP	57,5	2,31
	PNI	24,9	/
Illumination UV 5h de polymérisation	PEP	498	2,34
	PNI	213	/

Tableau 17 : Comparaison des performances en adsorption des polymères à empreintes de GFP obtenus avec deux méthodes différentes d'amorçage de polymérisation.

Le Tableau 17 nous indique que les deux méthodes de synthèse produisent des particules de spécificité similaire vis-à-vis de la GFP. En effet, les facteurs d'impression sont de 2,31 et 2,34. Ce résultat n'est pas très surprenant car la spécificité d'un polymère est liée aux nombres d'empreintes formées mais aussi à sa nature. Dans les deux cas, nous employons de l'acrylamide : les protéines vont interagir de la même manière avec celui-ci. Et si avec la seconde méthode de polymérisation on parvient à créer plus d'empreintes par nano-objet hybride, on a également des particules plus petites (170 nm contre 415 nm) et donc plus de surface disponible pour adsorber de manière non-spécifique des protéines. Ces deux effets pouvant se compenser, on obtient des PEP de spécificité similaire. La spécificité est donc ici une caractéristique intrinsèque à la nature du polymère, et ne dépend pas de sa méthode de synthèse.

2.3.3. Caractérisations des objets obtenus  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  photo-polymérisés

Seuls les principaux résultats concernant la morphologie, la taille et la sélectivité des nano-objets hybrides synthétisés sont présentés ici. Pour plus de détails, le lecteur est invité à se référer à la communication parue chez ACS Applied Polymer Materials (copyright ACS)<sup>297</sup>.

## 2.3.3.1. Structure et morphologie

Les clichés MET obtenus pour les nano-objets hybrides photo-polymérisés montrent des nanoparticules de maghémite au sein d'un polymère, peu contrasté (Figure 126), qui ne forme pas de couche homogène autour des nanoparticules.

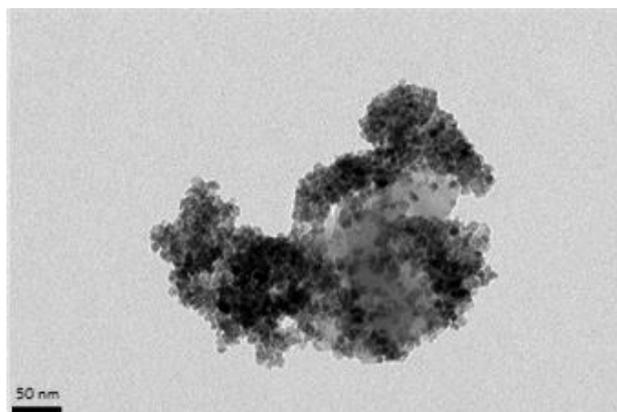


Figure 126 : Clichés TEM de nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ -CD44.

A partir des clichés TEM, on peut estimer que les objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ -CD44 ont une taille de l'ordre de 350 nm, ce qui est cohérent avec la taille moyenne de ces mêmes objets mesurée par diffusion dynamique de la lumière, et qui est de 390 nm.

Il est intéressant de noter une augmentation du diamètre hydrodynamique de ces nano-objets hybrides après 7 jours passés dans un milieu de culture cellulaire. Celui-ci passe de  $390 \pm 48$  nm à  $670 \pm 56$  nm. Cela peut s'expliquer par une agrégation faible des particules, mais plus vraisemblablement par la formation d'une épaisse couronne de protéines autour des nano-hybrides, les protéines étant présentes dans le milieu de culture, telles que les facteurs de croissance.

## 2.3.3.2. Le polymère est sélectif du gabarit

Afin de déterminer si le polymère imprimé synthétisé est bien sélectif de la protéine employée en tant que gabarit, nous avons mesuré la capacité d'adsorption de nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ -GFP et  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$  vis-à-vis de l'OVA et du Lyz (dont les caractéristiques en termes de masse, forme et point isoélectrique sont présentées page 87 du chapitre 3). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 18.

	Q ( $\mu\text{mol/g}$ ) GFP	Q ( $\mu\text{mol/g}$ ) Lyz	Q ( $\mu\text{mol/g}$ ) OVA
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ -GFP	17,1	9,3	8,6
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$	9,2	8,9	10,3

Tableau 18 : Capacité d'adsorption des nano-objets hybrides de polymère magnétique imprimé et non-imprimé vis-à-vis de la protéine fluorescente verte, l'ovalbumine et le lysozyme.

Comme on peut le voir, les objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  adsorbent environ deux fois plus de GFP que de lysozyme ou d'ovalbumine. Le polymère est bien sélectif de la GFP. La photo-polymérisation de l'acrylamide permet la formation des sites de reconnaissance spécifique.

Il est également intéressant de noter l'absence de différences significatives dans les capacités d'adsorption d'une part du PEP magnétique vis-à-vis du lysozyme et de l'ovalbumine, et d'autre part du PEP et du PNI magnétiques vis-à-vis de chacune des protéines compétitrices. Ce dernier résultat indique que l'adsorption de ces protéines est une adsorption purement non-spécifique, liée à la nature même du polymère et non pas aux empreintes.

### 2.3.3.3. Robustesse du protocole de synthèse

Avant de travailler avec la protéine CD44 et afin de vérifier la robustesse du protocole de synthèse, nous l'avons appliqué pour imprimer trois protéines classiques de tailles et points isoélectriques variés : l'albumine de sérum bovin (BSA), l'ovalbumine (OVA) et le lysozyme (Lyz). Les caractéristiques de ces protéines se retrouvent aux chapitres 2 et 3 (page 64 et page 87 respectivement). Une fois les nano-objets hybrides obtenus, nous avons réalisé des isothermes d'adsorption des protéines imprimées correspondantes.

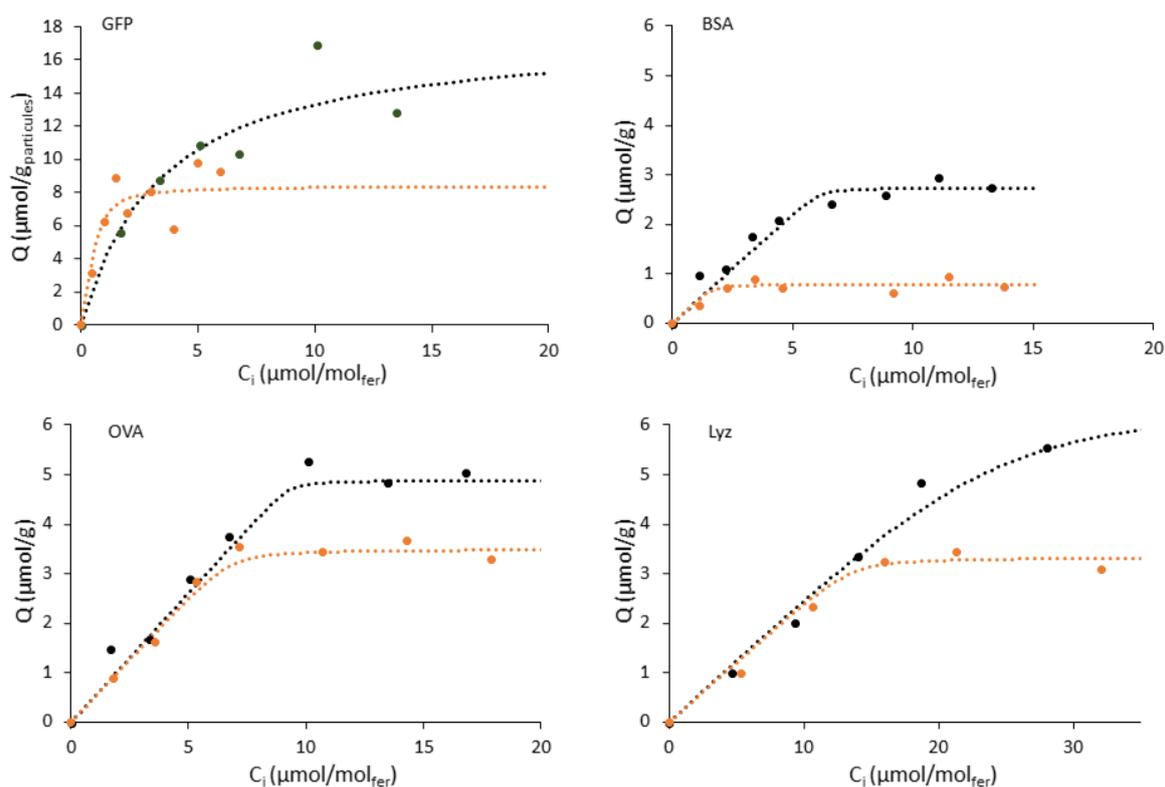


Figure 127 : Isothermes d'adsorption de la GFP, la BSA, l'OVA et le Lyz sur les polymères magnétiques imprimés correspondants (noir) ou non imprimés (orange).

Tous les polymères imprimés adsorbent plus de protéines ayant servi de gabarit que les polymères non imprimés correspondants (Figure 127). Il y a donc bien présence d'empreintes susceptibles de reconnaître les protéines natives. En observant plus en détails la Figure 127, on peut remarquer que les hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-BSA}$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-OVA}$  et  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-Lyz}$  présentent des capacités d'adsorption inférieures à celle que nous avons obtenue pour les hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$ . Au vu des points isoélectriques des différentes protéines (Tableau 2 page 64 et Tableau 8 page 87) et du solvant de synthèse (HEPES, pH=8, 200 mM), il semblerait que la GFP, protéine la moins chargée, soit

la protéine la plus susceptible d'interagir fortement avec les monomères fonctionnels, neutres, ce qui conduit à l'obtention d'une capacité d'adsorption plus élevée.

Le protocole de synthèse ici développé pour imprimer la GFP est donc robuste, car il permet également d'obtenir des polymères à empreintes de BSA, d'OVA et de Lyz. Nous l'avons par la suite appliqué à l'obtention de nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$ .

### 3. Ciblage de cellules sur-exprimant la glycoprotéine transmembranaire CD44

Une fois les objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$  synthétisés, la capacité d'adsorption et le facteur d'impression ont été déterminés *in vitro*, puis nous nous sommes intéressés à leur emploi possible afin de cibler des cellules cancéreuses exprimant CD44 à leur surface.

#### 3.1. Mesure de la capacité d'adsorption et du facteur d'impression

La protéine imprimée ici est onéreuse et disponible en faibles quantités seulement. Nous n'avons donc pas pu caractériser en détails les performances d'adsorption *in vitro* des nano-objets hybrides. Nous avons uniquement cherché à déterminer la capacité d'adsorption des objets obtenus ainsi que le facteur d'impression, afin de s'assurer de la présence des empreintes.

Nano-objet hybride	Q (mg/g)	IF
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$	36,37	2,35
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$	15,48	/

Tableau 19 : Capacité d'adsorption des nano-objets hybrides imprimés ou non vis-à-vis de CD44.

Les résultats du Tableau 19 nous montrent que la synthèse des empreintes est effective, les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$  adsorbant 2,35 fois plus de CD44 que les objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$ .

#### 3.2. Cellules cancéreuses humaines et toxicité des nano-objets hybrides

Avant de déterminer les performances en ciblage de nos objets hybrides, des cellules sur-exprimant CD44 ont été cultivées, et des tests de cytotoxicité ont été menés. Ces études ont été menées en collaboration avec l'Institut Galien, et notamment Stéphanie Denis qui m'a formée à la culture cellulaire et à la réalisation des tests de toxicité.

##### 3.2.1. Les cellules MDA-MB 231

Les cellules MDA-MB 231 représentent une des lignées cancéreuses que l'on retrouve fréquemment dans les cancers du sein invasifs d'origine métastatique<sup>298,299</sup>. Il s'agit d'une des lignées des cancers du sein les plus étudiées dans les laboratoires de recherche. Qualifiée de triple négative car ne possédant pas de récepteurs aux estrogènes ou à la progestérone, ou encore le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain, ce type de cancer est particulièrement agressif et les possibilités de le traiter sont limitées<sup>300,301</sup>. C'est pourquoi développer de nouvelles méthodes de ciblage envers les

cellules cancéreuses triple négatives est crucial et nous avons ainsi cherché à travailler avec cette lignée cellulaire, et à la reconnaître grâce aux protéines CD44 qu'elle exprime à sa surface<sup>302</sup>.

### 3.2.2. Cytotoxicité des nano-objets hybrides

La viabilité des cellules MDA-MB 231 (test MTT) suivant différentes conditions expérimentales est présentée sur la Figure 128. Les valeurs de viabilité sont normalisées par rapport aux cellules contrôle.

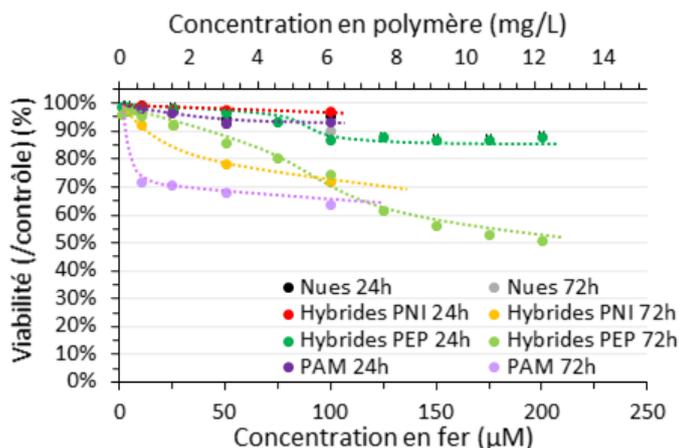


Figure 128 : Viabilité à 24h et 72h des cellules MBA-MD 231 traitées par différentes nanoparticules à différentes concentrations (test MTT). PAM : polyacrylamide à des concentrations équivalentes à celles apportées par les objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$ , hybrides PEP :  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$  et hybrides PNI :  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$ .

La première chose à remarquer sur la Figure 128 est que quelle que soit la nature des particules et leur concentration, la viabilité cellulaire après 24h est au minimum de 85%, résultat plutôt élevé qui dénote l'absence de toxicité aigüe des particules.

Après trois jours d'incubation, d'autres tendances se précisent. Les particules d'oxyde de fer nues ne semblent pas être fortement toxiques pour les cellules, résultat cohérent avec ce que l'on peut trouver dans la littérature<sup>303</sup>. Dans un même temps, le polyacrylamide induit une forte diminution de l'activité métabolique des cellules, et la viabilité oscille entre 60% et 70% tout en étant très peu sensible à la concentration initiale en polymère. Les nano-objets hybrides quant à eux présentent un comportement intermédiaire.

Afin de pouvoir considérer l'absence d'effet cytotoxique des particules, nous nous sommes imposé d'avoir une viabilité cellulaire de minimum 75% après 72h d'incubation. C'est pourquoi nous travaillerons par la suite lors des tests de ciblage principalement avec une concentration en particules hybrides équivalente à 50 µM en fer et 3,05 mg/L en polymère.

### 3.3. Ciblage cellulaire

Les tests de ciblage ont été réalisés en collaboration avec Hervé Hillaireau et Juliette Vergnaud de l'Institut Galien, qui m'ont formée sur le cytomètre en flux et aidée à l'interprétation des résultats

Les tests de ciblage des cellules MDA-MB 231 ont été effectués en prenant comme contrôle l'adsorption de particules hybrides non-imprimées à la surface des cellules. En effet, comme discuté précédemment, la nature même du polymère peut induire une adsorption non-spécifique des protéines. Il est nécessaire de connaître celle-ci pour déterminer l'efficacité du processus d'impression et la spécificité du ciblage. Un soin tout particulier a été apporté à la synthèse des objets hybrides  $\gamma$ -

$\text{Fe}_2\text{O}_3$ @PNI, afin d'obtenir une fluorescence par particule équivalente à celle que l'on a pour les nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @PEP-CD44. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 129.

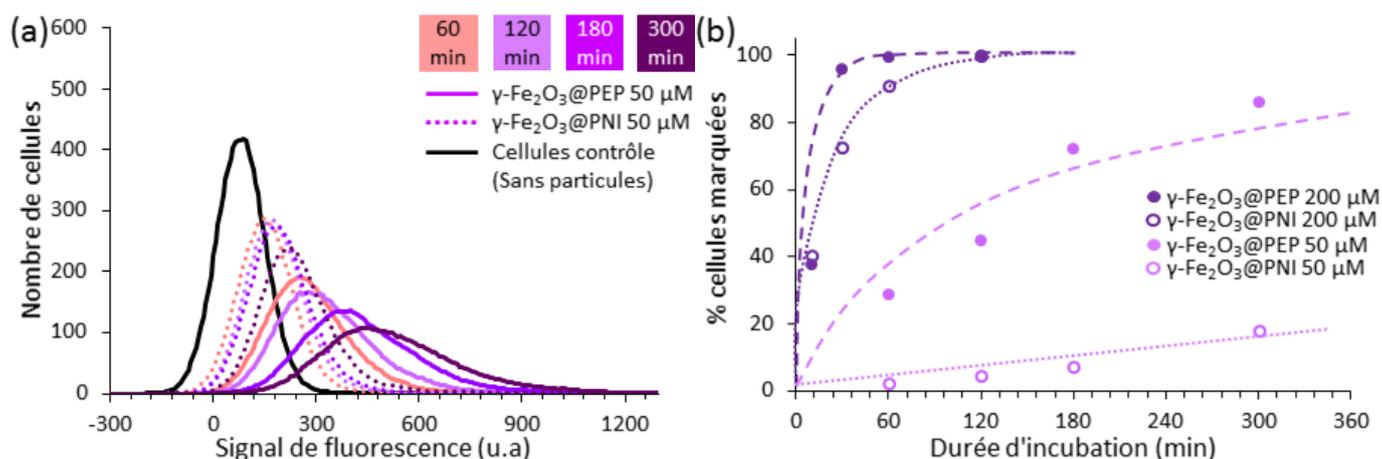


Figure 129 : Ciblage de cellules MDA-MB 231 à l'aide de nano-objets hybrides après incubation à différentes concentrations et sur différentes durées. (a) Résultats obtenus par cytométrie en flux pour des cellules ayant été incubées durant des temps variables avec des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @PEP-CD44 ou  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @PNI à une concentration équivalente en fer de 50  $\mu\text{M}$ . (b) Pourcentage de cellules marquées par les nano-objets hybrides après différentes durées d'incubation à différentes concentrations.

On peut voir sur la Figure 129a que le signal de fluorescence se décale d'autant plus vers des valeurs de forte intensité que la durée d'incubation avec les objets est grande. Les nano-objets hybrides sont donc capables de marquer les cellules. De plus, pour chaque temps d'incubation testé, le décalage en intensité est plus important pour les cellules incubées avec les hybrides PEP magnétiques (traits pleins) qu'avec les hybrides PNI magnétiques (traits pointillés).

Afin d'analyser de façon un peu plus précise les résultats obtenus par cytométrie en flux tels que présentés sur la Figure 129a, il faut déterminer un seuil de fluorescence au-delà duquel le signal mesuré est considéré comme lié à la présence de la rhodamine et non pas à l'auto-fluorescence des cellules. Ce seuil a été fixé à 0,12% de cellules contrôles positives. La fluorescence à laquelle nous nous intéressons par la suite vient donc a priori bien de la Rhodamine et donc des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @PEP-CD44 et  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @PNI.

En incubant les particules hybrides à 200  $\mu\text{M}$  avec les cellules, celles-ci sont presque toutes marquées immédiatement (Figure 129b, violet). En effet, plus de 95% des cellules sont marquées par les objets hybrides PEP magnétiques après seulement 30 minutes d'incubation. Les particules sont peut-être trop concentrées pour qu'un effet des empreintes soit détectable. De plus, la forte concentration peut favoriser l'endocytose des particules. Le signal détecté en cytométrie en flux sera le même que pour des particules adsorbées sur les cellules, sans que le ciblage ait eu lieu.

En incubant les particules à 50  $\mu\text{M}$  avec les cellules, leur marquage est plus lent : seulement 30% des cellules sont marquées après 1h d'incubation, contre 100 % à la concentration précédente. Mais les objets-hybrides peuvent quand même se fixer sur les MDA-MB 231 (Figure 129b, mauve). De plus, on observe que pour un même temps d'incubation l'on marque bien plus de cellules avec les objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @PEP-CD44 qu'avec les objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @PNI (12 fois plus de cellules marquées après 1h d'incubation et 4,7 fois plus après 5).

Bien qu'il existe une part d'adsorption non-spécifique et qu'il faille définir avec attention la concentration de travail, le ciblage des cellules à l'aide des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @PEP-CD44 est effectif.

#### 4. Conclusion sur les performances des objets hybrides photo-polymérisés

Après avoir développé un nouveau protocole de synthèse pour les objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$ , nous les avons caractérisés puis nous nous sommes intéressés à leurs performances en termes d'adsorption, d'abord *in vitro* puis en milieu biologique.

Obtenir des polymères magnétiques à empreintes de protéines par photo-polymérisation est possible, car nous avons imprimé avec succès la protéine fluorescente verte, l'albumine de sérum bovin, l'ovalbumine, et le lysozyme grâce à cette méthode d'amorçage. L'optimisation du protocole de synthèse a permis de mettre en évidence le rôle crucial de la composition du mélange de pré-polymérisation pour la formation d'empreintes de protéines dans leur configuration native. Les polymères obtenus grâce à cette méthode d'amorçage présentent des facteurs d'impression similaire à ceux calculés pour les polymères obtenus par amorçage rédox. Le facteur d'impression est donc une caractéristique inhérente à la nature du polymère, et non à sa méthode d'obtention.

Dans un second temps, des objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$  ont été synthétisés afin de reconnaître spécifiquement la glycoprotéine transmembranaire CD44, et ce avec un facteur d'impression de 2,35. Lorsque ceux-ci sont mis en présence de cellules MDA-MB 231 à des concentrations inférieures à 100  $\mu\text{M}$ , ils ne présentent pas de toxicité aigüe et sont capables de cibler la protéine CD44 exprimée à la surface des cellules.

L'objectif fixé est donc atteint, nous avons synthétisé avec succès un polymère à empreintes de protéines capable d'effectuer du ciblage cellulaire.

Au cours de ces travaux, la détermination du ciblage des cellules à l'aide des objets hybrides s'est faite uniquement par cytométrie en flux. Cette méthode ne permettant pas de discriminer de façon certaine entre la fluorescence due aux particules adsorbées en surface des cellules et la fluorescence des particules internalisées, il aurait été intéressant de compléter ces résultats en effectuant des observations des cellules par microscopie confocale de fluorescence.

#### 5. Matériels et méthodes

##### 5.1. Réactifs employés

Les nanoparticules de maghémite ont été synthétisées suivant le protocole décrit dans le chapitre 2 page 70. L'agent de fonctionnalisation, le tétrafluoroborate de benzyl-diazonium modifié N,N-diethylthiocarbamate a été synthétisé par Aazdine Lamouri (laboratoire ITODYS, Université Paris Diderot). La GFP a été produite par l'institut Curie. Nous nous sommes procuré les autres réactifs auprès des fournisseurs suivants :

Acrylamide, méthylène-bis-acrylamide, HEPES, BSA, OVA, Lyz, milieu de culture L15, trypsine, PBS, bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium, FBS,  $\text{NaHCO}_3$ : Sigma.

Acryloxyethylthiocarbamoyl-Rhodamine B : Polysciences Inc. ; CD44 : Abnova ; mMembranes de dialyse de porosité 10kDa et 100kDa : Spectrum Labs ; acide acétique : Carlo Erba ; cellules MDA-MB 231 : ATCC ; mélange d'antibiotiques Pénicilline-Streptomycine : Gibco ; méthanol et DMSO : VWR.

## 5.2. Appareils de mesure

Les différents appareils employés pour caractériser les nano-objets hybrides obtenus ainsi que leurs performances en termes d'adsorption *in vitro* sont ceux présentés aux chapitre 2 page 66 et chapitre 3 page 105.

Les plaques 96 puitsensemencées pour effectuer les tests de cytotoxicité ont été analysées avec un lecteur de microplaques Multiskan MS Original Microplate Reader commercialisé par Thermo Labsystems. Une partie des tests de cytométrie (incubation avec les particules à 200  $\mu\text{M}$ ) a été effectuée sur un appareil BD Accuri C6 est commercialisé par BD Biosciences tandis que l'autre partie a été réalisée sur un appareil Attune NxtT développé par Thermo Fisher Scientific.

## 5.3. Fonctionnalisation de la maghémite par l'agent RAFT photo-polymérisable

La surface des nanoparticules d'oxyde de fer peut être fonctionnalisée de manière covalente en utilisant la chimie des sels de diazonium et la présence de magnétite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  résiduelle (voir page 163).

Le protocole mis en œuvre lors de cette fonctionnalisation est le suivant. Dans un premier temps, on dissout une masse connue de l'agent fonctionnalisant, le tétrafluoroborate de benzyl-diazonium modifié par le N,N-diethyldithiocarbamate (voir Figure 121), variant entre 4,8 mg et 96,5 mg, dans 30 mL d'eau distillée. Le milieu est placé 30 minutes sous agitation orbitale à 640 rpm, puis soumis à des ultrasons durant 20 min, et de nouveau placé 30 min sous agitation orbitale à 640 rpm. Et ce afin d'assurer la bonne solubilisation de l'agent RAFT dans le milieu. Dans un second temps, on ajoute au milieu précédent 4 mL d'une suspension de nanoparticules magnétiques à la concentration 2,31 M en fer, soit un ajout de 9,24 mmol de fer, ou encore 738 mg de particules. La suspension est placée sous agitation orbitale durant 24h à 320 rpm. Enfin, dans un troisième temps, les particules fonctionnalisées sont lavées par dialyse dans l'eau distillée, durant 4 jours.

On définit alors un facteur R tel que  $R = \frac{m_{RAFT}}{m_{maghémite}}$  en % que l'on nommera aussi parfois %<sub>RAFT</sub> wt.

## 5.4. Synthèse du polymère

Le protocole expérimental mis en œuvre est le suivant :

- Formation du complexe de pré-polymérisation :

Dans un flacon en plastique de 40 mL (flacon en polypropylène), on introduit 8 mL d'HEPES 200 mM, pH=8. On dissout dans le milieu 0,36 mmol de monomère acrylamide et 0,33  $\mu\text{mol}$  de protéine. On peut également ajouter directement 65  $\mu\text{mol}$  d'agent réticulant. Le milieu est placé sur un agitateur orbitale à 240 rpm durant 2 heures.

- Polymérisation :

On ajoute dans le flacon précédent 65  $\mu\text{mol}$  d'agent réticulant (le méthylène-bis-acrylamide) s'il n'est pas déjà présent lors de la formation du complexe de pré-polymérisation, éventuellement 6,5  $\mu\text{mol}$  de monomère fluorescent (tel que décrit page 55 du chapitre 2), et 5 mg de particules de maghémite fonctionnalisées avec l'amorceur photo-polymérisable. Le milieu est dégazé à l'azote durant 20 minutes, avant d'être placé, ouvert et sous bullage d'azote, sous une lampe UV irradiant à 365 nm durant un temps variant entre 1 h et 5 h.

- Purification :

La suspension obtenue est introduite dans une membrane de dialyse, elle-même placée dans un bécher rempli d'eau distillée, sous faible agitation magnétique. L'eau de dialyse est changée régulièrement jusqu'à ce qu'aucun signal n'y soit détecté par spectroscopie de fluorescence.

- Extraction de la protéine :

L'extraction de la protéine se fait suivant la méthode de dialyse mise au point lors de la synthèse des polymères à empreintes de BSA et de GFP obtenus avec un amorçage rédox (cf chapitre 2, partie 3.3.3). Après extraction de la totalité de la protéine, les nano-objets hybrides sont remis en suspension dans de l'HEPES à 200 mM, pH=8.

Les polymères non imprimés sont synthétisés de la même manière, la seule différence étant l'absence de la protéine gabarit et donc de l'étape du complexe de pré-polymérisation. L'acrylamide est ajouté en même temps que l'agent réticulant et le monomère fluorescent.

### 5.5. Réalisation d'isothermes d'adsorption

Afin d'être sûr d'être à l'équilibre pour chaque mesure de cette étude, le temps de contact entre particules hybrides et protéines à différentes concentrations est de 24h. Le protocole suivant a été mis en œuvre. Dans des flacons en plastique de 2 mL on introduit une masse connue avec précision de nano-objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-protéine}$  ou  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$  obtenus par photo-polymérisation. On ajoute ensuite 1,5 mL d'une solution de protéines dans de l'HEPES, 200 mM pH=8, à des concentrations variées, comprises entre 0 mg/mL et 0,3 mg/mL. Les flacons sont placés sur un agitateur orbitaire à 240 rpm durant 24h. Puis ils sont positionnés sur un aimant afin d'effectuer une décantation magnétique. Les surnageants sont récupérés et analysés par fluoro-spectroscopie après dilution éventuelle en fonction de leur concentration. Cette analyse permet de déterminer la quantité de protéine encore présente en solution, et donc de déduire la quantité de protéine adsorbée par les nano-objets hybrides.

Ce protocole a été mis en œuvre pour déterminer les capacités d'adsorption de polymères obtenus suivant différentes conditions expérimentales initiales, et la masse totale de particules disponibles peut varier entre les différentes synthèses. C'est pourquoi, pour les concentrations initiales en GFP nous avons raisonné en  $\text{mg}/\text{mol}_{\text{fer}}$ , et non en mg/mL.

Afin de déterminer la sélectivité des nano-objets hybrides, le protocole suivant est mis en œuvre. 0,24 mg d'objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  ou PNI sont dispersés dans une solution de protéine (GFP, Lyz ou OVA) à 20  $\mu\text{mol}/\text{mol}_{\text{fer}}$  dans l'HEPES, 200 mM pH = 8. Après 15h d'agitation à 240 rpm, une décantation magnétique est effectuée et le surnageant est analysé par spectroscopie UV-Visible afin de déterminer la concentration en protéines résiduelle et de là déduire la quantité de protéines adsorbée.

