



HAL
open science

Fonctionnalisation de nanoparticules magnétiques par des peptides cationiques : vers un accès au cytosol

Mathilde Le Jeune

► **To cite this version:**

Mathilde Le Jeune. Fonctionnalisation de nanoparticules magnétiques par des peptides cationiques : vers un accès au cytosol. Chimie organique. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS247 . tel-03533021

HAL Id: tel-03533021

<https://theses.hal.science/tel-03533021v1>

Submitted on 18 Jan 2022

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.



THESE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITE

Spécialité : Chimie

Ecole doctorale : « chimie physique et chimie analytique de Paris Centre »

Présentée par

Mathilde LE JEUNE

pour obtenir le grade de :

Docteur de Sorbonne Université

Sujet de thèse :

Fonctionnalisation de nanoparticules magnétiques par des peptides cationiques : vers un accès au cytosol

Présentée et soutenue publiquement le 26 novembre 2021

devant le jury composé de :

M ^{me} Emilie Allard-Vannier	Rapporteure
M ^{me} Isabel Alves	Rapporteure
M. Zoher Gueroui	Examineur
M. Jean-François Berret	Examineur
M ^{me} Christine Ménager	Directrice de thèse
M ^{me} Fabienne Burlina	Co-directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mesdames Emilie Allard-Vannier, Isabel Alves en tant que rapporteuses et Messieurs Zohar Gueroui, Jean-François Berret en tant qu'examineurs, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer mes travaux de thèse et de faire partie du jury.

Cette thèse a été réalisée au sein de deux unités : le laboratoire PHENIX dirigé par Pierre Levitz puis Laurent Michot et le Laboratoire des Biomolécules (LBM) dirigé par Sandrine Sagan puis Olivier Lequin que je remercie pour leur accueil. Merci également Sandrine d'avoir suivie ce projet et d'avoir consacré un peu de temps aux réflexions scientifiques de ce projet.

Un immense merci à Christine Ménager et Fabienne Burlina, mes directrices de thèse, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions. Merci pour votre disponibilité, vos compétences scientifiques, vos qualités humaines : votre gentillesse, votre bienveillance, votre patience, votre optimisme et votre écoute, ont fait de cette thèse une expérience aussi enrichissante sur le plan scientifique que sur le plan humain. Christine, merci de m'avoir accordé une grande confiance quand je suis venue vers toi pour faire une thèse dans le domaine « chimie-biologie » et que tu m'as proposé ce sujet alors que je n'y connaissais rien en nanoparticules. Fabienne, j'ai beaucoup appris à tes côtés, merci pour tes conseils, tu as toujours su apporter de nouvelles idées au projet pour me faire avancer dans la bonne direction.

Mes remerciements vont également à Jean-Michel Siaugue et Emilie Secret, pour leur encadrement et pour avoir suivi ce projet de près. Jean-Michel, merci pour ta rigueur scientifique, je n'oublierai jamais tes feuilles excel qui ont vraiment été d'une grande aide. Emilie, merci pour ton investissement, ton soutien et ton aide au cours de ces trois ans.

Je tiens énormément à remercier Aude Michel et Delphine Ravault sans qui tout ce travail aurait été beaucoup plus fastidieux. Aude, tout d'abord merci pour ton inébranlable bonne humeur, pour ton rire qu'on entend dans tout le couloir, pour nos discussions « filles » récurrentes... Mais aussi un immense merci pour TOUS les dosages de fer que je t'ai

demandés, tu t'organisais toujours pour me les faire quand ça m'arrangeait, pour toutes les grilles de TEM que tu as imaginées au début de ma thèse et pour toutes les commandes que tu as passées. Delphine, je ne saurais assez te remercier de toujours te plier en quatre pour préparer mes commandes de cellules, de mes mails du week-end auxquels tu répondais toujours par oui, merci d'avoir toujours accepté avec le sourire, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur sans faille.

Un grand remerciement à Michaël Trichet du service de microscopie électronique (IBPS) pour son aide précieuse, son expertise et sa rigueur scientifique. Je sais que tu en as passé des heures à observer les nanoparticules dans les cellules. Mes remerciements vont également à la plateforme de microscopie photonique de l'IBPS : France Lam, Susanne Bolte, Jean-François Gilles pour votre bonne humeur et votre aide avec le microscope confocal, merci à Laurence Petit pour avoir été disponible avec le cytomètre en flux. Je remercie très chaleureusement Gilles Clodic pour m'avoir toujours accueillie avec le sourire à la plateforme de spectrométrie de masse et pour m'avoir aidée à chaque fois que j'en avais besoin. Je remercie également Claire Wilhelm (Institut Curie) pour sa bonne humeur, ses idées lors de discussions scientifiques et la réalisation d'expériences pour que ce projet aille un peu plus loin.

Merci à Mélody Perret pour sa contribution importante à ce projet, tu as vraiment été une stagiaire exemplaire, je te remercie pour ton enthousiasme et l'intérêt que tu as tout de suite porté à ce projet.

Mes remerciements vont également à l'ensemble du personnel du laboratoire PHENIX, en particulier à l'équipe administrative : Gérard Guillard, Brigitte Carrez et Jeanne Thibaut. Je souhaite également remercier les permanents du laboratoire, Frédéric Gélébart pour sa disponibilité et son aide précieuse sur le Foner et le Magnetherm, Vincent Dupuis pour ses explications sur le magnétisme et pour les expériences d'hyperthermie. Merci à Nébéwia Griffete, Sophie Neveu, Ali Abou Hassan, Jérôme Fresnais, Agnès Bée, Delphine Talbot, pour les discussions diverses aux pauses déjeuners et dans les couloirs.

Je voudrais ensuite remercier tous les doctorants et post-docs de PHENIX, notamment ceux qui ont partagé mon bureau : Emilie N., Sonia, Tuyen, Stefan, merci pour cette bonne humeur. Samantha, je te remercie pour tous les moments passés ensemble au labo et à

l'extérieur. Sirine, merci d'abord pour toutes les grilles de TEM que tu as passées, merci pour ta gentillesse, pour les discussions autour d'un thé ou juste pour 5 min qui se transforment en 30 min. Je te souhaite plein de courage pour ta fin de thèse. Merci également à Enzo, Emilia, Djamila, Anthony, Sarra et Maylis, j'ai beaucoup apprécié les repas qu'on a partagés.

Je souhaite remercier tous les membres du laboratoire des Biomolécules pour leur bienveillance. Merci à Françoise Illien pour ses conseils sur les expériences cellulaires, pour son expertise et son aide avec les différents appareils du laboratoire, toujours dans la bonne humeur et avec le sourire. Je remercie Rodrigue Marquant et Cillian Byrne pour leur disponibilité notamment lorsque j'étais bloquée avec la vieille HPLC. Mes remerciements vont également à Arnaud Gautier, Nicolas Pietrancosta, Dror Warschawski, Thierry Drujon, Nicolas Rodriguez et Sophie Cribier pour les discussions qu'on a pu avoir au laboratoire. Je remercie également Eliane Moulinié et Karine Gherdi pour le soutien administratif.

Un grand merci aux doctorants et post-docs du LBM, sans vous la thèse n'aurait vraiment pas été la même. Alexandre, Marine, Nathalie, Pauline, Sonia, je n'oublierai pas les craquages du vendredi après-midi en écoutant (et chantant) du Céline Dion ou Lara Fabian dans le bureau, mais surtout merci pour votre écoute, votre soutien, votre disponibilité. Je remercie aussi Agathe (ce fut un plaisir de te réserver la DLS à chaque fois que tu en avais besoin), Taleen (et nos aller-retours en Eurostar), Mathieu, Edward, Amandine, Yadira, Fanny, Lina, Valentin, Louise pour les moments conviviaux comme les apéros, brunchs, raclette que nous avons passés ensemble.

Au cours de ce doctorat j'ai eu le plaisir d'enseigner au sein de la licence de chimie, pour cela je voudrais remercier Astrid Walrant, Christelle Mansuy, Héloïse Dossmann, Emmanuelle Sachon, Roba Mounné, Philippe Karoyan, Richard Cole et les autres enseignants et personnels des différentes plateformes que j'ai pu côtoyer, merci de m'avoir offert la possibilité d'enseigner et merci pour vos conseils.

Enfin je souhaite remercier ma famille, mes amis et mes proches pour m'avoir encouragée à arriver jusqu'ici et de m'avoir soutenue même si ce n'était pas toujours facile.

Table des matières

Abréviations	1
Introduction générale	5
Chapitre 1 : Introduction	9
1.1. Structure et composition des membranes cellulaires eucaryotes.....	11
1.1.1. Les lipides membranaires.....	12
1.1.2. Différence de composition lipidique entre la membrane plasmique et la membrane des organites.....	15
1.1.3. Les protéines membranaires	17
1.1.4. Les sucres membranaires	17
1.2. Endocytose et trafic vésiculaire	18
1.2.1. Endocytose dépendante de la clathrine	19
1.2.2. Endocytose dépendante de la cavéoline	20
1.2.3. Endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline	20
1.2.4. Macropinocytose	20
1.2.5. Maturation des endosomes	20
1.2.6. Phagocytose.....	23
1.2.7. Autophagie.....	23
1.3. Propriétés spécifiques de la cellule mises à profit pour le ciblage cellulaire ou le relargage de molécules.....	24
1.4. Les différents types de nanoparticules utilisées dans le domaine médical	26
1.4.1. Les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer.....	27
1.4.2. Les nanoparticules de silice	29
1.5. Différentes stratégies de greffage des biomolécules sur les nanoparticules.....	32
1.5.1. La chimie click	32
1.5.2. Exemples de nanoparticules fonctionnalisées de manière covalente	34
1.6. Mécanismes et méthodes d'entrée des nanoparticules dans les cellules	36
1.6.1. Les voies d'endocytose.....	37
1.6.2. Voies d'entrée et stratégies d'administration cytosolique des nanoparticules.....	39
1.6.3. Paramètres physico-chimiques influençant les mécanismes d'entrée cellulaire.....	41

1.7.	Applications des nanoparticules magnétiques à l'échelle intracellulaire	44
1.7.1.	Propriétés des nanoparticules magnétiques pertinentes pour les applications intracellulaires.....	45
1.7.2.	Exemples d'applications	49
1.8.	Stratégies pour permettre l'accès direct des NPM au cytosol	54
1.8.1.	Les peptides vecteurs ou Cell-Penetrating Peptides (CPP).....	55
1.8.2.	Les différentes stratégies d'échappement des endosomes.....	62
	Conclusion	66

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des nanoparticules cœur-coquilles fonctionnalisées par les peptides cationiques 67

2.1.	La chimie click sans cuivre	69
2.2.	Synthèse et caractérisation des peptides fonctionnalisés par le groupement azoture	70
2.2.1.	Synthèse sur support solide en stratégie Fmoc.....	71
2.2.2.	Caractérisation des peptides.....	76
2.3.	Synthèse et caractérisation des nanoparticules cœur-coquilles	78
2.3.1.	Synthèse et caractérisation des cœurs magnétiques de maghémite γ -Fe ₂ O ₃	78
2.3.2.	Enrobage et fonctionnalisation des nanoparticules de maghémite γ -Fe ₂ O ₃ par une couche de silice.....	82
2.3.3.	Propriétés magnétiques des nanoparticules	90
2.4.	Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules cœur-coquilles avec l'alcyne contraint.....	98
2.5.	Greffage des peptides sur les nanoparticules cœur-coquilles par chimie click sans cuivre.....	101
2.5.1.	Optimisation de la conjugaison des cœur-coquilles avec le peptide R9 ..	102
2.5.2.	Conjugaison de peptides polyhistidine avec les nanoparticules cœur-coquilles.....	111
2.5.3.	Versatilité du système : preuve de concept de la bi-fonctionnalisation...	115
2.5.4.	Quantification des peptides à la surface des nanoparticules cœur-coquilles.....	119
2.6.	Conclusion sur la synthèse et la caractérisation des nanoparticules cœur-coquilles fonctionnalisées par les peptides cationiques	122

Chapitre 3: Etude de l'internalisation des nanoparticules cœur-coquilles fonctionnalisées avec les peptides cationiques	125
3.1. Analyse de la cytotoxicité et de la viabilité cellulaires en présence des nanoparticules.....	127
3.2. Etude par microscopie confocale de l'internalisation cellulaire des différentes nanoparticules.....	130
3.2.1. Analyse de la stabilité des nanoparticules cœur-coquilles dans le milieu de culture.....	130
3.2.2. Distribution intracellulaire des peptides R9 et H4 non conjugués.....	131
3.2.3. Comparaison de la distribution intracellulaire des nanoparticules cœur-coquilles avec et sans peptides.....	132
3.2.4. Extinction de la fluorescence verte par le bleu de trypan.....	134
3.3. Quantification des nanoparticules dans les cellules.....	137
3.3.1. Etude comparative de différentes techniques de quantification.....	137
3.3.2. Etude de l'internalisation des nanoparticules en fonction du temps d'incubation.....	143
3.4. Le peptide vecteur R9 permet-il la translocation cellulaire des nanoparticules cœur-coquilles ?.....	145
3.4.1. Analyse par cytométrie en flux.....	145
3.4.2. Analyse par microscopie confocale à fluorescence.....	147
3.4.3. Conclusion sur la possibilité de translocation des nanoparticules grâce au CPP polyarginine.....	150
3.5. Les peptides riches en résidus arginine ou histidine permettent-ils la sortie des endosomes des nanoparticules ?.....	151
3.5.1. Suivi des nanoparticules cœur-coquilles fluorescentes par microscopie confocale sur cellules vivantes.....	152
3.5.2. Visualisation de la distribution des nanoparticules cœur-coquilles dans les lysosomes par microscopie confocale sur cellules vivantes.....	155
3.5.3. Visualisation de la distribution intracellulaire de la calcéine par microscopie confocale sur cellules vivantes.....	157
3.5.4. Visualisation de la distribution intracellulaire des nanoparticules cœur-coquilles par microscopie électronique à transmission.....	161
3.6. Conclusion sur les études d'internalisation des différents systèmes.....	168
Conclusion générale et perspectives	171

Matériels et méthodes.....	179
1. Réactifs chimiques.....	181
2. Protocole général de synthèse et caractérisations des peptides	181
2.a. Synthèse des peptides	181
2.b. Caractérisation des peptides	184
3. Protocole général de synthèse des nanoparticules cœur-coquilles.....	187
3.a. Synthèse des nanoparticules de maghémite.....	187
3.b. Synthèse des nanoparticules cœur-coquilles.....	188
3.c. Fonctionnalisation des nanoparticules cœur-coquilles avec le DBCO.....	188
4. Caractérisation des suspensions de nanoparticules	189
4.a. Concentration en fer.....	189
4.b. Diffusion dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering)	189
4.c. Potentiométrie zêta	190
4.d. Microscopie électronique à transmission (TEM).....	190
4.e. Mesure de l'aimantation à saturation.....	191
4.f. Hyperthermie magnétique en solution.....	191
4.g. Mesure quantitative des groupes fonctionnels amine à la surface des nanoparticules par la fluorescamine	192
4.h. Spectroscopie de fluorescence.....	193
5. Fonctionnalisation des nanoparticules cœur-coquilles avec les peptides	193
5.a. Mono-fonctionnalisation des nanoparticules avec les peptides	193
5.b. Bi-fonctionnalisation des nanoparticules avec les peptides	193
6. Protocoles généraux des expériences cellulaires.....	194
6.a. Culture cellulaire	194
6.b. Test de cytotoxicité cellulaire (LDH).....	194
6.c. Test de viabilité cellulaire à la calcéine-AM	195
6.d. Analyse de l'internalisation des NP sur cellules fixées par microscopie à fluorescence ou microscopie confocale	195
6.e. Analyse de l'internalisation des NP sur cellules vivantes par microscopie confocale à fluorescence.....	196
6.f. Cytométrie en flux après internalisation des cellules en suspension à 4 °C et 37 °C	197
6.g. Quantification de l'internalisation cellulaire des nanoparticules par cytométrie en flux.....	198
6.h. Quantification du fer dans les cellules par spectrométrie d'absorption atomique (AAS)	199

6.i. Microscopie électronique à transmission avec les coupes de cellules	199
6.j. Microscopie électronique en transmission à balayage (STEM)	200
Bibliographie	203

Abréviations

AA	Acide aminé
AAS	Atomic absorption spectroscopy, Spectrophotométrie d'absorption atomique
AC	Alternative current, courant alternatif
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide gras
Ahx	Acide 6-aminohéxanoïque
Alloc	Alloxycarbonyle
AMF	Alternatic Magnetic Field, Champ magnétique alternatif
APTS	3-aminopropyltriéthoxysilane
Arg	Arginine
ATP	Adénosine triphosphate
BCN	bicyclo[6.1.0]nonyne
BmP	Bis(monoacylglycero)phosphate
Boc	Tert-butyloxycarbonyle
BT	Bleu de trypan
CC	Cœur-coquilles
CF	5,6-carboxyfluorescéine
CHCA	Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
CHO	Chinese hamster ovary, Ovaire d'hamster chinois
Chol	Cholestérol
COMU	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)diméthylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate
CPP	Cell penetrating peptide, Peptide vecteur
CuAAC	Copper(I)-catalysed alkyne-azide cycloaddition, Cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (I)
Cys	Cystéine
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DBCO	Dibenzocyclooctyne
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide

Abréviations

DCM	Dichlorométhane
DIBAC	Dibenzoazacyclooctyne
DIBO	Dibenzocyclooctyne
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DLS	Dynamique light scattering, Diffusion dynamique de la lumière
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTNB	acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)
DTT	Dithiothréitol
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétracétique
EE	Early endosome, Endosome précoce
emu	Electromagnetic unit, Unité électromagnétique
EPR	Enhanced permeability and retention
équiv.	Equivalent
FBS	Fetal Bovine Serum, Sérum de veau fœtal
FDA	Food and drug administration
Fmoc	9-fluorenylméthoxy-carbonyle
GAG	Glycosaminoglycane
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HATU	1-[Bis(diméthylamino)méthylène]-1H-1,2,3-triazolo[4,5- b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
HBSS	Hanks balanced salt solution
HBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraméthyluronium- hexafluorophosphate
HCTU	<i>O</i> -(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraméthyluronium hexafluorophosphate
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine-éthane-sulfonique
His	Histidine
HOBt	Hydroxybenzotriazole

HPLC	High performance liquid chromatography, Chromatographie liquid haute performance
IBPS	Institut de biologie de Paris-seine
ILP	Intrinsic Loss Power, Pouvoir intrinsèque de perte
ILV	Intraluminal vesicles, Vésicules intraluminales
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LBM	Laboratoire des biomolécules
LDH	Lactate déshydrogénase
LE	Late endosome, Endosome tardif
Lys	Lysine
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight, Désorption-ionisation laser assistée par matrice-temps de vol
MFI	Mean fluorescence intensity, Intensité moyenne de fluorescence
MOPS	Acide 3-(morpholino) propane-1-sulfonique
MS	Mass spectroscopy, Spectroscopie de masse
MSN	Nanoparticules de silice mésoporeuses
MVB	Multivesicular bodies, Corps multivésiculaires
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NIR	Near InfraRed, Proche infrarouge
NP	Nanoparticules
NPM	Nanoparticules magnétiques
Pbf	2,2,4,6,7-pentaméthyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholine
PCC	Pearson's correlation coefficient, coefficient de corrélation de Pearson
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEG	Polyéthylène glycol
PEI	Polyéthylène imine
PEOS	2-(méthoxy(polyéthylénoxy)propyl)triméthoxysilane
Pep	Peptide
PHENIX	Physicochimie des électrolytes et nanosystèmes interfaciaux
PI	Phosphatidylinositol
PLGA	poly(acide lactique-co-glycolique)

Abréviations

PS	Phosphatidylsérine
RE	Réticulum endoplasmique
Rh	Rhodamine
RITC	Rhodamine B isothiocyanate
ROS	Reactive oxygen species, Espèces réactives de l'oxygène
RP	Reverse phase
siRNA	Small interfering Ribonucleic acid, ARN interférent
SLP	Specific loss power, Pouvoir chauffant
SM	Sphingomyéline
SPAAC	Strain promoted alkyne-azide cycloaddition, Cycloaddition azoture-alkyne favorisée par la contrainte stérique
SPION	Superparamagnetic iron oxide nanoparticles, Nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques
SPPS	Solid phase peptide synthesis, Synthèse de peptide en phase solide
STEM	Scanning transmission electron microscopy, Microscopie électronique en transmission à balayage
TA	Température ambiante
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEM	Transmission electron microscopy, Microscopie électronique à transmission
TEOS	Tétraéthylorthosilicate
TFA	Acide trifluoroacétique
TIS	Triisopropylsilane
Trp	Tryptophane
Trt	Trityl
u.a	Unité arbitraire
VSM	Vibrating-sample magnetometer, Magnétomètre à échantillon vibrant
γ -Fe ₂ O ₃	Maghémite ; forme γ de l'oxyde ferrique

Introduction générale

Les nanoparticules magnétiques sont devenues une classe importante de nanomatériaux fonctionnels dans le domaine biomédical pour diverses applications comme la thérapie anticancéreuse par hyperthermie magnétique, l'imagerie à résonance magnétique, la vectorisation de médicaments ou encore pour l'ingénierie cellulaire. Pour ces différentes applications, la délivrance efficace des nanoparticules à des organes, types cellulaires ou organites intracellulaires spécifiques est importante. Ceci nécessite de pouvoir contrôler le transport des nanoparticules dans l'organisme et les cellules. Ce niveau de contrôle est cependant souvent difficile à atteindre et nécessite de mieux comprendre les modes d'interaction des nanoparticules avec les systèmes biologiques et les cellules en particulier. Ces interactions complexes sont dépendantes de plusieurs facteurs comme les propriétés physico-chimiques et chimiques des nanoparticules (dont leur taille, forme, chimie de surface, composition, etc.), le type d'organe ou tissu et les modifications subies par ces nanoparticules en milieu biologique.

L'internalisation cellulaire des nanoparticules implique des mécanismes hautement régulés mettant en jeu des interactions moléculaires complexes avec la membrane plasmique. Cette membrane agit comme une barrière qui permet de préserver l'intégrité des cellules et de contrôler les échanges entre l'intérieur des cellules et l'environnement extérieur. Du fait de ses caractéristiques structurales et de sa composition moléculaire (une bicouche lipidique à laquelle sont associées des protéines et des oligosaccharides), la membrane plasmique présente une perméabilité sélective vis-à-vis des ions, des biomolécules endogènes et exogènes et également des nanoparticules.

Les nanoparticules magnétiques sont généralement internalisées dans la cellule par endocytose, processus qui conduit à leur piégeage dans les endosomes. Ce phénomène de piégeage limite le potentiel thérapeutique des nanoparticules magnétiques car leurs propriétés magnétiques s'en trouvent fortement affectées. Les nanoparticules magnétiques endocytées peuvent également être dirigées vers les lysosomes, ou elles risquent de subir une dégradation due au pH acide et à la présence d'enzymes de dégradation dans ces organites. Cette endocytose limite également les applications

possibles des nanoparticules magnétiques, empêchant par exemple l'interaction de composés greffés à leur surface avec des organites intracellulaires ou des protéines cytosoliques cibles. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées pour contourner le piégeage dans les endosomes et permettre aux nanoparticules magnétiques de rejoindre le cytosol, comme l'utilisation de peptides vecteurs ou de polymères chargés positivement tels que le polyéthylène imine (PEI).

Au cours des dernières années, les peptides vecteurs ou CPP (cell penetrating peptides), peptides souvent cationiques, ont reçu une attention particulière en raison de leur capacité intrinsèque à traverser les membranes cellulaires et à médier le transport d'une large gamme de cargaisons macromoléculaires (peptides, oligonucléotides, nanoparticules, etc.) avec une faible cytotoxicité. Leur internalisation a lieu par endocytose et également par translocation directe. Ces mécanismes sont simultanés et leurs proportions varient notamment selon la concentration et la nature en peptide, la lignée cellulaire étudiée, les conditions physico-chimiques (température, pH, etc.). La translocation directe est une voie d'entrée particulièrement intéressante, car elle permet aux molécules de rejoindre directement le cytosol des cellules. Certains peptides basiques et notamment ceux riches en résidus histidine, ont également la possibilité de s'échapper des endosomes, potentiellement par un mécanisme appelé « effet éponge à protons ».

L'objectif de ce doctorat était de synthétiser des nanoparticules magnétiques enrobées de silice (type cœur-coquille) afin de les fonctionnaliser par des peptides cationiques pour contourner leur piégeage dans les endosomes. Pour ce faire, nous avons utilisé des nanoparticules de maghémite enrobées d'une coquille de silice permettant le greffage covalent de peptides à leur surface, par chimie click. Deux types de peptides cationiques ont été synthétisés, le CPP Arg₉ et un peptide oligo-histidine, afin d'étudier différentes stratégies pour atteindre le cytosol : la translocation directe et l'échappement des endosomes. Bien que le peptide oligo-histidine soit neutre à pH physiologique, le groupement imidazole de sa chaîne latérale ayant un pKa de 6, il sera chargé positivement dans les compartiments acides de la cellule (endosome, lysosome). Dans cette thèse nous avons tiré profit de ce peptide lorsqu'il était chargé, nous l'avons donc qualifié de peptide cationique. Après avoir confirmé la fonctionnalisation efficace des peptides sur la silice, nous avons comparé leur impact sur l'internalisation des nanoparticules dans les cellules.

Ce manuscrit est composé de trois chapitres distincts :

Le premier chapitre fournit une description de la membrane plasmique, détaille la littérature relative à la compréhension des mécanismes d'internalisation des nanoparticules, retrace différentes applications des nanoparticules d'oxydes de fer au niveau intracellulaire et rend compte de diverses stratégies pour permettre aux nanoparticules d'accéder au cytosol des cellules, avec notamment les CPP.

Le deuxième chapitre de cette thèse est consacré à mes travaux sur la synthèse des nanoparticules fonctionnalisées avec les peptides cationiques, de la synthèse des peptides et des particules de maghémite γ -Fe₂O₃ à l'enrobage de ces nanoparticules avec de la silice et leur fonctionnalisation par chimie click. Les différents objets sont également caractérisés de façon approfondie par différentes méthodes physico-chimiques.

Le troisième chapitre porte sur l'étude de l'internalisation cellulaire des nanoparticules fonctionnalisées et l'analyse détaillée de leur localisation au sein des cellules par microscopie à fluorescence et par microscopie électronique.

Chapitre 1 : Introduction

L'internalisation cellulaire des nanoparticules implique la compréhension des interactions cellule-nanoparticules. Ce chapitre sera consacré dans un premier temps à la présentation de données sur la structure et composition de la cellule et des membranes biologiques, puis dans un second temps à la présentation des objets étudiés durant ce travail de doctorat.

1.1. Structure et composition des membranes cellulaires eucaryotes

La cellule est délimitée par la membrane plasmique qui constitue une barrière pour la vectorisation intracellulaire de molécules. Les organites des cellules eucaryotes tels que le noyau, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et les endosomes possèdent des membranes de structure semblable à celle de la membrane plasmique mais qui peuvent différer au niveau de leurs composants.¹

La membrane plasmique sépare l'intérieur et l'extérieur d'une cellule et préserve son intégrité mais elle permet aussi de contrôler les interactions et les échanges avec son environnement extérieur. Elle possède une épaisseur d'environ 5 nm avec un cœur hydrophobe constitué par la bicouche lipidique, qui rend la membrane fortement imperméable aux molécules hydrophiles et chargées. Pour certaines molécules, la traversée de la membrane est facilitée par des protéines insérées dans la bicouche lipidique (figure 1.1). Ces protéines permettent le transport de molécules spécifiques (comme les ions ou le glucose) vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule. Des oligosaccharides se trouvent également à la surface des cellules, ces sucres sont soit associés aux protéines (glycoprotéines) soit aux lipides (glycolipides) (figure 1.1). Généralement, les membranes cellulaires eucaryotes sont composées à 50 % en masse par des lipides (phospholipides et cholestérol), 40 % par des protéines et 10 % par des glucides attachés à quelques lipides et protéines.¹

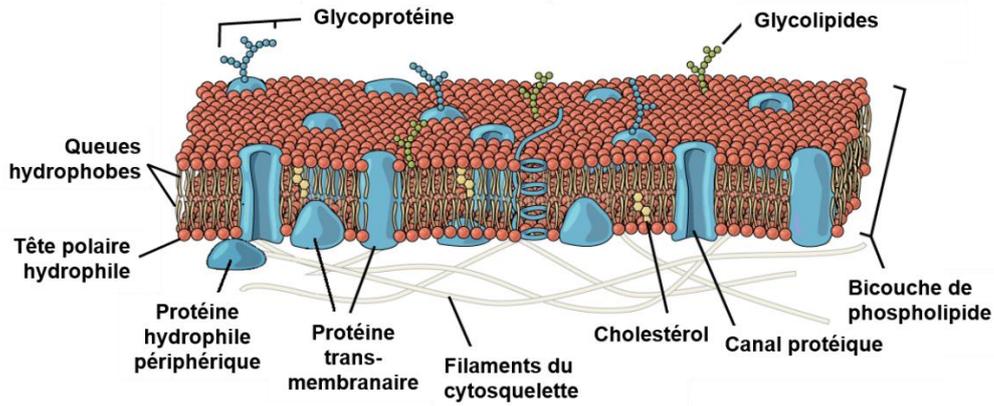


Figure 1.1. Représentation schématique de la structure de la membrane plasmique (Image modifiée à partir de OpenStax Biology).

1.1.1. Les lipides membranaires

Les phospholipides sont les composants majeurs des membranes cellulaires. Ces lipides sont composés de glycérol (glycérophospholipides) ou de sphingosine (sphingolipides). Ces molécules amphiphiles permettent la formation spontanée de bicouches en solution aqueuse, avec la partie hydrophobe orientée à l'intérieur des bicouches et les têtes polaires exposées au milieu aqueux (vers l'extérieur).

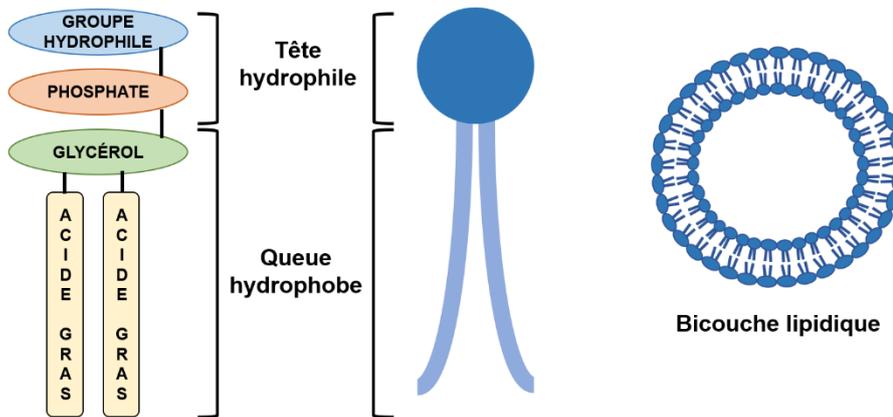


Figure 1.2. Représentation schématique d'un glycérophospholipide et de la formation en bicouche de ces phospholipides en solution aqueuse.

Les glycérophospholipides représentent la majorité des lipides de la membrane plasmique. Ils sont composés de glycérol estérifié par deux chaînes d'acides gras hydrophobes, le glycérol étant également lié à un groupe hydrophile contenant un phosphate, illustré figure 1.2. Le groupement polaire porté par le groupement phosphate

varie selon la nature du phospholipide (figure 1.3) et définit la charge globale du lipide. Le groupement phosphate est chargé négativement à pH physiologique du fait de son pKa se trouvant autour de 1-2. On distingue donc les phospholipides anioniques (phosphatidylsérine (PS) et phosphatidylinositol (PI)) qui possèdent un groupement polaire globalement neutre et les phospholipides zwitterioniques (phosphatidylcholine (PC) et phosphatidyléthanolamine (PE)) pour lesquels le groupement polaire est chargé positivement à pH physiologique (figure 1.3).

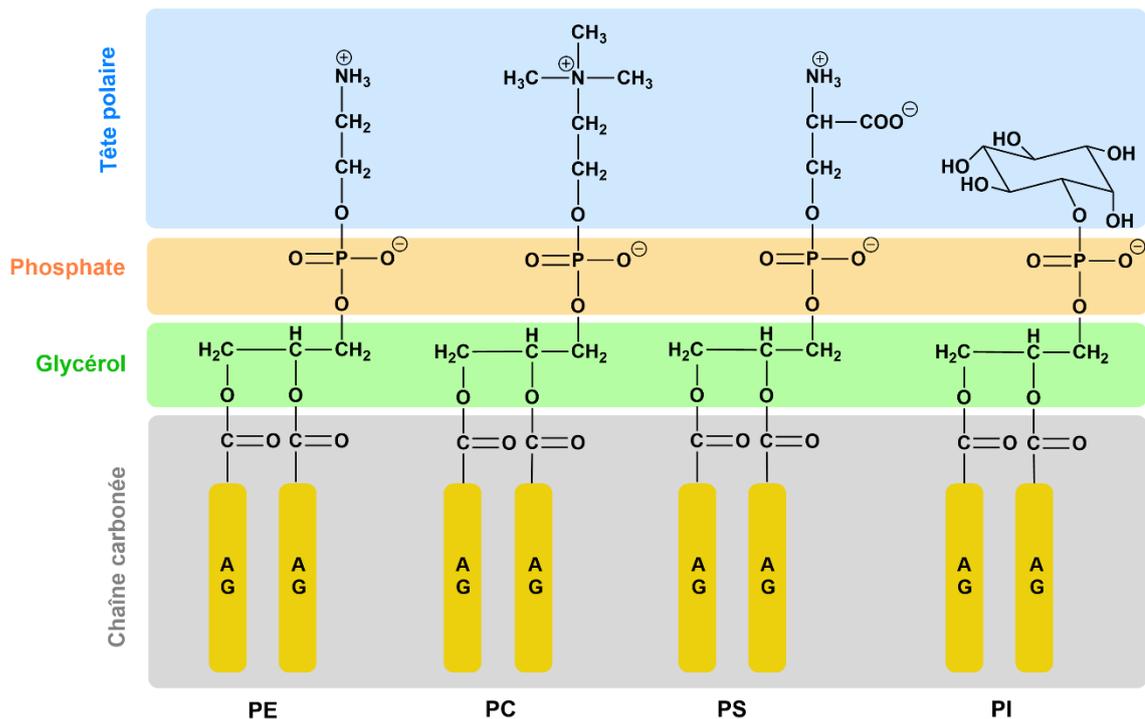


Figure 1.3. Structure des principaux glycérophospholipides de la membrane plasmique, avec la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylcholine (PC) qui sont zwitterioniques et la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI) qui sont chargés négativement. (AG = acide gras).

La sphingomyéline, représentée figure 1.4, est la plus abondante des sphingolipides, elle est constituée d'une céramide (sphingosine reliée à un acide gras), d'un groupement phosphate et d'une tête polaire, la choline. La présence de la sphingomyéline dans les membranes est reliée à de nombreuses fonctions de signalisation cellulaire, notamment le signalement de l'apoptose des cellules épithéliales.²

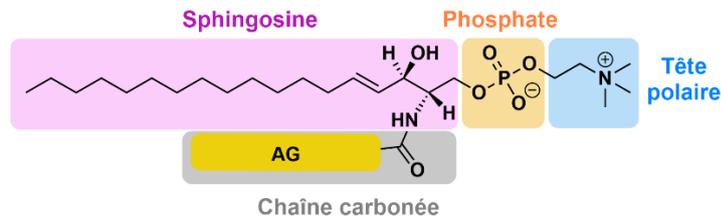


Figure 1.4. Structure du principal sphingolipide, la sphingomyéline (SM) qui est zwitterionique. (AG = acide gras).

Au niveau de la membrane plasmique, les feuillet interne et externe de la bicouche ont une composition lipidique différente. Le feuillet interne est enrichi en phosphatidyléthanolamine (PE) et phosphatidylsérine (PS), cette dernière étant chargée négativement. La sphingomyéline (SM) et la phosphatidylcholine (PC) sont majoritaires dans le feuillet externe et sont électriquement neutres (figures 1.3, 1.4, 1.5). Les phospholipides zwitterioniques représentent plus de 50 % des phospholipides de la membrane des cellules eucaryotes et 75 % d'entre eux se trouvent sur le feuillet externe (figure 1.5). La divergence de composition des feuillet interne et externe de la membrane entraîne donc une répartition asymétrie de la charge.³

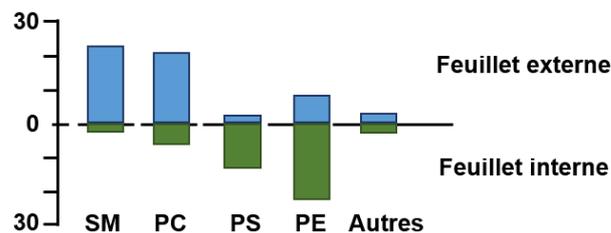


Figure 1.5. Distribution asymétrique des phospholipides dans la membrane plasmique d'érythrocytes humains. La distribution est donnée en fonction du pourcentage total de phospholipides. (Image adaptée à partir de Zachowski *et al.*⁴).

Le cholestérol est un élément essentiel des membranes cellulaires. C'est un lipide amphiphile de la famille des stérols composé d'un squelette carboné à quatre cycles rigides et plans à caractère hydrophobe, fonctionnalisé par un groupe hydroxyle à caractère hydrophile (figure 1.6). Le cholestérol s'insère entre les phospholipides de la bicouche lipidique grâce à son groupement hydroxyle qui se retrouve à proximité des têtes polaires des phospholipides. Les cycles interagissent quant à eux avec les chaînes carbonées des phospholipides et diminuent leur mobilité.⁵

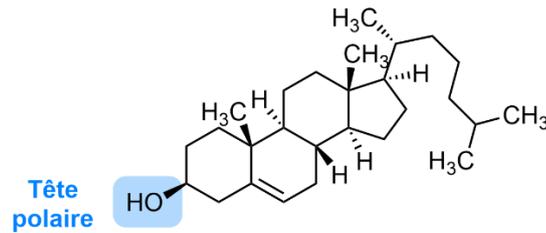


Figure 1.6. Représentation de la molécule de cholestérol composée de quatre cycles rigides (hydrophobe) et du groupement hydroxyle constituant la tête polaire.

Certaines parties de la membrane possèdent des régions enrichies en cholestérol et en sphingolipides appelées « radeaux lipidiques » qui seraient des microdomaines spécialisés notamment dans la libération de neurotransmetteurs (en raison de leurs propriétés physico-chimiques différentes) et joueraient un rôle privilégié dans la signalisation cellulaire en permettant la concentration de certaines protéines et récepteurs, en particulier celle de l'insuline.⁵

1.1.2. Différence de composition lipidique entre la membrane plasmique et la membrane des organites

Les différents lipides sont également distribués de manière hétérogène au niveau des membranes présentes dans une cellule eucaryote comme illustré table 1.1.

Organites Lipides	Membrane plasmique	Réticulum endoplasmique	Appareil de golgi	Mitochondries	Endosomes-Lysosomes
Chol	34 %	8 %	18 %		30 %
PC	23 %	54 %	36 %	37 %	30 %
SM	17 %		6 %		15 %
PE	11 %	20 %	21 %	31 %	11 %
PS	8 %		6 %		
PI		11 %	12 %	6 %	7 %
CL				22 %	
BMP					7 %

Table 1.1. Composition en lipides de la membrane plasmique et de la membrane de quelques organites intracellulaires. Seuls les lipides représentant plus de 5 % des lipides totaux sont indiqués. BmP : bis(monoacylglycero)phosphate ; Chol : cholestérol ; CL : cardiolipine ; PC : phosphatidycholine ; PE : phosphatidylethanolamine ; PI : phosphatidylinositol ; PS : phosphatidylsérine ; SM : sphingomyéline. Tableau réalisé à partir de Casares *et al.* ⁶

La membrane plasmique et la membrane des endosomes sont enrichies en sphingolipides et en cholestérol. Ils rendent ces membranes exceptionnellement rigides. Les membranes du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi sont enrichies en PC et PI (table 1.1).⁶ Les phospholipides sont également distribués de façon asymétrique au niveau des feuillettes des membranes des organites. Les sphingolipides sont retrouvés sur la surface luminale de la membrane de l'appareil de Golgi et à l'extérieur de la membrane plasmique, tandis que les phospholipides PS et PE sont concentrés dans les feuillettes membranaires cytosoliques.⁷

Les glycérophospholipides, le cholestérol et la sphingomyéline participent à différentes voies d'endocytose (principalement les voies impliquant la cavéoline et la clathrine). La composition lipidique des endosomes précoces correspond quasiment à celle de la membrane plasmique, du fait de l'invagination de celle-ci pour former les endosomes. Lors de la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs, la concentration en cholestérol et en PS diminue au profit d'une augmentation massive d'un autre phospholipide : le bis(monoacylglycéro)phosphate (BMP), aussi connu sous le nom d'acide lysobisphosphatidique (LBPA), représenté figure 1.7.

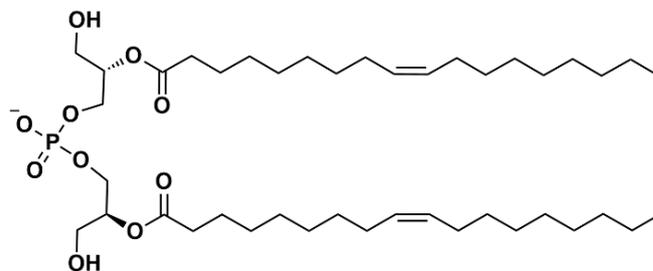


Figure 1.7. Structure du bis(monoacylglycérol)phosphate (BMP).

Le BMP est constitué de deux monoacylglycérols liés par un groupement phosphate. Les membranes des endosomes-lysosomes se retrouvent enrichis de ce phospholipide anionique, dans lesquelles il joue un rôle crucial sur le destin des composants endocytés. Alors qu'il ne représente qu'1 % des phospholipides totaux de la plupart des tissus de mammifères, le BMP représente 15 % des phospholipides de l'endosome tardif et jusqu'à 70 % de leurs phospholipides membranaires présents sur le feuillet interne ou à l'intérieur du compartiment. La membrane des lysosomes est également caractérisée par de faibles quantités de cholestérol et des quantités élevées de sphingomyéline.^{6,8,9}

1.1.3. Les protéines membranaires

Les protéines associées à la membrane sont indispensables pour la communication intercellulaire et pour les échanges de la cellule avec l'environnement extérieur. Les protéines peuvent être transmembranaires ou être associées à la face interne ou externe de la bicouche lipidique. Elles sont aussi présentes de manière asymétrique au niveau de la membrane et contribuent à son intégrité et son identité. Les protéines membranaires sont responsables de plusieurs fonctions ; elles peuvent agir notamment comme récepteurs pour permettre aux cellules de répondre aux signaux extérieurs et participent au passage sélectif à travers la membrane de molécules incapables de diffuser librement à travers la bicouche lipidique (canaux ioniques, pompes, transporteurs de métabolites, etc.).¹ Il faut noter que seules les molécules de faible poids moléculaire, à caractère hydrophobe et non chargées sont capables de diffuser passivement (mécanisme indépendant de l'ATP et des récepteurs) à travers la bicouche lipidique.

1.1.4. Les sucres membranaires

L'asymétrie la plus importante se trouve au niveau des sucres membranaires qui sont uniquement présents sur la surface externe de la membrane plasmique, formant une barrière de diffusion appelée glycocalyx, de nature hydrophile. Les motifs glucidiques sont présents sous forme de chaînes oligosacchariques liées de façon covalente majoritairement aux protéines formant des glycoprotéines ou minoritairement à des lipides formant des glycolipides. Les sucres jouent un rôle important dans les interactions entre les cellules et leur environnement extérieur. Dans les organites intracellulaires, les sucres sont dirigés vers l'intérieur de l'organite.¹⁰ Les glycoprotéines contiennent majoritairement des polysaccharides à chaînes longues composés d'unités disaccharidiques répétées appelées glycosaminoglycanes (GAG). Les GAG sont chargés négativement (car porteurs de groupements carboxylate et sulfate) et sont classés en cinq catégories en fonction de la nature de l'unité disaccharidique, du degré de sulfonation, et de la géométrie de la liaison glycosidique (figure 1.8). Les héparanes sulfates sont les plus abondants à la surface des cellules et jouent un rôle essentiel dans les processus d'internalisation cellulaire de molécules.¹¹

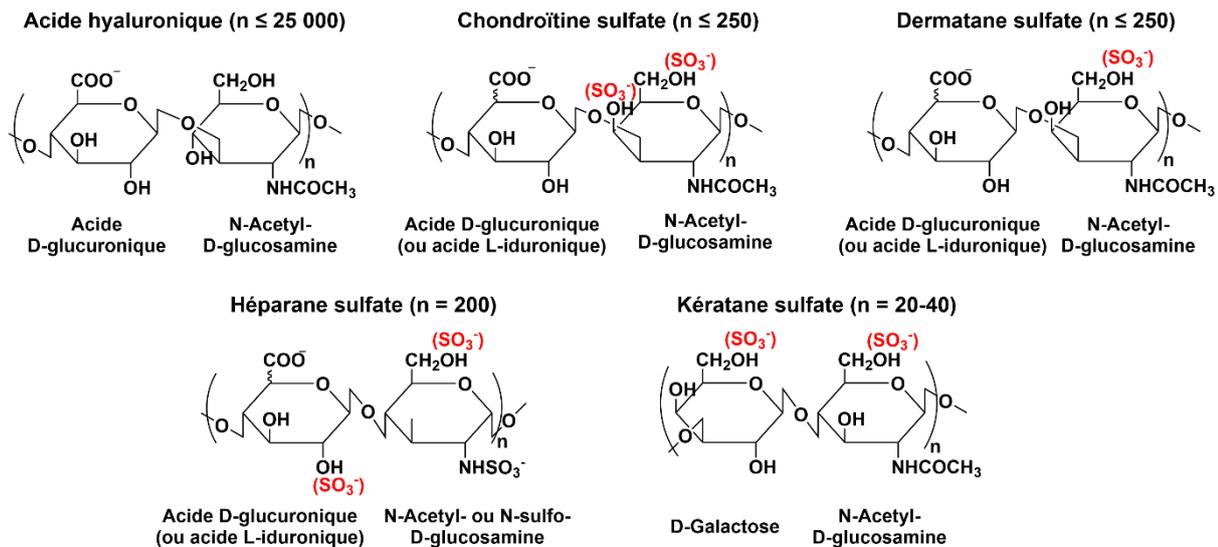


Figure 1.8. Représentation des unités disaccharidiques répétées dans la formation des glycosaminoglycanes (GAG). Image adaptée à partir de Lodish *et al.*¹¹

1.2. Endocytose et trafic vésiculaire

Certaines macromolécules ne sont pas prises en charge par les protéines de transport et nécessitent, pour entrer dans la cellule, l'endocytose. L'endocytose est un mécanisme physiologique permettant l'entrée de molécules essentielles à la survie des cellules ou à l'internalisation de récepteurs membranaires. C'est également un processus d'entrée de macromolécules exogènes, en particulier des toxines, vecteurs et nanoparticules. L'endocytose nécessite un apport d'énergie pour permettre une invagination de la membrane plasmique conduisant à la formation de vésicules intracellulaires appelées endosomes. Les endosomes formés contiennent des constituants de la membrane plasmique et des composants extracellulaires et encapsulent les molécules à transporter dans la cellule. Ces vésicules fusionnent ensuite avec les lysosomes où les macromolécules transportées sont alors digérées par des enzymes présentes dans ces compartiments acides.

La libération de protéines ou glucides produits par la cellule, ou l'élimination de déchets vers le milieu extérieur est appelée exocytose et possède un mécanisme similaire à l'endocytose. Dans ce cas, les vésicules intracellulaires fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire. D'un point de vue moléculaire, l'endocytose et l'exocytose sont hautement régulées et médiées par

différents types de lipides et de protéines de transport comme, par exemple, les radeaux lipidiques, la clathrine, la dynamine, la cavéoline et les récepteurs de reconnaissance de formes.¹²

Les voies d'endocytose peuvent être classées en cinq catégories : l'endocytose dépendante de la clathrine, l'endocytose dépendante de la cavéoline, l'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline, la phagocytose et la macropinocytose (figure 1.9).¹³

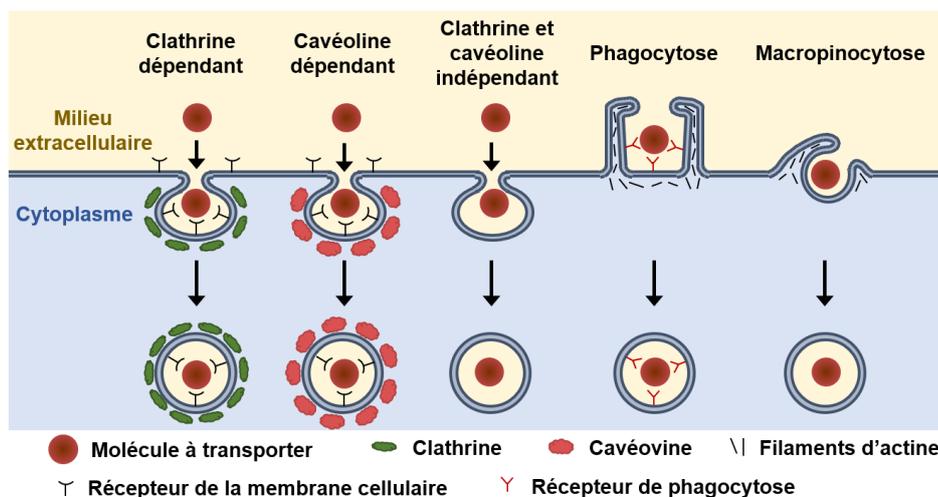


Figure 1.9. Les différentes voies d'internalisation *via* l'endocytose dépendante de la clathrine, dépendante de la cavéoline, indépendante de la clathrine et de la cavéoline, la phagocytose et la macropinocytose (d'après Donahue *et al.*¹³).

1.2.1. Endocytose dépendante de la clathrine

L'endocytose dépendante de la clathrine est initiée par la reconnaissance de la macromolécule à transporter par des récepteurs de surface de la membrane plasmique. De nombreux récepteurs membranaires sont communs à différents types cellulaires (par exemple, les récepteurs de la transferrine, les récepteurs de lipoprotéines de basse densité, les récepteurs du facteur de croissance, les récepteurs adrénergiques, etc.), et sont impliqués dans l'endocytose dépendante de la clathrine. La reconnaissance des molécules à internaliser grâce aux récepteurs spécifiques entraîne un recrutement des clathrines qui permettent l'invagination de la membrane. La vésicule recouverte de clathrine est alors séparée et coupée du col de l'invagination de la membrane plasmique pour former une vésicule intracellulaire grâce à une enzyme GTPase, la dynamine. Ces

vésicules intracellulaires sont ensuite prises en charge par le cytosquelette une fois que les clathrines s'en sont détachées. L'endocytose dépendante de la clathrine conduit à des vésicules intracellulaires d'une taille comprise entre 100 et 500 nm.¹⁴

1.2.2. Endocytose dépendante de la cavéoline

L'endocytose dépendante de la cavéoline est induite par liaison du ligand (ou d'une molécule) avec un récepteur glycosylphosphatidylinositol provoquant une invagination de la membrane plasmique et la formation d'une vésicule, appelée cavéole. Les cavéoles sont en forme de flacon d'un diamètre compris entre 50 et 100 nm et sont recouvertes d'une protéine transmembranaire, la cavéoline. La vésicule se détache de la membrane plasmique également par l'action de la dynamine.¹²

1.2.3. Endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline

L'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline implique souvent des « radeaux lipidiques », domaines de la membrane plasmique définis comme riches en cholestérol et en sphingolipides. Certains ligands spécifiques, tel que la toxine cholérique B, se lient à ces zones de la membrane plasmique et pénètrent par une endocytose médiée par ces « radeaux lipidiques ».¹²

1.2.4. Macropinocytose

La macropinocytose représente une voie d'internalisation cellulaire non spécifique caractérisée par l'engloutissement de fluides extracellulaires et de molécules par des extensions de la membrane plasmique stabilisées par l'actine. Les vésicules alors formées, appelées macropinosomes peuvent posséder une taille variée avec un diamètre compris entre 0,5 à 1,5 μm .¹²

1.2.5. Maturation des endosomes

Les vésicules endosomales initiales subissent une fusion homotypique (c'est-à-dire que les membranes du même type fusionnent) et forment les endosomes précoces (EE, Early Endosomes, figure 1.10). Les événements de tri initiés dans les endosomes précoces

déterminent le devenir des molécules internalisées, telles que le recyclage à la membrane plasmique, la dégradation dans les lysosomes ou le transport vers le réseau trans-Golgi (TGN, Trans-Golgi Network). Pour que les composants membranaires à réutiliser soient séparés de ceux qui sont ciblés par les lysosomes, l'endosome précoce fonctionne comme une station de tri dans la cellule. Ces endosomes ont une structure complexe et dynamique avec une cavité centrale et des extensions membranaires tubulaires. Avant leur dégradation, les molécules présentes dans l'endosome précoce peuvent être triées dans des vésicules intraluminales (ILV, Intraluminal Vesicles) qui peuvent se former par bourgeonnement vers l'intérieur de la membrane endosomale. Les endosomes se transforment alors progressivement en endosomes tardifs (LE, Late Endosomes) grâce à plusieurs cycles de tri des molécules transportées et à la formation de vésicules intraluminales.

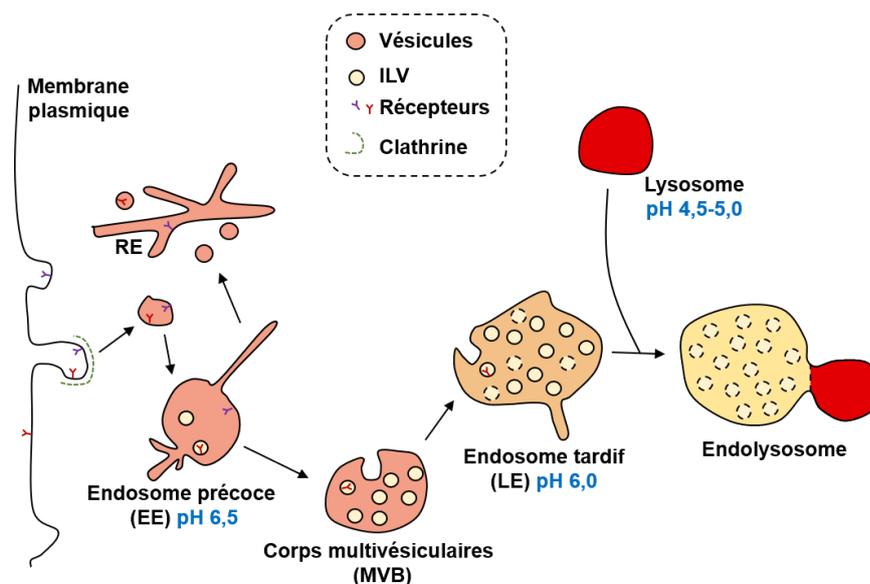


Figure 1.10. Trafic vésiculaire et maturation des endosomes. L'endocytose dépendante de la clathrine y est représentée.

Plus précisément, les vésicules appelées corps multivésiculaires (MVB, MultiVesicular Bodies) qui contiennent plusieurs ILV, se détachent vraisemblablement de l'endosome précoce et mûrissent progressivement en endosome tardif. Les MVB peuvent également fusionner avec la membrane plasmique et libérer leurs vésicules intraluminales sous forme d'exosomes. La maturation des endosomes précoces en tardifs s'accompagne également d'un remodelage protéique et lipidique de leurs membranes, avec pour les

lipides une diminution de la teneur en cholestérol et augmentation de celle en BMP et des modifications concomitantes du milieu intravésiculaire, avec en particulier une diminution significative du pH. Les endosomes tardifs contenant de nombreux ILV, soit mûrissent en lysosomes en acquérant une compétence hydrolytique, soit fusionnent avec des lysosomes, entraînant la dégradation des ILV chargées par les hydrolases acides lysosomales.^{12,15,16}

L'acidification des endosomes est réalisée par une ATPase de type V importatrice de protons (figure 1.11), présente dans leur membrane. Le pH des endosomes précoces se trouvent autour de 6,5 et celui des endosomes tardifs vers 6,0. Les lysosomes sont des organites encore plus acides avec un pH luminal de 4,5 à 5.¹⁷ La membrane du lysosome contient également des transporteurs et des canaux d'ions, ainsi que plusieurs autres transporteurs pour l'exportation des produits de dégradation et plusieurs protéines membranaires hautement glycosylées (LAMP).

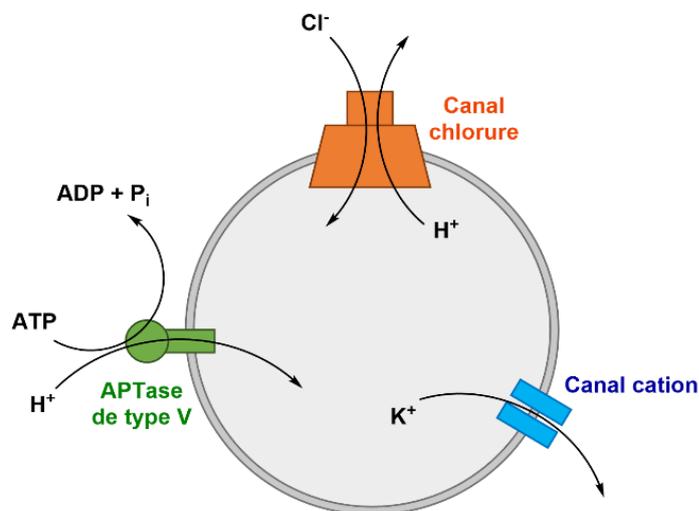


Figure 1.11. Transporteurs endo-lysosomaux impliqués dans l'homéostasie du pH. L'ATPase de type V (en vert) utilise l'énergie métabolique de l'hydrolyse de l'ATP pour apporter des protons à l'intérieur des lysosomes. Ce processus conduit à une charge positive nette à l'intérieur du lysosome. Cette charge peut être réduite par la sortie d'ion K⁺ à travers le canal à cation (en bleu) ou par l'entrée d'ion Cl⁻ par le canal chlorure (en orange).

Les modifications au niveau de la composition des membranes et l'acidification intravésiculaire qui accompagne le processus de maturation des endosomes ont été mises

à profit pour la vectorisation, en particulier pour promouvoir le relargage de molécules dans le cytosol.¹⁸

1.2.6. Phagocytose

La phagocytose est un mécanisme d'internalisation exercé par les cellules immunitaires, y compris les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les lymphocytes B. Un des principaux rôles de la phagocytose est l'élimination d'agents pathogènes ou de molécules synthétiques ou biologiques étrangères au corps. La phagocytose implique une réorganisation de la membrane plasmique grâce à la polymérisation d'actine. La membrane forme une poche qui se referme englobant les molécules étrangères. De grosses particules (plus de 250 nm de diamètre) peuvent être retrouvées dans les vésicules formées appelées phagosomes. Ces phagosomes finissent ensuite par fusionner avec un lysosome pour former un phagolysosome, où les molécules exogènes sont digérées par les enzymes lysosomales.¹²

1.2.7. Autophagie

L'autophagie est un processus cellulaire d'élimination et de recyclage de composants indésirables du cytoplasme comme par exemple de protéines dysfonctionnelles ou mal repliées ainsi que d'organites endommagés. Elle joue un rôle central dans la gestion du stress, de l'infection, de l'inflammation, de l'immunité, du vieillissement et dans certaines maladies y compris le cancer et la neurodégénérescence. L'autophagie, en plus de l'endocytose, fournit une voie d'entrée dans la voie endosomale pour la dégradation des composants cytosoliques et des organites. La macroautophagie implique l'engloutissement du contenu cytoplasmique dans une vésicule à double membrane appelée autophagosome (figure 1.12). L'autophagosome fusionne ensuite avec les vésicules du compartiment endo-lysosomal avant de devenir un autolysosome dans lequel son contenu est dégradé. La maturation des autophagosomes implique la fusion avec différentes parties du compartiment endo-lysosomal. Les autophagosomes peuvent fusionner avec les endosomes précoces ou tardifs, formant des amphisomes, avant de fusionner avec les lysosomes. Les autophagosomes peuvent également fusionner directement avec les lysosomes.^{15,19}

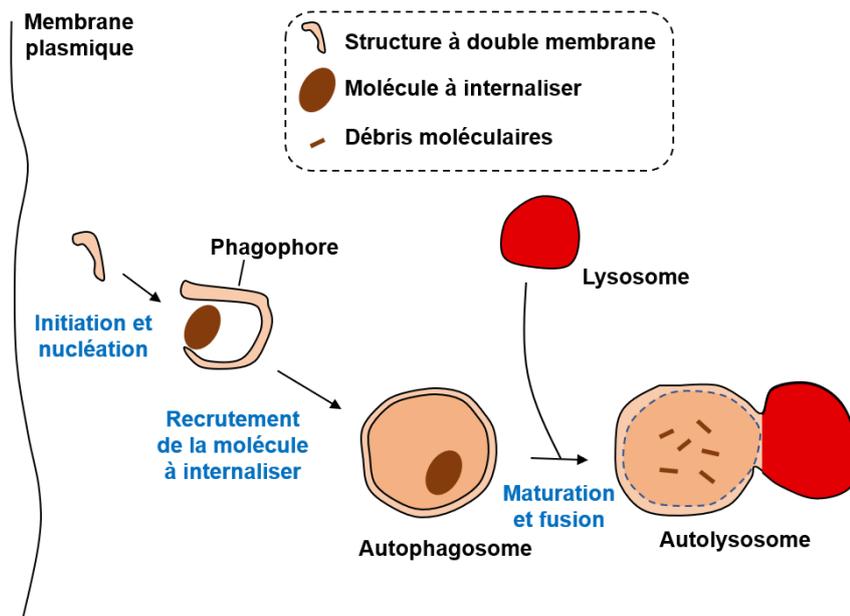


Figure 1.12. Les étapes clés de l'autophagie. L'initiation de l'autophagie entraîne la formation d'une structure à double membrane en forme d'ancre appelée phagophore. La formation et l'expansion du phagophore impliquent des lipides provenant de diverses sources membranaires, notamment le réticulum endoplasmique, les mitochondries, le réseau trans-Golgi, la membrane plasmique et les endosomes. Le phagophore enferme enfin la molécule à transporter, ce qui donne l'autophagosome à double membrane. L'autophagosome mûrit ensuite par fusion avec différents compartiments endo-lysosomes, aboutissant à la formation de l'autolysosome où la molécule transportée est dégradée.

1.3. Propriétés spécifiques de la cellule mises à profit pour le ciblage cellulaire ou le relargage de molécules

La composition des membranes peut varier en fonction des différents lignées cellulaires et également selon l'état des cellules (saines vs tumorales par exemple). Les changements de composition lipidique de la membrane plasmique affectent leurs propriétés biophysiques et leurs capacités d'échange d'information avec l'extérieur par les protéines et les lipides de signalisation. Par exemple, la membrane plasmique des cellules cancéreuses est généralement enrichie en PE et PI mais appauvrie en SM. Elle peut également surexprimer des récepteurs membranaires ou certains glycosaminoglycanes. Ces différences ont été mises à profit pour la conception de vecteurs ciblant les cellules cancéreuses.⁶ D'autres études ont montré des niveaux d'expression élevés de la transferrine, une glycoprotéine associée à la membrane plasmique, sur les cellules

cancéreuses par rapport aux cellules saines.²⁰ Kawamoto *et al.* ont exploité cette surexpression pour cibler et tuer des cellules cancéreuses. Ils ont conçu un peptide synthétique riche en résidus cationiques qui peut se lier aux récepteurs de la transferrine et qui est capable de déstabiliser la membrane cellulaire.²¹

Au-delà des différences au niveau des membranes, le microenvironnement varie aussi entre l'extérieur de la cellule et les compartiments intracellulaires, le cytosol ou l'intérieur des organites. Les différences portent sur le pH, avec l'acidification associée à la maturation des endosomes déjà citée précédemment, la composition en enzymes (estérases, lipases, protéases, etc.) et également sur le caractère oxydant ou réducteur du milieu. Le milieu extracellulaire des cellules saines est oxydant, tandis que leur cytosol est réducteur du fait de la présence de glutathion. En effet, la concentration en glutathion diffère de façon importante entre l'espace extracellulaire (environ 2-20 μM) et l'espace intracellulaire (environ 2-10 mM). Il existe également des protéines réductrices dans les endosomes et lysosomes. Toutes ces différences ont été largement exploitées en vectorisation, par exemple pour le relargage ciblé de molécules actives.¹⁸ Shi *et al.* ont ainsi développé un système micellaire multifonctionnel en forme d'étoile combinant un ciblage actif de cellules cancéreuses surexprimant les récepteurs aux folates et un comportement sensible à l'oxydoréduction. Dans les micelles conçues, à base de copolymère amphiphile, les segments hydrophobes et hydrophiles sont reliés par des ponts disulfures, conférant une sensibilité redox à ce système pour déclencher la libération intracellulaire rapide du médicament encapsulé, la doxorubicine. Les groupes terminaux des segments hydrophiles ont été décorés de ligands folates, permettant l'adressage des cellules tumorales et la stimulation de l'endocytose des micelles dans les cellules. La sensibilité à l'oxydoréduction de ces micelles a été évaluée en analysant leur changement de taille micellaire, de morphologie et de poids moléculaire en présence ou absence de glutathion. Les liaisons disulfures du système micellaire ont la capacité d'être clivées à une concentration élevée en glutathion, conduisant au désassemblage des micelles et à la libération de la doxorubicine. Les profils de libération du médicament *in vitro* ont montré que dans un environnement non réducteur, les micelles pouvaient maintenir une bonne stabilité, tandis que dans un environnement réducteur et acide similaire au milieu intracellulaire à celui des cellules tumorales, l'agent cancéreux encapsulé était libéré rapidement.²²

1.4. Les différents types de nanoparticules utilisées dans le domaine médical

L'utilisation de nanoparticules (NP) pour les applications médicales s'est rapidement développée durant les trente dernières années. Les rapports surface/volume très élevés des NP en font des objets de choix permettant de transporter des molécules d'intérêt thérapeutique (siRNA, molécules actives, anticorps, etc.) ou de greffer des ligands de ciblage tout en maintenant une bonne stabilité des NP en solution.^{23,24} De nombreux NP ont été développés au cours des dernières années, un certain nombre sont représentés sur la figure 1.13.

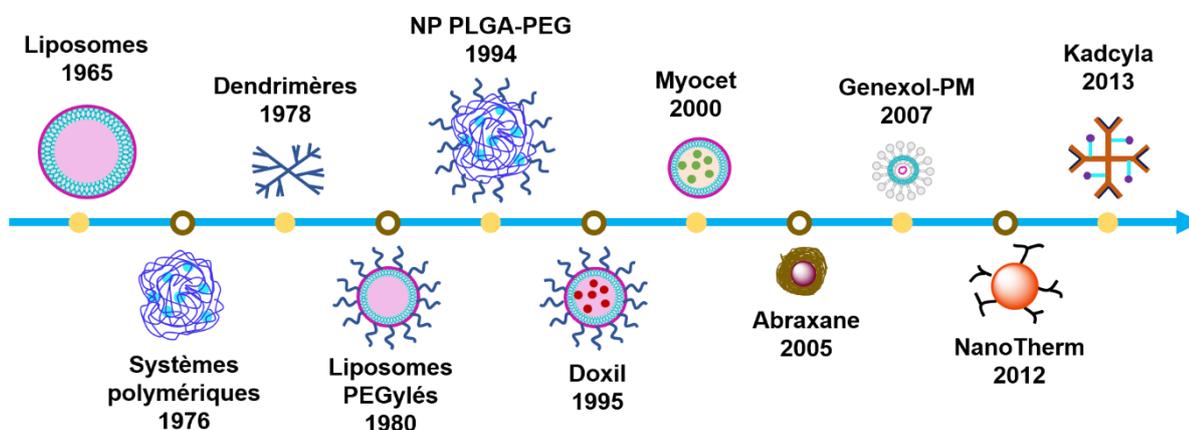


Figure 1.13. Chronologie du développement de certaines nanoparticules utilisées dans le domaine médical. Les liposomes, les systèmes polymériques, les dendrimères et les liposomes PEGylés ont été développés en tant que transporteurs de médicaments avant 1995. Le Doxil (doxorubicine encapsulée dans un liposome) est le premier liposome approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) pour une utilisation anticancéreuse. Le liposome non PEGylé Myocet (doxorubicine), la nanoparticule à base d'albumine (NP) Abraxane (doxorubicine), la micelle polymérique PEG-PLA Genexol-PM (paclitaxel), l'oxyde de fer NP NanoTherm et le liposome Kadcyla ont été approuvés pour une utilisation clinique. D'autres nanomédicaments sont actuellement testés dans des essais précliniques et cliniques. (Image adaptée de Li *et al.*²⁵)

Une nanoparticule peut être définie comme étant un objet dont une des dimensions est inférieure à une centaine de nanomètres. Ces nanoparticules, encore appelées vecteurs, peuvent être de nature organique ou inorganique. Les principales NP organiques sont constituées de polymères, de lipides, de dendrimères ou de carbone (comme les nanotubes de carbone). Les nanoparticules de polymère sont obtenues à partir de

polymères synthétiques (polyéthylène glycol PEG, poly(acide lactique-co-glycolique), PLGA) ou naturels (dextran, alginate, gélatine, chitosane), qui sont biocompatibles et biodégradables. Ces systèmes présentent l'avantage d'être facilement fonctionnalisables par une biomolécule.^{26,27} Les liposomes sont quant à eux, des vésicules lipidiques sphériques auto-assemblées ayant la capacité de piéger à la fois des composés lipophiles dans leur membrane lipidique et des molécules hydrophiles dans leur noyau aqueux. Les liposomes permettent l'encapsulation de nombreuses molécules qui peuvent être transportées dans les cellules ou tissus. Généralement les liposomes se caractérisent par une biocompatibilité et une biodégradabilité élevées, et ils améliorent la stabilité d'agents thérapeutiques.^{28,29}

Les NP inorganiques les plus étudiées pour des applications biomédicales sont composées de silice mésoporeuse, d'oxyde de fer et d'oxydes mixtes, de métaux (or, cuivre, argent) ou de semi-conducteurs (CdSe). Nous détaillerons par la suite uniquement les nanoparticules d'oxyde de fer et les nanoparticules de silice.

1.4.1. Les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer

Les nanoparticules magnétiques (NPM) d'oxyde de fer sont particulièrement attractives du fait de leurs propriétés magnétiques remarquables. Ces nanoparticules peuvent être utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques, de vectorisation et d'imagerie.