5.6. Mesure du facteur d'impression des objets hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP-CD44

Pour ce faire, 70  $\mu$ g de nano-objets hybrides ont été dispersés dans 50  $\mu$ L d'HEPES à pH=8, 200 mM, contenant 3  $\mu$ g de protéine CD44. Cette concentration a été choisie car c'est la concentration la plus faible détectable en spectroscopie UV-Visible. La masse d'objets hybrides a ensuite été ajustée afin de se placer dans des conditions permettant la saturation. Après agitation orbitale à 240 rpm durant une nuit, une décantation magnétique a eu lieu et les surnageants ont été analysés comme précédemment pour en déduire la quantité de protéines adsorbées.

## 5.7. Culture des cellules

Après une formation dispensée par Stéphanie Denis, responsable de la culture cellulaire à l'Institut Galien, j'ai pu être autonome sur la culture des cellules nécessaires à la réalisation des tests de ciblage de CD44, ainsi qu'aux tests de cytotoxicité.

Après décongélation, les cellules MDA-MB 231 ont été cultivées dans du milieu de culture Leibovitz L15 suppléé de glutamine et bicarbonate de sodium, initialement absents, de sérum fœtal de veau, contenant les facteurs de croissance, et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Au cours de leur culture, chaque changement de contenant en laboratoire des cellules est comptabilisé comme un passage, noté P, conformément aux explications fournies lors de la description de la culture des cellules souches mésenchymateuses, décrite au chapitre 4, partie 3.1.1 page 138. Les cellules employées ici pour les tests de cytotoxicité sont à P12 tandis que les cellules employées pour les tests de ciblage sont à P12 ou P13.

## 5.8. Test de cytotoxicité MTT

## 5.8.1. Le test MTT

Le test de viabilité cellulaire employé ici est le test dit « MTT ». Il s'agit d'un test à révélation retardé car il évalue l'activité métabolique de la population cellulaire étudiée après incubation avec le composé dont on cherche à déterminer la toxicité<sup>304</sup>. Pour ce faire un sel, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) est ajouté au milieu de culture à différents instants après incubation des cellules avec les nano-objets hybrides. Les cellules encore en vie vont réduire ce composé en MTT formazan, qui précipite alors sous forme de cristaux pourpres. Après dissolution de ceux-ci dans le DMSO, une mesure de l'absorbance à 570 nm du milieu permet de déterminer la quantité de sel initial convertie et de déduire le pourcentage résiduel d'activité cellulaire. Ce qui donne accès à la viabilité cellulaire. En effet, l'enzyme responsable de la réduction du MTT est une déshydrogénase mitochondriale, active seulement dans les cellules vivantes.

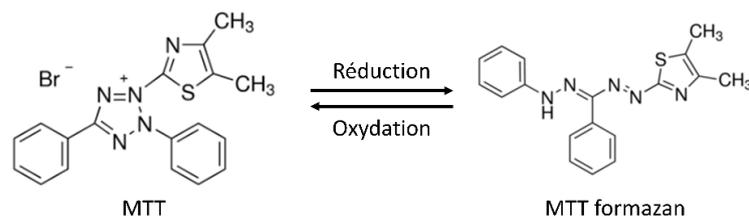


Figure 130 : Structures moléculaires du MTT et du MTT formazan. Le second précipite sous forme de cristaux pourpres, solubles le DMSO (absorbe à 570 nm).

L'absorbance des particules, et plus particulièrement des nano-objets hydrides fluorescents, a été mesurée pour chaque concentration et retirée du signal total obtenu lors du test MTT afin de ne pas fausser les résultats avec un signal dû aux particules et non pas au MTT formazan formé.

### 5.8.2. Mise en œuvre du test

Après leur culture jusqu'à P11, les cellules ont été réparties dans différents puits (10.000 cellules par puits pour le test à 24h et 5.000 pour le test à 72h) contenant du milieu de culture, ce qui constitue le 12<sup>ème</sup> passage. Après 24h, les cellules sont de nouveau adhérentes, et on ajoute alors dans les puits la solution de nanoparticules à tester. Ici, nous avons cherché à évaluer la cytotoxicité des polymères hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$  et  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$ , mais également du polymère imprimé seul (nommé uniquement PAM ou polyacrylamide par la suite) et des nanoparticules magnétiques seules, afin de déterminer l'influence de chacune des parties à la toxicité de l'hybride. Nous avons étudié plusieurs concentrations pour les différents objets, tel que présenté dans le Tableau 20, et les cellules sont placées à l'incubateur durant 24h ou 72h.

Particules étudiées	Concentrations testées	Pourquoi ?
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$	1 $\mu\text{M}$ en fer – 0,061 mg/mL en PAM	Cytotoxicité des nano-objets hybrides $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$
	4 $\mu\text{M}$ en fer – 0,244 mg/mL en PAM	
	7 $\mu\text{M}$ en fer – 0,427 mg/mL en PAM	
	10 $\mu\text{M}$ en fer – 0,61 mg/mL en PAM	
	25 $\mu\text{M}$ en fer – 1,51 mg/mL en PAM	
	50 $\mu\text{M}$ en fer – 3,05 mg/mL en PAM	
	75 $\mu\text{M}$ en fer – 4,56 mg/mL en PAM	
	100 $\mu\text{M}$ en fer – 6,1 mg/mL en PAM	
	125 $\mu\text{M}$ en fer – 7,61 mg/mL en PAM	
	150 $\mu\text{M}$ en fer – 9,15 mg/mL en PAM	
	175 $\mu\text{M}$ en fer – 10,66 mg/mL en PAM	
	200 $\mu\text{M}$ en fer – 12,2 mg/mL en PAM	
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	10 $\mu\text{M}$ en fer	Influence des particules d'oxyde de fer sur la cytotoxicité des nano-objets hybrides
	25 $\mu\text{M}$ en fer	
	50 $\mu\text{M}$ en fer	
	100 $\mu\text{M}$ en fer	
Polyacrylamide	0,61 mg/L	Influence du polyacrylamide sur la cytotoxicité des nano-objets hybrides
	1,51 mg/L	
	3,05 mg/L	
	6,1 mg/L	
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$	10 $\mu\text{M}$ en fer – 0,61 mg/mL en PAM	Influence des empreintes sur la cytotoxicité des nano-objets hybrides
	25 $\mu\text{M}$ en fer – 1,51 mg/mL en PAM	
	50 $\mu\text{M}$ en fer – 3,05 mg/mL en PAM	
	100 $\mu\text{M}$ en fer – 6,1 mg/mL en PAM	

Tableau 20 : Conditions expérimentales mises en œuvre lors des tests de cytotoxicité. Dans chacun des cas, deux temps de contact avec les cellules ont été étudiés : 24h et 72h. PAM : polyacrylamide.

Après incubation des cellules durant 1 à 3 jours, une solution de MTT est ajoutée à chaque puits. Au bout de trois heures environ, des petits cristaux bleus se sont formés. On retire alors le milieu de culture cellulaire et on le remplace par du DMSO afin de solubiliser ces cristaux<sup>305</sup>, puis la densité optique de la solution à 570 nm est lue. La quantité de MTT métabolisée est alors comparée entre cellules contrôles et cellules ayant été en contact avec des particules, puis traduite en termes de viabilité cellulaire. Chaque condition est testée sur 6 puits.

## 5.9. Ciblage cellulaire

### 5.9.1. Possibles biais expérimentaux lors du ciblage

Avant d'effectuer les différents tests de ciblage, plusieurs paramètres expérimentaux critiques à optimiser ont été identifiés. Il s'agit principalement de :

- la méthode de récupération des cellules après incubation avec les particules. Classiquement, les cellules MDA-MB 231 sont détachées des puits avec de la trypsine. Or il n'est pas à exclure que cette enzyme puisse également cliver les protéines CD44 et donc détacher de la surface des cellules des objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$ . Une autre manière de détacher les cellules du puits est l'emploi d'un grattoir. Cette méthode entraîne la mort d'un certain nombre de cellules, mais pourrait être intéressante si elle permet de mettre en évidence un biais introduit par l'usage de la trypsine.
- la concentration en particules ajoutées au milieu : plus la concentration est élevée, plus le risque de sédimentation des particules est important, mais à de trop faibles concentrations, la probabilité de rencontre particule – protéine diminue drastiquement.
- la durée d'incubation des particules avec les cellules, afin de leur laisser le temps de se fixer aux récepteurs en surface tout en minimisant leur internalisation.

### 5.9.2. Optimisation des conditions expérimentales – contrôle du ciblage avec $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$

Afin de déterminer les conditions expérimentales conduisant à l'obtention des meilleures performances possibles en termes de ciblage, chacun des puits de 2 plaques 12 puits ont étéensemencés avec 200.000 cellules à P12 dans 1,5 mL de milieu de culture complet. Nous avons choisi cette densité ainsi : 200.000 cellules par puits correspond à une densité équivalente à celle que nous avonsensemencée pour réaliser les tests de cytotoxicité, en considérant le moment des tests après l'ensemencement (1 jour pour le ciblage contre deux jours pour la préparation des puits pour le test MTT). Toutes les incubations se font ensuite par ajout de nano-objets hybrides dispersés dans 500  $\mu\text{L}$  de milieu de culture complet (ajout du milieu seul pour les cellules contrôle).

Concrètement, les expériences ont eu lieu telles que schématisées sur la Figure 131 (en ne représentant que les plaques réellement employées au cours de l'étude).

	Contrôle	PEP 60 m 200 $\mu\text{M}$ Trypsine	PNI 60 m 200 $\mu\text{M}$ Trypsine	Contrôle Trypsine	Contrôle Grattoir	PEP 120 m 50 $\mu\text{M}$ Grattoir	PNI 120 m 50 $\mu\text{M}$ Grattoir
PEP 10 m 200 $\mu\text{M}$ Trypsine	PNI 10 m 200 $\mu\text{M}$ Trypsine	PEP 120 m 200 $\mu\text{M}$ Trypsine	PNI 120 m 200 $\mu\text{M}$ Trypsine	PEP 60 m 50 $\mu\text{M}$ Trypsine	PEP 60 m 50 $\mu\text{M}$ Grattoir	PEP 180 m 50 $\mu\text{M}$ Grattoir	PNI 180 m 50 $\mu\text{M}$ Grattoir
PEP 30 m 200 $\mu\text{M}$ Trypsine	PNI 30 m 200 $\mu\text{M}$ Trypsine			PNI 60m 50 $\mu\text{M}$ Trypsine	PNI 60m 50 $\mu\text{M}$ Grattoir	PEP 300 m 50 $\mu\text{M}$ Grattoir	PNI 300 m 50 $\mu\text{M}$ Grattoir

Figure 131 : Conditions expérimentales appliquées aux différentes cellulesensemencées dans des plaques 12 puits. m : minutes. PEP et PNI désignent respectivement les objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$  et  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$ .

Nous avons d'abord testé une concentration en particules incubées de 200  $\mu\text{M}$ , pour des durées variant entre 10 et 120 minutes (Figure 131 puits orangés). A la fin de l'incubation, les puits contenant les cellules sont lavés deux fois avec 1 mL de PBS, puis les cellules sont détachées avec de la trypsine. Pour ce faire, on ajoute 250  $\mu\text{L}$  de trypsine puis on place 3 minutes à l'incubateur. On arrête ensuite l'action de l'enzyme par ajout de 750  $\mu\text{L}$  du milieu de culture complet. On centrifuge alors la suspension

cellulaire 5 min à 1000 rpm puis on re-disperse le culot de cellules dans 750  $\mu\text{L}$  de PBS. La suspension cellulaire est alors analysée par cytométrie en flux en pompant l'échantillon à 14  $\mu\text{L}/\text{min}$  et en mesurant l'intensité de fluorescence de 10.000 cellules. Les résultats sont analysés suivant la méthode décrite en annexe 3 page 223.

Cependant, le détachement des cellules par la trypsine peut induire un biais en décrochant des particules fixées à leur surface. Nous avons donc voulu voir si la méthode de détachement avait une réelle influence sur les résultats obtenus. Pour ce faire, des nano-objets hybrides à une concentration de 50  $\mu\text{M}$  ont été incubés durant 1h avec des cellules (Figure 131 puits bleus pâles). Celles-ci ont ensuite été détachées par action de la trypsine tel que décrit ci-dessus ou en grattant délicatement le fond du puits à l'aide d'un outil adapté, avant de centrifuger la suspension de cellules ainsi formée (5 min, 1000 rpm) et de re-disperser les cellules dans 750  $\mu\text{L}$  de PBS. La suspension cellulaire est alors analysée par cytométrie en flux en pompant l'échantillon à 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  et en mesurant l'intensité de fluorescence de 10.000 cellules. Les résultats analysés suivant la méthode décrite en annexe 3 page 223.

	% de cellules marquées
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$ - Trypsine	27,70
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$ - Grattoir	29,00
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$ - Trypsine	2,31
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$ - Grattoir	2,35

**Tableau 21 : Cellules marquées par les objets hybrides en fonction de la méthode de détachement.**

Les résultats obtenus ne varient pas significativement en fonction de la méthode de détachement (Tableau 21) mais pour des raisons pratiques, notamment le temps limité lors des tests effectués avec la faible concentration en particules, les autres cellules des puits bleus (Figure 131) ont également été détachées avec un grattoir. L'absence de différence entre résultats obtenus pour un détachement avec la trypsine ou un détachement manuel indique qu'il sera possible de comparer l'ensemble des résultats obtenus lors de ces tests de ciblage.



# Conclusion générale et perspectives



Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés au développement d'un nouveau système hybride composé d'un polymère à empreintes de protéines couplé à des nanoparticules magnétiques, en allant de la synthèse à la dégradation en tissu cellulaire, et en considérant également ses applications potentielles en nanomédecine (ciblage cellulaire et dénaturation de protéines).

La fonctionnalisation de surface des nanoparticules magnétiques a été réalisée afin de pouvoir amorcer une polymérisation d'acrylamide. En présence des protéines ciblées, utilisées comme gabarits, cette polymérisation mène à l'obtention de nano-objets hybrides magnétiques  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  (PEP : polymères à empreintes de protéines). En absence de protéines, nous obtenons des particules hybrides magnétiques  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PNI}$  (PNI : polymère non imprimé). Les objets obtenus ont été caractérisés avec attention, afin de déterminer notamment la part organique, et donc de polymère, au sein de l'hybride, mais également leur taille et leur capacité à produire de la chaleur par application d'un champ magnétique alternatif (hyperthermie magnétique).

Par la suite, l'adsorption des nano-objets hybrides a été caractérisée par de nombreux tests *in vitro*. Ceux-ci ont permis d'optimiser le protocole de synthèse mis en œuvre pour leur obtention, et également de mettre en évidence la sélectivité des PEP magnétiques vis-à-vis de la protéine ayant servi de gabarit lors de l'impression. L'étude d'objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  spécifiques de la GFP a permis de montrer l'absence de désorption de la protéine sans action d'un stimulus chimique extérieur. Nous avons également pu démontrer que la protéine adsorbée par le polymère peut être dénaturée par la chaleur dégagée par les nanoparticules magnétiques lors de l'application d'un champ magnétique alternatif. Enfin, le ciblage de cellules exprimant la GFP à leur surface à l'aide d'objets  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  est convaincant, et dans ce cas, il est encore possible de dénaturer par hyperthermie magnétique les protéines adsorbées. L'étape suivante est alors de s'intéresser au devenir de ces objets après leur adsorption à la surface de cellules.

Le devenir des nano-objets en tampon lysosomal (tampon d'acide citrique au pH proche de 4,8) se traduit par une dégradation de ceux-ci par les agents chélatants du fer. Ce résultat a été confirmé par observation de la dégradation des objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-GFP}$  dans des amas formés de cellules souches mésenchymateuses humaines durant trois semaines. Cette dégradation s'accompagne d'une forte expression de ferritines dans les cellules, protéine responsable de la prise en charge du fer au sein de l'organisme, à l'origine de la faible cytotoxicité observée pour ces objets hybrides.

Forts de ces résultats, nous avons développé un second protocole de synthèse afin de synthétiser des polymères à empreintes d'une protéine d'intérêt en nanomédecine, le complexe de différenciation 44, ou CD44. Cette protéine étant exprimée à la surface de cellules cancéreuses triple négatives, elle peut être un moyen de reconnaissance, si on l'imprime dans un PEP magnétique. Les résultats obtenus en termes de ciblage de ces cellules cancéreuses montrent l'efficacité de celui-ci, et laissent présager d'un emploi futur des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$  en nanomédecine.

Les travaux présentés ici ouvrent de nombreuses perspectives dans les différents thèmes abordés.

Tout d'abord, afin d'améliorer la sélectivité des polymères imprimés vis-à-vis de la protéine cible et notamment diminuer l'adsorption non-spécifique de protéines compétitrices, il serait avantageux de mieux optimiser la chimie du polymère. Cela peut se faire par le biais d'un mélange de monomères fonctionnels, qui peuvent être choisis après simulation numérique de leurs interactions possibles avec la protéine gabarit et les principales protéines identifiées comme compétitrices en fonction de l'application finale désirée.

Concernant la biocompatibilité des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ , il serait intéressant de passer à des tests sur petits animaux afin d'avoir une idée de leur furtivité. En effet, les nanoparticules magnétiques sans *coating* particulier présentent une clairance assez rapide, et l'influence de

l'enrobage par le PEP serait intéressante à étudier. Une étude complète de la toxicité des nanoparticules pourrait être réalisée, en considérant cette fois tous les organes impliqués dans la prise en charge et le traitement des substances étrangères, et notamment le foie et la rate. Il serait également intéressant d'effectuer un marquage isotopique au  $^{13}\text{C}$  du polymère afin de suivre sa distribution dans l'organisme, après injection mais également au cours de la dégradation des nano-objets hybrides.

Ensuite, concernant les performances des nano-objets hybrides  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$ , il serait maintenant intéressant d'aller plus loin et de démontrer la véritable inhibition de la protéine par application d'un champ magnétique alternatif. On peut alors envisager d'inoculer une tumeur faite de cellules exprimant CD44 telles que les MDA-MB 231 à de petits animaux avant de leur injecter des particules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$ . Nous pourrions ensuite appliquer un champ magnétique alternatif à une partie des animaux, et après quelques jours comparer l'état de tumeurs (taille, adhésion des cellules...) ayant ou n'ayant pas été soumises à ce champ magnétique alternatif.

A plus long terme, il serait également intéressant de synthétiser des nano-objets hybrides magnétiques possédant une double couche de polymère imprimé. La première couche serait un polymère à empreintes d'anti-cancéreux, tel que la doxorubicine. Tandis que la couche externe serait un polymère à empreintes de protéines, par exemple CD44. Le rôle des nanoparticules magnétiques serait alors double. Après avoir permis d'accumuler les nano-objets hybrides auprès des cellules à cibler, par exemple de la tumeur à traiter après injection *in vivo*, elles permettraient également d'effectuer un relargage actif de l'anticancéreux grâce à l'application d'un champ magnétique alternatif et à leurs propriétés d'hyperthermie magnétique. On peut ainsi envisager de créer un système de délivrance ciblée et contrôlée de médicaments.

# Références



1. Franks, L. M., Franks, L. M. & Teich, N. M. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. (Oxford University Press, 1997).
2. Adult soft tissue sarcoma Information | Mount Sinai - New York. *Mt. Sinai Health Syst.* at <<https://www.mountsinai.org/health-library/diseases-conditions/adult-soft-tissue-sarcoma>>
3. Alshaer, W., Hillaireau, H., Vergnaud, J., Ismail, S. & Fattal, E. Functionalizing Liposomes with anti-CD44 Aptamer for Selective Targeting of Cancer Cells. *Bioconjug. Chem.* **26**, 1307–1313 (2015).
4. Wang, H., Yue, G., Dong, C., Wu, F., Wei, J., Yang, Y., Zou, Z., Wang, L., Qian, X., Zhang, T. & Liu, B. Carboxybetaine Methacrylate-Modified Nylon Surface for Circulating Tumor Cell Capture. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 4550–4559 (2014).
5. Hasanzadeh, M., Shadjou, N. & de la Guardia, M. Cytosensing of cancer cells using antibody-based molecular imprinting: A short-review. *TrAC Trends Anal. Chem.* **99**, 129–134 (2018).
6. Ma, S., Zhou, X., Chen, Q., Jiang, P., Lan, F., Yi, Q. & Wu, Y. Multi-targeting magnetic hyaluronan capsules efficiently capturing circulating tumor cells. *J. Colloid Interface Sci.* **545**, 94–103 (2019).
7. Lv, S.-W., Wang, J., Xie, M., Lu, N.-N., Li, Z., Yan, X.-W., Cai, S.-L., Zhang, P.-A., Dong, W.-G. & Huang, W.-H. Photoresponsive immunomagnetic nanocarrier for capture and release of rare circulating tumor cells. *Chem. Sci.* **6**, 6432–6438 (2015).
8. Moll, R., Divo, M. & Langbein, L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 705 (2008).
9. Lane, E. B. & Alexander, C. M. Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Semin. Cancer Biol.* **1**, 165–179 (1990).
10. Knosel, T., Emde, V., Schlüns, K., Schlag, P. M., Dietel, M. & Petersen, I. Cytokeratin profiles identify diagnostic signatures in colorectal cancer using 3D-tissue microarrays. *Cancer Res.* **66**, 213–213 (2006).
11. Bae, Y., Jang, W.-D., Nishiyama, N., Fukushima, S. & Kataoka, K. Multifunctional polymeric micelles with folate -mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Mol. Biosyst.* **1**, 242–250 (2005).
12. Griffete, N., Fresnais, J., Espinosa, A., Wilhelm, C., Bée, A. & Ménager, C. Design of magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for controlled release of doxorubicin under an alternative magnetic field in athermal conditions. *Nanoscale* **7**, 18891–18896 (2015).
13. Cazares-Cortes, E., Espinosa, A., Guigner, J.-M., Michel, A., Griffete, N., Wilhelm, C. & Ménager, C. Doxorubicin Intracellular Remote Release from Biocompatible Oligo(ethylene glycol) Methyl Ether Methacrylate-Based Magnetic Nanogels Triggered by Magnetic Hyperthermia. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 25775–25788 (2017).
14. Derfus, A. M., von Maltzahn, G., Harris, T. J., Duza, T., Vecchio, K. S., Ruoslahti, E. & Bhatia, S. N. Remotely Triggered Release from Magnetic Nanoparticles. *Adv. Mater.* **19**, 3932–3936 (2007).

15. Moradi-Kalbolandi, S., Hosseinzade, A., Salehi, M., Merikhian, P. & Farahmand, L. Monoclonal antibody-based therapeutics, targeting the epidermal growth factor receptor family: from herceptin to Pan HER. *J. Pharm. Pharmacol.* **70**, 841–854 (2018).
16. Greenwood, N. N. & Earnshaw, A. *Chemistry of the Elements*. (Elsevier, 2012).
17. Schwertmann, U. & Cornell, R. M. *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*. (John Wiley & Sons, 2008).
18. Rockenberger, J., Scher, E. C. & Alivisatos, A. P. A New Nonhydrolytic Single-Precursor Approach to Surfactant-Capped Nanocrystals of Transition Metal Oxides. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 11595–11596 (1999).
19. Feldmann, C. Polyol-mediated synthesis of nanoscale functional materials. *Solid State Sci.* **7**, 868–873 (2005).
20. Deng, Y., Wang, L., Yang, W., Fu, S. & Elaïssari, A. Preparation of magnetic polymeric particles via inverse microemulsion polymerization process. *J. Magn. Magn. Mater.* **257**, 69–78 (2003).
21. Gupta, A. K. & Wells, S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Trans. Nanobioscience* **3**, 66–73 (2004).
22. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L. & Muller, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **108**, 2064–2110 (2008).
23. Wu, W., He, Q. & Jiang, C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Res. Lett.* **3**, 397 (2008).
24. LeFort, J. Mémoire sur les oxydes ferroso-ferriques et leurs combinaisons. *Compte-Rendu Académie Sci. Paris* **34**, 488 (1852).
25. Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans. Magn.* **17**, 1247–1248 (1981).
26. Zijlstra, H. in *Handb. Ferromagn. Mater.* **3**, 37–105 (Elsevier, 1982).
27. Colombo, M., Carregal-Romero, S., Casula, M. F., Gutiérrez, L., Morales, M. P., Böhm, I. B., Heverhagen, J. T., Prospero, D. & Parak, W. J. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 4306–4334 (2012).
28. Leslie-Pelecky, D. L. & Rieke, R. D. Magnetic properties of nanostructured materials. *Chem. Mater.* **8**, 1770–1783 (1996).
29. Box, G. E. P. & Lucas, H. L. Design of Experiments in Non-Linear Situations. *Biometrika* **46**, 77–90 (1959).
30. Wildeboer, R. R., Southern, P. & Pankhurst, Q. A. On the reliable measurement of specific absorption rates and intrinsic loss parameters in magnetic hyperthermia materials. *J. Phys. Appl. Phys.* **47**, 495003 (2014).

31. Jordan, A., Wust, P., Fählin, H., John, W., Hinz, A. & Felix, R. Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: Physical evaluation of their potential for hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* **9**, 51–68 (1993).
32. Jordan, A., Scholz, R., Wust, P., Fähling, H. & Roland Felix. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **201**, 413–419 (1999).
33. Maier-Hauff, K., Ulrich, F., Nestler, D., Niehoff, H., Wust, P., Thiesen, B., Orawa, H., Budach, V. & Jordan, A. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* **103**, 317–324 (2011).
34. MagForce AG – About Us. at <<https://www.magforce.com/en/unternehmen/ueber-uns.html>>
35. Hager, E. D., Birkenmeier, J. & Popa, C. Hyperthermie in der Onkologie: Eine viel versprechende neue Methode? *Dtsch. Z. Onkol.* **38**, 100–107 (2006).
36. Overgaard, J. The current and potential role of hyperthermia in radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol.* **16**, 535–549 (1989).
37. Marmor, J. B. Interactions of Hyperthermia and Chemotherapy in Animals. *Cancer Res.* **39**, 2269–2276 (1979).
38. Cazares-Cortes, E., Cabana, S., Boitard, C., Nehlig, E., Griffete, N., Fresnais, J., Wilhelm, C., Abou-Hassan, A. & Ménager, C. Recent insights in magnetic hyperthermia: From the “hot-spot” effect for local delivery to combined magneto-photo-thermia using magneto-plasmonic hybrids. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **138**, 233–246 (2019).
39. Di Corato, R., Espinosa, A., Lartigue, L., Tharaud, M., Chat, S., Pellegrino, T., Ménager, C., Gazeau, F. & Wilhelm, C. Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials* **35**, 6400–6411 (2014).
40. Guibert, C., Dupuis, V., Peyre, V. & Fresnais, J. Hyperthermia of Magnetic Nanoparticles: An Experimental Study of the Role of Aggregation. *J. Phys. Chem. C* **119**, 28148–28154 (2015).
41. Yadel, C., Michel, A., Casale, S. & Fresnais, J. Hyperthermia Efficiency of Magnetic Nanoparticles in Dense Aggregates of Cerium Oxide/Iron Oxide Nanoparticles. *Appl. Sci.* **8**, 1241 (2018).
42. Kubo, T., Tachibana, K., Naito, T., Mukai, S., Akiyoshi, K., Balachandran, J. & Otsuka, K. Magnetic Field Stimuli-Sensitive Drug Release Using a Magnetic Thermal Seed Coated with Thermal-Responsive Molecularly Imprinted Polymer. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **5**, 759–767 (2019).
43. Huang, H., Delikanli, S., Zeng, H., Ferkey, D. M. & Pralle, A. Remote control of ion channels and neurons through magnetic-field heating of nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **5**, 602–606 (2010).
44. N’Guyen, T. T. T., Duong, H. T. T., Basuki, J., Montembault, V., Pascual, S., Guibert, C., Fresnais, J., Boyer, C., Whittaker, M. R., Davis, T. P. & Fontaine, L. Functional Iron Oxide Magnetic Nanoparticles with Hyperthermia-Induced Drug Release Ability by Using a Combination of Orthogonal Click Reactions. *Angew. Chem.-Int. Ed.* **52**, 14152–14156 (2013).

## Références

45. Gareau, D., Desrosiers, A. & Vallée-Bélisle, A. Programmable Quantitative DNA Nanothermometers. *Nano Lett.* **16**, 3976–3981 (2016).
46. Dias, J. T., Moros, M., del Pino, P., Rivera, S., Grazú, V. & de la Fuente, J. M. DNA as a Molecular Local Thermal Probe for the Analysis of Magnetic Hyperthermia. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, (2013).
47. Wulff, G., Sarhan, A. & Zabrocki, K. Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates. *Tetrahedron Lett.* **14**, 4329–4332 (1973).
48. Mosbach, K. & Ramström, O. The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology. *Nat. Biotechnol.* **14**, 163–170 (1996).
49. Haupt, K. & Mosbach, K. Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors. *Chem. Rev.* **100**, 2495–2504 (2000).
50. Wulff, G. Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates—A Way towards Artificial Antibodies. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**, 1812–1832 (1995).
51. Polyakov, M. V. Adsorption properties and structure of silica gel. *Zhur Fiz Khim* **2**, 799–805 (1931).
52. Dickey, F. H. The preparation of specific adsorbents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **35**, 227–229 (1949).
53. Wulff, G. & Sarhan, A. Über die Anwendung von enzymanalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung. *Angew. Chem.* **84**, 364–364 (1972).
54. Arshady, R. & Mosbach, K. Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Makromol. Chem.* **182**, 687–692 (1981).
55. Ye, L. & Mosbach, K. Molecular Imprinting: Synthetic Materials As Substitutes for Biological Antibodies and Receptors. *Chem. Mater.* **20**, 859–868 (2008).
56. Whitcombe, M. J., Rodriguez, M. E., Villar, P. & Vulfson, E. N. A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 7105–7111 (1995).
57. Damen, J. & Neckers, D. C. Stereoselective syntheses via a photochemical template effect. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 3265–3267 (1980).
58. Wulff, G. Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers. *Chem. Rev.* **102**, 1–28 (2002).
59. Wulff, G. & Haarer, J. Enzyme-analogue built polymers, 29. The preparation of defined chiral cavities for the racemic resolution of free sugars. *Makromol. Chem.* **192**, 1329–1338 (1991).
60. Sellergren, B. Noncovalent molecular imprinting: antibody-like molecular recognition in polymeric network materials. *TrAC Trends Anal. Chem.* **16**, 310–320 (1997).

61. Andersson, L. I., Müller, R., Vlatakis, G. & Mosbach, K. Mimics of the binding sites of opioid receptors obtained by molecular imprinting of enkephalin and morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 4788–4792 (1995).
62. Liu, B., Han, M., Guan, G., Wang, S., Liu, R. & Zhang, Z. Highly-Controllable Molecular Imprinting at Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Ultrafast Enrichment and Separation. *J. Phys. Chem. C* **115**, 17320–17327 (2011).
63. Gonzato, C., Courty, M., Pasetto, P. & Haupt, K. Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanocomposites via Surface-Initiated RAFT Polymerization. *Adv. Funct. Mater.* **21**, 3947–3953 (2011).
64. Kan, X., Geng, Z., Zhao, Y., Wang, Z. & Zhu, J.-J. Magnetic molecularly imprinted polymer for aspirin recognition and controlled release. *Nanotechnology* **20**, 165601 (2009).
65. Zhang, Y., Liu, R., Hu, Y. & Li, G. Microwave Heating in Preparation of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Beads for Trace Triazines Analysis in Complicated Samples. *Anal. Chem.* **81**, 967–976 (2009).
66. Zengin, A., Yildirim, E., Tamer, U. & Caykara, T. Molecularly imprinted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for rapid enrichment and separation of cholesterol. *Analyst* **138**, 7238–7245 (2013).
67. Xu, L., Pan, J., Dai, J., Li, X., Hang, H., Cao, Z. & Yan, Y. Preparation of thermal-responsive magnetic molecularly imprinted polymers for selective removal of antibiotics from aqueous solution. *J. Hazard. Mater.* **233–234**, 48–56 (2012).
68. Bossi, A., Bonini, F., Turner, A. P. F. & Piletsky, S. A. Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 1131–1137 (2007).
69. Whitcombe, M. J., Chianella, I., Larcombe, L., Piletsky, S. A., Noble, J., Porter, R. & Horgan, A. The rational development of molecularly imprinted polymer-based sensors for protein detection. *Chem Soc Rev* **40**, 1547–1571 (2011).
70. Ge, Y. & Turner, A. P. F. Too large to fit? Recent developments in macromolecular imprinting. *Trends Biotechnol.* **26**, 218–224 (2008).
71. Janiak, D. S. & Kofinas, P. Molecular imprinting of peptides and proteins in aqueous media. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 399–404 (2007).
72. Rachkov, A. & Minoura, N. Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1544**, 255–266 (2001).
73. Ghorbani-Bidkorbeh, F. Molecular Imprinting of Peptides and Proteins. *Trends Pept. Protein Sci.* **1**, 99–108 (2017).
74. Verheyen, E., Schillemans, J. P., van Wijk, M., Demeniex, M.-A., Hennink, W. E. & van Nostrum, C. F. Challenges for the effective molecular imprinting of proteins. *Biomaterials* **32**, 3008–3020 (2011).

75. Xu, J., Ambrosini, S., Tamahkar, E., Rossi, C., Haupt, K. & Tse Sum Bui, B. Toward a Universal Method for Preparing Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles with Antibody-like Affinity for Proteins. *Biomacromolecules* **17**, 345–353 (2016).
76. Ambrosini, S., Beyazit, S., Haupt, K. & Tse Sum Bui, B. Solid-phase synthesis of molecularly imprinted nanoparticles for protein recognition. *Chem. Commun.* **49**, 6746 (2013).
77. Zhang, X., Zhang, N., Du, C., Guan, P., Gao, X., Wang, C., Du, Y., Ding, S. & Hu, X. Preparation of magnetic epitope imprinted polymer microspheres using cyclodextrin-based ionic liquids as functional monomer for highly selective and effective enrichment of cytochrome c. *Chem. Eng. J.* **317**, 988–998 (2017).
78. Koide, H., Yoshimatsu, K., Hoshino, Y., Lee, S.-H., Okajima, A., Ariizumi, S., Narita, Y., Yonamine, Y., Weisman, A. C., Nishimura, Y., Oku, N., Miura, Y. & Shea, K. J. A polymer nanoparticle with engineered affinity for a vascular endothelial growth factor (VEGF165). *Nat. Chem.* **9**, 715–722 (2017).
79. Carvalho, W. S. P., Wei, M., Ikpo, N., Gao, Y. & Serpe, M. J. Polymer-Based Technologies for Sensing Applications. *Anal. Chem.* **90**, 459–479 (2018).
80. Lieberzeit, P. A., Chunta, S., Navakul, K., Sangma, C. & Jungmann, C. Molecularly Imprinted Polymers for Diagnostics: Sensing High Density Lipoprotein and Dengue Virus. *Procedia Eng.* **168**, 101–104 (2016).
81. Dabrowski, M., Lach, P., Cieplak, M. & Kutner, W. Nanostructured molecularly imprinted polymers for protein chemosensing. *Biosens. Bioelectron.* **102**, 17–26 (2018).
82. Truta, L. A. A. N. A. & Sales, M. G. F. Carcinoembryonic antigen imprinting by electropolymerization on a common conductive glass support and its determination in serum samples. *Sens. Actuators B Chem.* **287**, 53–63 (2019).
83. Luo, J., Jiang, S. & Liu, X. Electrochemical sensor for bovine hemoglobin based on a novel graphene-molecular imprinted polymers composite as recognition element. *Sens. Actuators B Chem.* **203**, 782–789 (2014).
84. Yang, Q., Li, J., Wang, X., Peng, H., Xiong, H. & Chen, L. Strategies of molecular imprinting-based fluorescence sensors for chemical and biological analysis. *Biosens. Bioelectron.* **112**, 54–71 (2018).
85. Lv, P., Xie, D. & Zhang, Z. Magnetic carbon dots based molecularly imprinted polymers for fluorescent detection of bovine hemoglobin. *Talanta* **188**, 145–151 (2018).
86. Zhou, J., Gan, N., Hu, F., Li, T., Zhou, H., Li, X. & Zheng, L. A single antibody sandwich electrochemiluminescence immunosensor based on protein magnetic molecularly imprinted polymers mimicking capture probes. *Sens. Actuators B Chem.* **186**, 300–307 (2013).
87. Zhang, W., He, X.-W., Chen, Y., Li, W.-Y. & Zhang, Y.-K. Molecularly imprinted polymer anchored on the surface of denatured bovine serum albumin modified CdTe quantum dots as fluorescent artificial receptor for recognition of target protein. *Biosens. Bioelectron.* **31**, 84–89 (2012).

88. Piloto, A. M., Ribeiro, D. S. M., Rodrigues, S. S. M., Santos, C., Santos, J. L. M. & Sales, M. G. F. Plastic antibodies tailored on quantum dots for an optical detection of myoglobin down to the femtomolar range. *Sci. Rep.* **8**, 4944 (2018).
89. Tang, P., Zhang, H., Huo, J. & Lin, X. An electrochemical sensor based on iron( ii , iii )@graphene oxide@molecularly imprinted polymer nanoparticles for interleukin-8 detection in saliva. *Anal. Methods* **7**, 7784–7791 (2015).
90. Lee, M.-H., Thomas, J. L., Liao, C.-L., Jurcevic, S., Crnogorac-Jurcevic, T. & Lin, H.-Y. Polymers imprinted with three REG1B peptides for electrochemical determination of Regenerating Protein 1B, a urinary biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Microchim. Acta* **184**, 1773–1780 (2017).
91. Bi, X. & Liu, Z. Facile Preparation of Glycoprotein-Imprinted 96-Well Microplates for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay by Boronate Affinity-Based Oriented Surface Imprinting. *Anal. Chem.* **86**, 959–966 (2014).
92. Canfarotta, F., Lezina, L., Guerreiro, A., Czulak, J., Petukhov, A., Daks, A., Smolinska-Kempisty, K., Poma, A., Piletsky, S. & Barlev, N. A. Specific Drug Delivery to Cancer Cells with Double-Imprinted Nanoparticles against Epidermal Growth Factor Receptor. *Nano Lett.* **18**, 4641–4646 (2018).
93. E. Ekpenyong-Akiba, A., Canfarotta, F., H, B. A., Poblocka, M., Casulleras, M., Castilla-Vallmanya, L., Kocsis-Fodor, G., E. Kelly, M., Janus, J., Althubiti, M., Piletska, E., Piletsky, S. & Macip, S. Detecting and targeting senescent cells using molecularly imprinted nanoparticles. *Nanoscale Horiz.* (2019). doi:10.1039/C8NH00473K
94. Althubiti, M., Lezina, L., Carrera, S., Jukes-Jones, R., Giblett, S. M., Antonov, A., Barlev, N., Saldanha, G. S., Pritchard, C. A., Cain, K. & Macip, S. Characterization of novel markers of senescence and their prognostic potential in cancer. *Cell Death Dis.* **5**, e1528 (2014).
95. Takeuchi, T., Kitayama, Y., Sasao, R., Yamada, T., Toh, K., Matsumoto, Y. & Kataoka, K. Molecularly Imprinted Nanogels Acquire Stealth In Situ by Cloaking Themselves with Native Dysopsonic Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 7088–7092 (2017).
96. Cecchini, A., Raffa, V., Canfarotta, F., Signore, G., Piletsky, S., MacDonald, M. P. & Cuschieri, A. In Vivo Recognition of Human Vascular Endothelial Growth Factor by Molecularly Imprinted Polymers. *Nano Lett.* **17**, 2307–2312 (2017).
97. Koide, H., Yoshimatsu, K., Hoshino, Y., Ariizumi, S., Okishima, A., Ide, T., Egami, H., Hamashima, Y., Nishimura, Y., Kanazawa, H., Miura, Y., Asai, T., Oku, N. & Shea, K. J. Sequestering and inhibiting a vascular endothelial growth factor in vivo by systemic administration of a synthetic polymer nanoparticle. *J. Controlled Release* **295**, 13–20 (2019).
98. Dickert, F. L. & Hayden, O. Bioimprinting of Polymers and Sol–Gel Phases. Selective Detection of Yeasts with Imprinted Polymers. *Anal. Chem.* **74**, 1302–1306 (2002).
99. Dickert, F. L., Hayden, O., Bindeus, R., Mann, K.-J., Blaas, D. & Waigmann, E. Bioimprinted QCM sensors for virus detection—screening of plant sap. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 1929–1934 (2004).
100. Cumbo, A., Lorber, B., Corvini, P. F.-X., Meier, W. & Shahgaldian, P. A synthetic nanomaterial for virus recognition produced by surface imprinting. *Nat. Commun.* **4**, 1503 (2013).

101. Samardzic, R., Sussitz, H. F., Jongkon, N. & Lieberzeit, P. A. Quartz Crystal Microbalance In-Line Sensing of Escherichia Coli in a Bioreactor Using Molecularly Imprinted Polymers. *Sens. Lett.* **12**, 1152–1155 (2014).
102. Bao, H., Yang, B., Zhang, X., Lei, L. & Li, Z. Bacteria-templated fabrication of a charge heterogeneous polymeric interface for highly specific bacterial recognition. *Chem. Commun.* **53**, 2319–2322 (2017).
103. Bonakdar, S., Mahmoudi, M., Montazeri, L., Taghipoor, M., Bertsch, A., Shokrgozar, M. A., Sharifi, S., Majidi, M., Mashinchian, O., Hamrang Sekachaei, M., Zolfaghari, P. & Renaud, P. Cell-Imprinted Substrates Modulate Differentiation, Redifferentiation, and Transdifferentiation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 13777–13784 (2016).
104. Eersels, K., van Grinsven, B., Ethirajan, A., Timmermans, S., Jimenez Monroy, K. L., Bogie, J. F. J., Punniyakoti, S., Vandenryt, T., Hendriks, J. J. A., Cleij, T. J., Daemen, M. J. A. P., Somers, V., De Ceuninck, W. & Wagner, P. Selective Identification of Macrophages and Cancer Cells Based on Thermal Transport through Surface-Imprinted Polymer Layers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 7258–7267 (2013).
105. Liu, L., Yang, K., Gao, H., Li, X., Chen, Y., Zhang, L., Peng, X. & Zhang, Y. Artificial Antibody with Site-Enhanced Multivalent Aptamers for Specific Capture of Circulating Tumor Cells. *Anal. Chem.* **91**, 2591–2594 (2019).
106. Niu, M., Pham-Huy, C. & He, H. Core-shell nanoparticles coated with molecularly imprinted polymers: a review. *Microchim. Acta* **183**, 2677–2695 (2016).
107. Wan, L., Chen, Z., Huang, C. & Shen, X. Core-shell molecularly imprinted particles. *TrAC Trends Anal. Chem.* **95**, 110–121 (2017).
108. Li, X., Zhou, J., Tian, L., Wang, Y., Zhang, B., Zhang, H. & Zhang, Q. Preparation of anti-nonspecific adsorption polydopamine-based surface protein-imprinted magnetic microspheres with the assistance of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine and its application for protein recognition. *Sens. Actuators B Chem.* **241**, 413–421 (2017).
109. Zhang, M., Zhang, X., He, X., Chen, L. & Zhang, Y. A self-assembled polydopamine film on the surface of magnetic nanoparticles for specific capture of protein. *Nanoscale* **4**, 3141–3147 (2012).
110. Qian, L., Sun, J., Hou, C., Yang, J., Li, Y., Lei, D., Yang, M. & Zhang, S. Immobilization of BSA on ionic liquid functionalized magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for use in surface imprinting strategy. *Talanta* **168**, 174–182 (2017).
111. Lu, S., Cheng, G. & Pang, X. Protein-imprinted soft-wet gel composite microspheres with magnetic susceptibility. II. Characteristics. *J. Appl. Polym. Sci.* **99**, 2401–2407 (2006).
112. Kan, X., Zhao, Q., Shao, D., Geng, Z., Wang, Z. & Zhu, J.-J. Preparation and Recognition Properties of Bovine Hemoglobin Magnetic Molecularly Imprinted Polymers. *J. Phys. Chem. B* **114**, 3999–4004 (2010).
113. Lv, Y., Tan, T. & Svec, F. Molecular imprinting of proteins in polymers attached to the surface of nanomaterials for selective recognition of biomacromolecules. *Biotechnol. Adv.* **31**, 1172–1186 (2013).

114. Boitard, C., Bée, A., Ménager, C. & Griffete, N. Magnetic protein imprinted polymers: a review. *J. Mater. Chem. B* **6**, 1563–1580 (2018).
115. Ji, S., Li, N., Shen, Y., Li, Q., Qiao, J. & Li, Z. Poly(amino acid)-based thermoresponsive molecularly imprinted magnetic nanoparticles for specific recognition and release of lysozyme. *Anal. Chim. Acta* **909**, 60–66 (2016).
116. Zhang, L., Tang, Y., Hao, Y., He, G., Zhang, B., Gao, R. & Zhang, M. Preparation of magnetic glycoprotein-imprinted nanoparticles with dendritic polyethyleneimine as a monomer for the specific recognition of ovalbumin from egg white. *J. Sep. Sci.* **39**, 1919–1925 (2016).
117. Guo, J., Wang, Y., Liu, Y. & Zhou, Y. The synthesis of imprinted polymers based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanomaterials and the recognition of proteins. *Anal. Methods* **7**, 10018–10025 (2015).
118. Hao, Y., Gao, R., Liu, D., Zhang, B., Tang, Y. & Guo, Z. Preparation of biocompatible molecularly imprinted shell on superparamagnetic iron oxide nanoparticles for selective depletion of bovine hemoglobin in biological sample. *J. Colloid Interface Sci.* **470**, 100–107 (2016).
119. Gao, R., Kong, X., Wang, X., He, X., Chen, L. & Zhang, Y. Preparation and characterization of uniformly sized molecularly imprinted polymers functionalized with core–shell magnetic nanoparticles for the recognition and enrichment of protein. *J. Mater. Chem.* **21**, 17863–17871 (2011).
120. Chen, J., Lei, S., Xie, Y., Wang, M., Yang, J. & Ge, X. Fabrication of High-Performance Magnetic Lysozyme-Imprinted Microsphere and Its NIR-Responsive Controlled Release Property. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 28606–28615 (2015).
121. Liu, Y., Fang, S., Zhai, J. & Zhao, M. Construction of antibody-like nanoparticles for selective protein sequestration in living cells. *Nanoscale* **7**, 7162–7167 (2015).
122. Fortin, J.-P., Wilhelm, C., Servais, J., Ménager, C., Bacri, J.-C. & Gazeau, F. Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2628–2635 (2007).
123. Sidhu, P. S., Gilkes, R. J. & Posner, A. M. Mechanism of the low temperature oxidation of synthetic magnetites. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **39**, 1953–1958 (1977).
124. Frison, R., Cernuto, G., Cervellino, A., Zaharko, O., Colonna, G. M., Guagliardi, A. & Masciocchi, N. Magnetite–Maghemite Nanoparticles in the 5–15 nm Range: Correlating the Core–Shell Composition and the Surface Structure to the Magnetic Properties. A Total Scattering Study. *Chem. Mater.* **25**, 4820–4827 (2013).
125. Dorofeev, G. A., Streletskii, A. N., Povstugar, I. V., Protasov, A. V. & Elsukov, E. P. Determination of nanoparticle sizes by X-ray diffraction. *Colloid J.* **74**, 675–685 (2012).
126. Scherrer, P. in *Kolloidchem. Ein Lehrb.* (ed. Zsigmondy, R.) 387–409 (Springer Berlin Heidelberg, 1912).
127. Guibert, C., Fresnais, J., Peyre, V. & Dupuis, V. Magnetic fluid hyperthermia probed by both calorimetric and dynamic hysteresis measurements. *J. Magn. Magn. Mater.* **421**, 384–392 (2017).

128. Otsu, T. Iniferter concept and living radical polymerization. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **38**, 2121–2136 (2000).
129. Tan, C. J., Chua, H. G., Ker, K. H. & Tong, Y. W. Preparation of Bovine Serum Albumin Surface-Imprinted Submicrometer Particles with Magnetic Susceptibility through Core–Shell Miniemulsion Polymerization. *Anal. Chem.* **80**, 683–692 (2008).
130. Rosenoer, V. M., Oratz, M. & Rothschild, M. A. *Albumin: Structure, Function and Uses*. (Elsevier, 2014).
131. Righetti, P. G. & Caravaggio, T. Isoelectric points and molecular weights of proteins. *J. Chromatogr. A* **127**, 1–28 (1976).
132. Carter, D. C. & Ho, J. X. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* **45**, 153–203 (1994).
133. Wright, A. K. & Thompson, M. R. Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence. *Biophys. J.* **15**, 137–141 (1975).
134. Naik, K. M. & Nandibewoor, S. T. Spectroscopic studies on the interaction between chalcone and bovine serum albumin. *J. Lumin.* **143**, 484–491 (2013).
135. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411–2423 (1995).
136. Beyazit, S., Tse Sum Bui, B., Haupt, K. & Gonzato, C. Molecularly imprinted polymer nanomaterials and nanocomposites by controlled/living radical polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **62**, 1–21 (2016).
137. Boitard, C., Rollet, A.-L., Ménager, C. & Griffete, N. Surface-initiated synthesis of bulk-imprinted magnetic polymers for protein recognition. *Chem. Commun.* **53**, 8846–8849 (2017).
138. Chiefari, J., Chong, Y. K., Ercole, F., Krstina, J., Jeffery, J., Le, T. P., Mayadunne, R. T., Meijs, G. F., Moad, C. L., Moad, G. & others. Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: the RAFT process. *Macromolecules* **31**, 5559–5562 (1998).
139. Semsarilar, M. & Perrier, S. ‘Green’ reversible addition-fragmentation chain-transfer (RAFT) polymerization. *Nat. Chem.* **2**, 811–820 (2010).
140. Gossuin, Y., Gillis, P., Hocq, A., Vuong, Q. L. & Roch, A. Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **1**, 299–310 (2009).
141. Kruk, D., Korpała, A., Taheri, S. M., Kozłowski, A., Förster, S. & Rössler, E. A. <sup>1</sup>H relaxation enhancement induced by nanoparticles in solutions: Influence of magnetic properties and diffusion. *J. Chem. Phys.* **140**, 174504 (2014).
142. Roch, A., Muller, R. N. & Gillis, P. Theory of proton relaxation induced by superparamagnetic particles. *J. Chem. Phys.* **110**, 5403–5411 (1999).
143. Kimmich, R. *NMR: Tomography, Diffusometry, Relaxometry*. (Springer Berlin Heidelberg, 1997).

144. Rollet, A.-L., Neveu, S., Porion, P., Dupuis, V., Cherrak, N. & Levitz, P. New approach for understanding experimental NMR relaxivity properties of magnetic nanoparticles: focus on cobalt ferrite. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 32981–32991 (2016).
145. LaConte, L. E. W., Nitin, N., Zurkiya, O., Caruntu, D., O'Connor, C. J., Hu, X. & Bao, G. Coating thickness of magnetic iron oxide nanoparticles affects R2 relaxivity. *J. Magn. Reson. Imaging* **26**, 1634–1641 (2007).
146. Ye, F., Laurent, S., Fornara, A., Astolfi, L., Qin, J., Roch, A., Martini, A., Toprak, M. S., Muller, R. N. & Muhammed, M. Uniform mesoporous silica coated iron oxide nanoparticles as a highly efficient, nontoxic MRI T2 contrast agent with tunable proton relaxivities. *Contrast Media Mol. Imaging* **7**, 460–468 (2012).
147. Quinlan, G. J., Martin, G. S. & Evans, T. W. Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* **41**, 1211–1219 (2005).
148. Erickson, H. P. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biol. Proced. Online* **11**, 32–51 (2009).
149. Kiselev, M. A., Gryzunov, I. A., Dobretsov, G. E. & Komarova, M. N. [Size of a human serum albumin molecule in solution]. *Biofizika* **46**, 423–427 (2001).
150. Nisbet, A. D., Saundry, R. H., Moir, A. J. G., Fothergill, L. A. & Fothergill, J. E. The Complete Amino-Acid Sequence of Hen Ovalbumin. *Eur. J. Biochem.* **115**, 335–345 (1981).
151. Bonomi, P., Attieh, M. D., Gonzato, C. & Haupt, K. A New Versatile Water-Soluble Iniferter Platform for the Preparation of Molecularly Imprinted Nanoparticles by Photopolymerisation in Aqueous Media. *Chem. – Eur. J.* **22**, 10150–10154 (2016).
152. Klug, H. P. & Alexander, L. E. *X-Ray Diffraction Procedures: For Polycrystalline and Amorphous Materials, 2nd Edition.* (Wiley, 1974).
153. Li, X., Zhang, B., Li, W., Lei, X., Fan, X., Tian, L., Zhang, H. & Zhang, Q. Preparation and characterization of bovine serum albumin surface-imprinted thermosensitive magnetic polymer microsphere and its application for protein recognition. *Biosens. Bioelectron.* **51**, 261–267 (2014).
154. Shimomura, O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J. Microsc.* **217**, 3–15 (2005).
155. Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. & Cormier, M. J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229–233 (1992).
156. Hink, M. A., Griep, R. A., Borst, J. W., Hoek, A. van, Eppink, M. H. M., Schots, A. & Visser, A. J. W. G. Structural Dynamics of Green Fluorescent Protein Alone and Fused with a Single Chain Fv Protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 17556–17560 (2000).
157. Tsien, R. Y. The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509–544 (1998).
158. Chalfie, M. & Kain, S. R. *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols.* (John Wiley & Sons, 2005).

159. Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. & Tsien, R. Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 448–455 (1995).
160. Ormo, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A. & others. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392 (1996).
161. Runions, J. Photoactivation of GFP reveals protein dynamics within the endoplasmic reticulum membrane. *J. Exp. Bot.* **57**, 43–50 (2005).
162. Liu, Y. Some consideration on the Langmuir isotherm equation. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **274**, 34–36 (2006).
163. Freundlich, H. Über die Adsorption in Lösungen. *Z. Für Phys. Chem.* **57U**, 385–470 (1907).
164. Scatchard, G. The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660–672 (1949).
165. Huang, B. MetaPocket: a meta approach to improve protein ligand binding site prediction. *Omics J. Integr. Biol.* **13**, 325–330 (2009).
166. Lagergren, S. Zur theorie der sogenannten adsorption gelöster stoffe. *K. Sven. Vetenskapsakademiens Handl.* **24**, 1–39 (1898).
167. Simonin, J.-P. On the comparison of pseudo-first order and pseudo-second order rate laws in the modeling of adsorption kinetics. *Chem. Eng. J.* **300**, 254–263 (2016).
168. Jollès, P. Lysozymes: A Chapter of Molecular Biology. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **8**, 227–239 (1969).
169. Canfield, R. E. The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme. *J. Biol. Chem.* **238**, 2698–2707 (1963).
170. Wetter, L. R. & Deutsch, H. F. Immunological studies on egg white proteins. IV. Immunochemical and physical studies of lysozyme. *J. Biol. Chem.* **192**, 237–242 (1951).
171. Colvin, J. R. The Size and Shape of Lysozyme. *Can. J. Chem.* **30**, 831–834 (1952).
172. Inouye, S. & Tsuji, F. I. *Aequorea* green fluorescent protein: Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* **341**, 277–280 (1994).
173. Alkaabi, K. M., Yafea, A. & Ashraf, S. S. Effect of pH on thermal- and chemical-induced denaturation of GFP. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **126**, 149–156 (2005).
174. Saeed, I. A. & Ashraf, S. S. Denaturation studies reveal significant differences between GFP and blue fluorescent protein. *Int. J. Biol. Macromol.* **45**, 236–241 (2009).
175. Miesenböck, G., De Angelis, D. A. & Rothman, J. E. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* **394**, 192–195 (1998).

176. Ashby, M. C., Ibaraki, K. & Henley, J. M. It's green outside: tracking cell surface proteins with pH-sensitive GFP. *Trends Neurosci.* **27**, 257–261 (2004).
177. Gluzman, Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175–182 (1981).
178. Jensen, F. C., Girardi, A. J., Gilden, R. V. & Koprowski, H. Infection of Human and Simian Tissue Cultures with Rous Sarcoma Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **52**, 53–59 (1964).
179. Aruffo Alejandro. Transient Expression of Proteins Using COS Cells. *Curr. Protoc. Neurosci.* **2**, 4.7.1-4.7.7 (2001).
180. Gey, G. O., Coffman, W. D. & Kubicek, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**, 264–265 (1952).
181. Masters, J. R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 315–319 (2002).
182. Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S. & Reddel, R. R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* **14**, 4240–4248 (1995).
183. Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B. & Bacchetti, S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* **11**, 1921–1929 (1992).
184. Turner, T. Development of the Polio Vaccine: A Historical Perspective of Tuskegee University's Role in Mass Production and Distribution of HeLa Cells. *J. Health Care Poor Underserved* **23**, 5–10 (2012).
185. Cole, S. P. C., Sparks, K. E., Fraser, K., Loe, D. W., Grant, C. E., Wilson, G. M. & Deeley, R. G. Pharmacological Characterization of Multidrug Resistant MRP-transfected Human Tumor Cells. *Cancer Res.* **54**, 5902–5910 (1994).
186. Dutz, S., Kettering, M., Hilger, I., Müller, R. & Zeisberger, M. Magnetic multicore nanoparticles for hyperthermia—influence of particle immobilization in tumour tissue on magnetic properties. *Nanotechnology* **22**, 265102 (2011).
187. Connord, V., Clerc, P., Hallali, N., Diab, D. E. H., Fourmy, D., Gigoux, V. & Carrey, J. Real-Time Analysis of Magnetic Hyperthermia Experiments on Living Cells under a Confocal Microscope. *Small* **11**, 2437–2445 (2015).
188. Hamidi, M., Azadi, A. & Rafiei, P. Pharmacokinetic Consequences of Pegylation. *Drug Deliv.* **13**, 399–409 (2006).
189. He, Q., Zhang, J., Shi, J., Zhu, Z., Zhang, L., Bu, W., Guo, L. & Chen, Y. The effect of PEGylation of mesoporous silica nanoparticles on nonspecific binding of serum proteins and cellular responses. *Biomaterials* **31**, 1085–1092 (2010).
190. Bokman, S. H. & Ward, W. W. Renaturation of Aequorea green-fluorescent protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**, 1372–1380 (1981).

191. Ward, W. W. & Bokman, S. H. Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry* **21**, 4535–4540 (1982).
192. Muyldermans, S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 775–797 (2013).
193. Liu, Y., Hardie, J., Zhang, X. & Rotello, V. M. Effects of engineered nanoparticles on the innate immune system. *Semin. Immunol.* **34**, 25–32 (2017).
194. Liu, Y., Yin, Y., Wang, L., Zhang, W., Chen, X., Yang, X., Xu, J. & Ma, G. Surface hydrophobicity of microparticles modulates adjuvanticity. *J. Mater. Chem. B* **1**, 3888–3896 (2013).
195. Walkey, C. D., Olsen, J. B., Guo, H., Emili, A. & Chan, W. C. W. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 2139–2147 (2012).
196. Saei, A. A., Yazdani, M., Lohse, S. E., Bakhtiary, Z., Serpooshan, V., Ghavami, M., Asadian, M., Mashaghi, S., Dreaden, E. C., Mashaghi, A. & Mahmoudi, M. Nanoparticle Surface Functionality Dictates Cellular and Systemic Toxicity. *Chem. Mater.* **29**, 6578–6595 (2017).
197. Cho, E. C., Xie, J., Wurm, P. A. & Xia, Y. Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I2/KI Etchant. *Nano Lett.* **9**, 1080–1084 (2009).
198. Feliu, N., Docter, D., Heine, M., Pino, P. del, Ashraf, S., Kolosnjaj-Tabi, J., Macchiarini, P., Nielsen, P., Alloyeau, D., Gazeau, F., Stauber, R. H. & Parak, W. J. In vivo degeneration and the fate of inorganic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 2440–2457 (2016).
199. Lartigue, L., Alloyeau, D., Kolosnjaj-Tabi, J., Javed, Y., Guardia, P., Riedinger, A., Péchoux, C., Pellegrino, T., Wilhelm, C. & Gazeau, F. Biodegradation of Iron Oxide Nanocubes: High-Resolution In Situ Monitoring. *ACS Nano* **7**, 3939–3952 (2013).
200. Javed, Y., Lartigue, L., Hugounenq, P., Vuong, Q. L., Gossuin, Y., Bazzi, R., Wilhelm, C., Ricolleau, C., Gazeau, F. & Alloyeau, D. Biodegradation Mechanisms of Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers and Tunable Shield Effect of Gold Coating. *Small* **10**, 3325–3337 (2014).
201. Marsh, M. & McMahon, H. T. The Structural Era of Endocytosis. *Science* **285**, 215–220 (1999).
202. Zhao, J. & Stenzel, M. Entry of nanoparticles into cells: the importance of nanoparticle properties. *Polym. Chem.* **9**, 259–272 (2018).
203. Swanson, J. A. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 639–649 (2008).
204. Kuhn, D. A., Vanhecke, D., Michen, B., Blank, F., Gehr, P., Petri-Fink, A. & Rothen-Rutishauser, B. Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. *Beilstein J. Nanotechnol.* **5**, 1625–1636 (2014).
205. Lim, J. P. & Gleeson, P. A. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol. Amp Cell Biol.* **89**, 836–843 (2011).