Les NPM à base d'oxyde de fer sont considérées comme d'excellentes candidates pour les applications biomédicales en raison de leur biocompatibilité, de leur synthèse facile, de leur stabilité chimique et de leur caractère superparamagnétique. Les NP de magnétite Fe_3O_4 et de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, sont les plus largement utilisées et se sont avérées bien tolérées par le corps humain.³⁰ De plus, des études récentes ont démontré une biodégradation massive des NP d'oxyde de fer dans des endosomes au sein des cellules en moins d'un mois, montrant que les tissus peuvent se purger eux-mêmes de ces NP et qu'elles ne sont pas toxiques. La dégradation des NP est suivie de la libération intracellulaire d'ions fer sans affecter l'homéostasie cellulaire du fer.^{31,32} Les applications biomédicales de ces oxydes de fer se concentrent généralement sur leurs propriétés magnétiques intrinsèques et leur biocompatibilité, qui leur permettent d'agir comme

d'excellents agents de contraste en IRM (imagerie par résonance magnétique) et comme outil pour l'hyperthermie magnétique thérapeutique.³³ Cette double fonctionnalité a conduit à l'utilisation de NP d'oxyde de fer superparamagnétiques comme des agents théranostiques, c'est-à-dire présentant à la fois des propriétés thérapeutiques et diagnostiques.

Les premières nanoparticules inorganiques à avoir été validées par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis sont les nanoparticules d'oxyde de fer enrobées de dextran pour leur propriété d'agent de contraste en IRM. Ceci a été suivi en 2012 par l'approbation des nanoparticules NanoTherm® pour l'hyperthermie magnétique dans le traitement anticancéreux. Le composé actif de la thérapie est un mélange de NP de magnétite et de maghémite enrobées d'aminosilane possédant un diamètre hydrodynamique de 15 nm.³⁴ Des études cliniques de phase II ont été menées par Maier-Hauff *et al.*, dans lesquelles l'hyperthermie magnétique a été associée à la radiothérapie chez des patients présentant des récurrences de glioblastomes (figure 1.14).³⁵ Jusqu'à présent, ces NP sont également en essai clinique pour le traitement du cancer de la prostate et en étude préclinique pour le traitement du cancer du pancréas. Les NP sont injectées directement au niveau de la tumeur afin d'atteindre une concentration locale élevée en NP (> 1 M en fer). Cette thérapie a été développée par MagForce AG (Berlin, Allemagne), qui a utilisé le premier applicateur de champ magnétique alternatif pour l'homme, le Nanoactivator®. Cet appareil génère un champ magnétique alternatif homogène de 100 kHz.

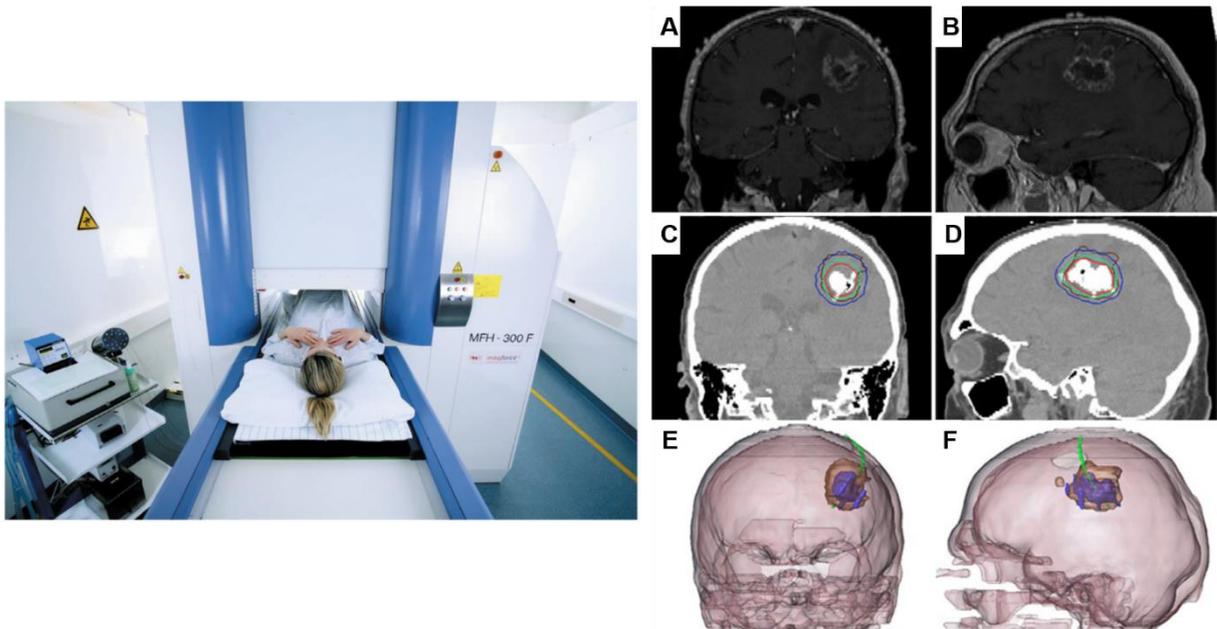


Figure 1.14. Image de gauche : Traitement anticancéreux par hyperthermie magnétique après injection intratumorale des NP NanoTherm® à l'aide de l'applicateur à champ magnétique alternatif MFH 300F®. Image de droite : Clichés A et B : IRM cérébrale avant traitement d'un patient présentant une récurrence de glioblastome. Clichés C et D : Tomographies assistées par ordinateur montrant des dépôts de NPM comme zones hyperdenses. Les lignes isothermes indiquent les températures de traitement calculées entre 40 °C (bleu) et 50 °C (rouge). La ligne marron représente la zone tumorale. Clichés E et F : Reconstruction 3D de l'IRM et de la tomographie assistée par ordinateur fusionnées montrant la tumeur (marron), le fluide magnétique (bleu) et le cathéter de thermométrie (vert). Images d'après Maier-Hauff *et al.*³⁵

1.4.2. Les nanoparticules de silice

Deux types de NP à base de silice sont particulièrement intéressantes pour les applications biomédicales : les NP de silice mésoporeuse et les NP cœur-coquilles.

Nanoparticules de silice mésoporeuse (MSN)

Les nanoparticules de silice mésoporeuses ont suscité un grand intérêt en tant que vecteur de médicaments. Elles présentent une surface spécifique extrêmement importante les rendant particulièrement intéressantes pour le transport de molécules actives. Elles sont constituées de pores de taille variable (pores de 2 à 50 nm) organisés en réseau, entourés d'une charpente de silice. Les MSN ont également démontré une bonne biocompatibilité et biodégradabilité.^{36,37} La fonctionnalisation de la surface de la silice permet également d'améliorer la stabilité colloïdale des NP dans les milieux biologiques complexes, élargissant la gamme de leur utilité pour différentes

applications.³⁸ La littérature concernant les MSN est foisonnante, on peut citer à titre d'exemple les travaux de Meng *et al.*, dans lesquels ils ont fonctionnalisé des NP de silice mésoporeuses permettant d'administrer efficacement un agent thérapeutique, la doxorubicine (figure 1.15). La surface des particules a été fonctionnalisée avec des phosphonates permettant la liaison électrostatique de la doxorubicine à l'intérieur des pores, d'où la molécule peut être libérée par acidification du milieu. Pour améliorer la sensibilité de cet agent thérapeutique lors de l'incubation avec une lignée cellulaire cancéreuse (KB-V1) résistante aux médicaments, les phosphonates ont été utilisés pour greffer un polymère cationique, le polyéthylène imine (PEI), permettant de lier et de libérer des siRNA supprimant l'expression d'un gène codant pour la glycoprotéine P responsable de la résistance multiple aux médicaments.³⁹ L'administration des siRNA a permis d'augmenter les concentrations intracellulaires de doxorubicine et d'observer une cytotoxicité plus élevée dans les cellules KB-V1.

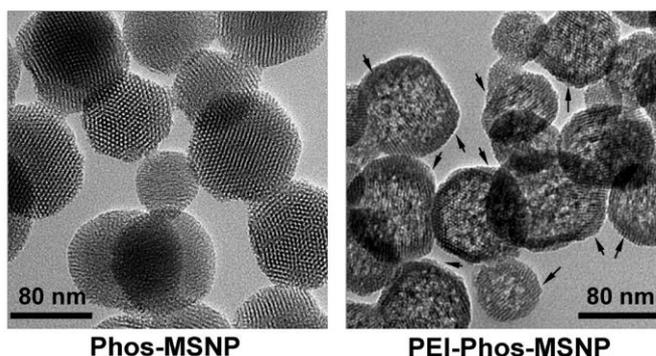


Figure 1.15. Images de microscopie électronique à transmission des MSN synthétisées par Meng *et al.*,³⁹ avant et après revêtement avec le polymère polyéthylène imine (PEI). Les flèches noires indiquent que le polymère se trouve à la surface des MSN mais laisse l'intérieur poreux, accessible à la doxorubicine.

Nanoparticules de silice type cœur-coquille

Le cœur des NP cœur-coquilles peut être constitué d'une grande variété de matériaux (Au, Fe₂O₃, quantum dots) encapsulé dans une coquille de silice. Plusieurs cœurs peuvent également se trouver dans une seule coquille. Les nanoparticules cœur-coquilles présentent des avantages majeurs par rapport aux nanoparticules simples dans les applications biologiques. Elles permettent souvent d'obtenir une cytotoxicité plus faible, une biocompatibilité plus élevée, une meilleure capacité de conjugaison avec des molécules bioactives et une meilleure stabilité chimique. Dans de nombreux cas, le

matériau d'intérêt peut être difficile à conjuguer avec un type particulier de biomolécules, et l'enrobage avec de la silice va permettre de résoudre ce problème. Dans le cas des oxydes de fer, la chimie de surface ne permet pas de faire facilement de liaisons covalentes.⁴⁰ Une alternative pour surmonter cette limitation tout en conservant les propriétés magnétiques des NP d'oxyde de fer, est de les encapsuler dans des coquilles de silice. La surface de silice est facilement fonctionnalisable, non toxique et peut protéger les NP magnétiques de l'oxydation. Horny *et al.* ont synthétisé des nanoparticules d'oxyde de fer ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) recouvertes d'une couche de silice fonctionnalisée par des chaînes de polyéthylène glycol, pour améliorer la stabilité, et par des groupes amine pour permettre le greffage de duplexes d'ADN par couplage EDC/NHS. Ils ont ensuite démontré que les duplexes d'ADN se dissociaient en surface des NP sous hyperthermie magnétique, preuve d'un chauffage local à 55 °C, alors que la température de la solution reste constante à 28 °C. Ce travail peut être considéré comme une preuve de concept pour une libération d'ADN à température ambiante par hyperthermie magnétique.⁴¹ De la même façon, Nallathamby *et al.* ont préparé des nanoparticules cœur-coquilles d'or sphériques ou de forme allongée, contenant une coquille de silice encapsulant un fluorophore (figure 1.16). Cette coquille de silice fluorescente a permis de greffer covalamment des immunoglobulines G (IgG), également par couplage peptidique pour obtenir un système robuste de sonde d'imagerie pour l'immunociblage.⁴²

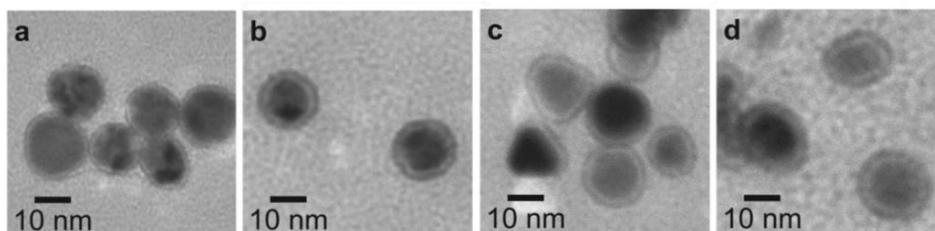


Figure 1.16. Images de microscopie électronique à transmission de nanoparticules de type cœur-coquilles synthétisées par Nallathamby *et al.*⁴² comportant des nanoparticules d'or enrobées de silice. Différentes épaisseurs de silice ont été préparées par la méthode Stöber. Le noyau d'or et l'enveloppe de silice sont visiblement plus sombres et plus clairs respectivement sur les images.

Dans ces deux exemples, la couche de silice s'est avérée cruciale pour pouvoir fonctionnaliser les NP d'oxyde de fer ou d'or pour leurs applications biologiques.

1.5. Différentes stratégies de greffage des biomolécules sur les nanoparticules

Différentes méthodes ont été employées pour greffer des ligands ou des molécules actives à la surface des nanoparticules. Ces conjugaisons peuvent se faire *via* des liaisons non covalentes ou covalentes. Les liaisons non covalentes de molécules se font par association physique (électrostatique, liaisons hydrogène) à la surface des nanoparticules, elles ont l'avantage d'éviter d'avoir à fonctionnaliser les molécules d'intérêt (ligands, médicaments) par des groupements réactifs spécifiques. Cependant, les molécules sont alors faiblement liées à la surface des nanoparticules, pouvant conduire à un relargage anticipé, par exemple pendant l'administration. De plus, cette stratégie n'offre que peu de contrôle sur la quantité et l'orientation de greffage des molécules. A l'inverse, les stratégies de liaison covalente se sont avérées efficaces pour obtenir un comportement contrôlé des molécules sur des cibles spécifiques. Généralement, la modification de surface initiale des NP permet de les stabiliser tout en ajoutant des groupements chimiques fonctionnels, qui permettront ensuite de greffer les molécules d'intérêt à leur surface. Plusieurs stratégies ont été utilisées pour la conjugaison de molécules aux NP de manière covalente, le choix de la chimie utilisée dépendant en particulier de la nature de la molécule à greffer. Les stratégies de synthèse de NP fonctionnalisées ont grandement bénéficié des avancées récentes en chimie de conjugaison. Les réactions de ligation chimiosélectives (par exemple ligation thiol-maléimide, formation de pont disulfure) et réactions de chimie click détaillées dans le chapitre ci-dessous sont maintenant très utilisées pour la conjugaison de biomolécules (peptides, protéines, acides nucléiques, sucres), en particulier sur les NP.⁴³

1.5.1. La chimie click

Le concept de « chimie click » a été proposé pour la première fois par Sharpless *et al.* en 2001.⁴⁴ Les réactions de chimie click doivent répondre à un certain nombre de critères, elles doivent être simples à mettre en œuvre et être chimiosélectives. Elles doivent conduire à un rendement élevé, avec formation d'une quantité faible de sous-produits cytotoxiques.⁴⁵ De plus, les réactions par chimie click doivent pouvoir se produire dans des conditions physiologiques et les liaisons chimiques qui en résultent doivent être

irréversibles. Certaines réactions de chimie click sont bio-orthogonales. Le terme de chimie bio-orthogonale a été inventé par Carolyn R. Bertozzi en 2003 pour désigner une réaction chimique qui peut être réalisée en milieu biologique ou au sein de systèmes vivants. Les entités impliquées doivent réagir ensemble de façon sélective, et ne pas présenter de réactivité vis-à-vis des fonctions chimiques présentes dans les systèmes biologiques.⁴⁶

Bien que l'ensemble des critères qui s'appliquent aux réactions de chimie click ou bio-orthogonales ne soit pas forcément requis pour la fonctionnalisation *in vitro* de NP, ces réactions se sont avérées très utiles dans ce domaine. Elles permettent en effet de greffer des biomolécules (peptides, sucres, acides nucléiques) sur les NP sans avoir recours à des groupements protecteurs, simplifiant énormément la procédure.

Pour répondre aux exigences de la bio-orthogonalité, un certain nombre de réactions chimiques ont été développées, montrant une bonne biocompatibilité et une bonne sélectivité dans les systèmes vivants. Quelques exemples de réactions bio-orthogonales sont représentés figure 1.17. Les premières fonctionnalités explorées comme fonctions bio-orthogonales étaient les cétones et les aldéhydes. En condition acide (pH 4-6), leurs groupes carbonyle réagissent avec des nucléophiles puissants tels que les hydrazines et alcoxyamines.

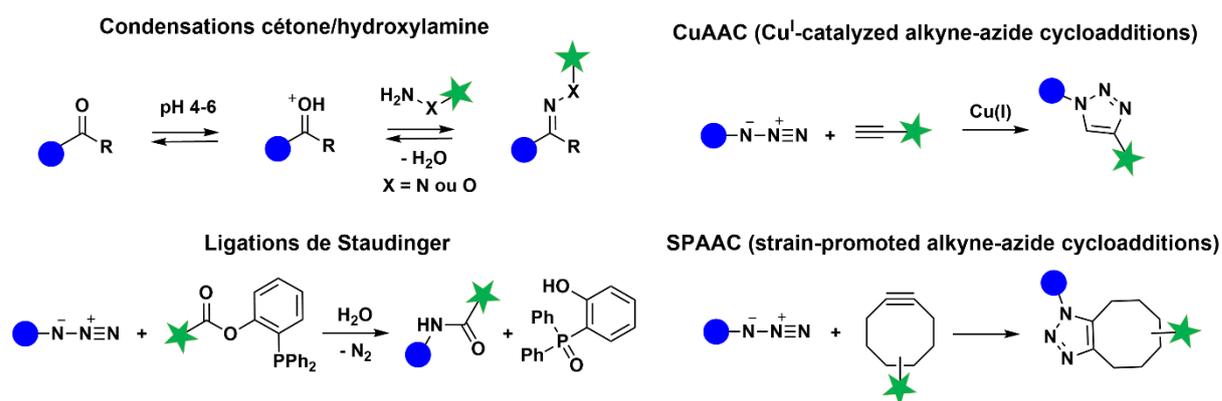


Figure 1.17. Exemples de réactions bio-orthogonales. Le rond bleu et l'étoile verte peuvent représenter des biomolécules ou des nanoparticules.

Une fonctionnalité essentiellement absente des systèmes biologiques et véritablement orthogonale dans sa réactivité vis-à-vis de la plupart des fonctionnalités biologiques est

le groupe azoture. Des protéines modifiées avec un azoture ont été conjuguées à des composés fonctionnalisés par des phosphines par ligation de Staudinger. Les azotures peuvent également réagir avec les alcynes terminaux dans les cycloadditions [3 + 2], catalysées par le cuivre (I). Cette réaction de chimie click nommée CuAAC (Copper(I)-catalysed Azide-Alkyne Cycloaddition) se déroule plus rapidement que la réaction de Staudinger en condition physiologique, cependant, le Cu(I) peut être toxique pour les systèmes vivants.^{47,48} Une version de réaction click ne nécessitant pas de catalyse par le cuivre a été développée par Agard *et al.* en 2004, cette cycloaddition [3 + 2] azoture-alcyne est favorisée par la contrainte stérique de l'alcyne impliqué (Strain Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition, SPAAC). Elle a été appliquée avec succès sur cellules vivantes, sans cytotoxicité induite (figure 1.17).⁴⁹ La SPAAC utilise une cyclooctyne capable de réagir spontanément avec un azoture organique pour générer un triazole stable. L'inconvénient de la première réaction SPAAC développée (utilisant une cyclooctyne non substituée) était sa faible vitesse de réaction. Pour résoudre ce problème, le développement de cyclooctynes modifiées a été entrepris, et a abouti notamment à la découverte de la 4-dibenzocyclooctynol (DIBO), de la dibenzoazacyclooctyne (DIBAC ou DBCO) et de la bicyclo[6.1.0]nonyne (BCN) (figure 1.18). En plus d'augmenter la vitesse de réaction, le BCN et le DBCO ont une solubilité élevée dans l'eau et une faible affinité pour les protéines sériques telles que l'albumine. De plus, la chimie click sans cuivre utilisant les cyclooctynes modifiées a une très faible toxicité et est largement reconnue comme une méthode d'ingénierie cellulaire utile.⁴⁸

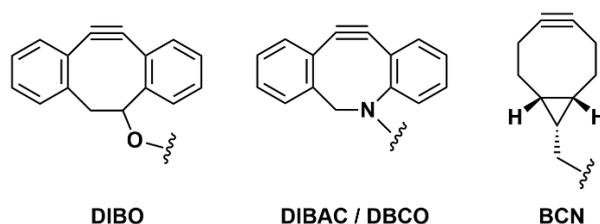


Figure 1.18. Exemples de cyclooctynes modifiées pour la SPAAC.

1.5.2. Exemples de nanoparticules fonctionnalisées de manière covalente

De nombreux exemples de fonctionnalisation de NP sont présents dans la littérature. Une grande variété de réactions de greffage covalent est possible en fonction des systèmes utilisés. Par exemple, Perillo *et al.* ont, dans un premier temps, silanisé des NP d'oxyde de

fer (de 8 nm de diamètre) permettant l'introduction de fonctions amine et chaînes PEG à leur surface avant d'assembler les NP avec une cyanine, par couplage EDC/NHS *via* les groupements amine. Cette fonctionnalisation leur permettra de visualiser la présence des NP dans les cellules par microscopie de fluorescence. Les auteurs ont ensuite modifié l'extrémité C-terminale du peptide gH625 avec une cystéine, pour le greffer de manière covalente aux fonctions maléimide présentes sur les chaînes PEG qui entourent les NP (figure 1.19).⁵⁰ Ces NP fonctionnalisées peuvent ensuite être utilisées pour l'administration de molécules actives, pour l'imagerie ou pour l'hyperthermie magnétique. Ils ont démontré que plusieurs réactions bio-orthogonales peuvent être réalisées sur les NP, permettant le greffage de différentes molécules de façon contrôlée.

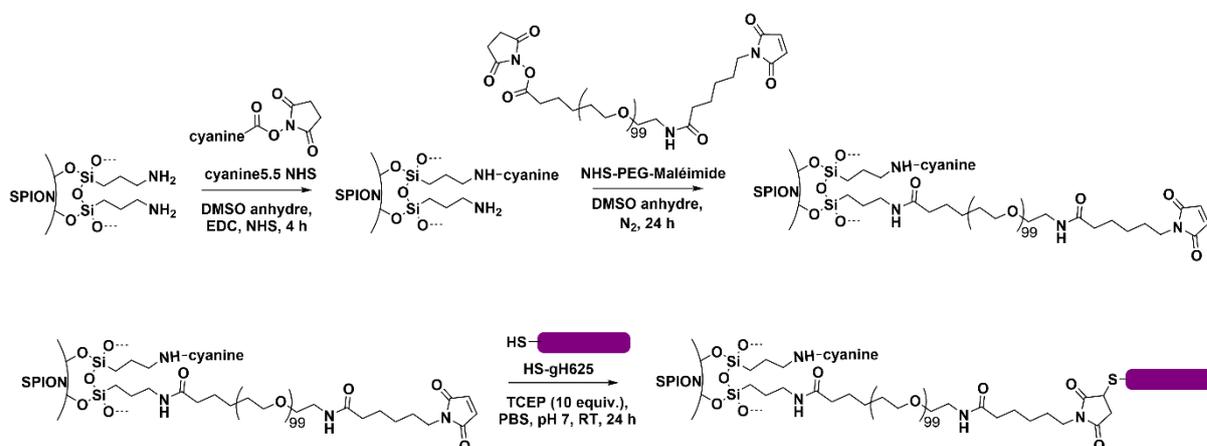


Figure 1.19. Représentation de la fonctionnalisation de surface des NP d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPION) de Perillo *et al.*,⁵⁰ leur PEGylation et leur liaison avec le peptide gH625.

Une autre méthode de greffage de molécules sur les nanoparticules a été utilisée par Wang *et al.* Les auteurs ont synthétisé des NP d'or contenant des azotures à leur surface et ont modifié le peptide RGD par une cyclooctyne, le DBCO, permettant la conjugaison du peptide sur les NP par chimie click sans cuivre (SPAAC) (figure 1.20). Ce système pourra être exploité comme agent de contraste en imagerie pour le diagnostic précoce de cancer ou pour le transport ciblé de principes actifs.⁵¹

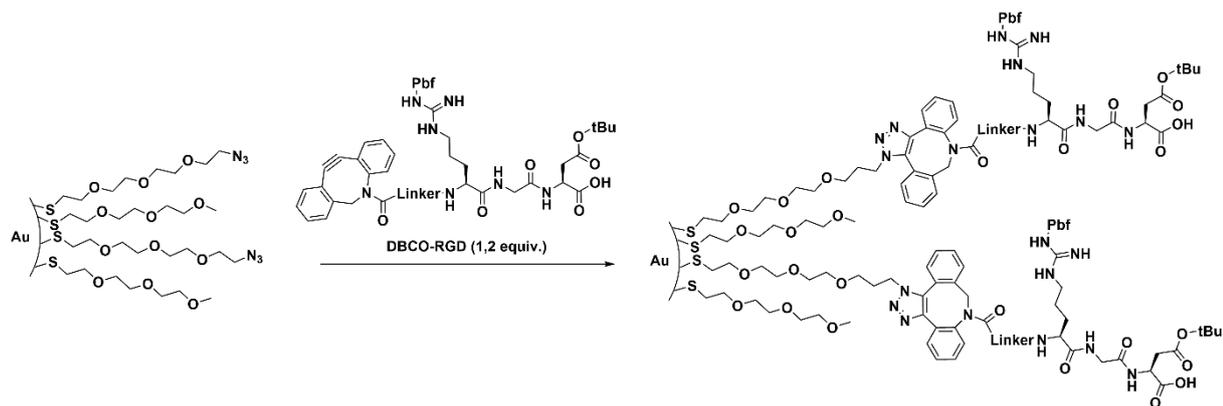


Figure 1.20. Greffage du peptide DBCO-RGD sur les NP d'or fonctionnalisées avec un azoture *via* SPAAC, d'après Wang *et al.*⁵¹

La libération du principe actif ou de molécules peut également être régulée par un lien clivable. Les stimuli pour déclencher le clivage des molécules peuvent être exogènes (lumière, température, champ magnétique, ultrasons) ou endogènes (activité enzymatique, microenvironnement tissulaire ou cellulaire). Parmi les liaisons sensibles à un stimulus endogène, les liaisons disulfures ont été très étudiées car elles peuvent être réduites par le glutathion présent dans le cytosol des cellules. Ce type de liaison est applicable à plusieurs vecteurs tels que les peptides, les anticorps ou nanoparticules. Wang *et al.* ont greffé par liaison disulfure la doxorubicine, à la surface des NP cœur-coquilles de poly-L-lysine contenant un cœur d'argent. Ils ont montré que la molécule active était libérée dans les cellules après clivage du lien disulfure en présence de glutathion et du désassemblage des poly-L-lysines.⁵²

1.6. Mécanismes et méthodes d'entrée des nanoparticules dans les cellules

Les NP doivent franchir la membrane plasmique pour atteindre l'intérieur de la cellule. Il est donc important de comprendre comment elles interagissent avec la membrane et pénètrent dans les cellules, car les voies d'internalisation déterminent le destin intracellulaire des NP et la réponse biologique d'une cellule. L'endocytose est la voie d'internalisation majoritaire des nanoparticules pour entrer dans les cellules.¹³

1.6.1. Les voies d'endocytose

Les différentes voies d'internalisation par endocytose ont déjà été détaillées dans la partie 1.2. Lors de l'endocytose, les NP sont dans un premier temps confinées dans des vésicules intracellulaires, telles que des endosomes, des phagosomes ou des macropinosomes, et n'ont donc pas d'accès direct et immédiat au cytosol ou aux autres organites cellulaires tels que le noyau ou les mitochondries.⁵³ Néanmoins, les voies d'entrée dans les cellules sont souvent multiples et simultanées pour un même type de NP. La contribution relative de ces voies dépend de la nature des NP et de certains facteurs, tels que leur chimie de surface, leur taille et forme, mais aussi de facteurs biologiques, tels que le type cellulaire ou leur microenvironnement.

Le devenir intracellulaire des NP d'oxyde de fer a fait l'objet de nombreuses études. Par exemple, Perillo *et al.* ont étudié leur localisation en microscopie électronique après 30 minutes d'incubation avec des cellules cancéreuses (figure 1.21). D'après leurs images, les nanoparticules sont endocytées et se trouvent à l'intérieur de vésicules entourées d'une membrane.⁵⁰

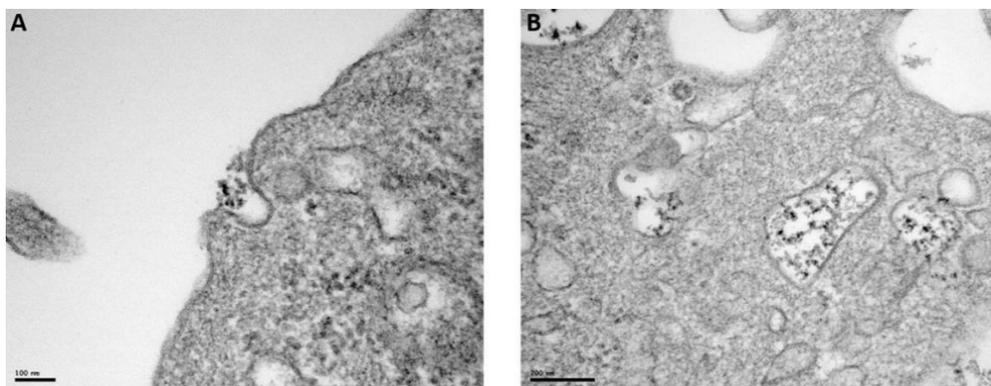


Figure 1.21. Images de microscopie électronique à transmission des NP d'oxyde de fer (Perillo *et al.*⁵⁰) incubées pendant 30 min avec des cellules cancéreuses MDA-MB-231.

Un autre exemple d'étude de l'internalisation de nanoparticules a été réalisé par Wang *et al.* Ils ont incubé des nanoparticules de ferrites mixtes $Zn_{0,5}Fe_{2,5}O_4$ enrobées dans une couche de silice type cœur-coquille avec des cellules d'ostéosarcome humain. Les images de microscope électronique à transmission obtenues sont représentées sur la figure 1.22. Les nanoparticules, chargées négativement, se trouvent localisées dans les endo-

lysosomes après 2 et 24 heures d'incubation, indiquant également une internalisation *via* endocytose.⁵⁴

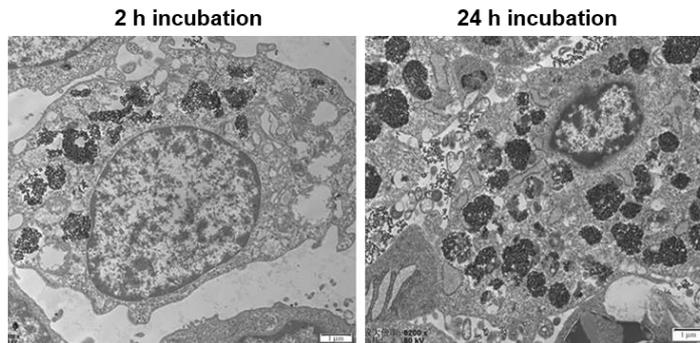


Figure 1.22. Images de microscopie électronique à transmission après 2 h et 24 h d'incubation de cellules d'ostéosarcome humain avec les nanoparticules $Zn_{0,5}Fe_{2,5}O_4/SiO_2$ synthétisées par Wang *et al.*⁵⁴

Certaines NP métalliques peuvent induire une accumulation d'autophagosomes dans les cellules. Par exemple, Ma *et al.* ont rapporté que les nanoparticules d'or sont internalisées dans les cellules par endocytose et qu'elles finissent par s'accumuler dans les lysosomes provoquant une altération de leur capacité de dégradation conduisant à une augmentation d'autophagosomes. Ils ont également montré que l'accumulation d'autophagosomes induite par les nanoparticules d'or dépendait de leur taille. Les NP d'or plus grandes engendrent une quantité d'autophagosomes plus importante dans les cellules (figure 1.23).⁵⁵

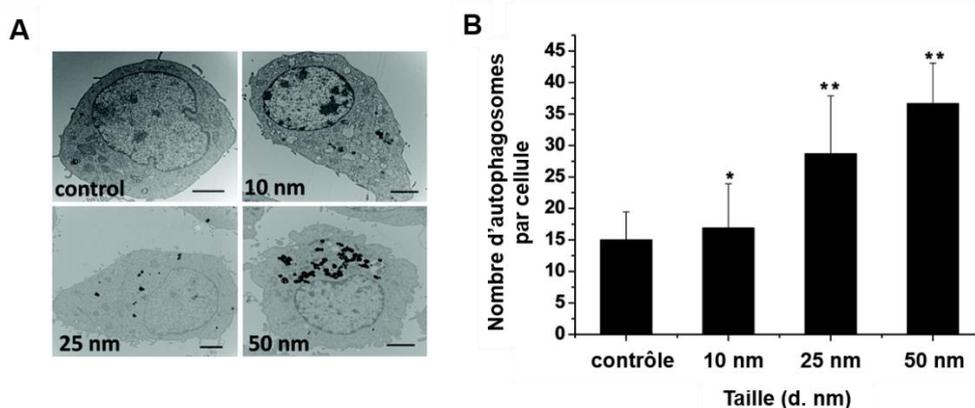


Figure 1.23. A) Images de microscopie électronique à transmission après incubation pendant 24 h de cellules NRK avec les nanoparticules d'or de diamètres 10, 25, ou 50 nm synthétisées par Ma *et al.*⁵⁵ Les nanoparticules sont internalisées dans les cellules par endocytose et piégées dans les lysosomes. B) Analyse statistique du nombre d'autophagosomes par cellules après 24 h d'incubation des nanoparticules d'or avec les cellules NRK.

1.6.2. Voies d'entrée et stratégies d'administration cytosolique des nanoparticules

Bien que les différents mécanismes d'endocytose discutés jusqu'à présent soient largement reconnus pour être les principaux processus par lesquels les NP pénètrent dans les cellules, d'autres mécanismes d'entrée ont également été rapportés, comme la diffusion passive et, pour les liposomes, la fusion lipidique (figure 1.24).¹³

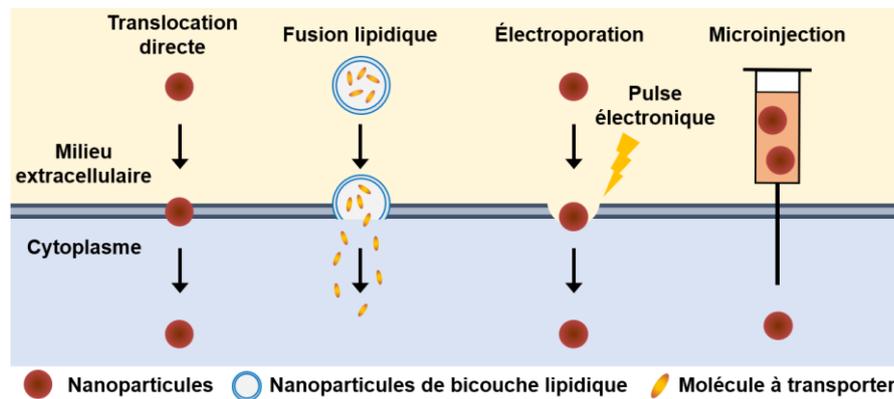


Figure 1.24. Aperçu schématique des voies et stratégies d'administration cytosolique des nanoparticules.

Wang *et al.* ont développé des nanoparticules de type quantum-dots d'environ 8 nm capables de pénétrer la membrane plasmique des globules rouges par un processus de pénétration passive, non endosomale. Ils ont démontré que les interactions des quantum-dots zwitterioniques avec la membrane plasmique permettent la pénétration des NP sans affecter l'intégrité globale de la membrane (figure 1.25).⁵⁶

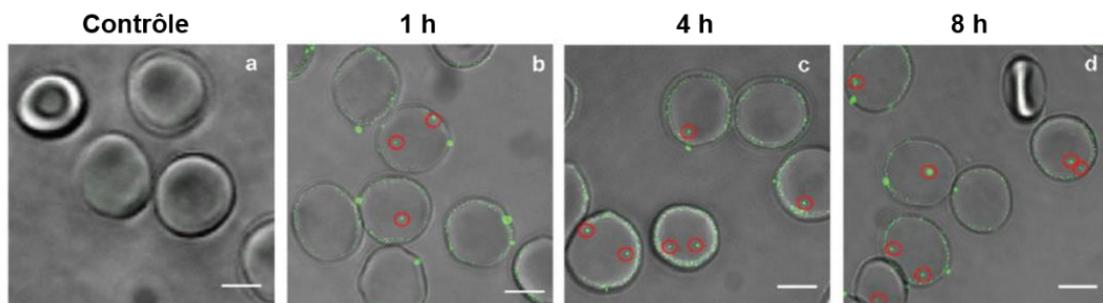


Figure 1.25. Images de microscopie confocale (superposition d'images en lumière blanche et en fluorescence) de l'internalisation des quantum-dots avec les globules rouges d'après Wang *et al.*⁵⁶ Les globules rouges ont été incubés avec du PBS (a) comme contrôle, et avec 10 nM de quantum-dots pendant 1 h (b), 4 h (c), et 8 h (d). Les quantum-dots sont représentés en vert. Les ronds rouges représentent les quantum-dots se trouvant à l'intérieur des globules rouges. Barres d'échelle : 5 µm.

L'entrée dans les cellules par diffusion passive est assez rare pour les NP. Ce type de mécanisme dépend de la taille, la forme, la charge et la surface des NP.^{57,58} La translocation directe (perturbation de la membrane plasmique) a été très étudiée avec les peptides pénétrants (cell-penetrating peptides, CPP). Les différents modèles de translocation directe seront développés plus tard dans le manuscrit. Les nanoparticules peuvent également être composées de gouttelettes lipidiques, appelées liposomes fusogènes. Ces liposomes possèdent une composition lipidique particulière leur permettant de fusionner avec la membrane plasmique des cellules.⁵⁹ Après fusion, le contenu encapsulé (protéines, nucléotides, petites molécules, composés bioactifs) est délivré directement dans le cytosol.^{60,61} Kim *et al.* ont développé des liposomes fusogènes contenant des nanoparticules de silicium poreux. Les images de microscopie électronique à transmission obtenues confirment la fusion des liposomes fusogènes avec la membrane plasmique des cellules qui s'accompagne de la libération des nanoparticules de silicium dans le cytosol. Au contraire, les liposomes non fusogènes sont endocytés et les nanoparticules se retrouvent piégées dans les endosomes (figure 1.26).⁶⁰

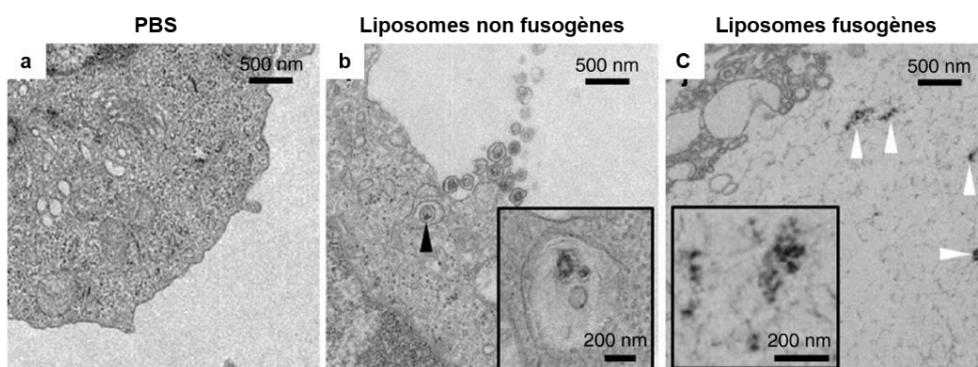


Figure 1.26. Images de microscopie électronique à transmission de macrophages murins après 10 min d'incubation avec du PBS comme contrôle (a), avec les liposomes non fusogènes (b), avec les liposomes fusogènes (c), d'après Kim *et al.*⁶⁰ La flèche noire correspond aux nanoparticules à l'intérieur d'un endosome, les flèches blanches montrent les NP dans le cytosol.

L'électroporation et la microinjection sont des exemples de méthodes physiques permettant également d'atteindre le cytosol, et sont illustrés figure 1.24. L'électroporation correspond à l'utilisation d'impulsions électriques pour perturber la membrane plasmique, ce qui permet aux NP de pénétrer directement dans le cytosol. Les pores formés lors de l'électroporation possèdent un diamètre compris entre 20 et 200 nm. Zu *et al.* ont par exemple montré que l'efficacité à délivrer des plasmides d'ADN est

meilleure en présence des nanoparticules d'or après électroporation dans des cellules leucémiques.⁶² La deuxième méthode physique utilisée est la microinjection, consistant à percer la membrane plasmique avec une aiguille microscopique pour injecter des NP directement dans le cytoplasme, évitant le piégeage dans les endosomes. La microinjection est particulièrement invasive et difficilement transposable aux études *in vivo*, et ne peut être utilisée que sur un nombre restreint de cellules lors des études *in vitro*. Raudzus *et al.* ont microinjecté des nanoparticules magnétiques de type cœur-coquille fonctionnalisées par des ligands pour capturer des protéines cytosoliques dans des neurites, et étudier le rôle de ces protéines dans la croissance des neurones.⁶³ Dans cet article, ils ont utilisé également une autre méthode physique, le « scrape-loading » en anglais, consistant en un raclage des cellules avec une solution contenant les NP pour leur permettre d'atteindre le cytosol.⁶³

1.6.3. Paramètres physico-chimiques influençant les mécanismes d'entrée cellulaire

Il est possible de modifier les interactions NP-cellule et la voie d'internalisation en jouant sur certains paramètres physicochimiques des NP comme leur taille, leur forme et leur surface.

Influence de la taille et de la forme des NP

Les propriétés physicochimiques des NP, telles que le diamètre hydrodynamique et la forme, ont un impact direct sur leur adhésion à la membrane et leur diffusion.⁶⁴ Par exemple, des NP polymères ayant la même chimie de surface mais une morphologie variable présentent des voies d'internalisation différentes à travers la membrane plasmique. Il a été montré que les NP en forme de bâtonnet diffusent plus efficacement à travers la membrane plasmique que les NP sphériques.⁵⁷ Jiang *et al.* ont utilisé des NP d'or sphériques de 2 à 4 nm de diamètre fonctionnalisées par des ligands zwitterioniques et ont montré dans ce cas une diffusion directe à travers la membrane plasmique de cellules HeLa. Lorsque le diamètre des NP d'or augmente (environ 6 nm), les auteurs observent l'internalisation de ces NP par endocytose dépendante de la cavéoline, indiquant un impact de la taille des NP sur l'internalisation cellulaire.⁶⁵ Bien que l'importance de la taille des NP dans les interactions et absorptions cellulaires soit bien établie, les données

rapportées suggèrent qu'il y a beaucoup plus de paramètres et de variables en jeu qui affectent l'entrée dans les cellules, tels que le type cellulaire, le taux de sédimentation des NP, la densité et la morphologie des NP.^{66,67}

Rôle de la charge de surface des NP

Les NP peuvent être synthétisées avec une charge de surface positive, négative ou neutre. La charge de surface des NP en solution est généralement estimée par la mesure du potentiel zêta. Ce potentiel correspond au potentiel électrocinétique d'une dispersion colloïdale de NP. Expérimentalement, le potentiel zêta est quantifié par des mesures de mobilité électrophorétique pour des dispersions colloïdales dans des milieux aqueux. Le potentiel zêta des NP est dynamique et peut changer considérablement en réponse aux conditions physicochimiques (pH, force ionique).⁶⁸ La charge de surface des NP affecte leur capacité d'interaction, leur affinité pour la membrane plasmique, et ceci a un impact sur leur absorption cellulaire. Les NP cationiques sont plus susceptibles d'être attirées électrostatiquement par la membrane plasmique, car elle présente à sa surface des sucres porteurs de fonctions anioniques (carboxylates, sulfates), ce qui entraîne généralement une accumulation accrue des NP cationiques à l'intérieur des cellules.⁶⁵ Cependant, plusieurs études ont démontré que les NP avec des charges de surface négatives peuvent également franchir efficacement la membrane plasmique et s'accumuler dans les cellules.⁶⁹

Nature des ligands en surface

Le polyéthylène glycol (PEG) est un polymère avec une hydrophilie et une neutralité électrique unique. Le revêtement de la surface des NP avec du PEG, ou « PEGylation » est une approche couramment utilisée pour améliorer les propriétés biophysiques et chimiques des NP. De plus, les chaînes PEG permettent d'améliorer l'efficacité de l'administration de médicaments et de molécules aux cellules et tissus cibles. En effet, les revêtements PEG des NP les protègent de l'agrégation et de l'opsonisation, empêchant les opsonines de se lier à leur surface. Ceci limite leur phagocytose par les macrophages, et prolonge ainsi leur temps de circulation systémique.⁷⁰ Les propriétés pharmacocinétiques des NP peuvent être considérablement améliorées tandis que leur toxicité peut être drastiquement diminuée grâce à ce revêtement. Le PEG à la surface des

NP est également responsable de la stabilité colloïdale par répulsion stérique. Cette répulsion augmente avec la longueur des chaînes PEG, évitant l'agrégation des NP. Le PEG est devenu le polymère le plus utilisé dans le domaine de recherche biomédical.^{71,72} Néanmoins, il existe actuellement des lacunes dans la compréhension des interactions entre les groupements PEG et le système immunitaire lors de l'administration de médicaments, en particulier de composés anti-tumoraux.⁷³

La surface des NP peut également être modifiée avec des ligands de ciblage pour permettre une interaction spécifique avec un composant membranaire qui peut être surexprimé dans une pathologie donnée. Ce concept est appelé « ciblage actif ».⁷⁴ Les ligands de ciblage incluent des petites molécules, des peptides, des protéines (anticorps, des fragments d'anticorps) et des acides nucléiques (aptamères) capables de reconnaître et de se lier à un composant spécifique de la membrane cellulaire, comme par exemple un récepteur surexprimé à la surface de cellules tumorales. La modification de surface des NP par ces ligands de ciblage peut augmenter l'interaction cellulaire, activer les voies de signalisation cellulaire en aval conduisant à une réponse biologique souhaitée (par exemple, l'apoptose cellulaire), ou améliorer l'internalisation cellulaire de NP pour délivrer des principes actifs dans les cellules ciblées.⁷⁴

Les NP qui ne présentent pas de ligands de ciblage de surface spécifiques peuvent s'accumuler de manière passive dans les tumeurs. Dans les tissus sains, seules de petites molécules peuvent diffuser à travers les parois des vaisseaux sanguins. La porosité des vaisseaux étant accentuée au niveau des tumeurs, avec une taille des pores entre 380 et 780 nm, des objets plus gros tels que les macromolécules et les NP peuvent diffuser dans le tissu.⁷⁵ Ces objets peuvent s'accumuler dans la tumeur à des concentrations plus élevées que pour un tissu sain, ce phénomène est appelé l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) (figure 1.27).⁷⁶

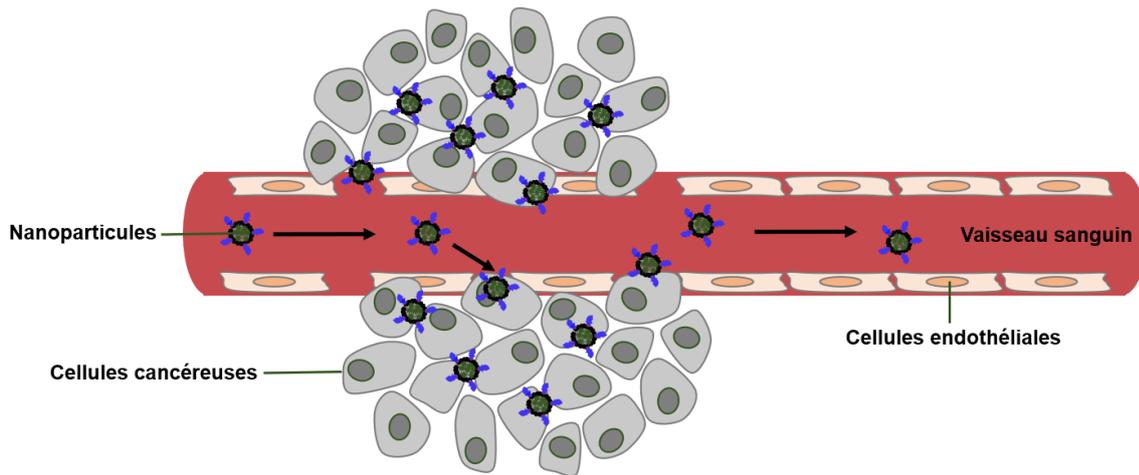


Figure 1.27. Principe de l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention).

Un défi pour les NP de ciblage passif et actif est que leur chimie de surface peut changer lors d'une exposition à un environnement biologique. Par exemple, les NP décorées de ligands peuvent subir une modification de leur capacité de ciblage lors de leur introduction dans la circulation sanguine. L'une des raisons est la formation d'une couronne de protéines due à l'adsorption des protéines sériques (opsonisation). Cette couronne protéique change l'identité synthétique conçue des NP en une identité biologique qui a souvent un impact significatif sur les interactions NP-cellules, et donc potentiellement sur leur efficacité et mécanisme d'internalisation cellulaire.⁷⁷ Dans le plasma humain, les NP sont exposées à des quantités élevées de protéines, ce qui augmente leur taille et le revêtement de surface et peut améliorer leur internalisation ultérieure par les cellules immunitaires.⁷⁸ En revanche, les ligands de ciblage peuvent être enfouis dans la couronne de protéines, ce qui entraîne une réduction ou une perte complète des capacités de ciblage spécifique.⁷⁹

1.7. Applications des nanoparticules magnétiques à l'échelle intracellulaire

Les NP d'oxyde de fer ont été largement appliquées comme vecteurs pour la délivrance de médicaments au cours des deux dernières décennies. Elles ont l'avantage d'être en même temps des agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), de permettre un ciblage magnétique et le suivi simultané de l'efficacité du traitement. Elles peuvent aussi participer au traitement en lui-même en présence d'un champ

magnétique alternatif, grâce à leurs propriétés de chauffage par l'hyperthermie.⁸⁰ De plus, l'utilisation des NPM en biologie cellulaire est depuis longtemps associée à l'étude de la mécano-transduction, c'est-à-dire la conversion d'un stimulus mécanique en un signal électrique ou biochimique.⁸¹ Plus récemment, les nanoparticules magnétiques ont été utilisées pour de la manipulation magnétique intracellulaire. Ces applications sont définies sous le terme « magnétogénétique ». En effet, les nanoparticules magnétiques présentent l'avantage d'avoir un large spectre d'activation possible (mécanique, thermique et biochimique) qui permet d'appliquer un stimulus avec un contrôle spatio-temporel. Qui plus est, ce stimulus ne présente pas de limitation à une transposition *in vivo* puisque les tissus n'absorbent pas les champs magnétiques contrairement à la lumière. Les champs d'application sont nombreux, on peut citer la possibilité d'activer des processus cellulaires complexes tels que la différenciation cellulaire ou la migration orientée qui sont à la base de thérapies cellulaires envisagées pour le traitement des maladies neurodégénératives.^{82,83} L'activation mécanique repose sur l'utilisation de la force magnétique générée par un gradient de champ alors que l'activation thermique est obtenue sous champ magnétique alternatif.

1.7.1. Propriétés des nanoparticules magnétiques pertinentes pour les applications intracellulaires

Les NP d'oxyde de fer de moins de 20 nm de diamètre sont des particules monodomaines, chaque nanoparticule est donc porteuse d'un moment magnétique (flèches blanches sur la figure 1.28), résultant des moments magnétiques atomiques (flèches jaunes sur la figure 1.28). Au sein d'une dispersion, à une température suffisamment élevée et en absence de champ magnétique, les moments magnétiques sont orientés de manière aléatoire en raison de l'agitation thermique, l'aimantation globale, somme des moments magnétiques de la dispersion, est donc nulle. À l'inverse, lorsqu'un champ magnétique externe H est appliqué, les moments magnétiques de chaque NP vont subir une rotation progressive qui va les amener à s'aligner selon la direction de ce champ magnétique, comme représenté figure 1.28. Dans ce cas, l'aimantation globale sera supérieure à celle d'un matériau paramagnétique, d'où le terme superparamagnétique.⁸⁴

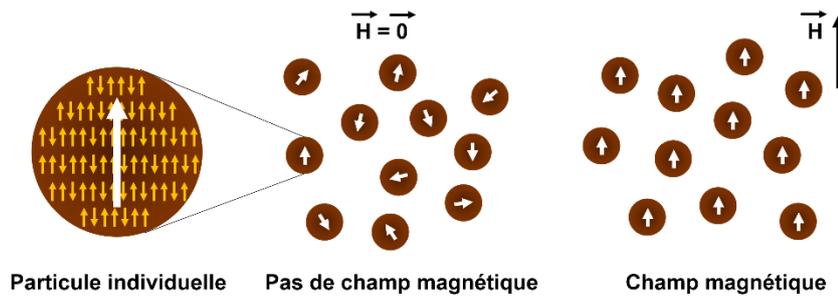


Figure 1.28. Représentation de nanoparticules superparamagnétiques. Les moments magnétiques atomiques (flèches jaunes) et le moment magnétique résultant des particules (flèches blanches) sont représentées.

La courbe d'aimantation d'une dispersion de nanoparticules superparamagnétiques, représentée figure 1.29, présente un plateau correspondant à l'alignement des moments magnétiques dans la direction du champ magnétique appliqué. Ce comportement superparamagnétique a deux conséquences importantes, la saturation est atteinte à des valeurs de champ peu intense (3000 Gauss, 0,3 Tesla) et lorsque le champ est coupé il n'y a pas d'aimantation rémanente. Par conséquent, l'aimantation peut être modulée en intensité et dans le temps.

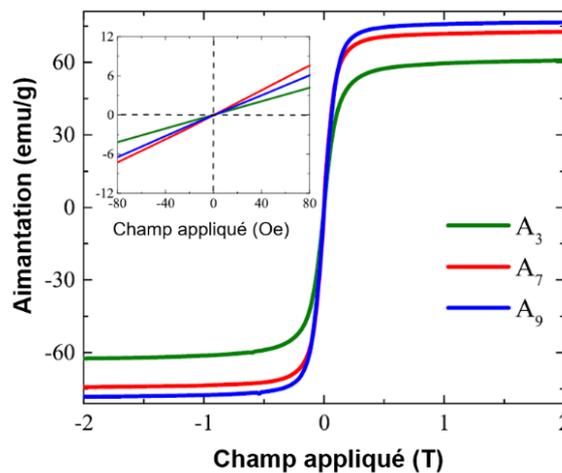


Figure 1.29. Courbe d'aimantation obtenue par Sharifi Dehsari *et al.*⁸⁵ à partir des échantillons de nanoparticules d'oxyde de fer de tailles différentes (A_3 : $8,6 \pm 0,9$ nm ; A_7 : $12,7 \pm 1,2$ nm et A_9 : $14,5 \pm 1,5$ nm).

Force magnétique

Lorsque la saturation est atteinte, le moment magnétique m d'une particule superparamagnétique correspond à $m = m_{sat}$, m_{sat} étant l'aimantation à saturation. La

force F appliquée par un champ magnétique H à cette particule superparamagnétique avec un gradient de champ magnétique ∇H s'écrit alors :

$$F = m_{sat} \cdot \nabla H$$

La force magnétique est donc proportionnelle à l'intensité du gradient de champ magnétique. La force magnétique générée en milieu cellulaire peut varier du femtoNewton (fN) au picoNewton (pN), le gradient pouvant être généré par un simple aimant (par exemple de type neodymium fer bore, NdFeB), par une pointe magnétique ou encore par des systèmes de micro-aimants parallélisés. Le moment magnétique des particules peut aussi être optimisé soit en travaillant avec des particules ayant une plus forte aimantation spécifique soit en utilisant des systèmes renfermant plusieurs particules superparamagnétiques (endosomes magnétiques par exemple).^{63,86-88}

Les NP présentent également l'avantage de pouvoir être suivies en microscopie optique par des marquages fluorescents ou en microscopie électronique grâce au contraste inhérent du matériau inorganique. Cette propriété est particulièrement importante dans le processus du suivi de l'internalisation cellulaire.

Hyperthermie magnétique

L'application d'un champ magnétique alternatif (AMF) aux NPM conduit à la production d'énergie, dissipée sous forme de chaleur, en transformant une énergie électromagnétique en énergie thermique.⁸⁹ Ce phénomène a été décrit par Rosensweig.⁹⁰

Pour les NPM monodomaines, la réorientation des moments magnétiques est gouvernée par deux modes de relaxation, la relaxation de Néel et la relaxation de Brown. La relaxation de Néel provient de la rotation du moment magnétique à l'intérieur des NPM tandis que la relaxation brownienne correspond à la rotation physique des particules entières sur elles-mêmes créant des pertes par frottement avec l'environnement (figure 1.30). Pour les NP de maghémite, de taille inférieure à 15 nm de diamètre, la relaxation de Néel prévaut généralement sur la relaxation Brownienne.^{89,91} De plus, l'agrégation de NPM et la viscosité du milieu peuvent modifier le comportement de chauffage car la rotation mécanique peut être inhibée, ce qui peut considérablement réduire la chaleur

dissipée par relaxation brownienne. De plus, la relaxation de Néel est également impactée par l'agrégation des NP du fait des interactions dipolaires entre elles empêchant la rotation des moments magnétiques et donc limitant la production de chaleur.⁹²

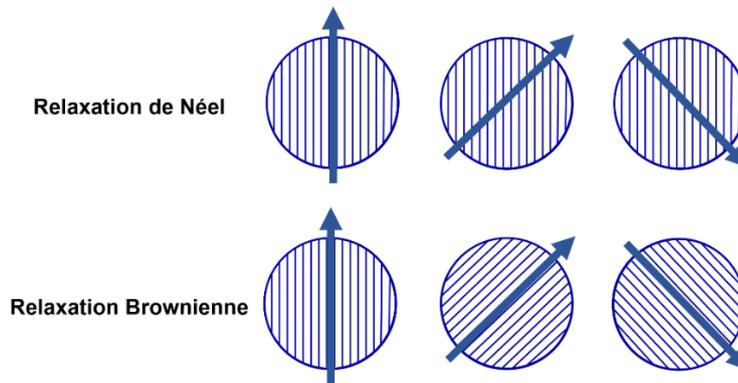


Figure 1.30. Relaxation de Néel et Brownienne. Relaxation de Néel : le moment magnétique tourne tandis que la particule reste fixe. Relaxation Brownienne : le moment magnétique reste fixe par rapport aux axes cristallins pendant la rotation de la particule.

La chaleur libérée lors de l'échauffement magnétique est quantifiée par la puissance de perte spécifique (Specific Loss power, SLP) et est définie comme la puissance électromagnétique délivrée par unité de masse de matériau magnétique, exprimée en watts par gramme (W/g).⁹³ Ce paramètre permet de déterminer l'efficacité de différents systèmes, et est défini suivant la formule :

$$SLP = \frac{\text{Puissance dissipée}}{\text{Masse magnétique}} = \frac{C_p \cdot m_{tot}}{m_{mag}} \cdot \frac{dT}{dt}$$

Avec C_p la capacité thermique spécifique de l'échantillon dans son ensemble ; m_{tot} la masse du matériau générateur de chaleur ; $m_{mag} = \Phi \cdot \rho_{mag} \cdot V$, la masse du matériel magnétique dans l'échantillon (Φ , la fraction volumique du matériel magnétique et $\rho_{mag} = 5,07 \text{ g/cm}^3$, la masse volumique d'oxyde de fer) et (dT/dt) correspond à l'augmentation de température en fonction du temps.

Pour les expériences *in vivo*, il a été défini un critère, connue sous le nom de « critère de Brezovich ». ⁹² Selon ce critère, le produit de l'amplitude du champ (H) par la fréquence (f) doit être inférieur à $4,85 \cdot 10^8 \text{ A/m/s}$. ^{92,94}

1.7.2. Exemples d'applications

1.7.2.1. Hyperthermie magnétique dans les cellules

Di Corato *et al.* se sont intéressés aux mécanismes d'hyperthermie magnétique dans l'environnement cellulaire et en solution en comparant une large gamme de nanomatériaux magnétiques dont les NP de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ présentant différentes tailles et formes (NP sphériques, nanocubes, nanofleurs et liposomes encapsulant des nanoparticules $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Tous les nanomatériaux testés présentent une baisse rapide et systématique de leur capacité de chauffage en conditions cellulaires dès qu'ils s'associent à la membrane cellulaire ou sont internalisés (figure 1.31). La diminution de la SLP (Specific Loss power) est plus importante pour les particules soumises à la relaxation brownienne, ce qui s'explique par le blocage des NP dans l'environnement cellulaire.⁹⁵

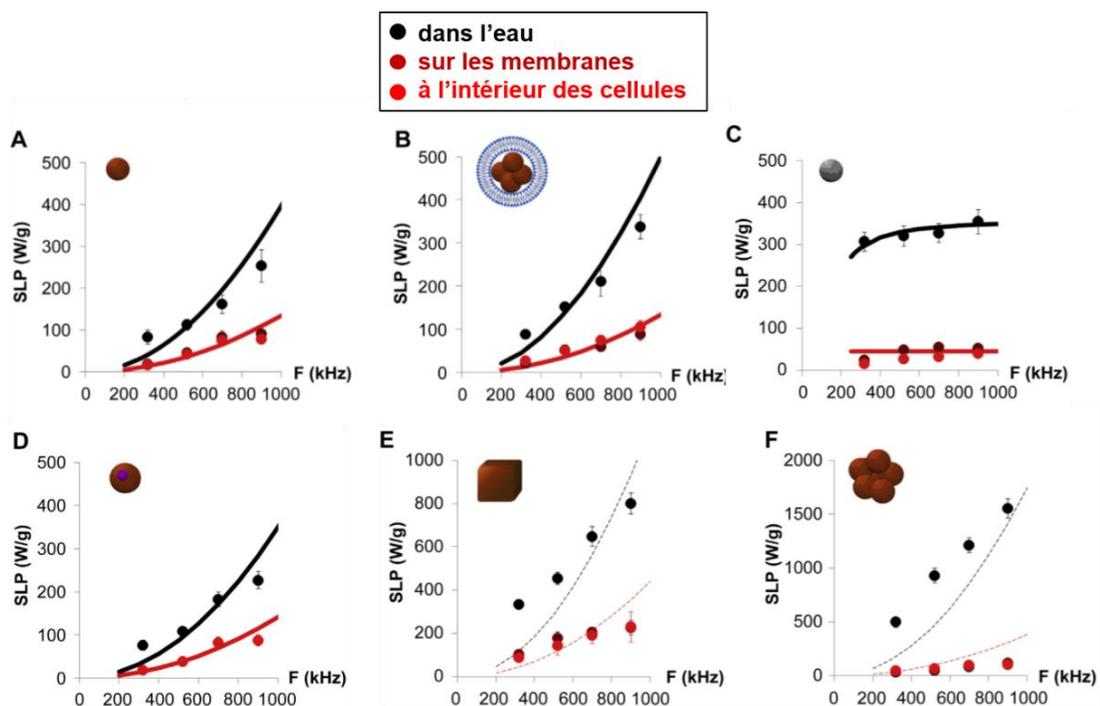


Figure 1.31. Mesure de la capacité de génération de chaleur (en termes de SLP (W/g)) pour différents nanomatériaux (A : NP de maghémite ; B : NP de maghémite dans liposome ; C : NP de ferrite de cobalt ; D : dimères d'oxyde de fer/or ; E : nanocubes d'oxyde de fer ; F : nanofleurs d'oxyde de fer), dans l'eau et au sein de systèmes de modèles cellulaires, selon la fréquence du champ magnétique appliqué. Image adaptée d'après Di Corato *et al.*⁹⁵

Une expérience de visualisation et d'analyse en temps réel des expériences *in vitro* sous champ magnétique alternatif (AMF) a été développée par Connord *et al.* Grâce à un

électroaimant miniaturisé ajusté sous un microscope confocal, les auteurs ont pu analyser en direct les événements moléculaires qui se produisent lors de l'application de l'AMF. En effet, l'AMF induit des dommages massifs aux cellules tumorales ayant incorporé des NP dans leurs lysosomes sans affecter les autres cellules. La perméabilisation de la membrane des lysosomes et la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) sont détectées après seulement 30 minutes d'application de l'AMF, démontrant que les ROS sont générées à un stade précoce de la cascade d'événements conduisant finalement à la mort cellulaire (figure 1.32). Cette approche expérimentale permet de mieux comprendre les processus physiques, moléculaires et biologiques se produisant lors de la combinaison des NPM et des champs magnétiques à haute fréquence.^{96,97}

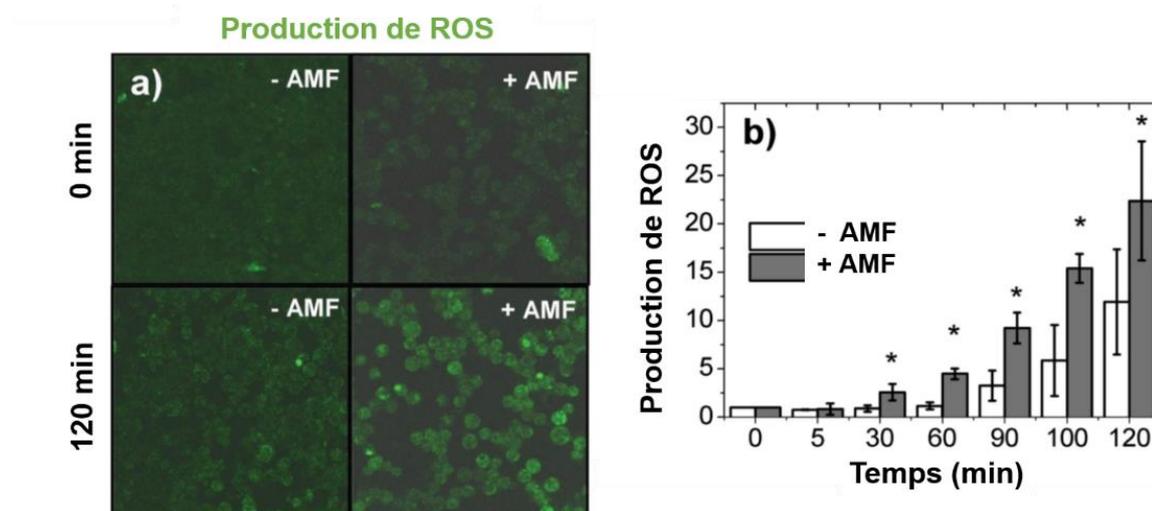


Figure 1.32. L'application d'un champ magnétique sur des cellules adhérentes contenant les NPM développées par Connord *et al.* augmente la production de ROS. Les cellules ayant internalisées les NPM fonctionnalisées ont été rincées et incubées avec le réactif CellROX Green. a) Les images de microscopie confocale montrent la production de ROS (en vert) avant (0 min) et à la fin du traitement AMF (120 min). Le contrôle sans traitement AMF est également montré. b) Avec et sans application de l'AMF, la production de ROS a été mesurée en analysant l'intensité du marquage du réactif CellROX Green des images de microscopie confocale. Analyse statistique réalisée à l'aide du test t de Student (* $p < 0,05$, ** $0,01 < p < 0,05$). Image adaptée de Connord *et al.*⁹⁶

1.7.2.2. Canaux ioniques contrôlés par hyperthermie magnétique

Les techniques optiques basées sur le photocontrôle de l'activité des protéines, utilisant des réactifs photoactivables⁹⁸ ou optogénétiques⁹⁹, ont été très bénéfiques, avec un large éventail d'applications en biologie cellulaire et en neurosciences. Cependant, ces

approches sont limitées par l'incapacité de la lumière visible à pénétrer profondément dans les tissus. Une approche complémentaire pour contrôler à distance les processus biologiques est basée sur la stimulation magnétique, dans laquelle le contrôle magnétique des processus biologiques est médié par des NPM fonctionnalisées. Cette méthode, comparée à l'optogénétique, présente l'avantage d'une grande perméabilité des tissus au champ magnétique contrairement à la lumière et d'une faible interaction entre ce champ magnétique et les molécules biologiques.⁸³ Pour comprendre le traitement neuronal qui gouverne certains comportements animaux, Huang *et al.* proposent en 2010 une approche basée sur le chauffage de NP superparamagnétiques par champ magnétique radiofréquence pour activer à distance les canaux cationiques thermosensibles dans les cellules. Les NP ciblent des protéines spécifiques de la membrane plasmique des cellules exprimant TRPV1, un canal ionique sensible à la température (figure 1.33). Ces NP sont ensuite capables de convertir la stimulation du champ magnétique radiofréquence (1 MHz) en chaleur. De plus, l'utilisation de la fluorescence comme thermomètre à l'échelle du nanomètre, a montré que la chaleur est générée localement sur la membrane sans chauffage cytoplasmique. L'activation thermique des canaux déclenche des potentiels d'action dans les neurones en culture sans effets toxiques observables. Cette approche peut être adaptée pour stimuler d'autres types de cellules et, en outre, peut être utilisée pour manipuler à distance d'autres processus cellulaires afin d'accéder à de nouvelles thérapies.⁸²

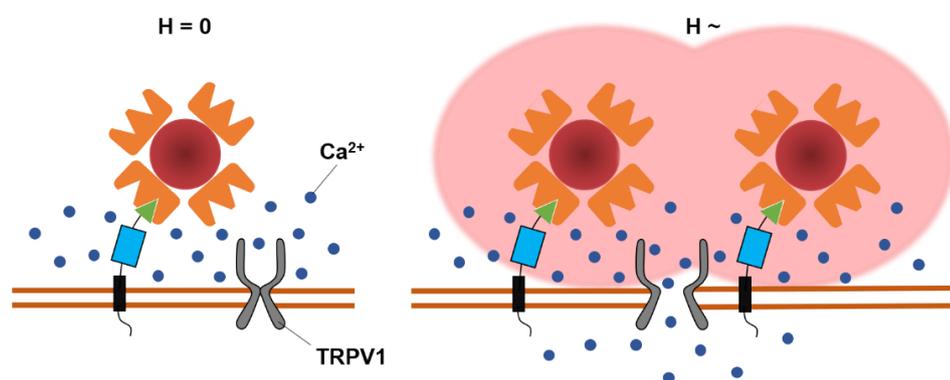


Figure 1.33. Principe de la stimulation des canaux ioniques utilisant le chauffage par les nanoparticules et la détection locale de température. Huang *et al.*⁸² utilisent le chauffage local (rose) de NP superparamagnétiques (marron) recouvertes de streptavidine (orange) grâce à la stimulation magnétique par un champ magnétique radiofréquence ($H \sim$), qui induit l'ouverture du canal ionique TRPV1 sensible à la température.