## Références

206. Marsh, M. & Helenius, A. Virus Entry: Open Sesame. *Cell* **124**, 729–740 (2006).
207. Conner, S. D. & Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37–44 (2003).
208. Hirst, J. & Robinson, M. S. Clathrin and adaptors. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1404**, 173–193 (1998).
209. Rejman, J., Conese, M. & Hoekstra, D. Gene Transfer by Means of Lipo- and Polyplexes: Role of Clathrin and Caveolae-Mediated Endocytosis. *J. Liposome Res.* **16**, 237–247 (2006).
210. Yamada, E. THE FINE STRUCTURE OF THE GALL BLADDER EPITHELIUM OF THE MOUSE. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 445–458 (1955).
211. Carver, L. A. & Schnitzer, J. E. Caveolae: mining little caves for new cancer targets. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 571–581 (2003).
212. Hillaireau, H. & Couvreur, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2873–2896 (2009).
213. Cooper, G. M. & Hausman, R. E. *The cell: a molecular approach*. (Sinauer Associates, Inc., Publishers, 2016).
214. Saftig, P. *Lysosomes*. (Springer Science & Business Media, 2007).
215. Asano, T., Komatsu, M., Yamaguchi-Iwai, Y., Ishikawa, F., Mizushima, N. & Iwai, K. Distinct Mechanisms of Ferritin Delivery to Lysosomes in Iron-Depleted and Iron-Replete Cells. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2040–2052 (2011).
216. Weissleder, R., Stark, D. D., Engelstad, B. L., Bacon, B. R., Compton, C. C., White, D. L., Jacobs, P. & Lewis, J. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am. J. Roentgenol.* **152**, 167–173 (1989).
217. Kidane, T. Z., Sauble, E. & Linder, M. C. Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291**, C445–455 (2006).
218. Holtzman, E. *Lysosomes*. (Springer Science & Business Media, 2013).
219. The structure of lysosomes. Infographics. Vector illustration on isolated background. at <[https://www.barewalls.com/art-print-poster/the-structure-of-lysosomes\\_bwc43177200.html](https://www.barewalls.com/art-print-poster/the-structure-of-lysosomes_bwc43177200.html)>
220. Arbab, A. S., Wilson, L. B., Ashari, P., Jordan, E. K., Lewis, B. K. & Frank, J. A. 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).
221. Bee, A., Massart, R. & Neveu, S. Synthesis of very fine maghemite particles. *J. Magn. Magn. Mater.* **149**, 6–9 (1995).
222. Cousin, F., Dubois, E. & Cabuil, V. Tuning the interactions of a magnetic colloidal suspension. *Phys. Rev. E* **68**, 021405 (2003).

223. Dos Santos Afonso, M., Morando, P. J., Blesa, M. A., Banwart, S. & Stumm, W. The reductive dissolution of iron oxides by ascorbate. *J. Colloid Interface Sci.* **138**, 74–82 (1990).
224. Zinder, B., Furrer, G. & Stumm, W. The coordination chemistry of weathering: II. Dissolution of Fe(III) oxides. *Geochim. Cosmochim. Acta* **50**, 1861–1869 (1986).
225. Sée, V., Free, P., Cesbron, Y., Nativo, P., Shaheen, U., Rigden, D. J., Spiller, D. G., Fernig, D. G., White, M. R. H., Prior, I. A., Brust, M., Lounis, B. & Lévy, R. Cathepsin L Digestion of Nanobioconjugates upon Endocytosis. *ACS Nano* **3**, 2461–2468 (2009).
226. Kreyling, W. G., Abdelmonem, A. M., Ali, Z., Alves, F., Geiser, M., Haberl, N., Hartmann, R., Hirn, S., de Aberasturi, D. J., Kantner, K., Khadem-Saba, G., Montenegro, J.-M., Rejman, J., Rojo, T., de Larramendi, I. R., Ufartes, R., Wenk, A. & Parak, W. J. In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 619–623 (2015).
227. Balas, M., Ciobanu, C., Burtea, C., Stan, M., Bezirtzoglou, E., Predoi, D. & Dinischiotu, A. Synthesis, Characterization, and Toxicity Evaluation of Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles. *Metals* **7**, 63 (2017).
228. Yu, Z., Xiaoliang, W., Xuman, W., Hong, X. & Hongchen, G. Acute toxicity and irritation of water-based dextran-coated magnetic fluid injected in mice. *J. Biomed. Mater. Res. A* **85A**, 582–587 (2008).
229. Rafiee, A., Alimohammadian, M. H., Gazori, T., Riazi-rad, F., Fatemi, S. M. R., Parizadeh, A., Haririan, I. & Havaskary, M. Comparison of chitosan, alginate and chitosan/alginate nanoparticles with respect to their size, stability, toxicity and transfection. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **4**, 372–377 (2014).
230. Lunov, O., Syrovets, T., Röcker, C., Tron, K., Ulrich Nienhaus, G., Rasche, V., Mailänder, V., Landfester, K. & Simmet, T. Lysosomal degradation of the carboxydextran shell of coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and the fate of professional phagocytes. *Biomaterials* **31**, 9015–9022 (2010).
231. Mi, F.-L., Tan, Y.-C., Liang, H.-F. & Sung, H.-W. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials* **23**, 181–191 (2002).
232. Suzuki, Y., Tanihara, M., Nishimura, Y., Suzuki, K., Yamawaki, Y., Kudo, H., Kakimaru, Y. & Shimizu, Y. In vivo evaluation of a novel alginate dressing. *J. Biomed. Mater. Res.* **48**, 522–527 (1999).
233. Mitra, A. K., Agrahari, V., Mandal, A., Cholkar, K., Natarajan, C., Shah, S., Joseph, M., Trinh, H. M., Vaishya, R., Yang, X., Hao, Y., Khurana, V. & Pal, D. Novel delivery approaches for cancer therapeutics. *J. Controlled Release* **219**, 248–268 (2015).
234. Canfarotta, F., Waters, A., Sadler, R., McGill, P., Guerreiro, A., Papkovsky, D., Haupt, K. & Piletsky, S. Biocompatibility and internalization of molecularly imprinted nanoparticles. *Nano Res.* **9**, 3463–3477 (2016).
235. McCollister, D. D., Oyen, F. & Rowe, V. K. Toxicology of acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **6**, 172–181 (1964).

236. McCollister, D. D., Hake, C. L., Sadek, S. E. & Rowe, V. K. Toxicologic investigations of polyacrylamides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **7**, 639–651 (1965).
237. Sjöholm, I. & Edman, P. Acrylic microspheres in vivo. I. Distribution and elimination of polyacrylamide microparticles after intravenous and intraperitoneal injection in mouse and rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **211**, 656–662 (1979).
238. Bello, G., Jackson, I. T., Keskin, M., Kelly, C., Dajani, K., Studinger, R., Kim, E. M. H., Lincoln, D., Silberberg, B. & Lee, A. The Use of Polyacrylamide Gel in Soft-Tissue Augmentation: An Experimental Assessment: *Plast. Reconstr. Surg.* **119**, 1326–1336 (2007).
239. Yang, T.-H. Recent Applications of Polyacrylamide as Biomaterials. *Recent Pat. Mater. Sci.* **1**, 29–40 (2008).
240. Briley-Saebo, K., Bjørnerud, A., Grant, D., Ahlstrom, H., Berg, T. & Kindberg, G. M. Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats: implications for magnetic resonance imaging. *Cell Tissue Res.* **316**, 315–323 (2004).
241. Skotland, T., Sontum, P. C. & Oulie, I. In vitro stability analyses as a model for metabolism of ferromagnetic particles (Clariscan™), a contrast agent for magnetic resonance imaging. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28**, 323–329 (2002).
242. Taylor, M. S., Daniels, A. U., Andriano, K. P. & Heller, J. Six bioabsorbable polymers: in vitro acute toxicity of accumulated degradation products. *J. Appl. Biomater. Off. J. Soc. Biomater.* **5**, 151–157 (1994).
243. Mazuel, F., Espinosa, A., Luciani, N., Reffay, M., Le Borgne, R., Motte, L., Desboeufs, K., Michel, A., Pellegrino, T., Lalatonne, Y. & Wilhelm, C. Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels. *ACS Nano* **10**, 7627–7638 (2016).
244. Fresnais, J., Ma, Q., Thai, L., Porion, P., Levitz, P. & Rollet, A.-L. NMR relaxivity of coated and non-coated size-sorted maghemite nanoparticles. *Mol. Phys.* **0**, 1–10 (2018).
245. Bertini, I., Luchinat, C. & Parigi, G. *Solution NMR of Paramagnetic Molecules: Applications to Metallobiomolecules and Models*. (Elsevier, 2001).
246. Duan, H., Kuang, M., Wang, X., Wang, Y. A., Mao, H. & Nie, S. Reexamining the Effects of Particle Size and Surface Chemistry on the Magnetic Properties of Iron Oxide Nanocrystals: New Insights into Spin Disorder and Proton Relaxivity. *J. Phys. Chem. C* **112**, 8127–8131 (2008).
247. La coloration négative | Uranyless. at <<http://uranyless.com/fr/la-coloration-negative/>>
248. Bianco Paolo, Riminucci Mara, Gronthos Stan & Robey Pamela Gehron. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *STEM CELLS* **19**, 180–192 (2009).
249. Kern Susanne, Eichler Hermann, Stoeve Johannes, Klüter Harald & Bieback Karen. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *STEM CELLS* **24**, 1294–1301 (2006).

250. Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W.-M., Lee, K.-D., Hsieh, S.-L. & Chen, T.-H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* **103**, 1669–1675 (2004).
251. Savickiene, J., Treigyte, G., Baronaite, S., Valiuliene, G., Kaupinis, A., Valius, M., Arlauskiene, A. & Navakauskiene, R. Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells from Second- and Third-Trimester Amniocentesis: Differentiation Potential, Molecular Signature, and Proteome Analysis. *Stem Cells Int.* **2015**, (2015).
252. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **9**, 641–650 (1991).
253. Sekiya, I., Vuoristo, J. T., Larson, B. L. & Prockop, D. J. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 4397–4402 (2002).
254. Liechty, K. W., MacKenzie, T. C., Shaaban, A. F., Radu, A., Moseley, A. B., Deans, R., Marshak, D. R. & Flake, A. W. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after *in utero* transplantation in sheep. *Nat. Med.* **6**, 1282–1286 (2000).
255. Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. & Lalykina, K. S. The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells. *Cell Prolif.* **3**, 393–403 (1970).
256. Pereira, R. F., O’Hara, M. D., Laptev, A. V., Halford, K. W., Pollard, M. D., Class, R., Simon, D., Livezey, K. & Prockop, D. J. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 1142–1147 (1998).
257. Horwitz, E. M., Gordon, P. L., Koo, W. K. K., Marx, J. C., Neel, M. D., McNall, R. Y., Muul, L. & Hofmann, T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 8932–8937 (2002).
258. Mazuel, F., Espinosa, A., Radtke, G., Bugnet, M., Neveu, S., Lalatonne, Y., Botton, G. A., Abou-Hassan, A. & Wilhelm, C. Magneto-Thermal Metrics Can Mirror the Long-Term Intracellular Fate of Magneto-Plasmonic Nanohybrids and Reveal the Remarkable Shielding Effect of Gold. *Adv. Funct. Mater.* **27**, 1605997 (2017).
259. Liu, X. & Theil, E. C. Ferritins: Dynamic Management of Biological Iron and Oxygen Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **38**, 167–175 (2005).
260. Gálvez, N., Fernández, B., Sánchez, P., Cuesta, R., Ceolín, M., Clemente-León, M., Trasobares, S., López-Haro, M., Calvino, J. J., Stéphan, O. & Domínguez-Vera, J. M. Comparative Structural and Chemical Studies of Ferritin Cores with Gradual Removal of their Iron Contents. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 8062–8068 (2008).
261. Arvizo, R., Bhattacharya, R. & Mukherjee, P. Gold nanoparticles: Opportunities and Challenges in Nanomedicine. *Expert Opin. Drug Deliv.* **7**, 753–763 (2010).
262. Page, B., Page, M. & Noel, C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. *Int. J. Oncol.* **3**, 473–476 (1993).

263. Gerets, H. H. J., Dhalluin, S. & Atienzar, F. A. in *Mamm. Cell Viability Methods Protoc.* (ed. Stoddart, M. J.) **740**, 91–101 (Humana Press, 2011).
264. Czekanska, E. M. in *Mamm. Cell Viability Methods Protoc.* (ed. Stoddart, M. J.) **740**, 27–32 (Humana Press, 2011).
265. O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. & Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5421–5426 (2000).
266. Dalchau, R., Kirkley, J. & Fabre, J. W. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *Eur. J. Immunol.* **10**, 737–744 (1980).
267. Goodison, S., Urquidi, V. & Tarin, D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol. Pathol.* **52**, 189–196 (1999).
268. Günthert, U. in *Adhes. Leukoc. Homing Differ.* 47–63 (Springer, Berlin, Heidelberg, 1993).
269. Jalkanen, S., Jalkanen, M., Bargatze, R., Tammi, M. & Butcher, E. C. Biochemical properties of glycoproteins involved in lymphocyte recognition of high endothelial venules in man. *J. Immunol.* **141**, 1615–1623 (1988).
270. Bajorath, J. Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **39**, 103–111 (2000).
271. Forsberg, U. H., Jalkanen, S. & Schröder, J. Assignment of the human lymphocyte homing receptor gene to the short arm of chromosome 11. *Immunogenetics* **29**, 405–407 (1989).
272. Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haußmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H. & Herrlich, P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* **65**, 13–24 (1991).
273. Lesley, J., Hyman, R. & Kincade, P. W. in *Adv. Immunol.* (ed. Dixon, F. J.) **54**, 271–335 (Academic Press, 1993).
274. Trochon, V., Mabilat, C., Bertrand, P., Legrand, Y., Smadja-Joffe, F., Soria, C., Delpech, B. & Lu, H. Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro. *Int. J. Cancer* **66**, 664–668 (1996).
275. Haynes, B. F., Telen, M. J., Hale, L. P. & Denning, S. M. CD44 — A molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol. Today* **10**, 423–428 (1989).
276. Liao, H. X., Lee, D. M., Levesque, M. C. & Haynes, B. F. N-terminal and central regions of the human CD44 extracellular domain participate in cell surface hyaluronan binding. *J. Immunol.* **155**, 3938–3945 (1995).
277. Miyake, K., Underhill, C. B., Lesley, J. & Kincade, P. W. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J. Exp. Med.* **172**, 69–75 (1990).

278. Cooper, D. L. & Dougherty, G. J. To metastasize or not? Selection of CD44 splice sites. *Nat. Med.* **1**, 635–637 (1995).
279. DeGrendele, H. C., Estess, P., Picker, L. J. & Siegelman, M. H. CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J. Exp. Med.* **183**, 1119–1130 (1996).
280. McKee, C. M., Penno, M. B., Cowman, M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Bao, C. & Noble, P. W. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J. Clin. Invest.* **98**, 2403–2413 (1996).
281. Underhill, C. CD44: The hyaluronan receptor. *J. Cell Sci.* **103**, 293–298 (1992).
282. Marhaba, R. & Zöller, M. CD44 in Cancer Progression: Adhesion, Migration and Growth Regulation. *J. Mol. Histol.* **35**, 211–231 (2004).
283. West, D. C., Hampson, I. N., Arnold, F. & Kumar, S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* **228**, 1324–1326 (1985).
284. Griffete, N., Lamouri, A., Herbst, F., Felidj, N., Ammar, S. & Mangeney, C. Synthesis of highly soluble polymer-coated magnetic nanoparticles using a combination of diazonium salt chemistry and the iniferter method. *RSC Adv.* **2**, 826–830 (2012).
285. Adenier, A., Cabet-Deliry, E., Chaussé, A., Griveau, S., Mercier, F., Pinson, J. & Vautrin-UI, C. Grafting of Nitrophenyl Groups on Carbon and Metallic Surfaces without Electrochemical Induction. *Chem. Mater.* **17**, 491–501 (2005).
286. Griffete, N., Li, H., Lamouri, A., Redeuilh, C., Chen, K., Dong, C.-Z., Nowak, S., Ammar, S. & Mangeney, C. Magnetic nanocrystals coated by molecularly imprinted polymers for the recognition of bisphenol A. *J. Mater. Chem.* **22**, 1807–1811 (2012).
287. Griffete, N., Herbst, F., Pinson, J., Ammar, S. & Mangeney, C. Preparation of Water-Soluble Magnetic Nanocrystals Using Aryl Diazonium Salt Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 1646–1649 (2011).
288. Combellas, C., Delamar, M., Kanoufi, F., Pinson, J. & Podvorica, F. I. Spontaneous Grafting of Iron Surfaces by Reduction of Aryldiazonium Salts in Acidic or Neutral Aqueous Solution. Application to the Protection of Iron against Corrosion. *Chem. Mater.* **17**, 3968–3975 (2005).
289. Neves-Petersen, M. T., Petersen, S. & Gajula, G. P. UV Light Effects on Proteins: From Photochemistry to Nanomedicine. *Mol. Photochem. - Var. Asp.* (2012).
290. Bent, D. V. & Hayon, E. Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. I. Tyrosine. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 2599–2606 (1975).
291. Bent, D. V. & Hayon, E. Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. II. Phenylalanine. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 2606–2612 (1975).
292. Bent, D. V. & Hayon, E. Excited state chemistry of aromatic amino acids and related peptides. III. Tryptophan. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 2612–2619 (1975).

293. Creed, D. The Photophysics and Photochemistry of the Near-Uv Absorbing Amino Acids–I. Tryptophan and Its Simple Derivatives. *Photochem. Photobiol.* **39**, 537–562 (1984).
294. Creed, D. The Photophysics and Photochemistry of the Near-Uv Absorbing Amino Acids–II. Tyrosine and Its Simple Derivatives. *Photochem. Photobiol.* **39**, 563–575 (1984).
295. R. Panikkanvalappil, S., M. Hira, S. & A. El-Sayed, M. Elucidation of ultraviolet radiation-induced cell responses and intracellular biomolecular dynamics in mammalian cells using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Chem. Sci.* **7**, 1133–1141 (2016).
296. Xie, X., Hu, Q., Ke, R., Zhen, X., Bu, Y. & Wang, S. Facile preparation of photonic and magnetic dual responsive protein imprinted nanomaterial for specific recognition of bovine hemoglobin. *Chem. Eng. J.* **371**, 130–137 (2019).
297. Boitard, C., Lamouri, A., Ménager, C. & Griffete, N. Whole Protein Imprinting over Magnetic Nanoparticles Using Photopolymerization. *ACS Appl. Polym. Mater.* (2019). doi:10.1021/acsapm.9b00109
298. Cailleau, R., Young, R., Olivé, M. & Reeves, W. J. Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **53**, 661–674 (1974).
299. Cailleau, R., Olivé, M. & Cruciger, Q. V. J. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. *In Vitro* **14**, 911–915 (1978).
300. Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y. & Pietersen, J. A. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* **121**, 2750–2767 (2011).
301. Chavez, K. J., Garimella, S. V. & Lipkowitz, S. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis.* **32**, 35–48 (2010).
302. Jin, J., Krishnamachary, B., Mironchik, Y., Kobayashi, H. & Bhujwala, Z. M. Phototheranostics of CD44-positive cell populations in triple negative breast cancer. *Sci. Rep.* **6**, 27871 (2016).
303. Patil, R. M., Thorat, N. D., Shete, P. B., Bedge, P. A., Gavde, S., Joshi, M. G., Tofail, S. A. M. & Bohara, R. A. Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biochem. Biophys. Rep.* **13**, 63–72 (2018).
304. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
305. Twentyman, P. R. & Luscombe, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer* **56**, 279–285 (1987).
306. Bloch, F. Nuclear Induction. *Phys. Rev.* **70**, 460–474 (1946).
307. Bloembergen, N. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. *J. Chem. Phys.* **27**, 572–573 (1957).
308. Bloembergen, N. & Morgan, L. O. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. Effects of Electron Spin Relaxation. *J. Chem. Phys.* **34**, 842–850 (1961).

## Références

309. Hindman, J. C., Svirnickas, A. & Wood, M. Relaxation processes in water. A study of the proton spin-lattice relaxation time. *J. Chem. Phys.* **59**, 1517–1522 (1973).
310. Simpson, J. H. & Carr, H. Y. Diffusion and Nuclear Spin Relaxation in Water. *Phys. Rev.* **111**, 1201–1202 (1958).
311. Levitt, M. H. *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. (John Wiley & Sons, 2001).
312. Carr, H. Y. & Purcell, E. M. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Phys. Rev.* **94**, 630–638 (1954).
313. Meiboom, S. & Gill, D. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Rev. Sci. Instrum.* **29**, 688–691 (1958).
314. Anoardo, E., Galli, G. & Ferrante, G. Fast-field-cycling NMR: Applications and instrumentation. *Appl. Magn. Reson.* **20**, 365–404 (2001).
315. Conte, P. & Alonzo, G. *Environmental NMR: Fast-field-cycling Relaxometry*. (Wiley, 2013).
316. Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C. & Boulanger, C. M. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* **64**, 109–130 (2012).
317. Brussaard, C. P., Marie, D. & Bratbak, G. Flow cytometric detection of viruses. *J. Virol. Methods* **85**, 175–182 (2000).
318. Nolan, J. P. & Sklar, L. A. The emergence of flow cytometry for sensitive, real-time measurements of molecular interactions. *Nat. Biotechnol.* **16**, 633–638 (1998).
319. Coulter, W. H. Means for counting particles suspended in a fluid. (1953). at <<https://patents.google.com/patent/US2656508A/en>>
320. Gucker, F. T., O’Konski, C. T., Pickard, H. B. & Pitts, J. N. A Photoelectronic Counter for Colloidal Particles<sup>1</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 2422–2431 (1947).

# Annexes



## Table des matières

1. Tableau récapitulatif des principaux objets hybrides $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP}$ et PNI .....	213
2. Relaxométrie .....	214
2.1. Atomes, moment magnétique et spin.....	214
2.2. Champs magnétiques et excitation des spins .....	214
2.2.1. Champ magnétique intense $B_0$ et aimantation macroscopique.....	214
2.2.2. Champ magnétique $B_1$ ou impulsion radiofréquence .....	215
2.3. Relaxation des spins .....	215
2.3.1. Principe général et équations de Bloch.....	215
2.3.2. Temps de relaxation spin-réseau $T_1$ .....	216
2.3.3. Temps de relaxation spin-spin $T_2$ .....	216
2.4. Mesure de $T_2$ par une séquence d'écho de spin .....	217
2.5. Mesure d'un profil de $T_1$ .....	218
3. Cytométrie en flux.....	219
3.1. Principe de la méthode .....	219
3.1.1. Analyse par mesure du courant électrique .....	220
3.1.2. Analyse par mesure de la lumière diffusée .....	220
3.1.3. Cytométrie en flux et détection de fluorescence.....	221
3.2. Protocole expérimental mis en œuvre.....	221
3.2.1. Présentation des appareils de mesure.....	221
3.2.2. Passage des échantillons .....	222
3.2.3. Analyse des résultats.....	223
4. Publication – Magnetic protein imprinted polymers: a review .....	225



1. Tableau récapitulatif des principaux objets hybrides  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@PEP et PNI

Identification	Emploi des objets hybrides	Protéine imprimée	Méthode d'amorçage	Durée de polymérisation	Fluo	Taille DLS (nm)	% de polymère
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-BSA	Optimisation de la synthèse Chapitre 2 partie 3.3.4 page 56	BSA	Thermique	18h	/	226 ± 23	/
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PNI	Optimisation de la synthèse Chapitre 2 partie 3.3.4 page 56	/	Thermique	18h	/	218 ± 15	/
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-BSA	Optimisation de la synthèse Chapitre 2 partie 3.3.5 page 56	BSA	Rédox	4h	/	95 ± 3	17
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-BSA	Optimisation de la synthèse Chapitre 2 partie 3.3.5 page 56	BSA	Rédox	9h	/	158 ± 4	27
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-BSA	Performances des objets $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-BSA Chapitre 2 partie 3.3.5 page 56	BSA	Rédox	18h	/	278 ± 7	52
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PNI	Performances des objets $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-BSA Chapitre 2 partie 3.3.5 page 56	/	Rédox	18h	/	272 ± 9	63
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-GFP	Adsorption, désorption et dénaturation de GFP Chapitre 3 partie 1 à partie 3, à partir de la page 79	GFP	Rédox	18h	/	415 ± 75	23
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-GFP (fluorescent)	Ciblage cellulaire et dénaturation de GFP Chapitre 3 partie 4 page 95	GFP	Rédox	18h	Oui	177 ± 78	18
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-GFP OU PEP f	Etude de la dégradation et cytotoxicité Chapitre 4 partie 2.3 page 129, partie 3 page 138	GFP	Rédox	18h	Oui	256 ± 45	20
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-GFP OU PEP e	Etude de la dégradation Chapitre 4 partie 2.3 page 129	GFP	Rédox	18h	Oui	494 ± 47	24
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-GFP	Performances des objets $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-GFP Chapitre 5 partie 2.3 page 165	GFP	UV	5h	/	169 ± 44	11
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PNI	Performances des objets $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-GFP Chapitre 5 partie 2.3 page 165	/	UV	5h	/	191 ± 26	/
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-BSA	Robustesse du protocole de photo-polymérisation Chapitre 5 partie 2.3.3.3 page 169	BSA	UV	5h	/	181 ± 51	/
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-OVA	Robustesse du protocole de photo-polymérisation Chapitre 5 partie 2.3.3.3 page 169	OVA	UV	5h	/	176 ± 45	/
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-Lyz	Robustesse du protocole de photo-polymérisation Chapitre 5 partie 2.3.3.3 page 169	Lyz	UV	5h	/	164 ± 37	/
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @PEP-CD44	Cytotoxicité, adsorption et ciblage cellulaire de CD44 Chapitre 5 partie 3.2 page 171, partie 3.3 page 171	CD44	UV	5h	Oui	390 ± 48	/

## 2. Relaxométrie

### 2.1. Atomes, moment magnétique et spin

Le noyau des atomes peut être séparé en deux composantes : les neutrons, qui comme leur nom l'indique sont neutres, et les protons, qui sont chargés. Nous allons ici nous intéresser uniquement aux noyaux des atomes d'hydrogène, comptant un seul proton.

Ces protons tournent sur eux-mêmes et possèdent donc un moment cinétique intrinsèque, également appelé spin. Le spin est aligné suivant l'axe de rotation du proton. Comme les protons sont chargés, leur rotation induit également l'apparition d'un vecteur d'aimantation microscopique, appelé moment magnétique, lui-aussi aligné suivant leur axe de rotation.

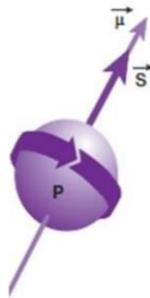


Figure 132 : Proton P tournant autour d'un axe de rotation, possédant un moment cinétique intrinsèque S et induisant un moment magnétique microscopique  $\mu$ .

Dans un milieu donné contenant de nombreux protons, par exemple dans l'eau, et en l'absence d'un champ magnétique, ces protons vont s'orienter de façon aléatoire. Il n'y aura donc pas de vecteur d'aimantation macroscopique résultant.

### 2.2. Champs magnétiques et excitation des spins

#### 2.2.1. Champ magnétique intense $B_0$ et aimantation macroscopique

Comme nous venons de le voir, dans un milieu donné en l'absence de champ magnétique, les noyaux d'hydrogène (ou protons) vont s'orienter de manière aléatoire. Il n'en résultera pas d'aimantation macroscopique. Par contre, en présence d'un champ magnétique extérieur, les protons vont s'orienter suivant l'axe de ce champ. Ils seront soit dans un état « parallèle » soit dans un état « anti-parallèle ». Comme il y a un peu plus de protons dans le sens « parallèle », cela va créer un vecteur d'aimantation macroscopique, somme des vecteurs d'aimantation microscopiques, d'intensité M et d'axe celui du champ magnétique  $B_0$ .

En plus d'être alignés suivant l'axe du champ magnétique  $B_0$ , les protons vont précesser autour de celui-ci à une fréquence dite fréquence de Larmor  $\omega_0$  égal à  $\gamma B_0$ , avec  $\gamma$  le rapport gyromagnétique du proton (42,58 MHz.T<sup>-1</sup> pour l'hydrogène). Les protons sont également en rotation sur eux-mêmes, chacun avec une vitesse angulaire légèrement différente de la fréquence de Larmor. Les spins sont alors déphasés, et l'aimantation transversale est nulle.

Le champ magnétique orienté suivant z et d'intensité  $B_0$  sera par la suite appelé uniquement champ magnétique  $B_0$ .