1.7.2.3. Activation et contrôle des voies de signalisation

De nombreuses fonctions cellulaires reposent sur l'activité coordonnée des voies de signalisation à une échelle subcellulaire. Cependant, peu d'outils sont capables de sonder et perturber les voies de signalisation avec une résolution spatiale correspondant aux dimensions intracellulaires. Une approche magnétogénétique basée sur l'autoassemblage de complexes de signalisation à la surface de NPM fonctionnalisées à l'intérieur de cellules vivantes a été développée par Etoc *et al.* Les NP d'oxyde de fer ont d'abord été fonctionnalisées en solution avec un ligand HaloTag biotinylé avant d'être microinjectées dans des cellules exprimant la protéine d'intérêt fusionnée à la protéine HaloTag (figure 1.34). Les protéines cibles ont donc été sélectivement capturées à la surface des NPM. Les auteurs ont appliqué cette stratégie à des Rho-GTPases (Cdc42 et Rac1), connues pour réguler la morphologie cellulaire et ont déplacé les NPM fonctionnalisées par des forces magnétiques pour déclencher des voies de transduction du signal qui provoquent une réponse cellulaire. Ils ont ainsi démontré que l'activation médiée par les NPM sur les voies de signalisation conduit bien à un remodelage local du cytosquelette d'actine et à des changements morphologiques.⁸⁷

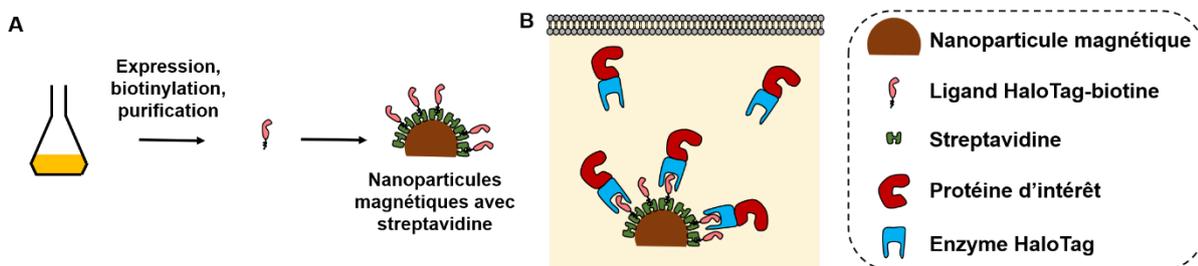


Figure 1.34. Fonctionnalisation des NPM utilisées pour la manipulation intracellulaire par Etoc *et al.*⁸⁷
 A) Expression du ligand HaloTag-Biotine dans *E. coli* et fonctionnalisation des NPM avec le ligand HaloTag.
 B) Fonctionnalisation *in situ* : les NPM fonctionnalisées avec le ligand HaloTag sont microinjectées dans les cellules exprimant la protéine d'intérêt fusionnée au HaloTag. Le HaloTag se lie de manière irréversible au ligand, recrutant la protéine d'intérêt pour les NPM fonctionnalisées.

Ce travail a été suivi par celui de Schöneborn *et al.* et Raudzus *et al.* sur la GTPase RAS pour améliorer la régénération axonale des neurones dans le cerveau en activant une voie de signalisation intracellulaire. De la même façon que Etoc *et al.*, les auteurs utilisent des NPM fonctionnalisées par le ligand HaloTag. Les domaines d'intérêt de RAS (H-RAS ou SOS1cat) ont été fusionnés à la protéine HaloTag, ici par chimie click. Ils montrent que les

NPM fonctionnalisées et microinjectées dans les neurones se retrouvent dans les neurites après l'application d'un champ magnétique externe. Ils ont également pu déplacer les NPM, ainsi que la protéine intracellulaire recrutée, le long d'un neurite dans les neurones grâce à leur attraction par une pointe magnétique externe. Ces résultats sont une première étape pour développer des outils pour les thérapies de remplacement cellulaire basées sur des neurones dopaminergiques chargés de nanoparticules magnétiques fonctionnalisées dans des systèmes modèles de la maladie de Parkinson.^{63,88}

Hoffmann *et al.* ont également examiné la signalisation intracellulaire en utilisant un contrôle magnétique. Ils ont utilisé des NPM conjuguées à des protéines régulatrices clés pouvant contrôler artificiellement, dans le temps et dans l'espace, la voie de signalisation Ran/RCC1 régulant le cytosquelette cellulaire. Ran est une petite protéine GTPase agissant comme un commutateur moléculaire qui a un état actif et un état inactif contrôlés par un facteur d'échange de nucléotide à guanine RCC1. En présence d'un champ magnétique, les protéines Ran conjuguées à des NP superparamagnétiques peuvent provoquer l'assemblage de fibres microtubulaires en réseaux asymétriques de fibres polarisées dans des extraits d'œuf de *Xenopus laevis*. L'orientation des fibres est dictée par la direction de la force magnétique. Lorsque ces nanoparticules conjuguées à RCC1 sont accumulées localement, l'assemblage de fibres microtubulaires est initié lorsqu'un certain seuil de concentration est dépassé.^{100,101}

1.7.2.4. Vectorisation cellulaire

Les NP possèdent un rapport surface sur volume très important, ce qui en fait de bonnes candidates pour transporter des molécules actives lorsqu'elles sont utilisées comme vecteur. Georgelin *et al.* ont utilisé un système cœur-coquille constitué de NP d'oxyde de fer enrobées de silice pour faire face à la dégradation de la surface des NP en milieu biologique et pour permettre un ancrage covalent contrôlé de bléomycine à la surface de la silice. Ce système pourrait permettre une libération contrôlée de cet agent anticancéreux au voisinage de sa cible, limitant sa toxicité pour les tissus sains. Dans le cadre d'expériences *in vitro* sur cellules en culture, les auteurs observent l'internalisation de ces NP fonctionnalisées dans le noyau. Ce vecteur nanométrique est donc capable de transporter la bléomycine près de sa cible biologique, l'ADN, sans l'aide de molécules de

pénétration nucléaire telles que les peptides. L'efficacité thérapeutique de la bléomycine est généralement limitée en raison de ses effets secondaires, notamment d'une forte toxicité pulmonaire. Dans cet article, les auteurs montrent que la distribution du médicament à des doses plus faibles près de la cible biologique pourrait conduire à son utilisation plus large en oncologie.¹⁰²

De plus, les NP d'oxyde de fer superparamagnétiques sont des systèmes de vectorisation importants car elles sont hautement biocompatibles et peuvent être guidées à l'aide d'un champ magnétique externe.¹⁰³ Par exemple, Cristofolini *et al.* ont développé avec succès un système de NP multifonctionnelles pour délivrer des siRNA (small interfering RNA ou ARN interférent) à des cellules cancéreuses du sein. Leur système hybride magnétique est composé de NP d'oxyde de fer recouvertes d'acide caféique et stabilisées par des couches de phosphate de calcium et de bloc de copolymère PEG-polyanion pour l'incorporation des siRNA. Les auteurs observent dans leur étude *in vitro*, une internalisation par endocytose de ces NP fonctionnalisées dans des cellules du cancer du sein HER2-positive, les résultats étant encore meilleurs sous champ magnétique. De plus, la forte concentration d'ions calcium dans les NP provoque une augmentation de la pression osmotique et un afflux d'eau dans les endo-lysosomes. Ceci permet un désassemblage lent de la couche de phosphate de calcium entourant les NP et la rupture de la membrane des endo-lysosomes conduisant à la libération du siRNA dans le cytosol. Ces résultats sont confirmés par la réduction de l'expression du gène HER2 dans les cellules cancéreuses du sein.¹⁰⁴ Le gène HER2 est une cible prometteuse pour la thérapie anticancéreuse en raison des graves conséquences de la surexpression de HER2 chez les patientes atteintes d'un cancer du sein.¹⁰⁵

1.8. Stratégies pour permettre l'accès direct des NPM au cytosol

Même s'il existe plusieurs exemples d'applications réussies des NPM, leur efficacité dépend de leur localisation intracellulaire après leur entrée dans les cellules. Lorsque l'internalisation des NP se fait par endocytose, le piégeage des NPM dans les endosomes est un obstacle important à certaines applications dont la manipulation magnétique. Il existe actuellement de nombreuses études visant à faciliter leur accès au cytosol.

Pour accéder directement au cytosol, les NP peuvent traverser la membrane plasmique par diffusion ou par fusion lipidique lorsqu'elles sont encapsulées dans des liposomes fusogènes. Des méthodes physiques peuvent également être utilisées (telles que la microinjection ou l'électroporation (partie 1.6.2)) pour accéder au cytosol, ces techniques ne sont cependant pas toujours faciles à mettre en œuvre ou ne sont pas toujours compatibles avec le système étudié. Certaines molécules possèdent quant à elles la capacité de traverser la membrane cellulaire, c'est le cas notamment des peptides pénétrants (cell penetrating peptides, CPP). De nombreuses recherches ont été menées ces dernières années pour élucider les mécanismes spécifiques d'entrée des NP fonctionnalisées par les CPP dans les cellules.¹⁰⁶⁻¹¹⁰ La compréhension de ces mécanismes fait encore débat, mais certaines études ont suggéré que plusieurs voies étaient impliquées dans l'absorption cellulaire de ces NP fonctionnalisées par les CPP, dont notamment l'endocytose et la translocation directe.

1.8.1. Les peptides vecteurs ou Cell-Penetrating Peptides (CPP)

Les CPP, également connus sous le nom de domaines de transduction de protéines (PTD), sont de petits peptides (moins de 30 acides aminés), généralement riches en résidus cationiques qui peuvent entrer dans les cellules. Les premiers CPP ont été découverts dans les années 90 avec le peptide Tat,¹¹¹ correspondant à un segment de la protéine Tat du VIH-1 et la pénétratine, correspondant à la troisième hélice de l'homéodomaine Antennapedia.^{112,113} Depuis, de nombreux peptides présentant également des capacités de pénétration ont été découverts à partir de la séquence de protéines naturelles ou conçus de manière rationnelle.

Les CPP ont reçu une attention considérable au cours des deux dernières décennies en raison de leur efficacité de vectorisation dans les cellules et également de leur faible cytotoxicité. Ils sont souvent utilisés comme agents de vectorisation de macromolécules d'origine biologique ou synthétique (peptides, protéines, oligonucléotides) incapables de franchir par elles-mêmes la membrane plasmique.¹¹⁰ Deux stratégies peuvent être utilisées pour la prise en charge de la macromolécule : i) la formation d'une liaison covalente stable (thioéther, triazole, etc.) ou réversible dans la cellule (disulfure, ester,

etc.) entre le CPP et la cargaison ou ii) la formation de complexes non covalents impliquant des interactions électrostatiques ou hydrophobes entre les deux entités.^{114,115}

Les CPP, en fonction de leurs propriétés physicochimiques, se distinguent en trois classes : purement cationiques, amphiphiles et hydrophobes (table 1.2).

Type de CPP	Séquences	Références
Purement Cationiques	Tat : GRKKRRQRRRPPQ	111
	Polyarginines : R _n (5<n<12)	116,117
Amphiphiles	Penetratin : RQIKIWFQNRRMKWKK	113
	R ₆ W ₃ : RRWWRRWRR	118
	Transportan : GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	119
	MAP : KLALKLALKALKALKLA	120
	Pep-1 : KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	121
Hydrophobes	Pep-7 : SDLWEMMMVSLACQY	122
	C105Y : CSIPPEVKFNKPFVYLI	123

Table 1.2. Exemples de CPP en fonction de leurs propriétés physicochimiques.

Bien que les mécanismes d'internalisation cellulaire des CPP aient fait l'objet d'une recherche intense, ils n'ont pas encore été entièrement définis, notamment au niveau moléculaire. Les mécanismes, comme l'efficacité d'entrée, dépendent des propriétés physicochimiques des CPP et de leurs conjugués, de la taille du complexe cargo-CPP, du type cellulaire et des conditions expérimentales, notamment la concentration en CPP et la température d'incubation.¹²⁴ Néanmoins, il est devenu clair qu'un même CPP peut exploiter différentes voies pour entrer dans la cellule et que ces voies peuvent parfois fonctionner de manière concomitante, selon les conditions expérimentales.¹²⁵ Ces voies d'entrée sont divisées en deux groupes : i) la translocation directe qui correspond à une déstabilisation transitoire de la bicouche lipidique de la membrane plasmique, indépendante de l'énergie et de la température et ii) l'endocytose (macropinocytose, endocytose dépendante de la clathrine ou la cavéoline ou endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline), processus qui dépend de l'énergie et de la température (figure 1.35).

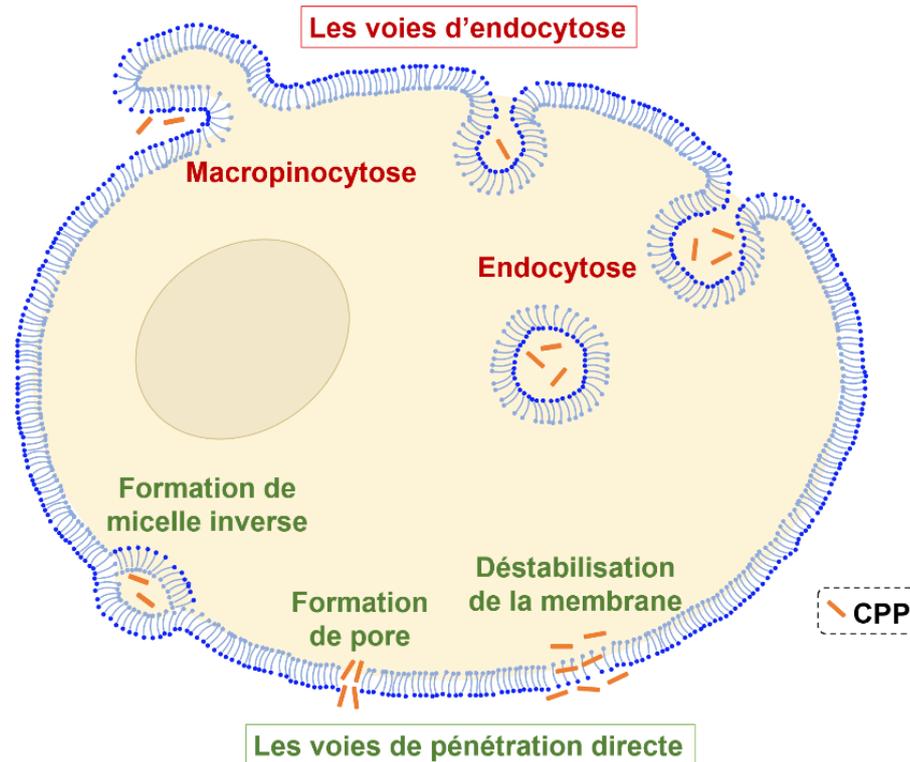


Figure 1.35. Représentation des différents mécanismes proposés pour l'internalisation des CPP, divisés en deux groupes : les voies d'endocytose (en rouge) et les voies de pénétration directe (en vert).

Il est généralement admis que la plupart des CPP et des conjugués cargo-CPP pénètrent dans les cellules majoritairement par endocytose.^{106-110,126} Comme indiqué précédemment pour les NP, cette voie peut conduire à un piégeage des composés dans les endosomes. Certains CPP sont cependant capables de transloquer efficacement à travers la membrane cellulaire, y compris lorsqu'ils sont associés à une cargaison.^{106,108-110,127} Cette voie d'entrée est considérée comme avantageuse car elle permet un accès direct au cytosol évitant les endosomes. La contribution relative de l'endocytose et de la translocation varie d'un CPP à l'autre et est probablement déterminée par la capacité du CPP à interagir avec des composants clés de la membrane plasmique. En particulier il a été démontré que les glycosaminoglycanes (GAG) sont impliqués dans l'endocytose de plusieurs CPP.^{128,129} Les études sur les peptides vecteurs ont également dévoilé que les résidus cationiques, en particulier les résidus arginine (Arg) et lysine (Lys), ainsi que le résidu aromatique tryptophane (Trp) jouent un rôle essentiel dans l'endocytose et la translocation directe.^{108,109,130,131}

1.8.1.1. Les résidus arginine et lysine

Les Arg comme les Lys sont chargées positivement à pH physiologique et permettent des interactions électrostatiques avec les composants chargés négativement de la membrane (glycosaminoglycanes, phospholipides anioniques). L'évaluation quantitative de la capacité des différents CPP cationiques à pénétrer la membrane plasmique a en outre révélé que les résidus Arg contribuent davantage à l'internalisation cellulaire que les Lys.¹⁰⁸ Cela a été attribué à la capacité du groupement guanidinium de l'arginine à former des liaisons hydrogène bidentées avec les groupes carboxyliques, sulfate et phosphate chargés négativement des constituants de la membrane cellulaire (figure 1.36), alors que le groupe ammonium de la chaîne latérale de la lysine ne peut former que des liaisons hydrogènes monodentées.^{108,131}

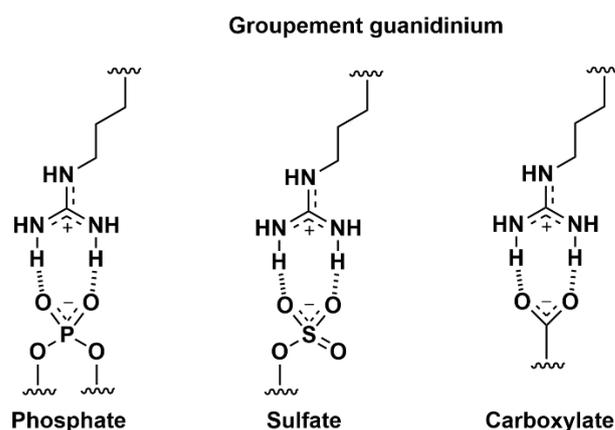


Figure 1.36. Représentation de l'arginine avec son groupement guanidinium qui peut former des interactions par liaisons hydrogène et des paires d'ions avec les groupements phosphate, sulfate et carboxylate qui se trouvent sur les composants des membranes cellulaires. Figure adaptée à partir de Futaki *et al.*¹⁰⁸

Rothbard *et al.* ont démontré le rôle crucial du groupement guanidinium de l'arginine, en le méthylant pour diminuer sa capacité à former des liaisons hydrogène, tout en conservant sa charge positive et sa capacité à former des paires d'ions. Les auteurs ont alors observé une diminution drastique de l'internalisation cellulaire de 80 % avec des Arg₈ mono-méthylées et une diminution de plus de 95 % pour des Arg₈ bi-méthylées en comparaison avec des Arg₈ non méthylées.¹³¹ Cette capacité de former des liaisons hydrogène bidentées expliquerait que les peptides oligo-Arg et plus généralement les CPP riches en arginines pénètrent plus efficacement que des peptides oligo-Lys.¹³² Cette

interaction avec la membrane favorise l'accumulation des CPP à la surface cellulaire, conduisant à leur internalisation. Étant donné que ces interactions ne sont pas très fortes, 6 à 12 résidus d'arginine sont généralement nécessaires pour provoquer une accumulation significative à la surface des cellules et induire une internalisation par perturbation transitoire de la membrane.¹³³ De plus, Ziegler *et al.* ont comparé l'absorption cellulaire du CPP WR9 et du dérivé PEGylé (PEG-WR9) et ont constaté que la PEGylation de WR9 empêche l'agrégation du CPP avec les GAG mais pas sa liaison aux GAG. La liaison aux GAG permet une internalisation des CPP par endocytose dépendante des GAG. En revanche, l'agrégation et donc l'accumulation de WR9 au niveau de la surface cellulaire déstabilise les membranes ce qui conduit à la translocation.¹²⁸

1.8.1.2. Le résidu tryptophane

Le tryptophane joue également un rôle critique dans les mécanismes d'internalisation des CPP. Le rôle du Trp fut d'abord mis en évidence lors des travaux sur les homéoprotéines, qui sont des facteurs de transcription ayant la capacité de pénétrer dans les cellules (et également d'en sortir).^{112,134} Ces protéines possèdent un résidu Trp conservé, qui s'avère crucial pour leur internalisation cellulaire. Les premiers travaux sur la pénétratine (CPP dont la séquence est issue de l'homeoprotéine Antennapedia) réalisés par les équipes d'Alain Prochiantz et de Gérard Chassaing ont confirmé le rôle important de ce Trp, en particulier pour la translocation directe du CPP. Ces travaux ont conduit à la conception du CPP amphiphile R10W6¹³⁵ et par la suite, du CPP R6W3¹¹⁸, tous deux constitués uniquement de résidus Arg et Trp et présentant une très bonne efficacité d'entrée dans les cellules. Jobin *et al.* ont alors remplacé dans le CPP R6W3 les résidus Trp par des résidus Phe qui conservent un caractère aromatique et montré que cela diminuait significativement l'efficacité d'entrée du peptide, confirmant l'importance et la particularité du rôle des résidus Trp dans le processus d'internalisation.¹³⁶ Bechara *et al.* ont trouvé en particulier que les CPP contenant des résidus Trp avaient tendance à adopter des structures secondaires de type brin β et à former des agrégats stables en présence de GAG, favorisant ainsi une internalisation dépendante des GAG. Les résidus Trp renforcent l'interaction des séquences peptidiques basiques avec des GAG chargés négativement et augmentent la quantité internalisée par endocytose.¹²⁹ Ces résultats convergent avec une autre étude dans laquelle Walrant *et al.* démontrent pour la première

fois que les résidus Trp contenus dans les CPP améliorent considérablement l'enthalpie de liaison des peptides avec les héparanes sulfates et les chondroïtine sulfates.¹⁰⁹ Une étude plus poussée a été ensuite réalisée en utilisant des modèles de nonapeptides contenant uniquement des résidus Arg et Trp, afin d'étudier plus finement le rôle du nombre et de la position des résidus Trp. Ces travaux soulignent que les résidus Trp jouent le rôle d'activateur aromatique naturel des CPP riches en Arg, ce qui se produit par le biais d'interactions de type paires d'ions- π , énergétiquement favorables, impliquant les résidus Arg, Trp et les composants chargés négativement de la membrane.¹³⁰

Les travaux de Christiaens *et al.* ont également montré l'importance du résidu Trp dans la translocation membranaire grâce à son environnement hydrophobe et à son interaction avec la bicouche lipidique.¹³⁷ Rydberg *et al.* ont de plus montré que la teneur en résidus Trp et leur position dans la séquence peptidique sont déterminant à la fois pour l'efficacité et le mécanisme d'internalisation dans les cellules. Le modèle d'internalisation diffère entre les peptides avec des teneurs et des compositions différentes en tryptophane, montrant à la fois des mécanismes d'internalisation par endocytose et par translocation.¹³⁸

1.8.1.3. Les différents modèles de translocation

La translocation directe est un mécanisme énergie-indépendant, non délétère pour la cellule. Différents modèles sont à ce jour proposés sur la base d'études biophysiques, comprenant entre autres le modèle de formation de micelles inverses ; le modèle de partitionnement adaptatif et le modèle de formation de pores transitoires.

Le modèle de micelles inverses

Ce mécanisme a été proposé dès les années 90 par les groupes d'Alain Prochiantz et de Gérard Chassaing lors de leurs études sur la pénétratine.¹¹³ Lors de l'interaction des CPP avec la membrane, les charges positives des peptides sont neutralisées par les lipides de la membrane chargés négativement. Le peptide déstabilise la membrane et entraîne la formation de micelles inverses produisant une cavité hydrophile encapsulant le CPP, suivi d'une résorption de la micelle qui permet de libérer le CPP dans le cytosol (figure 1.37a). Plus récemment, des études sur des systèmes vésiculaires comportant des

phospholipides anioniques marqués par un fluorophore ont permis d'affiner ce mécanisme et de montrer que l'entrée dans les vésicules des CPP cationiques s'accompagne d'un transport de lipides anioniques.¹³⁹

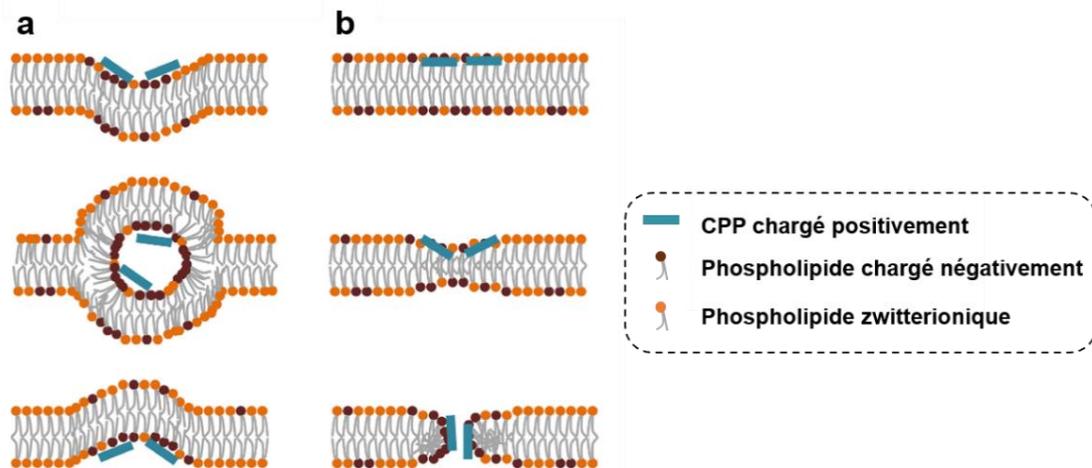


Figure 1.37. Modèle de translocation directe des CPP par formation de micelles inverses (a) et par formation de pores transitoires (b). Image adaptée à partir de Bechara et Sagan.¹⁴⁰

Le modèle de pores transitoires

Ce modèle implique l'interaction des résidus basiques des CPP amphiphiles avec les têtes polaires des phospholipides, entraînant une modification de la structure secondaire du peptide, généralement pour conduire à une hélice α , qui facilite son insertion dans la membrane et entraîne la formation d'un pore (figure 1.37b). La face hydrophile des peptides se retrouve sur la surface interne du pore et la face hydrophobe en contact avec les chaînes des phospholipides, permettant l'enfouissement des peptides dans la membrane. Ceci engendre une désorganisation transitoire de la membrane et permet au pore de laisser passer les molécules du milieu extracellulaire vers le cytosol.^{114,121}

Le modèle de partitionnement adaptatif

Ce modèle concerne notamment la traversée de la membrane plasmique par les oligomères d'arginine. Les groupements guanidinium chargés positivement forment des liaisons hydrogènes bidentées avec des composants anioniques de la surface de la cellule. Les complexes de paires d'ions résultants se partitionnent dans la bicouche et migrent à travers la membrane. Le complexe se dissocie sur le feuillet interne de la membrane et le peptide pénètre dans le cytosol.¹³¹

1.8.1.4. Modification chimique des CPP

Depuis la découverte des CPP, de nombreuses modifications chimiques ont été proposées pour améliorer leurs propriétés d'internalisation et/ou stabilité métabolique. En particulier, leurs fonctionnalisations par chaînes lipidiques saturées ou insaturées permettent d'améliorer l'interaction des CPP avec la membrane cellulaire, conduisant à une efficacité de translocation accrue.¹⁴¹ De plus, la cyclisation s'est avérée donner des résultats remarquables, en particulier la cyclisation de type tête queue, proposée récemment, a permis de montrer l'augmentation de l'efficacité d'internalisation des CPP, dans la plupart des cas en améliorant leur interaction avec les GAG.^{142,143}

1.8.2. Les différentes stratégies d'échappement des endosomes

Quel que soit le type de vecteur, la voie majoritaire pour pénétrer dans les cellules est généralement l'endocytose.¹⁴⁴ Les molécules ou particules qui pénètrent par endocytose se retrouvent dans un premier temps confinées à l'intérieur des endosomes, certaines parviennent à franchir leur membrane pour s'en échapper, mais souvent, les composés y restent piégés. Ils n'ont alors pas accès à l'espace cytosolique de la cellule.¹⁴⁵ Plusieurs études suggèrent que certains CPP ont la capacité de provoquer la fuite endosomale. Cependant, il apparaît que cette activité soit faible dans de nombreux cas.¹⁴⁶ De plus, la façon dont la fuite endosomale se produit est encore incomplètement connue, limitant ainsi la capacité des chercheurs à manipuler les paramètres qui peuvent contrôler ce processus. Steinbach *et al.* ont observé que lors de l'endocytose de NP fonctionnalisées par des CPP, une fuite endosomale pouvait être obtenue *via* une rupture de la membrane vésiculaire médiée par le CPP.¹⁴⁷ Cela a permis aux NP endocytées de pénétrer dans le cytosol. Néanmoins cette stratégie n'est généralement pas suffisante pour obtenir une livraison optimale dans le cytosol. Parmi les autres techniques, l'utilisation de polymères (polyéthylèneimine (PEI) ou polyamidoamine (PAMAM)) et de peptides riches en histidine est communément décrite pour induire une fuite endosomale.¹⁴⁸⁻¹⁵¹ Ces polymères et peptides emploieraient le mécanisme dit « d'éponge à protons » pour s'échapper des endosomes vers le cytosol.¹⁵² En effet, ces composés contiennent de nombreux groupes amine qui se protonent pendant la maturation et l'acidification des endosomes (figure 1.38). Ceci serait à l'origine de leur capacité à tamponner le milieu intra-vésiculaire

inhibant le processus d'acidification des endosomes et amenant les endosomes à pomper des protons pour conserver un pH acide.

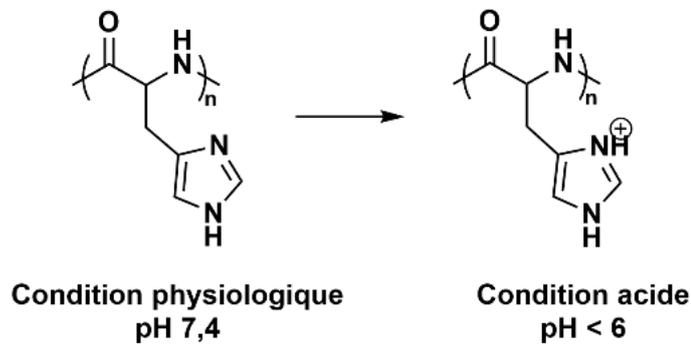


Figure 1.38. Protonation de l'oligo-histidine pour l'échappement des endosomes.

L'acidification des endosomes est due à l'action de l'enzyme ATPase qui transporte activement les protons du cytosol dans la vésicule. L'accumulation de protons dans la vésicule entraîne un afflux de contre-ions chlorure et augmente la pression osmotique. En raison de l'augmentation de la concentration en ions, l'eau qui passe dans la vésicule endosomale entraîne le gonflement de ce compartiment et provoque la rupture de la membrane endosomale par choc osmotique, conduisant à une libération des vecteurs et de leur cargaison dans le cytosol (figure 1.39).^{152,153} Bien que ce mécanisme, pour expliquer les événements d'échappement, ait été proposé il y a plus de 20 ans, le manque de pouvoir prédictif de ce mécanisme limite son application.

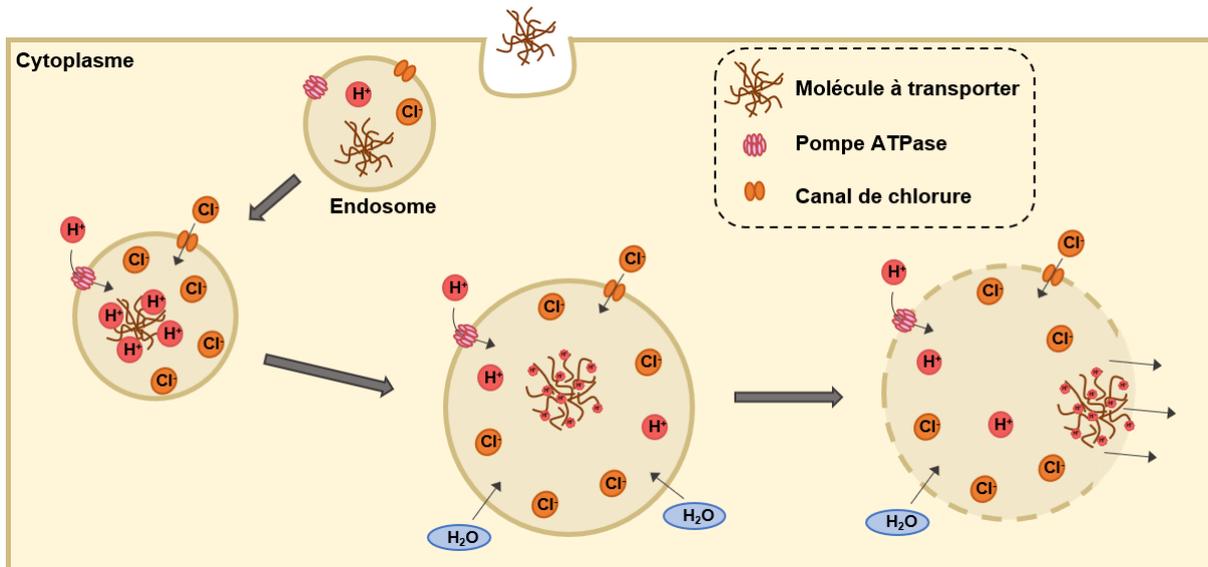


Figure 1.39. Schéma du mécanisme d'éponge à protons. Le vecteur entre dans la cellule par endocytose où il est ensuite piégé dans l'endosome. Durant la maturation de l'endosome et son acidification, le vecteur se retrouve sous forme protonée. La pompe ATPase s'active et transporte les protons à l'intérieur de l'endosome. L'accumulation de protons entraîne un afflux de contre-ions chlorure et augmente la pression osmotique. L'eau entre ensuite dans la vésicule et provoque la rupture de la membrane endosomale ce qui libère le vecteur dans le cytoplasme.

Néanmoins, de nombreuses applications sont présentées dans la littérature. Par exemple, Sun *et al.* introduisent le peptide H₆R₆, riche en résidus His et Arg, dans du chitosane (CS) pour obtenir un nouveau copolymère H₆R₆-CS comme vecteur de siRNA. Le copolymère H₆R₆-CS possède des efficacités d'internalisation cellulaire plus élevées et une capacité tampon exceptionnelle par rapport au CS non fonctionnalisé. En effet, les nanoparticules H₆R₆-CS/siRNA (H₆R₆-NP) ont montré une efficacité d'absorption cellulaire plus élevée en raison de la présence du domaine peptidique R6 qui agit comme un CPP pour améliorer l'internalisation cellulaire des NP et du domaine H6 responsable de l'effet « éponge à protons » dans les endosomes, pour induire la fuite endosomale. Ceci a permis d'améliorer l'efficacité de la transfection, visible sur la figure 1.40.¹⁵⁴

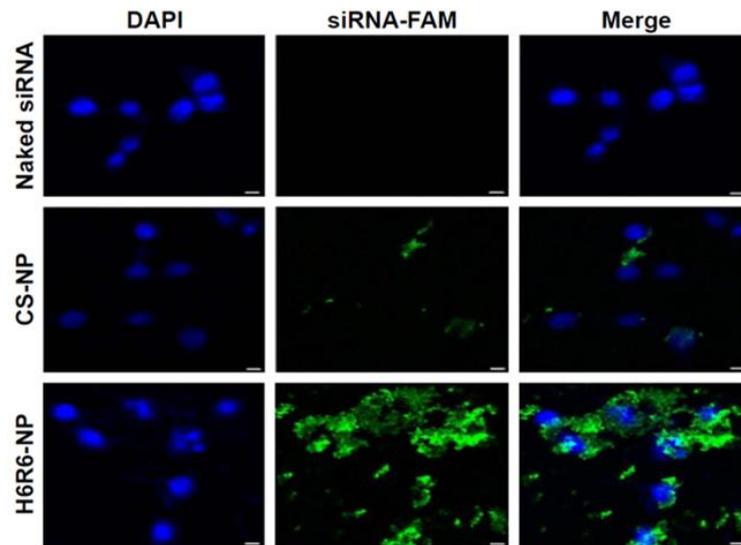


Figure 1.40. Images de microscopie confocale à balayage laser de cellules 4T1 après incubation avec le siARN seul (Naked siRNA), les NP de chitosane contenant les siRNA (CS-NP) ou avec les NP de chitosane modifiées par le peptide H₆R₆ et contenant les siRNA (H6R6-NP). Les noyaux des cellules ont été colorés avec le DAPI (bleu) ; les siRNA contiennent une carboxyfluorescéine formant la fluorescence verte. Images obtenues à partir de Sun *et al.*¹⁵⁴

Une autre molécule très largement utilisée pour induire un échappement endosomal par effet d'éponge à protons, est le PEI (polyéthylène imine), comme le montre Galliani *et al.* Les auteurs ont développé des NP de PLGA (poly(acide lactique-co-glycolique)) sous forme d'agrégats réticulés, contenant une protéine (l'albumine sérique bovine ou BSA) et le PEI. Les NP obtenues (BSA PEI NP) présentent un diamètre hydrodynamique entre 230 et 280 nm. Pour démontrer qu'une fraction de ces NP peuvent s'échapper des endosomes, ils incubent également les cellules avec de la calcéine. La calcéine est internalisée par endocytose et si les vésicules endosomales sont rompues, la calcéine est libérée dans le compartiment cytosolique. Après incubation avec les NP contenant le PEI, ils observent une fluorescence diffuse de la calcéine dans environ 15 % des cellules contrairement aux cellules après incubation avec les NP sans PEI ou avec la calcéine seule (figure 1.41). Ces résultats confirment que le PEI permet une déstabilisation des endosomes et l'échappement de la calcéine. De plus, ils ont mis en évidence par une colocalisation des nanoparticules avec les lysosomes (utilisant un LysoTracker), qu'une fraction des nanoparticules contenant le PEI n'était pas contenue dans ces vésicules, soulignant également l'échappement des nanoparticules à partir des endosomes.¹⁵⁵

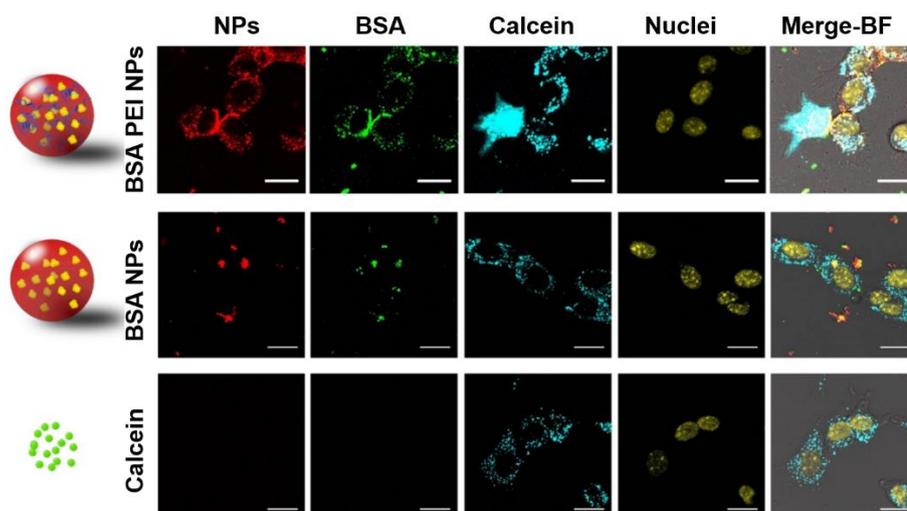


Figure 1.41. Images de microscopie confocale des cellules NIH-3T3 après incubation avec les NP contenant le PEI et la BSA (BSA PEI NPs) ou les NP contenant seulement la BSA (BSA NPs) ou avec la calcéine seule (calcein). Les NP sont représentées avec une fluorescence rouge, la BSA avec une fluorescence verte, la calcéine avec une fluorescence bleue et le noyau avec une fluorescence jaune. Image à partir de Galliani *et al.*¹⁵⁵

Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons vu que les interactions des nanoparticules avec la membrane plasmique dépendent notamment de leur taille, forme et surface. De plus l'internalisation des NP est principalement, et presque exclusivement, endosomale pour tout type de NP. Néanmoins les NP présentent de nombreux avantages notamment pour la vectorisation de molécules thérapeutiques du fait de leur grande surface d'interaction et de la possibilité de greffer de multiples molécules à leur surface. Les NP d'oxyde de fer sont particulièrement intéressantes de par leurs propriétés magnétiques et l'étude du contrôle de fonctions cellulaires par manipulation magnétique intracellulaire est en pleine expansion. Cependant, en raison du piégeage des NP dans les endosomes, leur potentiel d'application s'en trouve réduit. C'est pourquoi de nombreuses études sont en cours pour trouver une stratégie permettant aux NP d'atteindre le cytosol de manière non invasive. Les peptides basiques, CPP ou peptides riches en résidus His, sont propices à une présence cytosolique, en favorisant une internalisation cellulaire par translocation directe ou en permettant une fuite endosomale.

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des nanoparticules cœur-coquilles fonctionnalisées par les peptides cationiques

Cette thèse a pour objectif d'améliorer l'accès des nanoparticules magnétiques au cytosol. En effet les nanoparticules sont généralement internalisées dans les cellules par endocytose et se retrouvent piégées dans des vésicules, ne pouvant pas atteindre leurs cibles cellulaires, limitant leurs applications (hyperthermie magnétique, délivrance de molécules actives, etc.). Dans ce contexte, nous avons choisi de comparer l'impact du greffage à la surface des nanoparticules d'un peptide oligo-Arg (Arg₉) et d'un peptide riche en His (His₄-Trp) sur l'internalisation des conjugués résultants. Arg₉ est un CPP (cell-penetrating peptide) classique, qui a été utilisé pour délivrer une grande variété de molécules, y compris des peptides, des protéines et des nanoparticules. Ce CPP est capable de pénétrer dans les cellules par endocytose mais aussi par translocation, processus qui implique une perturbation transitoire de la bicouche lipidique de la membrane plasmique et permet au CPP et à sa cargaison d'atteindre directement le cytosol. L'efficacité de translocation du CPP et sa capacité à s'échapper des endosomes après endocytose dépendent cependant de différents paramètres, notamment de la nature et de la taille de la cargaison transportée.^{106-108,127,156} D'autre part, il a été démontré que les séquences oligo-His favorisent l'échappement endosomal par « effet éponge à protons » comme indiqué dans le chapitre précédent.¹⁵¹ Afin de greffer les peptides sur les nanoparticules magnétiques, un enrobage de silice sera utilisé pour fonctionnaliser plus aisément les nanoparticules de type cœur-coquille.

Mes travaux ont impliqué la mise au point d'une stratégie de conjugaison efficace pour incorporer les peptides polyarginine/polyhistidine à la surface des nanoparticules d'oxyde de fer enrobées d'une couche de silice $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ reposant sur la chimie click sans cuivre. Pour permettre cette liaison covalente sélective, un groupement azoture a été ajouté sur les séquences peptidiques et les nanoparticules ont été fonctionnalisées par un alcyne stériquement contraint.

2.1. La chimie click sans cuivre

La réaction de chimie click SPAAC (Strain Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition) présente plusieurs avantages. En particulier, cette réaction est bio-orthogonale, les fonctions alcyne et azoture impliquées sont inertes (ou du moins peu réactives) vis-à-vis

des groupes fonctionnels présents naturellement sur les biomolécules, notamment sur les peptides. La vitesse de réaction reste convenable même à faible concentration en espèces réactives, la réaction peut être réalisée en conditions physiologiques et génère un minimum de sous-produits. Enfin, par rapport à la réaction de chimie click CuAAC (Copper(I)-catalysed alkyne-azide cycloaddition), la SPAAC présente l'avantage de ne pas nécessiter de catalyse par le cuivre, qui dans notre cas de figure pourrait être difficile à éliminer des nanoparticules après réaction.

C'est pour ces différentes caractéristiques que nous avons choisi la chimie click sans cuivre SPAAC pour greffer covalamment les peptides sur les nanoparticules par la formation d'une liaison stable 1,2,3-triazole. Nous avons décidé d'introduire le groupement azoture requis pour la réaction sur les peptides et de fonctionnaliser les nanoparticules cœur-coquilles avec l'alkyne contraint, le DBCO (figure 2.1).

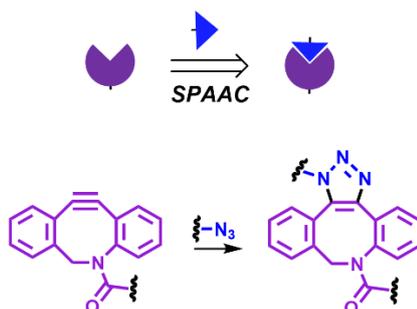


Figure 2.1. Représentation de la réaction de chimie click SPAAC entre la cyclooctyne (DBCO) qui sera greffée à la surface des nanoparticules cœur-coquilles et le groupement azoture qui sera sur les peptides.

2.2. Synthèse et caractérisation des peptides fonctionnalisés par le groupement azoture

Les peptides synthétisés au cours de cette thèse sont des oligo-arginines et des oligo-histidines possédant un groupement azoture pour leur fonctionnalisation par chimie click et une carboxyfluorescéine à leur extrémité *N*-terminale permettant la visualisation du greffage des peptides à la surface des nanoparticules (NP), et le suivi des NP résultantes dans les cellules. Une version non-fluorescente de ces peptides a également été synthétisée.

2.2.1. Synthèse sur support solide en stratégie Fmoc

Principe général de la synthèse peptidique sur support solide

La synthèse peptidique sur support solide (SPPS, solid phase peptide synthesis) est une technique de routine largement utilisée en chimie et biochimie. Le procédé peut être exécuté manuellement pour de petits peptides ou automatiquement avec un synthétiseur peptidique pour obtenir des oligo-peptides ou de petites protéines. La synthèse peptidique en phase solide peut être définie comme un processus dans lequel un peptide est assemblé de son extrémité *C*-terminale vers son extrémité *N*-terminale par addition successive des acides aminés constituant sa séquence, le résidu *C*-terminal étant lié covalamment à un polymère insoluble (aussi appelé résine). Chaque cycle de couplage, répété pour l'ajout de chaque acide aminé, comporte une étape de déprotection de l'amine du dernier résidu greffé et une étape de couplage du résidu suivant (après activation de sa fonction carboxylique), comme indiqué figure 2.2. Des étapes intermédiaires de lavage de la résine permettent l'élimination des excès de réactifs et des produits secondaires. En fin d'élongation le peptide est clivé de la résine et ses chaînes latérales sont déprotégées, généralement au cours d'une même étape.

Selon la stratégie utilisée, les acides aminés à coupler sont protégés sur leur fonction amine par un groupement Boc (éliminable en présence d'acide trifluoroacétique, TFA) ou par un groupement Fmoc (éliminable en présence de pipéridine). Afin d'éviter toute réaction secondaire au cours de la synthèse, la chaîne latérale des acides aminés, lorsqu'elle est porteuse d'une fonction réactive, est protégée par un groupement orthogonal au groupement protecteur de la fonction amine. Le lien entre le peptide et la résine doit évidemment être stable vis-à-vis des conditions de déprotection des fonctions amine. En stratégie Boc, le clivage de la résine et la déprotection des chaînes latérales sont généralement effectués par traitement à l'acide fluorhydrique (HF), alors qu'en stratégie Fmoc, c'est le TFA qui est utilisé.

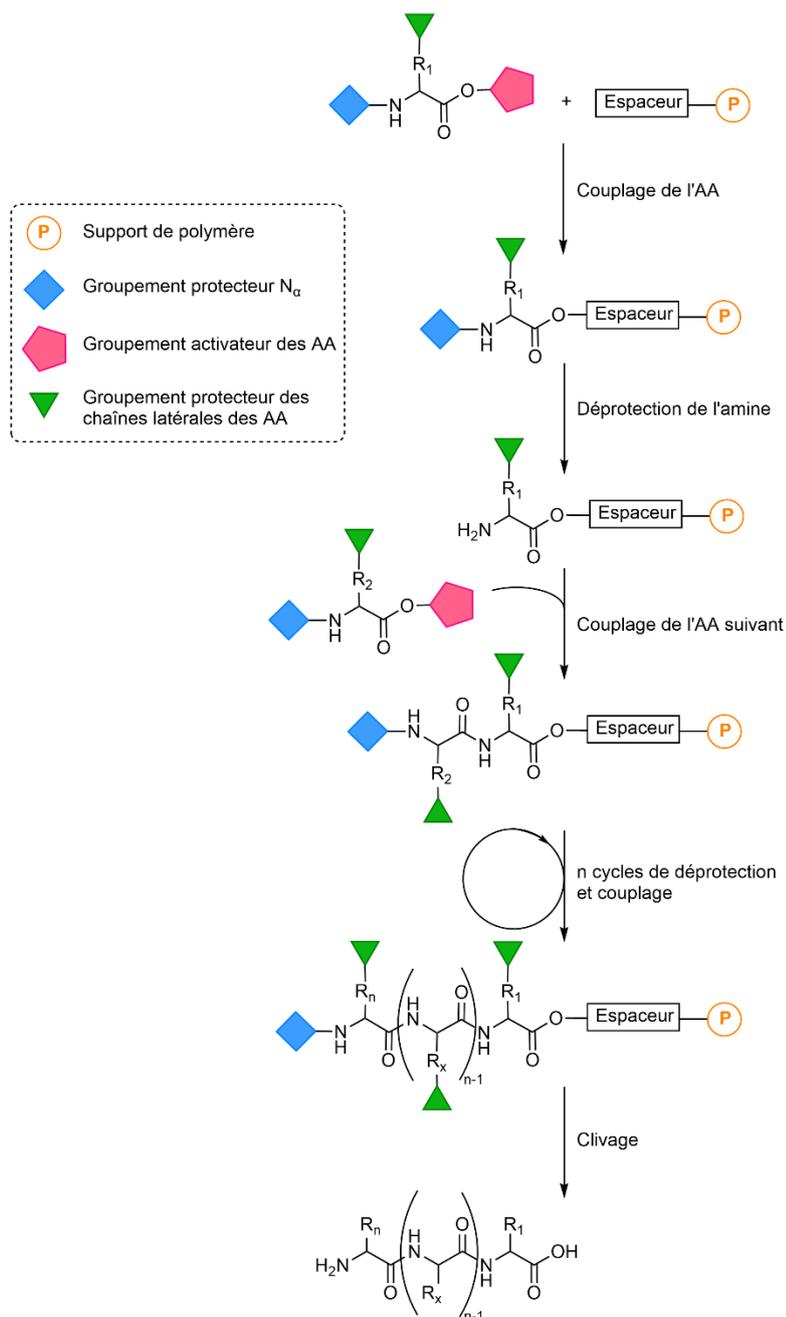


Figure 2.2. Etapes de synthèse peptidique sur support solide. R = chaîne latérale des acides aminés ; AA = acide aminé.

Au cours de cette étude, la synthèse peptidique sur support solide en stratégie Fmoc a été privilégiée. De nombreux agents d'activation existent actuellement, certains sont représentés figure 2.3. Les activations classiques en présence d'HBTU et de DIC/HOBt ont été utilisées au cours de nos synthèses peptidiques, conduisant à un acide aminé activé sous forme d'ester d'oxybenzotriazole. Le mécanisme d'activation des acides aminés par le DIC/HOBt est indiqué figure 2.3. La résine utilisée est la Rink Amide AM, représentée

figure 2.4, qui permet l'obtention de peptides ayant une extrémité C-terminale carboxamide.

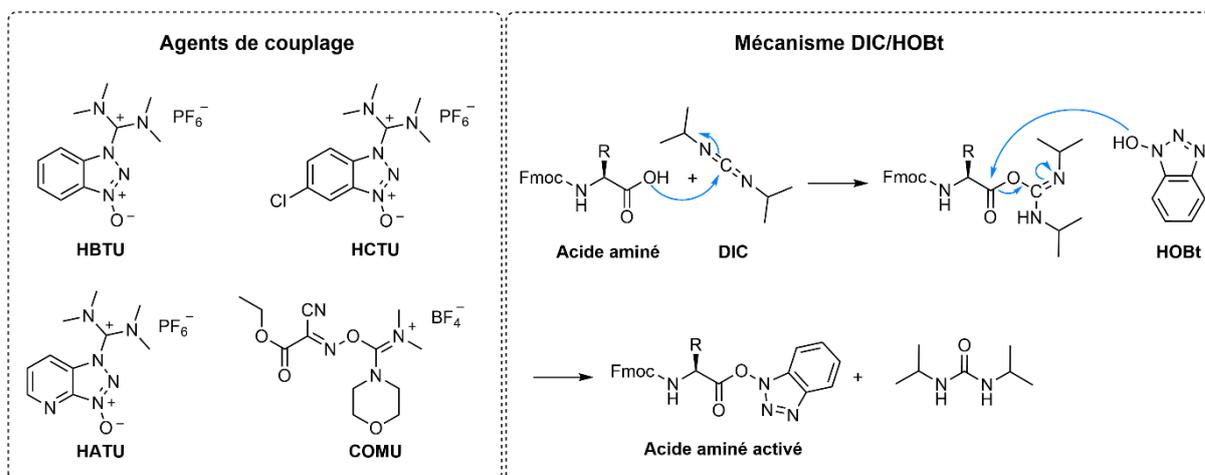


Figure 2.3. A gauche : Différents agents de couplage utilisés en synthèse peptidique. A droite : Représentation du mécanisme d'activation des acides aminés au DIC/HOBt, avec l'obtention d'un acide aminé activé, l'ester d'oxybenzotriazole.

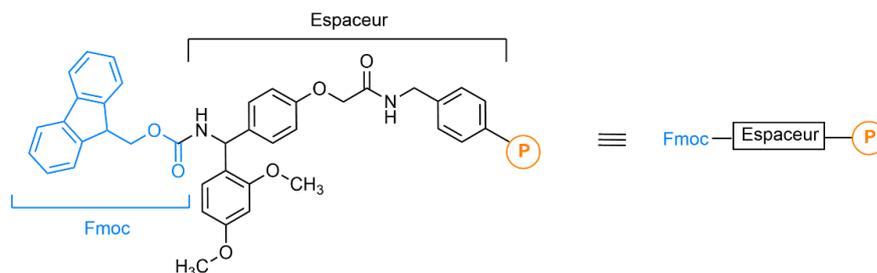


Figure 2.4. Représentation de la résine Rink Amide AM (4-(2',4'-Diméthoxyphényl-Fmoc-aminométhyl)-phénoxyacétamido-aminométhyl) protégée par un groupement Fmoc. P = polymère.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons combiné synthèse automatique et synthèse manuelle pour l'obtention des peptides. Le réacteur classique pour les synthèses manuelles, se compose d'une seringue avec un fritté en forme de disque comme indiqué sur la figure 2.5. La chaîne peptidique croissante est donc liée à la résine, insoluble, puis l'excès de réactifs et de sous-produits solubles, peuvent être éliminés par simple filtration au cours des étapes de lavage. Une fois l'allongement du peptide terminé, le peptide est libéré du support par clivage au TFA.

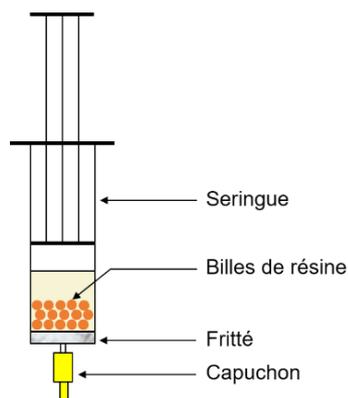


Figure 2.5. Réacteur ou seringue pour la synthèse peptidique manuelle sur support solide.

*Synthèse des peptides fluorescents oligo-arginines **CF-R9** et oligo-histidines **CF-H4***

La séquence Arg₉ a d'abord été assemblée par synthèse peptidique en phase solide Fmoc assistée par micro-ondes (plateforme d'ingénierie des protéines, IBPS, Sorbonne Université). Elle a ensuite été allongée manuellement par chimie en phase solide Fmoc standard (avec couplage à l'HBTU ou au DIC/HOBt) pour donner le peptide **CF-R9**. Le peptide **CF-H4**, a quant à lui été synthétisé entièrement manuellement en stratégie Fmoc standard. Un tryptophane a été introduit avant l'ajout successif de quatre histidines, pour permettre une purification plus aisée de la version du peptide **H4*** sans fluorophore présentée plus loin).

Les différentes étapes de synthèse des peptides **CF-R9** et **CF-H4** sont représentées en figure 2.6. A partir des segments de peptides Arg₉ et His₄-Trp (intermédiaires **1** et **2** respectivement), une lysine protégée orthogonalement sur sa chaîne latérale par un groupement Alloc a été couplée. Ce groupement Alloc pourra être sélectivement éliminé par la suite pour permettre une dérivatisation sur résine pour l'introduction du groupement azoture. Un espaceur hydrocarbonné (acide aminohéxanoïque, Ahx) a ensuite été ajouté avant la fonctionnalisation *N*-terminale du peptide avec la 5(6)-carboxyfluorescéine (CF) pour donner les intermédiaires **3** et **4**. La dernière étape a été la fonctionnalisation du peptide par le groupement azoture. Pour cela, l'élimination sélective du groupement Alloc sur la chaîne latérale de la lysine a été réalisée par traitement avec une quantité catalytique de Pd(PPh₃)₄ en présence de PhSiH₃. Cette déprotection a permis de révéler l'amine libre de la chaîne latérale de la lysine, qui a ensuite été mise à réagir avec de l'acide azidoacétique en présence de DIC/HOBt pour

donner les peptides **CF-R9** et **CF-H4**. Ces peptides sont donc fonctionnalisés avec le groupement azoture et la carboxyfluorescéine qui permettront respectivement de lier covalamment le peptide aux nanoparticules par chimie click et de visualiser l'efficacité du greffage à la surface des nanoparticules par microscopie de fluorescence. L'espaceur Ahx introduit dans la séquence des peptides permet de séparer la carboxyfluorescéine du reste de la séquence peptidique et en particulier du groupement azoture, diminuant ainsi l'encombrement stérique qui pourrait gêner la réaction de click.

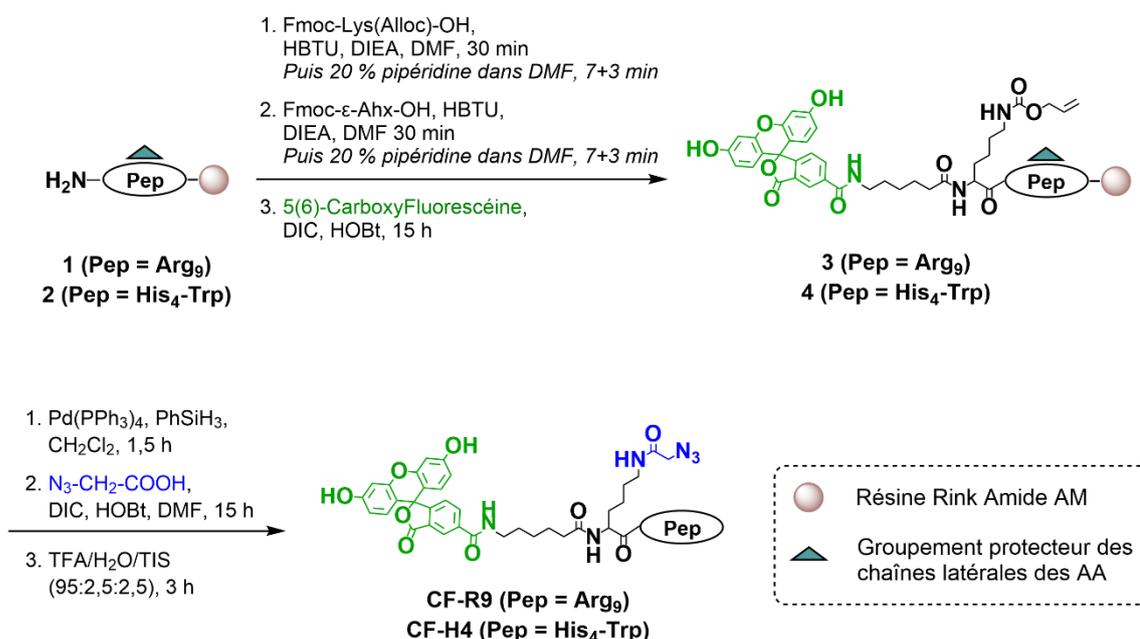


Figure 2.6. Etapes de synthèse des peptides **CF-R9** et **CF-H4** (AA = acides aminés, Pep = peptide).

Synthèse des peptides non fluorescents oligo-arginines **R9*** et oligo-histidines **H4***

Pour limiter l'impact du fluorophore sur les propriétés d'internalisation des peptides les versions non fluorescentes des azidopeptides **R9***, **H4*** ont également été synthétisées (figure 2.7). Ces peptides ont été obtenus à partir des segments **1** et **2** par couplage de l'acide azidoacétique à l'extrémité *N*-terminale des peptides pour produire **R9***, **H4***.

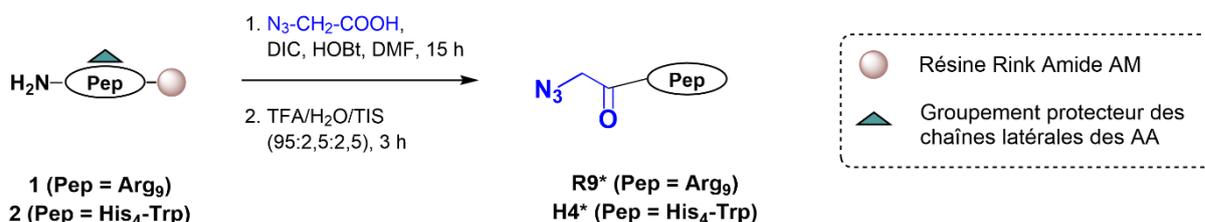


Figure 2.7. Etapes de synthèse des peptides **R9*** et **H4*** (AA = acides aminés, Pep = peptide).

2.2.2. Caractérisation des peptides

Après clivage de la résine par traitement avec du TFA en présence de piègeurs de carbocations (H₂O et triisopropylsilane (TIS)), les peptides ont été purifiés par HPLC en phase inverse. La pureté des peptides a ensuite été contrôlée par HPLC analytique (figure 2.8).

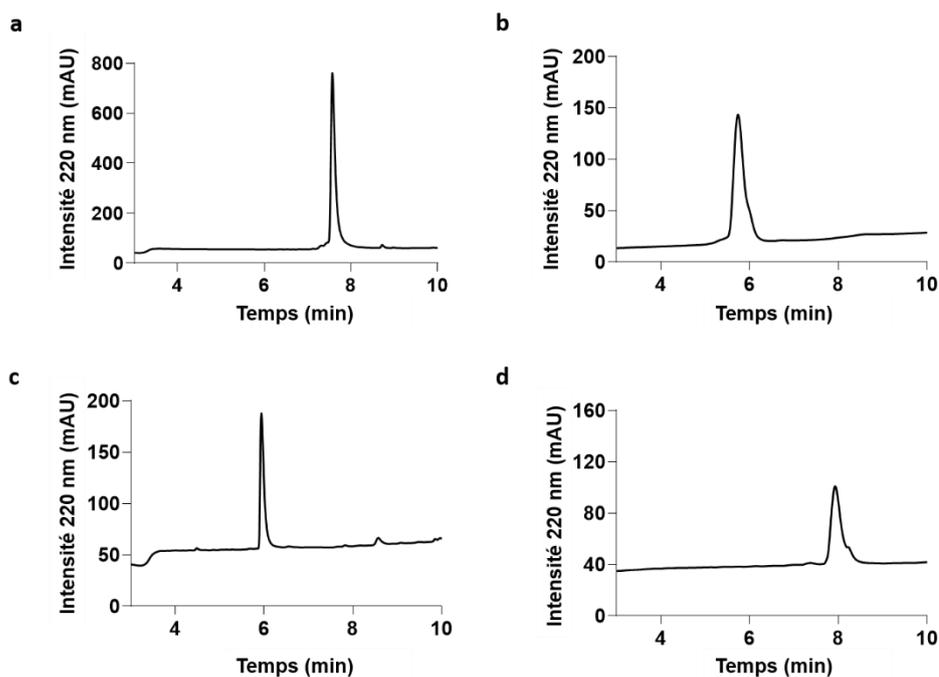


Figure 2.8. Chromatogrammes d'HPLC analytique en phase inverse montrant la pureté des peptides après purification (colonne RP-C18, détection à 220 nm). (a) **CF-R9**, gradient 1-60 % B dans A en 10 min. (b) **CF-H4**, gradient 20-60 % B dans A en 10 min. (c) **R9***, gradient 1-50 % B dans A en 10 min. (d) **H4***, gradient 5-30 % B dans A en 10 min (A = 0,1 % TFA dans H₂O, B = 0,1 % TFA dans acétonitrile).

Une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF (plateforme de spectrométrie de masse MS3U, Sorbonne Université) a permis d'observer l'ion $[M + H]^+$ souhaité pour les quatre peptides (figure 2.9). Les pics notés '◆' correspondent à une perte de 28 par rapport aux valeurs m/z attendues, très probablement en raison de la fragmentation lors de l'analyse MS MALDI-TOF de la fonctionnalité azoture entraînant l'expulsion de N₂.¹⁵⁷

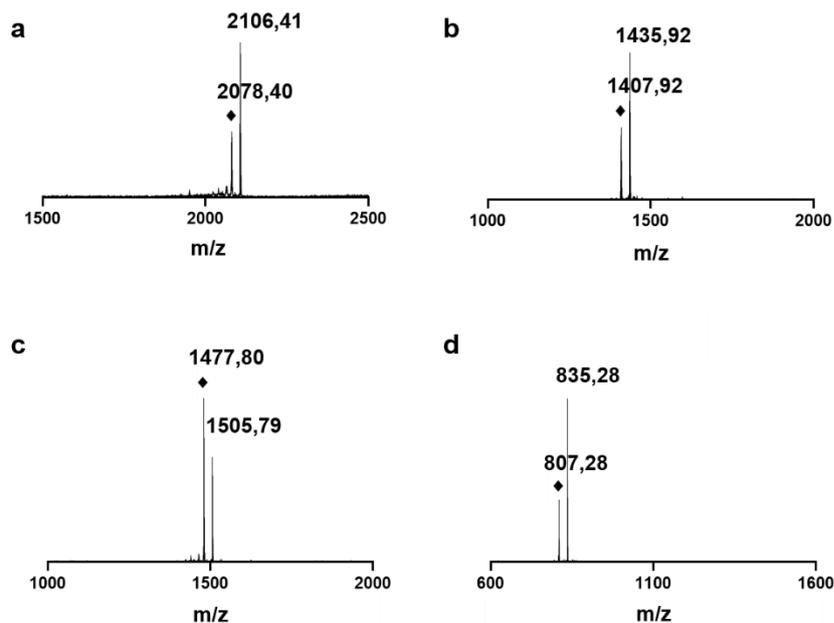


Figure 2.9. Spectres de masse MALDI-TOF obtenus pour **CF-R9** (a), **CF-H4** (b), **R9*** (c) et **H4*** (d) en mode positif, réflecteur. Les pics notés ◆ correspondent à une perte de 28 comparée à la valeur m/z attendue.

Le peptide **R9*** obtenu a été mis en présence d'un agent réducteur, le TCEP, et le produit de réaction a également été analysé par HPLC. L'objectif était de s'assurer que la perte de N_2 observée sur le spectre de masse résultait uniquement d'une fragmentation au cours de l'analyse par MALDI-TOF. Cette analyse par HPLC a ainsi permis de vérifier que le peptide synthétisé ne contient pas une fraction de peptide ayant subi une réduction du groupement azoture en amine au cours de la synthèse ou de la purification. Après 4 heures de réaction, les peptides traités ou non par le TCEP ont été analysés en HPLC en utilisant le même gradient pour leur élution (figure 2.10) et par spectrométrie de masse. Les deux conditions révèlent un seul pic en HPLC avec un temps de rétention différent. Cela confirme l'intégrité de notre peptide **R9*** de départ et la réduction complète de son groupement azoture en amine en présence du TCEP. La perte de N_2 observée sur le spectre de masse du peptide **R9*** de départ, provient donc bien d'une fragmentation de la fonction azoture au cours de l'analyse MALDI-TOF. Il est vraisemblable qu'il en soit de même pour nos autres peptides.

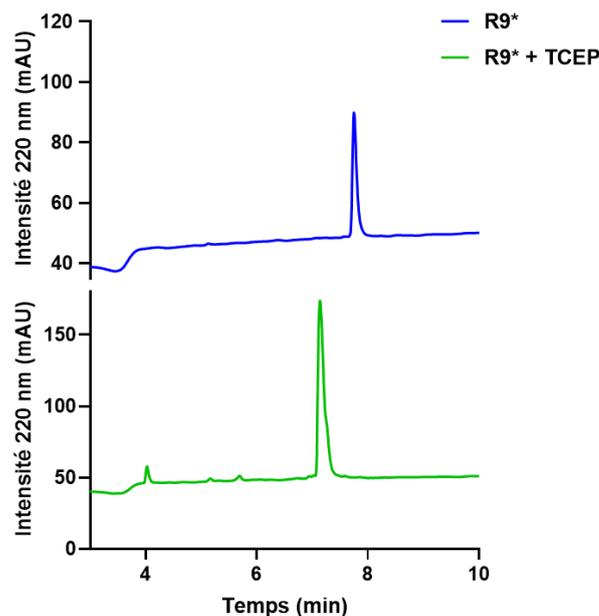


Figure 2.10. Chromatogrammes d'HPLC analytique à 220 nm montrant une diminution du temps de rétention après réduction du groupement azoture présent sur la chaîne latérale de la lysine du peptide **R9*** en amine après traitement au TCEP. Les analyses ont été réalisées avec une colonne RP-C18, utilisant un débit de 1 mL/min et suivant un gradient 1-30 % de B dans A en 10 min (A = 0,1 % TFA dans H₂O, B = 0,1 % TFA dans acétonitrile).

2.3. Synthèse et caractérisation des nanoparticules cœur-coquilles

2.3.1. Synthèse et caractérisation des cœurs magnétiques de maghémite γ -Fe₂O₃

Le choix des nanoparticules d'oxyde de fer a été discuté dans le chapitre 1. Pour des applications en magnétogénétique, ces nanoparticules d'oxyde de fer doivent entre autres posséder un pouvoir chauffant suffisant, ce pouvoir chauffant étant dépendant de leur taille et de leur polydispersité. D'après des travaux antérieurs, la taille optimale pour ces nanoparticules de maghémite se trouve autour de 10-15 nm de diamètre et plus la polydispersité des NP est faible, meilleur est leur pouvoir chauffant.⁸⁹ De plus, la force magnétique subie dans un gradient de champ dépend de la taille du cœur magnétique, donc un diamètre plus important sera favorisé.

2.3.1.1. Synthèse des particules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

La synthèse des nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a été réalisée en solution aqueuse par co-précipitation de chlorures ferriques et ferreux en milieu basique, procédé développé par R. Massart.¹⁵⁸ La synthèse est schématisée sur la figure 2.11.

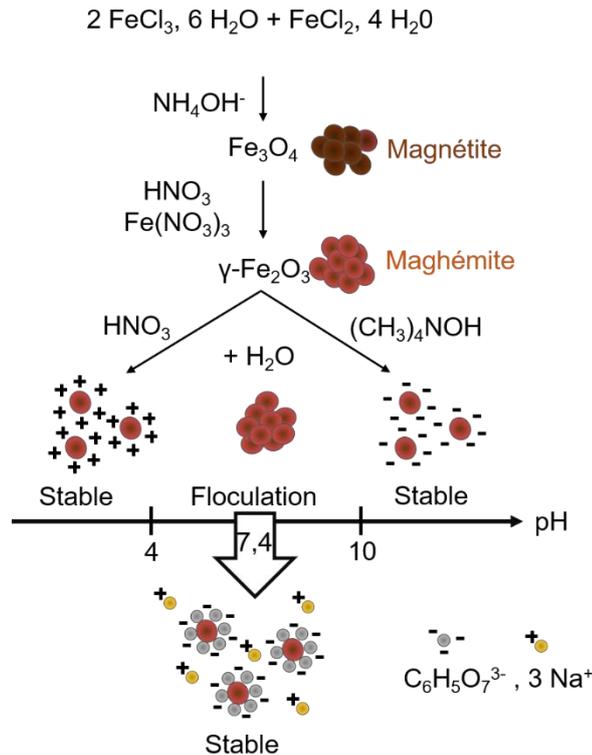


Figure 2.11. Synthèse des nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ par co-précipitation et dispersion stable des nanoparticules obtenues en phase aqueuse (pH 7) par complexation d'ions citrate à leur surface.