### 2.2.2. Champ magnétique $B_1$ ou impulsion radiofréquence

L'aimantation du champ magnétique  $B_0$  étant très supérieure à l'aimantation macroscopique, on ne peut pas étudier l'évolution de l'aimantation  $M$ . Pour ce faire, il va falloir dévier  $M$  de l'axe de  $B_0$ . Cela va se faire lors d'une phase d'excitation par apport d'énergie externe de la part d'un champ magnétique radiofréquence d'intensité  $B_1$ , plus faible que  $B_0$ , formant un angle  $\pi/2$  avec la direction du champ  $B_0$ , tournant autour de l'axe z à une fréquence égale à la fréquence de Larmor des protons considérés.

Sous l'effet de cette impulsion radiofréquence, la composante longitudinale  $M_z$  de  $M$  va s'annuler tandis que sa composante transversale  $M_{xy}$  va être maximisée. Tous les spins sont alors en phase.

## 2.3. Relaxation des spins

### 2.3.1. Principe général et équations de Bloch

Comme on l'a vu précédemment, on peut diviser l'aimantation macroscopique en deux grandeurs : une aimantation longitudinale  $M_z$ , suivant l'axe du champ magnétique  $B_0$ , et une aimantation transversale,  $M_{xy}$  dans le plan xOy. L'excitation des protons par une impulsion radiofréquence (ou champ magnétique  $B_1$ ) tournant à une vitesse angulaire égale à la fréquence de Larmor, et suivant un axe formant un angle  $\pi/2$  avec le champ  $B_0$  va avoir pour effet :

- La disparition de l'aimantation longitudinale  $M_z$
- L'apparition d'une aimantation transversale  $M_{xy}$ .

Après l'arrêt de l'impulsion radiofréquence, les spins vont retourner à leur état d'origine, donc alignés suivant le champ  $B_0$ . IL s'agit de la relaxation des spins. On peut distinguer la relaxation transversale qui suit la disparition de l'aimantation  $M_{xy}$  et la relaxation longitudinale qui suit la repousse de l'aimantation  $M_z$ .

Ces deux composantes,  $M_{xy}$  et  $M_z$ , peuvent être décrites à l'aide des équations de Bloch<sup>306</sup> :

$$\frac{dM_{xy}}{dt} = \gamma(\vec{M} \wedge \vec{B}_0) - \frac{M_{xy}}{T_2}$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma(\vec{M} \wedge \vec{B}_0) - \frac{(M_0 - M_z)}{T_1}$$

Avec  $M_0$  l'aimantation totale à l'équilibre selon l'axe z, et  $T_1$  et  $T_2$  les temps de relaxation correspondants respectivement à la récupération de la composante longitudinale et à la décroissance de la composante transversale de l'aimantation.

Le produit vectoriel entre l'aimantation et le champ  $B_0$  correspond au couplage entre moment magnétique et champ magnétique, tandis que les termes en  $1/T_1$  et  $1/T_2$  sont liés aux processus de

relaxation. De manière générale, le temps de relaxation  $T_2$  est inférieur ou égal au temps de relaxation  $T_1$ . Ces temps dépendent fortement de la mobilité des molécules, et donc de la température du milieu, mais également des autres atomes présents, comme par exemple atomes paramagnétiques, tels que le fer, le gadolinium ou le manganèse<sup>307,308</sup>.

On a par exemple dans l'eau  $T_1 \approx T_2 \approx 3$  secondes à  $20^\circ\text{C}$  et  $T_1 \approx T_2 \approx 4$  secondes à  $30^\circ\text{C}$ <sup>309,310</sup>.

### 2.3.2. Temps de relaxation spin-réseau $T_1$

Comme expliqué plus haut, l'impulsion radiofréquence  $\pi/2$  bascule l'aimantation dans le plan  $xOy$  et fait donc disparaître la composante longitudinale de l'aimantation. Après l'arrêt de l'impulsion radiofréquence, les spins vont revenir à leur état d'équilibre, entraînant une réapparition progressive de l'aimantation  $M_z$ . Il s'agit de la « relaxation longitudinale », qui sera plus ou moins rapide en fonction du milieu considéré : plus le milieu sera rigide et plus la repousse de l'aimantation  $M_z$  sera lente. Cette relaxation suit une exponentielle croissante avec la constante de temps  $T_1$  (d'après les équations de Bloch) :

$$M_z(t) = M_0 \cdot \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{T_1}\right)\right)$$

Où  $M_0$  est l'aimantation totale à l'équilibre suivant l'axe  $z$ , et où  $T_1$  est le temps de relaxation longitudinal, soit le temps nécessaire pour que l'aimantation longitudinale  $M_z$  retrouve 63% de sa valeur d'origine (voir Figure 133).

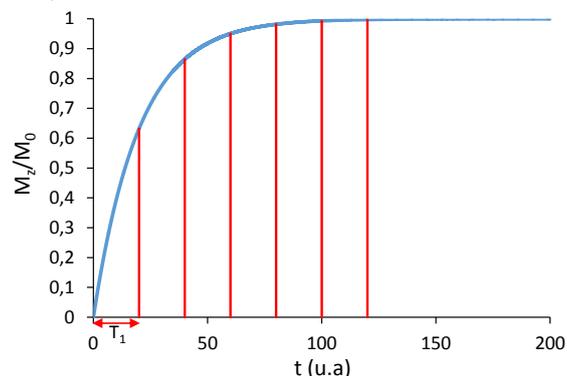


Figure 133 : Repousse de l'aimantation longitudinale  $M_z$  et évolution du temps de relaxation spin-réseau  $T_1$ .

La relaxation longitudinale est également appelée « relaxation spin-réseau » car elle repose sur un échange d'énergie, principalement thermique, entre les protons et les molécules voisines<sup>311</sup>. On aura par exemple un transfert d'énergie entre les spins des protons de deux molécules d'eau distinctes.

### 2.3.3. Temps de relaxation spin-spin $T_2$

Comme nous venons de le voir, l'impulsion radiofréquence  $\pi/2$  bascule l'aimantation dans le plan  $xOy$  et induit l'apparition d'une composante transversale de l'aimantation. Après l'arrêt de l'impulsion, les spins vont progressivement se déphaser, et la composante transversale de l'aimantation va disparaître. Il s'agit de la « relaxation transversale », qui traduit la perte de cohérence des spins, plus ou moins rapide en fonction du milieu considéré. Cette relaxation suit une exponentielle décroissante avec la constante de temps  $T_2$  (d'après les équations de Bloch) :

$$M_{x,y}(t) = M_0 \cdot \exp\left(\frac{-t}{T_2}\right)$$

Où  $M_0$  est l'aimantation totale à l'équilibre suivant l'axe z, et où  $T_2$  est le temps de relaxation transverse, soit le temps nécessaire pour obtenir une décroissance de 63% de l'aimantation transverse  $M_{x,y}$  (voir Figure 134).

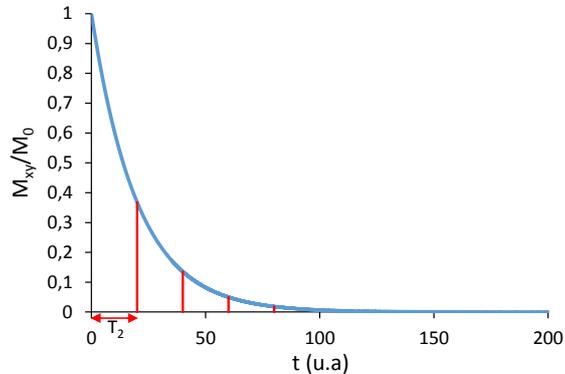


Figure 134 : Disparition de l'aimantation transverse  $M_{xy}$  et évolution du temps de relaxation spin-spin  $T_2$ .

La relaxation transverse est également appelée « relaxation spin-spin » car les protons excités vont certes transmettre leur énergie aux molécules voisines, mais surtout aux spins voisins non encore excités<sup>311</sup>. Par exemple, on aura un transfert d'énergie entre les spins des deux protons d'une même molécule d'eau.

#### 2.4. Mesure de $T_2$ par une séquence d'écho de spin

La séquence d'écho de spin CPMG<sup>312,313</sup> (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) est très largement utilisée afin de mesurer des temps de relaxation  $T_2$ . Cette méthode consiste à suivre l'évolution de l'aimantation totale dans le plan xOy et donc à effectuer des mesures directes de l'aimantation transverse. On peut représenter la séquence de manière schématique de la façon suivante. Une impulsion radiofréquence  $\pi/2$  est appliquée, ce qui va basculer les spins dans le plan transversal (Figure 135B). Ceux-ci ayant des vitesses différentes, ils vont se défocaliser (Figure 135C et Figure 135D). L'application d'une impulsion radiofréquence  $\pi$  au bout d'un temps  $\tau$  (Figure 135E) va permettre de les re-focaliser à un temps  $t = 2\tau$  (Figure 135F et Figure 135G). Il s'agit de ce que l'on appelle le sommet de l'écho. Une mesure de l'aimantation est alors réalisée. Les spins se défocalisant de nouveau, on appliquera une nouvelle impulsion radiofréquence  $\pi$  à un temps  $t = 3\tau$ , ce qui permettra une nouvelle focalisation de ceux-ci et une nouvelle mesure d'aimantation à  $t = 4\tau$ . Et ainsi de suite, jusqu'à ne plus avoir de signal correspondant à la composante transverse de l'aimantation.

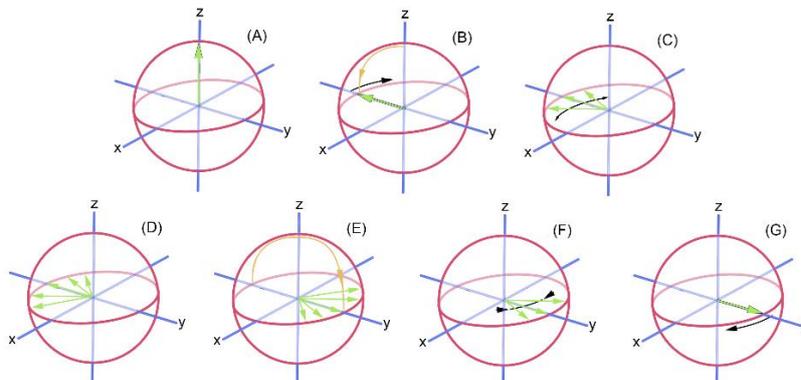
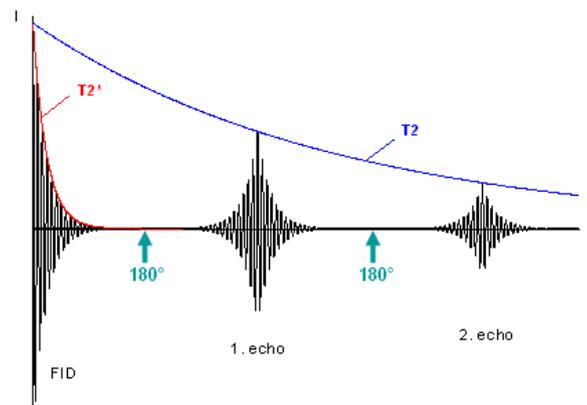


Figure 135 : Représentation schématique de la séquence d'écho de spin.

La courbe représentant la décroissance de l'aimantation transversale au cours du temps est obtenue en traçant l'évolution des sommets des échos au cours du temps (Figure 136).



**Figure 136 : Reconstruction de la courbe de décroissance de l'aimantation transversale à partir de la mesure des sommets des échos. Ordonnées : Mxy (u.a) et abscisse : temps (u.a).**

Sur la figure ci-dessus, FID désigne le signal de précession libre, soit le signal obtenu juste après basculement de l'aimantation dans le plan xOy.  $T_2^*$  correspond quant à lui au temps caractéristique de la décroissance de ce signal, et donc au temps nécessaire aux spins pour se défocaliser complètement.

## 2.5. Mesure d'un profil de $T_1$

Un profil de temps de relaxation longitudinaux  $T_1$  correspond à la mesure de ce temps de relaxation, pour un même échantillon, après application d'un champ radiofréquence  $B_1$  à différentes fréquences et donc différentes intensités. En fonction de la fréquence de résonance du champ magnétique  $B_1$ , deux séquences peuvent être employées : une avec pré-polarisation des échantillons (séquence PP, faibles champs / faibles fréquences jusqu'à 4 MHz environ) et une sans polarisation (séquence NP)<sup>314,315</sup>.

### 3. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique d'analyse qui permet la mesure de différents paramètres physiques de cellules en suspension<sup>316</sup>, tels que leur taille ou leur intensité de fluorescence relative, que celle-ci soit due aux protéines qu'elles expriment, ou à des nanoparticules internalisées ou fixées à leur membrane externe.

#### 3.1. Principe de la méthode

La cytométrie en flux est principalement développée pour l'analyse cellulaire, et est utilisée en laboratoire d'analyse médicale ou en biologie cellulaire, notamment en hématologie. Mais c'est une technique qui est également capable d'analyser nombre d'objets distincts, qu'ils soient d'origine biologique tels que les virus<sup>317</sup>, ou chimique tels que des microparticules de polymère<sup>318</sup>. L'unique contrainte est que les objets à analyser doivent être individualisés et en suspension dans un liquide.

Un cytomètre en flux est composé de trois parties majeures, comme représenté sur la Figure 137.

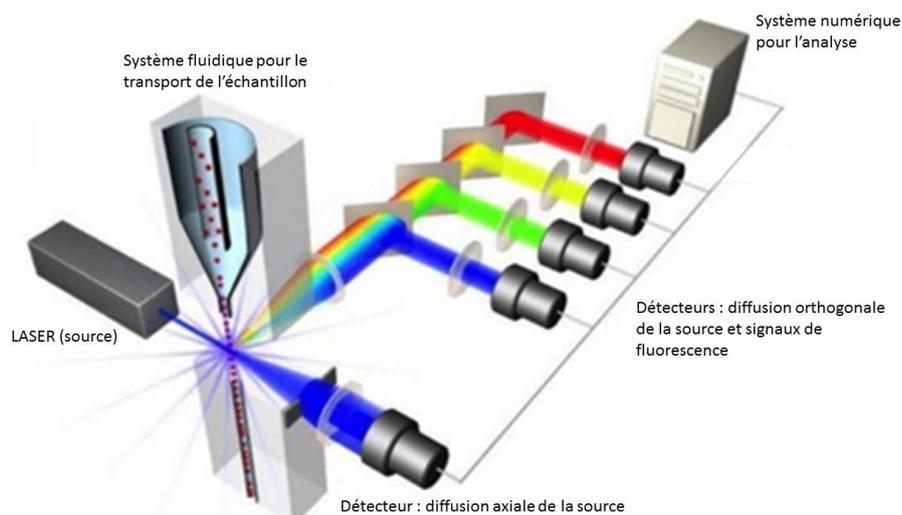


Figure 137: Schéma de principe d'un cytomètre en flux (adapté de <http://cytobase.montp.inserm.fr/Cours/Cours.html>)

- Un système fluide va conduire l'échantillon jusqu'à la zone de mesure et le mettre en forme selon un principe de focalisation hydrodynamique. La cellule de flux permet d'aligner les objets pour les faire passer au centre du faisceau laser et les séparer les uns des autres.
- Un système optique constitué d'un laser et d'un banc optique, afin de détecter les objets.
- Un système numérique qui va permettre de convertir les photons détectés en signal électrique et gérer l'affichage des mesures ainsi que leur sauvegarde.

Les cytomètres en flux peuvent analyser jusqu'à plusieurs dizaines de milliers d'objets par seconde, et déterminer la valeur de plusieurs paramètres simultanément pour chacun des objets. Pour ce faire, deux méthodes d'analyse sont classiquement utilisées. La première se fonde sur une mesure de courant électrique, il s'agit de la méthode Coulter. La seconde se fonde sur l'analyse de la lumière diffusée par les objets analysés. Les principaux paramètres mesurés par la cytométrie en flux sont :

- La diffusion axiale de la lumière, qui donne accès à la taille des objets, par exemple des cellules.
- La diffusion orthogonale de la lumière, liée à la présence d'hétérogénéités dans l'indice de réfraction des objets (par exemple dues aux organites des cellules).
- Une (ou plusieurs) intensité de fluorescence. Cela peut par exemple permettre de détecter des nanoparticules fluorescentes adsorbées sur la membrane plasmique de cellules, ou internalisées par celles-ci. Le nombre de signaux de fluorescence mesurables simultanément dépend du système optique du cytomètre en flux.

### *3.1.1. Analyse par mesure du courant électrique*

Les cytomètres en flux de ce type fonctionnent sur le principe suivant. Deux compartiments contenant un liquide conducteur sont séparés par un orifice de petite taille. L'application d'un courant constant entre les deux compartiments va induire une différence de potentiel électrique. Lorsqu'une cellule, mauvais conducteur électrique, va passer d'un compartiment à l'autre, la différence de potentiel va augmenter. Cela peut se traduire par la génération d'un pic de tension.

Cette méthode permet de détecter les cellules, déterminer leur concentration, mais également mesurer leur volume. En effet, le pic de tension généré par le passage d'une cellule est affecté par le volume cellulaire. Après calibration, il est donc possible de remonter à la taille des cellules à partir du signal mesuré.

Cette méthode, également appelée méthode Coulter du nom de l'ingénieur à l'origine du premier appareil<sup>319</sup>, est la méthode la plus utilisée dans les appareils de détermination de formule sanguine. Elle est robuste et peu coûteuse, sa seule limitation étant la nécessité pour les cellules d'avoir un volume suffisant pour modifier de manière significative la résistance du système lors de leur traversée de l'orifice.

### *3.1.2. Analyse par mesure de la lumière diffusée*

Les cytomètres en flux de ce type fonctionnent sur le principe de la microscopie à champs sombre. La technique est apparue avec les travaux de Gucker à la fin des années 1940<sup>320</sup>. Les photons produits par une source laser sont focalisés par un jeu de lentilles. Entre la dernière lentille et l'échantillon, l'on place un cache afin de ne pas illuminer directement le photo-détecteur par le faisceau incident. Lorsqu'un objet va passer dans la zone de mesure, il va diffuser des photons vers le détecteur, qui produira alors un signal en retour. En absence d'objet, le photo-détecteur ne détecte pas de photons, et ne produit donc pas de signal.

Le principale avantage de cette technique de détection de cellules est son utilisation de la lumière et ses mesures fondées sur la détection de photons. Elle peut donc être facilement couplée à des mesures de fluorescence.

### 3.1.3. Cytométrie en flux et détection de fluorescence

Les spectrofluorimètres, employés habituellement pour mesurer des intensités de fluorescence, fonctionnent en décomposant la lumière et en sélectionnant une longueur d'onde de mesure à l'aide d'un monochromateur. L'intensité lumineuse est mesurée pour la longueur d'onde choisie à l'aide d'un photo-détecteur. Ils peuvent donc mesurer la fluorescence à différentes longueurs d'onde, mais une à la fois, et l'enregistrement d'un spectre de fluorescence prend alors plusieurs minutes.

Un cytomètre en flux analysant plusieurs milliers d'objets par seconde, la mesure de fluorescence pour chacun d'entre eux doit être effectuée en quelques microsecondes. La lumière est alors décomposée non pas à l'aide de monochromateurs mais de filtres, tels que des miroirs dichroïques passe-haut, réfléchissant les longueurs d'ondes inférieures à une valeur seuil vers un photo-détecteur, et laissant passer les longueurs supérieures (voir la partie optique du schéma de principe d'un cytomètre, Figure 137).

Un cytomètre en flux permet donc de mesurer la fluorescence rapidement, avec une mauvaise résolution spectrale mais avec une bonne sensibilité. Si l'on cherche à observer différents marquages de cellules, il est alors nécessaire de travailler avec des fluorophores possédant des spectres d'émission bien séparés les uns des autres.

## 3.2. Protocole expérimental mis en œuvre

### 3.2.1. Présentation des appareils de mesure

#### **Appareil BD Accuri C6**

L'appareil BD Accuri C6 est commercialisé par BD Biosciences (Figure 138).



Figure 138 : Cytomètre en flux BD Accuri C6.

Le système optique de cet appareil est constitué de deux sources laser, une à 488 nm et l'autre à 640 nm, ainsi que deux détecteurs, l'un pour la lumière directe émise dans l'axe de la source laser (appelé signal FSC, ou forward scatter) et l'un pour la lumière réfléchi (signal SSC ou side scatter). Il est complété par quatre filtres de fluorescence, nommés FL. Les trois premiers, centrés respectivement sur  $533 \pm 30$  nm et  $585 \pm 40$  nm et passe-haut à partir de 670 nm vont de pair avec la source laser à 488 nm tandis que le quatrième, centré sur  $675 \pm 25$  nm, accompagne la source à 640 nm. Le fluorophore employé ici étant la rhodamine, nous utilisons le filtre FL2 ( $585 \pm 40$  nm). Les différents capteurs et filtres sont visibles sur la Figure 139.



Figure 139 : Photographie des différents filtres et détecteurs du cytomètre en flux BD Accuri C6.

Les résultats obtenus sont enregistrés, visualisables et analysables à l'aide d'un logiciel fourni par le constructeur : CFlow Plus. Au sein de celui-ci, on peut employer soit des feuilles de travail (workplace) soit des modèles prédéfinis (template). Un workplace s'utilise lors de différentes expériences (96 mesures d'échantillons différents possibles par feuille) alors qu'un template sera favorisé quand une grande répétabilité est nécessaire, lors de cycles de vérification de l'étalonnage par exemple.

### **Appareil Attune NxT**

L'appareil Attune NxT est commercialisé par Thermo Fisher Scientific (Figure 140).



Figure 140 : Cytomètre en flux Attune NxT.

Le système optique de cet appareil est constitué de deux sources laser (488 nm et 637 nm), ainsi que deux détecteurs optiques, pour les signaux FSC et SSC. Ce système est complété par de nombreux filtres de fluorescence, dont le filtre BL-2 ( $585 \pm 16$  nm) qui nous intéressait pour la rhodamine.

Les résultats obtenus avec ce cytomètre en flux sont enregistrés, visualisables et analysables à l'aide d'un logiciel fourni par le constructeur. Cependant, je ne disposais pas de la licence afin de pouvoir utiliser ce logiciel pour traiter les données enregistrées. A la place, une version d'essai gratuite du logiciel FlowJo a été employée.

#### *3.2.2. Passage des échantillons*

Chaque session d'analyse des échantillons se faisait d'après les étapes suivantes. Après avoir allumé l'appareil et l'ordinateur de contrôle qui lui est relié, il faut s'assurer que la bouteille de déchets est vide et remplir la bouteille de liquide de gaine (ici, de l'eau milli-Q contenant une solution bactériostatique pour éviter la contamination). Une purge de la sonde est effectuée avant de vérifier

l'étalonnage du système avec ce que l'on appelle des billes de validation. Un cycle de vérification est d'abord effectué avec des « billes 8-pics » pour le laser à 488 nm, puis un second cycle a lieu avec des « billes 6-pics » pour le laser à 640 nm. Les deux cycles se font en faisant circuler la solution à une vitesse de 14  $\mu\text{L}/\text{min}$  dans le système et en comptant 500.000 évènements, puis les résultats sont enregistrés dans une feuille modèle prédéfinie. Si les résultats obtenus sont conformes aux attentes, l'appareil est utilisable.

Les étapes décrites ensuite sont à réaliser à chaque fois que l'on veut analyser un échantillon différents (par exemple des cellules incubées différents temps avec les particules, ou alors avec des objets hybrides différents). Le système est rincé en faisant circuler de l'eau milli-Q durant au minimum 2 min, à une vitesse de 60  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Puis l'échantillon est homogénéisé par agitation douce avant d'être mesuré. Pour ce faire, il est pompé dans le système à une vitesse de 14  $\mu\text{L}/\text{min}$  et on considère la mesure satisfaisante après avoir compté 10.000 cellules. Le système est alors rincé de nouveau comme décrit précédemment et prêt pour mesurer le prochain échantillon.

### *3.2.3. Analyse des résultats*

Les résultats bruts obtenus sont analysés à l'aide du logiciel CFlow Plus pour l'appareil Accuri C6 ou FlowJo pour l'appareil Attune.

Lorsqu'un objet passe devant les sources laser, il est comptabilisé comme un évènement. L'appareil étant très sensible, ces objets peuvent être des cellules vivantes, des cellules mortes, des déchets ou des débris cellulaires, des impuretés du milieu, des poussières, des particules décrochées de la surface des cellules... Tous ces évènements seront affichés sur un premier graphe « SSC vs FSC ». Leur signature spécifique permet de déterminer leur nature, et donc de déterminer s'il s'agit ou non de cellules vivantes. Les premières cellules analysées étant les cellules contrôle, n'ayant subi aucun traitement avec quelques particules que ce soit, l'observation du graphe « SSC vs FSC » nous permet de définir quels évènements comptés par le cytomètre correspondent à la population de cellules vivantes. Cette zone du graphe est alors entourée manuellement et constitue ce qui sera appelé le « gate P1 ». Lors des mesures ultérieures, seuls les évènements à l'intérieur de cette zone seront considérés. Nous nous intéressons ensuite au signal mesuré grâce au filtre FL2 (pour l'appareil Accuri) ou BL2 (pour l'appareil Attune), qui nous informe de l'auto-fluorescence des cellules. On y définit un seuil, appelé M1, à environ 0,1 % de la fin de la distribution d'auto-fluorescence des cellules. Tout le signal de fluorescence mesuré au-dessus de ce seuil sera considéré comme étant dû à la présence de la rhodamine, et donc de particules à la surface des cellules.

Le « gate P1 » et le seuil M1 vont s'appliquer pour toutes les séries de mesures effectuées par la suite dans une même feuille de calcul. A partir de là, nous pouvons obtenir les informations qui nous intéressent : le nombre de cellules dans P1, le nombre de cellules fluorescentes dans P1 (pour calculer le % de cellules positives, i.e. le % de cellules à la surface desquelles des nano-objets hybrides se collent), et l'intensité moyenne du signal de fluorescence (proportionnelle au nombre de nano-objets-hybrides présents à la surface des cellules ou internalisées par celles-ci).

Une feuille type de résultats obtenus avec le logiciel CFlow Plus est présentée sur la Figure 141. Dans l'espace A2, des cellules contrôles ont été mesurées (image du haut) tandis que dans l'espace B5, il s'agissait de cellules incubées avec des particules  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@PEP\text{-CD44}$  (image du milieu). Comme on peut le voir, après traitement le signal de fluorescence se décale vers les plus fortes intensités de

manière homogène : le fluorophore est bien détectable et semble se fixer sur toutes les cellules (image du bas ; noir : cellules non traitées et vert : cellules traitées avec  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@PEP-CD44}$ ).

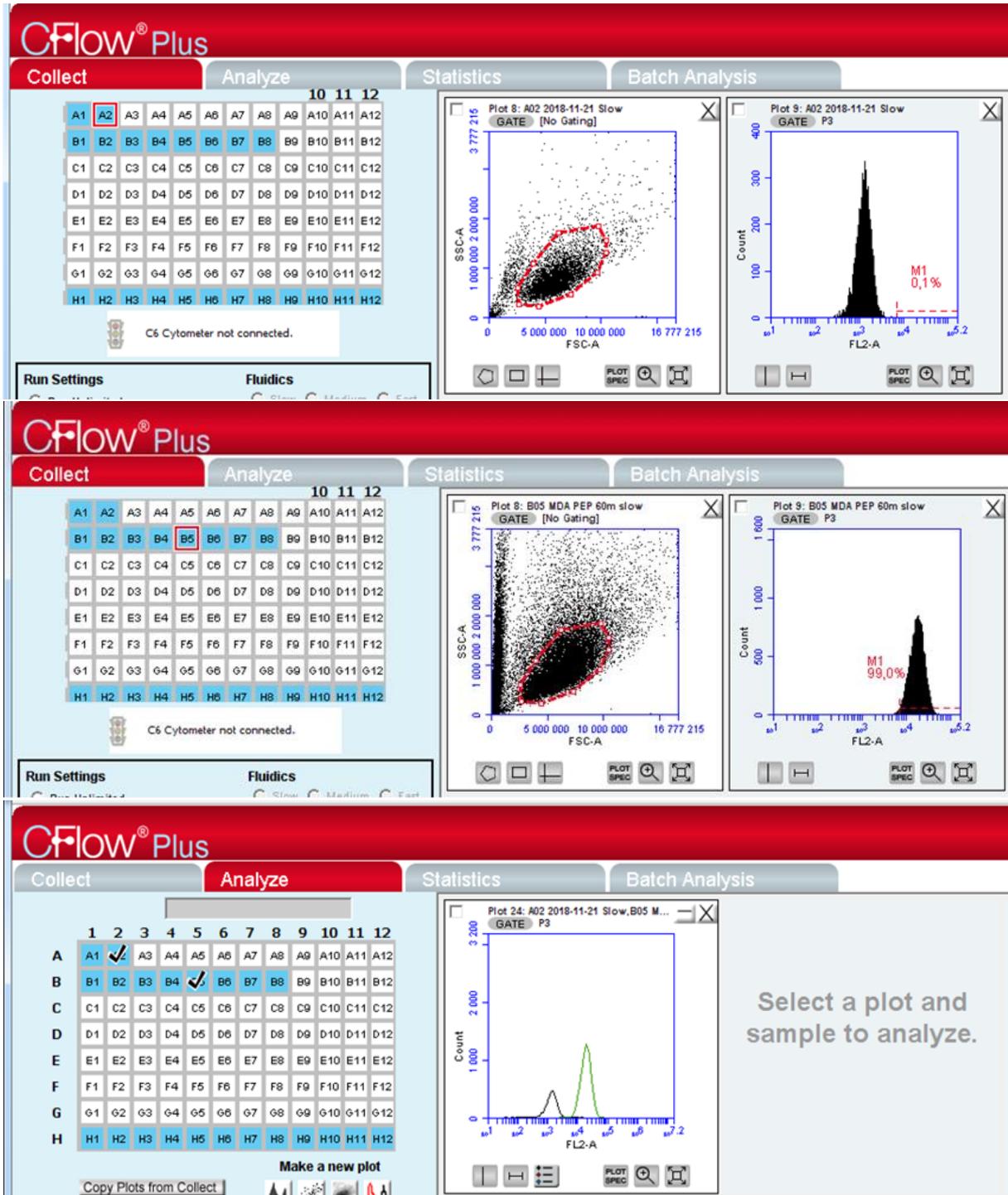


Figure 141 : Captures d'écran du logiciel d'analyse des résultats obtenus à l'aide du cytomètre en flux BD Accuri C6.