Une première étape de formation de nanoparticules de magnétite Fe_3O_4 a été réalisée par co-précipitation d'une solution acide d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} en proportions stœchiométriques par ajout d'ammoniaque. Les particules de magnétite ont ensuite été oxydées en milieu $\text{HNO}_3/\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ pour obtenir les particules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Le flocculat obtenu a été lavé et redispersé dans de l'eau. Les particules, se trouvant en milieu acide (pH ~ 3), sont chargées positivement et sont stabilisées grâce aux répulsions électrostatiques. Les nanoparticules synthétisées par cette méthode présentent une distribution en taille polydisperse. Un tri en taille a été effectué pour conserver seulement les nanoparticules de plus grand diamètre. Une solution d'acide nitrique a été ajoutée aux nanoparticules de maghémite directement après la synthèse. L'acide nitrique permet d'écranter les

répulsions entre les particules, les plus grosses flocculent et sont récupérées par décantation sur plaque magnétique. Le flocculat a ensuite été redispersé dans de l'eau. Les étapes sont répétées pour obtenir un meilleur tri en taille et sont représentées figure 2.12. Fortin et ses collaborateurs ont étudié le pouvoir chauffant des nanoparticules d'oxyde de fer $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ obtenues par co-précipitation. Il s'avère que les nanoparticules de plus grand diamètre issues de cette synthèse sont à conserver pour obtenir le meilleur pouvoir chauffant. De plus, le pouvoir chauffant de ces NP diminue très rapidement lorsque la polydispersité σ est supérieur à 0,1.⁸⁹ La fraction de ferrofluide CC, représentée figure 2.12, est celle contenant les plus grosses nanoparticules mais sa polydispersité est supérieure à 0,3 alors que la fraction de ferrofluide CS a une meilleure polydispersité ($\sigma = 0,07$) (figure 2.12). C'est donc la fraction de ferrofluide CS qui a été choisie pour la suite de la thèse.

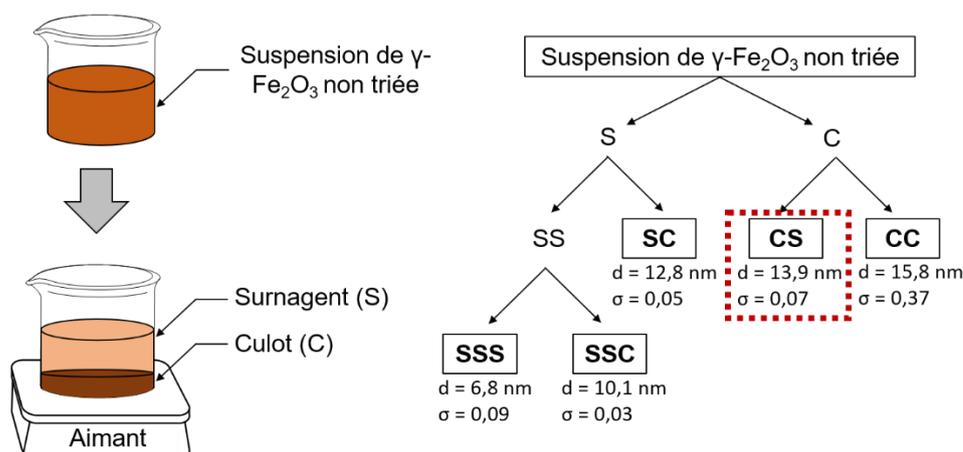


Figure 2.12. Procédure de tri en taille des nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Les diamètres hydrodynamiques d de chaque fraction de suspension colloïdale sont donnés en nombre après mesure par diffusion dynamique de la lumière (DLS) avec leurs polydispersités (σ) respectives.

Les particules de maghémite synthétisées sont à pH acide ($\text{pH} \sim 3$) en fin de synthèse, et flocculent à pH 7 à cause de la charge de celles-ci qui devient nulle et les particules ne sont plus stabilisées par les répulsions électrostatiques. Pour assurer leur stabilité colloïdale à pH physiologique ou pour les disperser dans de l'eau à pH 7, des ions citrate ont été complexés à la surface des particules de maghémite. Ces nanoparticules citratées sont alors chargées et stables dans une gamme de pH comprise entre 4 et 10, et sont chargées négativement à pH 7 (figure 2.11).

2.3.1.2. Caractérisation morphologique des cœurs magnétiques

Après l'étape de citration, les nanoparticules de maghémite ont été observées en microscopie électronique à transmission (TEM) permettant de déterminer leur taille physique et leur forme. Les images dévoilent des particules sphériques de diamètre moyen de 11 nm (figure 2.13). L'histogramme de distribution a été réalisé en mesurant le diamètre de près de 800 particules à l'aide du logiciel ImageJ sur trois clichés de TEM. Une représentation de la distribution en taille a été ajustée avec la loi log-normale (figure 2.14).

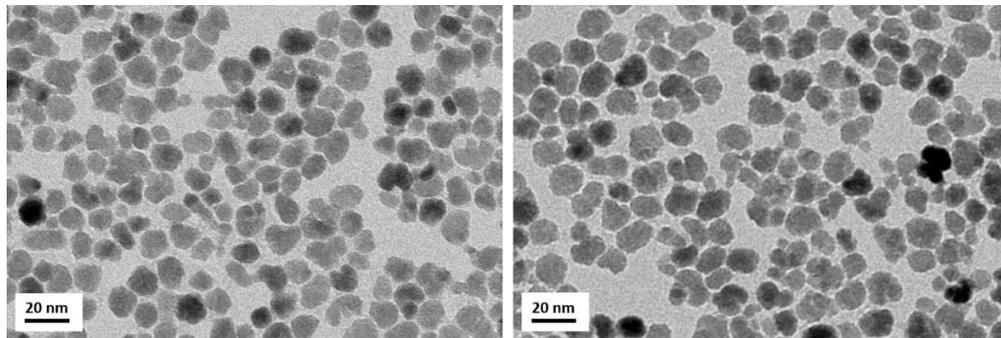


Figure 2.13. Images de microscopie électronique à transmission des nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (fraction de ferrofluide CS citratée).

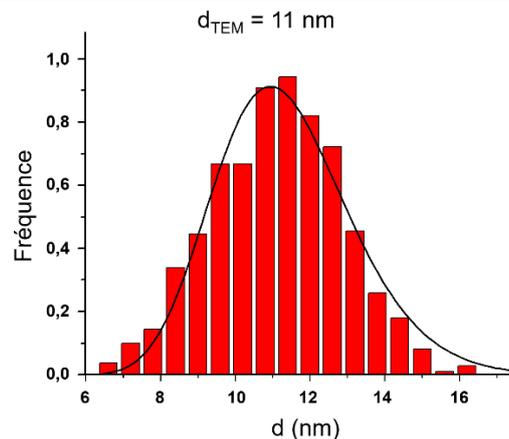


Figure 2.14. Distribution en taille des nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ déterminée par analyse des images de TEM à l'aide du logiciel imageJ, ajustée avec une distribution log-normale ($\sigma = 0,16$).

L'état d'agrégation des particules a été évalué et leur diamètre hydrodynamique a ensuite été mesuré par diffusion dynamique de la lumière (DLS). La taille obtenue en nombre

permet de déterminer le diamètre hydrodynamique des particules et leur polydispersité (σ). Le diamètre moyen des nanoparticules obtenu à l'aide de cette méthode est de 17 nm avec une polydispersité inférieure à 0,1 (figure 2.15). Six mesures de DLS ont été enregistrées (12 runs par analyse) pour donner une estimation du diamètre moyen hydrodynamique. Ce diamètre moyen indique que la suspension colloïdale est stable et qu'il n'y a pas d'agrégation. Le diamètre hydrodynamique correspond à la taille des nanoparticules solvatées et est donc supérieure au diamètre physique mesuré en TEM. Les nanoparticules de maghémite citratées présentent également un potentiel zêta négatif de - 46 mV en solution, à pH ~ 7.

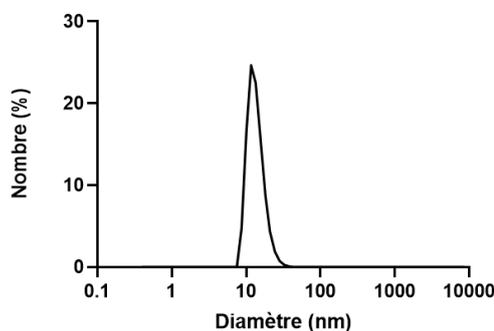


Figure 2.15. Distribution en taille par DLS d'une suspension de nanoparticules de γ -Fe₂O₃. La distribution est la moyenne de 12 runs.

2.3.2. Enrobage et fonctionnalisation des nanoparticules de maghémite γ -Fe₂O₃ par une couche de silice

La protection des oxydes de fer par une couche de silice est un procédé classique pour les applications biologiques. La silice est chimiquement stable en milieu aqueux (pH < 9) et est très facilement fonctionnalisable par différents groupements chimiques (acide carboxylique, amine), contrairement aux oxydes de fer simplement citratés. Cette couche de silice permettra ensuite de lier covalamment d'autres molécules ou fonctions d'intérêt biologique. La couche de silice peut également incorporer un fluorophore qui permettra le suivi des nanoparticules dans les cellules. De plus, la silice permet d'éviter les interactions dipolaires entre noyaux magnétiques, en les éloignant les uns des autres.

2.3.2.1. Synthèse des nanoparticules cœur-coquilles $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$

Il existe deux procédés principaux pour enrober des nanoparticules avec la silice. Le procédé sol-gel, aussi appelé procédé Stöber, et la microémulsion au sein d'un réacteur micrométrique micellaire.^{159,160} Au cours de cette thèse, le procédé sol-gel a été choisi du fait de sa simplicité et de sa compatibilité avec des synthèses à grande échelle.

La synthèse des nanoparticules cœur-coquilles est schématisée figure 2.16. La première étape consiste en l'enrobage des nanoparticules de maghémite citratées par une couche de silice. Cette étape a été réalisée dans un mélange $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ (1:2) en présence d'un alcoxysilane, le tétraéthoxysilane (TEOS). La condensation du TEOS à la surface des oxydes de fer citratés a été initiée en condition basique par l'ajout d'ammoniaque, résultant en la formation d'une couche de silice autour d'un ou plusieurs noyaux de maghémite. Au cours de cette étape, il est également possible d'incorporer un fluorophore dans la couche de silice suivant la méthode de Van Blaaderen.¹⁶¹ Le fluorophore, la rhodamine B isothiocyanate, a d'abord été fonctionnalisée par réaction de son groupement isothiocyanate avec un organosilane aminé, le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTS) (figure 2.17). Le dérivé rhodamine silylé ainsi obtenu ($\text{Si}(\text{OEt})_3\text{-rhodamine}$) peut alors être condensé à la surface des oxydes de fer en même temps que le TEOS.¹⁰²

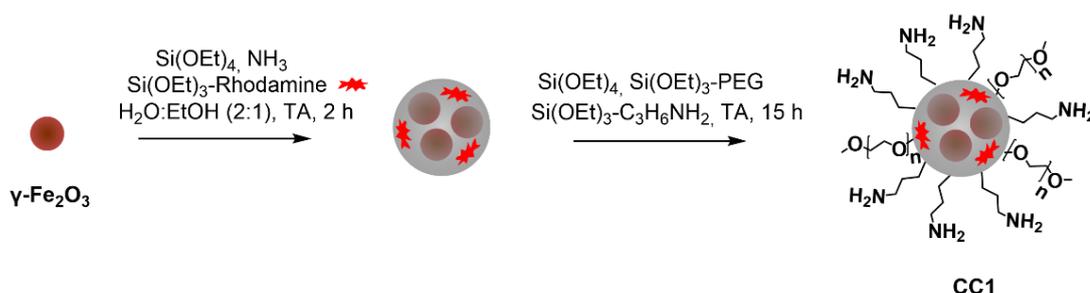


Figure 2.16. Encapsulation des nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ avec de la silice et fonctionnalisation de la surface avec des groupements amine et chaînes PEG pour obtenir les nanoparticules cœur-coquilles CC1. La rhodamine est représentée en rouge dans le schéma de synthèse, encapsulée dans la couche de silice. TA = température ambiante.

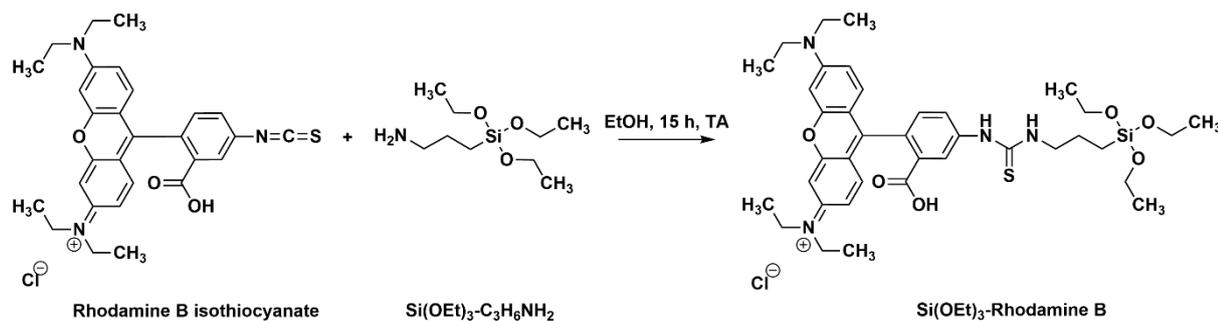


Figure 2.17. Fonctionnalisation de la rhodamine B par un alcoxysilane. Couplage entre les fonctions amine de l’APTS et la fonction isothiocyanate du fluorophore. TA = température ambiante.

Après cette première étape de formation de la couche de silice autour des nanoparticules de maghémite, une fonctionnalisation de la surface de la silice a été entreprise simultanément avec des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) et des fonctions amine (figure 2.16). L’APTS permet l’introduction de groupements amine qui assurent la stabilité colloïdale par interactions électrostatiques, et qui seront facilement fonctionnalisables par la suite. Les chaînes PEG (4-6 motifs) sont introduites par le PEOS et apportent une stabilisation stérique aux nanoparticules. De plus, l’ajout du TEOS permet de réticuler le réseau de silice et facilite la condensation du PEOS grâce à ses quatre fonctions hydrolysables. La réaction est arrêtée par l’ajout d’éther diéthylique qui induit la précipitation des nanoparticules. Les organosilanes n’ayant pas réagi peuvent ainsi être éliminés par décantation magnétique. La redispersion finale est réalisée dans un tampon MOPS (0,1 M ; pH 7,4) afin d’obtenir les nanoparticules cœur-coquilles $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ (**CC1**). Le dosage du fer en spectrophotométrie d’absorption atomique (AAS) de différentes synthèses indépendantes de **CC1** a permis de déterminer une concentration moyenne des suspensions colloïdales en fin de synthèse d’environ 26 mM. Les échantillons sont stables pendant plusieurs mois à 4 °C.

2.3.2.2. Caractérisation des nanoparticules cœur-coquilles $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ (**CC1**)

Après optimisation du ratio entre la quantité de nanoparticules de maghémite citratées et de TEOS à ajouter, une analyse par microscopie électronique à transmission a été effectuée et est illustrée figure 2.18. Les images dévoilent des particules individualisées assez polydisperses en taille, de forme sphérique ou un peu plus allongée, avec en moyenne trois cœurs d’oxyde de fer encapsulés dans une même coquille de silice. Dans ces conditions optimales, aucune nanoparticule de maghémite non encapsulée ou

nanoparticule de silice sans oxyde de fer n'a été observée. Un histogramme de distribution en taille a été réalisé en mesurant le diamètre de près de 100 particules à l'aide du logiciel imageJ sur trois clichés de TEM. Le diamètre moyen mesuré est de 41 nm (figure 2.19).

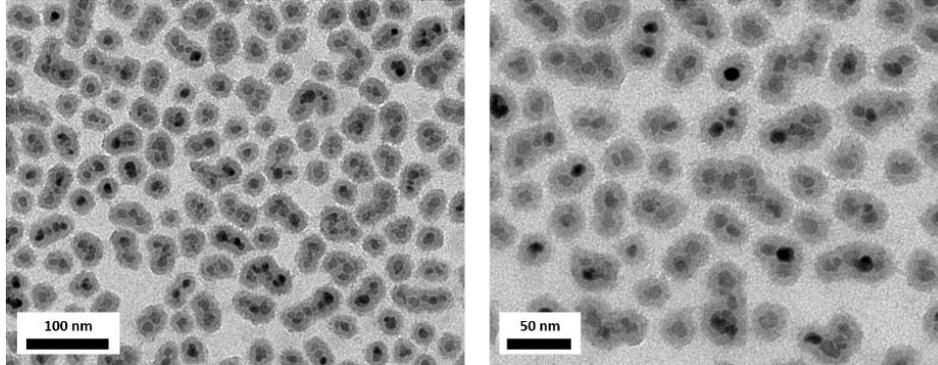


Figure 2.18. Images de microscopie électronique à transmission des nanoparticules cœur-coquilles **CC1**.

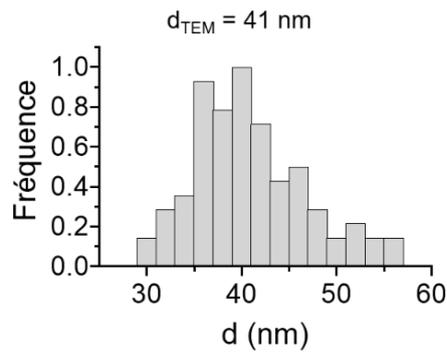


Figure 2.19. Distribution en taille des nanoparticules cœur-coquilles $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ (**CC1**) obtenue par analyse des images de TEM à l'aide du logiciel imageJ.

Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules cœur-coquilles **CC1** (moyenné sur six synthèses indépendantes), a été analysé en DLS et est de 43 nm avec une polydispersité inférieure à 0,2 (figure 2.20). La suspension colloïdale ne présente pas d'agrégation et est stable. Les nanoparticules de maghémite enrobées de silice présentent un potentiel zêta positif d'environ + 22 mV en solution, à pH = 7,4, du fait de la présence des fonctions amine à la surface protonées à ce pH. En absence de ces fonctions amine, seules les fonctions hydroxyles seraient présentes à la surface et le potentiel zêta de la suspension serait alors négatif.

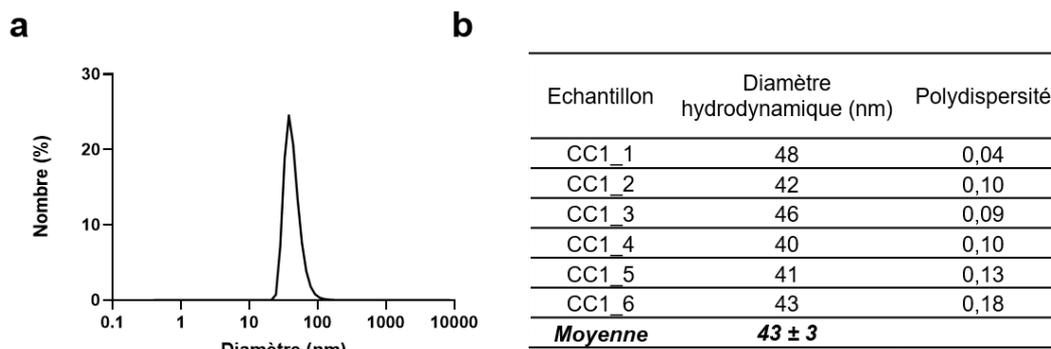


Figure 2.20. a) Analyse DLS d'une suspension de nanoparticules cœur-coquilles **CC1**. b) Résultats obtenus pour 6 synthèses indépendantes de nanoparticules cœur-coquilles **CC1**. Les analyses DLS ont été réalisées en nombre (12 runs/analyse). La moyenne du diamètre hydrodynamique est représentée \pm écart-type.

L'encapsulation de la rhodamine dans la couche de silice a été vérifiée par spectroscopie de fluorescence. Le spectre d'émission de fluorescence de la solution de nanoparticules cœur-coquilles montre un pic autour de 580 nm (après excitation à 540 nm) confirmant la présence de rhodamine dans ces particules (figure 2.21).

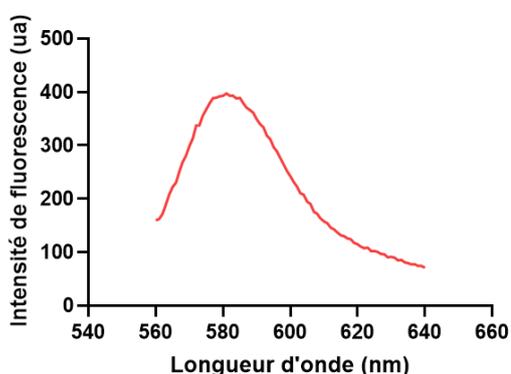


Figure 2.21. Spectre d'émission de fluorescence de la suspension de nanoparticules cœur-coquilles **CC1**, encapsulant de la rhodamine dans la couche de silice (longueur d'onde d'excitation = 540 nm ; longueur d'onde maximale d'émission = 581 nm).

La présence de fonctions amine à la surface des nanoparticules cœur-coquilles a été confirmée par zétamétrie mais ne permet pas leur quantification. Celle-ci peut être effectuée par fluorescence avec un test à la fluorescamine. La fluorescamine est un composé non fluorescent qui réagit avec les amines primaires pour former un composé hautement fluorescent (figure 2.22). Ce réactif est très utilisé pour détecter les amines sur les peptides et protéines.¹⁶²

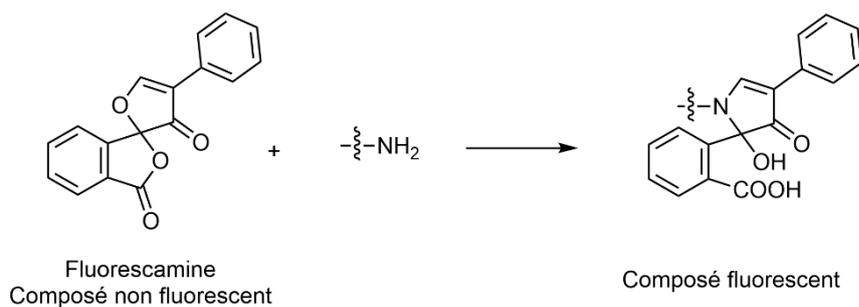


Figure 2.22. Réaction de la fluorescamine avec une amine primaire pour former un composé hautement fluorescent.

Ce test demande au préalable la réalisation d'une droite d'étalonnage faisant réagir l'APTS à des concentrations connues avec la fluorescamine. Cette droite permettra de déterminer la concentration en fonction amine se trouvant à la surface des NP cœur-coquilles (figure 2.23).

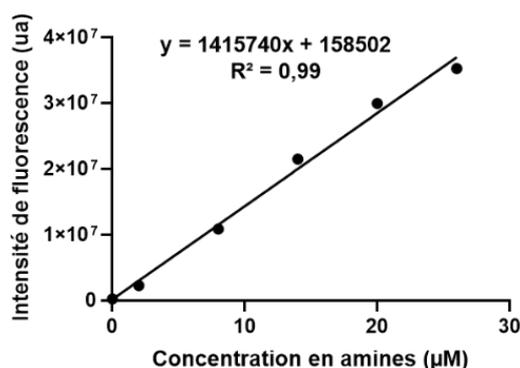


Figure 2.23. Droite d'étalonnage des solutions d'APTS de concentrations connues (2 ; 8 ; 14 ; 20 ; 26 μM) ayant réagi avec la fluorescamine pendant 2 heures. L'intensité de fluorescence a été mesurée pour chaque point à des longueurs d'ondes d'excitation de 390 nm et d'émission de 480 nm.

Le dosage des fonctions amine a été réalisé en duplicata sur différentes synthèses (notées « lot ») de nanoparticules cœur-coquilles **CC1**. Ces suspensions ont été diluées avec une solution de fluorescamine puis l'intensité de fluorescence à 480 nm des solutions a été mesurée après 2 heures de réaction. D'après la droite d'étalonnage, la concentration en fonction amine dans les solutions de cœur-coquilles en est déduite (figure 2.24).

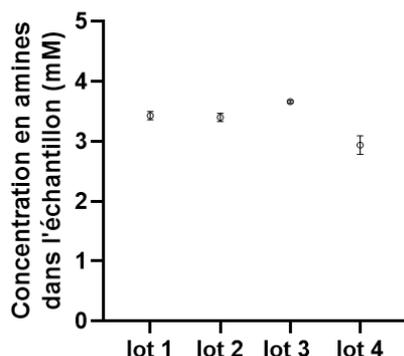


Figure 2.24. Dosage des fonctions amine de quatre lots (ou synthèses indépendantes) de nanoparticules cœur-coquilles **CC1**. Chaque mesure a été réalisée en duplicata (les données sont représentées en moyenne \pm écart-type). Les valeurs ont été multipliées par le facteur de dilution après dosage pour trouver la concentration en fonctions amine présentes dans chaque échantillon.

Une concentration moyenne de 3,4 mM en fonction amine a été trouvée dans les solutions de nanoparticules cœur-coquilles **CC1**. Quel que soit les lots de **CC1** étudiés, les concentrations en amines sont proches, indiquant la bonne reproductibilité des synthèses. A partir de la concentration en amines obtenue, il est possible de déterminer la densité en amines présente par NP cœur-coquille à la surface de la silice. Dans un premier temps il s'agit de calculer la fraction volumique ϕ des nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dans l'échantillon, connaissant la concentration en fer (C_{fer}) de la solution (mesurée par spectrophotométrie d'absorption atomique), sa masse molaire ($M_{\text{FeO}_{1.5}} = 80 \text{ g/mol}$) et sa masse volumique ($\rho = 5,07.10^3 \text{ g/L}$). La fraction volumique est calculée à l'aide de la formule ci-dessous :

$$\phi (\%) = \frac{M \cdot C_{fer}}{\rho} \cdot 100$$

Ensuite, la concentration en particules magnétique C_{coeurs} peut être calculée à partir de la fraction volumique ϕ , du volume moyen d'une particule de maghémite V_{part} et de la constante d'Avogadro N_A avec l'équation ci-dessous :

$$C_{coeurs} = \frac{\phi}{V_{part} \cdot N_A}$$

Il est important de noter que le volume moyen d'une particule de maghémite V_{part} prend en compte la valeur moyenne du diamètre des nanoparticules de maghémite d_{TEM} issue de la mesure en microscopie électronique à transmission. De plus, les nanoparticules de maghémite sont considérées de forme sphérique pour simplifier les calculs grâce à l'équation ci-dessous :

$$V_{part} = \frac{4}{3}\pi \left(\frac{d_{TEM}}{2}\right)^3$$

Le nombre de cœurs de maghémite dans une même couche de silice est en moyenne de trois, la concentration en nanoparticules cœur-coquilles C_{CC1} est alors calculée en divisant la concentration en cœurs magnétiques par trois ($C_{CC1} = C_{cœurs}/3$). La quantité de fonction amine par NP cœur-coquille est quant à elle calculée à partir de la concentration en amines C_{NH2} dosée par le test à la fluorescamine. Le rapport de la concentration en amines (C_{NH2}) présentes dans l'échantillon par la concentration en nanoparticules cœur-coquilles (C_{CC1}), C_{NH2}/C_{CC1} révèle le nombre d'amines à la surface des cœur-coquilles. La densité en amines par nm^2 est enfin calculée par le rapport entre le nombre d'amines par nanoparticule cœur-coquille et leur surface, en considérant que ce sont des sphères ($d_{TEM} = 41$ nm). Les résultats sont regroupés dans la table 2.1.

Echantillons	C_{NH2} (M)	C_{fer} (M)	$C_{cœurs}$ (M)	C_{CC1} (M)	Nombre NH_2 par CC1	Densité (NH_2/nm^2)
Lot 1_1	$3,48.10^{-3}$	$2,48.10^{-2}$	$8,85.10^{-7}$	$2,95.10^{-7}$	$1,18.10^4$	2,23
Lot 1_2	$3,38.10^{-3}$	$2,48.10^{-2}$	$8,85.10^{-7}$	$2,95.10^{-7}$	$1,14.10^4$	2,17
Lot 2_1	$3,45.10^{-3}$	$2,75.10^{-2}$	$9,81.10^{-7}$	$3,27.10^{-7}$	$1,05.10^4$	2,00
Lot 2_2	$3,35.10^{-3}$	$2,75.10^{-2}$	$9,81.10^{-7}$	$3,27.10^{-7}$	$1,02.10^4$	1,94
Lot 3_1	$3,68.10^{-3}$	$2,74.10^{-2}$	$9,77.10^{-7}$	$3,26.10^{-7}$	$1,13.10^4$	2,14
Lot 3_2	$3,68.10^{-3}$	$2,74.10^{-2}$	$9,77.10^{-7}$	$3,26.10^{-7}$	$1,13.10^4$	2,14
Lot 4_1	$2,83.10^{-3}$	$2,77.10^{-2}$	$9,87.10^{-7}$	$3,29.10^{-7}$	$8,59.10^3$	1,63
Lot 4_2	$3,05.10^{-3}$	$2,77.10^{-2}$	$9,87.10^{-7}$	$3,29.10^{-7}$	$9,27.10^3$	1,76
Moyenne	$3,36.10^{-3}$				$1,06.10^4$	2,00

Table 2.1. Estimation du nombre d'amines à la surface des nanoparticules cœur-coquilles **CC1** grâce au dosage à la fluorescamine. C_{NH2} = concentration en fonctions amine dans la solution de NP de cœur-coquille, C_{fer} = concentration en fer obtenue par AAS, $C_{cœurs}$ = concentration en particules magnétiques, C_{CC1} = concentration en NP cœur-coquilles **CC1**, nombre de fonctions amine présentes à la surface des NP cœur-coquilles **CC1** ($=C_{NH2}/C_{CC1}$). Chaque lot correspond à des synthèses de nanoparticules cœur-coquilles **CC1** indépendantes qui ont été analysées en duplicata.

La densité en fonctions amine à la surface des NP cœur-coquilles est en moyenne de 2,0 NH₂/nm² et chaque cœur-coquille possède environ 10 600 fonctions amine disponibles à leur surface. L'efficacité du greffage d'amines est d'environ 20 %.

2.3.3. Propriétés magnétiques des nanoparticules

Les nanoparticules d'oxydes de fer possèdent des propriétés magnétiques qui dépendent de leur taille. Les particules de taille inférieure à 20 nm sont des monodomains magnétiques et sont superparamagnétiques, ce qui est le cas ici car les nanoparticules d'oxyde de fer utilisées ont un diamètre d'environ 11 nm.

Les courbes d'aimantation ont été enregistrées sur un magnétomètre à échantillon vibrant (VSM). La courbe d'aimantation de la suspension de nanoparticules de maghémite γ -Fe₂O₃ est présentée figure 2.25. Cette courbe ne présente pas de cycle d'hystérésis, c'est-à-dire qu'elle ne possède pas d'aimantation rémanente en l'absence de champ et présente un champ coercitif nul, ce qui illustre le comportement superparamagnétique des nanoparticules de maghémite. A haut champ magnétique, la courbe d'aimantation obtenue tend vers une asymptote et atteint un palier correspondant à l'aimantation à saturation (73 emu/g de Fe₂O₃ ou 6242 A/m (figure 2.25, table 2.2)). Le terme emu est l'abréviation de « unité électromagnétique » et correspond à 1 A.m²/kg dans le système international. La valeur de l'aimantation à saturation trouvée est proche de la valeur théorique pour la maghémite qui est de 74 emu/g de Fe₂O₃. L'aimantation à saturation est atteinte lorsque les moments magnétiques de toutes les particules sont parallèles et alignés dans la direction du champ magnétique appliqué. Cette sigmoïde peut être modélisée à l'aide de l'équation de Langevin décrit ci-dessous :

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

Avec M(H) l'aimantation sous un champ H, m_s l'aimantation volumique du matériau à saturation, ϕ la fraction volumique en particules dans la suspension, $\xi(H) = \mu_0 \cdot m_s \cdot VH/kT$ le paramètre de Langevin, μ_0 la perméabilité magnétique du vide ($4\pi \cdot 10^{-7}$ kg.m/A²/s²), k la constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23}$ m².kg/s²/K¹), T la température, et V le volume

d'une particule magnétique. ξ compare l'énergie d'un dipôle magnétique $m_s V$ soumis à un champ H à énergie thermique kT .

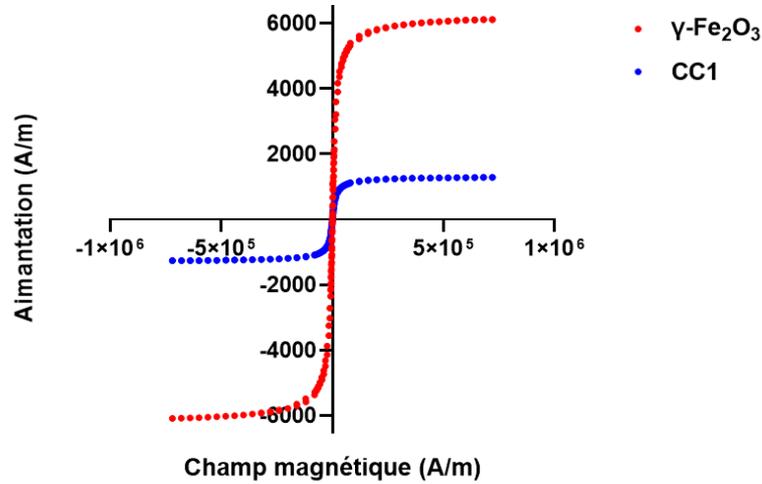


Figure 2.25. Courbe d'aimantation des nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (en rouge) et des nanoparticules cœur-coquilles **CC1** (en bleu). Les courbes d'aimantation des deux suspensions de nanoparticules ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et **CC1**) n'ont pas été réalisées à la même concentration en fer, ce qui explique la différence dans les valeurs de l'aimantation à saturation en A/m, observée sur le graphe.

L'estimation du diamètre des nanoparticules magnétiques par cette modélisation est de 11,3 nm avec un indice de polydispersité de 0,21, ce qui est en accord avec les valeurs obtenues en TEM.

La courbe d'aimantation a également été mesurée après encapsulation des nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dans la silice pour former les nanoparticules cœur-coquilles **CC1**. L'aimantation à saturation trouvée pour cette suspension de nanoparticules cœur-coquilles est de 66 emu/g de Fe_2O_3 ou 1315 A/m (figure 2.25, table 2.2). Les courbes d'aimantation des deux suspensions colloïdales n'ayant pas été réalisées à la même concentration en fer, les valeurs d'aimantation à saturation en A/m trouvées sont très différentes car dépendantes de la fraction volumique en fer. Cependant, la valeur d'aimantation à saturation pour les nanoparticules **CC1** est légèrement plus faible à celle trouvée pour les nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ non encapsulées une fois exprimée en emu/g de Fe_2O_3 .

	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	CC1
Atome de fer	2	2
Masse molaire (g/mol)	159,7	159,7
Densité	5,1	5,1
Concentration en fer par AAS (M)	1,07	0,25
Fraction volumique (%)	1,68	0,39
Aimantation à saturation (A/m)	6242	1315
Aimantation à saturation (emu/g de Fe_2O_3)	73	66

Table 2.2. Résumé des calculs des aimantations à saturation en emu/g de Fe_2O_3 pour les nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et les nanoparticules cœur-coquilles **CC1**.

2.3.3.1. Comparaison du pouvoir chauffant des nanoparticules de maghémite et des cœur-coquilles en solution

Les mesures de pouvoir chauffant des suspensions de nanoparticules sous champ magnétique alternatif (AMF) ont été réalisées par calorimétrie. Un suivi de température au cours du temps permet de remonter facilement à la SLP (Specific Loss Power) ou pouvoir chauffant des nanoparticules. Les mesures calorimétriques ont été réalisées à l'aide du Magnetherm™ (Nanotherics) comme présentées sur la figure 2.26.

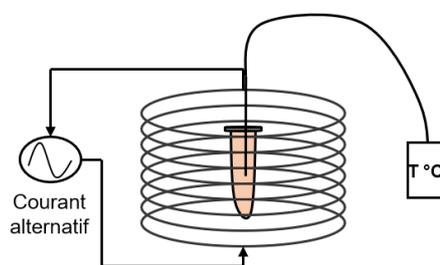


Figure 2.26. Montage expérimental des mesures de SLP en solution. La suspension colloïdale est disposée au milieu de la bobine magnétique où un champ magnétique alternatif est appliqué. La température de l'échantillon est suivie au cours de l'expérience par une fibre optique.

En pratique, une suspension de nanoparticules a été introduite au centre de la bobine magnétique et une stabilisation de la température a été réalisée en l'absence de champ magnétique pendant trente secondes. La température a été enregistrée grâce à une fibre optique placée au centre de l'échantillon tout au long de l'acquisition. Après stabilisation de la température, le champ magnétique alternatif a été appliqué pendant 2 minutes. La température a été mesurée également 30 secondes après l'arrêt du champ magnétique. Un échauffement de la bobine magnétique peut être observé au cours de la mesure, ce qui

pourrait conduire en absence de correction à une surestimation du pouvoir chauffant des nanoparticules. De ce fait, une évaluation de l'élévation de température d'une solution d'eau a été réalisée dans les mêmes conditions, et les valeurs obtenues ont été soustraites aux valeurs mesurées pour les suspensions de nanoparticules. Une courbe de variation de température ΔT (°C) de la suspension magnétique en fonction du temps a ainsi été obtenue (figure 2.27).

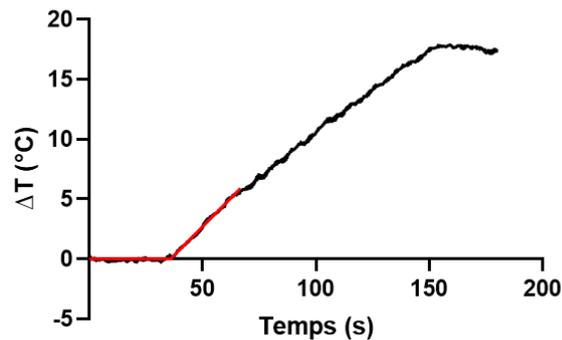


Figure 2.27. Détermination de la vitesse d'échauffement pour calculer la SLP. Variation de température en fonction du temps pour une suspension de nanoparticules de maghémite placée 2 min dans un champ magnétique créé par un courant de 11,2 A, une tension de 24,9 V et une fréquence de 535,0 kHz. En noir sont représentées les données expérimentales et en rouge le modèle de Box-Lucas.

La variation de la température au cours du temps a été modélisée à l'aide de l'équation de Box-Lucas, comme indiqué ci-dessous :¹⁶³

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

ΔT représente la variation de température mesurée, t le temps et t_0 le temps de début d'application du champ magnétique. On peut alors utiliser les paramètres d'ajustement A et λ pour calculer la SLP (exprimée en W/g) puisque $A\lambda = T_{ss}\tau^{-1} = P/C_p$ avec T_{ss} la température en régime permanent, τ le temps caractéristique du refroidissement du système, P la puissance des NPM et C_p la capacité calorifique du solvant utilisé, ici l'eau avec une capacité calorifique de 4,19 J/g/K.

La SLP peut alors être calculée avec l'équation suivante :

$$SLP = A. \lambda. C_p. \frac{1}{\phi_m}$$

Avec ϕ_m la fraction massique des nanoparticules $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, correspondant à :

$$\phi_m = \frac{m_{\text{particules}}}{m_{\text{échantillon}}}$$

La SLP dépend des propriétés physiques des nanoparticules magnétiques comme la taille et l'anisotropie magnétique. Elle dépend également très fortement des caractéristiques d'excitation magnétique comme la fréquence et l'amplitude du champ magnétique. Chaque mesure de SLP doit être reliée à ces paramètres (fréquence, courant, champ magnétique) pour pouvoir les comparer à d'autres expériences. En considérant une dépendance quadratique avec le champ magnétique H (en A/m) et une dépendance linéaire avec la fréquence f (mesurée en Hz) de stimulation magnétique ; une nouvelle grandeur a été proposée, appelée perte de puissance intrinsèque ou ILP (Intrinsic Loss Power, exprimée en $\text{m}^2 \cdot \text{nH}/\text{kg}$) qui consiste à normaliser la SLP par ces deux grandeurs. Ce paramètre permet une comparaison directe des expériences effectuées dans différentes conditions.¹⁶⁴ Cependant, il est à noter que ce paramètre ne peut être considéré comme constant que dans des régimes d'intensité de champ et de fréquence relativement faibles.^{34,163} L'ILP est donc défini comme suit :

$$ILP = \frac{SLP}{H^2 \cdot f}$$

Une étude de différentes combinaisons fréquence/champ magnétique a été réalisée sur les nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et sur les nanoparticules cœur-coquilles **CC1** pour déterminer la condition optimale d'hyperthermie magnétique en solution, c'est-à-dire pour avoir le plus grand pouvoir chauffant. Les deux suspensions de nanoparticules ont été étudiées à la même concentration ($[\text{Fe}] = 0,23 \text{ M}$), avec une bobine de 9 tours aux fréquences autour de 530 kHz, 750 kHz et 1000 kHz et avec une bobine de 17 tours aux fréquences autour de 110 kHz, 330 kHz, 470 kHz et 630 kHz. Un étalonnage du champ

magnétique a été réalisé pour chaque condition par Frédéric Gélébart (ingénieur d'étude intervenant dans l'équipe CIN, Laboratoire PHENIX) pour une précision plus juste lors des calculs de pouvoir chauffant. Les propriétés de chaque combinaison sont résumées dans la table 2.3.

Fréquence utilisée f (kHz)	Type de bobine	Courant (A)	Tension (V)	Champ magnétique mesuré H (mT)
111,0	17 tours	9,8	24,9	21,0
334,0	17 tours	7,7	31,8	14,0
471,5	17 tours	5,8	26,8	10,0
535,0	9 tours	11,2	24,9	13,0
629,5	17 tours	4,1	20,2	6,5
753,5	9 tours	7,4	18,5	8,0
1000,0	9 tours	3,7	27,4	3,0

Table 2.3. Résumé des différentes combinaisons fréquence/champ magnétique pour les expériences d'hyperthermie, avec le type de bobine, le courant et la tension utilisés.

Une courbe de l'élévation de la température en fonction du temps a été obtenue pour chaque fréquence après stimulation sous champ magnétique alternatif. Les différentes courbes pour les nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et pour les nanoparticules cœur-coquilles **CC1** sont représentées figure 2.28a et figure 2.28b respectivement. Pour chaque courbe, une valeur de SLP a été déterminée (table 2.4).

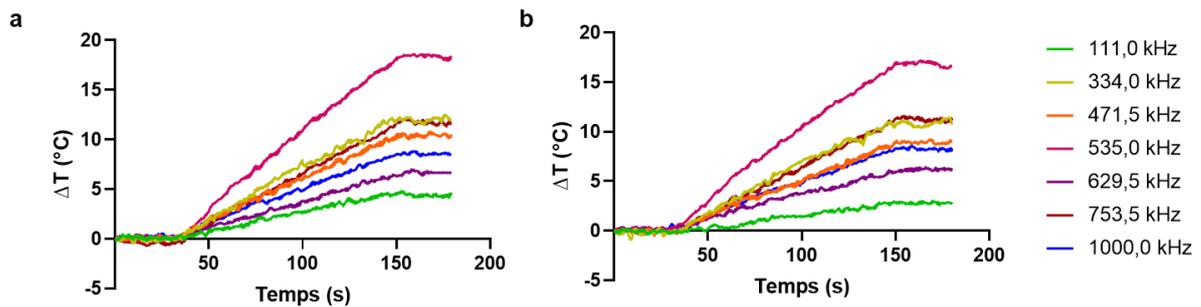


Figure 2 .28. Variation de température (ΔT) en fonction du temps pour les suspensions de nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (a) et de cœur-coquilles **CC1** (b) à une concentration en fer de 0,23 M placées 2 min dans un champ magnétique alternatif à 111,0 kHz (21,0 mT) ; 334,0 kHz (14,0 mT) ; 471,5 kHz (10,0 mT) ; 535,0 kHz (13,0 mT) ; 629,5 kHz (6,5 mT) ; 753,5 kHz (8,0 mT) ; 1000,0 kHz (3,0 mT).

L'élévation de température la plus importante a été trouvée pour la fréquence de 535,0 kHz que ce soit pour les nanoparticules $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et pour les NP cœur-coquilles **CC1**. De façon intéressante, quelle que soient les fréquences utilisées, les élévations de température mesurées sont similaires pour les nanoparticules $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et les nanoparticules cœur-coquilles. L'encapsulation des nanoparticules de maghémite dans la silice n'influe donc pas sur leur pouvoir chauffant. Les résultats de SLP et ILP sont résumés dans la table 2.4. Une SLP de 43,7 W/g Fe_2O_3 et 37,4 W/g Fe_2O_3 a été calculée respectivement pour les nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et les cœur-coquilles **CC1** à 535 kHz (13 mT).

Fréquence f utilisée (kHz)	Champ magnétique H mesuré (mT)	ΔT (°C) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	ΔT (°C) CC1	SLP (W/g Fe_2O_3) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	SLP (W/g Fe_2O_3) CC1	ILP (m ² .nH/kg) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	ILP (m ² .nH/kg) CC1	f.H ² (x10 ¹⁰ kHz.A ² /m ² /s ²)
111,0	21,0	4,2	4,3	10,0	10,0	0,32	0,32	3,1
334,0	14,0	12,0	10,5	26,5	24,5	0,63	0,59	4,2
471,5	10,0	10,3	9,2	22,5	22,0	0,76	0,74	3,0
535,0	13,0	18,6	18,4	43,7	37,4	0,76	0,65	5,8
629,5	6,5	6,8	6,2	13,6	13,1	0,74	0,77	1,7
753,5	8,0	12,4	11,1	28,5	22,9	0,92	0,74	3,1
1000,0	3,0	8,5	7,5	18,4	20,2	3,19	3,50	5,8

Table 2.4. élévation de température (ΔT), valeurs de SLP et d'ILP calculées après acquisition de l'élévation de la température des nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et des NP cœur-coquilles **CC1** sous champ magnétique alternatif.

La SLP peut dépendre linéairement du produit $f.H^2$, et c'est en divisant la SLP par ce produit que la valeur d'ILP est calculée. Une variation de la SLP en fonction du produit $f.H^2$ est représentée figure 2.29a. La dépendance de la SLP par le produit $f.H^2$ est une approximation en régime linéaire (bas champ) en considérant que la dissipation magnétique $\chi''(f)$, dépendant également de la fréquence, est constante à bas champ. Néanmoins, à haute fréquence, une augmentation de $\chi''(f)$ peut apparaître, l'approximation de la dépendance linéaire de la SLP en $f.H^2$ n'est alors plus valable (valeur de SLP trouvée à une fréquence de 1000 kHz) (figure 2.29a). A champ fort (21 mT, à une fréquence de 111 kHz), l'approximation linéaire n'est également plus respectée, du fait de la non linéarité de la courbe d'aimantation qu'il faudrait prendre en compte pour avoir une meilleure représentation. Après élimination de ces deux points extrêmes, la dépendance linéaire de la SLP est bien confirmée (figure 2.29b).

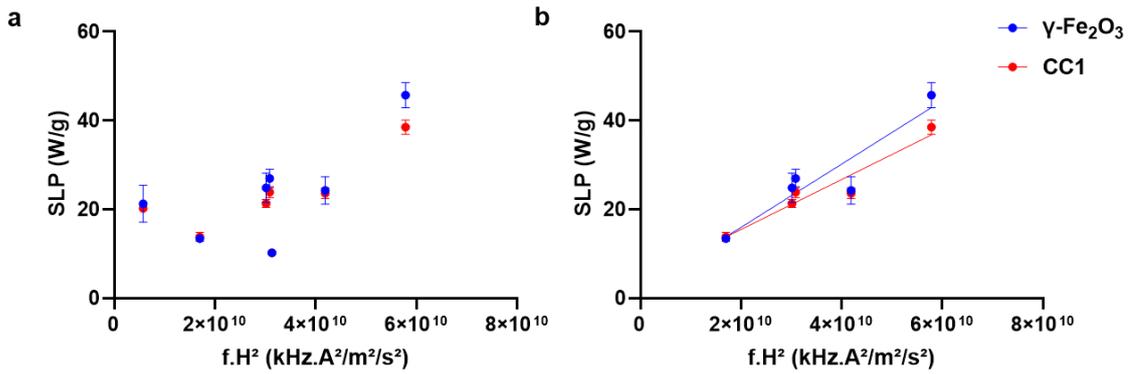


Figure 2.29. Dépendance des valeurs de SLP avec le champ magnétique H et la fréquence f. a) Graphique avec les différentes valeurs de fréquence utilisées : 111,0 kHz (21,0 mT) ; 334,0 kHz (14,0 mT) ; 471,5 kHz (10,0 mT) ; 535,0 kHz (13,0 mT) ; 629,5 kHz (6,5 mT) ; 753,5 kHz (8,0 mT) ; 1000,0 kHz (3,0 mT). b) Graphique ne tenant pas compte des valeurs obtenues à fréquence élevée (1000 kHz) et à champ fort (21,0 mT à une fréquence de 111 kHz).

Comme mentionné précédemment, les valeurs d'ILP devraient être indépendantes du champ magnétique appliqué et de la fréquence utilisée. L'approximation de l'ILP n'est possible que lorsque la SLP varie linéairement avec $f \cdot H^2$, c'est pour cela que les valeurs obtenues à champ fort ou fréquence élevée n'ont pas été prises en compte. La figure 2.30 correspond aux valeurs d'ILP calculées pour les différents échantillons en fonction du produit de la fréquence et du champ magnétique au carré. Ce graphe montre des valeurs d'ILP relativement constantes, avec une valeur autour de 0,8 m².nH/kg, confirmant l'utilisation de l'ILP pour comparer des échantillons à différentes fréquences et à différents champs.

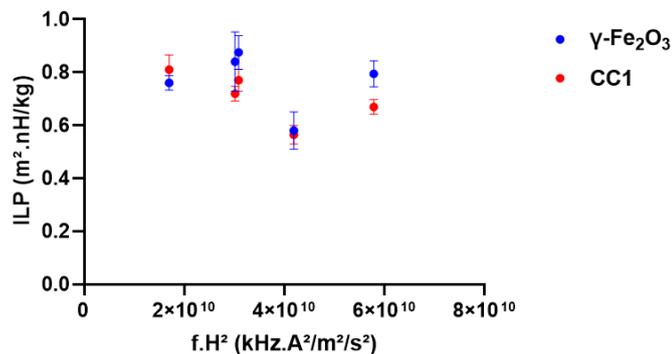


Figure 2.30. Comparaison de l'ILP dans les différentes conditions avec les nanoparticules de maghémite γ -Fe₂O₃ et les nanoparticules de cœur-coquilles CC1. Indépendance de l'ILP avec le produit du champ magnétique H² et de la fréquence f.

En conclusion, le pouvoir chauffant le plus important pour les nanoparticules de maghémite et les cœur-coquilles a été trouvé à une fréquence située autour de 530 kHz (champ magnétique de 13 mT), avec des SLP de 43,7 W/g et 37,4 W/g respectivement. Cette fréquence pourra être utilisée pour de futures expériences sur cellules.

Pour comparaison, Horny *et al.* ont rapporté des valeurs d'ILP pour des NP $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ sphériques et de forme allongée. Ils ont obtenu une ILP de 0,88 $\text{m}^2\cdot\text{nH}/\text{kg}$ pour les NP de maghémite non enrobées (de diamètre 12 nm, mesuré en TEM), ce qui est comparable aux NP de maghémite que nous avons synthétisées. L'ILP de leurs NP cœur-coquilles $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$ sphériques est de 1,06 $\text{m}^2\cdot\text{nH}/\text{kg}$, correspondant au même ordre de grandeur que celui trouvé pour les NP cœur-coquilles que nous avons synthétisées. Cependant leurs NP de forme allongée (avec un cœur magnétique atteignant 60 nm de longueur) présentent une ILP de 1,37 $\text{m}^2\cdot\text{nH}/\text{kg}$, légèrement supérieure à l'ILP des NP sphériques.⁴¹

2.4. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules cœur-coquilles avec l'alcyne contraint

Les nanoparticules cœur-coquilles **CC1** synthétisées présentent les caractéristiques requises pour leur application biologique, incluant notamment une taille optimale des cœurs magnétiques (11 nm) et un pouvoir chauffant conservé après encapsulation des nanoparticules dans la silice. Il a été choisi d'introduire un alcyne contraint à la surface des nanoparticules cœur-coquilles **CC1** afin de greffer covalamment les azidopeptides précédemment synthétisés, par réaction de chimie click SPAAC (strain promoted azide alkyne cycloaddition).

La fonctionnalisation des nanoparticules cœur-coquilles **CC1** a donc été poursuivie dans un premier temps par l'introduction à leur surface d'un groupement bio-orthogonal correspondant à un alcyne contraint (la dibenzocyclooctyne ou DBCO). Schöneborn *et al.* ont établi un protocole de greffage du DBCO à la surface des NP cœur-coquilles $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$, leurs NP cœur-coquilles mesurant environ 50 nm de diamètre (mesure en TEM).⁸⁸ Nous avons adapté ce protocole, en utilisant le même réactif, le NHS-PEG₄-DBCO.

Cette fonctionnalisation est effectuée facilement par réaction des groupes amine greffés à l'étape précédente avec le réactif bi-fonctionnel commercial NHS-PEG₄-DBCO (figure 2.31). Cette molécule comporte un court espaceur de type PEG₄ qui permettra de minimiser le masquage des groupes DBCO sur la surface des cœur-coquilles. Après 1 heure de réaction, le mélange a été purifié sur colonne d'exclusion stérique pour enlever le DBCO n'ayant pas réagi.

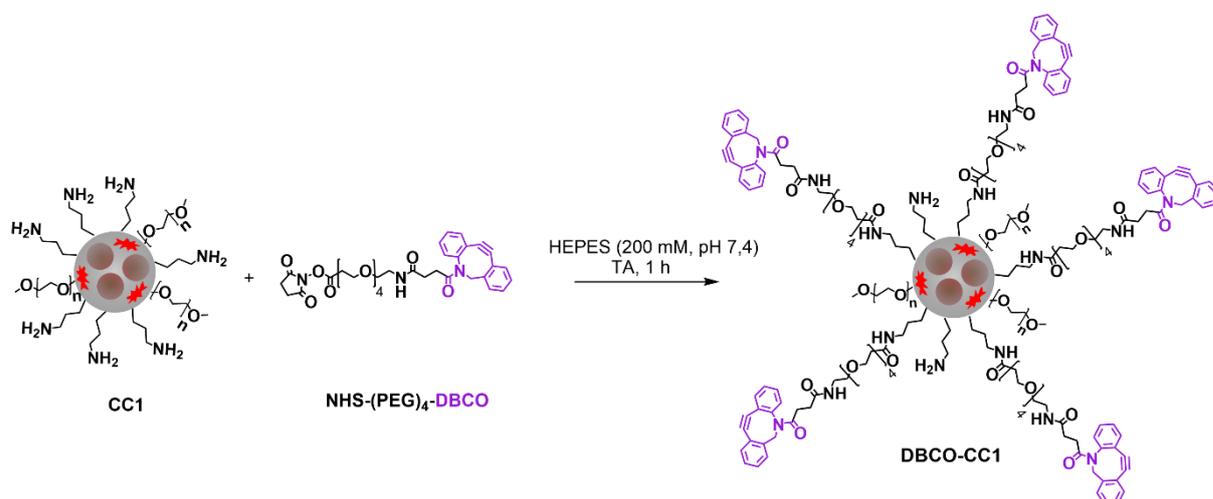
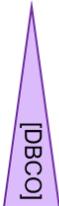


Figure 2.31. Fonctionnalisation des nanoparticules cœur-coquilles **CC1** avec un alcyne contraint, le dibenzocyclooctyne (DBCO) afin d'obtenir les NP cœur-coquilles **DBCO-CC1**.

L'introduction d'un nombre important de groupements DBCO à la surface des NP cœur-coquilles devrait permettre par la suite le greffage d'une plus grande quantité de peptide. C'est pour cette raison que plusieurs conditions de réaction, en terme d'équivalent de réactif NHS-PEG₄-DBCO utilisé par rapport à la quantité de fonctions amine présentes à la surface des NP, ont été testées pour optimiser cette étape (table 2.5). Dans tous les cas, le réactif NHS-PEG₄-DBCO a été ajouté en défaut par rapport à la quantité d'amines présentes à la surface des NP, pour garder une charge globale positive des NP cœur-coquilles et éviter leur déstabilisation. La concentration en amines utilisée pour nos calculs est celle mesurée lors du précédent dosage par la fluorescamine ($C_{NH_2} = 3,36$ mM). Pour évaluer l'efficacité de greffage du réactif comportant le DBCO sur les nanoparticules, un second dosage à la fluorescamine a été réalisé dans les mêmes conditions, pour cette fois-ci déterminer le nombre d'amines n'ayant pas réagi après réaction avec le réactif NHS-PEG₄-DBCO (table 2.5).

Le résultat du dosage à la fluorescamine à l'issue de la réaction, montre que quel que soit le nombre d'équivalent de NHS-PEG₄-DBCO utilisé, on observe peu de variation du nombre d'amines restantes, avec environ 5 700 amines par nanoparticule cœur-coquille et une densité de l'ordre de 1,7 NH₂/nm² (table 2.5).



NHS-PEG ₄ - DBCO (equiv.)	Ratio molaire NH ₂ :NHS-PEG ₄ - DBCO	Nombre NH ₂ par DBCO-CC1 théorique	Nombre NH ₂ par DBCO-CC1 expérimental
0,03	35,4:1	1,03.10 ⁴	5,70.10 ³
0,06	17,7:1	9,96.10 ³	5,35.10 ³
0,09	11,8:1	9,66.10 ³	5,71.10 ³
0,11	8,8:1	9,36.10 ³	5,35.10 ³
0,14	7,0:1	9,06.10 ³	6,25.10 ³
0,17	5,9:1	8,76.10 ³	5,79.10 ³

Table 2.5. Bilan du dosage avec la fluorescamine des fonctions amine présentes sur les NP cœur-coquilles après greffage du NHS-PEG₄-DBCO pour obtenir les NP **DBCO-CC1**. C_{NH_2} = concentration en fonctions amine dans la solution de NP de cœur-coquille après greffage du NHS-PEG₄-DBCO, $C_{DBCO-CC1}$ = concentration en NP cœur-coquilles **DBCO-CC1**, nombre NH₂ par **DBCO-CC1** théorique (= $C_{NH_2}/C_{DBCO-CC1}$ théorique) = nombre de fonctions amine présentes à la surface des NP cœur-coquilles **DBCO-CC1** si la réaction avec le réactif NHS-PEG₄-DBCO est totale, nombre NH₂ par **DBCO-CC1** expérimental (= $C_{NH_2}/C_{DBCO-CC1}$ expérimental) = quantité de fonctions amine présentes à la surface des NP cœur-coquilles **DBCO-CC1** mesurée avec le dosage à la fluorescamine.

Par ailleurs, une diminution de 54 % des amines est observée par comparaison avec les valeurs obtenues avant greffage du DBCO (qui étaient en moyenne de 10 600 amines par composite et 2,0 NH₂/nm², table 2.1). De façon surprenante, les valeurs expérimentales du nombre d'amines par NP **DBCO-CC1** n'ayant pas réagi lors du greffage du réactif NHS-PEG₄-DBCO sont très inférieures aux valeurs attendues (valeurs théoriques calculées en considérant le greffage de toutes les molécules du réactif bi-fonctionnel introduites). La comparaison entre valeurs expérimentales et théoriques correspondrait à une efficacité de greffage comprise entre 140 et 190 % en fonction de la quantité de NHS-PEG₄-DBCO ajoutée. Cela suggère que le DBCO, du fait de son encombrement stérique, empêche la fluorescamine d'atteindre et de réagir avec les amines libres restantes à la surface des cœur-coquilles. Le dosage à la fluorescamine n'est donc pas adapté à ce système, néanmoins, il permet de confirmer que le DBCO a été greffé à la surface des NP cœur-coquilles, du fait de la diminution de la quantité d'amine accessible à la fluorescamine mais ne permet pas sa quantification. Une agrégation des

nanoparticules **DBCO-CC1** commence à être observée après quelques semaines pour les nanoparticules obtenues avec 0,17 et 0,14 équivalents de NHS-PEG₄-DBCO. Il a donc été décidé que les NP obtenues avec 0,11 équivalent du réactif NHS-PEG₄-DBCO (correspondant au ratio 8,8:1 (NH₂:NHS-PEG₄-DBCO) introduit) seraient utilisées pour la suite de la fonctionnalisation.

Le greffage du DBCO, introduit en défaut par rapport à la quantité totale d'amines initialement greffées sur les nanoparticules, n'a pas modifié la charge globale de surface, les nanoparticules cœur-coquilles sont toujours chargées positivement avec une charge moyenne de + 18 mV. De plus, le diamètre hydrodynamique des nanoparticules cœur-coquilles augmente très légèrement après ajout du DBCO et est similaire quel que soit le nombre d'équivalent de NHS-PEG₄-DBCO utilisé (figure 2.32).

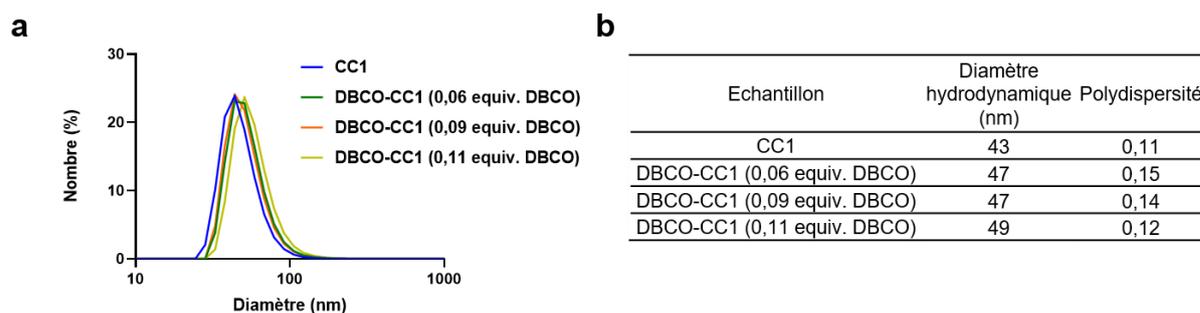


Figure 2.32. a) Comparaison du diamètre hydrodynamique par DLS entre les NP cœur-coquilles **CC1** et **DBCO-CC1** obtenues avec différents équivalents du lien NHS-PEG₄-DBCO ajoutés. b) Résultats obtenus pour les différents échantillons de **DBCO-CC1**, chaque analyse est la moyenne de 12 runs. Le diamètre hydrodynamique provient de la représentation en nombre.

En conclusion, le greffage du DBCO à la surface des nanoparticules cœur-coquilles est efficace et sera considéré total mais n'a pas pu être quantifié.

2.5. Greffage des peptides sur les nanoparticules cœur-coquilles par chimie click sans cuivre

Les azidopeptides (**CF-R9**, **CF-H4**) synthétisés précédemment ont été greffés sur les NP cœur-coquilles fonctionnalisées avec le DBCO (**DBCO-CC1**), par réaction de chimie click sans cuivre, pour générer les conjugués peptide-nanoparticule **CF-R9-CC1** et **CF-H4-CC1** souhaités (figure 2.33). L'utilisation de nanoparticules contenant de la rhodamine et des

peptides fonctionnalisés avec la carboxyfluorescéine a permis par la suite de contrôler le greffage covalent entre les deux entités lors d'expériences de microscopie à fluorescence après internalisation cellulaire.

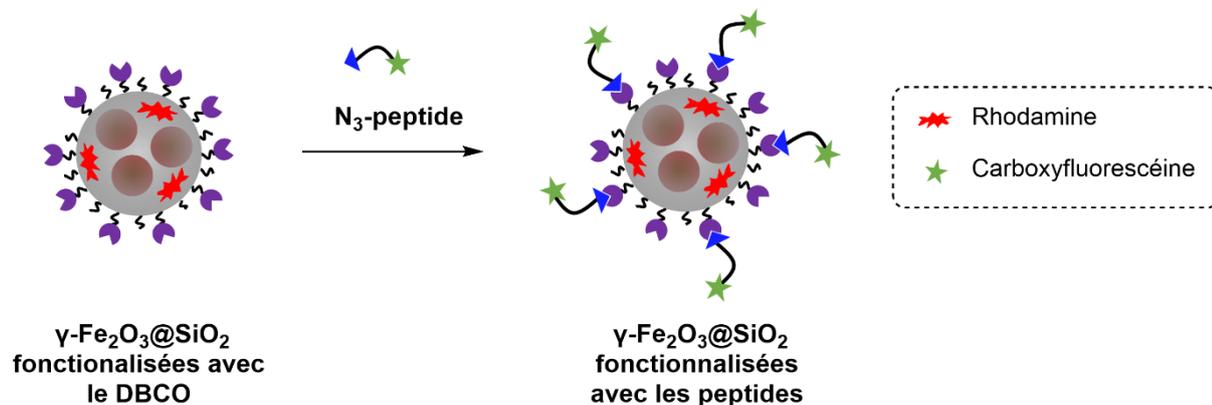


Figure 2.33. Représentation de la réaction de chimie click SPAAC entre la cyclooctyne (DBCO) greffée à la surface des nanoparticules cœur-coquilles et les azidopeptides ($\text{N}_3\text{-peptide}$).

2.5.1. Optimisation de la conjugaison des cœur-coquilles avec le peptide R9

L'optimisation du greffage du peptide par chimie click sur les nanoparticules cœur-coquilles a été effectuée avec le peptide polyarginine. Dans un premier temps les nanoparticules **DBCO-CC1** présentant à leur surface des fonctions NH_2 et DBCO dans un rapport théorique 8,8:1 (ou 0,11 équivalent de NHS-PEG₄-DBCO introduit) ont été choisies. Un rapport molaire 2:1 (DBCO:peptide- N_3) a été utilisé. De plus, pour minimiser l'impact de la carboxyfluorescéine dans le processus d'internalisation cellulaire, il a été décidé de faire réagir les nanoparticules **DBCO-CC1** avec un mélange 1:9 de peptide fonctionnalisé par la carboxyfluorescéine (**CF-R9**) et de peptide non fluorescent (**R9***), comme indiqué figure 2.34. La réaction a été laissée 15 heures à température ambiante puis l'échantillon a été purifié. Nous avons dans un premier temps tenté de purifier les NP ainsi obtenues, sur une colonne d'exclusion stérique Sephadex en utilisant un tampon HEPES (200 mM, pH 7,4) pour l'élution, afin d'éliminer l'excès de peptide n'ayant pas réagi.

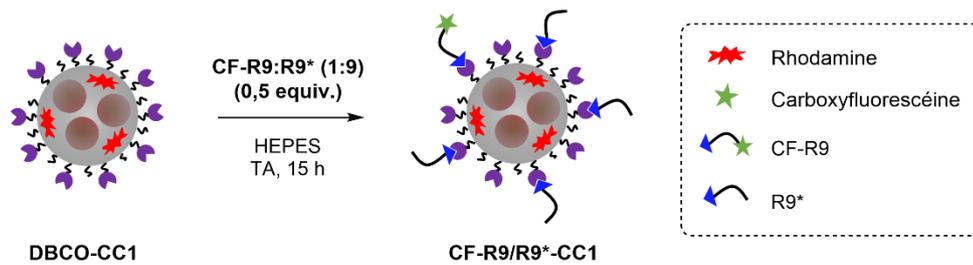


Figure 2.34. Représentation du premier essai de synthèse des composés CF-R9/R9*-CC1.

Le conjugué peptides-nanoparticules **CF-R9/R9*-CC1** ainsi obtenu a ensuite été incubé avec des cellules d'ovaires d'hamster chinois (CHO-K1) pendant 1 heure puis les cellules ont été lavées avec du milieu de culture (DMEM-F12 sans sérum) et fixées avant observation en microscopie de fluorescence.

Les images de microscopie obtenues montrent une fluorescence ponctuelle pour la rhodamine, indiquant des cœur-coquilles essentiellement présentes dans les endosomes (figure 2.35). Aucun signal de la rhodamine n'est observé au niveau des noyaux des cellules. A l'inverse, une fluorescence cytosolique diffuse est visualisée pour la carboxyfluorescéine, faisant penser à des peptides libres dans le cytosol. Les peptides sont également observés dans le noyau, en particulier au niveau des nucléoles. La superposition des images indique une colocalisation très faible, uniquement partielle, des cœur-coquilles (rhodamine) et des peptides (carboxyfluorescéine). Ces images suggèrent que les peptides **CF-R9** qui étaient présents à la surface des NP cœur-coquilles n'étaient pas tous covalamment attachés aux nanoparticules. La purification par chromatographie d'exclusion stérique des nanoparticules n'aurait donc pas permis d'éliminer efficacement les peptides uniquement adsorbés sur les nanoparticules cœur-coquilles. Il est possible par contre qu'en contexte cellulaire, ces espèces adsorbées en surface aient été relarguées dans le milieu. Il est à noter qu'étant donné la structure de nos conjugués, l'action de protéases intracellulaires ne conduirait pas au détachement de la carboxyfluorescéine des peptides greffés sur les nanoparticules.

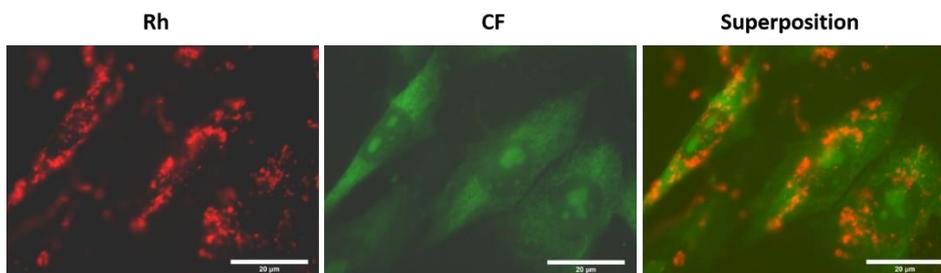


Figure 2.35. Images obtenues par microscopie à fluorescence de cellules CHO-K1 après incubation pendant 1 h avec les NP **CF-R9/R9*-CC1** (1,0 mM en fer) purifiées par colonne d'exclusion stérique. La rhodamine (cœur-coquilles) et la carboxyfluorescéine (peptides) ne présentent qu'une faible colocalisation, suggérant que les peptides n'ayant pas réagi lors de la réaction de chimie click n'ont pas été bien éliminés par passage sur colonne d'exclusion. La rhodamine est représentée en rouge et la carboxyfluorescéine en vert. Barres d'échelle : 20 µm.

A l'issue de ce résultat, nous avons effectué des expériences de contrôle pour vérifier si les fonctions azotures des peptides **R9*** et **CF-R9** présentent une bonne réactivité. Celles-ci ont consisté à faire la ligation par chimie click en solution des deux peptides avec un composé modèle, la DIBO-biotine pour permettre un suivi par HPLC analytique de la réaction. On s'attend pour chacune de ces réactions à la formation de deux isomères représentés figure 2.36.