#### 4. Publication – Magnetic protein imprinted polymers: a review

Les pages suivantes présentent la publication acceptée par *Journal of Materials Chemistry B* (RSC) en février 2018.





## Magnetic protein imprinted polymers: a review

Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2018, **6**, 1563

Charlotte Boitard, \* Agnès Bée, Christine Ménager and Nébewia Griffete \*

Received 15th November 2017,  
Accepted 5th February 2018

DOI: 10.1039/c7tb02985c

rsc.li/materials-b

Protein imprinted polymers have received a lot of interest in the past few years because of their applications as tailor-made receptors for biomacromolecules. Generally, the preparation of these polymers requires numerous and time-consuming steps. But their coupling with magnetic nanoparticles simplifies and speeds up the synthesis of these materials. Some recent papers describe the use of protein imprinted polymer (PIP) coupled to magnetic iron oxide nanoparticles (MION) for the design of MION@PIP biosensors. With such systems, a target protein can be specifically and selectively captured from complex media due to exceptional chemical properties of the polymer. Despite such performances, only a limited number of studies address these hybrid nanosystems. This review focuses on the chemistry and preparation of MION@PIP nanocomposites as well as on the metrics used to characterize their performances.

## 1. Introduction

## 1.1. Generalities

In a very recent paper, Peppas *et al.*<sup>1</sup> demonstrated that synthetic materials capable of protein recognition are very promising as low-cost platforms for applications in drug delivery, sensing, and tissue engineering. Compared to other recognition systems such as antibodies, PIPs present many advantages. They offer higher recognition selectivity because they are able to recognize only one protein from a complex mixture, are reusable and are

often easier to synthesize. Functional monomers are pre-organized in the presence of a targeted protein before being polymerized with a cross-linking agent. After the extraction of template proteins, the polymer matrix contains tailor-made binding sites, perfectly complementary to the protein. The most important challenges for the development of PIPs are the proteins themselves. Because of their nature, they are highly sensitive to harsh synthesis conditions, and the PIP experimental protocols are difficult to develop. Nevertheless, some successful PIP nanoparticles have been synthesized, offering really good characteristics regarding their ease in use or performances toward protein binding. However, the protein imprinting process is still challenging, because of the large size of the template and diffusion limitations of proteins inside

Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06, CNRS, UMR 8234, PHENIX Laboratory, Case 51, 4 place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France.  
E-mail: charlotte.boitard@upmc.fr, nebewia.griffete@upmc.fr



Charlotte Boitard

Charlotte Boitard obtained a Master's degree in material chemistry in 2016 from Sorbonne Université while graduating from the ESPCI Paris, engineering School of Physics and Chemistry. She is now completing a PhD at PHENIX laboratory under the supervision of Dr N. Griffete and Prof. C. Ménager. The thesis concerns the cell targeting using magnetic protein imprinted polymers.



Agnès Bée

Agnès Bée is associate professor of chemistry since 1988 in PHENIX laboratory at Sorbonne Université. Her research focuses on the functionalization of magnetic nanoparticles and the design of green magnetic multi-scale materials based on biopolymers. Much of her work is on improving the understanding, design, and performance of these materials, mainly for environmental applications and more particularly for the magnetic capture of pollutants from wastewater.

the polymer. To overcome this last drawback, methods for producing PIP with smaller dimensions have been proposed, opening up applications in nanomedicine. For example, PIP nanogels for albumin recognition have been described to avoid immunological response *in vivo*.<sup>2</sup> Other PIP nanogels have been imprinted against proteins overexpressed on the cell surface, such as the human vascular endothelial growth factor,<sup>3,4</sup> an effector of angiogenesis involved in a lot of cancers. And magnetic antibody-like nanoparticles were used for selective protein sequestration in living cells.<sup>5</sup>

Magnetic iron oxide nanoparticles in nanomedicine have been the subject of extensive research over the past few decades because of their low toxicity<sup>6–8</sup> as well as their magnetic properties permitting their use as imaging contrast agents.<sup>9–11</sup> Due to their remarkable hyperthermia properties, they can be used for cancer treatment or for drug release.<sup>12,13</sup> MION have a high surface to volume ratio, allowing a great surface for functionalization to attach biomacromolecules, or polymers. Furthermore, the magnetic properties of iron oxide nanoparticles enable their use for magnetic decantation and separation, greatly facilitating the development of new preparation pathways for biomacromolecule recognition systems. However, it is often necessary to functionalize iron oxide nanoparticles with an appropriate organic or inorganic coating to make performing recognition systems. Among the recognition systems mentioned in the literature,<sup>14–17</sup> protein imprinted polymers seem to be the most promising ones, because of their recognition sites able to selectively and specifically recognize targeted biomacromolecules.<sup>18–21</sup>

## 1.2. Aim of the review

In nanomedicine, MION play a key role due to their biocompatibility and their intrinsic properties, explaining the increasing number of articles on magnetic nanoparticles and PIPs. Many reviews dealing with the synthesis of protein imprinted polymers<sup>22–24</sup> on the one hand and with hybrid nanoparticles containing both an inorganic and an organic part<sup>25</sup> on the other

hand have already been reported in the literature. Nevertheless, to the best of our knowledge, the combination of these two research fields, namely the synthesis of hybrids composed of magnetic iron oxide nanoparticles as an inorganic part, and protein imprinted polymers as an organic one has never been the main focus of a review so far. Lv *et al.* superficially mentioned this nanocomposite in 2013<sup>26</sup> but synthesis conditions were not thoroughly discussed.

In the present review, we consider all the synthesis steps of the MION@PIP nanohybrids, examining experimental conditions, as well as the metrics used to assess the performances of the synthesized nanomaterials. In the first part, we will summarize the fundamentals of the protein imprinting technique and of the advantages of coupling imprinted polymers with magnetic nanoparticles. Assets and limitations of protein imprinting will be discussed, before examining experimental conditions for all synthesis steps. The final section is devoted to the performances of the nanomaterials based on magnetic protein imprinted polymers.

## 2. Fundamental aspects of magnetic protein imprinted polymers

### 2.1. Imprinting technique

Protein imprinted polymers are cross-linked polymer networks presenting very specific recognition sites for a template protein.<sup>18,19</sup> The monomers, denoted as functional monomers, interact with the template proteins by forming a complex, called a pre-polymerization complex, generally either by hydrogen bonding or hydrophobic interactions, as described by Mosbach and co-workers<sup>27</sup> or by Wulff<sup>28</sup> *et al.* Monomers are then polymerized in the presence of proteins. Thus, a cross-linked polymer network is formed, containing the template proteins. After their extraction from the matrix using an appropriate method, they leave imprints corresponding to the specific binding sites of the protein of interest. These imprints perfectly correspond, both chemically and physically, to the template protein. The protein



Christine Ménager

Christine Ménager is full professor of chemistry at Sorbonne Université since 2012. She is the head of the Inorganic Colloids group at the PHENIX lab and president of the scientific council of the faculty of chemistry within Sorbonne Université. Her research deals with the design of complex magnetic systems for biomedical applications: magnetic vectorization, bioimaging, drug release, and magnetic hyperthermia.



Nébèwia Griffete

Nébèwia Griffete obtained her PhD from Paris Diderot University in 2011 in materials chemistry. In 2013, after two years of post-doctoral research, she joined the PHENIX laboratory (at Sorbonne Université) as an assistant professor in Prof. Christine Ménager's group. Her current research interests concern: (i) the surface functionalization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles by molecularly imprinted polymers, and (ii) the use of alternating magnetic field for the development of stimuli-responsive materials for health and environment applications.

imprinted polymer is thus able to specifically and selectively recognize the template from a mixture containing analogous proteins.<sup>29,30</sup>

One of the main interests of protein imprinted polymers is their potential use as synthetic antibodies. They present a lot of advantages compared to the natural ones,<sup>31</sup> such as low production cost (10's £ for mg quantities compared to 100 000's £), ease of obtention (synthesis completed in days and not months), high synthesis reproducibility, mechanical and chemical robustness to a wider range of solvents, pH and temperature conditions, and they do not need the production of animal hosts.

## 2.2. Advantages of coupling imprinted polymers with magnetic nanoparticles

When one cites magnetic nanoparticles, one generally refers to iron, cobalt, nickel and some of their oxidizing materials or alloys. However the coupling of cobalt, nickel and their derivatives with PIPs is limited due to their toxicity in the biological and pharmaceutical fields. The most widely employed magnetic material to be coupled to protein imprinted polymers is magnetite,<sup>32,33</sup>  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , due to its excellent characteristics, such as low toxicity and low production cost. It is also very easy to synthesize. The other magnetic material coupled to PIPs is maghemite,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,<sup>34</sup> presenting the same main characteristics as  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Although chemically more stable than magnetite, maghemite may be less employed because of the oxidation step required. The magnetic iron oxide nanoparticle size covers a broad spectrum, ranging from 10 nm to 100 nm, depending on the synthesis methods used, the co-precipitation<sup>34</sup> pathway leading to smaller nanoparticles than by solvothermal<sup>35</sup> synthesis. The nanoparticle size will affect the speed of their recovery using magnetic decantation: the biggest particles having higher magnetic susceptibility are recovered the fastest.<sup>36,37</sup>

Nanomaterials with different morphologies can be synthesized. Three different kinds of MION@PIP nanoparticles are described in the literature. First, one can synthesize core-shell nanoparticles with a single magnetic iron oxide nanoparticle as a core and a protein imprinted polymer as a shell (Fig. 1a). Second, multicore-shell nanoparticles can be obtained, composed of multiple iron oxide nanoparticles as a core and a PIP layer as a shell (Fig. 1b). And third, PIP gels containing MION nanoparticles (Fig. 1c) should be mentioned. No distinction will be made in this review between these three possible structures of MION@PIP nanomaterials.

MION@PIP can be separated from solution using an external magnetic field. Compared to the more traditional separation methods, such as centrifugation<sup>38</sup> and filtration, magnetic separation is far more rapid, effective and simpler. These advantages are the reason why magnetic protein imprinted polymers are widely used in protein enrichment,<sup>39,40</sup> or separation.<sup>41,42</sup> Some applications are nowadays appearing in nanomedicine. Takeuchi *et al.*<sup>2</sup> used protein imprinted polymers to improve nanoparticle stealth *in vivo*, in order to have more furtive MRI contrast agents. However, polymer coatings modify MION relaxation properties,<sup>34</sup> which may hinder their imaging properties. A compromise between stealth and contrast effects might be needed. Another application in nanomedicine may be

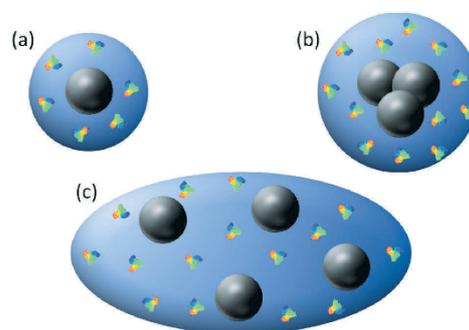


Fig. 1 Three different kinds of MION@PIP nanomaterials (black: MION and blue: PIP).

cell manipulation. Some magnetic nanoparticles are employed *in cellulo* to magnetically guide cell growth in order to develop neurones,<sup>43</sup> and having PIP coating may reduce their aggregation by enhancing their stealth. These applications required a very good control of the material chemistry.

## 3. Assets and limitations of the protein imprinting technique

The polymer imprinting technique is a very powerful tool, which proved to be successful toward a lot of molecules with industrial relevance, such as antibiotics or endocrine disrupting agents for waste water treatment,<sup>44,45</sup> or drugs like aspirin or doxorubicin for a controlled release under a magnetic alternative field, due to the hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles.<sup>32,46,47</sup>

However, when the template is a protein, some new challenges appear.<sup>1,18</sup> Proteins may present the advantage of being composed of a lot of amino acids susceptible to binding by functional monomers;<sup>48</sup> they are hydrosoluble and can be denaturated by the use of organic solvents, employed in almost all protein imprinted polymer synthesis.<sup>22,48</sup> Therefore, synthesis must be carried out in water or in aqueous buffers. Functional monomers and cross linking agents have to be hydrosoluble, limiting their choice.<sup>24,49</sup> Moreover, proteins are bigger and a lot more flexible than templates usually used for the imprinting process, *e.g.* antibiotics or endocrine disrupting agents. Hence, protein cannot access binding cavities inside the polymer matrix, thus hindering the development of the PIP technique.<sup>50</sup> Nevertheless, synthetic pathways were developed to obtain protein imprinted polymers<sup>30,51</sup> for analytical or diagnosis purposes.<sup>52</sup> In 2016, Lieberzeit *et al.*<sup>53</sup> developed a PIP able to specifically trap high density lipoproteins, exploited as a cardiovascular biomarker, because of the inverse correlation existing between its concentration in human serum and the risk of coronary disease. Great interest is now focused on the use of PIPs in nanomedicine. Some of them have been successfully employed by Cecchini *et al.*<sup>4</sup> to target specific cells in zebra fish embryos and by Koide *et al.*<sup>3</sup> to

inhibit *in vivo* the action of the human endothelial growth factor. Moreover, despite the challenges appearing with the size of the template, the success regarding the impression of biomacromolecules pushes researchers to use more complex templates, such as bacteria<sup>54</sup> or viruses.<sup>55</sup>

Other than these challenges in protein imprinting due to the nature of the protein itself, limiting the choice of monomers, solvents, initiators, and the useful temperature range, other ones appear during the synthesis or the characterization of the nanomaterials. A good control of the polymerization will be needed to ensure the possible access of the proteins to the binding sites, and a better homogeneity of the nanomaterials, which may prove difficult in aqueous synthesis carried out at near-ambient temperatures. Moreover, the obtained particles may be difficult to characterize. In particular, difficulties may arise when one wants to assess the size of the hybrid nanomaterials, either using dynamic light scattering (DLS) or transmission electronic microscopy (TEM). When measuring hydrodynamic diameters, authors should keep in mind that different analytical equipment will use different observation angles, sometimes leading to different results. The observation angle used should thus be mentioned to allow a better comparison between different systems. Furthermore, TEM imaging of nanomaterials is not easily accessible for some laboratories, and may also not be accurate enough to see organic polymers, due to some poor contrast existing between them and the most widely used carbon-covered grids. Authors should be careful to use appropriate grids when imaging their materials.

All these challenges, inherent to the nature of the protein, the polymer synthesis and the nanomaterial characterization, may be the reason why PIP synthesis, and even more when coupled to magnetic nanoparticles, is therefore a very recent field of research, currently in full development.<sup>56</sup> The first studies of such hybrid systems were carried out in 2006 by Lu *et al.*<sup>57</sup> but it was not until 2010 that real interest in the subject appeared, notably with the work of Kan *et al.*<sup>58</sup>

#### 4. Magnetic protein imprinted polymer nanomaterial synthesis

The synthesis of magnetic protein imprinted polymer nano-systems could be achieved through the following synthesis steps: (1) the choice of the protein to be imprinted, (2) the magnetic particle functionalization, being responsible for the morphology of the resulting nanomaterial (Fig. 1) and leading to either a surface or bulk imprinted protein (Fig. 2), (3) the choice of the functional monomers and crosslinking agents, (4) the synthesis of the polymer, occurring in water or in physiological buffers, and (5) the extraction of the template proteins. All these steps are thoroughly described below.

When proteins are immobilized onto the nanoparticle surface, and with a good control of the thickness of the polymer layer synthesized,<sup>59–61</sup> the imprints obtained are rather two-dimensional than three-dimensional. When speaking of two-dimensional imprints, one is referring to cavities at the surface

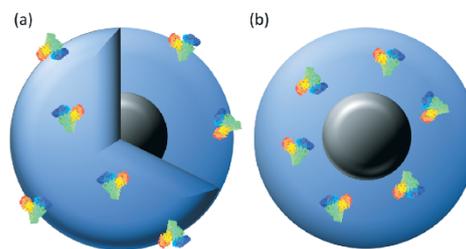


Fig. 2 Different kinds of recognition sites: either at the surface forming two-dimensional or surface imprints (a) or fully embedded inside the polymer forming three dimensional, or bulk, imprints (b) (black: MION, blue: PIP).

of the polymer: only a part of the protein is imprinted, and proteins do not need to diffuse inside the polymer to reach recognition sites (Fig. 2a). In contrast, three-dimensional imprints are fully embedded inside the polymer and the whole tertiary conformation of the protein is imprinted (Fig. 2b).

##### 4.1. Imprinted proteins

The choice of the protein template is crucial before synthesizing PIP. Although human and animal proteomes display a wide variety of proteins, only a very few of them have currently been used as template proteins, as one can see in Fig. 3, which reports the distribution of the number of publications on MION@PIP according to the nature of the imprinted protein. Among the most commonly used proteins, one can mention bovine serum albumin (BSA), imprinted by Lu *et al.* in 2006<sup>57</sup> and Tan *et al.* in 2008,<sup>62</sup> bovine hemoglobin (BHb) used by Li *et al.* in 2009,<sup>63</sup> Kan *et al.* in 2010<sup>58</sup> and Liu *et al.* in 2014,<sup>64</sup> and finally lysozyme, imprinted by Lu *et al.* in 2006<sup>57</sup> and Jing *et al.* in 2010.<sup>65</sup>

There are several possible reasons for this limited choice of protein. First, this research on protein imprinted polymers combined with magnetic nanoparticles is relatively new. Even though the synthesis of protein imprinted polymers begins to be rather well controlled, the addition of magnetic

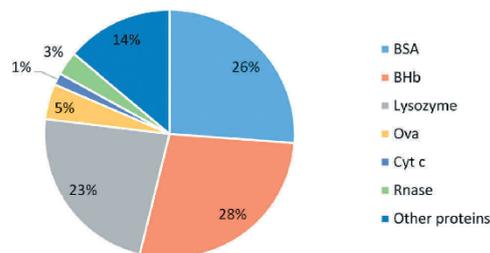


Fig. 3 Distribution of the number of publications on MION@PIP according to the nature of the imprinted protein, considering all the published work in this research field (59 publications, from 2006 to 2017). BSA: bovine serum albumin, BHb: bovine hemoglobin, Ova: ovalbumin, Cyt c: cytochrome c, Rnase: ribonuclease.

nanoparticles modifies the synthesis protocols already established. These must therefore be optimized, using relatively inexpensive and sparsely varied proteins in order to be able to carry out several experiments and determine the best experimental conditions. Second, not all proteins can be readily obtained, synthesized or purchased, in quantities sufficient to carry out both syntheses and performance assessments. It is therefore necessary to imprint proteins available in the market in large quantities, which once again reduces the choice to the three so-called classical proteins: BSA, BHB, and lysozyme. However, the evolution in the nature of proteins used as templates should be noted in the last few years. The share of articles related to the three classical proteins decreases while in the meantime, more articles report the synthesis of imprinted polymers using non-classical proteins, such as human hemoglobin<sup>35</sup> (HHb), human serum albumin<sup>66,67</sup> (HSA), or immunoglobulins.<sup>68</sup> This could lead to some great innovations in the years to come.

Moreover, the protein template used can be of two different types. It can either be the whole protein or an epitope of the protein of interest. An epitope is a small portion of protein, consisting of a few amino acids. The sequence considered must be able to induce recognition by the imprinted polymer. The epitope must also be sufficiently characteristic of the protein to be specifically recognized. The imprinting of epitopes compared to the one of whole proteins has many advantages, such as the possible use of harsher synthesis conditions. However, it requires very good knowledge of the protein structure in order to choose the right epitope, which is often more difficult to obtain than the whole protein, because it is generally synthesized on demand. This may be why very few articles mention the use of this imprinting method. To the best of our knowledge, only five studies have reported the successful synthesis of magnetic imprinted polymers using protein epitopes as templates.<sup>39,69–72</sup>

Regarding the proteins successfully imprinted, very few applications of hybrid systems have emerged. The main one is by far the use of magnetic PIP nanomaterials as a solid extractor. And this, in order to carry out an analysis of complex biological media, such as egg white<sup>11,73</sup> or bovine blood,<sup>12,74</sup> or alternatively to provide an enrichment in one specific protein of these media.<sup>39,40</sup>

Another application, still marginal, was developed by Liu *et al.*<sup>5</sup> in 2015. Liu developed the idea to sequester a specific protein, DNase I, *in cellulo*. To this end, they synthesized magnetic DNase I imprinted polymers, called ANP5. Intracellular fluorescent assays were carried out to follow the activity of two proteins: DNase I and a competitive protein, 3'-exonuclease. Both imprinted and non-imprinted polymers were made using a co-monomer, fluorescein-*o*-methacrylate, in addition to the functional monomer, in order to have a green fluorescence of particles (FAM-NPs). DNase I and 3'-exonuclease were hybridized with a nucleic-acid based fluorescent probe to obtain fluorescent proteins (TAMRA Probe-D for DNase I and Cy5 Probe-E for 3'-exonuclease).

Despite being an experimental protocol to be further optimized, in particular in order to minimize the non-specific

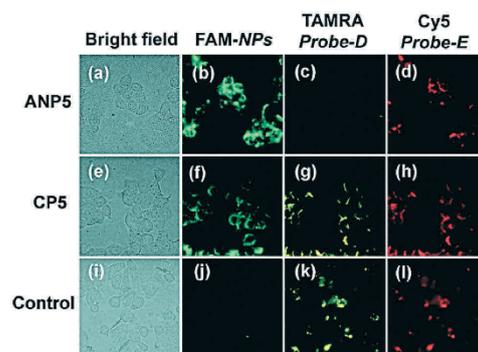


Fig. 4 Intra-cellular fluorescence to follow the activity of two proteins, DNase I (yellow, TAMRA Probe-D) and 3'-exonuclease (red, Cy-5 Probe-E), after internalization of magnetic imprinted polymer nanoparticles (ANP5) and non-imprinted ones (CP5) (green). Reproduced with permission from ref. 5. Copyright 2015 Royal Society of Chemistry.

adsorption of other proteins on the surface of the polymer, this work remains a success.

As one can see in Fig. 4, both magnetic imprinted (ANP5) and non-imprinted (CP5) polymer nanomaterials were successfully internalized by the targeted cells. CP5 nanoparticles do not interfere with the cell activity. Indeed, the results obtained by fluorescence microscopy concerning the DNase I and 3'-exonuclease activities are substantially identical for the control cells and for the cells having internalized CP5 nanoparticles (images Fig. 4(h–l) and (g–k), respectively). The internalization of the ANP5 nanoparticles results in a sudden loss of DNase I activity (absence of yellow fluorescence in Fig. 4c) without disrupting the activity of the 3'-exonuclease (image Fig. 4d). Thus, synthesized  $\text{Fe}_3\text{O}_4@PIP$  nanoparticles are able to selectively trap DNase I *in cellulo*.

In conclusion, the protein imprinted polymers coupled to magnetic iron oxide nanoparticles present nowadays little variety. BSA, BHB and lysozyme are mainly used, which limits the possible applications of these systems. Imprinting of proteins presenting major biological interest is therefore really innovative.

#### 4.2. Magnetic nanoparticle functionalization

The interaction of magnetic iron oxide nanoparticles with imprinted polymers often implies a surface modification of the nanoparticle, making them much more suitable for the synthesis of magnetic PIPs. Different strategies are proposed to design surface-functionalized nanoparticles, and the main ones are displayed in Scheme 1.

First, one should note that some functionalizations involve a silica layer,<sup>59,63,69</sup>  $\text{SiO}_2$  and some do not involve it. Covering the surface of iron oxide nanoparticles, magnetite or maghemite, with a silica layer (Fig. 5, top) makes them more resistant to dissolution under acidic conditions. Moreover, silica coating can prevent oxidation of magnetite nanoparticles and can also minimize their aggregation in the reaction medium and

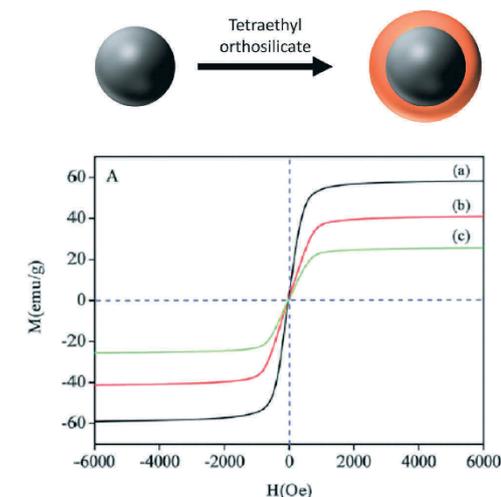
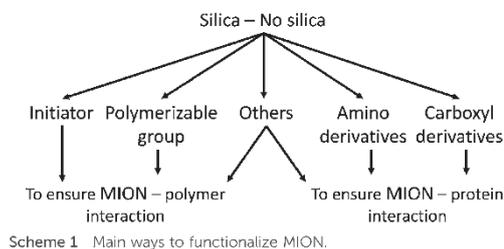


Fig. 5 Top: Surface functionalization of magnetic iron oxide nanoparticles by a layer of silica (black: MION and orange: silica layer). Bottom: Loss of magnetism due to the presence of this silica layer (a:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , b:  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  and c:  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2@PIP$ ). Reproduced with permission from ref. 40. Copyright 2011 Royal Society of Chemistry.

ultimately in the polymer. However, the  $\text{SiO}_2$  coating acts as an insulator, resulting in a decrease in the magnetic properties of the final object, characterized by a decrease of magnetization at saturation<sup>63</sup> (Fig. 5, bottom). However, its presence increases the size of the final particles, by adding a layer of non-negligible thickness. This may prove to be problematic for injection *in cellulo* as reported by Liu *et al.*<sup>5</sup> Finally, silica is easier to functionalize than iron oxide, preferentially forming covalent interactions, thus more resistant than the non-covalent ones, like electrostatic or hydrogen bonding, between iron oxide surfaces and functionalizing molecules.

Second, with or without a silica layer, nanoparticles can subsequently be functionalized by organic molecules. These can have two main functions.

On the one hand, functionalization can be performed to enhance the interactions between the nanoparticles and the polymer. This is done using organic molecules having a polymerizable

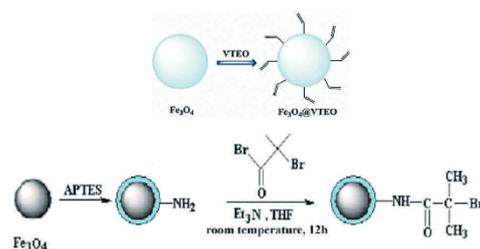


Fig. 6 Top: Magnetic nanoparticle surface functionalization using a polymerizable group: VTEO or vinyltriethoxysilane (blue: MION). Reproduced with permission from ref. 52. Copyright 2017 Elsevier. Bottom: Surface functionalization using a silica layer combined with a polymerization initiator: 2-bromoisobutyryl bromide (black: MION, blue: silica layer).  $\text{Et}_3\text{N}$ : triethylamine, THF: tetrahydrofuran. Reproduced with permission from ref. 75. Copyright 2010 Elsevier.

group, such as a carbon-carbon double bond<sup>52,65</sup> (e.g. VTEO: vinyltriethoxysilane, Fig. 6 top), or by a polymerization initiator<sup>34,75</sup> (e.g. 2-bromoisobutyryl bromide, Fig. 6 bottom).

On the other hand, functionalization can be done to promote interactions between nanoparticles and proteins. The organic molecules functionalizing the surface of the nanoparticles may have functions able to form hydrogen bonds with the amino acids of the proteins (Fig. 7). The functional groups concerned are amines  $\text{NH}_2$  and their derivatives<sup>5,67,76,77</sup> as well as carbonyl  $\text{C}=\text{O}$  and their derivatives.<sup>58,78-80</sup>

Finally, other types of functionalizations are possible and should be mentioned. For example, one can use an ionic liquid cation, such as 3-chloropropyltrimethoxysilane 1-methylimidazole,<sup>61</sup> as displayed in Fig. 8, top. The protein will then interact with the nanoparticles by performing an anion exchange, taking the place of chloride. The aim is the same as previously described, *i.e.* immobilize proteins at the MION surface to obtain two-dimensional imprints.

One can also first encapsulate several magnetic nanoparticles within a polymer, such as poly acrylic acid, chitosan

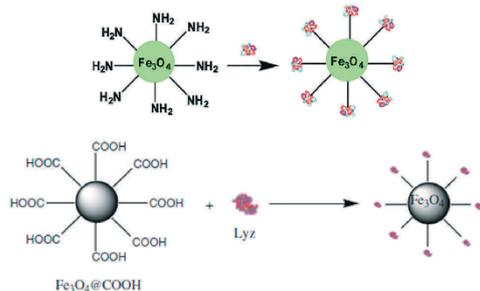


Fig. 7 Top: Magnetic nanoparticle surface functionalization with an amine derivative (green: MION and entangled chains: proteins). Reproduced with permission from ref. 76. Copyright 2014 Royal Society of Chemistry. Bottom: Surface functionalization with a carboxylic acid (black: MION and entangled chains: proteins). Reproduced with permission from ref. 80. Copyright 2015 Springer.