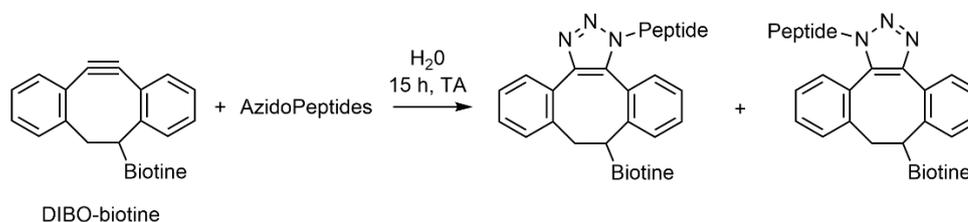


Figure 2.36. Réaction de la dibenzocyclooctynol (DIBO)-biotine avec les azidopeptides **CF-R9** et **R9***.

Le couplage de la DIBO-biotine a d'abord été entrepris avec le peptide **R9*** pendant 15 heures dans de l'eau. En fin de réaction, le mélange réactionnel brut a été analysé par HPLC analytique en phase inverse. Cette analyse montre que pratiquement tout le produit de départ **R9*** a été converti (figure 2.37). Le signal HPLC obtenu après réaction donne deux pics avec des temps de rétention différents de celui du peptide **R9*** de départ. Après vérification par spectrométrie de masse MALDI-TOF, les deux pics obtenus correspondent bien aux deux produits de couplage attendus.

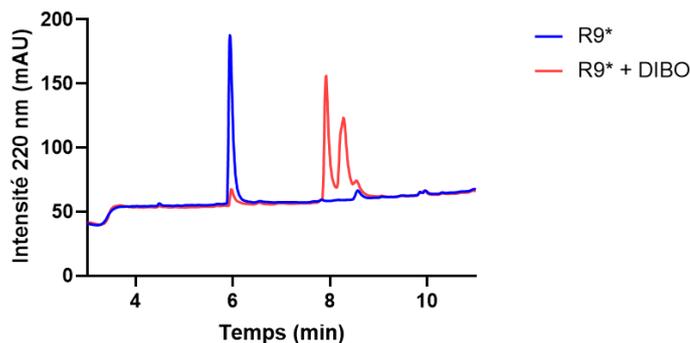


Figure 2.37. Chromatogrammes d’HPLC analytique à 220 nm. Superposition des chromatogrammes du peptide **R9*** de départ et du produit brut de couplage **R9*/DIBO**-biotine après 15 h de réaction. Les analyses ont été réalisées avec une colonne RP-C18, utilisant un débit de 1 mL/min et suivant un gradient 1-50 % de B dans A en 10 min (A = 0,1 % TFA dans H₂O, B = 0,1 % TFA dans acétonitrile).

La même expérience a été réalisée avec le peptide **CF-R9** et la DIBO-biotine. Le chromatogramme HPLC indique également la présence de deux pics ayant des temps de rétention très proches, qui correspondent aux deux produits isomères de couplage. L’absence de pic correspondant au peptide **CF-R9** de départ montre que la réaction est totale (figure 2.38).

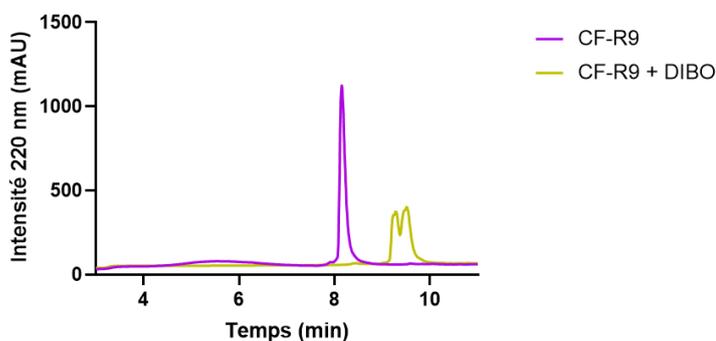


Figure 2.38. Chromatogrammes d’HPLC analytique à 220 nm. Superposition des chromatogrammes du peptide **CF-R9** et du mélange **CF-R9/DIBO**-biotine après 15 h de réaction. Les analyses ont été réalisées avec une colonne RP-C18, utilisant un débit de 1 mL/min et suivant un gradient 1-50 % de B dans A en 10 min (A = 0,1 % TFA dans H₂O, B = 0,1 % TFA dans acétonitrile).

Une expérience supplémentaire a été réalisée, en faisant cette fois-ci réagir un mélange 1:1 des peptides **CF-R9** et **R9*** avec la DIBO-biotine. Après 15 heures de réaction, le chromatogramme HPLC montre quatre pics, avec des temps de rétention comparables aux produits de réaction obtenus lors des réactions entre la DIBO-biotine et **CF-R9** ou **R9***

(figure 2.39). L'absence de pic correspondant aux peptides n'ayant pas réagi avec la DIBO-biotine est à noter.

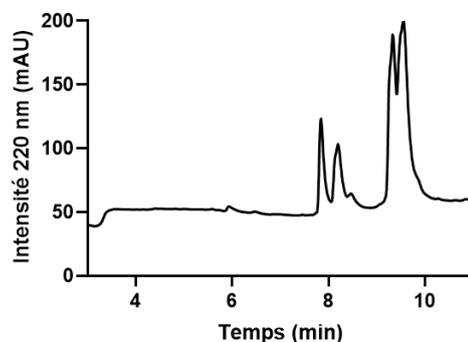


Figure 2.39. Chromatogramme d'HPLC analytique à 220 nm du mélange réactionnel contenant les azidopeptides **R9***, **CF-R9** et la DIBO-biotine. Le chromatogramme est obtenu après 15 h de réaction. L'analyse a été réalisée avec une colonne RP-C18, utilisant un débit de 1 mL/min et suivant un gradient 1-50 % de B dans A en 10 min (A = 0,1 % TFA dans H₂O, B = 0,1 % TFA dans acétonitrile).

Ces résultats confirment l'intégrité et la bonne réactivité, par chimie click en solution, de la fonction azoture des deux peptides **CF-R9** et **R9***. De plus, lors de la mise en présence simultanée des peptides avec la DIBO-biotine, aucun phénomène de compétition entre les deux peptides n'a été observé. Le peptide **CF-R9** pourrait en effet être stériquement plus encombré que **R9*** du fait de la présence de la carboxyfluorescéine, mais les deux peptides semblent réagir de façon similaire et totale avec la DIBO-biotine dans les conditions testées. Il est important de noter que ces réactions contrôlées ont été effectuées en solution, la réactivité à la surface des NP cœur-coquilles peut bien sûr être différente du fait de l'attachement de l'alcyne contraint sur la silice.

La deuxième tentative de greffage du peptide R9 à la surface des nanoparticules cœur-coquilles par chimie click a été réalisée en présence du peptide fluorescent **CF-R9** seul pour permettre la mise au point des conditions de réaction et de purification du conjugué peptide-nanoparticule, comme indiqué figure 2.40.

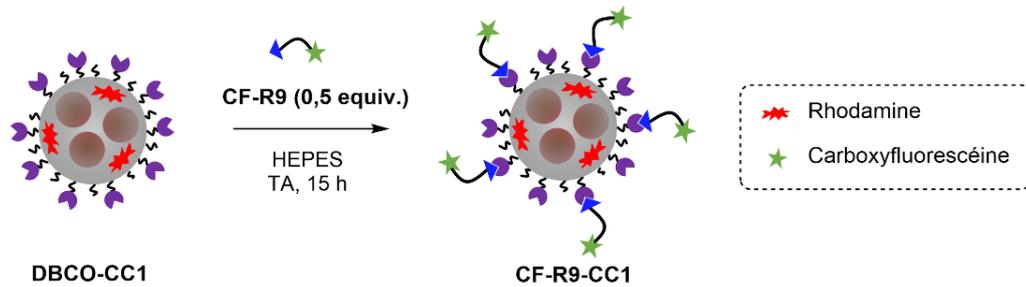


Figure 2.40. Fonctionnalisation des NP cœur-coquilles **DBCO-CC1** par chimie click avec le peptide **CF-R9** pour donner **CF-R9-CC1**.

L'élimination des azidopeptides n'ayant pas réagi après réaction de chimie click avec les nanoparticules **DBCO-CC1** s'était avérée critique lors de notre première expérience de greffage. La deuxième tentative de purification des nanoparticules a cette fois-ci été réalisée par ultrafiltration (Nanosep, 10 kD) en utilisant un tampon HEPES (200 mM, pH 7,4) contenant de l'EDTA (2 mM). Le greffage covalent et l'élimination totale du peptide lié de manière non covalente aux NP cœur-coquilles ont été vérifiés après incubation des nanoparticules avec des cellules CHO-K1 et visualisation des marqueurs rhodamine et carboxyfluorescéine par microscopie confocale, avec ou sans fixation des cellules. Les cellules CHO-K1 ont été incubées avec les nanoparticules **CF-R9-CC1** pendant 2 heures à une concentration en fer de 1,0 mM (cellules fixées au paraformaldéhyde) ou 0,56 mM (cellules vivantes) dans du milieu de culture (DMEM). Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du DMEM, trois fois avec du HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) et imagées.

Les images de microscopie confocale diffèrent énormément de celle obtenues après notre première expérience de greffage (figure 2.35) en ce qui concerne la localisation intracellulaire du peptide **CF-R9**. Nos nouvelles images de microscopie montrent une excellente colocalisation de la rhodamine et de la carboxyfluorescéine dans le cas de cellules vivantes et fixées, suggérant cette fois-ci la bonne élimination des espèces peptidiques adsorbées (figures 2.41 et 2.42).

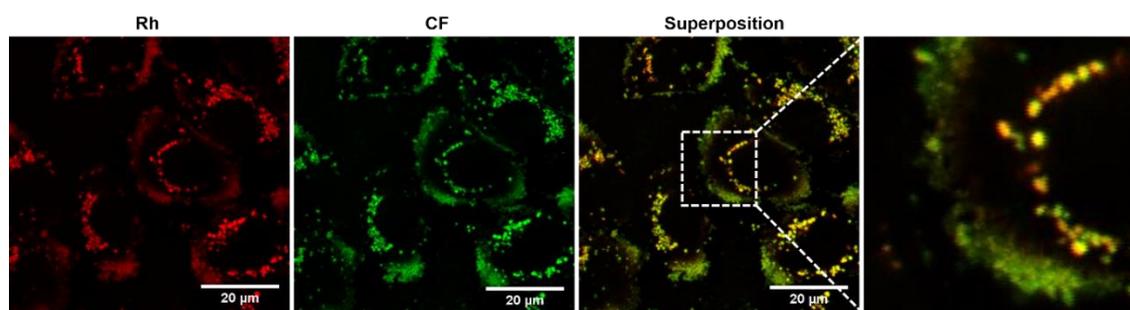


Figure 2.41. Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules vivantes dans des cellules CHO-K1 après incubation à 37 °C avec **CF-R9-CC1** (0,56 mM en fer) pendant 2 h. Les images montrent une colocalisation de la rhodamine (NP cœur-coquilles **CC1**) et de la carboxyfluorescéine (azidopeptide **CF-R9**), confirmant le greffage covalent des azidopeptides sur les nanoparticules cœur-coquilles et l'élimination totale des peptides n'ayant pas réagi. La rhodamine est représentée en rouge et la carboxyfluorescéine en vert. Barres d'échelle : 20 µm.

Il a été rapporté précédemment dans la littérature que la fixation des cellules pouvait induire une relocalisation artéfactuelle des CPP, des espèces présentes dans les endosomes pouvant être redistribuées dans le cytosol et le noyau.¹⁶⁵ On s'attend à ce que ce phénomène de redistribution artéfactuelle soit particulièrement important dans le cas du peptide R9, celui-ci ne pouvant réagir avec le paraformaldéhyde utilisé dans l'étape de fixation. En revanche, les NP cœur-coquilles contiennent des amines libres à leur surface et devraient donc être capables de réagir avec le paraformaldéhyde, permettant leur « réelle » fixation. Il est à noter que dans notre deuxième expérience, les cœur-coquilles et les peptides sont visualisés très majoritairement dans des vésicules, suggérant qu'aucun phénomène de redistribution artéfactuelle n'a lieu pour les NP et les peptides covalamment liés à leur surface (figure 2.42).

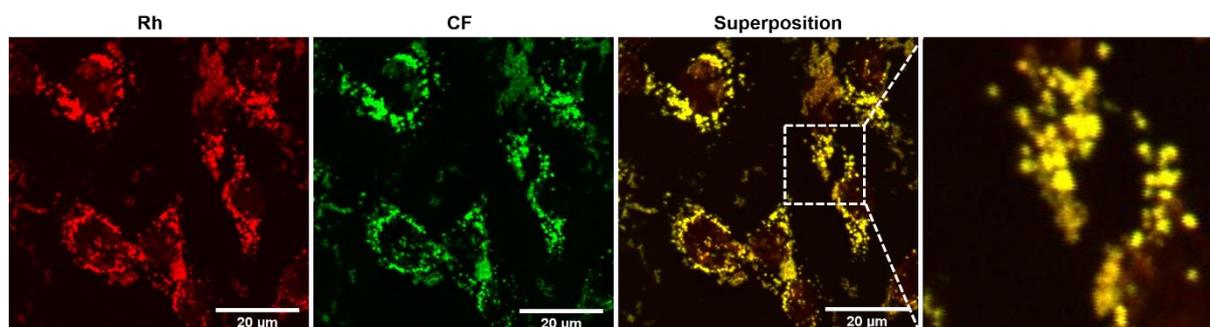


Figure 2.42. Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules fixées dans des cellules CHO-K1 après incubation à 37 °C avec nanoparticules **CF-R9-CC1** (1 mM en fer) pendant 2 h. La rhodamine est représentée en rouge et la carboxyfluorescéine en vert. Barres d'échelle : 20 µm.

A partir de ces images il est possible d'obtenir un histogramme d'intensité de fluorescence 2D entre les images obtenues pour le canal rhodamine et le canal carboxyfluorescéine (figure 2.43). Le traitement de ces images a été réalisé sur imageJ, permettant d'obtenir le coefficient de corrélation de Pearson (PCC). Ce coefficient, noté r , est utilisé pour quantifier le degré de colocalisation entre deux fluorophores. Cette mesure de corrélation a été développée par Karl Pearson à partir des idées introduites par Francis Galton à la fin du 19^{ème} siècle, bien que plus récemment utilisée pour la mesure de colocalisation entre deux fluorophores.^{166,167} Cette valeur est comprise entre 0 (absence de corrélation) et 1 (corrélation parfaite). Les valeurs absolues $1 \leq r \leq 0,7$ indiquent une corrélation relativement forte ; $0,69 \leq r \leq 0,36$ indiquent une corrélation modérée ; $0,35 \leq r \leq 0,2$ indiquent une corrélation faible et $r \leq 0,2$ indiquent une absence de corrélation. Le PCC permet alors de quantifier le degré de colocalisation entre la rhodamine et la carboxyfluorescéine sur deux images, permettant d'évaluer l'efficacité de greffage covalent des peptides à la surface des nanoparticules. La valeur du PCC est calculée avec l'équation suivante :

$$r = \frac{\sum(R_i - R_{av}) \cdot (G_i - G_{av})}{\sqrt{\sum(R_i - R_{av})^2 \cdot \sum(G_i - G_{av})^2}}$$

Avec R_i l'intensité du premier fluorophore dans les pixels individuels et R_{av} la moyenne arithmétique, alors que G_i et G_{av} sont les intensités correspondantes pour le deuxième fluorophore dans les mêmes pixels.

Après analyse des images par le logiciel imageJ, un histogramme de nuage de points des intensités des pixels rouges (pour la rhodamine) et verts (pour la carboxyfluorescéine) des deux images à étudier est représenté, comme illustré figure 2.43. Cet histogramme a été obtenu grâce aux images (canal rhodamine et canal carboxyfluorescéine) des cellules incubées avec **CF-R9-CC1** après fixation des cellules (figure 2.42).

La valeur de PCC obtenue pour **CF-R9-CC1** est $r = 0,94 \pm 0,01$ avec les cellules fixées et $r = 0,94 \pm 0,02$ sur cellules vivantes, suggérant une fonctionnalisation réussie des nanoparticules cœur-coquilles avec le CPP. La purification par ultrafiltration en présence d'un tampon HEPES contenant de l'EDTA a ainsi permis d'éliminer efficacement les peptides qui étaient seulement adsorbés à la surface de la silice.

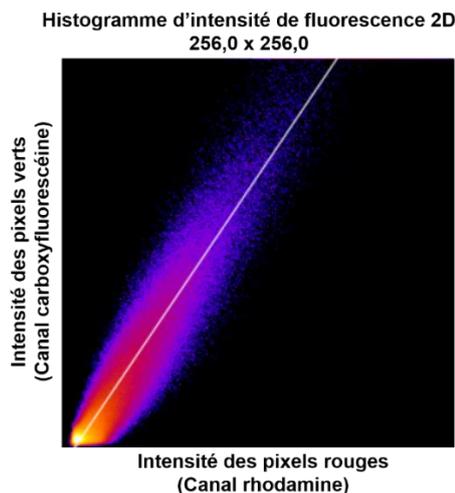


Figure 2.43. Histogramme d'intensité de fluorescence 2D entre les images de microscopie confocale obtenues dans les canaux de rhodamine (Rh) et de carboxyfluorescéine (CF) pour les cellules fixées (figure 2.42). L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ, avec l'option coloc2.

Cette étude sur cellules suggère une entrée des nanoparticules fonctionnalisées plutôt par endocytose avec une localisation endosomale. Des études plus approfondies ont par la suite été réalisées pour confirmer cette observation avec notamment un traitement des cellules pour éliminer le peptide membranaire (voir chapitre 3).

*Caractérisation des nanoparticules **CF-R9-CC1***

Comme le montre le graphe figure 2.44a, l'ajout de **CF-R9** a légèrement augmenté le diamètre hydrodynamique des nanoparticules cœur-coquilles (**DBCO-CC1** = 49 nm, **CF-R9-CC1** = 58 nm), sans affecter significativement leur potentiel zêta qui se trouve autour de + 23 mV en solution, à pH = 7,4. La taille hydrodynamique moyenne de **CF-R9-CC1** est présentée figure 2.44b pour six synthèses indépendantes. Une faible différence du diamètre est observée, indiquant une bonne reproductibilité des synthèses. Cette variation peut provenir des différentes synthèses des NP **CC1**. Les nanoparticules fonctionnalisées sont stables pendant plusieurs semaines à 4 °C.

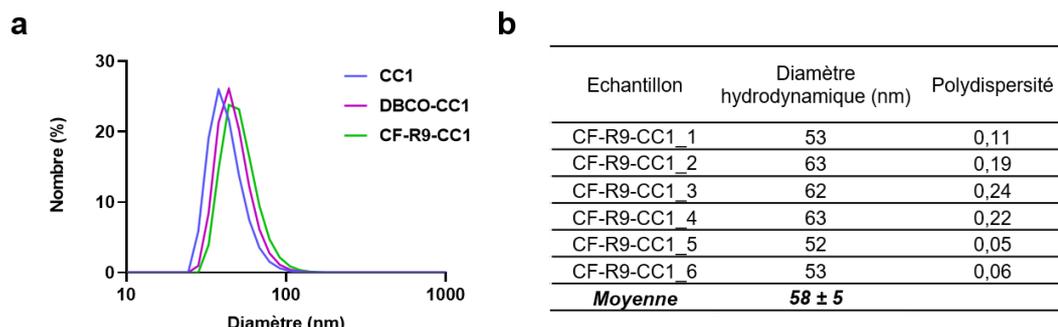


Figure 2.44. a) Comparaison du diamètre hydrodynamique (DLS) entre les nanoparticules cœur-coquilles **CC1**, **DBCO-CC1** et **CF-R9-CC1**. b) Résultats obtenus pour des échantillons de nanoparticules cœur-coquilles fonctionnalisées avec le peptide polyarginine **CF-R9-CC1** issus de 6 synthèses différentes. Les mesures DLS ont été analysées en nombre (12 runs/analyse). La moyenne du diamètre hydrodynamique est représentée \pm écart-type.

Une analyse par microscopie électronique à transmission a été effectuée et est illustrée figure 2.45. L'image montre des particules identiques à celles trouvées pour les cœur-coquilles **CC1**, c'est-à-dire avec un ou plusieurs oxydes de fer enrobés dans une couche de silice.

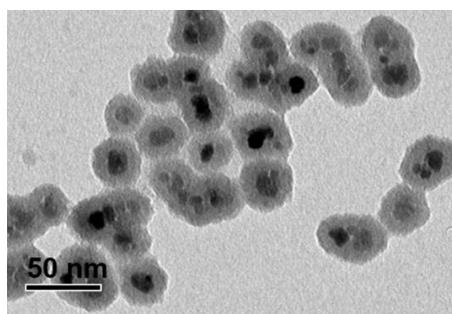


Figure 2.45. Images de microscopie électronique à transmission des cœur-coquilles fonctionnalisées avec le peptide polyarginine **CF-R9-CC1**.

2.5.2. Conjugaison de peptides polyhistidine avec les nanoparticules cœur-coquilles

Nos expériences préliminaires ont montré que la fonctionnalisation des NP cœur coquilles par le CPP R9 est efficace mais conduit à une localisation cellulaire des nanoparticules très majoritairement endosomale, tout du moins après 2 heures d'incubation avec les cellules. Ceci nous a conduit à également considérer le greffage de peptides polyhistidine dans le but de favoriser l'échappement des endosomes. Le greffage du peptide polyhistidine a

dans un premier temps été réalisé dans les mêmes conditions expérimentales que le greffage du peptide polyarginine sur les nanoparticules cœur-coquilles fonctionnalisées avec le lien NHS-PEG₄-DBCO (0,11 équivalent) (figure 2.46).

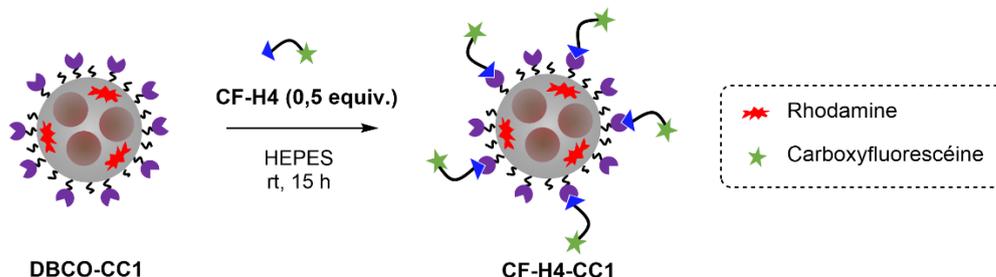


Figure 2.46. Fonctionnalisation des NP cœur-coquilles **DBCO-CC1** par chimie click avec le peptide **CF-H4** pour former **CF-H4-CC1**.

Les nanoparticules cœur-coquilles **DBCO-CC1**, contenant 0,11 équivalent du réactif NHS-PEG₄-DBCO (soit un ratio 8,8:1 (NH₂:NHS-PEG₄-DBCO) introduit), ont donc été utilisées pour greffer le peptide **CF-H4** et le rapport molaire 2:1 (DBCO:CF-H4) a été conservé pour faire réagir le peptide polyhistidine. Malheureusement, après ajout du peptide **CF-H4** à la suspension de **DBCO-CC1** (0,11 équivalent de NHS-PEG₄-DBCO) dans un tampon HEPES pH 7,4, une précipitation complète des nanoparticules a eu lieu. La différence de stabilité entre les NP cœur-coquilles fonctionnalisées par le peptide **CF-R9** et le peptide **CF-H4** peut être expliquée par le fait que le peptide **CF-R9** a une charge nette de + 9 du fait des arginines qui sont essentiellement sous forme protonée à pH 7,4 alors que le peptide **CF-H4** possède une charge nulle à ce pH. Le peptide **CF-H4**, une fois greffé à la surface des NP cœur-coquilles, peut de plus écranter en partie les fonctions amine de surface (chargées positivement), empêchant la répulsion électrostatique entre nanoparticules et induisant leur déstabilisation. Au contraire, le peptide **CF-R9** doit compenser l'écrantage des charges positives des amines de surface par les arginines également chargées positivement. Pour contourner ce problème, un nombre d'équivalent de NHS-PEG₄-DBCO plus faible a été utilisé afin d'augmenter le ratio d'amines par rapport au DBCO à la surface des NP.

Les nanoparticules cœur-coquilles **CC1** ont été fonctionnalisées dans un premier temps avec différents ratios NH₂:NHS-PEG₄-DBCO (11,8:1 et 17,7:1, correspondant respectivement à 0,09 et 0,06 équivalents de NHS-PEG₄-DBCO introduits). Après

fonctionnalisation de la surface de la silice par le DBCO, le peptide **CF-H4** a été ajouté en conservant le rapport molaire 2:1 (DBCO:**CF-H4**). Après quinze heures de réaction, les nanoparticules synthétisées avec 0,09 équivalent de NHS-PEG₄-DBCO avaient également précipité (table 2.6). Néanmoins, l'échantillon contenant 0,06 équivalent de NHS-PEG₄-DBCO n'avait pas précipité après couplage du peptide.

NHS-PEG ₄ -DBCO (equiv.)	Ratio molaire NH ₂ :NHS-PEG ₄ -DBCO	Précipitation de CF-H4-CC1 (15 h après réaction)
0,11	8,8:1	Oui
0,09	11,8:1	Oui
0,06	17,7:1	Non

Table 2.6. Bilan des essais de greffage du peptide **CF-H4** sur les nanoparticules cœur-coquilles **DBCO-CC1** contenant différents équivalents du lien NHS-PEG₄-DBCO.

Après purification par ultrafiltration en utilisant le tampon HEPES (200 mM, pH 7,4) contenant de l'EDTA (2 mM), les suspensions étaient toujours stables. Les nanoparticules cœur-coquilles **DBCO-CC1** contenant 0,06 équivalent du lien NHS-PEG₄-DBCO ont été utilisées pour la suite des expériences. Le greffage du peptide **CF-H4** sur les nanoparticules **DBCO-CC1** (0,06 équivalent de NHS-PEG₄-DBCO) et l'efficacité de la purification des NP obtenues ont été vérifiées comme précédemment, après incubation avec des cellules et visualisation de la rhodamine et de la carboxyfluorescéine en microscopie confocale à fluorescence. Après 2 heures d'incubation des cellules CHO-K1 avec les nanoparticules **CF-H4-CC1** (0,56 mM en fer), les cellules ont été lavées et imagées (figure 2.47).

Une très bonne colocalisation de la rhodamine et de la carboxyfluorescéine peut être observée sur les images de microscopie confocale avec un coefficient de corrélation de Pearson $r = 0,91 \pm 0,03$ pour **CF-H4-CC1** (valeur de PCC indiquée comme la moyenne \pm écart type, analyse réalisée sur trois images indépendantes). Cette valeur confirme une fonctionnalisation réussie (*via* liaison covalente) des nanoparticules cœur-coquilles avec le peptide **CF-H4**.

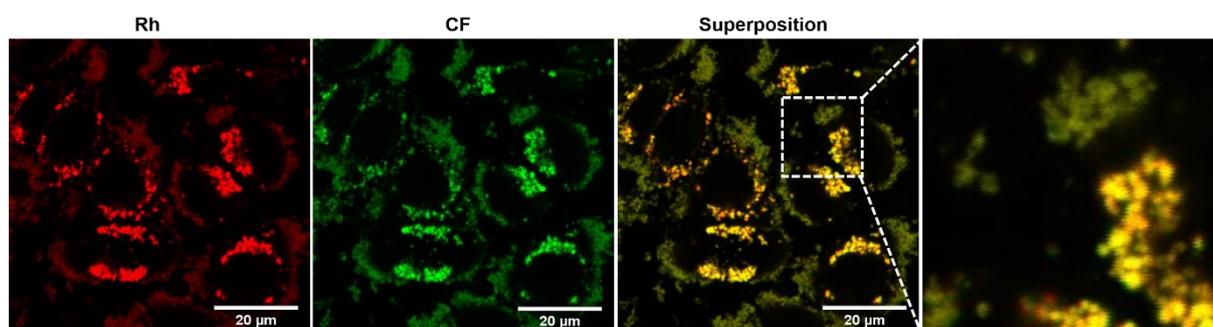


Figure 2.47. Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules vivantes dans des cellules CHO-K1 après incubation à 37 °C avec **CF-H4-CC1** (0,56 mM en fer) pendant 2 h. Les images montrent une colocalisation de la rhodamine (NP cœur-coquilles **CC1**) et de la carboxyfluorescéine (azidopeptide **CF-H4**), confirmant le greffage covalent des azidopeptides sur les nanoparticules cœur-coquilles. La rhodamine est représentée en rouge et la carboxyfluorescéine en vert. Barres d'échelle : 20 µm.

De la même manière que pour **CF-R9-CC1**, l'ajout de **CF-H4** a légèrement augmenté le diamètre hydrodynamique (**DBCO-CC1** = 47 nm, **CF-H4-CC1** = 52 nm, figure 2.48) des nanoparticules cœur-coquilles. Le diamètre hydrodynamique trouvé est très proche de celui de **CF-R9-CC1**. La charge globale de surface n'est pas significativement affectée par le greffage de **CF-H4**, avec un potentiel zêta de + 21 mV en solution, à pH = 7,4. L'indice de polydispersité est inférieur à 0,2 indiquant une distribution de taille étroite et la fonctionnalisation dans nos conditions optimisées n'a pas induit d'agrégation.

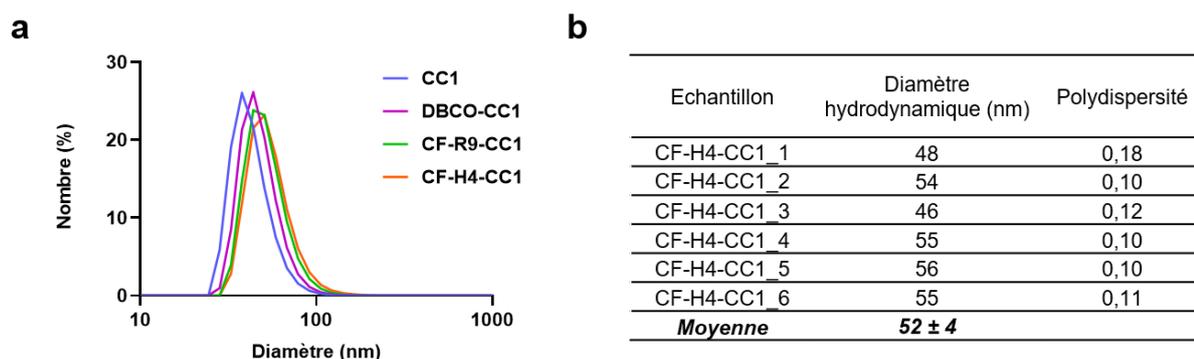


Figure 2.48. a) Comparaison du diamètre hydrodynamique (DLS) entre les nanoparticules cœur-coquilles **CC1**, **DBCO-CC1**, **CF-R9-CC1** et **CF-H4-CC1**. b) Résultats obtenus pour des échantillons de nanoparticules cœur-coquilles fonctionnalisées avec le peptide polyhistidine **CF-H4-CC1** issus de 6 synthèses différentes. Les mesures DLS ont été analysées en nombre (12 runs/analyse). La moyenne du diamètre hydrodynamique est représentée en moyenne ± écart-type.

L'image de microscopie électronique à transmission figure 2.49 montre comme précédemment des nanoparticules cœur-coquilles bien individualisées sans modification de forme.

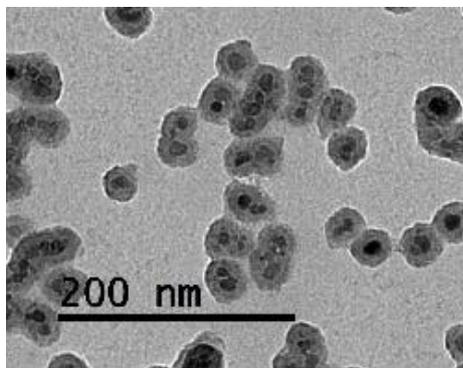


Figure 2.49. Image de microscopie électronique à transmission des cœur-coquilles fonctionnalisées avec le peptide polyhistidine **CF-H4-CC1**.

2.5.3. Versatilité du système : preuve de concept de la bi-fonctionnalisation

La polyvalence de notre méthodologie de greffage a été explorée en incorporant deux substrats différents sur la surface des nanoparticules. Les substrats utilisés pour la preuve de concept sont le peptide **CF-R9** et un dérivé rhodamine-azoture (Rh-N₃), permettant de visualiser une colocalisation des deux fluorophores si le greffage à la surface des nanoparticules est effectif pour ces deux molécules. Dans un premier temps, des nanoparticules cœur-coquilles sans rhodamine **CC2** ont été préparées en adaptant le protocole décrit partie 2.3.2.1. La synthèse a été poursuivie par la fonctionnalisation de la silice avec le DBCO, utilisant 0,11 équivalent du lien NHS-PEG₄-DBCO, comme pour le conjugué **CF-R9-CC1**. Le composé **DBCO-CC2** a ensuite été conjugué avec le peptide **CF-R9** en utilisant un rapport DBCO:**CF-R9** plus élevé (4:1) que précédemment. Après 5 heures de réaction, la rhodamine-azoture (Rh-N₃) a été ajoutée au mélange pour réagir avec les sites DBCO restants, avec un rapport molaire de 4:1 (DBCO:Rh-N₃) (figure 2.50).

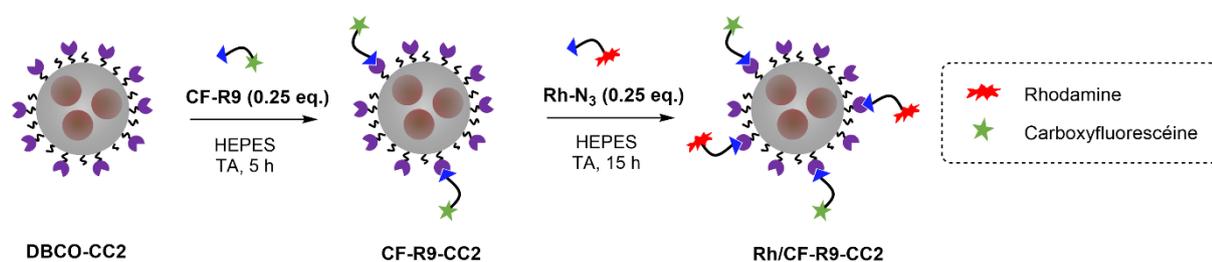


Figure 2.50. Bi-fonctionnalisation de nanoparticules cœur-coquilles **DBC0-CC2** (0,11 équivalent de NHS-PEG₄-DBC0) par chimie click avec le peptide **CF-R9** et le fluorophore Rh-N₃.

Après 15 heures de réaction, la purification a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Le greffage des deux substrats azotures **CF-R9** et Rh-N₃ à la surface des nanoparticules **DBC0-CC2** (0,11 équivalent de NHS-PEG₄-DBC0) a été observé en microscopie confocale à fluorescence. Des cellules CHO-K1 ont été incubées avec les nanoparticules résultantes **Rh/CF-R9-CC2** (0,56 mM en fer) pendant 2 heures avant d'être lavées et imagées (figure 2.51).

Les images de microscopie confocale figure 2.51 confirment le greffage réussi à la surface des NP cœur-coquilles des deux substrats porteurs de la fonction azoture. En effet, une bonne colocalisation ($r = 0,78 \pm 0,07$, moyenne \pm écart type des valeurs de PCC sur trois images indépendantes) entre la carboxyfluorescéine (vert) et la rhodamine (rouge) a été observée, montrant que les nanoparticules bi-fonctionnalisées **Rh/CF-R9-CC2** avaient bien été formées.

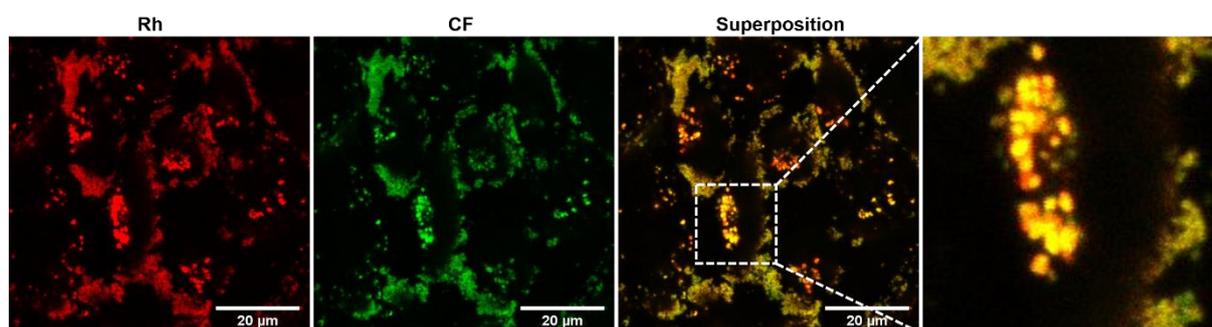


Figure 2.51. Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules vivantes après incubation des cellules CHO-K1 avec **Rh/CF-R9-CC2** (0,56 mM en fer) pendant 2 h. Les images montrent une colocalisation de la rhodamine (Rh-N₃) et de la carboxyfluorescéine (azidopeptide **CF-R9**), confirmant le greffage covalent des deux substrats sur les nanoparticules cœur-coquilles **CC2**. La rhodamine est représentée en rouge et la carboxyfluorescéine en vert. Barres d'échelle : 20 µm.

Les nanoparticules résultantes **Rh/CF-R9-CC2** possèdent un diamètre hydrodynamique moyen de 51 nm et un PDI < 0,2 (figure 2.52). La taille des particules est du même ordre que celle des particules mono-fonctionnalisées par les peptides. Leur potentiel zêta est toujours positif, autour de + 24 mV en solution, à pH = 7,4.

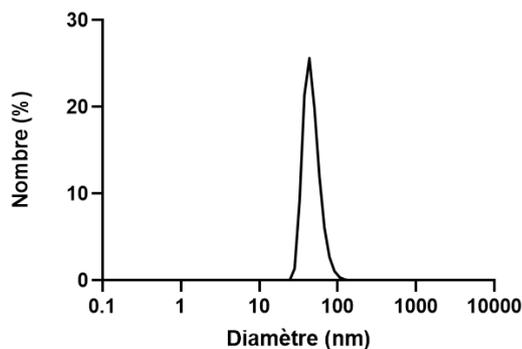


Figure 2.52. Analyse DLS d'une suspension de cœur-coquilles bi-fonctionnalisées **Rh/CF-R9-CC2**. La distribution est la moyenne obtenue pour 12 runs.

Ce travail de preuve de concept suggère que la stratégie de conjugaison par chimie click est compatible avec l'ajout de plusieurs substrats et peut être utilisée pour explorer l'effet synergique de la fixation de modalités mixtes aux nanoparticules cœur-coquilles et peut par exemple être appliquée pour le greffage de molécules thérapeutiques.

Bi-fonctionnalisation des nanoparticules cœur-coquilles avec un peptide polyarginine et un peptide polyhistidine

Après cette preuve de concept du greffage de deux substrats à la surface des cœur-coquilles, la synthèse d'un composé mixte contenant les peptides polyarginine et polyhistidine a été étudiée. Ces nanoparticules contenant les deux peptides à leur surface pourront présenter des caractéristiques complémentaires aux nanoparticules contenant seulement le peptide oligo-Arg ou oligo-His. N'ayant pas synthétisé de peptide contenant de la rhodamine ou un autre fluorophore que la carboxyfluorescéine, nous avons préparé des nanoparticules cœur-coquilles contenant de la rhodamine dans leur couche de silice (**CC1**), un peptide sans fluorophore et un peptide fonctionnalisé avec la carboxyfluorescéine. De même que pour le système bi-fonctionnalisé précédemment, 0,11 équivalent de NHS-PEG₄-DBCO ont été utilisés pour synthétiser les nanoparticules **DBCO-CC1**. Le couplage avec le peptide polyarginine a été réalisé en premier pour aider à la

stabilité des NP cœur-coquilles avant l'ajout de la polyhistidine. Le peptide polyarginine non fonctionnalisé par la carboxyfluorescéine (**R9***) a été introduit avec un rapport 4:1 (DBCO:**R9***) et le peptide polyhistidine, contenant la carboxyfluorescéine (**CF-H4**), a été ajouté 5 heures après dans un rapport molaire de 4:1 (DBCO:**CF-H4**) (figure 2.53).

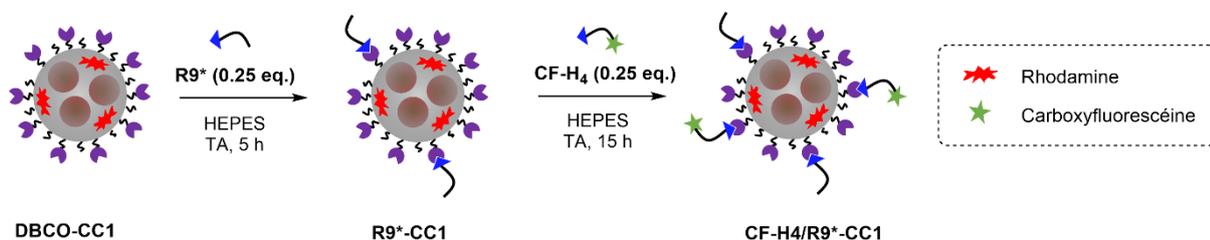


Figure 2.53. Bi-fonctionnalisation des NP cœur-coquilles **DBCO-CC1** (0,11 équivalent de NHS-PEG₄-DBCO) par chimie click avec les azidopeptides **R9*** et **CF-H4**.

De la même façon, la purification des composés bi-fonctionnalisés a été réalisée 15 heures après l'ajout de la polyhistidine, par ultrafiltration. Le bon greffage du deuxième peptide ajouté sur les nanoparticules cœur-coquilles a été vérifié en microscopie confocale à fluorescence après incubation avec des cellules CHO-K1. Les cellules ont cette fois-ci été incubées avec le conjugué résultant **CF-H4/R9*-CC1** (0,56 mM en fer) pendant 2 heures avant d'être lavées et imagées. Les images de microscopie confocale figure 2.54 confirment le greffage de **CF-H4** sur les nanoparticules cœur-coquilles avec un coefficient de corrélation de Pearson $r = 0,94 \pm 0,01$ pour **CF-H4/R9*-CC1** (valeur de PCC indiquée comme la moyenne \pm écart type, analyse réalisée sur trois images indépendantes).

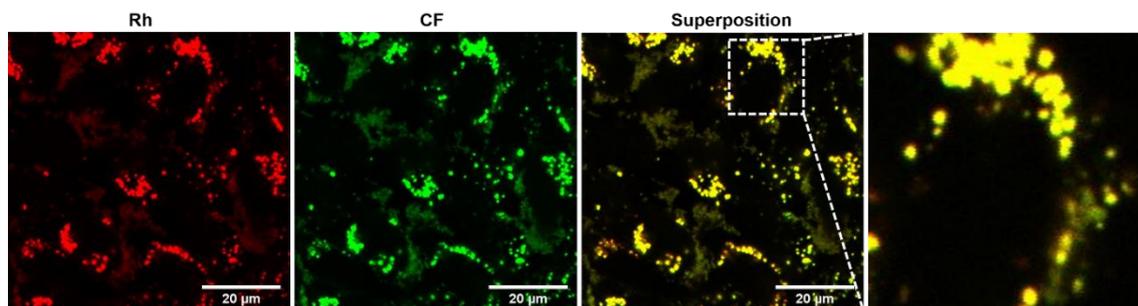


Figure 2.54. Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules vivantes après incubation des cellules CHO-K1 avec **CF-H4/R9*-CC1** (0,56 mM en fer) pendant 2 h. Les images montrent une colocalisation de la rhodamine (NP cœur-coquilles **CC1**) et de la carboxyfluorescéine (azidopeptide **CF-H4**), confirmant le greffage covalent du peptide oligo-His sur les nanoparticules cœur-coquilles. La rhodamine est représentée en rouge et la carboxyfluorescéine en vert. Barres d'échelle : 20 μm .

Le greffage du peptide **R9*** à la surface de la silice ne peut pas être confirmé par microscopie, le peptide n'étant pas fluorescent. Néanmoins, la preuve du greffage efficace des deux substrats obtenue pour le composé **Rh/CF-R9-CC2** et l'observation d'une précipitation des nanoparticules après ajout du peptide **CF-H4** seul sur les nanoparticules DBCO (0,11 équivalent de NHS-PEG₄-DBCO), indiquent une très forte probabilité du succès de la double fonctionnalisation des NP par les peptides **R9*** et **CF-H4**. Les NP cœur-coquilles bi-fonctionnalisées par les deux peptides possèdent un diamètre hydrodynamique de 54 nm (figure 2.55), équivalent aux autres nanoparticules bi-fonctionnalisées (51 nm) et une polydispersité toujours inférieure à 0,2 (figure 2.55). Leur potentiel zêta est de + 18 mV en solution, à pH = 7,4.

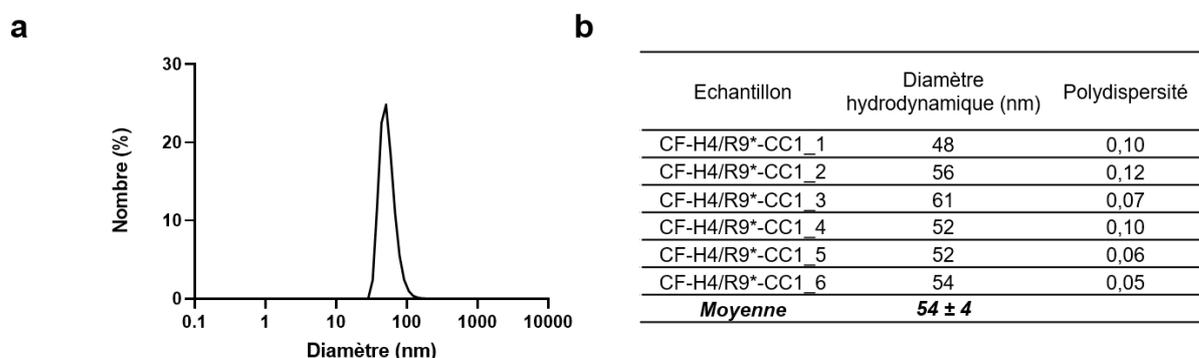


Figure 2.55. a) Analyse DLS d'une suspension de NP cœur-coquilles bi-fonctionnalisées par les azido-peptides **CF-H4/R9*-CC1**. b) Résultats obtenus pour les différents échantillons synthétisés de nanoparticules cœur-coquilles porteuses des peptides polyarginine et polyhistidine **CF-H4/R9*-CC1**. Les mesures DLS ont été analysées en nombre (12 runs/analyse). La moyenne du diamètre hydrodynamique est représentée ± écart-type.

2.5.4. Quantification des peptides à la surface des nanoparticules cœur-coquilles

Le greffage covalent de peptides fluorescents à la surface des nanoparticules cœur-coquilles a été confirmé précédemment par microscopie confocale. Pour aller plus loin, la détermination de la quantité de peptides à la surface des NP cœur-coquilles a été effectuée par spectrophotométrie de fluorescence. Les droites d'étalonnage des peptides **CF-R9** et **CF-H4** sont représentées figure 2.56 et ont été réalisées à des concentrations en peptide fluorescent connues (de 0,16 μ M à 10 μ M), à une longueur d'onde d'excitation de 505 nm. Ces droites ont permis de déterminer la concentration en peptide **CF-R9** pour les

suspensions colloïdales des NP cœur-coquilles **CF-R9-CC1** et en peptide **CF-H4** pour les suspensions des NP cœur-coquilles **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1**.

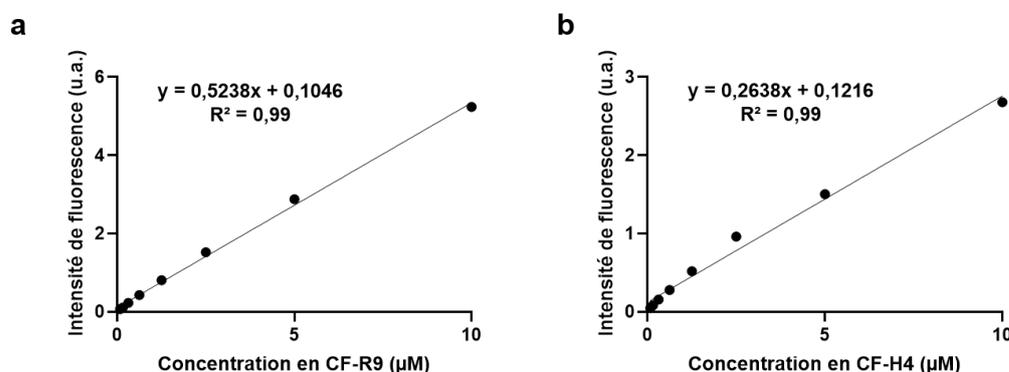


Figure 2.56. Droites d'étalonnage des solutions peptidiques **CF-R9** (a) et **CF-H4** (b) de concentrations connues (de 0,16 µM à 10 µM). L'intensité de fluorescence a été mesurée pour chaque point à des longueurs d'ondes d'excitation de 505 nm et d'émission de 525 nm.

La quantité de peptides présente à la surface des nanoparticules cœur-coquilles a été déterminée à partir de la concentration en peptides (C_{Pep}) et de la concentration en fer (C_{fer}) de chaque échantillon en utilisant la même démarche que celle utilisée pour déterminer la concentration en amines C_{NH_2} à la surface des NP cœur-coquilles (partie 2.3.2.2.). Grâce aux équations indiquées partie 2.3.2.2, la fraction volumique ϕ de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a été déterminée afin de calculer la concentration en particules magnétiques (C_{coeurs}) présentes dans chaque suspension de NP cœur-coquilles fonctionnalisées avec les peptides (**Pep-CC1**). Trois cœurs de maghémite sont en moyenne présents dans une même couche de silice, donc la concentration en NP cœur-coquilles $C_{Pep-CC1}$ est calculée en divisant la concentration en cœur magnétiques par trois ($C_{Pep-CC1} = C_{coeurs}/3$). La quantité de peptides fluorescents par NP cœur-coquille est alors calculée à partir de la concentration en peptides (C_{Pep}) dosée par spectrophotométrie à fluorescence. Le rapport de concentration $C_{Pep}/C_{Pep-CC1}$ correspond au nombre de peptides à la surface des NP cœur-coquilles. La densité en peptides fluorescents par nm^2 est enfin calculée par le rapport entre la quantité de peptides par NP cœur-coquille et leur surface, en considérant que ce sont des sphères ($d_{TEM} = 41 \text{ nm}$). Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 2.57.

La quantité moyenne de peptides à la surface des cœur-coquilles **CF-R9-CC1** et **CF-H4-CC1** est similaire : 83 ± 3 et 76 ± 13 peptides par NP cœur-coquilles respectivement (figure 2.57). Ce résultat peut sembler surprenant car nous avons introduit environ deux fois plus de NHS-PEG₄-DBCO lors de la préparation des nanoparticules **CF-R9-CC1** (0,11 équivalent) par rapport à celle des conjugués **CF-H4-CC1** (0,06 équivalent de NHS-PEG₄-DBCO), en conservant le même ratio molaire DBCO:peptide. Ce résultat peut provenir d'une gêne stérique des peptides à la surface des NP cœur-coquilles **CC1**, limitant le taux de fonctionnalisation. Il est aussi possible que la quantité de peptide calculée pour **CF-R9-CC1** soit sous-estimée du fait d'un phénomène d'extinction de fluorescence lié à une densité plus élevée des peptides à la surface des cœur-coquilles. La densité en peptides à la surface des NP cœur-coquilles est en moyenne de 1-2 peptides/100 nm² pour les nanoparticules mono-fonctionnalisées **CF-R9-CC1** et **CF-H4-CC1**.

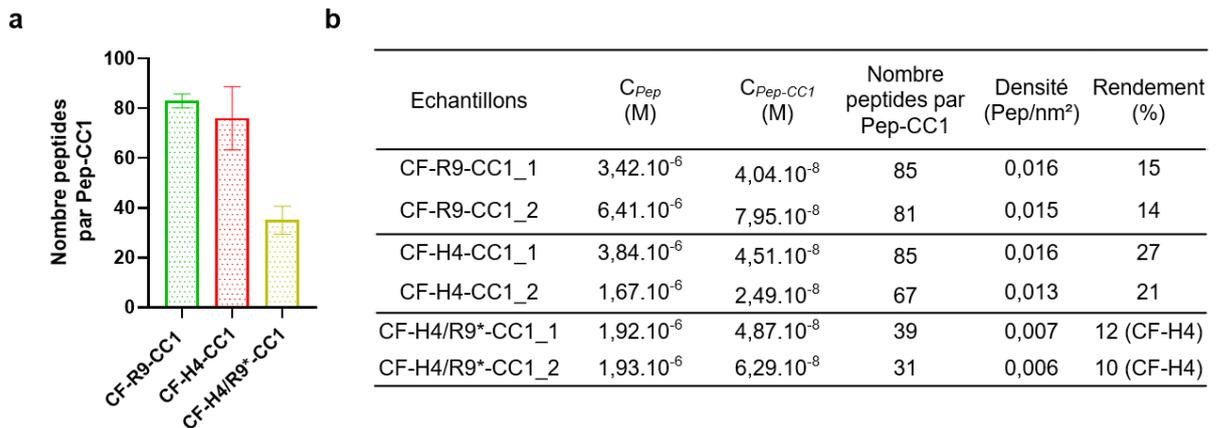


Figure 2.57. a) Nombre de peptides par nanoparticule **pep-CC1** et plus particulièrement nombre de peptide **CF-R9** à la surface des nanoparticules cœur-coquilles **CF-R9-CC1** et nombre de peptide **CF-H4** à la surface des nanoparticules cœur-coquilles **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1**. Chaque mesure a été réalisée sur deux échantillons provenant de deux synthèses différentes pour chaque condition. b) Bilan du dosage des peptides à la surface des nanoparticules cœur-coquilles **CC1**. C_{Pep} = concentration en peptide **CF-R9** pour **CF-R9-CC1** et en peptide **CF-H4** pour **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1** dans les suspensions de NP cœur-coquilles. $C_{Pep-CC1}$ = concentration en nanoparticules cœur-coquilles fonctionnalisées par les peptides. Nombre de peptides par **Pep-CC1** = $C_{Pep}/C_{Pep-CC1}$ = nombre de peptides **CF-R9** par NP cœur-coquilles **CF-R9-CC1** ou nombre de peptides **CF-H4** par NP cœur-coquilles **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1** après dosage de la fluorescence des suspensions colloïdales. Densité (Pep/nm²) = densité en peptides **CF-R9** ou **CF-H4** par nm² calculée grâce à la concentration en fer et à la concentration en peptides mesurée dans les suspensions de nanoparticules.

Pour les nanoparticules bi-fonctionnelles **CF-H4/R9*-CC1**, nous avons mesuré une quantité moyenne de peptides **CF-H4** de 35 ± 6 , ce qui est cohérent du fait de la présence du peptide **R9*** non comptabilisé dans le dosage de fluorescence. La densité du peptide **CF-H4** à la surface des NP bi-fonctionnalisées est en moyenne d'un peptide/150 nm².

2.6. Conclusion sur la synthèse et la caractérisation des nanoparticules cœur-coquilles fonctionnalisées par les peptides cationiques

Les peptides R9 et H4 ont été synthétisés en stratégie Fmoc, des versions fluorescentes ont été préparées contenant une carboxyfluorescéine en leur extrémité *N*-terminale. Un groupement azoture a également été introduit pour permettre la liaison avec les nanoparticules.

Les nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ont été préparées par co-précipitation en milieu basique de chlorures de fer (II) et de fer (III). Après une étape d'oxydation, les particules de maghémite ont été stabilisées à pH 7 par complexation de citrate. Elles possèdent alors une charge de surface négative, permettant l'obtention d'une dispersion stable par répulsions électrostatiques. Elles ont un diamètre physique d'environ 11 nm, elles sont monocristallines, superparamagnétiques et possèdent un fort pouvoir chauffant ($\sim 40 \text{ W/g}_{\text{maghémite}}$). Un enrobage de silice, contenant de la rhodamine a permis d'obtenir des nanoparticules cœur-coquilles avec un cœur de maghémite et une coquille de silice. La couche de silice a ensuite été fonctionnalisée une première fois avec des groupements amine et PEG, qui permettent une excellente stabilité colloïdale des objets. Le potentiel zêta mesuré a confirmé la présence des groupements amine à la surface de la silice. De plus la polymérisation de la silice autour des nanoparticules de maghémite a conduit à la formation des nanoparticules cœur-coquilles d'environ 41 nm de diamètre et n'a pas modifié leurs propriétés superparamagnétiques.

Une partie des amines présentes à la surface de la silice a été couplée avec une cyclooctyne (DBCO), ce qui a ensuite permis le greffage covalent des azidopeptides par chimie click. Ce couplage a été optimisé et contrôlé avec les deux peptides (la polyarginine et la

polyhistidine) de façon à obtenir des suspensions stables de NP. Il a également été possible de préparer des nanoparticules cœur-coquilles bi-fonctionnelles comportant les deux peptides. Ces études ont montré que le protocole de purification des nanoparticules après greffage des peptides est critique et que l'ultrafiltration et l'utilisation d'une solution de lavage contenant de l'EDTA ont permis de bien éliminer les espèces non covalamment liées. Le greffage covalent des azidopeptides sur les nanoparticules fonctionnalisées par le DBCO a ensuite été confirmé après incubation des objets dans les cellules CHO-K1, par microscopie confocale grâce à la présence de fluorophores sur chacune des entités.

Chapitre 3 : Etude de l'internalisation des nanoparticules cœur-coquilles fonctionnalisées avec les peptides cationiques

3.1. Analyse de la cytotoxicité et de la viabilité cellulaires en présence des nanoparticules

Etude de la cytotoxicité cellulaire

La cytotoxicité des nanoparticules cœur-coquilles, contenant ou non les peptides greffés à leur surface, a été examinée après 6 heures et 24 heures d'incubation avec les cellules CHO-K1 grâce à un test LDH (lactate déshydrogénase). La LDH, enzyme naturellement présente dans le cytosol des cellules, est libérée dans le milieu extracellulaire lors de lésions induites de la membrane plasmique. La LDH libérée peut alors catalyser la conversion du lactate en pyruvate par réduction du NAD^+ en NADH. L'oxydation du NADH par la diaphorase conduit alors à la réduction d'un sel de tétrazolium (ajouté dans le milieu extracellulaire) en formazan, composé rouge mesurable au spectrophotomètre à 490 nm. Le niveau de formazan produit est directement proportionnel à la quantité de LDH libérée dans le milieu extracellulaire et au nombre de cellules lysées (figure 3.1).

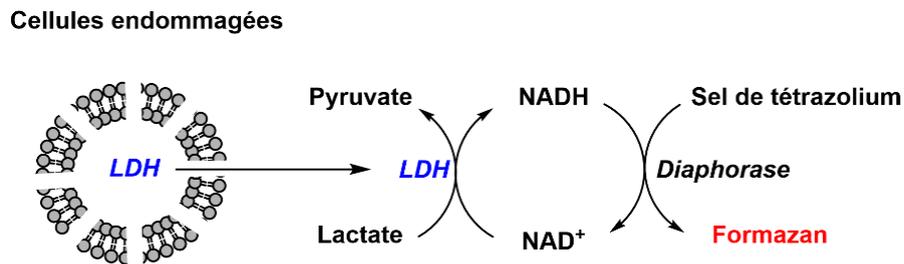


Figure 3.1. Représentation schématique du principe du test de cytotoxicité au LDH.

Le test LDH a montré que nos différents conjugués de nanoparticules (**CC1**, **CF-R9-CC1**, **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1**) à une concentration inférieure à 1,2 mM en fer n'induisaient pas de cytotoxicité détectable dans les cellules CHO-K1 après 6 heures et 24 heures d'incubation (figure 3.2).

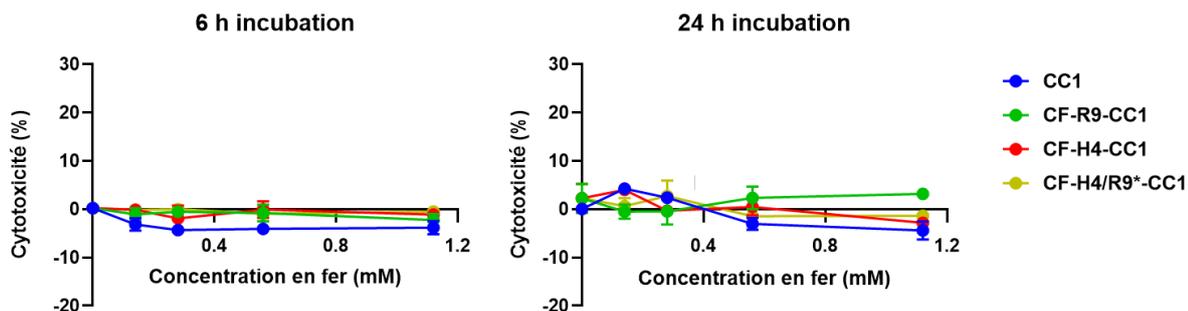


Figure 3.2. Pourcentage de toxicité cellulaire mesurée par le test LDH après 6 h d'incubation de 15 000 cellules CHO-K1/puit et après 24 h d'incubation de 5 000 cellules CHO-K1/puit avec les nanoparticules **CC1**, **CF-R9-CC1**, **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1** (aux concentrations en fer de 0,14 mM ; 0,28 mM ; 0,56 mM et 1,12 mM). Les échantillons contrôle (incubation des cellules sans NP puis ajout de triton) correspondent à 100 % de cytotoxicité cellulaire. Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata, les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

La cytotoxicité des peptides fluorescents **CF-R9** et **CF-H4** en absence des NP a également été étudiée après 24 heures d'incubation avec les cellules CHO-K1 à l'aide du test LDH (figure 3.3). Les deux peptides utilisés ne présentent pas de toxicité significative aux concentrations choisies.

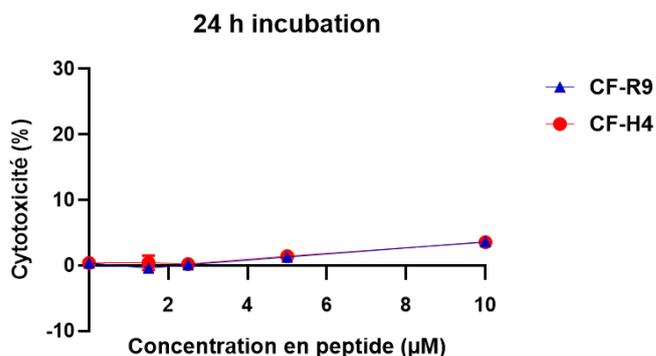


Figure 3.3. Pourcentage de toxicité cellulaire mesurée par le test LDH après 24 h d'incubation de 5 000 cellules CHO-K1/puit avec les peptides **CF-R9** et **CF-H4** (à 1,5 µM ; 2,5 µM ; 5,0 µM et 10,0 µM). Les échantillons contrôle (incubation des cellules sans peptides puis ajout de triton) correspondent à 100 % de cytotoxicité cellulaire. Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata, les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

Etude de la viabilité des cellules incubées avec les nanoparticules

Une étude de viabilité cellulaire a également été effectuée avec le test à la calcéine-AM. Les cellules vivantes se distinguent des cellules mortes par la présence d'une activité

estérasiq ue intracellulaire, qui peut être évaluée en suivant la conversion enzymatique de la calcéine AM (composé très peu fluorescent et capable de diffuser dans les cellules) en calcéine (intensément fluorescente). La calcéine, après hydrolyse de la fonction ester est retenue dans les cellules vivantes et produit une fluorescence intense uniforme verte, mesurable au spectrophotomètre à fluorescence (excitation 495 nm / émission 515 nm). De la même façon qu'avec le test de cytotoxicité LDH, les cellules CHO-K1 ont été incubées 6 heures et 24 heures avec les nanoparticules cœur-coquilles, fonctionnalisées ou non par les peptides, à différentes concentrations en fer (0,14 ; 0,28 ; 0,56 ; 1,12 mM). Pour ne pas interférer avec la fluorescence de la calcéine, les nanoparticules cœur-coquilles utilisées ne contenait pas de rhodamine (**CC2**) et les peptides greffés à leur surface n'étaient pas fonctionnalisés avec la carboxyfluorescéine (**R9*** et **H4***). Ce test a montré une diminution de la viabilité cellulaire pour la concentration la plus élevée en fer (1,12 mM) après 24 heures d'incubation pour les composés contenant les peptides mais pas de diminution significative en présence des cœur-coquilles seules (figure 3.4). En revanche, après 6 heures d'incubation, aucune diminution de la viabilité n'a été identifiée.

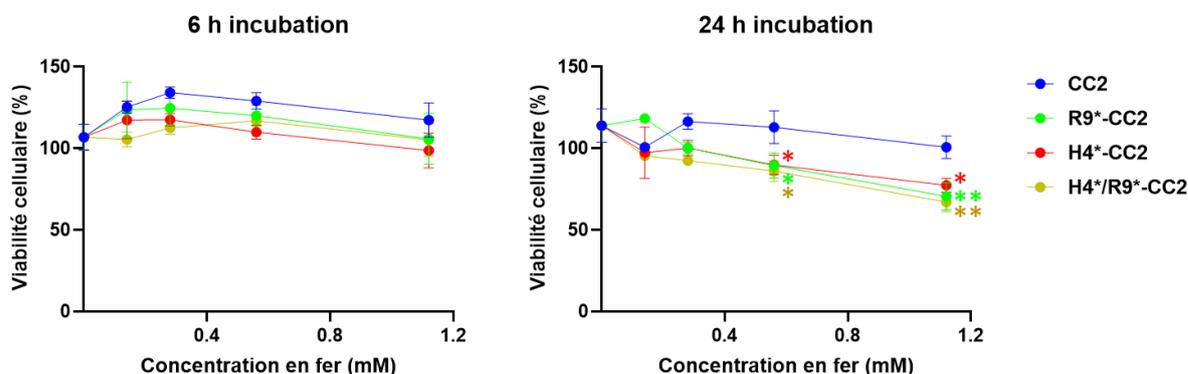


Figure 3.4. Pourcentage de viabilité cellulaire mesurée par le test à la calcéine-AM après 6 h d'incubation de 15 000 cellules CHO-K1/puit et après 24 h d'incubation de 5 000 cellules CHO-K1/puit avec les nanoparticules **CC2**, **R9*-CC2**, **H4*-CC2** et **H4*/R9*-CC2** (aux concentrations en fer de 0,14 mM ; 0,28 mM ; 0,56 mM et 1,12 mM). Ces cellules contrôles correspondent à 100 % de viabilité cellulaire. Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata, les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. * : $p < 0,1$; ** : $p < 0,05$.

Conclusion sur les tests de cytotoxicité et viabilité cellulaires

Les données obtenues avec le test de cytotoxicité indiquent que les nanoparticules (porteuses ou non de peptides) n'induisent pas de mort cellulaire en 24 heures. En

revanche, il est possible que les nanoparticules fonctionnalisées par les peptides aient un impact sur le cycle de division des cellules en l'allongeant, ce qui expliquerait les résultats observés avec le test de viabilité au temps d'incubation 24 heures. En effet, si les cellules se divisent moins rapidement en présence de ces NP, la viabilité mesurée après 24 heures d'incubation sera plus faible du fait de la diminution de fluorescence verte observée avec le test de la calcéine-AM. Au vu des résultats des deux tests, cytotoxicité et viabilité cellulaire, une concentration en fer de 0,28 mM et de 0,56 mM a été choisie pour les différentes expériences effectuées par la suite sur les cellules CHO-K1.

3.2. Etude par microscopie confocale de l'internalisation cellulaire des différentes nanoparticules

3.2.1. Analyse de la stabilité des nanoparticules cœur-coquilles dans le milieu de culture

Avant d'effectuer les études d'internalisation cellulaire de nos nanoparticules, nous avons souhaité évaluer leur stabilité *in vitro* dans du milieu de culture. Pour ceci, une première étude a été réalisée par DLS en incubant les nanoparticules cœur-coquilles **CC1** dans du milieu de culture (DMEM-F12 sans sérum) à 37 °C. Les NP cœur-coquilles après greffage des peptides **CF-R9** et **CF-H4** ont également été étudiées pour analyser l'influence de la présence des peptides sur la stabilité des NP dans le milieu de culture. Du fait de la présence d'acides aminés, de vitamines et d'une grande gamme de composés dans la composition du milieu de culture, une interaction de ces molécules est inévitable avec les nanoparticules et peptides. De plus, leur adsorption à la surface des nanoparticules peut les déstabiliser et augmenter leur diamètre hydrodynamique. L'analyse DLS en nombre est représentée figure 3.5, en fonction du temps d'incubation. Le graphe indique une augmentation du diamètre hydrodynamique des nanoparticules **CC1** à partir de 120 minutes. Celui de **CF-H4-CC1** augmente à partir de 100 minutes, indiquant une stabilité proche de celle des NP **CC1** en milieu de culture à 37 °C. En revanche, en présence du peptide **CF-R9** à la surface des NP cœur-coquilles, une augmentation du diamètre hydrodynamique est observable moins de 40 minutes après incubation du conjugué dans le milieu de culture à 37 °C. Ceci suggère que le peptide R9 interagit de façon plus

importante que le peptide H4 avec le milieu de culture et son greffage à la surface des NP cœur-coquilles affecte donc plus leur stabilité.

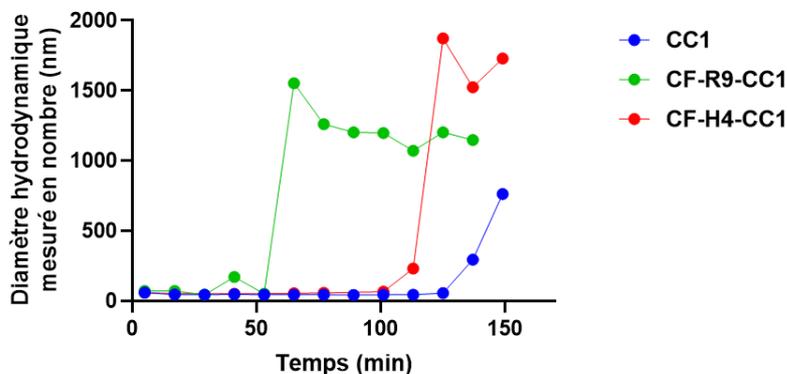


Figure 3.5. Analyse de la stabilité des différents échantillons dans le milieu de culture (DMEM-F12 sans sérum). Analyse DLS en nombre en fonction du temps, après incubation des suspensions de NP cœur-coquilles **CC1**, **CF-R9-CC1** et **CF-H4-CC1** à 37 °C.