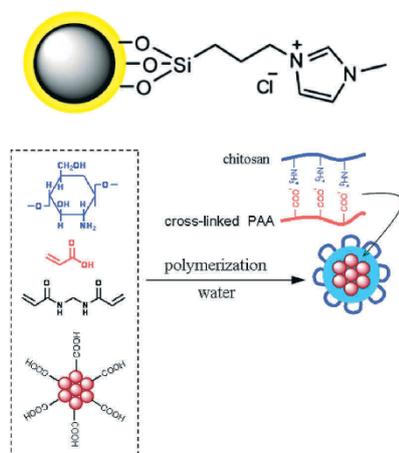


Fig. 8 Top: Magnetite nanoparticle functionalized with an ionic liquid (black MION, yellow: silica coating). Reproduced with permission from ref. 61. Copyright 2017 Elsevier. Bottom: Synthesis of a chitosan shell over several magnetic nanoparticles, itself to be further functionalized through the synthesis of a PIP coating (brown: MION, blue: polyacrylic acid-block-chitosan shell). Reproduced with permission from ref. 81. Copyright 2015 Elsevier.

or sodium alginate,<sup>81,82</sup> itself to be covered in a further synthesis step by a protein-imprinted polymer (Fig. 8, bottom).

#### 4.3. Type of polymer

The choice of the monomer to be polymerized to form the protein imprinted polymer is mainly based on its ability to form interactions with the selected protein. These interactions can be of two kinds. First, hydrogen bond-type interactions involving, on

the one hand, the amino acids of the protein sequence and on the other hand amine functions, or derivatives, or carbonyl-derived functions present in the monomer structure. Second, interactions can be of hydrophobic type, involving the proteins and the alkyl chains of certain monomers. The most widely used monomers presented in Fig. 9 are commented on below.

acrylamide (Fig. 9a) and its derivatives such as *N*-isopropylacrylamide are widely used<sup>57,73,83,84</sup> mainly because they are capable of forming numerous hydrogen bonds with the proteins to be imprinted, due to the presence of the amine group. Furthermore, as the syntheses of imprinted polymers are carried out in water, *N,N*-methylene-bis-acrylamide (Fig. 9b) is found to be a first class crosslinking agent.

Boronic acids, such as 3-amino-phenylboronic acid (Fig. 9c), are mainly used in syntheses involving iron oxide nanoparticles functionalized by a silica layer.<sup>63,85</sup> Indeed, these acids exhibit high affinity for silica and thus promote the interaction of the nanoparticles with the polymer during its synthesis. In addition, the amine function can interact with the proteins, promoting their incorporation into the polymer coating and the formation of three-dimensional imprints.

Among the most widely used silane monomers, 3-amino-propyltriethoxysilane,<sup>40</sup> octyltrimethoxysilane<sup>76</sup> (Fig. 9d) and tetraethoxysilane should be mentioned.<sup>66</sup> They exhibit strong affinities toward silica, thus facilitating their interaction with nanoparticles coated by a SiO<sub>2</sub> layer. Moreover, they very often display long alkyl chains, favoring the hydrophobic interactions with the proteins. Another advantage of silane-based inorganic polymers is their enhanced resistance to dehydration and temperature changes compared to organic polymers allowing the use of harsher extraction methods.

Then, dopamine (Fig. 9e) is widely used as a monomer, primarily because of its ability to form a self-assembled polymer.<sup>60,86–91</sup> It is therefore not necessary to use conditions

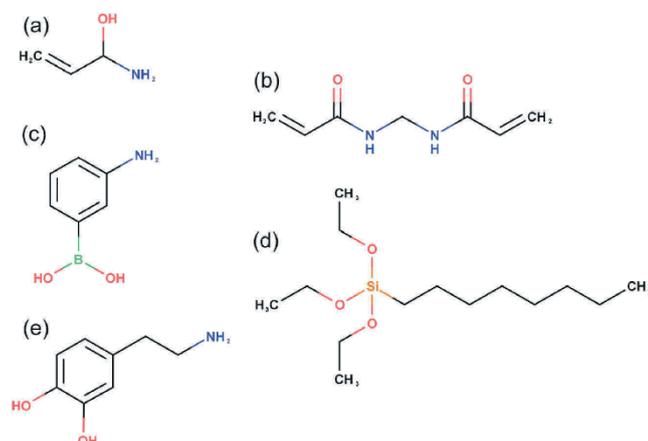


Fig. 9 Most widely used monomers: acrylamide (a), *N,N*-methylene-bis-acrylamide (b), 3-amino-phenylboronic acid (c), octyltrimethoxysilane (d), and dopamine (e).

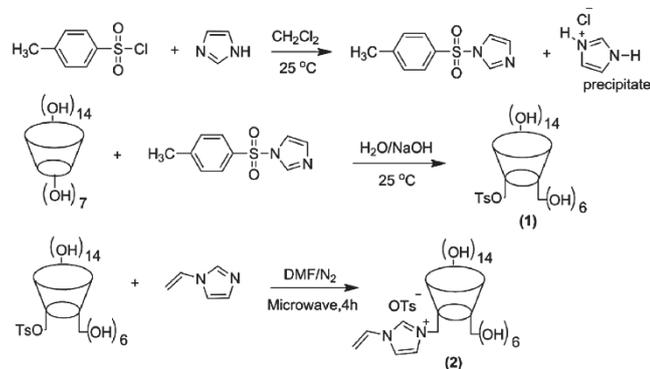


Fig. 10 Synthesis pathway toward the obtention of home-made cyclodextrins (monomers 1 and 2). (1): mono-6-(*p*-tolylsulfonyl)- $\beta$ -cyclodextrin. (2): mono-6A-deoxy-6-(1-vinylimidazolium)- $\beta$ -cyclodextrin tosylate. Reproduced with permission from ref. 39. Copyright 2017 Elsevier.

potentially destructive for the protein, such as heating or free radical formation steps to initiate polymerization.

Finally, one should note that some researchers synthesize their own functional monomers in order to maximize selective interactions with the protein to be printed. For example Zhang *et al.*<sup>39</sup> used cyclodextrin and their strong ability to be functionalized to obtain home-made monomers providing both strong electrostatic and hydrophobic interactions with the targeted protein (Fig. 10).

#### 4.4. Polymerization initiation and control

The next step, after the choice of the monomers, is the initiation of polymerization. Polymerizations are chain-growth, and more precisely free-radical ones. Among the most widely used method to produce free radicals, one should cite the use of UV-light,<sup>92</sup> thermal or redox decomposition<sup>34,93</sup> of initiators. Thermal decomposition is the least used one because of the degradation risks for the template protein. UV-irradiation may also lead to protein lesions, explaining why the preferred method to create free radicals while synthesizing PIP is the redox decomposition.<sup>31,93</sup>

The polymerization can be a controlled one, aiming to decrease the number of termination or transfer reactions by controlling the quantity of radicals present. A fraction of these free radicals is protected through an inert form, and an activation-deactivation equilibrium is established between the growing, active chains and the dormant ones. Ideally, the polymer chains are all rapidly created at the beginning of the polymerization and grow simultaneously, following these activation-deactivation cycles. These polymerization processes are of advantage when a control of the polymer layer thickness is needed,<sup>75,84</sup> *e.g.* in order to have really thin coatings with two dimensional imprints of proteins immobilized at the surface of nanoparticles.

#### 4.5. Extraction methods

Once the polymer is synthesized, proteins are trapped inside. It is therefore necessary to extract them in order to obtain

imprints and to assess the performances of the synthesized magnetic imprinted polymer nanomaterials. In order to do so, different methods exist, which could be classified among five main categories, as displayed in Fig. 11. Both weakly acidic or basic conditions<sup>62,94</sup> can be employed, but also a salt, or one or more organic solvents. It is also possible to envisage the use of surfactants such as SDS (sodium dodecylsulfate), in a neutral,<sup>85,95–97</sup> or slightly acid or basic medium.

As one can see in Fig. 11, the last mentioned method is the most common. Indeed, nearly half of the published articles use a slightly acidic (or more rarely basic) solution containing a surfactant.<sup>35,64,89,98,99</sup> However, this method presents the risk of polluting the imprints formed inside the polymer by the residual presence of surfactant after the extraction step, even after being washed with distilled water.<sup>100</sup>

The second most employed method is the use of salts,<sup>82,101,102</sup> and typically sodium chloride solution at concentrations ranging from 0.2 to 2 mol L<sup>-1</sup>.<sup>65,81,84,103</sup> The change in the ionic strength of the medium results in a change in the conformation of the proteins, attenuating or even suppressing their interactions with the polymer and therefore allowing their release.

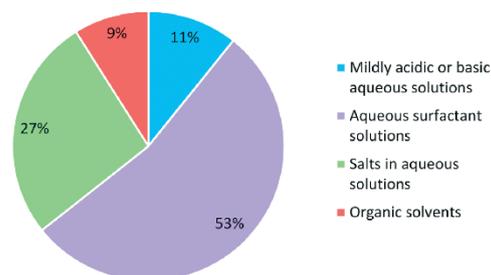


Fig. 11 Distribution of the number of publications on MION@PIP according to the nature of the employed extraction method.

The use of organic solvents,<sup>34,39,58,70</sup> pure or in mixture, also results in a change in the conformation of the proteins enabling their release. However, it may also induce an irreversible alteration of the polymer, and therefore a loss of imprints. This may be the reason why this extraction method is far less usual than the use of aqueous solutions.

#### 4.6. Summary of the synthetic conditions employed to obtain MION@PIP

Table 1 summarizes the most used experimental conditions toward the obtention of MION@PIP.

## 5. MION@PIP nanomaterial performances

The efficiency of MION@PIP is mainly characterized by their specificity and selectivity performances. Specificity is due to the fact that PIP particles adsorb more protein than the non-imprinted polymer (NIP) while selectivity is due to the ability of the PIP to bind the template protein better than other proteins. Information about both these parameters is obtained from adsorption isotherms, which describe the distribution of the template protein between MION@PIP and solution. To build these adsorption isotherms, the quantity of protein

**Table 1** Overview of the experimental conditions employed for MION@PIP synthesis. AcOH: acetic acid, BHB: bovine haemoglobin, BSA: bovine serum albumin, HAS: human serum albumin, MBAM: methylene-bis-acrylamide, SDS: sodium dodecylsulfate, w- water

Imprinted protein	Initiation	Control of polymerization	Functional monomer	Cross-linker	Extraction method	Application	Ref.
Alpha fetoprotein	—	—	Ethyl-co-vinyl alcohol	—	SDS/w	Protein separation from cellular culture medium	104
BHB	Redox	No	3-Aminobenzenboronic acid	3-Amino-benzenboronic acid	SDS/w	Electroluminescent immunoassay	96
	—	No	3-Aminopropyltriethoxysilane and octyltrimethoxysilane	—	NaOH	Protein separation from bovine serum	76
	—	—	Dopamine and copper ions	—	Enzyme, then KOH	Protein separation from bovine blood	87
	Redox	No	Itaconic acid, methacrylic acid	MBAM	SDS/AcOH	Protein separation from bovine blood	42
	—	No	3-Aminopropyltriethoxysilane and octyltrimethoxysilane	—	NaOH	—	105
BSA	Redox	No	Methyl methacrylate	Ethylene glycol dimethacrylate	NaOH	—	—
	Redox	Yes	Acrylamide, N-[3-(dimethylamino)-propyl]-methacrylamide and N-isopropylacrylamide	MBAM	NaCl	Protein separation from bovine serum	84
	Redox	No	N-isopropylacrylamide and methacrylic acid	MBAM	SDS/AcOH	—	98
	—	—	Dopamine	—	SDS/AcOH	Protein separation from bovine blood	91
BSA and lysozyme	Redox	No	Acrylamide	MBAM	SDS/AcOH	—	57
Cytochrome c	Redox	No	Special monomer, cyclodextrin-based, synthesized for this purpose	MBAM	Mixture of methanol and acetic acid	—	39
Horse radish peroxidase	—	—	Dopamine	—	SDS/AcOH	—	106
HSA	—	No	3-Aminopropyltrimethoxysilane and tetraethyl orthosilicate	—	NaCl	—	66
Lysozyme	Redox	Yes	Acrylamide and N-isopropylacrylamide	MBAM	SDS/AcOH	Protein separation from egg white	75
	—	—	Dopamine	—	SDS/AcOH	—	60
	Redox	No	Acrylamide, methacrylic acid, and dimethyl-amino ethyl-methacrylate	MBAM	NaCl	—	81
	—	—	Dopamine	—	SDS/AcOH	Protein separation from egg white	86
	Acid	No	3-Aminopropyltrimethoxysilane and tetraethyl orthosilicate	—	SDS/AcOH	Protein separation from egg white	80
Ovalbumin	—	No	Chitosan	Glutaraldehyde	NaCl	—	82

adsorbed at equilibrium ( $Q_e$  in  $\text{mg g}^{-1}$ ) is plotted *versus* the initial concentration of protein in solution ( $C_i$  in  $\text{mg mL}^{-1}$ ). The quantity adsorbed is normalized by the mass of the adsorbent to allow a comparison of different materials. The maximum amount of adsorbed protein (called  $Q_{\text{max}}$ ) represents the adsorption capacity of the materials, which is a characteristic of the considered materials. There are several models for predicting the equilibrium distribution. However, the Langmuir and Freundlich models are the most widely used, and will be more thoroughly described. In order to be sure to reach equilibrium for adsorption experiments and determination of adsorption capacities, adsorption kinetics studies are performed. The last performance to be assessed is the reusability of MION@PIP nanomaterials, to know how many adsorption–desorption cycles can be performed with a single sample of nanomaterials before it loses its adsorption properties.

In order to evaluate all these parameters, batch adsorption experiments are carried out according to the following protocol. A known mass of MION@PIP (or MION@NIP) is dispersed in an aqueous protein solution at the initial concentration  $C_i$  ( $\text{mg mL}^{-1}$ ). The resulting mixture is shaken and the nanomaterials are magnetically collected at pre-determined times before supernatants are analyzed, mainly by UV-Vis spectrophotometry or liquid chromatography, to determine the concentration of proteins remaining in solution. The amount of adsorbed protein ( $Q$ , in  $\text{mg g}^{-1}$  with the amount of protein in  $\text{mg}$  and the amount of dry MION@PIP in  $\text{g}$ ) is deduced as follows:

$$Q = \frac{(C_i - C_f)V}{m} \quad (1)$$

where  $C_i$  ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) and  $C_f$  ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) are respectively the initial and final concentrations of the protein samples,  $V$  ( $\text{mL}$ ) is the volume of the protein solution and  $m$  ( $\text{g}$ ) is the mass of MION@PIP (or MION@NIP) nanomaterials. When assessing the properties of their MION@PIP nanomaterials, authors should keep in mind that synthesis and adsorption tests have to be carried out under the same conditions, regarding pH,

ionic force, and temperature to be sure that protein conformations do not change between impression and recognition. The experimental conditions used for performance assessments may be better described in some publications to ensure the relevance of the results.

### 5.1. Adsorption kinetics

First, adsorption kinetics is investigated in order to determine the minimum time required to assess adsorption equilibrium. Two major trends should be mentioned, according to the two possible kinds of imprints. When the PIP synthesis leads to the formation of surface imprints, also mentioned as two-dimensional imprints, the adsorption kinetics are very rapid and the equilibrium is reached within an average time of 30 minutes.<sup>91,94,107</sup> In contrast, when the imprints are three-dimensional, the adsorption kinetics are much slower. The proteins must diffuse into the polymer, and the time to reach equilibrium increases to hours.<sup>93,87,108</sup> One should note that in both cases, the time to reach the equilibrium is smaller for MION@NIP than for MION@PIP. Indeed, non-imprinted polymers have lower adsorption capacities, and non-specific adsorption is faster because there are no particular binding sites to reach. Gao *et al.*<sup>94</sup> reported this difference in kinetic rates by investigating the adsorption of bovine serum albumin on both MION@PIP and MION@NIP, as displayed in Fig. 12A.

The kinetic models classically used to determine the rate determining step in adsorption processes are based (i) on the composition of the solution where the rate of adsorption at time  $t$  is determined by the difference between the state of the system at  $t$  and its equilibrium state, (ii) on diffusion, the rate of adsorption being determined by molecular diffusion. In the protein imprinted polymer literature, most authors describe their experimental data with models based on the composition of the solution. Among these models, pseudo-first order and pseudo-second order models<sup>109,110</sup> are the most studied models. The pseudo-first order model considers that the rate of occupation of the adsorption sites is proportional to the

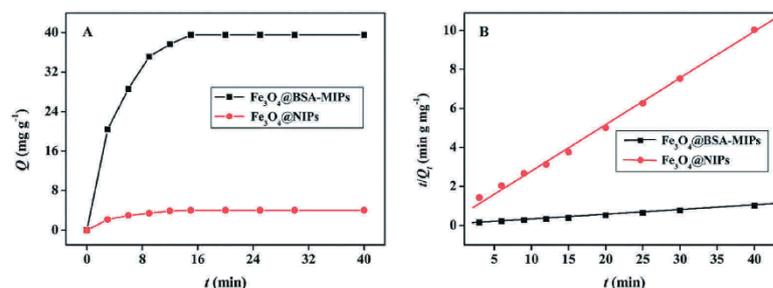


Fig. 12 (A) Adsorption kinetics of bovine serum albumin on imprinted magnetic polymer nanocomposites ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @BSA-MIPs) and non-imprinted magnetic polymer nanocomposites ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @NIPs). (B) Second-order kinetics model to evaluate the kinetic mechanisms of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @BSA-MIPs and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @NIPs. Reproduced with permission from ref. 94. Copyright 2013 Royal Society of Chemistry.

number of unoccupied sites, and that adsorption is reversible. The linearized rate equation is described below:

$$Q_t = Q_c[1 - e^{-k_1 t}] \quad (2)$$

where  $k_1$  ( $\text{min}^{-1}$ ) is the pseudo-first order rate constant, also known as the Lagergren constant,  $Q_c$  and  $Q_t$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) are the amounts of protein adsorbed at equilibrium or at time  $t$  respectively. The half-equilibrium time (min) corresponds to  $\ln(2)/k_1$ .

The pseudo-second order model considers both rapid adsorption onto highly reactive sites and slower adsorption on sites with lower energy. Its linearized rate equation is as follows:

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{t}{Q_c} + \frac{1}{k_2 Q_c^2} \quad (3)$$

where  $k_2$  ( $\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) is the pseudo-second order rate constant and  $Q_c$  and  $Q_t$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) are the amounts of proteins adsorbed at equilibrium and at time  $t$  respectively. The initial adsorption rate ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) corresponds to  $k_2 Q_c^2$  and the half-equilibrium time (min) is  $1/k_2 Q_c$ . This model was applied by Gao *et al.*<sup>94</sup> for bovine serum albumin on both MION@PIP and MION@NIP (Fig. 12B).

From the kinetics studies, one retrieves important information. The first one is the equilibrium time, deduced from the experimental data representing the evolution of the amount of the adsorbed protein as a function of time. And the second one is the order of the kinetic rate. Both pseudo-first order and pseudo-second order models are equally employed by authors to fit their experimental data, according to the following trend. When imprinting relatively big proteins, such as BSA, or synthesizing highly cross-linked polymers, the limiting adsorption step is the time needed by proteins to reach their binding sites and authors preferentially use a pseudo-first order model. In contrast, when working with smaller proteins, such as lysozyme, or when having poorly cross-linked polymer networks, the limiting adsorption rate is the formation of the hydrogen bonds between the polymer and

the protein. In this case, authors favour the use of the pseudo-second order model.

## 5.2. Isotherm analysis

Once the equilibrium time is determined, protein adsorption isotherms can be performed on both MION@PIP and MION@NIP. In order to better describe these experimental isotherms, linearized Langmuir<sup>111</sup> and Freundlich<sup>112</sup> models are widely used. The Langmuir isotherm model basically applies for monolayer adsorption onto a homogeneous surface, while the Freundlich model is preferentially used to describe multilayer adsorption onto a heterogeneous surface. The most widely used linearized Langmuir model can be expressed as follows:

$$\frac{C_c}{Q_c} = \frac{C_c}{Q_{\max}} + \frac{1}{K_L Q_{\max}} \quad (4)$$

While the most used and linearized Freundlich model obeys the following equation:

$$\ln(Q_c) = \ln(K_F) + m \ln(C_c) \quad (5)$$

where  $C_c$  is the equilibrium concentration of protein ( $\text{mg mL}^{-1}$ ),  $Q_c$  is the equilibrium amount of the adsorbed protein ( $\text{mg g}^{-1}$ : mg of proteins, and g of hybrid nanomaterials),  $Q_{\max}$  is the theoretical maximal amount of the adsorbed protein ( $\text{mg g}^{-1}$ ), also known as the adsorption capacity,  $K_L$  ( $\text{mL mg}^{-1}$ ) is the Langmuir constant related to the affinity of binding sites or imprints, while  $K_F$  ( $(\text{mg g}^{-1}) (\text{mL mg}^{-1})^m$ ) is the Freundlich coefficient and  $m$  is the heterogeneity index. Strongly heterogeneous polymers have low  $m$  coefficient, while more homogeneous ones have higher  $m$  values.

An example of experimental data obtained for bovine hemoglobin adsorption on MION@PIP by Li *et al.*<sup>88</sup> and fitted with both Langmuir and Freundlich adsorption models is displayed in Fig. 13. The linearized Freundlich model (Fig. 13B) suits these experimental data better than the linearized Langmuir model (Fig. 13A).

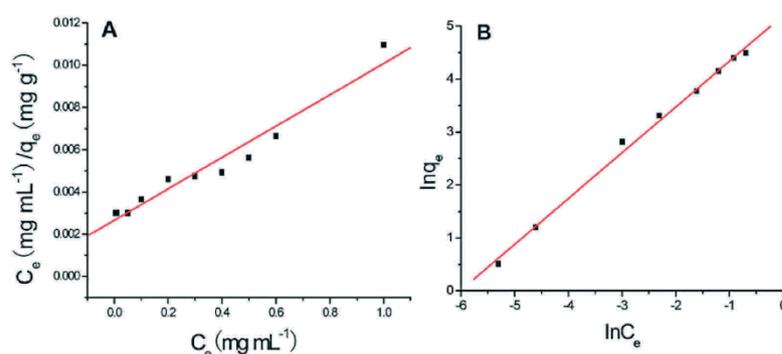


Fig. 13 Langmuir (A) and Freundlich (B) isotherm fit for bovine hemoglobin adsorption on MION@PIP. Reproduced with permission from ref. 88. Copyright 2016 Royal Society of Chemistry.

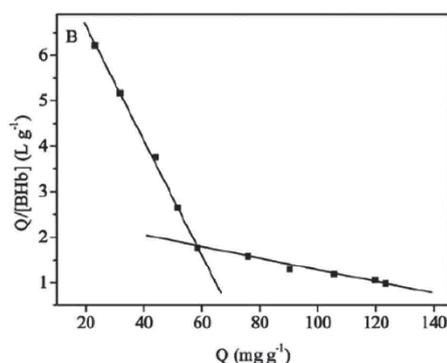


Fig. 14 Scatchard plot to estimate the binding nature of bovine hemoglobin on  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @PIP.  $Q$ : the amount of BHB bound to  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @BHB-MIPs; [BHB]: concentration of free BHB. Reproduced with permission from ref. 40. Copyright 2011 Royal Society of Chemistry.

Another model, far less usual than the Langmuir or Freundlich ones, but also employed in some publications to analyse adsorption isotherms is a variation of the Scatchard-Rosenthal plot<sup>11,13</sup> as follows:

$$\frac{Q_c}{C_c} = \frac{Q_{\max} - Q_c}{K_D} \quad (6)$$

where  $C_c$ ,  $Q_c$ , and  $Q_{\max}$  are previously described.  $K_D$  ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) is the dissociation constant between the template protein and the polymer. For some systems, Scatchard plots are found not to be single straight lines, but composed of two distinct linear portions with different slopes (*cf.* Fig. 14). This indicates the presence of two kinds of binding sites on PIPs: one is specific, due to the presence of imprints, while the other is non-specific, due to the polymer itself.

### 5.3. Adsorption specificity

The efficiency of an imprinted polymer is related to the specific adsorption of the targeted protein. The aim of adsorption specificity studies is to determine the extent of adsorption due to the presence of imprints or due to the polymer itself. Indeed, polymers can sometimes also bind proteins, *e.g.* through the formation of hydrogen bonds, and induce a so-called non-specific adsorption since it is not related to the presence of the imprints. To assess the specificity, adsorption isotherms of the template protein are made on both the magnetic imprinted (MION@PIP) and magnetic non-imprinted (MION@NIP) polymers.

Isotherms obtained for bovine hemoglobin on both MION@PIP and MION@NIP by Li *et al.*<sup>88</sup> are displayed in Fig. 15, and are respectively called MMIPs and MNIPs by the authors. Using this example, one can show that MION@PIP adsorb more protein than MION@NIP, proving the existence and efficiency of the imprints.

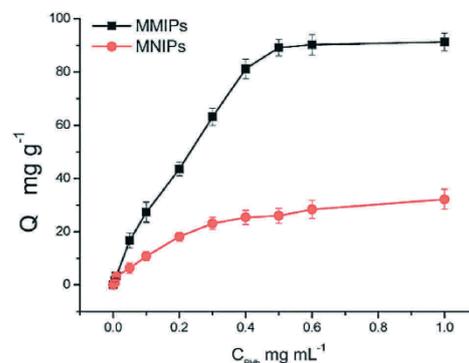


Fig. 15 Adsorption isotherms of bovine hemoglobin on the magnetic non-imprinted polymers (MNIPs) and magnetic imprinted polymers (MMIPs). Reproduced with permission from ref. 88. Copyright 2016 Royal Society of Chemistry.

The most relevant parameter to assess the adsorption specificity is the imprinting factor, or IF. One can calculate the imprinting factor according to the following equation:

$$IF = \frac{Q_{\max,PIP}}{Q_{\max,NIP}} \quad (7)$$

where  $Q_{\max,PIP}$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) and  $Q_{\max,NIP}$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) are the amounts of adsorbed proteins at saturation (adsorption capacities) for the imprinted and non-imprinted polymers respectively, and are obtained by performing adsorption isotherms. High imprinting factors indicate specific adsorption of the targeted protein onto PIPs. The best imprinting factors are obtained either with PIP presenting really high adsorption capacities, or with NIPs having really low adsorption capacities. A very high performing system regarding the imprinting factor is the one of Kartal *et al.*,<sup>66</sup> displaying an imprinting factor close to 30. However, this performance can be described as isolated, and related to the great attention given to the choice of the functional monomer to reduce non-specific adsorption. Indeed, imprinting factors are generally between 3 and 6, but it is important to denote a tendency of improvement over the last few years.<sup>86,90,114</sup> This is due to the greater care taken in choosing the experimental synthesis conditions,<sup>74,97</sup> as displayed in Fig. 16, but also to a better comprehension of protein-monomer interactions to guide the choice of the monomer employed, in order to reduce the non-specific adsorption.<sup>59,103</sup>

It has to be noted that having high imprinting factors is of prime interest, more important than having high adsorption capacities, when synthesizing PIPs. Hao *et al.*<sup>74</sup> optimized their synthesis conditions for both magnetic imprinted (BHB-MMIPs) and non-imprinted polymers (MNIPs), in order to always obtain the higher possible adsorption capacities for the PIP, and the lowest for the NIP. For this reason, Hao *et al.* present both adsorption capacities and imprinting factors when testing the effect of some experimental conditions on the performances of

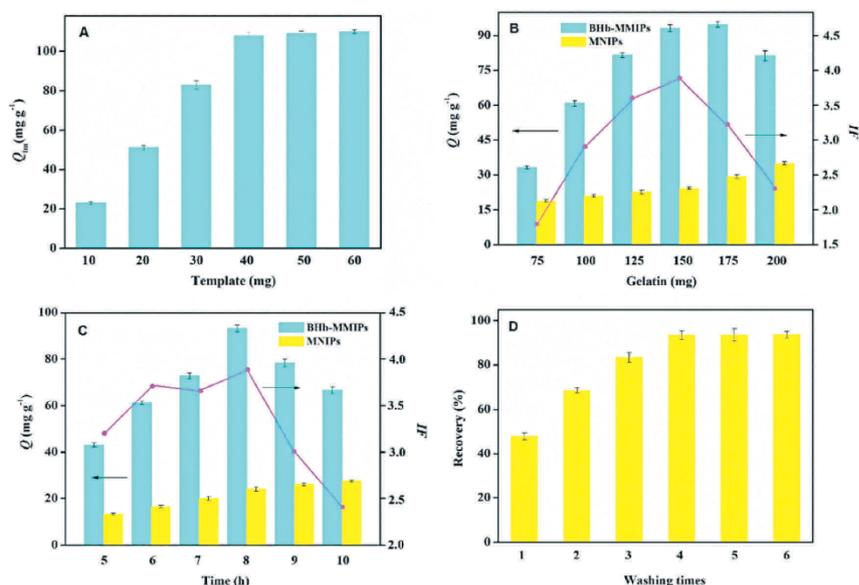


Fig. 16 Effects of (A) template protein and (B) monomer (gelatin) initial quantities, (C) polymerization time and (D) washing cycles on the recognition behavior of MION@PIP toward bovine hemoglobin. BHB-MMIPs: protein imprinted magnetic polymers and MNIPs: magnetic non-imprinted polymers. Red line: imprinting factors for different experimental conditions. Reproduced with permission from ref. 74. Copyright 2016 Elsevier.

both MION@PIP and MION@NIP (IF: red dots and lines in Fig. 16B and C). In their work, they made the choice to optimize the initial quantities of template proteins (Fig. 16A) and monomers (Fig. 16B), as well as the polymerization time (Fig. 16C) and the number of extraction cycles (Fig. 16D, here called washing times).

One can see in Fig. 16A that increasing the initial amount of the template protein increased the adsorption capacity of MION@PIP before reaching a plateau. At first, more template proteins meant more possible imprints, until the initial amount of monomers is not enough to interact with all the proteins and no more imprints could be made. From this figure, one can deduce that a compromise can be made in order to have the highest amount of the adsorbed protein by using the lowest amount of template protein during the synthesis, to reduce production costs. Moreover, as displayed in Fig. 16B, with magnetic imprinted polymers prepared using 40 mg of the template protein, the amount of bovine hemoglobin (BHB) bound to MION@PIP increased with increasing amount of monomer, reaching a maximum before decreasing again. One explanation is that the increasing thickness of the polymer hindered the access to the imprints. No such effect is observed for the protein adsorption on MION@NIP. Their adsorption capacity only increased with the initial quantity of monomers, because there are no imprints, and only their outer surface is of interest with this surface increasing with the polymer thickness. The same trend is observed for the variation of the adsorption capacity of MION@NIP with the polymerization time. In contrast, the

adsorption capacity of MION@PIP first highly increased and then decreased with increasing polymerization time (Fig. 16C); 8 hours seem to be optimal. Shorter polymerization times may lead to PIP layers not thick enough to have the highest possible number of imprints, while longer polymerization times may hinder access to imprints due to higher degree cross-linking and longer paths inside the polymer to reach the binding sites. Concerning the extraction, it has to be long enough to remove all the proteins trapped inside the cavities, but really high extraction times do not seem to influence the protein recovery (Fig. 16D).