3.2.2. Distribution intracellulaire des peptides R9 et H4 non conjugués

Le comportement des peptides seuls, non liés aux NP, dans les cellules CHO-K1 a été étudié en incubant les cellules avec 10 μM de peptides fluorescents **CF-R9** et **CF-H4** pendant 2 heures. Les images de microscopie confocale à fluorescence présentées figure 3.6 indiquent une fluorescence majoritairement diffuse dans le cytosol pour le peptide **CF-R9**, témoignant que le peptide est capable de pénétrer dans les cellules par translocation directe (ou de s'échapper des endosomes après endocytose). Il est à noter que les nucléoles sont également marqués par la fluorescence verte, confirmant la possibilité du peptide polyarginine à atteindre le noyau. Une fluorescence ponctuée est également observable dans le cytoplasme, indiquant que le peptide **CF-R9** pénètre aussi *via* endocytose. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature.¹⁰⁸ Concernant le peptide **CF-H4**, peu de fluorescence ponctuée et aucune fluorescence diffuse sont observées après 2 heures d'incubation avec les cellules. Le peptide polyhistidine est donc très faiblement internalisé dans les cellules par endocytose, probablement dû à sa charge neutre à pH physiologique, et aucune translocation directe ou sortie des endosomes ne sont observées dans les conditions testées.

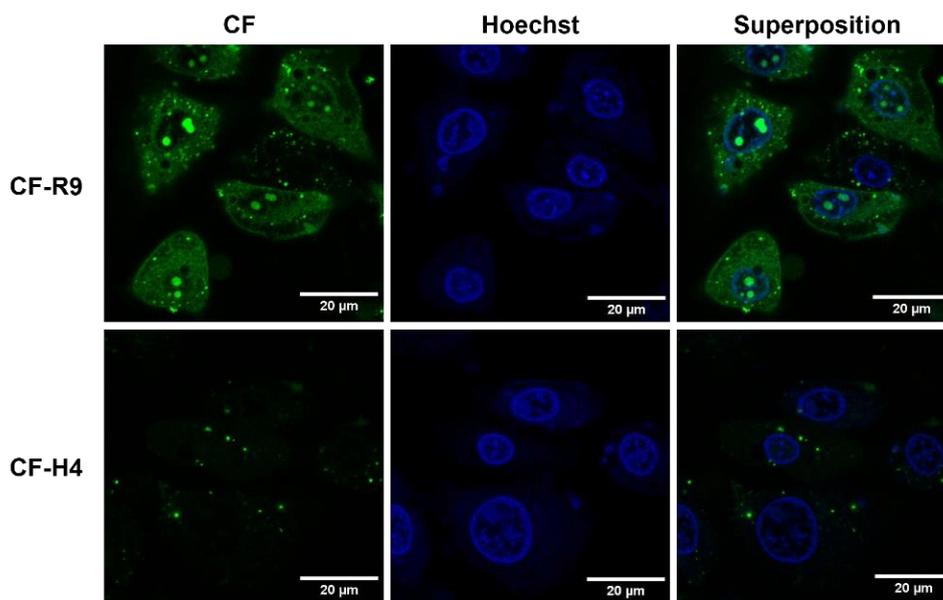


Figure 3.6. Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules vivantes après incubation des cellules CHO-K1 avec les peptides **CF-R9** et **CF-H4** (10 μM) pendant 2 h. La carboxyfluorescéine est représentée en vert et le colorant Hoechst en bleu. Barres d'échelle : 20 μm.

3.2.3. Comparaison de la distribution intracellulaire des nanoparticules cœur-coquilles avec et sans peptides

Une étude de la distribution intracellulaire des nanoparticules cœur-coquilles seules **CC1** et fonctionnalisées avec les peptides **CF-R9-CC1**, **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1** a été réalisée par imagerie de fluorescence confocale sur cellules vivantes pour déterminer si la conjugaison des peptides améliore l'internalisation des nanoparticules. Initialement, un temps d'incubation de 2 heures a été choisi pour incuber les NP cœur-coquilles avec les cellules CHO-K1 et après incubation, les cellules ont été uniquement lavées avec du milieu de culture, sans autre traitement. La comparaison de la localisation cellulaire des objets a été réalisée avec les images obtenues grâce au canal de la rhodamine. L'analyse par microscopie confocale sur cellules vivantes, représentée en figure 3.7, a montré des niveaux appréciables de fluorescence ponctuée entourant le noyau en présence et en absence des peptides. De plus, une fluorescence diffuse est observable dans les cellules surtout en présence des peptides pour **CF-R9-CC1**, **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1** (figure 3.7).

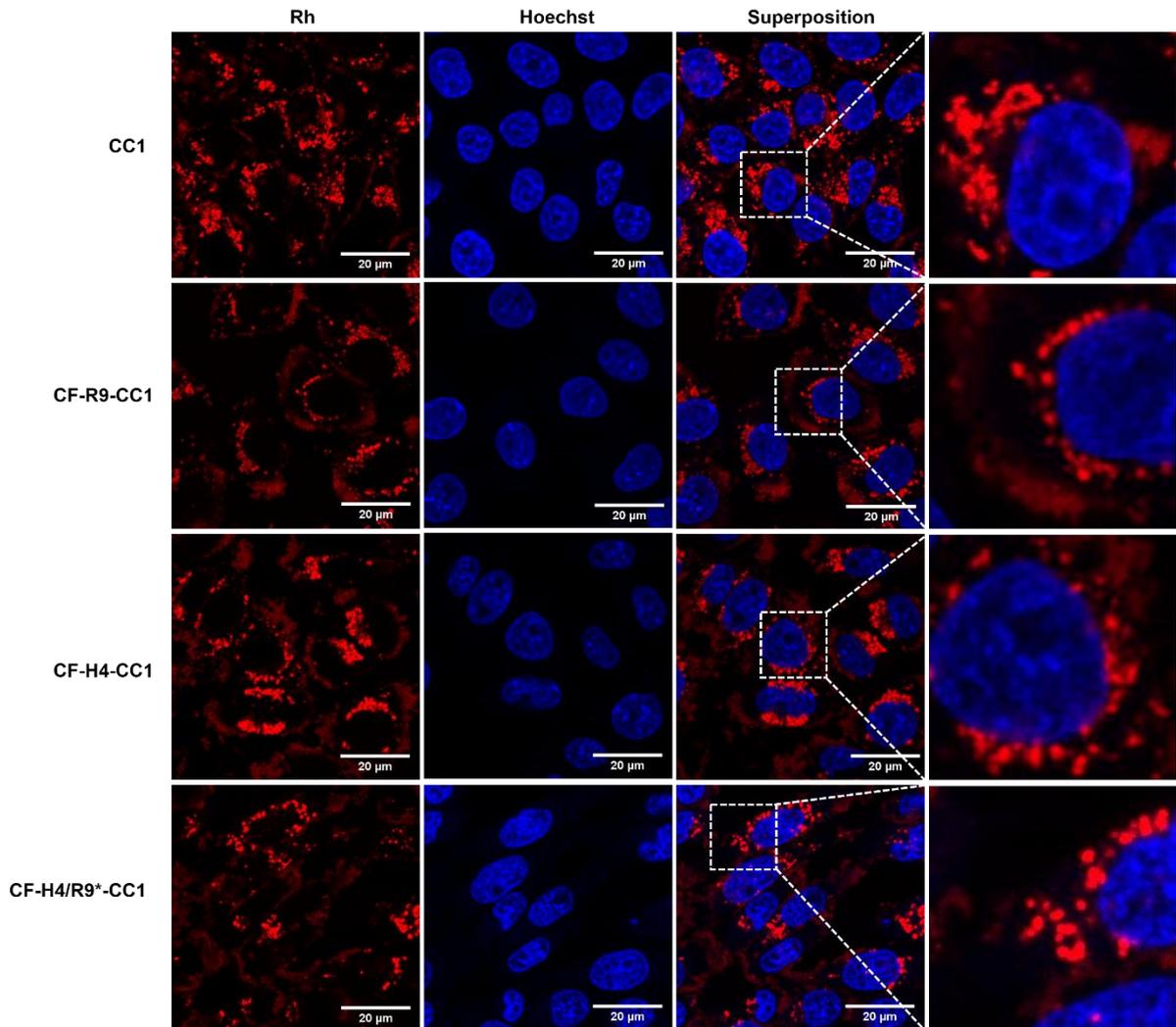


Figure 3.7. Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules vivantes après incubation à 37 °C de cellules CHO-K1 avec **CC1**, **CF-R9-CC1**, **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1** (0,56 mM en fer) pendant 2 h. La rhodamine est représentée en rouge et le colorant Hoechst permettant la visualisation des noyaux des cellules en bleu. Barres d'échelle : 20 µm.

Les nanoparticules cœur-coquilles seules ou après greffage des peptides sont chargées positivement. Elles peuvent donc interagir plus ou moins fortement avec la membrane des cellules qui possède des composants chargés négativement. Après incubation des cellules avec les différents composés, le lavage permet d'éliminer une partie des nanoparticules n'ayant pas été internalisées mais ne permet pas forcément de rompre toutes les liaisons non covalentes entre les objets et la membrane plasmique. Il peut alors être difficile de différencier les nanoparticules qui sont présentes à l'intérieur des cellules, de celles liées à la membrane plasmique.

3.2.4. Extinction de la fluorescence verte par le bleu de trypan

Afin de visualiser uniquement les espèces intracellulaires, un traitement des cellules au bleu de trypan (BT) a été effectué après incubation avec les nanoparticules porteuses de peptides fluorescents. Le bleu de trypan est un colorant bleu qui contient deux chromophores azoïques. Au contact de la carboxyfluorescéine, il agit comme un agent d'extinction de sa fluorescence verte. Cette utilisation a déjà été décrite dans la littérature par Busetto *et al.* et par Illien *et al.* au laboratoire des Biomolécules.^{125,168} Le bleu de trypan est visualisable en microscopie à fluorescence par son émission rouge. La fluorescence rouge extracellulaire et la délimitation des cellules en présence du bleu de trypan prouvent leur intégrité membranaire (figure 3.8).

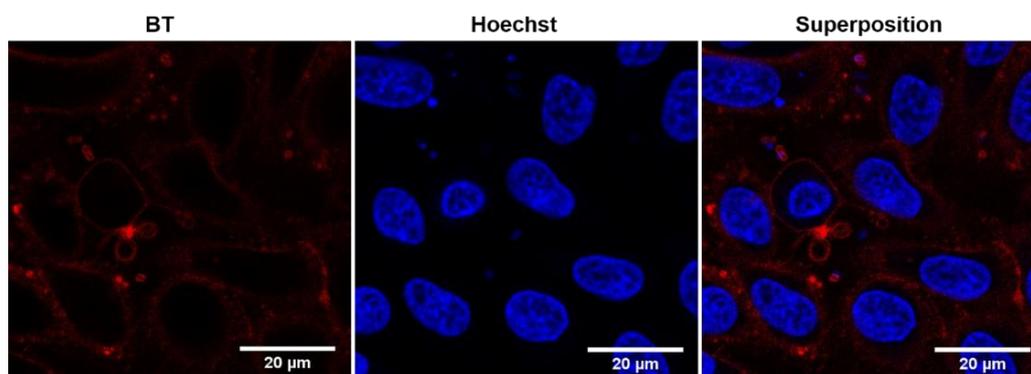


Figure 3.8. Images de microscopie confocale à fluorescence sur cellules vivantes de cellules CHO-K1 (sans internalisation de NP) après ajout du bleu de trypan (BT). La membrane plasmique des cellules est observable par la délimitation rouge du BT. Le bleu de trypan est représenté en rouge et le colorant Hoechst en bleu. Barres d'échelle : 20 µm.

Le bleu de trypan étant incapable de pénétrer dans les cellules, il entraîne uniquement l'extinction de fluorescence des conjugués carboxyfluorescéine-nanoparticules liés à la membrane et permet donc de visualiser uniquement des conjugués intracellulaires. Lors d'une comparaison directe d'images de cellules incubées avec les différents types de NP et traitées ou non traitées au bleu de trypan, des niveaux similaires de fluorescence ponctuelle ont été observés indiquant un piégeage endosomal. Cependant, la fluorescence diffuse observée en absence de bleu de trypan (figure 3.9a) n'était plus détectable pour les cellules traitées au bleu de trypan (figure 3.9b).

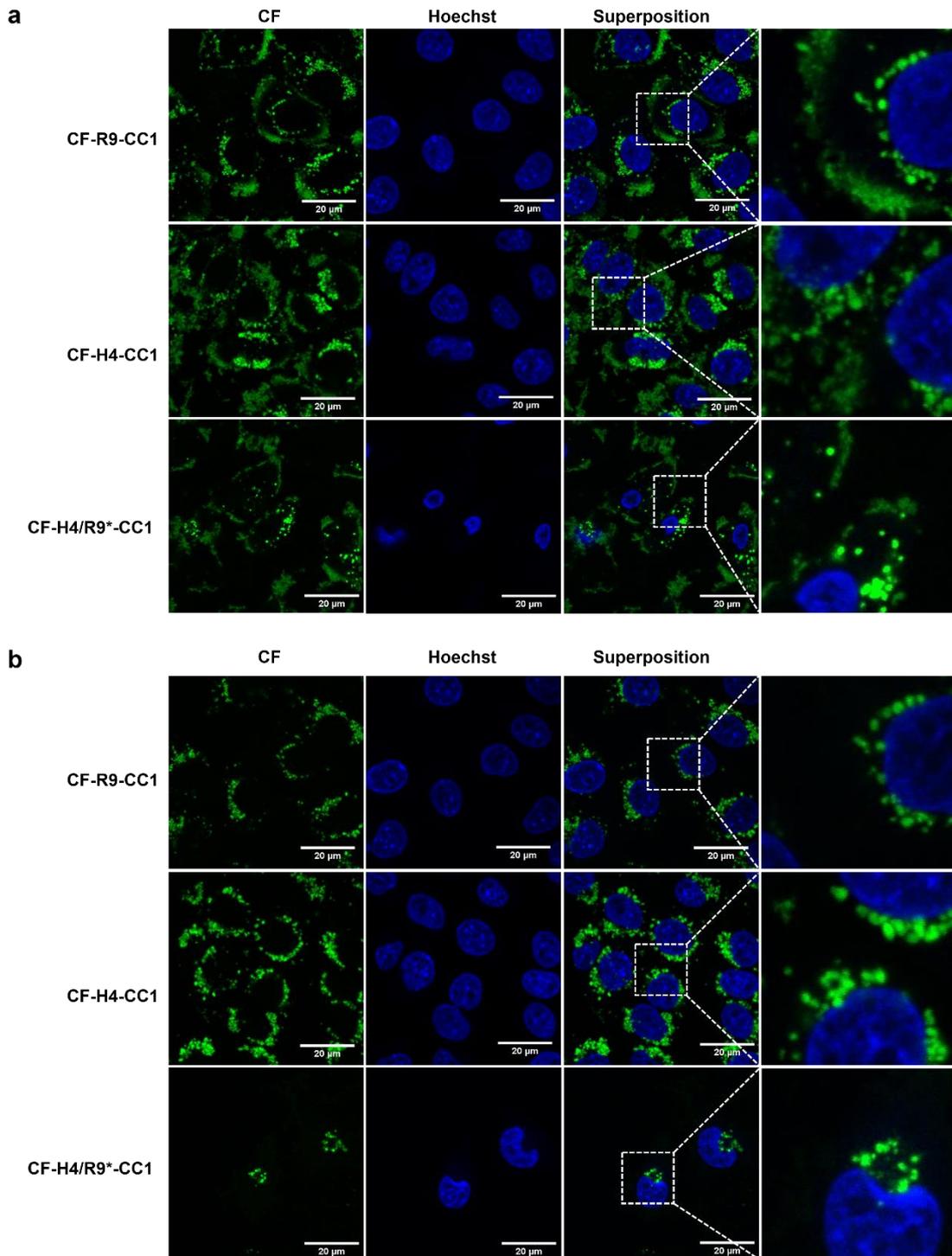


Figure 3.9. Images de microscopie confocale à fluorescence sur cellules vivantes CHO-K1 non traitées au bleu de trypan (a) et sur cellules traitées au bleu de trypan (b) après incubation avec **CF-R9-CC1**, **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1** (0,56 mM en fer) pendant 2 h à 37 °C. La carboxyfluorescéine est représentée en vert et le colorant Hoechst en bleu. Barres d'échelle : 20 μm.

La distribution diffuse initialement observée, en absence de bleu de trypan, correspondait donc vraisemblablement à du peptide membranaire. De ce fait, l'ajout du bleu de trypan

avant l'imagerie est essentiel pour obtenir une représentation précise de la localisation des nanoparticules dans les cellules. D'après les images obtenues, il apparaît qu'après 2 heures d'incubation, toutes les espèces internalisées sont présentes dans les endosomes. Il est à noter que pour les nanoparticules cœur-coquilles **CC1** sans peptide, la fluorescence des composés ne peut pas être éteinte avec l'aide du bleu de trypan. En effet, même si une carboxyfluorescéine était introduite dans la couche de silice des nanoparticules cœur-coquilles, le fluorophore, ne serait pas accessible au bleu de trypan et sa fluorescence ne pourrait être éteinte.

L'extinction de fluorescence, grâce au bleu de trypan, a également été évaluée sur les nanoparticules en solution. Pour ceci, les NP cœur-coquilles **CF-R9-CC1** et **CF-H4-CC1** ont été incubées dans du milieu de culture (DMEM-F12 sans sérum) pendant 6 heures à 37 °C. Après incubation, la moitié de l'échantillon a été traitée au bleu de trypan et l'intensité de fluorescence de la carboxyfluorescéine a été directement mesurée au spectrofluorimètre (figure 3.10). La comparaison de l'intensité de fluorescence avant et après ajout du bleu de trypan confirme l'extinction totale de la fluorescence verte en solution après traitement au bleu de trypan. De plus, cette extinction de fluorescence est observable malgré une forte agrégation des objets après 6 heures d'incubation dans le milieu de culture. Une diminution de l'intensité de fluorescence par deux ou trois est également à noter entre les composés **CF-H4-CC1** et **CF-R9-CC1** avant ajout du bleu de trypan. La plus faible intensité de fluorescence pour **CF-R9-CC1** peut être due à un phénomène d'auto-extinction de la fluorescence de la carboxyfluorescéine, la quantité de peptide fluorescent introduite à la surface des nanoparticules étant plus élevée pour **CF-R9-CC1** que pour **CF-H4-CC1**. Ce même phénomène d'auto-extinction avait été observé précédemment au laboratoire pour des peptides fonctionnalisés par de la fluorescéine lorsqu'ils étaient présents à forte concentration dans certains compartiments intracellulaires.¹⁶⁹ De plus, l'agrégation de **CF-R9-CC1** est plus rapide que celle de **CF-H4-CC1** dans le milieu de culture (partie 3.2.1.), donc après 6 heures d'incubation, les nanoparticules contenant le peptide R9 peuvent former de plus gros agrégats, les peptides se retrouvant plus proches entre eux, ceci peut induire un phénomène d'extinction de fluorescence.

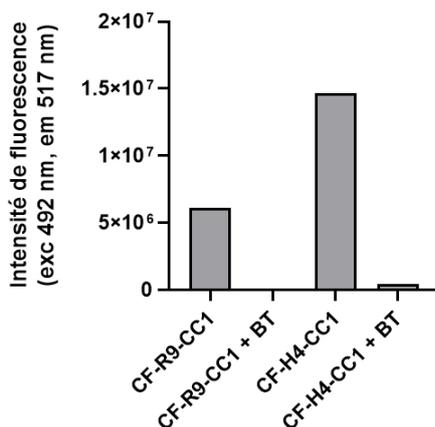


Figure 3.10. Extinction de fluorescence de la carboxyfluorescéine des peptides greffés sur les NP cœur-coquilles **CF-R9-CC1** et **CF-H4-CC1** en solution dans du milieu de culture (DMEM-F12 sans sérum) après ajout du bleu de trypan (BT). Les composés ont été incubés pendant 6 h à 37 °C avec une concentration en fer de 0,56 mM.

3.3. Quantification des nanoparticules dans les cellules

3.3.1. Etude comparative de différentes techniques de quantification

Le greffage des peptides à la surface des nanoparticules cœur-coquilles peut modifier leur capacité de liaison à la membrane des cellules et leur efficacité d'internalisation. Cette tendance peut être étudiée par une quantification des nanoparticules associées aux cellules. Du fait de la présence de fluorophore dans la couche de silice, il est possible de détecter un signal fluorescent plus ou moins important par cellule en utilisant la cytométrie en flux. Cette méthode ne permet pas de remonter à une quantité d'objet par cellule mais elle permet de réaliser une quantification relative. En revanche, il existe deux méthodes qui permettent de déterminer la quantité absolue de fer associée par cellule, qui sont le dosage d'ions fer dans un culot cellulaire par spectrophotométrie d'absorption atomique et la mesure de la vitesse de déplacement des cellules sous champ magnétique par magnétophorèse. Grâce à ces deux techniques, il est possible de déterminer une masse de fer obtenue par cellule dans chacune des conditions étudiées.

Ces trois méthodes d'analyse ont été utilisées sur des cellules traitées dans les mêmes conditions, permettant de comparer les résultats obtenus. Les nanoparticules **CC1**, **CF-R9-CC1** et **CF-H4-CC1** (0,28 mM en fer) ont été incubées dans du milieu de culture

pendant 4 heures à 37 °C avec des cellules CHO-K1 adhérentes. Les cellules ont ensuite été lavées et réincubées 2 heures supplémentaires dans du milieu de culture frais sans nanoparticules. Ces 2 dernières heures d'incubation devraient permettre à un grand nombre de nanoparticules présentes au niveau de la membrane plasmique des cellules d'être internalisées. Il est à noter que les techniques d'analyse utilisées ici ne permettent pas de différencier les nanoparticules liées à la membrane plasmique des nanoparticules présentes au niveau intracellulaire. On dose donc dans les trois cas la quantité totale de nanoparticules associées aux cellules, incluant celles internalisées dans les cellules et également celles potentiellement liées à leur surface.

3.3.1.1. Quantification de la fluorescence par cytométrie en flux

L'internalisation des nanoparticules cœur-coquilles avec ou sans peptides greffés à leur surface permet aux cellules de devenir fluorescentes grâce à la rhodamine qui est présente dans la couche de silice des NP cœur-coquilles. La fluorescence des cellules a été analysée par cytométrie en flux. La quantité de peptide **CF-R9** et **CF-H4** n'étant pas la même à la surface des NP, il n'était pas possible de suivre la fluorescence de la carboxyfluorescéine pour cette étude. De plus, la rhodamine est le seul fluorophore présent sur les nanoparticules cœur-coquilles en absence de peptide (**CC1**), il était donc indispensable de suivre la rhodamine pour pouvoir comparer l'internalisation cellulaire des NP **CC1**, **CF-R9-CC1** et **CF-H4-CC1**.

Le principe de la cytométrie en flux est détaillé figure 3.11. Chaque cellule traverse le laser de lumière et l'émission de fluorescence du fluorophore fournit des informations sur les propriétés de la cellule. Deux détecteurs sont généralement utilisés, le FSC (Forward Scatter) qui donne une estimation de la taille des cellules avec les particules plus grosses réfractant plus de lumière que les petites. L'autre détecteur est situé à 90 ° par rapport à la ligne d'excitation et est appelé SSC (Side Scatter). Le SSC peut fournir des informations sur la granularité des cellules (Figure 3.11).

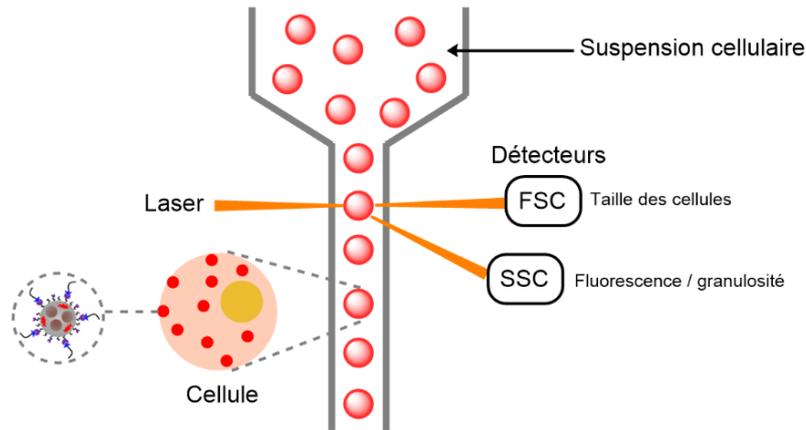


Figure 3.11. Principe de la cytométrie en flux. FSC = forward scatter et SSC = side scatter.

La quantité de nanoparticules cœur-coquilles présentes dans les cellules CHO-K1 après 6 heures d'incubation a donc été étudiée par cytométrie en flux en analysant la fluorescence de 2 000 cellules pour chaque condition. L'intensité de fluorescence moyenne mesurée pour **CF-R9-CC1** et **CF-H4-CC1** a été comparée à l'intensité de fluorescence des nanoparticules cœur-coquilles non fonctionnalisées par les peptides. Il est à noter que toutes les cellules contenaient de la rhodamine dans les conditions étudiées. Une faible diminution de l'intensité de fluorescence est observée figure 3.12a en présence des peptides greffés à la surface des nanoparticules cœur-coquilles par rapport aux NP cœur-coquilles seules **CC1**.

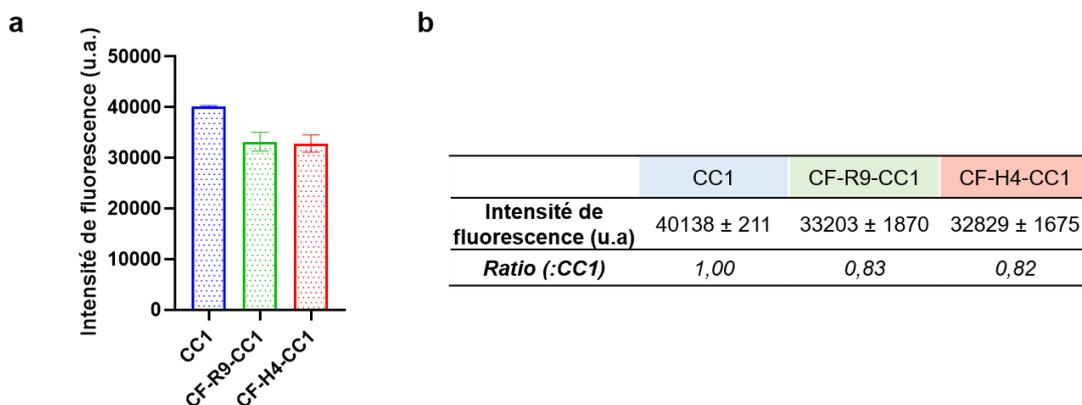


Figure 3.12. a) Comparaison de l'intensité de fluorescence (rhodamine) obtenue par cytométrie en flux des cellules après incubation avec **CC1**, **CF-R9-CC1** et **CF-H4-CC1** (0,28 mM en fer) pendant 6 h à 37 °C. b) Table des résultats obtenus, indiqués en moyenne ± écart-type. Les mesures ont été réalisées en duplicata.

L'intensité de fluorescence obtenue en cytométrie en flux est proportionnelle à la quantité de nanoparticules cœur-coquilles associées aux cellules. Il apparaît que cette quantité est similaire quel que soit le peptide greffé à la surface des cœur-coquilles. De plus, les ratios **CF-R9-CC1:CC1** et **CF-H4-CC1:CC1** sont d'environ 0,8, soit une diminution de 20 % de la quantité de nanoparticules porteuses de peptides par rapport aux nanoparticules cœur-coquilles seules **CC1** (figure 3.12b).

3.3.1.2. Quantification par magnétophorèse cellulaire

L'incubation des cellules avec les nanoparticules cœur-coquilles permet également aux cellules de devenir magnétiques. Il est alors possible de mesurer la charge magnétique des cellules par une technique appelée magnétophorèse cellulaire.¹⁷⁰ Les cellules ont été soumises à un gradient de champ magnétique calibré puis à partir de séquences vidéos, le diamètre (d_{cell}) et la vitesse (v_{cell}) des cellules vers l'aimant ont été mesurées. L'aimantation d'une cellule seule (M_{cell}) a été obtenue en équilibrant sa force de frottement visqueuse ($F_{\text{vis}} = 3\pi\eta d_{\text{cell}}v_{\text{cell}}$) à la force magnétique ($F_{\text{mag}} = M_{\text{cell}}\text{grad}B$) car les cellules ont été attirées et déplacées par un gradient magnétique constant ($\text{grad}B$). La magnétisation d'une cellule seule donne ainsi la charge magnétique d'une cellule en terme de masse équivalente de fer (exprimée en pg).

La magnétophorèse cellulaire a été réalisée par Claire Wilhelm (Institut Curie). Les résultats obtenus indiquent que les nanoparticules cœur-coquilles ont été internalisées un peu moins efficacement en présence des peptides greffés avec une charge moyenne en fer de 10 pg par cellule pour les NP cœur-coquilles **CC1**, contre environ 8 pg de fer par cellule pour les NP **CF-R9-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1** et 7 pg de fer par cellule pour les NP **CF-H4-CC1** (Figure 3.13, Table 3.1).

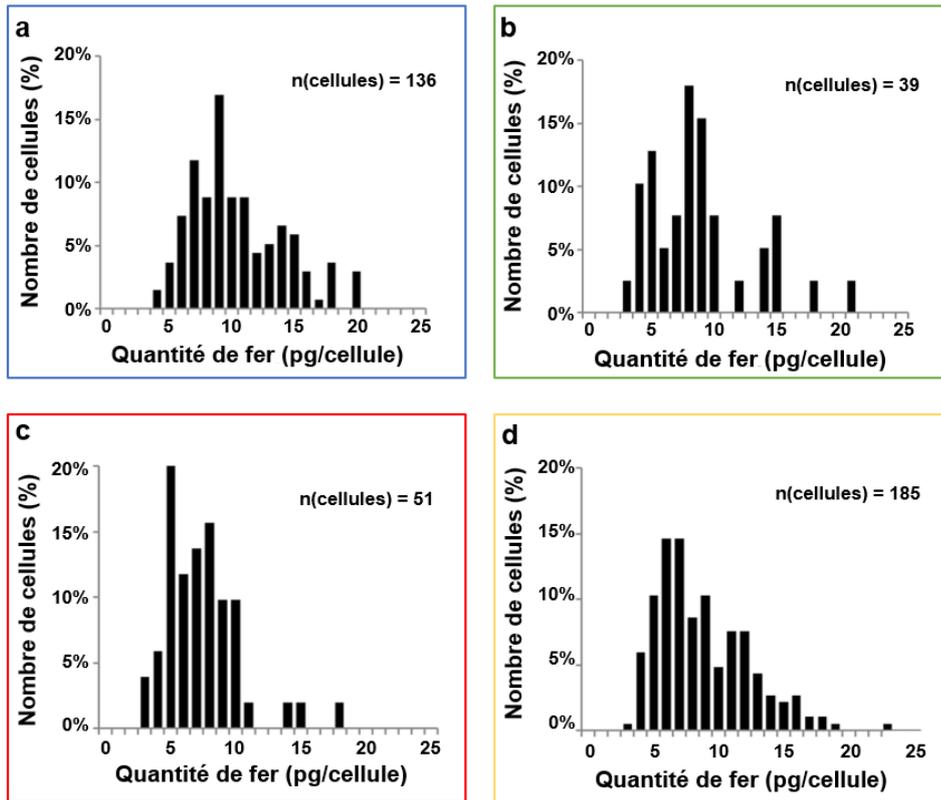


Figure 3.13. Répartition de la charge en fer par cellule, exprimée en pg de fer, qui a été mesurée pour un nombre n de cellules individuelles par magnétophorèse cellulaire. Les cellules ont été incubées pendant 6 h à 37 °C avec les échantillons **CC1** (a), **CF-R9-CC1** (b), **CF-H4-CC1** (c) et **CF-H4/R9*-CC1** (d). Les différents échantillons ont été incubés avec les cellules à une concentration en fer de 0,28 mM. Expériences de magnétophorèse réalisées par Claire Wilhelm (Institut Curie).

Les résultats obtenus avec cette méthode corrélient bien avec ceux issus de la cytométrie en flux. Une diminution de la quantité de fer par cellule d'environ 20 % est observée lors de l'internalisation de **CF-R9-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1** par rapport à **CC1**. En revanche, pour **CF-H4-CC1** la diminution de la charge en fer par cellule est de 30 % par rapport à **CC1** (table 3.1). Cependant le nombre de cellules prises en compte pour la quantification en fer était un peu faible pour **CF-R9-CC1** (39 cellules) et **CF-H4-CC1** (51 cellules), ce qui pourrait altérer la moyenne obtenue de la charge en fer par cellule.

	CC1	CF-R9/CC1	CF-H4-CC1	CF-H4/R9*-CC1
pg fer/cellule	9,9 ± 0,4	8,3 ± 0,5	6,9 ± 0,4	8,3 ± 0,4
Ratio (:CC1)	1,00	0,84	0,70	0,84

Table 3.1. Résumé de la quantification de fer par cellule (en pg fer/cellule) en utilisant la magnétophorèse, après incubation des cellules avec **CC1**, **CF-R9-CC1**, **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1** à une concentration en fer de 0,28 mM pendant 6 h à 37 °C. Les résultats sont indiqués en moyenne ± écart-type.

3.3.1.3. Quantification par spectrométrie d'absorption atomique (AAS)

La dernière technique utilisée pour quantifier les nanoparticules associées aux cellules est le dosage des ions fer par spectrophotométrie d'absorption atomique (AAS). Cette technique a permis de déterminer une masse de fer par cellule. Les cellules contenant les oxydes de fer ont été lysées et les nanoparticules dégradées en présence d'acide chlorhydrique, puis les solutions obtenues ont été dosées par AAS. La concentration en fer mesurée par cette méthode peut être rapportée au nombre moyen de cellules présentes dans l'échantillon. Les résultats obtenus sont indiqués en quantité moyenne de fer par cellule (exprimée en pg) et sont représentés figure 3.14a. Quelle que soit la condition, une quantité de fer d'environ 8 pg par cellule a été mesurée.

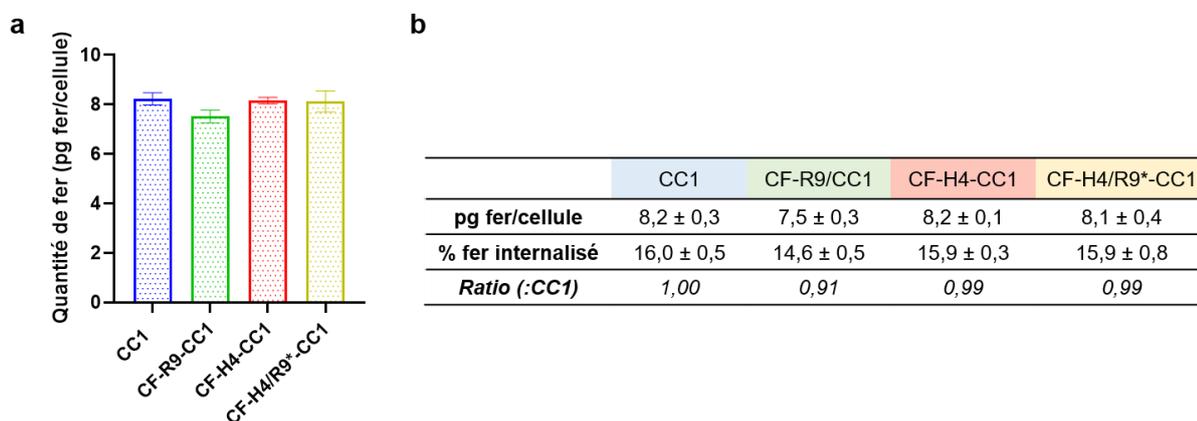


Figure 3.14. a) Résultat de la quantification de fer par cellule (en pg fer/cellule) obtenue par AAS, après incubation des cellules avec **CC1**, **CF-R9-CC1**, **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1** à une concentration en fer de 0,28 mM pendant 6 h à 37 °C. b) Table des résultats obtenus, indiqués en moyenne ± écart-type. Les mesures ont été réalisées en duplicata.

Avec cette méthode, le ratio obtenu pour **CF-H4-CC1:CC1** et **CF-H4/R9*-CC1:CC1** est de 1. Le ratio est très légèrement plus faible pour **CF-R9-CC1:CC1**, une diminution de l'internalisation de 10 % est observée en présence du peptide polyarginine par rapport aux autres conditions. A partir de ces résultats, il est également possible de déterminer le pourcentage de fer associé aux cellules par rapport à la quantité de fer introduite initialement dans le surnageant des cellules. Celui-ci, après les 6 heures d'incubation, correspond à 15-16 % de la quantité de fer totale ajoutée (figure 3.14b).

3.3.1.4. Conclusion sur la quantification des nanoparticules dans les cellules

Les trois méthodes de quantification que nous avons utilisées sont complémentaires et permettent de comparer la quantité de nanoparticules cœur-coquilles associées aux cellules en présence ou non du greffage des peptides. Quel que soit la méthode d'analyse, une légère diminution de l'internalisation est observée en présence des peptides sur les nanoparticules. De plus, il est important de noter que la charge en fer dosée dans les cellules est similaire avec les deux techniques utilisées (magnétophorèse et AAS).

3.3.2. Etude de l'internalisation des nanoparticules en fonction du temps d'incubation

Une investigation plus poussée a été réalisée pour étudier l'effet du temps d'incubation des NP avec les cellules. Pour cette étude, les échantillons **CC1**, **CF-R9-CC1**, **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1** ont été incubés avec des cellules CHO-K1 adhérentes pendant 2, 4 et 6 heures à 37 °C, en utilisant cette fois-ci une concentration en fer de 0,56 mM. Il est à noter également que les cellules n'ont pas été incubées avec du milieu seul après incubation avec les NP. Les résultats ont été obtenus grâce au dosage des ions fer par AAS.

Une augmentation de la quantité de fer par cellule est observée pour tous les échantillons lorsque l'on augmente le temps d'incubation (figure 3.15a). De plus, lorsque les cellules sont incubées avec les échantillons à une concentration de 0,56 mM en fer, les nanoparticules cœur-coquilles **CC1** conduisent à une quantité de fer associée aux cellules moindre que celles observée avec les conjugués peptide-nanoparticule **CF-R9-CC1**, **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1**. Cette observation est valable à tous les temps étudiés. Les valeurs les plus importantes sont obtenues avec les composés **CF-R9-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1**, à nouveau pour tous les temps d'incubation. Néanmoins, l'écart entre les échantillons **CC1**, **CF-H4-CC1** et **CF-R9-CC1** se réduit au cours du temps (figure 3.15).

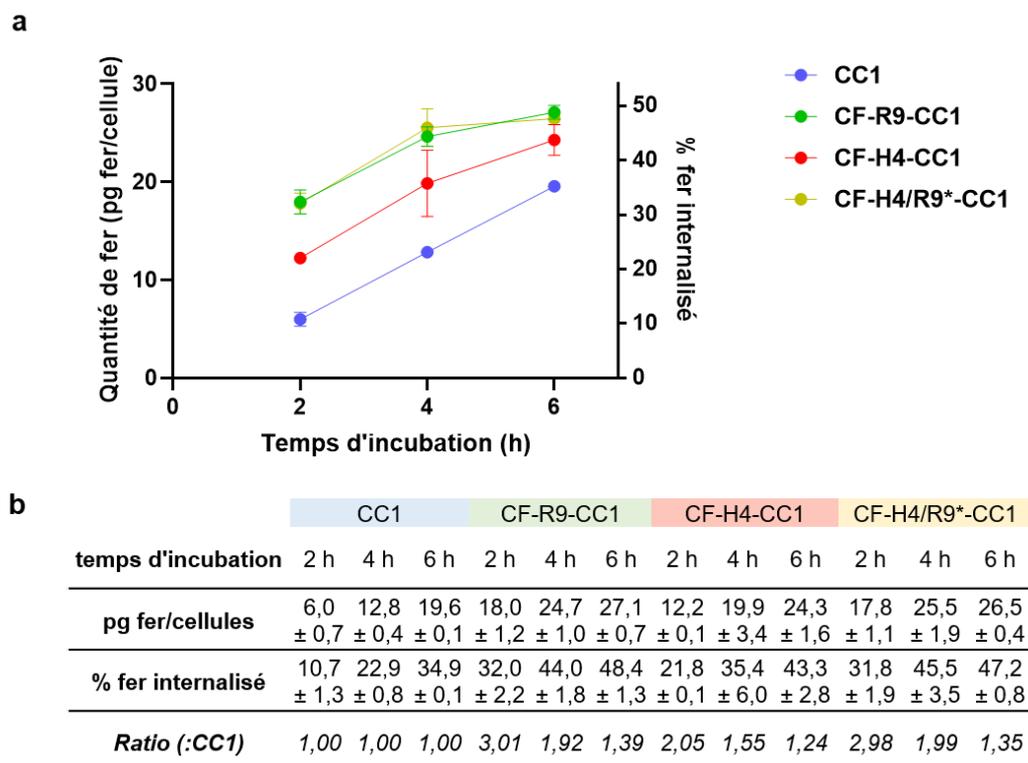


Figure 3.15. Evolution de la quantité de fer par cellule (exprimée en pg fer/cellule) et du pourcentage de fer associé aux cellules par rapport à la quantité initialement introduite, en fonction du temps d'incubation des cellules avec les échantillons **CC1**, **CF-R9-CC1**, **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1**. Les différents échantillons ont été incubés à 37 °C avec les cellules CHO-K1 à une concentration en fer de 0,56 mM. Les mesures ont été réalisées par AAS en duplicata. b) Table résumant la quantification de fer par cellule (en pg fer/cellule) par AAS. Les résultats sont indiqués en moyenne ± écart-type.

En présence des peptides, une augmentation rapide de la quantité de fer associée aux cellules est notable jusqu'à 4 heures d'incubation, on semble ensuite tendre vers un plateau. En revanche, en absence des peptides, la quantité de fer associée aux cellules augmente de façon plus linéaire avec un doublement entre 2 et 4 heures (figure 3.15a). Après 6 heures d'incubation, on mesure 20 pg de fer/cellule (35 % du fer initial) pour les nanoparticules **CC1**, 24 pg de fer (43 % du fer initial) pour **CF-H4-CC1** et 27 pg (48 % du fer initial) pour **CF-R9-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1** (figure 3.15b).

On peut donc noter qu'en présence du peptide R9 on obtient une quantité de fer associée aux cellules significativement plus élevée. Cette observation pourrait s'expliquer par une plus forte interaction du peptide R9 avec la membrane plasmique.

3.4. Le peptide vecteur R9 permet-il la translocation cellulaire des nanoparticules cœur-coquilles ?

L'endocytose et la translocation directe sont deux mécanismes envisageables pour l'internalisation des NP **CF-R9-CC1**. Pour distinguer les deux voies d'entrée, nous avons comparé l'internalisation du composé à 37 °C et 4 °C. En effet, à 37 °C, l'endocytose et la translocation peuvent théoriquement avoir lieu. En revanche, à 4 °C les voies d'endocytose sont inhibées et seule la translocation reste possible. Une étude de l'internalisation à 4 °C peut donc permettre de mettre en évidence si le greffage du peptide R9 sur les nanoparticules promeut leur entrée par translocation directe. De plus, à l'aide du traitement des cellules par le bleu de trypan, il est possible de détecter uniquement les nanoparticules présentes à l'intérieur des cellules, que ce soit par cytométrie en flux que par microscopie confocale.

3.4.1. Analyse par cytométrie en flux

Une première étude des voies d'entrée des NP **CF-R9-CC1** a été réalisée par cytométrie en flux. Nous avons au préalable déterminé la quantité nécessaire de bleu de trypan pour permettre l'extinction de fluorescence de la carboxyfluorescéine au niveau des membranes. Des cellules en suspension ont été incubées à 37 °C pendant 2 heures avec le conjugué **CF-R9-CC1** avant l'ajout de différentes quantités de bleu de trypan en amont de la mesure avec le cytomètre. La figure 3.16 montre une importante diminution de l'intensité de fluorescence après traitement avec le bleu de trypan, l'extinction de fluorescence membranaire maximale étant atteinte dès l'ajout de 0,1 % de bleu de trypan. Il est important de noter qu'après 2 heures d'incubation, 70 % de la fluorescence se trouve au niveau de la membrane plasmique et seulement 30 % de la fluorescence détectée se trouve au niveau intracellulaire. Ce résultat confirme que lors de la quantification de la rhodamine des NP par cytométrie en flux (partie 3.3.1.1), des NP associées à la membrane plasmique étaient certainement également quantifiées avec les NP internalisées, même si les conditions d'incubation sont différentes dans les deux expériences. En particulier ici l'expérience a été faite avec des cellules en suspension, ce qui augmente de façon importante la surface membranaire et les lavages des cellules sont plus délicats. On

s'attend donc à ce que la fraction membranaire soit nettement plus importante que dans les expériences sur cellules adhérentes.

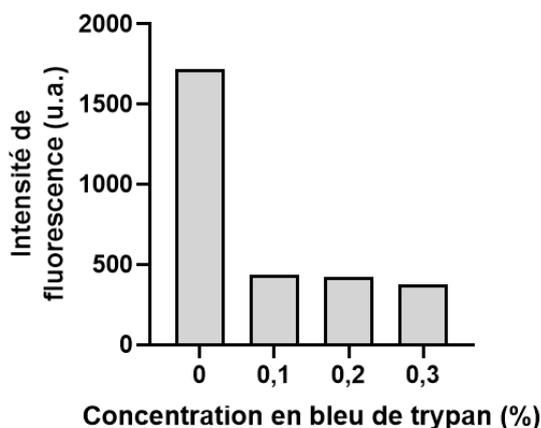


Figure 3.16. Evaluation de l'extinction de fluorescence de la carboxyfluorescéine par cytométrie en flux en présence de bleu de trypan (en % m/vol). Les cellules ont été incubées pendant 2 h à 37 °C avec 0,28 mM en fer de **CF-R9-CC1**. Après lavages, les cellules ont été analysées en présence ou absence de bleu de trypan.

L'analyse par cytométrie en flux a ensuite été réalisée en présence ou non de bleu de trypan (0,2 %) après incubation des cellules avec les NP **CF-R9-CC1** à 4 °C ou à 37 °C pendant 2 heures. Les cellules ont été incubées avec les NP à trois concentrations différentes (0,14 mM ; 0,28 mM et 0,56 mM en fer). Ce qui est notable figure 3.17, c'est qu'en l'absence de traitement au bleu de trypan, l'intensité de fluorescence des cellules est du même ordre de grandeur après incubation à 4 °C et à 37 °C. Le traitement au bleu de trypan conduit à nouveau à une diminution importante de l'intensité de fluorescence pour les cellules incubées à 37 °C, le phénomène étant encore plus marqué à 4°C (figure 3.17). La comparaison des données obtenues à 37°C et 4°C en présence de bleu de trypan montre que l'entrée des NP se fait exclusivement par endocytose, et ce quel que soient les concentrations initiales de **CF-R9-CC1** que nous avons utilisées.

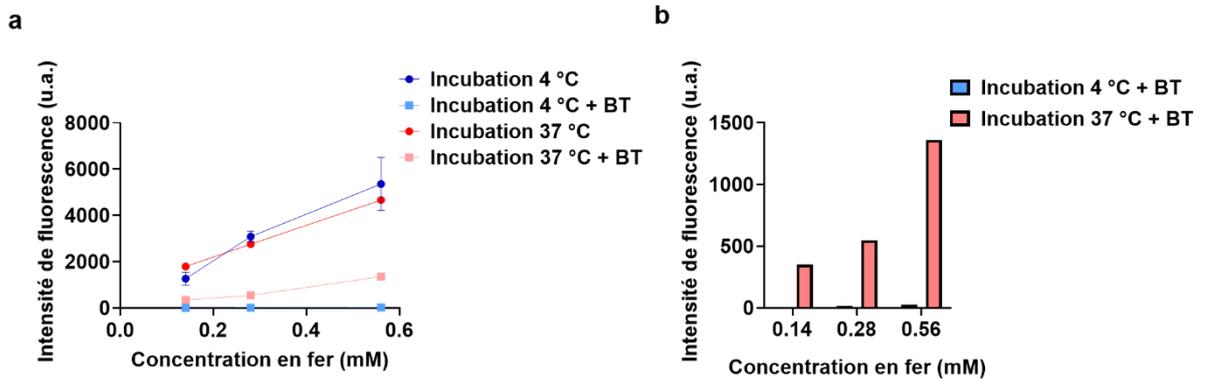


Figure 3.17. a) Comparaison de l'intensité de fluorescence des cellules après incubation en présence de **CF-R9-CC1** (0,14 ; 0,28 ; 0,56 mM en fer) pendant 2 h à 4 °C et 37 °C. Après lavages, les cellules ont été analysées en cytométrie en flux en présence ou absence de 0,2 % de bleu de trypan (BT). L'autofluorescence des cellules (mesurée sans NP) a été soustraite de l'intensité de fluorescence des cellules après incubation avec les NP. b) Histogrammes de l'intensité de fluorescence des cellules après incubation en présence de **CF-R9-CC1** après traitement au bleu de trypan (nanoparticules internalisées).

3.4.2. Analyse par microscopie confocale à fluorescence

La microscopie confocale est également largement utilisée pour étudier l'internalisation cellulaire des nanoparticules et des peptides. Une observation sur cellules vivantes est préférable étant donné la quantité importante de nanoparticules se trouvant au niveau de la membrane plasmique, un traitement au bleu de trypan permet alors de visualiser uniquement les conjugués peptide-nanoparticule présents à l'intérieur des cellules. Cette technique de microscopie permet d'étudier la localisation intracellulaire des composés et donne donc des éléments sur le mécanisme d'internalisation. La translocation directe des composés les amène à se situer dans le cytosol et est généralement associée à un marquage diffus dans le cytoplasme, alors qu'un marquage ponctué est indicatif d'une localisation vésiculaire par endocytose.^{88,142} Néanmoins un marquage vésiculaire très intense peut masquer un marquage diffus du cytoplasme, ce qui peut conduire à des observations trompeuses. C'est pourquoi, les nanoparticules cœur-coquilles seules **CC1** et conjuguées au peptide R9 **CF-R9-CC1** ont été incubées avec les cellules CHO-K1 à 4 et 37°C pendant 2 heures, pour analyser leur mécanisme d'entrée.

Etude de l'internalisation des nanoparticules cœur-coquilles seules CC1

Tout d'abord, nous avons observé que les nanoparticules cœur-coquilles **CC1** sont internalisées très efficacement à 37 °C dans les cellules CHO-K1, où une ponctuation de la fluorescence rouge (rhodamine) est visualisée en particulier autour des noyaux (figure 3.18) indiquant une entrée par endocytose. A l'inverse, à 4 °C, l'intensité de fluorescence trouvée au niveau des cellules est beaucoup plus faible, et est située à distance du noyau (figure 3.18). Ce signal provient probablement des nanoparticules se trouvant au niveau de la membrane plasmique et non à l'intérieur des cellules. Les nanoparticules cœur-coquilles **CC1** semblent donc être internalisées dans les cellules exclusivement par endocytose, aucune fluorescence diffuse indiquant une possible translocation n'a pu être observée.

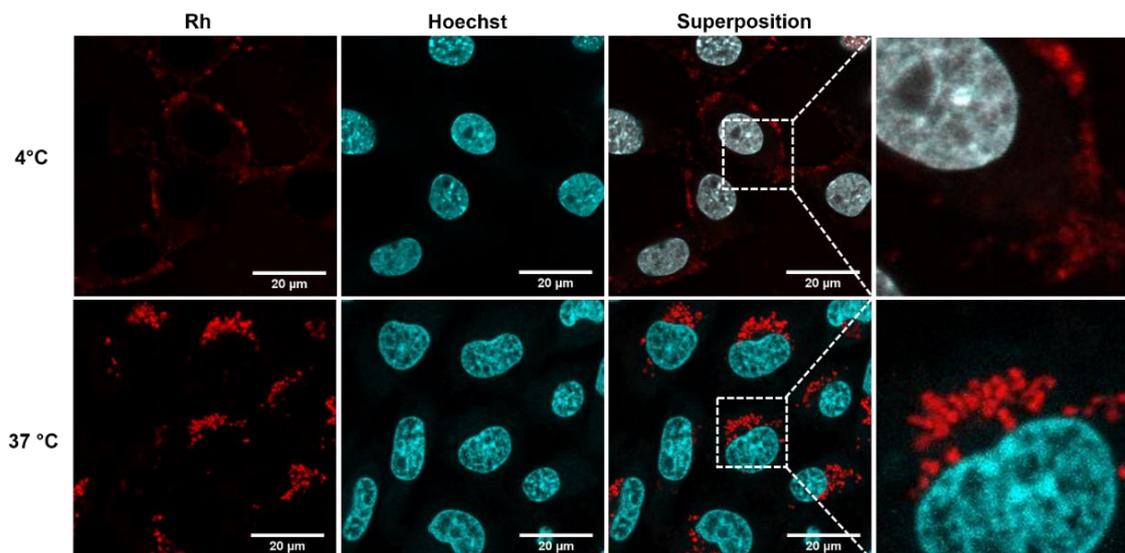


Figure 3.18. Images de microscopie confocale à fluorescence sur cellules vivantes après incubation des cellules CHO-K1 à 4 °C et à 37 °C avec **CC1** (0,28 mM en fer) pendant 2 h. La rhodamine est représentée en rouge et le colorant Hoechst en cyan. Barres d'échelle : 20 µm.

Etude de l'internalisation des nanoparticules cœur-coquilles conjuguées au CPP R9

Après incubation des cellules avec les nanoparticules **CF-R9-CC1** à 37 °C, on observe à la fois de la fluorescence ponctuée et diffuse lorsque les cellules ne sont pas traitées au bleu de trypan (figure 3.19). La visualisation de la distribution de la carboxyfluorescéine dans les cellules permet d'utiliser le bleu de trypan pour éteindre cette fluorescence verte au niveau de la membrane plasmique et d'observer uniquement les nanoparticules **CF-R9-CC1** internalisées à l'intérieur des cellules. Les images de microscopie après traitement

des cellules au bleu de trypan montrent uniquement une fluorescence ponctuelle autour des noyaux (figure 3.19). La distribution cellulaire des NP **CF-R9-CC1** est donc similaire à celle des NP **CC1**, et montre que ces NP pénètrent également principalement par endocytose. Aucune fluorescence diffuse n'est observable à 37 °C. Cependant, la fluorescence diffuse peut être dissimulée par l'intense signal ponctué vésiculaire. Une analyse de l'internalisation des cellules à 4 °C en présence des nanoparticules cœur-coquilles **CF-R9-CC1** va permettre de déterminer si une translocation des objets est possible.

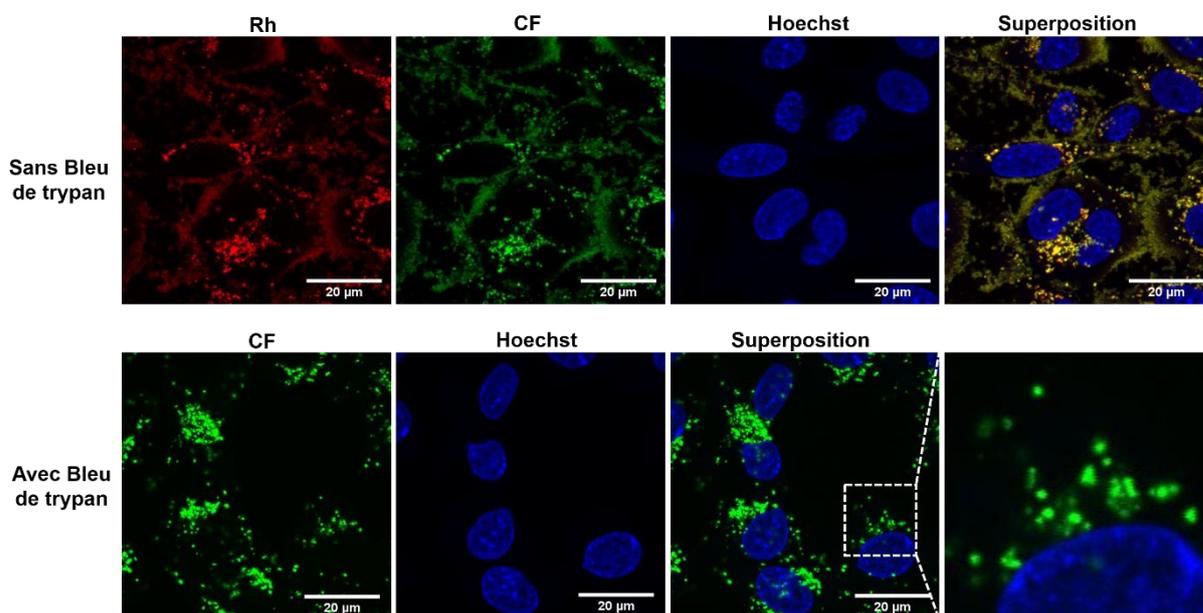


Figure 3.19. Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules CHO-K1 vivantes qui ont été incubées à 37 °C avec **CF-R9-CC1** (0,28 mM en fer) pendant 2 h puis traitées ou non au bleu de trypan. La rhodamine est représentée en rouge, la carboxyfluorescéine en vert et le colorant Hoechst en bleu. Barres d'échelle : 20 μm.

Les résultats de l'incubation à 4 °C des NP **CF-R9-CC1** avec les cellules CHO-K1 sont montrés figure 3.20. La fluorescence rouge et verte, correspondant respectivement à la rhodamine et à la carboxyfluorescéine, sont observables au contour des cellules, probablement au niveau de la membrane plasmique. Cette hypothèse a été confirmée après traitement des cellules au bleu de trypan, où aucune fluorescence verte n'est détectable sur les images de microscopie (figure 3.20). Le bleu de trypan émet également dans le rouge, donc la fluorescence rouge observable après ajout du bleu de trypan peut

provenir à la fois de la rhodamine des cœur-coquilles et du bleu de trypan. Cette fluorescence rouge permet de visualiser le contour des cellules.

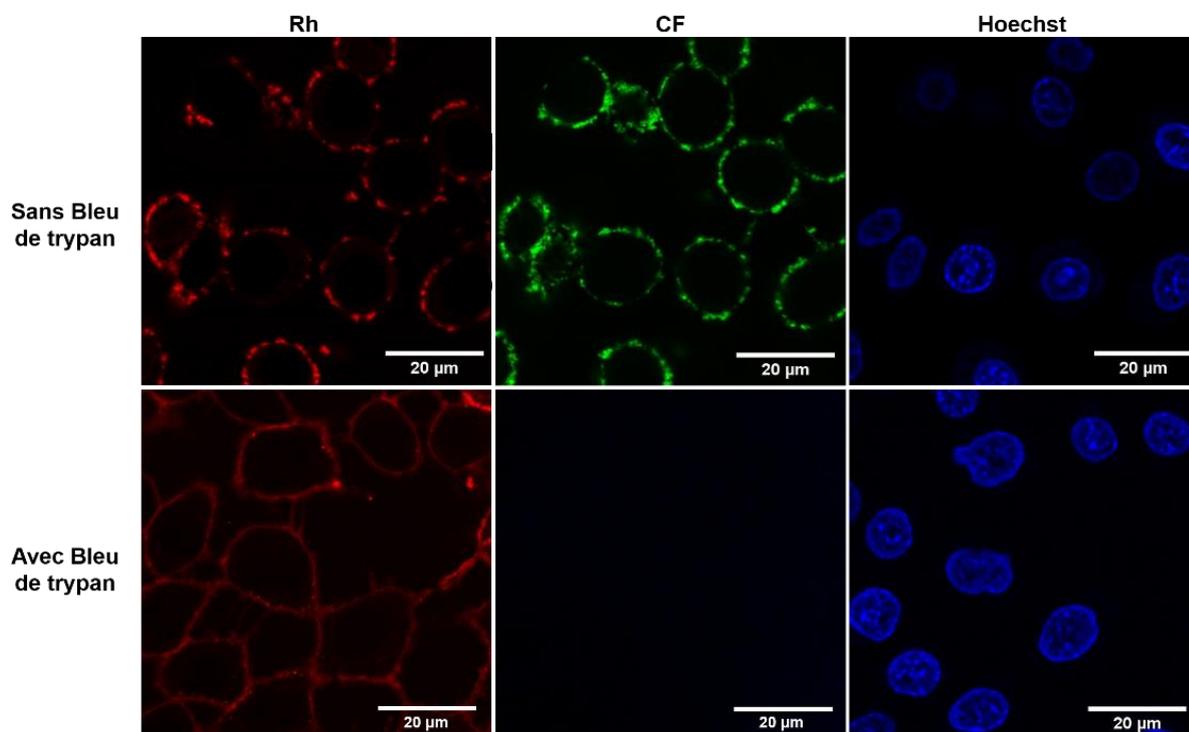


Figure 3.20. Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules CHO-K1 vivantes qui ont été incubées à 4 °C avec **CF-R9-CC1** (0,28 mM) pendant 2 h puis traitées ou non au bleu de trypan. La rhodamine est représentée en rouge, la carboxyfluorescéine en vert et le colorant Hoechst en bleu. Barres d'échelle : 20 µm.

3.4.3. Conclusion sur la possibilité de translocation des nanoparticules grâce au CPP polyarginine

La cytométrie en flux et la microscopie confocale ont été utilisées pour étudier l'effet du greffage covalent du CPP R9 à la surface des nanoparticules cœur-coquilles sur l'internalisation cellulaire. L'incubation des cellules à 4 °C permet de bloquer l'endocytose et de visualiser uniquement l'internalisation par translocation. Il est à noter que la membrane plasmique est sûrement moins fluide à 4 °C qu'à 37 °C, conduisant probablement à une translocation directe moins efficace à basse température. D'après les résultats obtenus à 37 °C et à 4 °C, aucune translocation des conjugués peptide-nanoparticule n'a été observée, que ce soit en cytométrie en flux ou en microscopie confocale. Le peptide **CF-R9**, bien qu'il soit capable de transloquer dans les cellules

lorsqu'il est non conjugué,¹²⁷ ne permet donc pas de promouvoir la translocation des nanoparticules à travers la membrane plasmique. Ceci peut provenir de la taille finale, relativement importante, de nos nanoparticules (diamètre hydrodynamique d'environ 58 nm). Par ailleurs, d'après certaines données de la littérature une agrégation des CPP R9 au niveau de la membrane plasmique favorise leur entrée par translocation.¹²⁸ Or ici les peptides se retrouvent covalamment liés à la surface des nanoparticules, ce qui modifie leur mode d'interaction avec les différents composants de la membrane plasmique et par conséquent, leur mode d'internalisation. Les peptides riches en résidus arginines ont parfois été utilisés dans la littérature pour induire une fuite endosomale.¹⁷¹ Ainsi, suite à ces premières expériences, nous avons voulu examiner la capacité de fuite des endosomes de nos NP cœur-coquilles fonctionnalisées par ce CPP ou par le peptide polyhistidine.

3.5. Les peptides riches en résidus arginine ou histidine permettent-ils la sortie des endosomes des nanoparticules ?

Lors de l'étude précédente (partie 3.2), l'observation des cellules réalisée après 2 heures d'incubation à 37 °C avec les nanoparticules avait fait apparaître une fluorescence exclusivement ponctuelle (après traitement au bleu de trypan), indiquant que dans ces conditions, les conjugués étaient piégés dans les endosomes. Nous avons pensé qu'un temps d'incubation plus long pourrait favoriser l'observation d'un échappement endosomal des nanoparticules qui serait facilité par les peptides. Il a donc été choisi d'incuber les différentes nanoparticules avec les cellules CHO-K1, cette fois-ci pendant 6 heures.

Préalablement, la distribution des peptides non conjugués dans les cellules CHO-K1 a été étudiée après 6 heures d'incubation avec 10 µM de peptides fluorescents **CF-R9** et **CF-H4**. Les images de microscopie confocale présentées figure 3.21, montrent une localisation intracellulaire similaire pour le peptide **CF-R9** après 2 et 6 heures d'incubation (figure 3.6, partie 3.2.2). D'après ces expériences il est difficile de savoir si le peptide polyarginine induit une fuite endosomale. En effet, le peptide était déjà présent en quantité importante dans le cytosol après 2 heures d'incubation. Nous n'avons pas étudié ici en détail le mécanisme d'entrée de ce CPP, mais les travaux antérieurs du laboratoire (LBM)

indiquent que ce peptide est capable de transloquer efficacement,¹²⁷ il est donc probable que les espèces cytosoliques observées ici provenaient en grande partie d'une translocation de la membrane plasmique. Une fluorescence ponctuée est toujours présente témoignant de l'existence d'endosomes contenant les peptides R9. Le peptide **CF-H4** présente quant à lui une très faible fluorescence ponctuée après 6 heures d'incubation avec les cellules, comme observé après 2 heures d'incubation. Ce peptide pénètre donc très peu par endocytose, certainement du fait de sa charge neutre à pH physiologique (figure 3.21). De plus, aucune fluorescence diffuse n'est observée. Il ne pénètre donc pas dans les cellules par translocation directe et aucune fuite des endosomes n'est observée, peut-être du fait de sa faible concentration dans les endosomes.

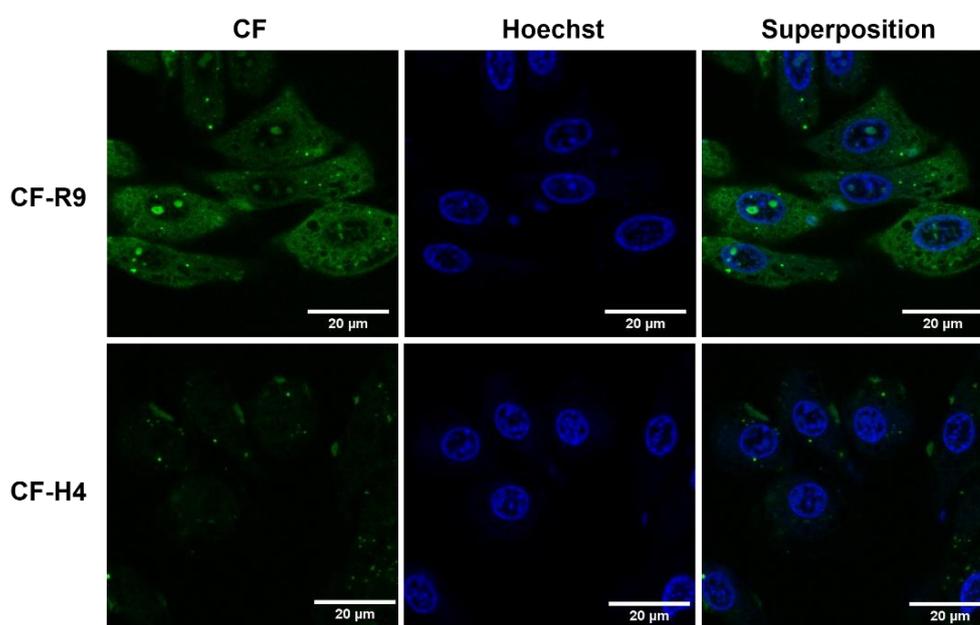


Figure 3.21. Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules vivantes après incubation des cellules CHO-K1 avec les peptides **CF-R9** et **CF-H4** (10 µM) pendant 6 h. La carboxyfluorescéine est représentée en vert et le colorant Hoechst en bleu. Barres d'échelle : 20 µm.

3.5.1. Suivi des nanoparticules cœur-coquilles fluorescentes par microscopie confocale sur cellules vivantes

Une première observation des cellules au microscope confocal visualisant la rhodamine présente dans la couche de silice des nanoparticules cœur-coquilles a été réalisée après 6 heures d'incubation (figure 3.22). Un niveau appréciable de fluorescence ponctuée est observable pour toutes les NP cœur-coquilles, avec et sans peptides. En revanche, du fait

de l'impossibilité d'éteindre la fluorescence au niveau de la membrane plasmique, une visualisation avec la carboxyfluorescéine en présence de bleu de trypan a été favorisée pour les nanoparticules contenant les peptides.

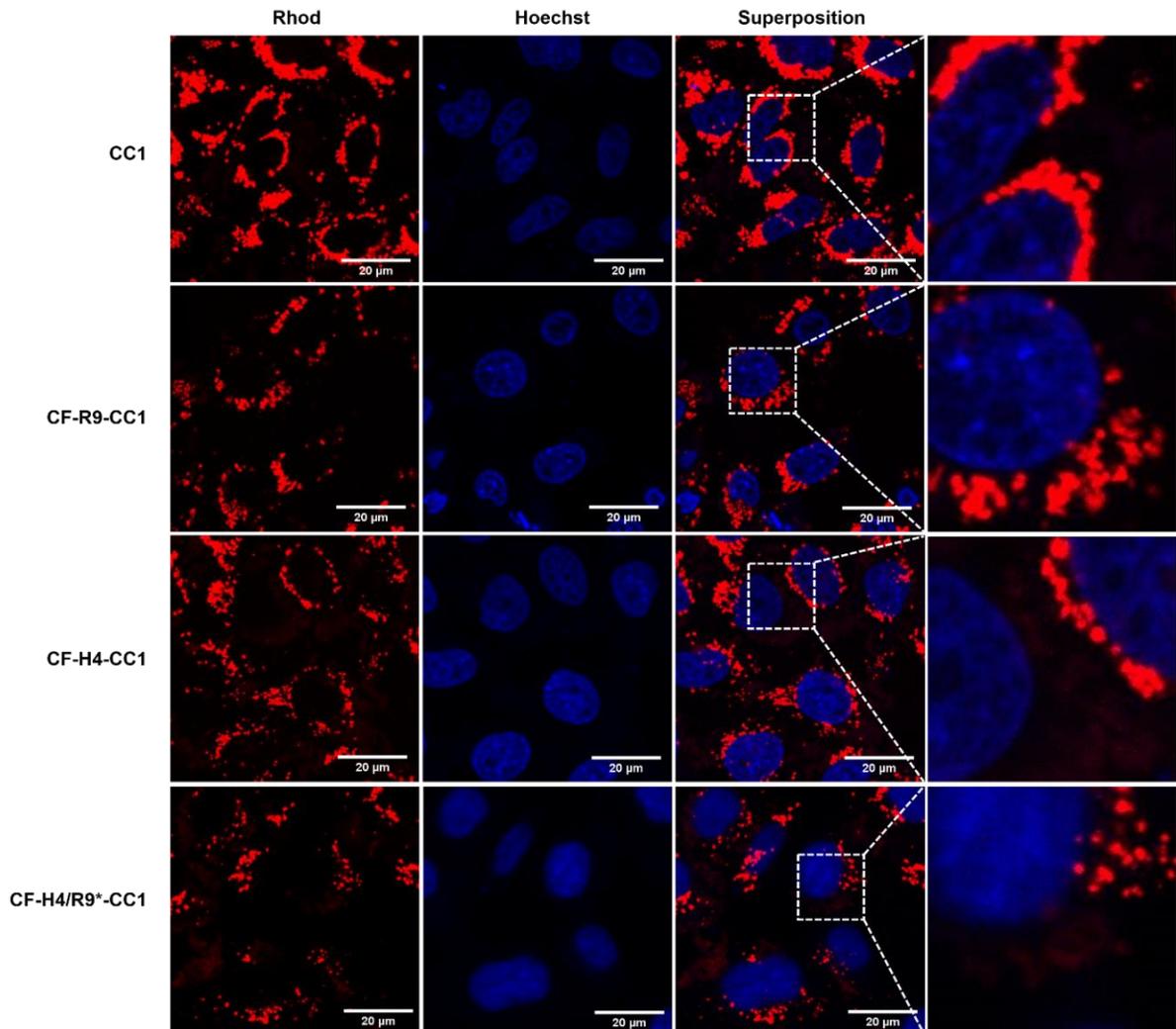


Figure 3.22. Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules vivantes après incubation des cellules CHO-K1 avec **CC1**, **CF-R9-CC1**, **CF-H4-CC1** ou **CF-H4/R9*-CC1** (0,56 mM en fer) pendant 6 h. La rhodamine est représentée en rouge et le colorant Hoechst en bleu. Barres d'échelle : 20 µm.

La figure 3.23 correspond aux images de microscopie confocale obtenues après traitement des cellules au bleu de trypan. La fluorescence ponctuelle, significative du piégeage de nanoparticules dans des vésicules est toujours observée. Cependant, de façon intéressante, une fluorescence intracellulaire diffuse est également observée pour les NP cœur-coquilles fonctionnalisées par le peptide polyhistidine (**CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1**), suggérant la présence de conjugués peptide-nanoparticule dans le cytosol.

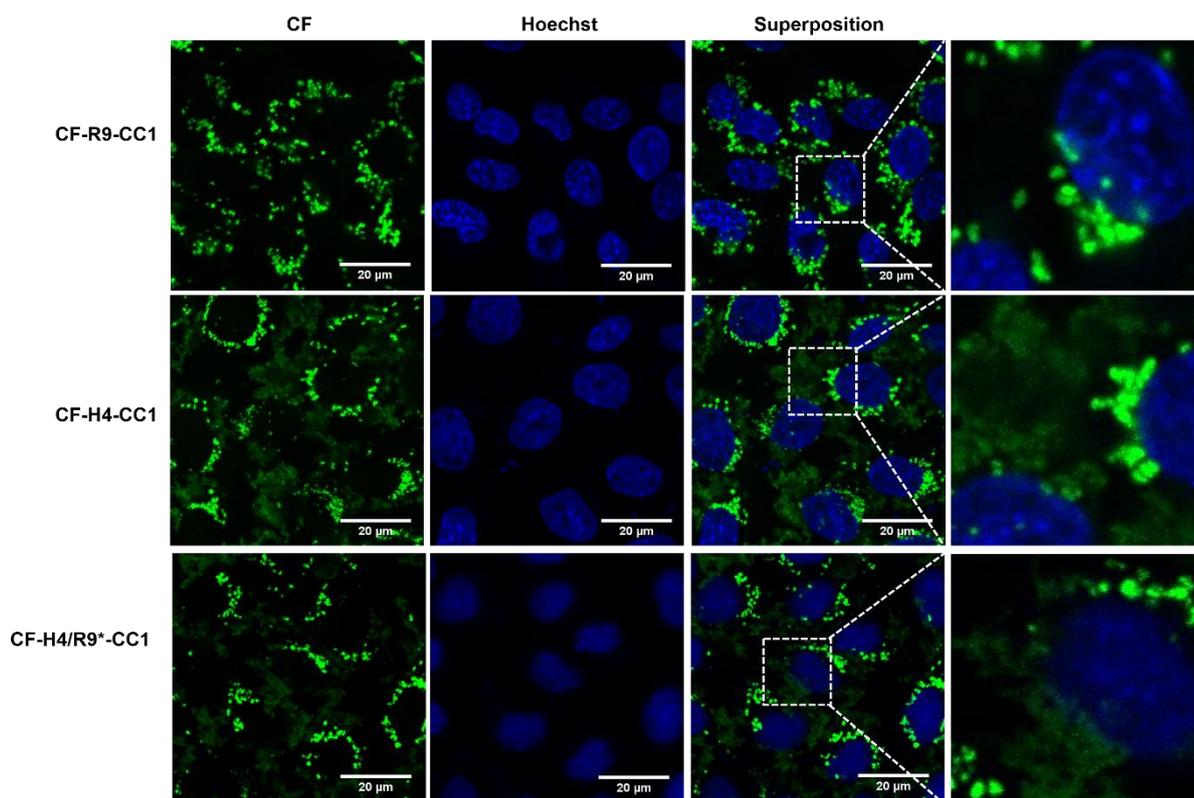


Figure 3.23. Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules vivantes traitées au bleu de trypan après incubation des cellules CHO-K1 avec **CF-R9-CC1**, **CF-H4-CC1** ou **CF-H4/R9*-CC1** (0,56 mM en fer) pendant 6 h. La carboxyfluorescéine est représentée en vert et le colorant Hoechst en bleu. Barres d'échelle : 20 μm .

Cette fluorescence diffuse n'étant pas observée après 2 heures d'incubation avec les NP **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1** (voir partie 3.2.4.), il est probable que ces espèces ayant rejoint le cytosol se soient échappées des endosomes. Comme indiqué dans l'introduction de ce manuscrit, la maturation des endosomes est un processus cellulaire qui s'accompagne d'une acidification du milieu intra-vésiculaire. Les histidines, piégées dans les endosomes, se protonent lorsque le pH devient inférieur à 6. Il a été proposé dans la littérature que la protonation de composés riches en His tamponne le lumen des endosomes induisant un influx de protons, d'ions chlorures et également d'eau dans ces vésicules, pouvant provoquer la rupture des membranes endosomales.¹⁷² Le contenu de ces compartiments est alors déversé dans le cytosol. En revanche, aucun changement dans la localisation cellulaire n'a été observé pour le conjugué lié à R9 entre 2 et 6 heures d'incubation. Suite à ces observations, une étude plus approfondie du mécanisme d'internalisation a été réalisée.

3.5.2. Visualisation de la distribution des nanoparticules cœur-coquilles dans les lysosomes par microscopie confocale sur cellules vivantes

Nous avons examiné si les nanoparticules cœur-coquilles avec ou sans peptides sont présentes dans les lysosomes, en utilisant un lysotracker pour visualiser ces organites ayant un lumen à pH acide.

Le lysotracker choisi émet dans le proche infra-rouge et est visualisé en rouge figure 3.24. Pour éviter toute interférence avec ce marqueur, nous avons supprimé la rhodamine habituellement présente dans la couche de silice de nos NP cœur-coquilles. Nous avons ainsi synthétisé une nouvelle série de nanoparticules cœur-coquilles (nommées **CC2**) qui ne possèdent pas de fluorophore dans leur couche de silice et sont fonctionnalisées par les peptides à leur surface. Les peptides possèdent toujours la carboxyfluorescéine qui sera suivie, et pourra être combinée avec l'utilisation de bleu de trypan. Les NP cœur-coquilles nommées **CC3** contenant de la fluorescéine dans leur couche de silice et sans peptides en surface ont également été préparées pour cette expérience. La carboxyfluorescéine étant alors piégée dans la couche de silice, sa fluorescence ne pourra pas être éteinte en présence de bleu de trypan. Il est d'ailleurs possible d'observer un peu de fluorescence diffuse sur les images de microscopie confocale des cellules incubées avec les NP **CC3**, sûrement due à la fluorescence des nanoparticules **CC3** au niveau des membranes plasmiques des cellules. A l'inverse, aucune fluorescence diffuse n'est observable pour **CF-R9-CC2** sur les images de microscopie après traitement au bleu de trypan (figure 3.24). Comme précédemment, une fluorescence diffuse cytosolique est encore visible en présence des composés **CF-H4-CC2** et **CF-H4/R9*-CC2** après traitement au bleu de trypan, confirmant encore cette différence de comportement en présence des peptides H4, avec une possible fuite des nanoparticules grâce aux résidus histidine.

Le lysotracker présente une fluorescence ponctuée rouge intracellulaire pour toutes les conditions. Les images indiquent une superposition partielle entre le lysotracker et les nanoparticules cœur-coquilles, en présence ou non des peptides à leur surface.

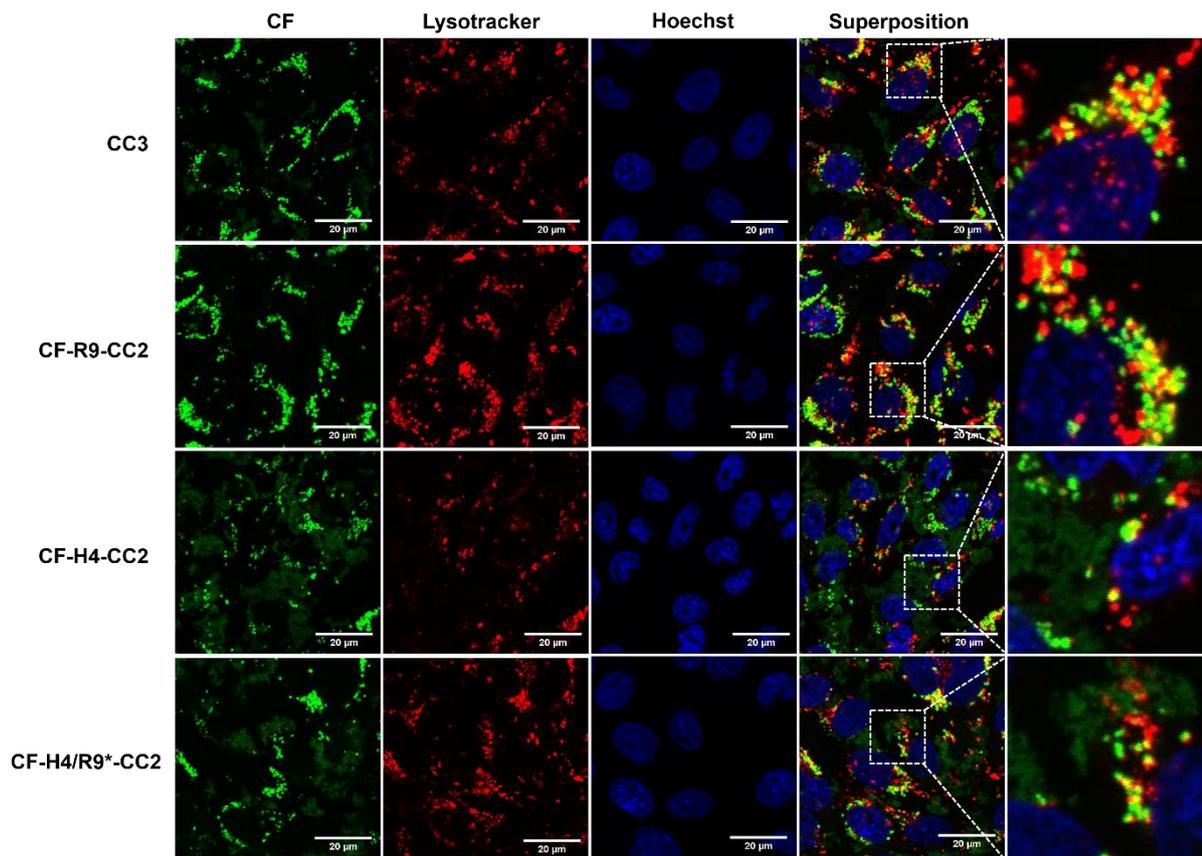


Figure 3.24. Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules vivantes traitées au bleu de trypan après incubation des cellules CHO-K1 avec **CC3** (contenant de la carboxyfluorescéine dans la couche de silice), **CF-R9-CC2**, **CF-H4-CC2** ou **CF-H4/R9*-CC2** (sans fluorophore dans la couche de silice) à 0,56 mM en fer pendant 6 h. La carboxyfluorescéine est représentée en vert, le lysotracker en rouge et le colorant Hoechst en bleu. Barres d'échelle : 20 µm.

Une corrélation de fluorescence entre la carboxyfluorescéine et le lysotracker a été réalisée par traitement des images sur imageJ. Deux images contenant une dizaine de cellules/image ont été analysées, permettant d'obtenir le coefficient de corrélation de Pearson (PCC). Les valeurs obtenues sont comprises entre 0,2 et 0,4 pour toutes les conditions, indiquant un niveau de corrélation faible entre les nanoparticules cœur-coquilles et les lysosomes (figure 3.25).

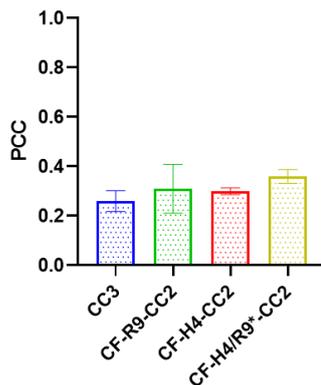


Figure 3.25. Valeurs de coefficient de corrélation de Pearson (PCC, Pearson's correlation coefficient) obtenues pour la fluorescence de la carboxyfluorescéine de **CC3**, **CF-R9-CC2**, **CF-H4-CC2** et **CF-H4/R9*-CC2** avec la fluorescence du lysotracker. Les données sont représentées en moyenne \pm écart-type ($n = 2$).

En conclusion, après 6 heures d'incubation, seule une minorité de nanoparticules cœur-coquilles sont présentes dans des lysosomes. On note de plus que les peptides greffés à la surface des NP cœur-coquilles n'ont pas d'influence sur la distribution des nanoparticules dans les lysosomes.

3.5.3. Visualisation de la distribution intracellulaire de la calcéine par microscopie confocale sur cellules vivantes

Les images de microscopie confocale après 6 heures d'incubation étant prometteuses, nous avons poursuivi nos recherches pour évaluer la capacité des résidus histidine à induire l'échappement endosomal en réalisant des expériences de fuite de calcéine. Ce colorant fluorescent vert, lorsqu'il est incubé seul avec des cellules, est internalisé par endocytose et se retrouve en grande partie piégé dans les endosomes. Ce composé a été utilisé précédemment dans la littérature pour évaluer la capacité de nanomatériaux à perturber des vésicules endosomales.¹⁷³ La libération de calcéine dans le cytosol permet en effet une mesure indirecte de la perturbation des endosomes causée par exemple par des nanoparticules de polymère sensible au pH.¹⁷⁴ Pour éviter la compétition lors de la visualisation de la fluorescence verte de la calcéine, des versions non fluorescentes des azidopeptides **R9***, **H4*** ont été conjuguées aux nanoparticules cœur-coquilles contenant de la rhodamine. Des cellules CHO-K1 ont alors été co-incubées avec les hybrides résultants **R9*-CC1**, **H4*-CC1** et de la calcéine pendant 6 heures. Les nanoparticules cœur-coquilles bi-fonctionnalisées (porteuses des deux peptides), n'ont pas été étudiées

dans cette expérience, leur comportement étant similaire à celui des NP fonctionnalisées par le peptide H4 seul.

Il est à noter que la calcéine est une molécule chargée négativement, alors que les nanoparticules cœur-coquilles sont chargées positivement. Lors de la co-incubation de la calcéine et des nanoparticules avec les cellules, la calcéine peut venir s'adsorber à la surface des NP cœur-coquilles par interactions électrostatiques. L'internalisation simultanée de la calcéine et des nanoparticules *via* endocytose a été confirmée par l'observation d'une colocalisation de la calcéine et de la rhodamine par microscopie confocale (figure 3.26a). De plus, grâce aux images de microscopie, une corrélation de fluorescence entre la calcéine et la rhodamine a été réalisée comme précédemment, en analysant trois images par condition (avec une dizaine de cellules/image) sur image]. Les valeurs de PCC obtenues sont comprises entre 0,8 et 0,9 pour toutes les conditions, indiquant un niveau de corrélation fort entre les nanoparticules cœur-coquilles et la calcéine (figure 3.26b). De plus, il est important de noter qu'une petite diminution de corrélation est observée pour **CF-H4-CC1**.

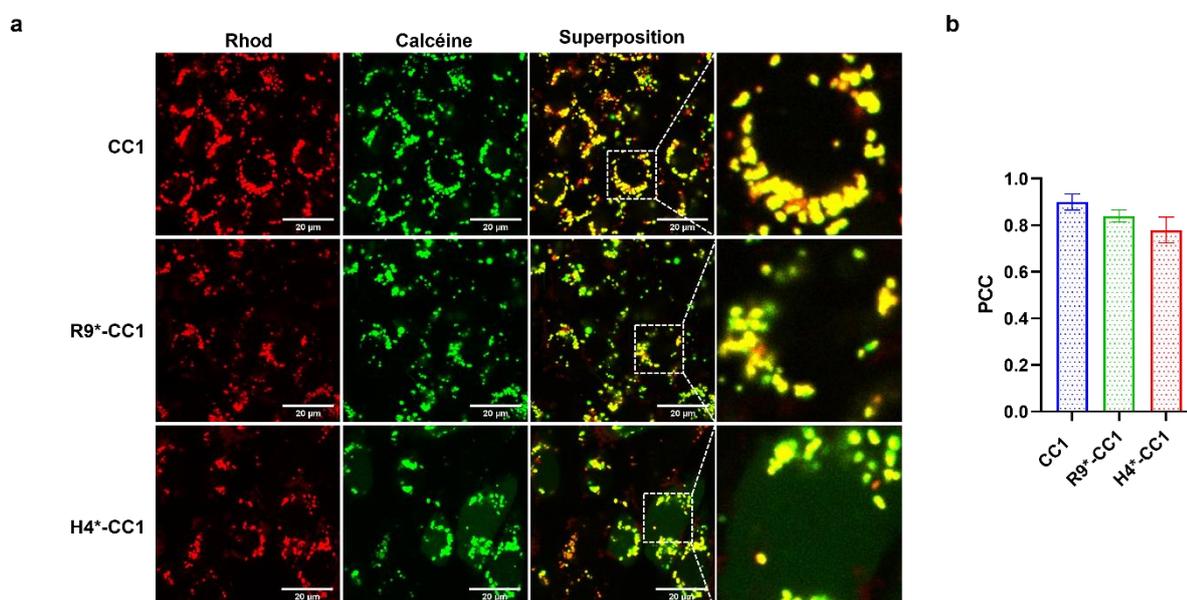


Figure 3.26. a) Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules vivantes après co-incubation de cellules CHO-K1 avec **CC1**, **R9*-CC1** ou **H4*-CC1** (0,56 mM en fer) et de la calcéine (160 µM) pendant 6 h. La rhodamine est représentée en rouge et la calcéine en vert. Barres d'échelle : 20 µm. b) Valeurs de coefficient de corrélation de Pearson (PCC, Pearson's correlation coefficient) pour les images de microscopie confocale obtenues après 6 h d'incubation des composés **CC1**, **R9*-CC1** et **H4*-CC1** dans les cellules CHO-K1. Les données sont représentées en moyenne ± écart-type (n = 2).

Du fait de sa fluorescence verte, la calcéine peut être éteinte par le bleu de trypan lorsqu'elle est présente sur la membrane plasmique des cellules et dans le milieu extracellulaire. L'analyse de la distribution de la calcéine par microscopie confocale sur cellules vivantes a été réalisée après traitement au bleu de trypan. Les images obtenues, figure 3.27, montrent que seules les cellules incubées avec **H4*-CC1** présentent une fluorescence diffuse significative de la calcéine dans le cytosol et le noyau.

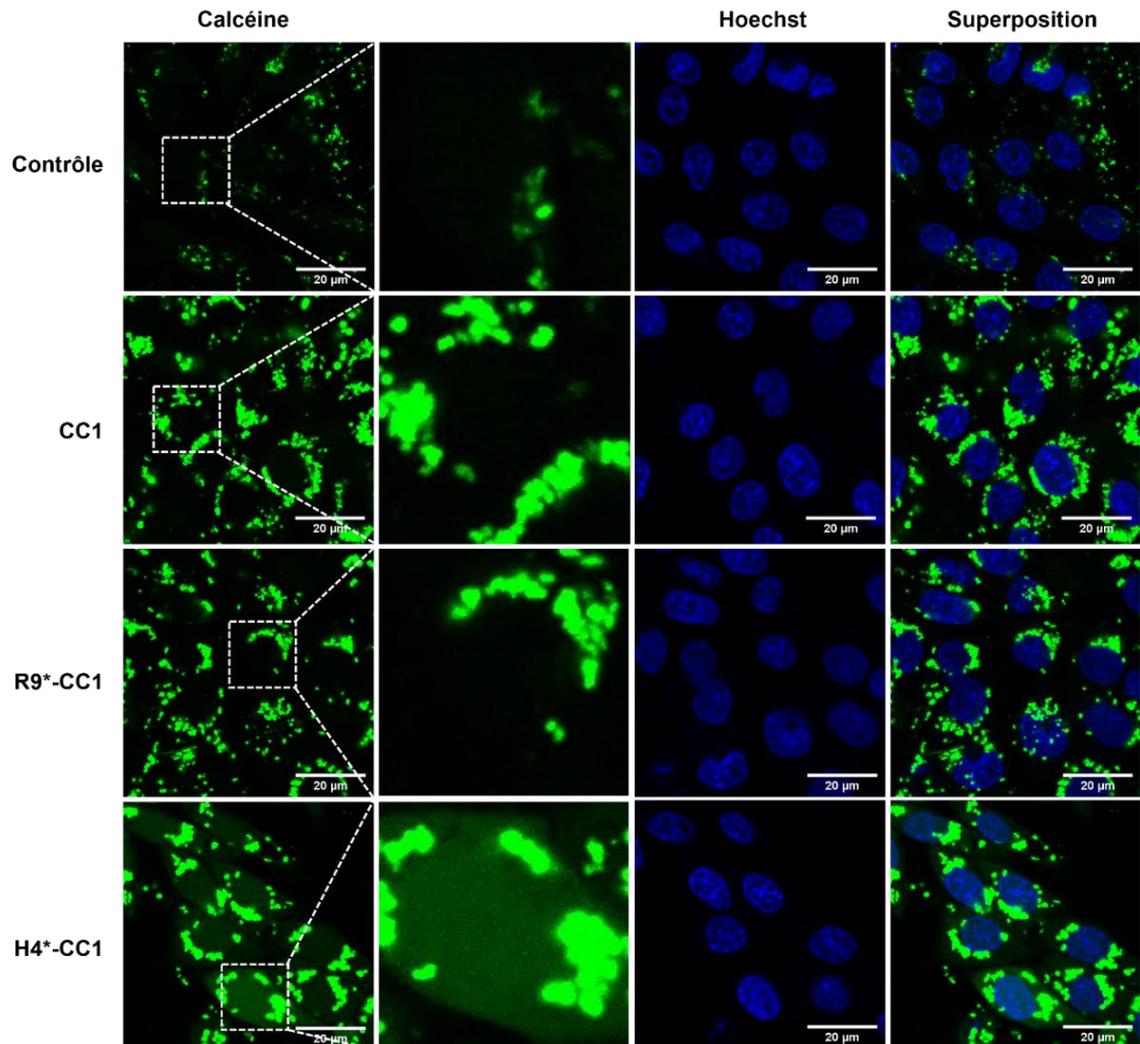


Figure 3.27. Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules vivantes CHO-K1 traitées au bleu trypan après co-incubation de **CC1**, **R9*-CC1** ou **H4*-CC1** (0,56 mM en fer) avec de la calcéine (160 µM) pendant 6 h. Une expérience témoin a été réalisée avec une incubation de calcéine (160 µM) seule. La calcéine est représentée en vert et le colorant Hoechst en bleu. Barres d'échelle : 20 µm.

En revanche, on observe uniquement une fluorescence cytoplasmique ponctuée de la calcéine pour les cellules traitées avec les cœur-coquilles **R9*-CC1** ou **CC1** (figure 3.27).

De plus, des expériences contrôle ont été réalisées en incubant des cellules en présence de calcéine seule. Les images résultantes confirment une internalisation de la calcéine par endocytose.

Une quantification de l'intensité moyenne de fluorescence observée dans le noyau lors de l'incubation avec les différents conjugués de nanoparticules a été réalisée sur trente cellules, afin d'évaluer l'échappement de la calcéine des endosomes. Les résultats montrent une nette augmentation de l'intensité de fluorescence pour les cellules traitées avec des nanoparticules liées au peptide H4 (figure 3.28). Ces données sont en accord avec une internalisation simultanée de la calcéine et des nanoparticules *via* endocytose, suivie d'une rupture des vésicules qui serait facilitée par le motif tétra-histidine entraînant la libération de calcéine des endosomes et sa redistribution dans le cytosol et le noyau (figure 3.29).

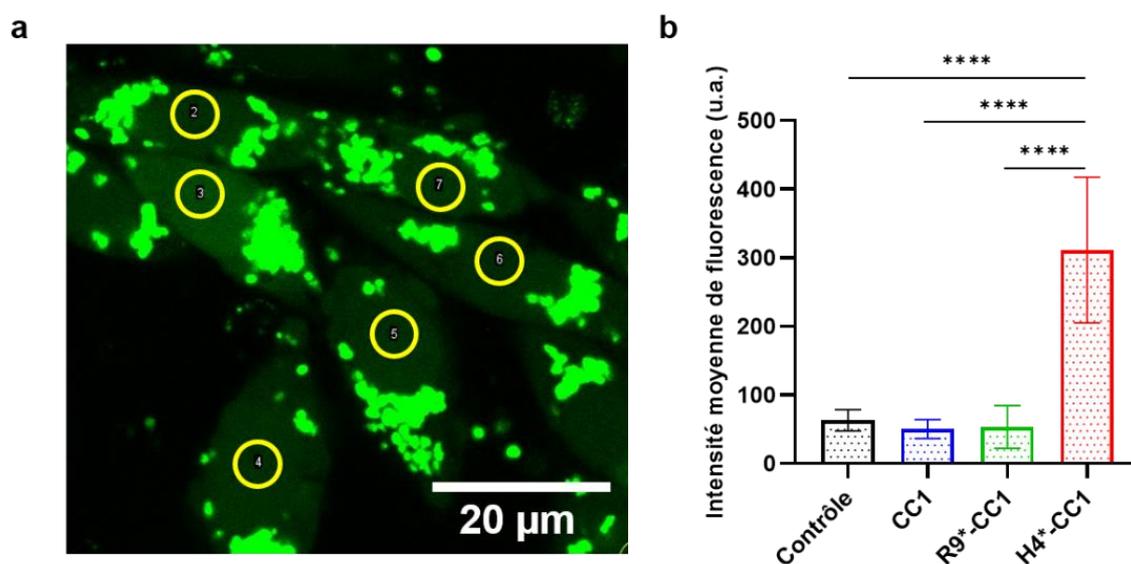


Figure 3.28. a) Analyse d'une image de microscopie confocale à fluorescence de cellules vivantes CHO-K1 traitées au bleu trypan après co-incubation de **H4*-CC1** (0,56 mM en fer) avec de la calcéine (160 μ M) pendant 6 h. La calcéine est représentée en vert. Les cercles jaunes représentent l'aire prise en compte pour mesurer l'intensité moyenne de fluorescence. Barres d'échelle : 20 μ m. b) Analyse de l'intensité de fluorescence des images de microscopie confocale après 6 h d'incubation des NP **CC1**, **R9*-CC1** et **H4*-CC1** avec la calcéine ou incubation de la calcéine seule (contrôle) et après traitement au bleu de trypan. Intensité de fluorescence moyenne correspondante de la calcéine trouvée dans le noyau. Les données sont représentées en moyenne \pm SD (n = 30). **** : p < 0,0001.

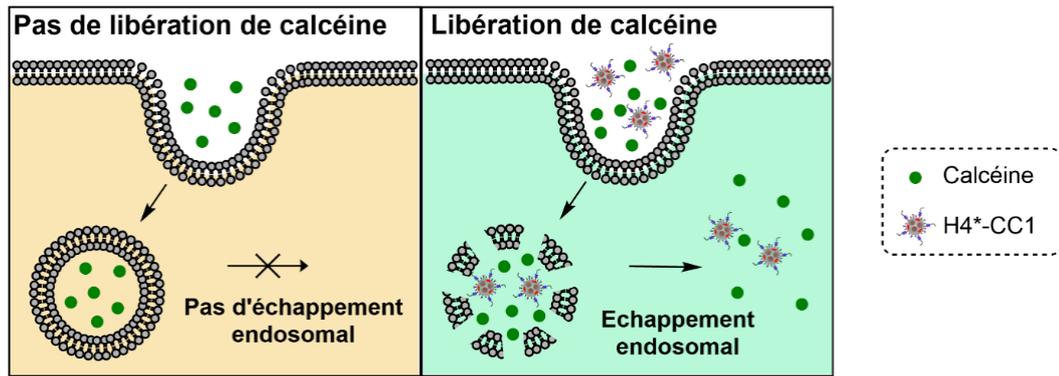


Figure 3.29. Représentation de l'échappement endosomal de la calcéine grâce au peptide polyhistidine greffé sur les nanoparticules cœur-coquilles.

Ces résultats sont comparables à ceux de Chen *et al.* et Galliani *et al.*, qui ont utilisé le même type d'expérience de fuite de calcéine pour suivre l'échappement endosomal de leurs particules fonctionnalisées.^{175,176}

3.5.4. Visualisation de la distribution intracellulaire des nanoparticules cœur-coquilles par microscopie électronique à transmission

Enfin, une étude de l'internalisation des NP a été réalisée par microscopie électronique à transmission (TEM) sur des coupes minces fixées de cellules incubées avec les différentes nanoparticules (CC1, CF-R9-CC1 et CF-H4-CC1) pendant 6 heures. La préparation des échantillons a été réalisée avec l'aide de Michaël Trichet (Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), service de microscopie électronique).

La visualisation des membranes intracellulaires est primordiale pour cette analyse. Elle permet de différencier les vésicules endosomales contenant des nanoparticules qui possèdent une membrane intègre, des vésicules qui présentent une membrane discontinue et dont les nanoparticules s'échappent. Une coloration des cellules au cyanure de potassium a donc été effectuée après la fixation des cellules et avant l'inclusion des cellules dans la résine pour augmenter le contraste des membranes lors de l'observation au microscope électronique à transmission (figure 3.30). Il est possible de visualiser les deux cas de figure : une membrane continue avec les nanoparticules piégées à l'intérieur des endosomes, ou une rupture ou interruption de la membrane et un échappement des nanoparticules (flèches blanches sur la figure 3.30) dans le cytosol. Il est également

intéressant de noter que les nanoparticules cœur-coquilles sont parfaitement identifiables dans la cellule avec leur cœur d'oxydes de fer en noir et la couche de silice en gris foncé. Les images de TEM ont été réalisées par Michaël Trichet (IBPS).

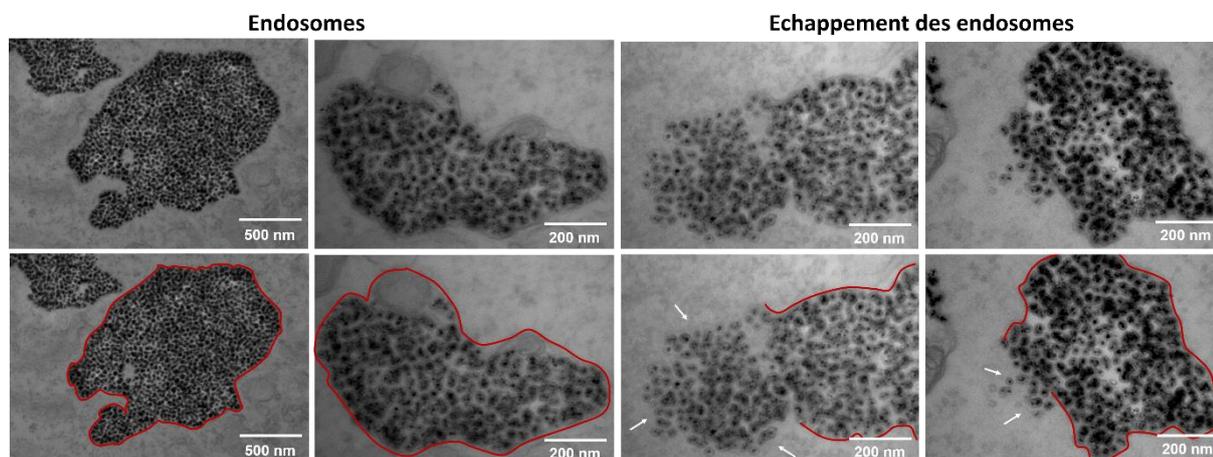


Figure 3.30. Images de TEM de cellules CHO-K1 incubées avec des nanoparticules cœur-coquilles fonctionnalisées ou non avec les peptides (0,56 mM en fer) pendant 6 h. La ligne rouge correspond à la membrane autour des vésicules, qui est continue pour les endosomes ayant une membrane intègre ou qui s'interrompt lors d'échappement de NP des endosomes. Les flèches blanches correspondent à une rupture de la membrane. Barres d'échelle des 2 images à gauche : 500 nm ; barres d'échelle des autres images : 200 nm.

Les images de TEM (figure 3.31) montrent que les nanoparticules (**CC1**, **CF-R9-CC1** ou **CF-H4-CC1**) internalisées, sont essentiellement localisées dans des vésicules, en accord avec nos expériences de microscopie confocale. Les études de TEM après incubation de cellules avec différentes nanoparticules décrites par Di Corato *et al.*, ont également montré les nanoparticules à l'intérieur d'endosomes.⁹⁵ Cependant, lors de nos analyses d'images, nous avons pu observer des événements de rupture de membrane endosomale (figure 3.31), ceux-ci semblent plus fréquents pour les cellules traitées avec les nanoparticules fonctionnalisées avec le peptide polyhistidine **CF-H4-CC1** par rapport aux nanoparticules **CF-R9-CC1** et **CC1**. La rupture de la membrane endosomale engendre une « fuite » des NP.

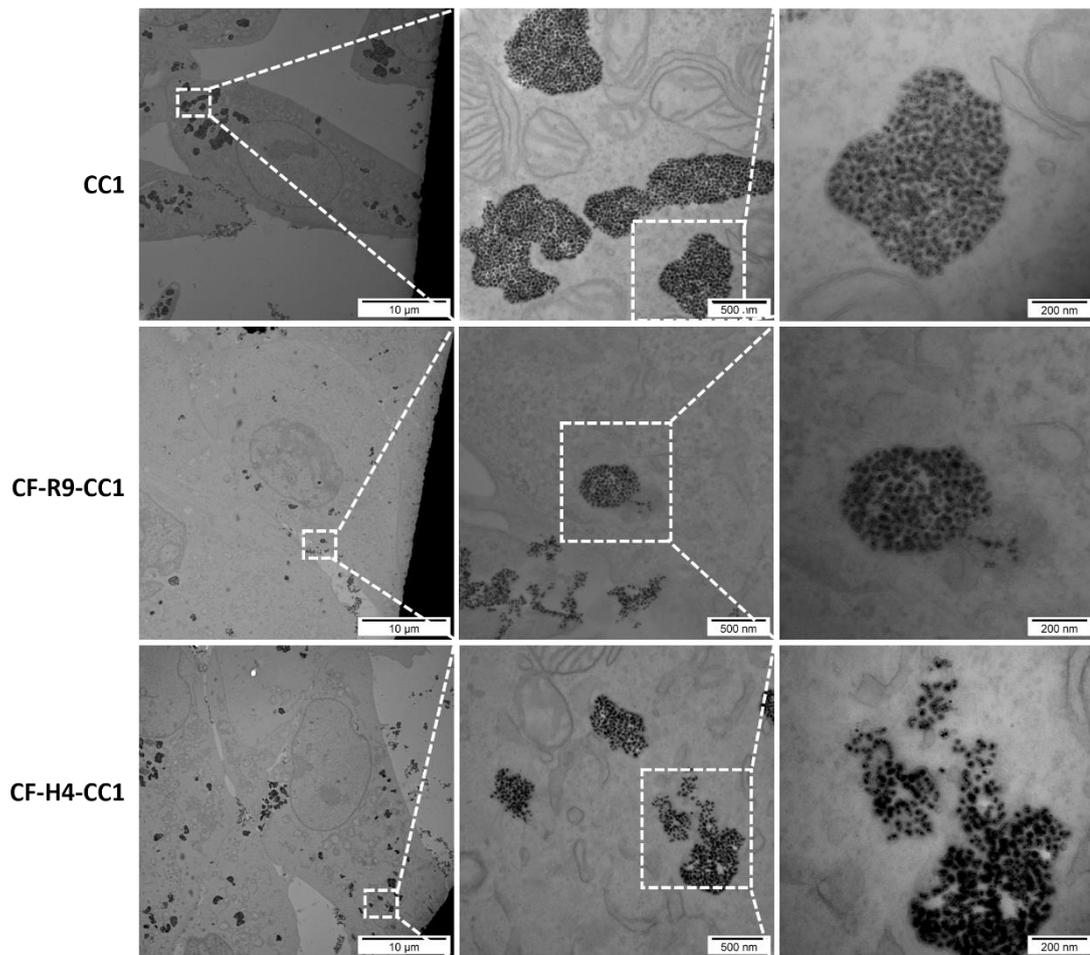


Figure 3.31. Images de TEM de cellules CHO-K1 incubées avec **CC1**, **CF-R9-CC1** ou **CF-H4-CC1** (0,56 mM en fer) pendant 6 h. Barres d'échelle colonne de gauche : 10 μm ; barres d'échelle colonne du milieu : 500 nm ; barres d'échelle colonne de droite : 200 nm. Sur ces images, les NP **CC1** sont visualisées dans un endosome, les NP **CF-R9-CC1** dans un endosome qui a fusionné avec un endosome tardif et les NP **CF-H4-CC1** s'échappent d'un endosome.

Les images de TEM obtenues sont donc très intéressantes mais peu de cellules ont pu être observées (environ cinq cellules pour chaque condition) et donc un nombre restreint d'évènements cellulaires ont pu être analysés. Pour renforcer ces observations préliminaires, Michaël Trichet (IBPS) a automatisé les acquisitions d'images avec un microscope électronique en transmission à balayage (STEM) et nous avons choisi de comparer les NP cœur-coquilles sans peptide, et celles fonctionnalisées par le peptide H4.

Analyse par microscope électronique en transmission à balayage

La quantification des évènements intracellulaires associés à la présence de NP a été réalisée pour les cellules incubées avec **CC1** et **CF-H4-CC1** en imageant deux carreaux de

grille de TEM. Les images obtenues correspondent cette fois-ci à environ quarante cellules et à plus de huit cents évènements pour chaque condition. Il est également à noter que dans toutes les observations en STEM, aucune indication d'une redistribution artéfactuelle des NP due à la préparation des échantillons n'a été observée (absence de trous faits par un déplacement des NP lors de l'ultramicrotomie par exemple). Le contraste des membranes a été ajusté lors du comptage des évènements pour éviter toute mauvaise interprétation due à un manque de contraste. Les évènements ont été classés en cinq groupes : les NP dans des endosomes précoces ; les NP dans des corps multivésiculaires (MVB) ou dans des endosomes tardifs ; les NP dans des autophagosomes ; les NP s'échappant des endosomes avec une rupture de la membrane et les NP libres dans le cytosol (figure 3.32). Certains évènements, ne pouvant pas être classés sans ambiguïté dans un groupe d'appartenance, n'ont pas été comptabilisés.

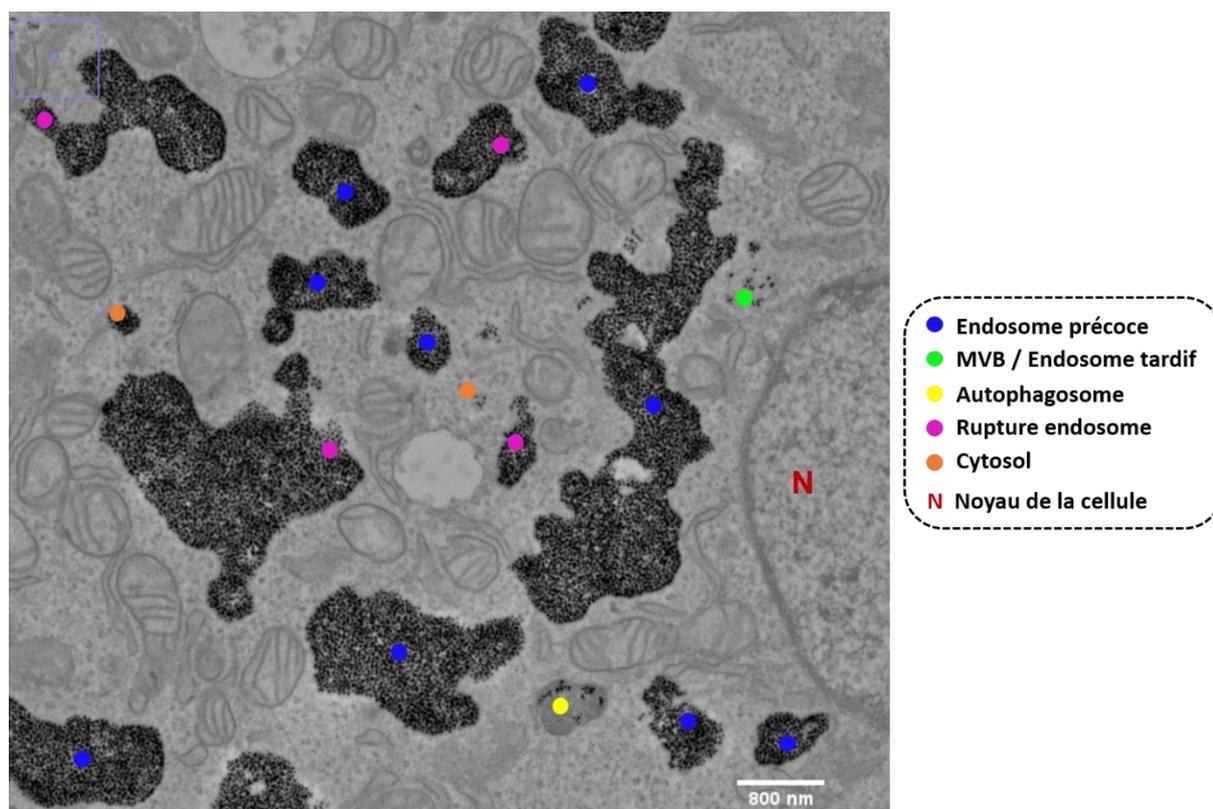


Figure 3.32. Exemple d'image de STEM d'une cellule CHO-K1 après incubation avec les nanoparticules cœur-coquilles CC1 (0,56 mM en fer) pendant 6 h à 37 °C, lors du comptage manuel des différents évènements.

Les cinq groupes utilisés pour le comptage des évènements cellulaires sont illustrés figure 3.33. A la différence des endosomes précoces, les endosomes tardifs ou MVB

contiennent de petites vésicules intraluminales (ILV), bien reconnaissables. Les endosomes précoces et endosomes tardifs ou MVB contiennent une simple membrane, à l'inverse des autophagosomes qui présentent une double membrane. L'autophagosome peut fusionner avec différentes parties du compartiment endo-lysosomal et permet également la dégradation de son contenu. Les endosomes précoces, endosomes tardifs, MVB et autophagosomes présentent une membrane intègre et on peut visualiser des nanoparticules piégées dans ces vésicules. Il est aussi possible d'observer des endosomes présentant une rupture ou discontinuité de leur membrane ou des vésicules avec des nanoparticules qui s'échappent (flèches blanches sur la figure 3.33) et dans quelques cas de visualiser des nanoparticules dans le cytosol sans aucune membrane les entourant (flèche rouge sur la figure 3.33).

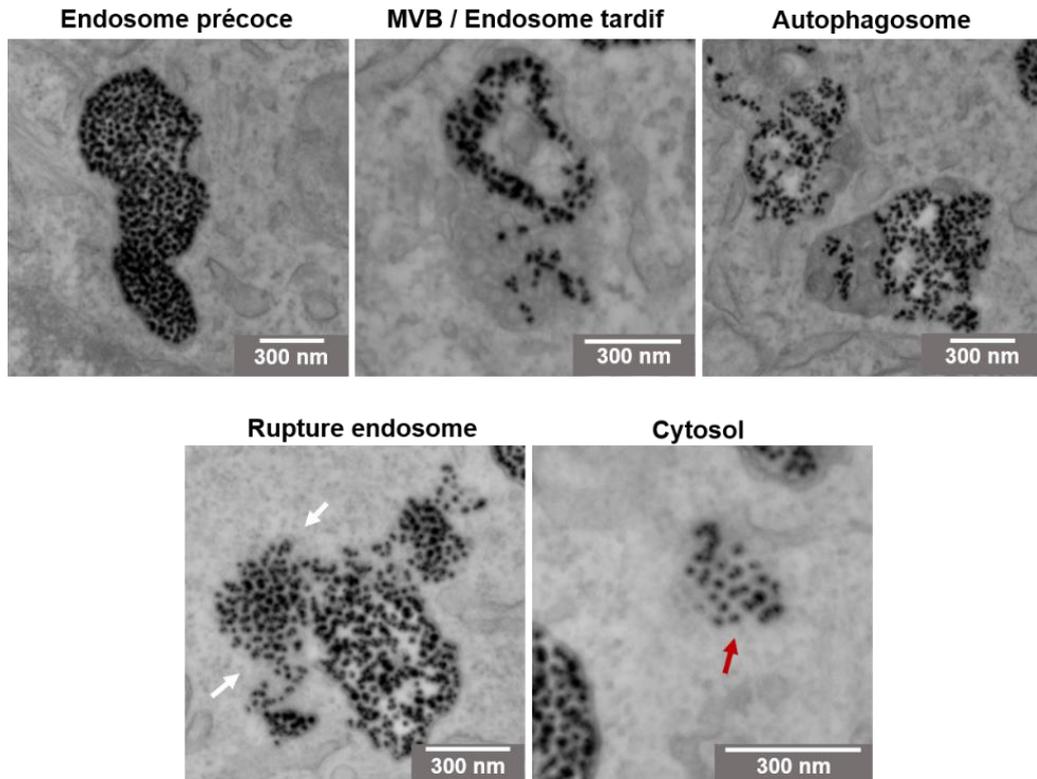


Figure 3.33. Images obtenues en STEM de cellules CHO-K1 après incubation avec les nanoparticules cœur-coquilles **CC1** ou **CF-H4-CC1** (0,56 mM en fer) pendant 6 h à 37 °C. Les images représentent un exemple de chaque groupe de localisation des NP cœur-coquilles retenu pour le comptage manuel des différents évènements. Barres d'échelle : 300 nm.

Les résultats du comptage manuel des différents évènements ont été résumés table 3.2 et figure 3.34. Il apparaît qu'après 6 heures d'incubation, les nanoparticules **CC1** et **CF-H4-**

CC1 sont majoritairement présentes dans les endosomes précoces (EE) à 55 % et 44 % respectivement. Le deuxième groupe d'évènement le plus représenté est la rupture de la membrane des endosomes avec la fuite des NP dans le cytosol (20 % des évènements pour **CC1** et 33 % pour **CF-H4-CC1**). Peu de nanoparticules sont localisées dans les endosomes tardifs (LE) ou MVB (6 % des évènements pour **CC1** et 2 % pour **CF-H4-CC1**) en accord avec nos expériences de colocalisation des NP avec le lysotracker par microscopie confocale (figure 3.24). En revanche, une part importante des nanoparticules cœur-coquilles se trouvent dans des autophagosomes (14 % pour **CC1** et 18 % pour **CF-H4-CC1**). Il a été mentionné dans le chapitre 1, partie 1.6.1, que certaines nanoparticules sont connues pour activer ou provoquer l'autophagie dans certaines cellules.^{177,178} Nos nanoparticules d'oxyde de fer enrobées de silice semblent également induire l'autophagie. Une quantité d'autophagosomes plus importante a été retrouvée pour **CF-H4-CC1** comparé à **CC1**, cette observation pourrait suggérer une augmentation des autophagosomes due à l'échappement endosomal des NP. Enfin, une faible proportion des NP est retrouvée dans le cytosol sans aucune membrane les entourant (5 % pour **CC1** et 3 % pour **CF-H4-CC1**) (table 3.2, figure 3.34).

	CC1		CF-H4-CC1	
	Nombre d'évènements	Pourcentage d'évènements	Nombre d'évènements	Pourcentage d'évènements
Endosome précoce	454	55	368	44
MVB / Endosome tardif	45	6	14	2
Autophagosome	117	14	147	18
Rupture endosome	160	20	278	33
Cytosol	44	5	27	3
Total	820	100	834	100

Table 3.2. Résumé du comptage manuel des évènements cellulaires correspondant à la localisation des nanoparticules cœur-coquilles sur les images de STEM pour **CC1** et **CF-H4-CC1** après 6 h d'incubation avec les cellules CHO-K1 (0,56 mM en fer) à 37 °C. MVB = corps multivésiculaires.

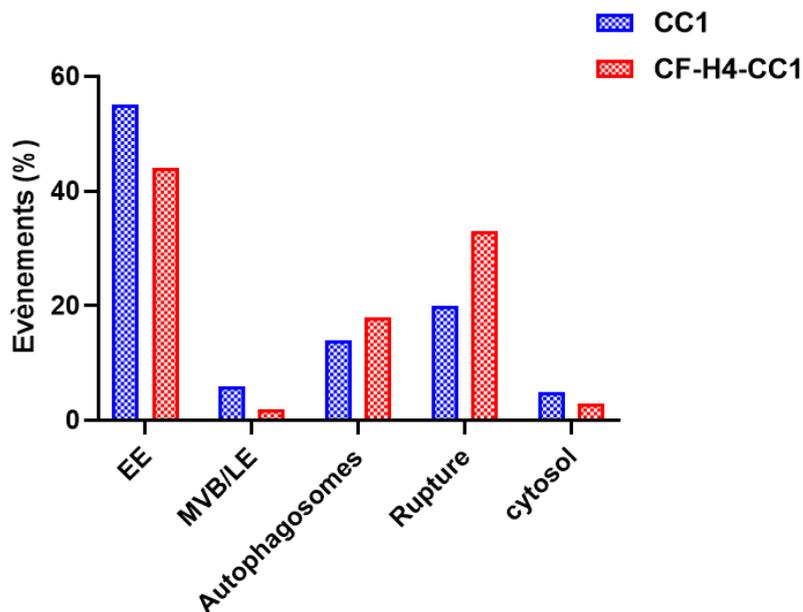


Figure 3.34. Résumé du comptage manuel en pourcentage d'évènements cellulaires correspondant à la localisation des nanoparticules cœur-coquilles sur les images de STEM pour **CC1** et **CF-H4-CC1** après 6 h d'incubation avec les cellules CHO-K1 (0,56 mM en fer). EE = endosome précoce, MVB = corps multivésiculaires, LE = endosome tardif.

Un test d'indépendance de χ^2 a été réalisé pour déterminer si la distribution cellulaire des nanoparticules était significativement différente dans les deux conditions (**CC1** vs **CF-H4-CC1**). L'hypothèse H_0 consiste à considérer que les variables aléatoires sont indépendantes, et correspond à l'hypothèse : « la distribution des nanoparticules dans les cellules n'est pas liée à la présence du peptide polyhistidine ». A l'inverse, l'hypothèse H_1 considère que les variables aléatoires sont liées : « la distribution des nanoparticules dans les cellules dépend de la présence du peptide polyhistidine ». Les résultats de ce test ont montré une différence significative entre les distributions de **CC1** et **CF-H4-CC1**. En effet, la valeur de χ^2 trouvée est égale à 64,44 et est bien supérieure à 18,47 (valeur seuil pour une erreur $p < 0,001$). L'hypothèse H_0 est alors rejetée, la distribution des évènements est donc liée à la présence de polyhistidine à la surface des NP.

Ces analyses confirment une rupture de la membrane des endosomes plus importante en présence des résidus histidine, certainement provoquée par la protonation de celles-ci lors de l'acidification des endosomes au cours de leur maturation.

3.6. Conclusion sur les études d'internalisation des différents systèmes

Les nanoparticules cœur-coquilles seules et fonctionnalisées avec les peptides cationiques **CF-R9** et **CF-H4** n'induisent pas de cytotoxicité à 0,56 mM en fer après 6 et 24 heures d'incubation avec les cellules CHO-K1. Leur stabilité en solution dans le milieu de culture (DMEM F-12 sans sérum) est limitée surtout en présence du peptide polyarginine, où une agrégation des NP est observée après 40 minutes d'incubation à 37 °C.

L'internalisation des conjugués peptide-nanoparticule a été comparée à celle des NP cœur-coquilles seules par différentes méthodes complémentaires. Lors d'une incubation de cellules CHO-K1 en présence des différentes NP (**CC1**, **CF-R9-CC1**, **CF-H4-CC1** et **CF-H4/R9*-CC1**) à 0,28 mM en fer, la quantité de fer associée par cellule (à l'intérieur et sur les membranes) est similaire dans tous les cas. Néanmoins, lorsque les cellules sont incubées avec les NP à concentration plus élevée (0,56 mM en fer), la quantité de fer associée aux cellules est plus importante lorsque le peptide H4 et surtout le peptide R9 est greffé à la surface des NP et elle augmente avec le temps d'incubation. La forte interaction des peptides avec la membrane plasmique a été mise en évidence en comparant les images de microscopie confocale des cellules vivantes incubées avec les NP fonctionnalisées par les peptides grâce au traitement effectué avec le bleu de trypan.

La distribution intracellulaire des NP seules ou en présence des peptides polyarginine et polyhistidine est similaire après 2 heures d'incubation, l'internalisation s'effectuant par endocytose. Le CPP R9 non conjugué pénètre dans la cellule par translocation et par endocytose mais une fois greffé sur les NP ne permet pas la translocation des conjugués. Le peptide H4 seul est quant à lui très faiblement internalisé dans les cellules, probablement du fait de sa charge globale nulle à pH 7,4. Il est néanmoins visualisé dans quelques endosomes, même après un temps d'incubation long (6 heures). Dans ces conditions, il ne semble donc pas promouvoir la fuite endosomale. Au contraire, les NP fonctionnalisées avec le peptide H4 sont internalisées très efficacement dans les cellules, probablement du fait des fonctions amine présentes à la surface des NP. De manière très intéressante, l'augmentation du temps d'incubation avec les cellules, de 2 à 6 heures, des

NP fonctionnalisées par H4 a permis la détection d'une fluorescence verte plus diffuse à l'intérieur des cellules faisant penser à une distribution cytosolique et donc à un échappement des NP des endosomes. Cette observation a pu être confirmée par des tests de fuite endosomale de la calcéine co-incubée avec les NP. Seules les cellules incubées avec les NP contenant des histidines à leur surface montrent une fluorescence diffuse de la calcéine, dans la cellule et en particulier dans les noyaux.

La rupture des membranes des endosomes a été mise en évidence par microscopie électronique à transmission. Le nombre d'évènements correspondant à une fuite endosomale est plus élevé lorsque le peptide H4 est utilisé pour fonctionnaliser les NP, confirmant la capacité de ce peptide lorsqu'il est greffé sur les nanoparticules à induire une perturbation de la membrane des endosomes.

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse a porté sur le développement d'un nouveau système composé de peptides cationiques couplés à des nanoparticules magnétiques (NPM) permettant d'atteindre le cytosol des cellules. L'objectif à plus long terme est de pouvoir manipuler individuellement les NPM au niveau intracellulaire et ainsi pouvoir les stimuler thermiquement et contrôler leur diffusion par un gradient de champ magnétique. Pour cela, nous avons synthétisé des nanoparticules de type cœur-coquilles comportant un cœur d'oxyde de fer enrobé d'une couche de silice fluorescente. La silice a été bi-fonctionnalisée par des fonctions amine et des chaînes PEG. Les nanoparticules synthétisées sont chargées positivement à pH physiologique et mesurent une quarantaine de nanomètres. Nous avons montré que ces nanoparticules cœur-coquilles conservent leur caractère superparamagnétique en présence de la couche de silice. Les NP ont ensuite été fonctionnalisées par un lien réagissant sur les fonctions amine, permettant l'introduction d'un alcyne contraint, le DBCO, à la surface des nanoparticules pour leur fonctionnalisation par chimie click sans cuivre.

Par ailleurs, deux types de peptides cationiques ont été synthétisés, les peptides R9 et H4 afin de tester deux approches différentes pour promouvoir l'accès des NP dans le cytosol. Le CPP R9 est connu pour être internalisé dans les cellules par translocation de la membrane plasmique, lui permettant de rejoindre le cytosol, alors que les séquences polyhistidines peuvent favoriser un échappement des endosomes par effet « éponge à protons ». Les peptides synthétisés en stratégie Fmoc possèdent un azoture permettant leur greffage covalent à la surface des nanoparticules par réaction avec le DBCO. De plus, les peptides sont fluorescents, ceci a permis le contrôle de la bonne fonctionnalisation des nanoparticules par microscopie à fluorescence après internalisation dans les cellules. Nos expériences ont ainsi permis de sélectionner un protocole de fonctionnalisation et purification des NP efficace. La versatilité du système a également permis une bi-fonctionnalisation contrôlée de la surface des NP par deux entités (CPP/sonde).

L'internalisation des NPM fonctionnalisées par les peptides a ensuite été étudiée *in vitro* sur des cellules CHO sauvages par différentes techniques complémentaires (cytométrie en flux, magnétophorèse et spectrométrie d'absorption atomique). Une étude de leur distribution intracellulaire a été réalisée par microscopie confocale et microscopie électronique à transmission. Il apparaît que les NP fonctionnalisées ou non par les

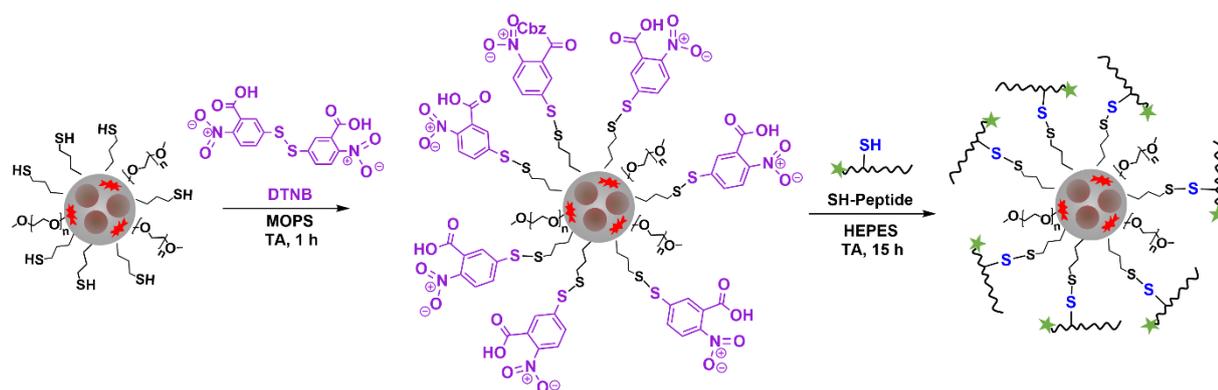
peptides sont internalisées par endocytose. D'après les études effectuées à 4 °C, en cytométrie en flux et en microscopie confocale, le peptide R9 ne permet pas la translocation des NP. Cependant, nous avons pu montrer que le peptide comportant uniquement quatre résidus histidine favorise l'échappement des NP des endosomes. Ceci a été mis en évidence à la fois par des expériences de co-incubation de la calcéine avec les NP, et les observations par microscopie électronique. Il est vraisemblable que la fuite endosomale des NP soit liée à la protonation des histidines au pH acide des endosomes, induisant une perturbation de la membrane de ces organites. Les images de STEM ont en effet fait apparaître des endosomes possédant une membrane endommagée, ce phénomène étant plus fréquemment observé dans les cellules incubées avec les NP porteuses de peptides H4 par rapport aux cellules incubées avec les NP sans peptides. En revanche, lorsqu'il n'est pas conjugué aux nanoparticules, le peptide H4 n'est pas capable de sortir des endosomes. Ces résultats s'expliquent probablement par le fait que les NP pénètrent très efficacement par endocytose. Les concentrations endosomales en résidus histidine obtenues sont donc bien supérieures lorsque le peptide H4 est conjugué aux NP par rapport au peptide non conjugué. Ces expériences suggèrent donc que la déstabilisation des endosomes requiert une concentration endosomale élevée en résidus histidine. L'effet synergique entre les NP et le peptide oligo-His est donc très important, permettant d'obtenir une concentration endosomale suffisante en résidus histidine pour déclencher une fuite endosomale.

Nous avons donc réussi à développer un système nanométrique, permettant d'atteindre le cytosol grâce aux peptides. Néanmoins, une optimisation des conditions d'incubation ou de la fonctionnalisation du système est certainement possible pour obtenir une fuite endosomale plus efficace. La concentration en histidine dans les endosomes étant un critère qui semble important, on pourrait augmenter le temps d'incubation des NP avec les cellules. Nous avons vu qu'il n'était pas possible d'augmenter le taux de greffage du peptide polyhistidine, du fait de la déstabilisation des NP. Pour obtenir une concentration endosomale en résidus His plus élevée, on pourrait envisager de greffer des séquences poly-His plus longues tout en conservant le même taux de greffage. Une alternative serait de greffer des séquences comportant à la fois un domaine polyhistidine et un domaine polyarginine, permettant de rétablir une répulsion électrostatique entre NP, il serait alors peut-être possible d'augmenter le taux de greffage du peptide. Il sera également

primordial de tester les NP sur différents types cellulaires et sur des lignées cancéreuses pour comparer le potentiel d'échappement endosomal des NP grâce aux polyhistidines.

Par ailleurs, il serait intéressant de greffer à la surface des NP, en plus des polyhistidines, une autre molécule (molécule thérapeutique, protéine d'intérêt etc.) ayant une cible cytosolique ou nucléaire et permettant le suivi d'une activité biologique. Ceci pourrait notamment aider à optimiser les NP en permettant d'identifier plus directement les systèmes induisant un échappement endosomal efficace. Cette molécule pourra être liée de manière covalente soit par une liaison stable dans la cellule (en utilisant à nouveau la chimie click), soit par une liaison réversible, de façon à permettre sa libération dans le cytosol des cellules. Cette liaison réversible pourrait être possible par formation d'un pont disulfure. Le glutathion présent dans le cytosol des cellules permettra la réduction du pont disulfure, délivrant la molécule de la surface des NP qui pourra alors diffuser librement dans la cellule.

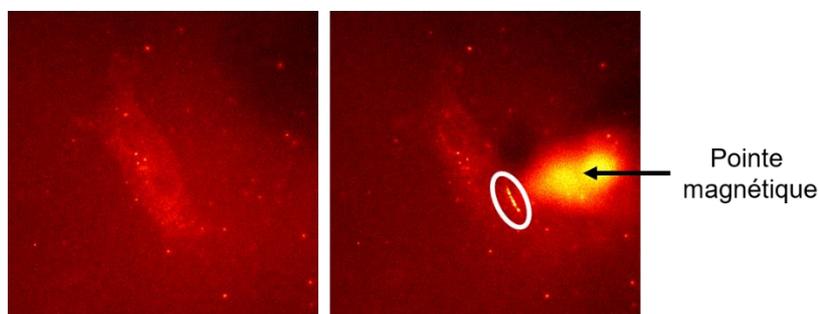
J'ai participé à l'encadrement de Mélody Perret (stagiaire de master 2, janvier – juillet 2021) qui a développé une stratégie de fonctionnalisation des NP *via* pont disulfure en greffant une séquence polyhistidine à la surface de NP cœur-coquilles, comme indiqué dans la figure ci-dessous. La synthèse s'est révélée complexe du fait de l'oxydation très rapide des fonctions thiol introduites à la surface des nanoparticules et de la faible stabilité colloïdale résultant probablement de la formation de ponts disulfure entre nanoparticules. Différentes stratégies ont été testées. Une voie de synthèse efficace a pu être identifiée, elle implique la réaction des fonctions thiol des nanoparticules avec le DTNB (acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)). Cette étape permet à la fois de protéger les fonctions thiol des nanoparticules, évitant la formation de ponts disulfure entre nanoparticules, et de les activer vis-à-vis de la formation de ponts disulfure avec les peptides comportant une Cys libre.



Stratégie de fonctionnalisation des NP avec des peptides par la formation de ponts disulfure.

L'étude du clivage du lien disulfure a déjà été réalisée en solution, dans un milieu contenant du glutathion et s'est révélée efficace. Les résultats sont donc prometteurs et l'étude de l'internalisation cellulaire de ces NP fonctionnalisées est la prochaine étape de ce projet pour notamment étudier la réduction du lien disulfure dans les cellules.

Par ailleurs, la manipulation des NP pour diverses applications mentionnées dans l'introduction de ce manuscrit, serait possible grâce à la présence des NP dans le cytosol, ne nécessitant plus la microinjection de NP dans les cellules. Il serait intéressant alors d'observer si les NP fonctionnalisées avec les polyhistidines peuvent être attirées par un gradient de champ magnétique dans le cytosol. La contrainte du point de vue physique est de pouvoir générer un gradient fort à proximité des NPM sachant qu'il décroît de manière exponentielle avec la distance à l'aimant. Cette expérience nécessite donc la mise en place d'un gradient de champ suffisamment fort (100 - 1 000 T/m) à l'aide d'une pointe magnétique par exemple.



Images obtenues après microinjection de nanoparticules magnétiques (visualisées en rouge) dans des cellules. Au voisinage de la pointe magnétique, une accumulation des NPM est observée (encerclée en blanc). La pointe magnétique est également fluorescente due à l'attraction des NPM dans le milieu.

La manipulation de particules magnétiques dans le cytosol permettrait alors d'envisager le recrutement et la concentration de protéines d'intérêt impliquées par exemple dans les mécanismes de croissance ou de différenciation cellulaire. Cette étape représente un challenge très important car la manipulation intracellulaire n'a jamais été décrite à notre connaissance après internalisation des NPM mais seulement avec l'utilisation de méthodes invasives permettant l'entrée des NP dans la cellule.

De plus, comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, les propriétés d'hyperthermie des NPM chutent lorsqu'elles sont piégées dans les endosomes. Le fait que les séquences oligo-His greffées à la surface des NPM aient favorisé l'échappement des endosomes pourrait avoir une influence sur l'échauffement généré et donc sur la mort cellulaire. Les conditions d'hyperthermie (fréquence, intensité du champ magnétique) doivent être optimisées tout en restant en deçà du seuil toléré pour les applications *in vivo* ($f.H < 4,85.10^8$ A/m/s). Les mécanismes d'apoptose étant déclenchés pour des températures de l'ordre de 42-43 °C, on peut imaginer que la quantité de NPM dans le cytosol doit à la fois être plus importante et que celles-ci ne doivent pas être agrégées ce qui aurait pour conséquence de diminuer leur pouvoir chauffant. Une alternative à cette approche d'échauffement global serait d'exploiter leur échauffement local sachant que la température estimée à proximité des NPM est d'environ 60-65 °C. Ces estimations reposent sur des expériences de dépliement de brins d'ADN ou de transitions de phases de polymères. Il est important de préciser qu'elles sont réalisées sans élévation globale de température. A l'échelle cellulaire cette génération locale de chaleur pourrait être utilisée pour cibler de protéines thermosensibles ou pour activer des canaux ioniques.

Matériels et méthodes

1. Réactifs chimiques

Les réactifs chimiques et biologiques ont été obtenus auprès des fournisseurs suivants : Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Alloc)-OH: Iris Biotech GmbH.

Résine Rink Amide AM, DIC, HOBt, HBTU, DIEA Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, Fmoc-ε-Ahx-OH, N₃-CH₂-COOH, Tétraéthylorthosilicate (TEOS), 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTS), rhodamine B isothiocyanate (RITC), citrate de sodium, diméthylsulfoxyde (DMSO), Dibenzocyclooctyne-PEG₄-N-hydroxysuccinimidyl ester, tampon d'acide 3-(morpholino) propane-1-sulfonique (MOPS), tampon d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine-éthane-sulfonique (HEPES), Hanks balanced salt solution (HBSS), sérum bovin fétal (FBS), bleu trypan colorant Hoechst 33342, calcéine, glutaraldéhyde, résine Epon et acide chlorhydrique 37% : Merck.

DMF, acétonitrile, TFA, dichlorométhane, pipéridine, ammoniacque (22.5%) et acide citrique : Carlo Erba.

Chlorure ferrique, chlorure ferreux, nitrate ferrique, acétone, éther diéthylique, éthanol (96%), acide nitrique (68%) : VWR.

2-(méthoxy(polyéthylénoxy)propyl)triméthoxysilane (PEOS) : Gelest.

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-F12), pénicilline, streptomycine, amphotéricine B et trypsine-EDTA (0,05 %) : Gibco.

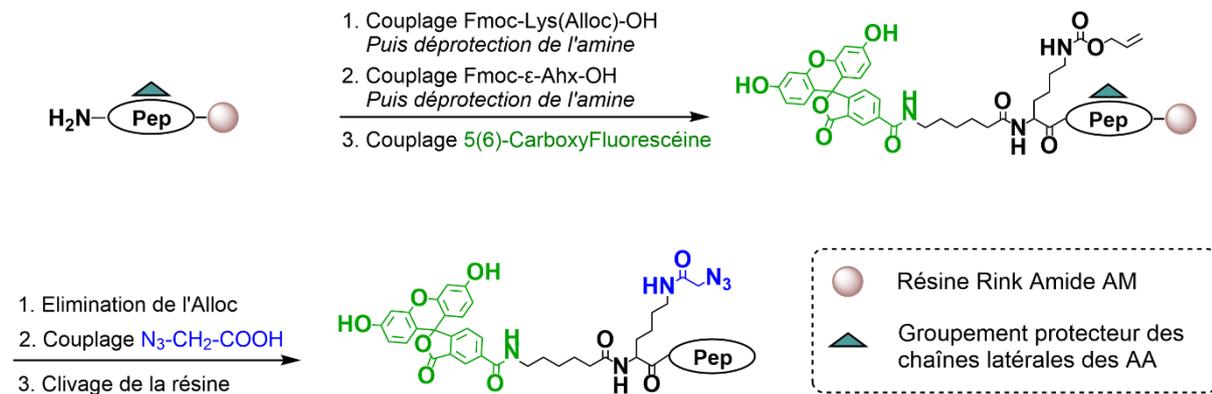
Lactate dehydrogénase (LDH) et LysoBrite NIR : Invitrogen.

2. Protocole général de synthèse et caractérisations des peptides

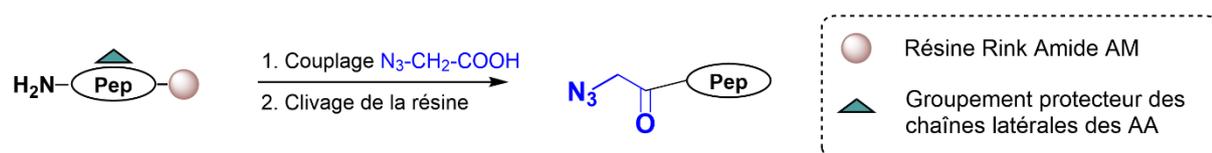
2.a. Synthèse des peptides

Les peptides ont été synthétisés sur support solide, en stratégie Fmoc. Le segment peptidique Arg₉ a été assemblé par synthèse automatique assistée par micro-onde par Christophe Piesse (Plateforme d'ingénierie des protéines, service synthèse peptidique, IBPS, Sorbonne Université). L'élongation de cette séquence pour donner les peptides **CF-R9** et **R9*** a ensuite été réalisée manuellement en suivant les protocoles décrits ci-dessous. Les peptides **CF-H4** et **H4*** ont été synthétisés entièrement manuellement sur résine Rink Amide AM (taux de substitution 0,35 mmol/g de résine) avec une échelle de synthèse fixée à 0,1 mmol.