#### 5.4. Adsorption selectivity

Another useful characteristic to study the performances of imprinted polymers is their selectivity. The main criteria to determine whether PIPs present good selectivity toward the template protein is the selectivity coefficient,  $\alpha$ , calculated as follows:

$$\alpha = \frac{Q_{\max, \text{template}}}{Q_{\max, \text{competitor}}} \quad (8)$$

with  $Q_{\max, \text{template}}$  and  $Q_{\max, \text{competitor}}$  being the maximum adsorption capacities of the PIP toward the template protein and a competitive one respectively. The higher the  $\alpha$  coefficient, the better the selectivity of the imprinted polymer. Usually, imprinted polymers are considered as selective enough toward the template protein with  $\alpha$  values higher than 2.

Selectivity can be studied in two different ways. Either the adsorption efficiency of imprinted polymers, and sometimes of non-imprinted polymers, toward different proteins is analyzed using solutions containing a single protein at a time,<sup>88,102</sup> or the analyses are performed using solutions containing simultaneously the template protein and at least another one. In this case, it is referred to as a competitiveness test.<sup>93,106</sup>

When proteins are tested one by one, the analysis can be carried out by UV-Visible spectrometry,<sup>105</sup> chromatography<sup>80</sup> or gel electrophoresis.<sup>106</sup> However, when several proteins are present simultaneously, analysis by UV-Visible spectrometry becomes difficult, if not impossible. Indeed, all proteins exhibit an absorbance peak wavelength between 275 and 285 nm, due to the presence of amino acids with aromatic rings, and it is not possible to distinguish the contribution of each of the proteins to the main absorbance peak. This explains the preferential use of chromatography or gel electrophoresis by some authors when evaluating the selectivity and competitiveness of their systems.

Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) is widely used to visualize the purity of the extracted protein, when testing the performances of imprinted polymers for real sample analysis, as displayed in Fig. 17. In this example, the extraction of lysozyme from egg white using MION@PIP was investigated. First, MION@PIP particles were incubated in egg white solution. One can clearly see the band corresponding to lysozyme in diluted egg white (lane 2, 14.4 kDa). After the diluted egg white solution was treated with MION@PIP, the band of lysozyme disappeared (lane 3), implying that lysozyme was efficiently extracted from the egg white solution by MION@PIP. For comparison, the band of lysozyme is still obvious in lane 4, corresponding to egg white solution treated with MION@NIP. This result confirms the great specificity of the

polymer toward lysozyme. Moreover, the brightness of the bands corresponding to other proteins does not seem to vary, suggesting a high adsorption selectivity toward lysozyme. After extraction of lysozyme from MION@PIP having previously absorbed it, eluate was analyzed and one can clearly see that only the band corresponding to lysozyme appeared (lane 5), confirming the fact that MION@PIP are highly specific toward the template protein.

### 5.5. Nanocomposite reusability

Finally, attention is paid to the regeneration capacity of magnetic protein imprinted polymers. As mentioned above, the current main application of these nanoparticles is their use as an extraction agent. For this reason, systems must be reusable. They are therefore subjected to a large number of successive protein adsorption-extraction cycles in order to evaluate the decrease in their adsorption capacity when used many times in a row. Extraction steps are carried out using the same agents as previously described. Existing systems exhibit good maintenance of their adsorption capacities for use ranging from 3 to 12 cycles.<sup>53,95,102,104</sup>

### 5.6. Impact of the magnetic core on the adsorption performances

The size of the iron oxide nanoparticles used as magnetic cores covers a wide range of values, from 20 to 200 nm. One could also wonder whether the size of these MION does influence the adsorption performances of the coupled PIP. This influence is not easy to assess because as previously mentioned, adsorption performances depend on a lot of different parameters, such as the solvent, the functional monomers and cross-linking agents, the initiators, the cross-linking rate, the extraction method employed, and the polymer size or thickness. It is also really difficult to find two or more publications carrying out the exact same synthesis protocol and differing only by the size of the iron oxide nanoparticles to make proper comparisons.

Nonetheless, when comparing performances MION@PIP having imprinted the same protein through a radical polymerization process, using functional monomers from the same family and whose template proteins are extracted substantially using the same method, we can make some relevant comparisons even if some improvements are still possible. Table 2 compares the adsorption performances of three different PIPs coupled to MION of different sizes in terms of specificity and selectivity.

From Table 2, one can see that the size of the magnetic nanoparticles used seems to have no significant effects in terms of adsorption specificity or selectivity, which are two of the main parameters concerning the adsorption performances of MION@PIP.

Adsorption capacities are currently calculated in milligrams per gram of hybrid nanomaterials. But due to the wide range of possible structures for the materials and polymer thickness, one gram of MION@PIP nanoobjects does not contain the same quantity of polymers, and furthermore not the same number of recognition sites from one synthesis to another.

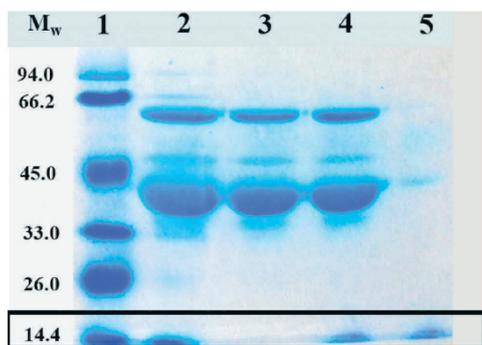


Fig. 17 SDS-PAGE analysis of egg-white. Lane 1: protein molecular weight marker (14.4 kDa: lysozyme). Lane 2: 20-fold dilution of egg white before treatment. Lane 3: remaining 20-fold dilution of egg white extracted by a lysozyme imprinted polymer. Lane 4: remaining 20-fold dilution of egg white extracted by a non-imprinted polymer. Lane 5: eluate from the rebound PIP-lysozyme in egg white dilution. Reproduced with permission from ref. 86. Copyright 2015 American Chemical Society.

Table 2 Adsorption performances of PIP and MION@PIP nanomaterials having MION of different sizes

MION size (nm)	Imprinted protein	Functional monomers	Extraction method	IF	Selectivity	Ref.
0	Lyz	Acrylamide derivatives	NaCl 0.5 mol L <sup>-1</sup>	2.24	2.7 Toward Rnase A	20
200	Lyz	Acrylamide derivatives	NaCl 0.5 mol L <sup>-1</sup>	2.32	2.64 Toward Rnase A	81
60	BHb	Silane derivatives	NaOH 0.1 mol L <sup>-1</sup>	4.79	4.31 Toward BSA	76
200	BHb	Silane derivatives	NaOH 0.1 mol L <sup>-1</sup>	4.90	4.96 Toward BSA	40

Table 3 Performance summary of some magnetic protein imprinted polymer nanoparticles

Imprinted protein	IF	Equilibrium time	Number of regeneration cycles	Ref.
Alpha fetoprotein	3, 13	30 min	12	104
BSA, lysozyme and creatinine	8	1 h	10	95
Human serum albumin	29, 92	45 min	10	66
Lysozyme	2, 95	5 min	4	78

It seems therefore not to be relevant to compare adsorption capacities for different nanomaterials.

Adsorption kinetics really depends on the polymer thickness. A pertinent comparison of adsorption kinetics should be done when normalizing the equilibrium time by the thickness of the polymer to be passed by the proteins. As these values are not available in the literature, it is not relevant here to compare adsorption kinetics for different MION@PIP nanomaterials.

Thus the effect of the magnetic nanoparticle size, or even presence, on the comparable adsorption performances of the different MION@PIP nanomaterials seems to be negligible.

### 5.7. Summary of the best performances obtained

Table 3 summarizes systems nowadays presenting the best performances according to one or many of the above mentioned characteristics.

## 6. Conclusion and outlooks

This article provides an up-to-date review on hybrid nano-systems composed of magnetic nanoparticles and protein imprinted polymers. The outstanding recognition properties of protein imprinted polymers make them the perfect candidate for the development of synthetic antibody-like nanomaterials, by showing great potential in terms of protein adsorption selectivity, specificity and adsorption kinetics. Their magnetic properties facilitate their processing, manipulation, and practical use, opening a way toward industrial and pharmaceutical applications.

To synthesize MION@PIP nanocomposites, several surface functionalizations of magnetic nanoparticles are possible, in order to facilitate the interactions of the iron oxides with the polymer or to secure the protein to be printed near the surface of the particles. Various monomers can then be employed to form the imprinted polymer. These are chosen according to the

two criteria. They have to be able to engage hydrogen bonds with amino acids and thus have strong affinity with proteins, and they must interact with the functionalization of the nanoparticles. The choice of monomers can be optimized to both reduce the non-specific adsorption and enhance the selectivity of the imprinted polymer. The protein extraction methods used are diverse and influence the performances of the synthesized systems. Optimization of the synthesis protocols must be carried out to obtain systems having high specificity, selectivity, and rapid adsorption. The MION@PIP nanomaterials must be physically and chemically resistant and used for numerous adsorption-desorption cycles. Regarding all the synthetic conditions used in the past decade to obtain some new magnetic protein imprinted polymers, we may suppose that in the years to come, more and more home-made functional monomers, designed to reduce the non-specific adsorption, will be employed in controlled radical polymerization in order to have thinner polymer coatings and more homogeneous materials. The work of Koide *et al.*<sup>3</sup> as well as Cecchini *et al.*<sup>4</sup> may be pioneering in terms of *in vivo* applications, many of them will appear due to the wider range of proteins being imprinted nowadays.

However, MION@PIP nanocomposites are still a very new research field, demanding a lot of improvements from the point of view of real-life and nanomedicine-related applications, but also in a more trivial way to facilitate the comparison between the performances of two different MION@PIP. Nowadays, authors present adsorption capacities in milligrams per gram of hybrid nanomaterials. But due to the wide range of MION size, possible structures for the hybrids and polymer thickness, it may be more accurate to present results in milligrams per gram of the imprinted polymer. As a result, one should be able to make more valid comparisons of adsorption capacities and kinetics. Concerning the nanomedicine-related applications, the main issue to be addressed is the nature of the imprinted protein. Nowadays, a great amount of MION@PIP researches deal with BSA, BHb or lysozyme. But some recent studies showed the potential of PIPs toward the recognition and selective trapping of proteins is of real, clinical interest.<sup>3,4</sup> One can also suppose that in the years to come, MION@PIP using proteins with such a clinical significance will be developed. The second issue to be addressed will be the size of the final nanomaterials. Magnetic iron oxide nanoparticles do not have a negligible size in the nano-world and coupling them to protein imprinted polymers will lead to the obtention of objects maybe too big to be

internalized by cells, thus hindering some applications like the trapping of some specific proteins *in cellulo*. Authors will have to carefully control the thickness of their polymers and the size of their resulting objects to prevent the decrease of their field of potential applications. After overcoming the challenges inherent to the synthesis of the MION@PIP nano-objects, the next step will be to test their adsorption properties in the presence of some protein corona, which is known to form around nano-objects in biological samples. This corona being potentially able to reduce or prevent the adsorption of a specific protein, some *in vitro* experiments in complex media may be of interest, before going to applications in real samples to bind proteins of biological relevance. And finally, an assessment of the toxicity of the obtained nanomaterials before using them in nanomedicine will be needed. To the best of our knowledge, only one publication deals with the biocompatibility and internalization of protein imprinted polymers,<sup>115</sup> but such studies will have to become routine to better comprehend their possible interactions with cells.

Combining MION@PIP with other kinds of nanoparticles, such as carbon nanotubes,<sup>116,117</sup> is another fascinating direction for further studies. One asset of these hybrids is the possible synthesis of two-dimensional materials such as thin films, which can be implemented *e.g.* in electrochemical devices for sensing applications allowing a more direct detection of the protein trapped by the PIP.

From what has been stated above, the synthesis of protein imprinted polymers has entered a new dimension in which their recognition capacities, their possible coupling to magnetic iron oxide nanoparticles and their processing abilities allow the design of new and unique biomimetic sensors with analytical performance far above other existing systems, such as liquid chromatography.

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## References

- H. R. Culver and N. A. Peppas, *Chem. Mater.*, 2017, **29**, 5753–5761.
- T. Takeuchi, Y. Kitayama, R. Sasao, T. Yamada, K. Toh, Y. Matsumoto and K. Kataoka, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2017, **56**, 7088–7092.
- H. Koide, K. Yoshimatsu, Y. Hoshino, S.-H. Lee, A. Okajima, S. Ariizumi, Y. Narita, Y. Yonamine, A. C. Weisman, Y. Nishimura, N. Oku, Y. Miura and K. J. Shea, *Nat. Chem.*, 2017, **9**, 715–722.
- A. Cecchini, V. Raffa, F. Canfarotta, G. Signore, S. Piletsky, M. P. MacDonald and A. Cuschieri, *Nano Lett.*, 2017, **17**, 2307–2312.
- Y. Liu, S. Fang, J. Zhai and M. Zhao, *Nanoscale*, 2015, **7**, 7162–7167.
- R. Weissleder, D. D. Stark, B. L. Engelstad, B. R. Bacon, C. C. Compton, D. L. White, P. Jacobs and J. Lewis, *AJR, Am. J. Roentgenol.*, 1989, **152**, 167–173.
- L. Gu, R. H. Fang, M. J. Sailor and J.-H. Park, *ACS Nano*, 2012, **6**, 4947–4954.
- M. Levy, N. Luciani, D. Alloeyau, D. Elgrabli, V. Deveaux, C. Pechoux, S. Chat, G. Wang, N. Vats, F. Gendron, C. Factor, S. Lotersztajn, A. Luciani, C. Wilhelm and F. Gazeau, *Biomaterials*, 2011, **32**, 3988–3999.
- C. Paquet, H. W. de Haan, D. M. Leek, H.-Y. Lin, B. Xiang, G. Tian, A. Kell and B. Simard, *ACS Nano*, 2011, **5**, 3104–3112.
- S. Tong, S. Hou, Z. Zheng, J. Zhou and G. Bao, *Nano Lett.*, 2010, **10**, 4607–4613.
- F. Ye, S. Laurent, A. Fornara, L. Astolfi, J. Qin, A. Roch, A. Martini, M. S. Toprak, R. N. Muller and M. Muhammed, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2012, **7**, 460–468.
- S. Tong, C. A. Quinto, L. Zhang, P. Mohindra and G. Bao, *ACS Nano*, 2017, **11**, 6808–6816.
- S. Laurent, S. Dutz, U. O. Häfeli and M. Mahmoudi, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2011, **166**, 8–23.
- J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson and G. Belfrage, *Nature*, 1975, **258**, 598–599.
- F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.*, 1991, **9**, 151–156.
- H. Nishino, C.-S. Huang and K. J. Shea, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 2392–2396.
- P. Zahedi, M. Ziaee, M. Abdouss, A. Farazin and B. Mizaikoff, *Polym. Adv. Technol.*, 2016, **27**, 1124–1142.
- K. Haupt and K. Mosbach, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 2495–2504.
- K. Mosbach and O. Ramström, *Nat. Biotechnol.*, 1996, **14**, 163–170.
- G. Pan, Q. Guo, C. Cao, H. Yang and B. Li, *Soft Matter*, 2013, **9**, 3840–3850.
- J. Xu, S. Ambrosini, E. Tamahkar, C. Rossi, K. Haupt and B. Tse Sum Bui, *Biomacromolecules*, 2016, **17**, 345–353.
- D. S. Janiak and P. Kofinas, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **389**, 399–404.
- F. Ghorbani-Bidkobe, *Trends Pept. Protein Sci.*, 2017, **1**, 99–108.
- E. Verheyen, J. P. Schillemans, M. van Wijk, M.-A. Demeniex, W. E. Hennink and C. F. van Nostrum, *Biomaterials*, 2011, **32**, 3008–3020.
- M. Niu, C. Pham-Huy and H. He, *Microchim. Acta*, 2016, **183**, 2677–2695.
- Y. Lv, T. Tan and F. Svec, *Biotechnol. Adv.*, 2013, **31**, 1172–1186.
- L. Ye and K. Mosbach, *Chem. Mater.*, 2008, **20**, 859–868.
- G. Wulff, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1995, **34**, 1812–1832.
- G. Wulff, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 1–28.
- B. Sellergren, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 1997, **16**, 310–320.
- J. L. Bowen, P. Manesiotis and C. J. Allender, *Mol. Imprinting*, 2013, **1**, 35–40.
- N. Griffete, J. Fresnais, A. Espinosa, C. Wilhelm, A. Bée and C. Ménager, *Nanoscale*, 2015, **7**, 18891–18896.
- N. Griffete, H. Li, A. Lamouri, C. Redeuilh, K. Chen, C.-Z. Dong, S. Nowak, S. Ammar and C. Mangeney, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 1807–1811.

- 34 C. Boitard, A.-L. Rollet, C. Ménager and N. Griffete, *Chem. Commun.*, 2017, **53**, 8846–8849.
- 35 W.-H. Zhou, C.-H. Lu, X.-C. Guo, F.-R. Chen, H.-H. Yang and X.-R. Wang, *J. Mater. Chem.*, 2010, **20**, 880–883.
- 36 M. Gonzales-Weimuller, M. Zeisberger and K. M. Krishnan, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2009, **321**, 1947–1950.
- 37 C. Bor Fuh and S. Y. Chen, *J. Chromatogr. A*, 1998, **813**, 313–324.
- 38 Z. Hua, Z. Chen, Y. Li and M. Zhao, *Langmuir*, 2008, **24**, 5773–5780.
- 39 X. Zhang, N. Zhang, C. Du, P. Guan, X. Gao, C. Wang, Y. Du, S. Ding and X. Hu, *Chem. Eng. J.*, 2017, **317**, 988–998.
- 40 R. Gao, X. Kong, X. Wang, X. He, L. Chen and Y. Zhang, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 17863–17871.
- 41 S. Ji, N. Li, Y. Shen, Q. Li, J. Qiao and Z. Li, *Anal. Chim. Acta*, 2016, **909**, 60–66.
- 42 J. Guo, Y. Wang, Y. Liu and Y. Zhou, *Anal. Methods*, 2015, **7**, 10018–10025.
- 43 M. Pilar Calatayud, C. Riggio, V. Raffa, B. Sanz, T. E. Torres, M. Ricardo Ibarra, C. Hoskins, A. Cuschieri, L. Wang, J. Pinkernelle, G. Keilhoff and G. F. Goya, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 3607–3616.
- 44 L. Xu, J. Pan, J. Dai, X. Li, H. Hang, Z. Cao and Y. Yan, *J. Hazard. Mater.*, 2012, **233–234**, 48–56.
- 45 Y. Li, X. Li, J. Chu, C. Dong, J. Qi and Y. Yuan, *Environ. Pollut.*, 2010, **158**, 2317–2323.
- 46 X. Kan, Z. Geng, Y. Zhao, Z. Wang and J.-J. Zhu, *Nanotechnology*, 2009, **20**, 165601.
- 47 S. Trabulo, A. Aires, A. Aicher, C. Heeschen and A. L. Cortajarena, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 2017, **1861**, 1597–1605.
- 48 A. Bossi, F. Bonini, A. P. F. Turner and S. A. Piletsky, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 1131–1137.
- 49 M. J. Whitcombe, I. Chianella, L. Larcombe, S. A. Piletsky, J. Noble, R. Porter and A. Horgan, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 1547–1571.
- 50 Y. Ge and A. P. F. Turner, *Trends Biotechnol.*, 2008, **26**, 218–224.
- 51 S. H. Ou, M. C. Wu, T. C. Chou and C. C. Liu, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **504**, 163–166.
- 52 J. Xie, G. Zhong, C. Cai, C. Chen and X. Chen, *Talanta*, 2017, **169**, 98–103.
- 53 P. A. Lieberzeit, S. Chunta, K. Navakul, C. Sangma and C. Jungmann, *Procedia Eng.*, 2016, **168**, 101–104.
- 54 H. Bao, B. Yang, X. Zhang, L. Lei and Z. Li, *Chem. Commun.*, 2017, **53**, 2319–2322.
- 55 A. Cumbo, B. Lorber, P. F.-X. Corvini, W. Meier and P. Shahgaldian, *Nat. Commun.*, 2013, **4**, 1503.
- 56 D. R. Kryscio and N. A. Peppas, *Acta Biomater.*, 2012, **8**, 461–473.
- 57 S. Lu, G. Cheng and X. Pang, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2006, **99**, 2401–2407.
- 58 X. Kan, Q. Zhao, D. Shao, Z. Geng, Z. Wang and J.-J. Zhu, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 3999–4004.
- 59 X. Li, J. Zhou, L. Tian, Y. Wang, B. Zhang, H. Zhang and Q. Zhang, *Sens. Actuators, B*, 2017, **241**, 413–421.
- 60 M. Zhang, X. Zhang, X. He, L. Chen and Y. Zhang, *Nano-scale*, 2012, **4**, 3141–3147.
- 61 L. Qian, J. Sun, C. Hou, J. Yang, Y. Li, D. Lei, M. Yang and S. Zhang, *Talanta*, 2017, **168**, 174–182.
- 62 C. J. Tan, H. G. Chua, K. H. Ker and Y. W. Tong, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 683–692.
- 63 L. Li, X. He, L. Chen and Y. Zhang, *Chem. – Asian J.*, 2009, **4**, 286–293.
- 64 Y. Liu, Y. Gu, M. Li and Y. Wei, *New J. Chem.*, 2014, **38**, 6064–6072.
- 65 T. Jing, H. Du, Q. Dai, H. Xia, J. Niu, Q. Hao, S. Mei and Y. Zhou, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **26**, 301–306.
- 66 F. Kartal and A. Denizli, *J. Sep. Sci.*, 2014, **37**, 2077–2086.
- 67 S. Bhakta, C. K. Dixit, I. Bist, J. Macharia, M. Shen, K. Kadimisetty, J. He, B. Dutta, S. L. Suib and J. F. Rusling, *Chem. Commun.*, 2017, **53**, 9254–9257.
- 68 R. Ma, X. Sun, W. Ha, J. Chen and Y. Shi, *J. Mater. Chem. B*, 2017, **5**, 7512–7518.
- 69 X.-L. Zhao, D.-Y. Li, X.-W. He, W.-Y. Li and Y.-K. Zhang, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 7575–7582.
- 70 L. Tan, Z. Yu, X. Zhou, D. Xing, X. Luo, R. Peng and Y. Tang, *J. Chromatogr. A*, 2015, **1411**, 69–76.
- 71 K. Yang, J. Liu, S. Li, Q. Li, Q. Wu, Y. Zhou, Q. Zhao, N. Deng, Z. Liang, L. Zhang and Y. Zhang, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 9521–9524.
- 72 M.-H. Lee, J. L. Thomas, C.-L. Liao, S. Jurcevic, T. Crnogorac-Jurcevic and H.-Y. Lin, *Sep. Purif. Technol.*, 2018, **192**, 213–219.
- 73 L. Zhang, Y. Tang, Y. Hao, G. He, B. Zhang, R. Gao and M. Zhang, *J. Sep. Sci.*, 2016, **39**, 1919–1925.
- 74 Y. Hao, R. Gao, D. Liu, B. Zhang, Y. Tang and Z. Guo, *J. Colloid Interface Sci.*, 2016, **470**, 100–107.
- 75 Q.-Q. Gai, F. Qu, Z.-J. Liu, R.-J. Dai and Y.-K. Zhang, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 5035–5042.
- 76 R. Gao, X. Mu, Y. Hao, L. Zhang, J. Zhang and Y. Tang, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 1733–1741.
- 77 R. Gao, S. Zhao, Y. Hao, L. Zhang, X. Cui, D. Liu, M. Zhang and Y. Tang, *J. Sep. Sci.*, 2015, **38**, 3914–3920.
- 78 Y. Wang, Z. Chai, Y. Sun, M. Gao and G. Fu, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 2015, **26**, 644–656.
- 79 C. J. Tan and Y. W. Tong, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 299–306.
- 80 S. Yang, X. Zhang, W. Zhao, L. Sun and A. Luo, *J. Mater. Sci.*, 2016, **51**, 937–949.
- 81 H. Guo, D. Yuan and G. Fu, *J. Colloid Interface Sci.*, 2015, **440**, 53–59.
- 82 R. Gao, S. Zhao, Y. Hao, L. Zhang, X. Cui, D. Liu and Y. Tang, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 88436–88444.
- 83 X. Li, B. Zhang, L. Tian, W. Li, T. Xin, H. Zhang and Q. Zhang, *Sens. Actuators, B*, 2014, **196**, 265–271.
- 84 Q.-Q. Gai, F. Qu, T. Zhang and Y.-K. Zhang, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 3489–3495.
- 85 L. Li, X. He, L. Chen and Y. Zhang, *Sci. China, Ser. B: Chem.*, 2009, **52**, 1402–1411.
- 86 J. Chen, S. Lei, Y. Xie, M. Wang, J. Yang and X. Ge, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, **7**, 28606–28615.

- 87 R. Gao, L. Zhang, Y. Hao, X. Cui, D. Liu, M. Zhang and Y. Tang, *J. Sep. Sci.*, 2015, **38**, 3568–3574.
- 88 Y. Li, Y. Chen, L. Huang, B. Lou and G. Chen, *Analyst*, 2017, **142**, 302–309.
- 89 X. Jia, M. Xu, Y. Wang, D. Ran, S. Yang and M. Zhang, *Analyst*, 2013, **138**, 651–658.
- 90 F. Lan, S. Ma, Q. Yang, L. Xie, Y. Wu and Z. Gu, *Colloids Surf., B*, 2014, **123**, 213–218.
- 91 R. Gao, L. Zhang, Y. Hao, X. Cui and Y. Tang, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 64514–64524.
- 92 Z. Hua, S. Zhou and M. Zhao, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **25**, 615–622.
- 93 X. Li, J. Zhou, L. Tian, W. Li, Z. Ali, N. Ali, B. Zhang, H. Zhang and Q. Zhang, *Sens. Actuators, B*, 2016, **225**, 436–445.
- 94 R. Gao, X. Mu, J. Zhang and Y. Tang, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 783–792.
- 95 M.-H. Lee, J. L. Thomas, M.-H. Ho, C. Yuan and H.-Y. Lin, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2010, **2**, 1729–1736.
- 96 J. Zhou, N. Gan, F. Hu, T. Li, H. Zhou, X. Li and L. Zheng, *Sens. Actuators, B*, 2013, **186**, 300–307.
- 97 R. Ouyang, J. Lei and H. Ju, *Nanotechnology*, 2010, **21**, 185502.
- 98 X. Li, B. Zhang, W. Li, X. Lei, X. Fan, L. Tian, H. Zhang and Q. Zhang, *Biosens. Bioelectron.*, 2014, **51**, 261–267.
- 99 J. Cao, X. Zhang, X. He, L. Chen and Y. Zhang, *Chem. – Asian J.*, 2014, **9**, 526–533.
- 100 D. S. Janiak, O. B. Ayyub and P. Kofinas, *Macromolecules*, 2009, **42**, 1703–1709.
- 101 N. Li, L. Qi, Y. Shen, J. Qiao and Y. Chen, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 17289–17295.
- 102 L. Shi, Y. Tang, Y. Hao, G. He, R. Gao and X. Tang, *J. Sep. Sci.*, 2016, **39**, 2876–2883.
- 103 X. Li, B. Zhang, L. Tian, W. Li, H. Zhang and Q. Zhang, *Sens. Actuators, B*, 2015, **208**, 559–568.
- 104 M.-H. Lee, A. Ahluwalia, K.-M. Hsu, W.-T. Chin and H.-Y. Lin, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 36990–36995.
- 105 W. Li, M. Chen, H. Xiong, W. Wen, H. He, X. Zhang and S. Wang, *New J. Chem.*, 2016, **40**, 564–570.
- 106 Y. Hao, R. Gao, D. Liu, G. He, Y. Tang and Z. Guo, *Talanta*, 2016, **153**, 211–220.
- 107 X. Zhang, H. Li, J. Kang, X. Zhu, W. Peng, H. Zhou, S. Zhong and Y. Wang, *Colloids Surf., A*, 2016, **504**, 367–375.
- 108 M. Zhang, Y. Wang, X. Jia, M. He, M. Xu, S. Yang and C. Zhang, *Talanta*, 2014, **120**, 376–385.
- 109 J.-P. Simonin, *Chem. Eng. J.*, 2016, **300**, 254–263.
- 110 S. Lagergren, *K. Sven. Vetenskapsakad. Handl.*, 1898, **24**, 1–39.
- 111 Y. Liu, *Colloids Surf., A*, 2006, **274**, 34–36.
- 112 H. Freundlich, *Z. Phys. Chem.*, 1907, **57U**, 385–470.
- 113 G. Scatchard, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1949, **51**, 660–672.
- 114 R. Gao, Y. Hao, L. Zhang, X. Cui, D. Liu, M. Zhang, Y. Tang and Y. Zheng, *Chem. Eng. J.*, 2016, **284**, 139–148.
- 115 F. Canfarotta, A. Waters, R. Sadler, P. McGill, A. Guerreiro, D. Papkovsky, K. Haupt and S. Piletsky, *Nano Res.*, 2016, **9**, 3463–3477.
- 116 Z. Zhang, X. Yang, X. Chen, M. Zhang, L. Luo, M. Peng and S. Yao, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **401**, 2855.
- 117 H.-J. Chen, Z.-H. Zhang, L.-J. Luo and S.-Z. Yao, *Sens. Actuators, B*, 2012, **163**, 76–83.