Les différentes étapes de synthèse de ces peptides sont résumées sur les figures ci-dessous.



Etapes de synthèse des peptides **CF-R9** (pep = Arg₉) et **CF-H4** (pep = His₄-Trp).



Etapes de synthèse des peptides **R9*** (pep = Arg₉) et **H4*** (pep = His₄-Trp).

Dans les protocoles généraux ci-dessous, le nombre d'équivalents est donné par rapport au peptide en élongation.

Couplage manuel des acides aminés et du lien Fmoc-ε-Ahx-OH et déprotection des amines terminales

Les résidus (Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Lys(Alloc)-OH ou Fmoc-ε-Ahx-OH, 5 équiv.) ont été activés pendant 3 minutes par traitement avec une solution de HBTU (0,5 M dans du DMF; 4,5 équiv.) et de la DIEA (10 équiv.). La solution activée a ensuite été mise en contact de la résine pendant 30 minutes à température ambiante pour permettre le couplage du résidu. Après lavage de la résine par du DMF (2 x 2 mL), l'élimination du groupement Fmoc a été effectuée avec une solution de pipéridine 20 % dans le DMF (7 + 3 minutes). Après déprotection, la résine a été lavée 4 fois avec du DMF. La progression des réactions de couplage a été suivie par le test de Kaiser.

Couplage de la carboxyfluorescéine à l'extrémité N-terminale

La 5(6)-carboxyfluorescéine (5 équiv.) a été activée avec une solution de DIC (5 équiv.) et HOBT (10 équiv.) dans du DMF pendant 10 minutes. La solution activée a ensuite été ajoutée à la résine pendant 15 heures à température ambiante. Après couplage de la carboxyfluorescéine, la résine a été lavée 4 fois avec 2 mL d'une solution de pipéridine 20 % dans du DMF puis encore 4 fois avec du DMF.

Déprotection Alloc

La résine a d'abord été lavée 3 fois avec du DCM anhydre. La déprotection sélective de la Lys(Alloc) a été réalisée en ajoutant une solution de Pd(PPh₃)₄ (0,25 équiv.), PhSiH₃ (25 équiv.) dans 2 mL de DCM anhydre à la résine pendant 1h30 sous argon à température ambiante. La résine a ensuite été lavée 6 fois avec une solution de pipéridine 20 % dans du DMF puis encore 4 fois avec du DCM et 4 fois avec du DMF.

Conjugaison du groupe azido

N₃-CH₂-COOH (5 équiv.) a été activé avec une solution de DIC (5 équiv.) et HOBT (10 équiv.) dans du DMF (2 mL) pendant 10 minutes. La solution activée a été ajoutée à la résine pendant 15 heures à température ambiante. Après couplage, la résine a été lavée 4 fois avec du DMF.

Test de Kaiser

Le suivi des réactions de couplage et de déprotection a été réalisé par le test de Kaiser. Ce test colorimétrique permet la détection de fonctions amine libres sur la résine et donc d'évaluer l'efficacité d'une réaction de couplage. Trois solutions sont utilisées pour ce test : une solution de 5 g de ninhydrine dans 100 mL d'éthanol, une solution de 80 g de phénol dans 20 mL d'éthanol et une solution de 2 mL de cyanate de potassium (1 mM) dans 98 mL de pyridine. Après chaque couplage manuel, deux gouttes de chaque solution sont ajoutées à quelques billes de résine dans un tube hémolyse. Après chauffage à 100 °C pendant 3 minutes, la solution contenant la résine au préalable jaunâtre, ne change pas de couleur si le couplage de l'acide aminé est total (absence d'amines libres) et devient bleu foncé s'il est incomplet (présence d'amines libres). Si des amines libres sont détectées, un second couplage du résidu est réalisé.

Déprotection finale du peptide et clivage de la résine

La résine a d'abord été lavée 2 fois avec du DCM puis 2 fois avec du MeOH avant d'être séchée sous vide. Le clivage a été réalisé par addition d'une solution de clivage (10 mL/g de résine, 95 % TFA, 2,5 % H₂O, 2,5 % triisopropylsilane) pendant 4 heures à température ambiante. La résine a été éliminée par filtration et rincée une fois avec du TFA. Le TFA a été évaporé sous flux d'argon puis les peptides ont été précipités avec de l'éther diéthylique froid (15 mL) avant d'être incubés pendant 30 minutes à -20 °C. Les peptides ont ensuite été mis en culot par centrifugation puis les culots ont été séchés à l'air avant d'être solubilisés dans H₂O distillée et lyophilisés.

2.b. Caractérisation des peptides

Les peptides ont été purifiés par HPLC sur un appareil Waters 2489, en phase inverse (colonne RP-C18, 5 µm, 250 x 16 mm, Macherey Nagel) en utilisant un débit de 10 mL/min et des gradients linéaires sur 30 minutes de solvant B/ A (solvant A : 0,1 % TFA dans H₂O ; solvant B : 0,1 % TFA dans MeCN). Les peptides ont été détectés à 220 nm. La pureté des fractions a été évaluée par HPLC analytique (colonne RP-C18, 5 µm, 100 x 4,6 mm, Higgins Analytical) à un débit de 1 mL/min avec un gradient linéaire de solvant B/A sur 10 minutes. Les fractions contenant les peptides purs souhaités ont été combinées et lyophilisées.

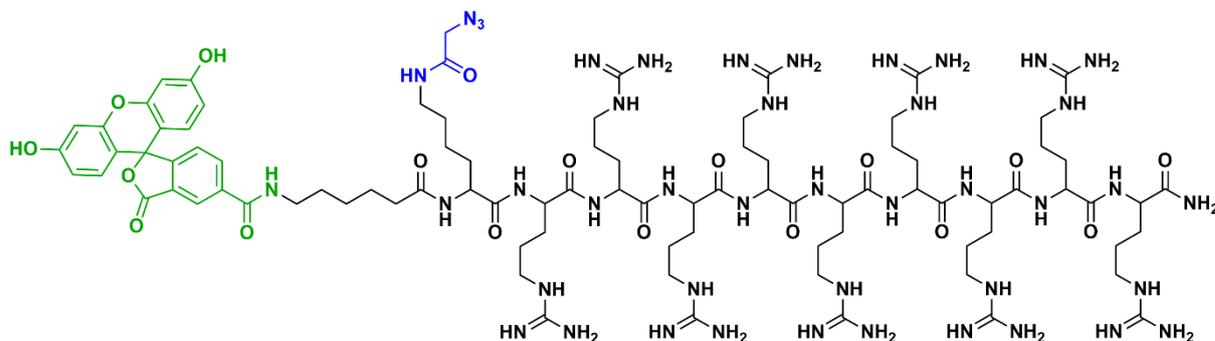
Les peptides purs ont été caractérisés sur la plateforme MS3U (Sorbonne Université) par spectrométrie de masse MALDI-TOF (spectromètre Applied Biosystems 4700 ou AB Sciex Voyager DE-PRO) en mode positif réflecteur, en utilisant la résine CHCA (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique) à 10 mg/mL dans H₂O/MeCN/TFA (1/1/0,01).

CF-R9, CF-Ahx-Lys(CO-CH₂-N₃)-(Arg)₉-NH₂

Gradient pour purification : 10-40 % de solvant B/A en 30 min

Gradient pour analyse : 1-60 % de solvant B/A en 10 min, $t_R = 7,6$ min

m/z attendue [M+H]⁺: 2106,19, m/z observées [M+H]⁺: 2078,40 et 2106,41



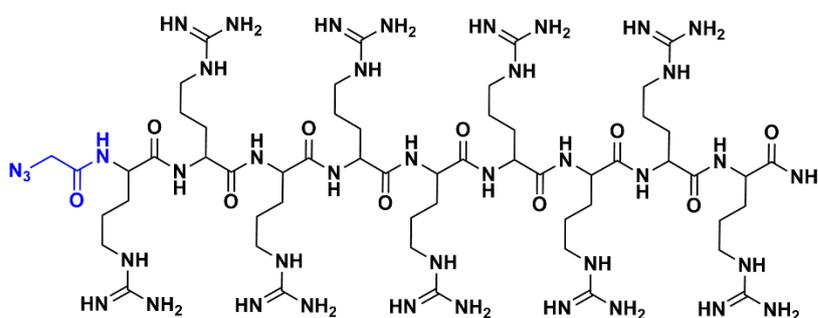
Structure du peptide **CF-R9**.

R9*, N₃-CH₂-CO-(Arg)₉-NH₂

Gradient pour purification : 0-40 % de solvant B/A en 30 min

Gradient pour analyse : 1-50 % de solvant B/A en 10 min, $t_R = 6,0$ min

m/z attendue [M+H]⁺: 1505,95, m/z observées [M+H]⁺: 1477,80 et 1505,79



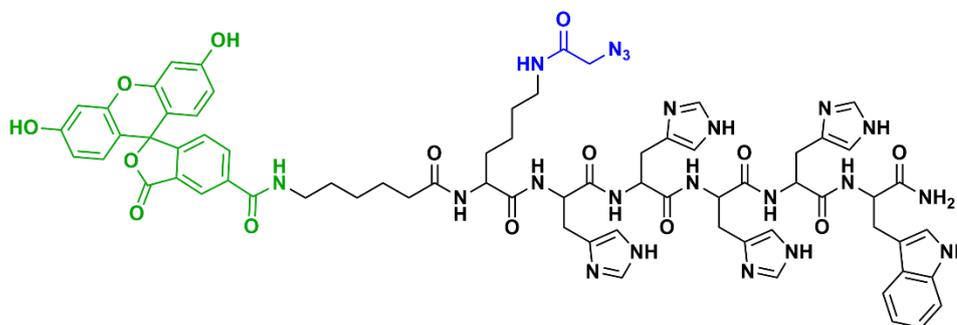
Structure du peptide **R9***.

CF-H4, CF-Ahx-Lys(CO-CH₂-N₃)-(His)₄-Trp-NH₂

Gradient pour purification : 1-30 % de solvant B/A en 30 min

Gradient pour analyse : 20-60 % de solvant B/A en 10 min, t_R = 5,8 min

m/z attendue [M+H]⁺: 1435,59, m/z observées [M+H]⁺: 1407,92 et 1435,92



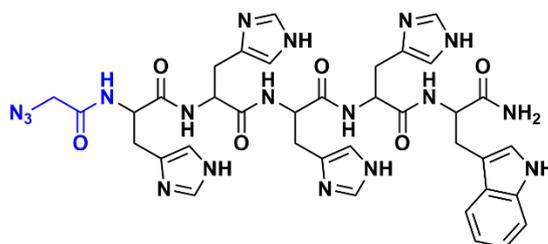
Structure du peptide **CF-H4**.

H4*, N₃-CH₂-CO-(His)₄-Trp-NH₂

Gradient pour purification : 1-30 % de solvant B/A en 30 min

Gradient pour analyse : 5-30 % de solvant B/A en 10 min, t_R = 7,9 min

m/z attendue [M+H]⁺: 835,36, m/z observées [M+H]⁺: 807,28 et 835,28



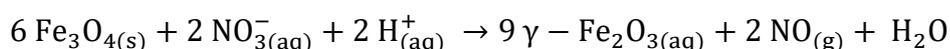
Structure du peptide **H4***.

Lors de l'analyse MALDI-TOF, un pic supplémentaire a été trouvé pour tous les peptides (Δ m/z: -28), suggérant une fragmentation du groupe azoture *via* l'expulsion de N₂ pendant l'analyse MALDI-TOF.

3. Protocole général de synthèse des nanoparticules cœur-coquilles

3.a. Synthèse des nanoparticules de maghémite

Les nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ont été obtenues par la méthode de coprécipitation de Massart.¹⁷⁹ Une solution d'ammoniaque 22,5 % dans H_2O (1 L) a été ajoutée à une solution acide d'ions fer (II) et fer (III) (180 g de FeCl_2 , 100 mL de HCl 37 %, 500 mL de H_2O distillée, 715 mL de FeCl_3 27 %) et laissée sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes. Après rinçage avec H_2O distillée puis décantation magnétique, les nanoparticules de magnétite Fe_3O_4 obtenues ont été redispersées dans 360 mL d'acide nitrique (52 %). L'oxydation des nanoparticules de magnétite obtenues a été réalisée en ajoutant une solution de nitrate de fer (III) (323 g) dans H_2O distillée (800 mL) et portée à ébullition (150° C) pendant 30 minutes pour donner des nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Cette oxydation a été accomplie suivant la réaction d'oxydo-réduction suivante :



Cette réaction se traduit par un changement de couleur de la solution de noir à rouille. Les nanoparticules résultantes ont été lavées avec de l'acide nitrique (52 %, 360 mL), de l'acétone (3x, 1 L) et de l'éther diéthylique (2x, 0,5 L) avant d'être redispersées dans H_2O distillée (1 L), donnant des nanoparticules de magnétite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ de taille polydisperse.

Tri en taille

Pour diminuer la polydispersité, un processus de tri par la taille a été effectué. L'ajout d'acide nitrique (52,5 %, 30 mL) a augmenté la force ionique, conduisant à la floculation des nanoparticules plus grosses, donc moins stables. Ces nanoparticules précipitées ont été séparées du reste du fluide magnétique, lavées avec de l'acétone (0,5 L) puis avec de l'éther diéthylique (0,3 L), et finalement redispersées dans H_2O distillée. Le cycle de précipitation est ensuite répété pour obtenir plusieurs fractions de nanoparticules de différentes tailles.

Citratation

Une stabilisation des nanoparticules magnétiques en milieu aqueux à pH 7 a été réalisée par addition de citrate de sodium. Le citrate est ajouté avec un rapport 0,13 par rapport au nombre de moles de fer. La solution est chauffée à 150 °C pendant 30 minutes puis lavée par décantation magnétique en utilisant de l'acétone et de l'éther diéthylique. Les nanoparticules ont été redispersées dans H₂O distillée où elles sont stabilisées par répulsion électrostatique des charges négatives se trouvant à leur surface.

3.b. Synthèse des nanoparticules cœur-coquilles

La synthèse des nanoparticules cœur-coquilles découle d'une procédure sol-gel (synthèse de type Stöber) développée et optimisée au sein du laboratoire PHENIX.¹⁵⁹ Avant le début de la synthèse des cœur-coquilles, une solution de rhodamine a été fonctionnalisée avec de l'APTS pour être incorporée dans la couche de silice. La rhodamine B isothiocyanate (10 mg) a été dispersée dans de l'éthanol (1 mL) et de l'APTS (9,5 µL) a été ajouté à la solution. Le mélange est agité pendant 15 heures avant d'être utilisé pour la synthèse des nanoparticules cœur-coquilles. Les NP cœur-coquilles sont synthétisées en deux étapes. Une dispersion de ferrofluide citratée triée (125 µL, [Fe] = 1,02 M) a été ajoutée dans un mélange H₂O:EtOH (1 :2). 112 µL de TEOS, 250 µL de NH₃ 30 % et 18,6 µL de rhodamine fonctionnalisée avec l'APTS ont été ajoutés et laissés réagir sous agitation pendant 2 heures à température ambiante. L'enveloppe de silice a été fonctionnalisée par l'ajout de 39,1 µL de TEOS, 40,7 µL de PEOS et 19,7 µL d'APTS. Le mélange a été agité pendant 15 heures à température ambiante. Les nanoparticules résultantes ont ensuite été rincées avec un mélange diéthyléther/éthanol (15:1) et redispersées dans 5 mL d'un tampon d'acide 3-morpholinopropane-1-sulfonique (MOPS 0,1 M, pH 7,4). La suspension est stable pendant plusieurs mois.

3.c. Fonctionnalisation des nanoparticules cœur-coquilles avec le DBCO

Les nanoparticules cœur-coquilles ont ensuite été fonctionnalisées par un alcyne stériquement contraint. L'ester de dibenzocyclooctyne-PEG₄-N-hydroxysuccinimidyle (DBCO-PEG₄-NHS, 1,9 µL correspondant à 0,06 équivalent ou 3,8 µL correspondant à 0,11 équivalent, 10 mM dans DMSO) a été ajouté à une solution de dispersion cœur-coquilles

(100 µL, 26 mM) dans du MOPS (0,1 M, pH 7,4). Le mélange a été incubé pendant 1 heure à température ambiante. Les nanoparticules fonctionnalisées avec le DBCO ont ensuite été purifiées avec une colonne d'exclusion stérique Sephadex G-25 (colonnes PD10, GE Healthcare) et lavées avec du tampon HEPES (0,2 M, pH 7,4).

4. Caractérisation des suspensions de nanoparticules

4.a. Concentration en fer

La concentration totale en fer de chaque échantillon a été déterminée par spectrophotométrie d'absorption atomique (AAS) à 248 nm (PerkinElmer Analyst 100). Avant les mesures AAS, les échantillons ont été dégradés à l'aide d'acide chloridrique 37 % (500 µL) puis dilués dans de l'acide nitrique 2 %.

4.b. Diffusion dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering)

La diffusion dynamique de la lumière est une technique de mesure établie et précise pour caractériser la taille hydrodynamique des nanoparticules en suspension. Cette taille comprend la couche de solvatation présente autour des nanoparticules et des molécules organiques en surface. Cette technique est basée sur le mouvement brownien des particules, cela indique que les particules plus petites se déplacent plus rapidement alors que les plus grandes se déplacent plus lentement dans le liquide. La lumière diffusée par les particules donne des informations sur la vitesse de diffusion et donc sur la distribution granulométrique. Le coefficient de diffusion (D) des particules est inversement proportionnel à la taille (d_p , diamètre hydrodynamique) des particules d'après l'équation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k \cdot T}{3\pi \cdot \eta \cdot d_p}$$

Avec k = constante de Boltzmann ; T = température ; η = viscosité.

Les mesures DLS ont été effectuées sur un appareil Malvern Nanosizer à 20 °C dans une cuve à base carrée. Le laser Hélium-Néon fonctionnait à 633 nm avec un angle fixe de 173°. L'intensité de diffusion d'une particule est reliée à son coefficient de diffusion par une fonction d'autocorrélation, ce qui permet de calculer la taille hydrodynamique des nanoparticules, en formulant l'hypothèse qu'elles sont sphériques. Chaque échantillon a été dilué dans du tampon MOPS (0,1 M, pH 7.4) ou dans du tampon HEPES (0,2 M, pH 7.4) et a été mesuré 6 fois combinant 60 mesures à 20 °C.

L'analyse des résultats est possible en intensité, en nombre et en volume. Une analyse en intensité favorise les plus grandes nanoparticules car le signal diffusé est proportionnel à d^4 (d = diamètre des particules). Une analyse en nombre favorise les particules les plus nombreuses, c'est pourquoi cette analyse a été utilisée pour les résultats obtenus. Une analyse en volume donne une moyenne entre l'analyse en intensité et en nombre.

4.c. Potentiométrie zêta

Le potentiel zêta permet de donner une information sur la charge de surface des nanoparticules présentes en suspension dans la solution. Les mesures de potentiel zêta ont été effectuées à l'aide d'un Zétasizer développé par Malvern (Nanosizer). Chaque échantillon a été dilué dans de l'eau distillée pour ne pas avoir d'interférence de forces ioniques des différents solvants ou tampons, et a été mesuré trois fois, combinant 60 mesures à 20 °C. Le résultat obtenu est directement donné en mV.

4.d. Microscopie électronique à transmission (TEM)

Les expériences de TEM ont été obtenues après avoir placé une goutte (5 μ L) de la suspension aqueuse de NP diluée au 1/1000 sur une grille de cuivre revêtue d'un film de carbone. La grille a été laissée à l'air pendant quelques heures à température ambiante. L'analyse TEM a été réalisée avec un microscope électronique à transmission Jeol 100 cx fonctionnant à 100 keV. La TEM permet l'observation de la morphologie et de la surface avec un champ profond. La résolution des images peut aller jusqu'au dixième de nanomètre. Les images ont été réalisées sur la plateforme de microscopie de l'UFR de

Chimie (Sorbonne Université) par Aude Michel (Ingénieur d'étude, laboratoire PHENIX) et Sirine El Mousli (Doctorante, laboratoire PHENIX).

4.e. Mesure de l'aimantation à saturation

Le magnétomètre à échantillons vibrants (VSM) utilisé pour enregistrer les courbes d'aimantation a été développé au laboratoire à partir d'une alimentation commercialisée par Caylar. Le magnétomètre contient deux bobines pour imposer le champ magnétique H uniforme. L'échantillon va acquérir une aimantation M , qui va perturber le flux magnétique traversant les bobines de détection. Ces bobines constituent la boucle supraconductrice, et ce flux magnétique doit rester constant. L'induction d'un courant électrique dans le système, permettant de compenser la variation de flux magnétique due à l'aimantation de l'échantillon, est alors mesurée. Pour chaque mesure, le champ magnétique H imposé varie. La courbe d'aimantation de l'échantillon est alors tracée avec l'aide des courbes de calibration qui permettent de retrouver les valeurs d'aimantation M de l'échantillon pour chaque champ magnétique H .

Les courbes d'aimantation dépendant du champ ont été mesurées à 300 °K en fonction du champ externe, dans la gamme de -9000 à +9000 A/m (150 points) pour obtenir une aimantation à saturation. Le moment magnétique enregistré (en emu) peut directement être converti en grammes de fer, du fait de l'aimantation à saturation du matériau (exprimé en emu/g de γ -Fe₂O₃).

4.f. Hyperthermie magnétique en solution

Les mesures d'hyperthermie magnétique ont été réalisées sur le Magnetherm commercialisé par Nanotherics avec des fréquences autour de 111,0 kHz, 334,0 kHz, 471,5 kHz, 535,0 kHz, 629,5 kHz, 753,5 kHz et 1000 kHz correspondant à un champ respectif de 21,0 mT, 14,0 mT, 10,0 mT, 13,0 mT, 6,5 mT, 8,0 mT et 3,0 mT. L'échantillon de ferrofluide ou la suspension de NP cœur-coquilles ($V = 500 \mu\text{L}$) est introduit dans une bobine de cuivre, qui fait partie d'un circuit RLC résonnant produisant un champ magnétique AC dans la gamme de fréquences 100-1000 kHz. La bobine est refroidie par une circulation d'eau pour éliminer l'influence de gradients thermiques dus à

l'échauffement de la bobine. La température de la solution de ferrofluide a été mesurée avec une fibre optique (Fluoroptic, Luxtron Corp.) placée au centre de l'échantillon. L'augmentation de température a été modélisée à l'aide de l'équation de Box-Lucas indiquée ci-dessous :

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

Avec ΔT la variation de température mesurée, t le temps et t_0 le temps de début d'application du champ magnétique. Les paramètres α et λ sont déterminés par la modélisation puis la SLP (Specific Loss Power, exprimée en W/g) des nanoparticules est calculée selon l'équation suivante :

$$SLP = \alpha \cdot \lambda \cdot \frac{C_p}{\phi_m}$$

Avec C_p la capacité calorifique de l'eau (4,19 J/g/K), et ϕ_m la fraction massique de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

La perte de puissance intrinsèque (ILP, Intrinsic Loss Power, exprimée en $\text{m}^2 \cdot \text{nH/kg}$) est dépendante de la fréquence f et du champ magnétique H et a été calculée avec l'équation suivante :

$$ILP = \frac{SLP}{f \cdot H^2}$$

4.g. Mesure quantitative des groupes fonctionnels amine à la surface des nanoparticules par la fluorescamine

Des solutions standard d'APTS, 0 μM , 2 μM , 8 μM , 14 μM , 20 μM et 26 μM ont été préparées dans une solution de fluorescamine (0,2 M dans de l'éthanol 99 %). 20 μL des suspensions de nanoparticules ont été ajoutées dans 5 mL de solution de fluorescamine (0,2 M dans de l'éthanol 99 %). Les solutions ont été conservées à l'obscurité pendant 2 heures. Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés sur un spectrophotomètre à fluorescence Cary Eclipse commercialisé par Agilent ou sur un lecteur de plaques SpectraMax i3x commercialisé par Molecular Devices, en utilisant une gamme de 450 à 600 nm et une longueur d'onde d'excitation à 390 nm. Sur la base de la courbe d'étalonnage de l'APTS, la concentration en NH_2 de chaque échantillon a été déterminée.

4.h. Spectroscopie de fluorescence

L'incorporation effective de rhodamine dans la couche de silice des cœur-coquilles a été étudiée par l'enregistrement d'un spectre de fluorescence. Les mesures ont été effectuées sur un spectrophotomètre à fluorescence Cary Eclipse commercialisé par Agilent. Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés dans la gamme de 550 à 650 nm en utilisant la longueur d'onde d'excitation à 540 nm.

5. Fonctionnalisation des nanoparticules cœur-coquilles avec les peptides

5.a. Mono-fonctionnalisation des nanoparticules avec les peptides

Une solution de peptide **CF-R9/R9*** (19,0 μL , 1 mM dans H_2O) ou **CF-H4/H4*** (9,53 μL , 1 mM dans H_2O) a été incubée avec une suspension de NP cœur-coquilles, préalablement fonctionnalisées avec 0,11 et 0,06 équivalents de NHS-PEG₄-DBCO (100 μL , 18 mM dans HEPES 0,2 M, pH 7,4) respectivement, avec un rapport molaire 2:1 (NHS-PEG₄-DBCO:peptide). Le mélange est laissé à température ambiante pendant 15 heures. Le mélange a ensuite été purifié par ultrafiltration utilisant une Nanosep (10 kDa) en éluant 4 fois avec de l'EDTA (2 mM) dans un tampon HEPES (0,2 M, pH 7,4), puis lavé 6 fois avec le tampon HEPES (0,2 M, pH 7,4).

5.b. Bi-fonctionnalisation des nanoparticules avec les peptides

Une solution de peptide **CF-R9** ou **R9*** (9,53 μL , 1 mM dans H_2O) a été incubée avec une suspension de cœur-coquilles préalablement fonctionnalisées avec 0,11 équivalent de NHS-PEG₄-DBCO (100 μL , 18 mM dans HEPES 0,2 M, pH 7,4) avec un rapport molaire 4:1 (NHS-PEG₄-DBCO:peptide). Le mélange est laissé à température ambiante pendant 5 heures. Une solution de peptide **CF-H4** ou une solution de Rh-N₃ (9,53 μL , 1 mM dans H_2O) est ensuite ajoutée au mélange, alors laissé pendant 15 heures à température ambiante. Le mélange a ensuite été purifié par ultrafiltration utilisant une Nanosep (10 kDa) en éluant 4 fois avec de l'EDTA (2 mM) dans un tampon HEPES (0,2 M, pH 7,4), puis lavé 6 fois avec le tampon HEPES (0,2 M, pH 7,4).

6. Protocoles généraux des expériences cellulaires

6.a. Culture cellulaire

Les cellules d'ovaires d'hamster chinois, de type sauvage (CHO-K1) ont été cultivées dans un milieu de croissance DMEM-F12 supplémenté avec 10 % de sérum bovin fœtal (FBS inactivé par la chaleur), de la pénicilline (100 000 UI/L), de la streptomycine (100 000 UI/L) et de l'amphotéricine B (1 mg/L) dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂ à 37 °C. La culture cellulaire a été réalisée avec l'aide de Delphine Ravault et Françoise Illien (Laboratoire des Biomolécules, Sorbonne Université).

6.b. Test de cytotoxicité cellulaire (LDH)

Les cellules CHO-K1 ont étéensemencées dans des plaques à fond plat 96 puits (15 000 cellules/puits pour 6 heures d'incubation et 5 000 cellules/puits pour 24 heures d'incubation, dans 100 µL de milieu DMEM-F12 contenant 10 % de sérum FBS). Les cellules ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 24 heures avant que le milieu ne soit retiré, et un nouveau milieu (sans sérum) contenant les nanoparticules précisées à différentes concentrations de fer (0,14; 0,28; 0,56 et 1,12 mM) a été ajouté. Pour les 24 heures d'incubation, 50 µL de DMEM-F12 contenant 5 % de FBS a été ajouté après 6 heures d'incubation cellulaire avec les nanoparticules. Après 6 heures et 24 heures totales d'incubation, la libération de LDH dans le milieu cellulaire a été analysée en utilisant le kit d'analyse de cytotoxicité CyQUANT™ LDH (Invitrogen). Pour ceci, le surnageant de chaque échantillon (50 µL) a été transféré dans une nouvelle plaque à fond plat 96 puits afin que les cellules n'interfèrent pas à la lecture de l'absorption de la solution. Le mélange réactionnel du kit d'analyse (50 µL) a ensuite été ajouté. Après 30 minutes d'incubation, une solution stop (50 µL) a été ajoutée et l'absorbance a été lue à 490 nm et 680 nm avec un lecteur de plaques SpectraMax i3x commercialisé par Molecular Devices. Les contrôles (activité LDH spontanée correspondant aux cellules incubées sans NP et activité LDH maximale correspondant aux cellules mortes après incubation avec 20 µL de triton 10 % (sans NP) pendant 30 minutes) et les calculs de pourcentage de cytotoxicité ont été effectués selon le protocole du fabricant, comme indiqué ci-dessous :

$$\% \text{ cytotoxicité} = \frac{\text{activité LDH de l'échantillon} - \text{activité LDH spontanée}}{\text{activité LDH maximum} - \text{activité LDH spontanée}} \cdot 100$$

Les expériences ont été menées en triplicata.

6.c. Test de viabilité cellulaire à la calcéine-AM

Les cellules CHO-K1 ont étéensemencées dans des plaques à fond plat 96 puits (15 000 cellules/puits pour 6 heures d'incubation et 5 000 cellules/puits pour 24 heures d'incubation, dans 100 µL de milieu F12 contenant 10 % FBS). Les cellules ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 24 heures avant que le milieu ne soit retiré, et un nouveau milieu (sans sérum) contenant les nanoparticules précisées à différentes concentrations de fer (0,14; 0,28; 0,56 et 1,12 mM) a été ajouté. Pour les 24 heures d'incubation, 50 µL de DMEM-F12 contenant 5 % de FBS a été ajouté après 6 heures d'incubation des cellules avec les nanoparticules. Après 6 heures et 24 heures totales d'incubation, les cellules ont été lavées 2 fois avec du DMEM-F12 et 3 fois avec de l'HBSS. Une solution de calcéine-AM (5 µM, 100 µL) a été ajoutée dans chaque puit. Après 30 minutes d'incubation, la fluorescence a été lue à 530 nm avec un lecteur de plaques SpectraMax i3x commercialisé par Molecular Devices. Les contrôles (fluorescence à 530 nm maximale correspondant aux cellules incubées sans NP et fluorescence à 530 nm minimale correspondant aux cellules mortes après incubation avec 20 µL de triton 10 % (sans NP) pendant 30 minutes) et les calculs de pourcentage de viabilité ont été effectués selon le protocole du fabricant, comme indiqué ci-dessous :

$$\% \text{ cellules vivantes} = \frac{F(530)_{\text{échantillon}} - F(530)_{\text{min}}}{F(530)_{\text{max}} - F(530)_{\text{min}}} \cdot 100$$

Les expériences ont été menées en triplicata.

6.d. Analyse de l'internalisation des NP sur cellules fixées par microscopie à fluorescence ou microscopie confocale

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de culture cellulaire à 12 puits contenant une lamelle en verre de 15 mm (100 000 cellules/puit dans 500 µL). Les

cellules ont été incubées dans du milieu de culture (DMEM-F12) contenant 10 % FBS à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 24 heures avant que le milieu ne soit éliminé, et remplacé par un nouveau milieu (sans FBS) contenant les nanoparticules spécifiées. Les cellules ont été incubées pendant 1 heure supplémentaire, puis lavées 2 fois avec du milieu de culture (1 mL) et 3 fois avec de l'HBSS (1 mL). Les cellules ont été fixées dans 300 µL de paraformaldéhyde à 3 % dans de l'HBSS pendant 10 minutes, avant d'être lavées 2 fois avec 500 µL de HBSS. La lamelle a ensuite été retirée et une lame de microscope avec un milieu de montage fluoromount a été appliquée. Les cellules ont ensuite été imagées sur un microscope à fluorescence inversé Nikon Eclipse TE2000-S en utilisant une lentille d'objectif à immersion d'huile 100x ou sur un microscope confocal Leica TCS SP5 inversé en utilisant une lentille d'objectif à immersion d'huile 63x.

6.e. Analyse de l'internalisation des NP sur cellules vivantes par microscopie confocale à fluorescence

Les cellules CHO-K1 ont étéensemencées dans des boîtes à fond de verre (10 000 cellules/puits dans 200 µL, µ-Slide 8 Well IbiTreat). Les cellules ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 48 heures dans du milieu de culture DMEM-F12 contenant 10 % FBS avant que le milieu ne soit retiré, et remplacé par un nouveau milieu (sans FBS) contenant les nanoparticules précisées (0,28 mM et 0,56 mM en fer dans 150 µL). Les cellules ont été incubées pendant 2 heures ou 6 heures supplémentaires (pour 6 heures d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais sans NP après 4 heures), puis lavées 2 fois avec du milieu de culture (200 µL) et 3 fois avec de l'HBSS (200 µL) avant d'ajouter le colorant Hoechst 33342 (4 µg par puit). Après incubation pendant 15 minutes supplémentaires à 37 °C, les cellules ont ensuite été lavées avec du milieu de culture (200 µL) avant d'ajouter de l'HBSS (200 µL). Les cellules ont ensuite été immédiatement imagées sur un microscope confocal Leica TCS SP5 inversé en utilisant une lentille d'objectif à immersion d'huile 63x (Plateforme de microscopie photonique de l'Institut de Biologie Paris-Seine, Sorbonne Université) Si nécessaire, du bleu trypan (100 µL) a été ajouté aux cellules avant l'imagerie. Les images finales ont été générées sous la forme d'une projection d'intensité maximale de sept images empilées en Z (image finale z = 0,9 µm) en utilisant FIJI ImageJ. Les valeurs PCC (Pearson correlation coefficient) ont été obtenues à partir de coloc2 en utilisant FIJI ImageJ. Trois images de

cellules représentatives (> 30 cellules) ont été utilisées pour calculer les valeurs de PCC, et les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type.

Co-localisation avec le LysoTracker

Le marquage des lysosomes a été effectué, après incubation des cellules avec le milieu contenant les nanoparticules spécifiées (0,56 mM en fer dans 150 μ L), par l'ajout du LysoBrite NIR (1/500) pendant 10 minutes à 37 °C. Les cellules ont ensuite été lavées avec de l'HBSS (200 μ L) puis traitées et imagées comme précisé ci-dessus.

Expériences de fuite de calcéine

Pour examiner les fuites de calcéine, les cellules ont été incubées avec du milieu DMEM-F12 contenant un mélange des nanoparticules précisées (0,56 mM en fer dans 150 μ L) et de calcéine (160 μ M). Un traitement avec de la calcéine (160 μ M dans 150 μ L) seule a été effectué comme contrôle. Les cellules ont ensuite été traitées et imagées comme décrit ci-dessus. L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) des noyaux cellulaires a été mesurée à l'aide du logiciel FIJI ImageJ. Trois images représentatives avec 10 noyaux/image ont été utilisées pour obtenir le MFI pour chaque condition. Les données ont été exprimées en moyenne \pm écart type et ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA). **** valeur $p < 0,0001$ a été considérée comme statistiquement significative. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du progiciel Prism (PRISM 8.0; GraphPad Software, USA).

6.f. Cytométrie en flux après internalisation des cellules en suspension à 4 °C et 37 °C

Les cellules CHO-K1 ont étéensemencées dans une boîte de pétri de 100 mm de diamètre et ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ jusqu'à atteindre 90 % de confluence. Les cellules ont été dissociées avec de la trypsine-EDTA (0,05 %) (2 mL) à 37 °C pendant 3 minutes puis de l'HBSS a été ajouté (5 mL). Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 5 minutes à 850 g et redispersées dans du milieu de culture (1 mL) avant d'être comptées. Un million de cellules en suspension ont été incubées dans un microtube avec un nouveau milieu contenant les nanoparticules spécifiées (0,14 mM,

0,28 mM ou 0,56 mM en fer dans 1 mL) pendant 2 heures à 4 °C ou 37 °C sous agitation. Un traitement sans nanoparticules a été effectué comme contrôle et permettra d'en déduire l'auto-fluorescence des cellules. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 850 g pendant 5 minutes. Les culots cellulaires ont été lavés avec de l'HBSS (1 mL) et mis en suspension dans de l'HBSS (500 µL). La moitié de la suspension cellulaire a été utilisée pour mesurer la fluorescence totale, l'autre moitié a été traitée avec du bleu trypan (0,2 %). La fluorescence des cellules individuelles a été mesurée par cytométrie en flux à l'aide d'un FACSCalibur (BD Biosciences) et analysée par le logiciel BD CellQuest™. Les longueurs d'ondes étaient de 488 nm pour l'excitation et de 525 nm pour la détection. 10 000 évènements ont été enregistrés pour toutes les conditions expérimentales. La fluorescence moyenne d'un échantillon a été obtenue en soustrayant l'autofluorescence des cellules de la fluorescence moyenne mesurée des cellules en présence des nanoparticules.

6.g. Quantification de l'internalisation cellulaire des nanoparticules par cytométrie en flux

Les cellules CHO-K1 ont étéensemencées dans des plaques de culture cellulaire à 12 puits (150 000 cellules/puit dans 500 µL). Les cellules ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 24 heures dans DMEM-F12 contenant 10 % FBS avant que le milieu ne soit retiré, et un nouveau milieu (sans FBS) contenant les nanoparticules précisées (0,28 mM en fer dans 500 µL) a été ajouté. Les cellules ont été incubées pendant 6 heures supplémentaires (le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais sans nanoparticules après 4 heures), puis lavées 2 fois avec du milieu de culture (1 mL) et 3 fois avec de l'HBSS (1 mL). Les cellules ont ensuite été incubées avec de la trypsine-EDTA (0,05 %) (400 µL) à 37 °C jusqu'à décollement des cellules, puis du sérum bovin fœtal inactivé (100 µL) et du milieu de culture (1 mL) ont été ajoutés. Les cellules sont ensuite comptées et centrifugées pendant 5 minutes à 850 g. Les culots cellulaires ont été lavés avec de l'HBSS (1 mL) et mis en suspension dans de l'HBSS (500 µL). La fluorescence des cellules individuelles a été mesurée par cytométrie en flux à l'aide d'un analyseur MASCQuant et analysée grâce au logiciel FlowJo par Laurence Petit (Ingénieure, INSERM) à la plateforme de microscopie photonique de l'Institut de Biologie Paris-Seine (Sorbonne

Université). 20 000 évènements ont été enregistrés pour toutes les conditions expérimentales.

6.h. Quantification du fer dans les cellules par spectrométrie d'absorption atomique (AAS)

Les cellules CHO-K1 ont étéensemencées dans des plaques de culture cellulaire à 12 puits (150 000 cellules/puit dans 500 μ L). Les cellules ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 24 heures avant que le milieu ne soit retiré, et un nouveau milieu contenant les nanoparticules précisées (0,28 mM ou 0,56 mM en fer dans 500 μ L) a été ajouté. Les cellules ont été incubées pendant 2, 4 et 6 heures supplémentaires, puis lavées 2 fois avec du milieu de culture (1 mL) et 3 fois avec de l'HBSS (1 mL). Les cellules ont ensuite été incubées avec de la trypsine-EDTA (0,05 %) (400 μ L) à 37 °C jusqu'à décollement des cellules, puis du sérum bovin fœtal inactivé (100 μ L) et du milieu de culture (1 mL) ont été ajoutés. Les cellules sont ensuite comptées et centrifugées pendant 10 minutes à 850 g. Après élimination du surnageant, les cellules sont lysées, et les cœur-coquilles dégradées par traitement à l'acide chloridrique 37 % (100 μ L) pendant 15 heures. Avant les mesures au spectrophotomètre d'absorption atomique, les échantillons sont dilués dans de l'acide nitrique 2 % (3 mL).

6.i. Microscopie électronique à transmission avec les coupes de cellules

Les cellules CHO-K1 ont étéensemencées dans des plaques de culture cellulaire à 12 puits contenant une lamelle en verre de 15 mm (30 000 cellules/puit dans 500 μ L). Les cellules ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 48 heures avant que le milieu ne soit retiré, et un nouveau milieu contenant les nanoparticules spécifiées (0,56 mM en fer dans 500 μ L) a été ajouté. Les cellules ont été incubées pendant 6 heures supplémentaires (le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais après 4 heures), puis lavées 2 fois avec du milieu de culture (1 mL) et 3 fois avec de l'HBSS (1 mL). Les cellules ont été fixées avec du glutaraldéhyde (2 %) dans du tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4) à température ambiante pendant 2 heures. Les cellules fixées ont été lavées 5 fois avec du tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4). Les échantillons ont ensuite été postfixés avec 1 % de tétroxyde d'osmium contenant 1,5 % de cyanoferrate de potassium pendant

1 heure à température ambiante, puis progressivement déshydratés dans de l'éthanol (de 50 % à 100 %) et inclus dans la résine époxy Agar 100. Des coupes minces (80 nm) ont été collectées sur des grilles de cuivre de 200 mesh, et contre-colorées avec du citrate de plomb avant observation avec un microscope électronique à transmission JEM-2100 fonctionnant à 80 kV avec un filament LaB6 (plateforme de microscopie électronique de l'Institut de Biologie Paris-Seine, Sorbonne Université). Les images ont été enregistrées avec un CCD Veleta 2k x 2k monté sur le côté piloté par le logiciel iTEM (Olympus). La préparation des échantillons a été réalisée sur la plateforme de microscopie électronique de l'Institut de Biologie Paris-Seine (Sorbonne Université), avec l'assistance de Michaël Trichet. L'ultramicrotomie et les observations en TEM ont été réalisées par Michaël Trichet.

6.j. Microscopie électronique en transmission à balayage (STEM)

Les grilles de TEM précédemment observées ont été recouvertes de 2 nm de carbone à l'aide d'un appareil ACE600 (Leica microsystems). Les grilles ont été automatiquement imagées en mode d'imagerie Scanning-TEM (STEM) dans un microscope électronique à balayage (SEM) GeminiSEM 500 fonctionnant à 20 kV avec une ouverture de 20 μm et un mode courant élevé, piloté par le logiciel Atlas 5 (Carl Zeiss Microscopy). Un processus automatisé d'acquisition en mosaïque (assemblage de 25 ROI adjacents de 24,6 x 24,6 μm FOV) a généré une grande carte à haute résolution (FOV 100 x 100 μm , 1,7 Gpix, 3 nm/pixel). Toutes les images ont été acquises en mélangeant des électrons collectés simultanément en mode Bright Field (BF) et en mode High Angular Annular Dark Field (HAADF). Les acquisitions ont été réalisés par Michaël Trichet et Alexis Canette (plateforme de microscopie électronique de l'Institut de Biologie Paris-Seine, Sorbonne Université). Deux de ces cartes ont été examinées pour **CC1** et pour **CF-H4-CC1**, représentant plus de 40 cellules par condition. Les nanoparticules ont été divisées en 5 classes, selon leur localisation : endosome, corps multi-vésiculaire (MVB), autophagosome, rupture de membrane et cytosol. Deux comptages manuels ont été réalisés à l'aide du logiciel FIJI ImageJ et du plugin Cell Counter (Total des événements : 820 pour **CC1** et 834 pour **CF-H4-CC1**). Les événements qui n'ont pas pu être attribués à un groupe sans ambiguïté n'ont pas été comptabilisés. Les données ont été analysées à l'aide du test d'indépendance χ^2 . L'hypothèse H_0 consiste à considérer que les variables

aléatoires sont indépendantes, et correspond à l'hypothèse : « la distribution des nanoparticules dans les cellules n'est pas liée à la présence du peptide polyhistidine ». A l'inverse, l'hypothèse H_1 considère que les variables aléatoires sont liées : « la distribution des nanoparticules dans les cellules dépend de la présence du peptide polyhistidine ». **CC1** et **CF-H4-CC1** contiennent un nombre fini de valeurs, I pour **CC1** et J pour **CF-H4-CC1**. On dispose d'un échantillonnage de N données. Notons O_{ij} l'effectif observé de données pour lesquelles **CC1** prend la valeur i et **CF-H4-CC1** la valeur j . Sous l'hypothèse d'indépendance, on s'attend à une valeur théorique E_{ij} définie par l'équation :

$$E_{ij} = \frac{\sum_{j=1}^J O_{ij} \cdot \sum_{i=1}^I O_{ij}}{N}$$

L'écart à tester T entre les effectifs observés (O_{ij}) et les effectifs théoriques s'il y avait indépendance (E_{ij}) est ensuite calculé à partir de la formule suivante :

$$T = \sum_{i,j} \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Les calculs du test sont résumés dans le tableau ci-dessous :

	Effectifs observés			Effectifs théoriques			Calcul de l'écart à tester T		
	CC1	CF-H4-CC1	Total	CC1	CF-H4-CC1	Total	CC1	CF-H4-CC1	Total
EE	454	368	822	408	414	822	5,30	5,21	10,51
MVB/LE	45	14	59	29	30	59	8,48	8,34	16,82
Autophagosome	117	147	264	131	133	264	1,47	1,45	2,92
Rupture	160	278	438	217	221	438	15,04	14,79	29,83
Cytosol	44	27	71	35	36	71	2,20	2,16	4,36
Total	820	834	1654	820	834	1654			64,44

Test du χ^2 , les valeurs correspondent aux événements cellulaires obtenus lors du comptage à partir des images de STEM pour **CC1** et **CF-H4-CC1** après 6 h d'incubation avec les cellules CHO-K1 (0,56 mM en fer). EE = endosome précoce, MVB = corps multivésiculaires, LE = endosome tardif.

L'écart critique se lit dans la table de la loi du χ^2 avec un degré de liberté correspondant à 4 pour notre étude. Les comptages et l'analyse des données ont été réalisés avec l'aide de Michaël Trichet.

Bibliographie

- (1) Harayama, T.; Riezman, H. Understanding the Diversity of Membrane Lipid Composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2018**, *19* (5), 281–296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>.
- (2) Slotte, J. P.; Ramstedt, B. The Functional Role of Sphingomyelin in Cell Membranes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2007**, *109* (10), 977–981. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700024>.
- (3) Boesze-Battaglia, K.; Schimmel, R. Cell Membrane Lipid Composition and Distribution: Implications for Cell Function and Lessons Learned from Photoreceptors and Platelets. *J Exp Biol* **1997**, *200* (Pt 23), 2927–2936.
- (4) Zachowski, A. Phospholipids in Animal Eukaryotic Membranes: Transverse Asymmetry and Movement. *Biochem. J.* **1993**, No. 294, 1–14. <https://doi.org/10.1042/bj2940001>.
- (5) Boesze-Battaglia, K.; Clayton, S. T.; Schimmel, R. J. Cholesterol Redistribution within Human Platelet Plasma Membrane: Evidence for a Stimulus-Dependent Event †. *Biochemistry* **1996**, *35* (21), 6664–6673. <https://doi.org/10.1021/bi951846w>.
- (6) Casares, D.; Escribá, P. V.; Rosselló, C. A. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *IJMS* **2019**, *20* (9), 2167. <https://doi.org/10.3390/ijms20092167>.
- (7) van Meer, G.; de Kroon, A. I. P. M. Lipid Map of the Mammalian Cell. *Journal of Cell Science* **2011**, *124* (1), 5–8. <https://doi.org/10.1242/jcs.071233>.
- (8) Rabia, M.; Leuzy, V.; Soulage, C.; Durand, A.; Fourmaux, B.; Errazuriz-Cerda, E.; Köffel, R.; Draeger, A.; Colosetti, P.; Jalabert, A.; Di Filippo, M.; Villard-Garon, A.; Bergerot, C.; Luquain-Costaz, C.; Moulin, P.; Rome, S.; Delton, I.; Hullin-Matsuda, F. Bis(Monoacylglycero)Phosphate, a New Lipid Signature of Endosome-Derived Extracellular Vesicles. *Biochimie* **2020**, *178*, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.07.005>.
- (9) Hullin-Matsuda, F.; Luquain-Costaz, C.; Bouvier, J.; Delton-Vandenbroucke, I. Bis(Monoacylglycero)Phosphate, a Peculiar Phospholipid to Control the Fate of Cholesterol: Implications in Pathology. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **2009**, *81* (5–6), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.09.006>.

- (10) Gandhi, N. S.; Mancera, R. L. The Structure of Glycosaminoglycans and Their Interactions with Proteins. *Chemical Biology & Drug Design* **2008**, *72* (6), 455–482. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x>.
- (11) Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L., Darnell, J. *Molecular Cell Biology*, 5th Ed; 2004.
- (12) Doherty, G. J.; McMahon, H. T. Mechanisms of Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78* (1), 857–902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>.
- (13) Donahue, N. D.; Acar, H.; Wilhelm, S. Concepts of Nanoparticle Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Kinetics in Nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2019**, *143*, 68–96. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.008>.
- (14) Kirchhausen, T.; Owen, D.; Harrison, S. C. Molecular Structure, Function, and Dynamics of Clathrin-Mediated Membrane Traffic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2014**, *6* (5), 1–26. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016725>.
- (15) Huotari, J.; Helenius, A. Endosome Maturation: Endosome Maturation. *The EMBO Journal* **2011**, *30* (17), 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>.
- (16) Scott, C. C.; Vacca, F.; Gruenberg, J. Endosome Maturation, Transport and Functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2014**, *31*, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.034>.
- (17) Mindell, J. A. Lysosomal Acidification Mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* **2012**, *74* (1), 69–86. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142317>.
- (18) Saito, G.; Swanson, J. A.; Lee, K.-D. Drug Delivery Strategy Utilizing Conjugation via Reversible Disulfide Linkages: Role and Site of Cellular Reducing Activities. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55* (2), 199–215. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00179-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00179-5).
- (19) Birgisdottir, Á. B.; Johansen, T. Autophagy and Endocytosis – Interconnections and Interdependencies. *Journal of Cell Science* **2020**, *133* (10), 1–16. <https://doi.org/10.1242/jcs.228114>.
- (20) Omary, M. B.; Trowbridge, I. S.; Minowada, J. Human Cell-Surface Glycoprotein with Unusual Properties. *Nature* **1980**, *286* (5776), 888–891. <https://doi.org/10.1038/286888a0>.
- (21) Kawamoto, M.; Horibe, T.; Kohno, M.; Kawakami, K. A Novel Transferrin Receptor-Targeted Hybrid Peptide Disintegrates Cancer Cell Membrane to Induce Rapid Killing

- of Cancer Cells. *BMC Cancer* **2011**, *11* (1), 359. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-359>.
- (22) Shi, C.; Guo, X.; Qu, Q.; Tang, Z.; Wang, Y.; Zhou, S. Actively Targeted Delivery of Anticancer Drug to Tumor Cells by Redox-Responsive Star-Shaped Micelles. *Biomaterials* **2014**, *35* (30), 8711–8722. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.036>.
- (23) Richards, D. A.; Maruani, A.; Chudasama, V. Antibody Fragments as Nanoparticle Targeting Ligands: A Step in the Right Direction. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (1), 63–77. <https://doi.org/10.1039/C6SC02403C>.
- (24) Sun, T.; Zhang, Y. S.; Pang, B.; Hyun, D. C.; Yang, M.; Xia, Y. Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 12320–12364. <https://doi.org/10.1002/anie.201403036>.
- (25) Li, Z.; Tan, S.; Li, S.; Shen, Q.; Wang, K. Cancer Drug Delivery in the Nano Era: An Overview and Perspectives. *Oncology Reports* **2017**, *38* (2), 611–624. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5718>.
- (26) Zhi, K.; Raji, B.; Nookala, A. R.; Khan, M. M.; Nguyen, X. H.; Sakshi, S.; Pourmotabbed, T.; Yallapu, M. M.; Kochat, H.; Tadrous, E.; Pernell, S.; Kumar, S. PLGA Nanoparticle-Based Formulations to Cross the Blood–Brain Barrier for Drug Delivery: From R&D to CGMP. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (4), 500. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040500>.
- (27) Zhou, Z.; D’Emanuele, A.; Attwood, D. Solubility Enhancement of Paclitaxel Using a Linear-Dendritic Block Copolymer. *International Journal of Pharmaceutics* **2013**, *452* (1–2), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.075>.
- (28) Andreopoulou, E.; Gaiotti, D.; Kim, E.; Downey, A.; Mirchandani, D.; Hamilton, A.; Jacobs, A.; Curtin, J.; Muggia, F. Pegylated Liposomal Doxorubicin HCL (PLD; Caelyx/Doxil®): Experience with Long-Term Maintenance in Responding Patients with Recurrent Epithelial Ovarian Cancer. *Annals of Oncology* **2007**, *18* (4), 716–721. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl484>.
- (29) Krauss, A. C.; Gao, X.; Li, L.; Manning, M. L.; Patel, P.; Fu, W.; Janoria, K. G.; Gieser, G.; Bateman, D. A.; Przepiorka, D.; Shen, Y. L.; Shord, S. S.; Sheth, C. M.; Banerjee, A.; Liu, J.; Goldberg, K. B.; Farrell, A. T.; Blumenthal, G. M.; Pazdur, R. FDA Approval Summary: (Daunorubicin and Cytarabine) Liposome for Injection for the Treatment of Adults

- with High-Risk Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* **2019**, *25* (9), 2685–2690. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2990>.
- (30) Blanco-Andujar, C.; Ortega, D.; Pankhurst, Q. A.; Thanh, N. T. K. Elucidating the Morphological and Structural Evolution of Iron Oxide Nanoparticles Formed by Sodium Carbonate in Aqueous Medium. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22* (25), 12498–12506. <https://doi.org/10.1039/c2jm31295f>.
- (31) Kolosnjaj-Tabi, J.; Lartigue, L.; Javed, Y.; Luciani, N.; Pellegrino, T.; Wilhelm, C.; Alloyeau, D.; Gazeau, F. Biotransformations of Magnetic Nanoparticles in the Body. *Nano Today* **2016**, *11* (3), 280–284. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.10.001>.
- (32) 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* **2016**, *10* (8), 7627–7638. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b02876>.
- (33) Bakhtiary, Z.; Saei, A. A.; Hajipour, M. J.; Raoufi, M.; Vermesh, O.; Mahmoudi, M. Targeted Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Early Detection of Cancer: Possibilities and Challenges. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2016**, *12* (2), 287–307. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.019>.
- (34) Ortega, D.; Pankhurst, Q. A. Magnetic Hyperthermia. In *Nanoscience*; O'Brien, P., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2012; Vol. 1, pp 60–88. <https://doi.org/10.1039/9781849734844-00060>.
- (35) 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* **2011**, *103* (2), 317–324. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0389-0>.
- (36) Slowing, I.; Viveroescoto, J.; Wu, C.; Lin, V. Mesoporous Silica Nanoparticles as Controlled Release Drug Delivery and Gene Transfection Carriers☆. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60* (11), 1278–1288. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.012>.
- (37) Jiang, F.; Fu, Y.; Zhu, Y.; Tang, Z.; Sheng, P. Fabrication of Iron Oxide/Silica Core–Shell Nanoparticles and Their Magnetic Characteristics. *Journal of Alloys and Compounds* **2012**, *543*, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2012.07.079>.

- (38) Hurley, K. R.; Lin, Y.-S.; Zhang, J.; Egger, S. M.; Haynes, C. L. Effects of Mesoporous Silica Coating and Postsynthetic Treatment on the Transverse Relaxivity of Iron Oxide Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2013**, *25* (9), 1968–1978. <https://doi.org/10.1021/cm400711h>.
- (39) Meng, H.; Liong, M.; Xia, T.; Li, Z.; Ji, Z.; Zink, J. I.; Nel, A. E. Engineered Design of Mesoporous Silica Nanoparticles to Deliver Doxorubicin and P-Glycoprotein SiRNA to Overcome Drug Resistance in a Cancer Cell Line. *ACS Nano* **2010**, *4* (8), 4539–4550. <https://doi.org/10.1021/nn100690m>.
- (40) Reddy, L. H.; Arias, J. L.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (11), 5818–5878. <https://doi.org/10.1021/cr300068p>.
- (41) Horny, M.-C.; Gamby, J.; Dupuis, V.; Siaugue, J.-M. Magnetic Hyperthermia on γ -Fe₂O₃@SiO₂ Core-Shell Nanoparticles for Mi-RNA 122 Detection. *Nanomaterials* **2021**, *11* (1), 149. <https://doi.org/10.3390/nano11010149>.
- (42) Nallathamby, P. D.; Hopf, J.; Irimata, L. E.; McGinnity, T. L.; Roeder, R. K. Preparation of Fluorescent Au–SiO₂ Core–Shell Nanoparticles and Nanorods with Tunable Silica Shell Thickness and Surface Modification for Immunotargeting. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (32), 5418–5428. <https://doi.org/10.1039/C6TB01659F>.
- (43) Algar, W. R.; Prasuhn, D. E.; Stewart, M. H.; Jennings, T. L.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Medintz, I. L. The Controlled Display of Biomolecules on Nanoparticles: A Challenge Suited to Bioorthogonal Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (5), 825–858. <https://doi.org/10.1021/bc200065z>.
- (44) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::aid-anie2004>3.3.co;2-x](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::aid-anie2004>3.3.co;2-x).
- (45) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. The Growing Applications of Click Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (8), 1249–1262. <https://doi.org/10.1039/B613014N>.
- (46) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 6974–6998. <https://doi.org/10.1002/anie.200900942>.

- (47) Lang, K.; Chin, J. W. Bioorthogonal Reactions for Labeling Proteins. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (1), 16–20. <https://doi.org/10.1021/cb4009292>.
- (48) Takayama, Y.; Kusamori, K.; Nishikawa, M. Click Chemistry as a Tool for Cell Engineering and Drug Delivery. *Molecules* **2019**, *24* (1), 172. <https://doi.org/10.3390/molecules24010172>.
- (49) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047. <https://doi.org/10.1021/ja044996f>.
- (50) Perillo, E.; Hervé-Aubert, K.; Allard-Vannier, E.; Falanga, A.; Galdiero, S.; Chourpa, I. Synthesis and in Vitro Evaluation of Fluorescent and Magnetic Nanoparticles Functionalized with a Cell Penetrating Peptide for Cancer Theranosis. *Journal of Colloid and Interface Science* **2017**, *499*, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.03.106>.
- (51) Wang, X.; Gobbo, P.; Suchy, M.; Workentin, M. S.; Hudson, R. H. E. Peptide-Decorated Gold Nanoparticles via Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition and Post Assembly Deprotection. *RSC Adv.* **2014**, *4* (81), 43087–43091. <https://doi.org/10.1039/C4RA07574A>.
- (52) Wang, C.; Tang, F.; Wang, X.; Li, L. Self-Assembly of Fluorescent Hybrid Core–Shell Nanoparticles and Their Application. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (24), 13653–13658. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b03440>.
- (53) Mailänder, V.; Landfester, K. Interaction of Nanoparticles with Cells. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (9), 2379–2400. <https://doi.org/10.1021/bm900266r>.
- (54) Wang, R.; Liu, J.; Liu, Y.; Zhong, R.; Yu, X.; Liu, Q.; Zhang, L.; Lv, C.; Mao, K.; Tang, P. The Cell Uptake Properties and Hyperthermia Performance of Zn_{0.5}Fe_{2.5}O₄/SiO₂ Nanoparticles as Magnetic Hyperthermia Agents. *R. Soc. open sci.* **2020**, *7* (1), 191139. <https://doi.org/10.1098/rsos.191139>.
- (55) Ma, X.; Wu, Y.; Jin, S.; Tian, Y.; Zhang, X.; Zhao, Y.; Yu, L.; Liang, X.-J. Gold Nanoparticles Induce Autophagosome Accumulation through Size-Dependent Nanoparticle Uptake and Lysosome Impairment. *ACS Nano* **2011**, *5* (11), 8629–8639. <https://doi.org/10.1021/nn202155y>.
- (56) Wang, T.; Bai, J.; Jiang, X.; Nienhaus, G. U. Cellular Uptake of Nanoparticles by Membrane Penetration: A Study Combining Confocal Microscopy with FTIR

- Spectroelectrochemistry. *ACS Nano* **2012**, *6* (2), 1251–1259. <https://doi.org/10.1021/nn203892h>.
- (57) Hinde, E.; Thammasiraphop, K.; Duong, H. T. T.; Yeow, J.; Karagoz, B.; Boyer, C.; Gooding, J. J.; Gaus, K. Pair Correlation Microscopy Reveals the Role of Nanoparticle Shape in Intracellular Transport and Site of Drug Release. *Nature Nanotech* **2017**, *12* (1), 81–89. <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.160>.
- (58) Van Lehn, R. C.; Atukorale, P. U.; Carney, R. P.; Yang, Y.-S.; Stellacci, F.; Irvine, D. J.; Alexander-Katz, A. Effect of Particle Diameter and Surface Composition on the Spontaneous Fusion of Monolayer-Protected Gold Nanoparticles with Lipid Bilayers. *Nano Lett.* **2013**, *13* (9), 4060–4067. <https://doi.org/10.1021/nl401365n>.
- (59) Kube, S.; Hersch, N.; Naumovska, E.; Gensch, T.; Hendriks, J.; Franzen, A.; Landvogt, L.; Siebrasse, J.-P.; Kubitscheck, U.; Hoffmann, B.; Merkel, R.; Csiszár, A. Fusogenic Liposomes as Nanocarriers for the Delivery of Intracellular Proteins. *Langmuir* **2017**, *33* (4), 1051–1059. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04304>.
- (60) Kim, B.; Pang, H.-B.; Kang, J.; Park, J.-H.; Ruoslahti, E.; Sailor, M. J. Immunogene Therapy with Fusogenic Nanoparticles Modulates Macrophage Response to *Staphylococcus Aureus*. *Nat Commun* **2018**, *9* (1), 1969. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04390-7>.
- (61) He, S.; Fan, W.; Wu, N.; Zhu, J.; Miao, Y.; Miao, X.; Li, F.; Zhang, X.; Gan, Y. Lipid-Based Liquid Crystalline Nanoparticles Facilitate Cytosolic Delivery of siRNA via Structural Transformation. *Nano Lett.* **2018**, *18* (4), 2411–2419. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b05430>.
- (62) Zu, Y.; Huang, S.; Liao, W.-C.; Lu, Y.; Wang, S. Gold Nanoparticles Enhanced Electroporation for Mammalian Cell Transfection. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2014**, *10* (6), 982–992. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1797>.
- (63) Raudzus, F.; Schöneborn, H.; Neumann, S.; Secret, E.; Michel, A.; Fresnais, J.; Brylski, O.; Ménager, C.; Siaugue, J.-M.; Heumann, R. Magnetic Spatiotemporal Control of SOS1 Coupled Nanoparticles for Guided Neurite Growth in Dopaminergic Single Cells. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 22452. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80253-w>.
- (64) Agarwal, R.; Singh, V.; Journey, P.; Shi, L.; Sreenivasan, S. V.; Roy, K. Mammalian Cells Preferentially Internalize Hydrogel Nanodiscs over Nanorods and Use Shape-Specific Uptake Mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110* (43), 17247–17252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305000110>.

- (65) Jiang, Y.; Huo, S.; Mizuhara, T.; Das, R.; Lee, Y.-W.; Hou, S.; Moyano, D. F.; Duncan, B.; Liang, X.-J.; Rotello, V. M. The Interplay of Size and Surface Functionality on the Cellular Uptake of Sub-10 Nm Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **2015**, *9* (10), 9986–9993. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03521>.
- (66) Jiang, W.; Kim, B. Y. S.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. W. Nanoparticle-Mediated Cellular Response Is Size-Dependent. *Nature Nanotech* **2008**, *3* (3), 145–150. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.30>.
- (67) Dasgupta, S.; Auth, T.; Gompper, G. Shape and Orientation Matter for the Cellular Uptake of Nonspherical Particles. *Nano Lett.* **2014**, *14* (2), 687–693. <https://doi.org/10.1021/nl403949h>.
- (68) Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential – What They Are and What They Are Not? *Journal of Controlled Release* **2016**, *235*, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- (69) Zhou, Y.; Shi, L.; Li, Q.; Jiang, H.; Lv, G.; Zhao, J.; Wu, C.; Selke, M.; Wang, X. Imaging and Inhibition of Multi-Drug Resistance in Cancer Cells via Specific Association with Negatively Charged CdTe Quantum Dots. *Biomaterials* **2010**, *31* (18), 4958–4963. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.053>.
- (70) Amoozgar, Z.; Yeo, Y. Recent Advances in Stealth Coating of Nanoparticle Drug Delivery Systems. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* **2012**, *4* (2), 219–233. <https://doi.org/10.1002/wnan.1157>.
- (71) Shi, L.; Zhang, J.; Zhao, M.; Tang, S.; Cheng, X.; Zhang, W.; Li, W.; Liu, X.; Peng, H.; Wang, Q. Effects of Polyethylene Glycol on the Surface of Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. *Nanoscale* **2021**, *13* (24), 10748–10764. <https://doi.org/10.1039/D1NR02065J>.
- (72) Suk, J. S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L. M. PEGylation as a Strategy for Improving Nanoparticle-Based Drug and Gene Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2016**, *99*, 28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>.
- (73) La-Beck, N. M.; Gabizon, A. A. Nanoparticle Interactions with the Immune System: Clinical Implications for Liposome-Based Cancer Chemotherapy. *Front. Immunol.* **2017**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00416>.
- (74) Bertrand, N.; Wu, J.; Xu, X.; Kamaly, N.; Farokhzad, O. C. Cancer Nanotechnology: The Impact of Passive and Active Targeting in the Era of Modern Cancer Biology.

- Advanced Drug Delivery Reviews* **2014**, *66*, 2–25.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009>.
- (75) Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* **2002**, *54* (5), 631–651. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00044-3](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00044-3).
- (76) Maeda, H. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Tumor Vasculature: The Key Role of Tumor-Selective Macromolecular Drug Targeting. *Advances in Enzyme Regulation* **2001**, *41* (1), 189–207. [https://doi.org/10.1016/S0065-2571\(00\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2571(00)00013-3).
- (77) Polo, E.; Collado, M.; Pelaz, B.; del Pino, P. Advances toward More Efficient Targeted Delivery of Nanoparticles *in Vivo*: Understanding Interactions between Nanoparticles and Cells. *ACS Nano* **2017**, *11* (3), 2397–2402. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b01197>.
- (78) Mirshafiee, V.; Kim, R.; Mahmoudi, M.; Kraft, M. L. The Importance of Selecting a Proper Biological Milieu for Protein Corona Analysis *in Vitro*: Human Plasma versus Human Serum. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2016**, *75*, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.11.019>.
- (79) Lazarovits, J.; Chen, Y. Y.; Song, F.; Ngo, W.; Tavares, A. J.; Zhang, Y.-N.; Audet, J.; Tang, B.; Lin, Q.; Tleugabulova, M. C.; Wilhelm, S.; Krieger, J. R.; Mallevaey, T.; Chan, W. C. W. Synthesis of Patient-Specific Nanomaterials. *Nano Lett.* **2019**, *19* (1), 116–123. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b03434>.
- (80) Cardoso, V. F.; Francesko, A.; Ribeiro, C.; Bañobre-López, M.; Martins, P.; Lanceros-Mendez, S. Advances in Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. *Adv. Healthcare Mater.* **2018**, *7* (5), 1700845. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700845>.
- (81) Anovernos, J. G.; Corey, D. P. Mechanosensation: Touch at the Molecular Level. *Curr. Biol.* **1996**, *6* (5), 541–543. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00537-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00537-7).
- (82) Huang, H.; Delikanli, S.; Zeng, H.; Ferkey, D. M.; Pralle, A. Remote Control of Ion Channels and Neurons through Magnetic-Field Heating of Nanoparticles. *Nature Nanotech* **2010**, *5* (8), 602–606. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.125>.
- (83) Monzel, C.; Vicario, C.; Piehler, J.; Coppey, M.; Dahan, M. Magnetic Control of Cellular Processes Using Biofunctional Nanoparticles. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (11), 7330–7338. <https://doi.org/10.1039/C7SC01462G>.

- (84) Bacri, J.-C.; Perzynski, R.; Salin, D.; Cabuil, V.; Massart, R. Magnetic Colloidal Properties of Ionic Ferrofluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1986**, *62* (1), 36–46. [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(86\)90731-6](https://doi.org/10.1016/0304-8853(86)90731-6).
- (85) Sharifi Dehsari, H.; Ksenofontov, V.; Möller, A.; Jakob, G.; Asadi, K. Determining Magnetite/Maghemite Composition and Core–Shell Nanostructure from Magnetization Curve for Iron Oxide Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122* (49), 28292–28301. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b06927>.
- (86) Bongaerts, M.; Aizel, K.; Secret, E.; Jan, A.; Nahar, T.; Raudzus, F.; Neumann, S.; Telling, N.; Heumann, R.; Siaugue, J.-M.; Ménager, C.; Fresnais, J.; Villard, C.; El Haj, A.; Piehler, J.; Gates, M. A.; Coppey, M. Parallelized Manipulation of Adherent Living Cells by Magnetic Nanoparticles-Mediated Forces. *IJMS* **2020**, *21* (18), 6560. <https://doi.org/10.3390/ijms21186560>.
- (87) Etoc, F.; Lisse, D.; Bellaiche, Y.; Piehler, J.; Coppey, M.; Dahan, M. Subcellular Control of Rac-GTPase Signalling by Magnetogenetic Manipulation inside Living Cells. *Nature Nanotech* **2013**, *8* (3), 193–198. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.23>.
- (88) Schöneborn, H.; Raudzus, F.; Secret, E.; Otten, N.; Michel, A.; Fresnais, J.; Ménager, C.; Siaugue, J.-M.; Zaehres, H.; Dietzel, I. D.; Heumann, R. Novel Tools towards Magnetic Guidance of Neurite Growth: (I) Guidance of Magnetic Nanoparticles into Neurite Extensions of Induced Human Neurons and In Vitro Functionalization with RAS Regulating Proteins. *JFB* **2019**, *10* (3), 32. <https://doi.org/10.3390/jfb10030032>.
- (89) 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.* **2007**, *129* (9), 2628–2635. <https://doi.org/10.1021/ja067457e>.
- (90) Rosensweig, R. E. Heating Magnetic Fluid with Alternating Magnetic Field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2002**, *252*, 370–374. [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(02\)00706-0](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(02)00706-0).
- (91) Colombo, M.; Carregal-Romero, S.; Casula, M. F.; Gutiérrez, L.; Morales, M. P.; Böhm, I. B.; Heverhagen, J. T.; Prospero, D.; Parak, Wolfgang. J. Biological Applications of Magnetic Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (11), 4306. <https://doi.org/10.1039/c2cs15337h>.
- (92) Hergt, R.; Dutz, S. Magnetic Particle Hyperthermia—Biophysical Limitations of a Visionary Tumour Therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, *311* (1), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.10.1156>.

- (93) Osaci, M.; Cacciola, M. Specific Loss Power in Superparamagnetic Hyperthermia: Nanofluid versus Composite. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* **2017**, *163*, 012008. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/163/1/012008>.
- (94) Sanchez, C.; El Hajj Diab, D.; Connord, V.; Clerc, P.; Meunier, E.; Pipy, B.; Payré, B.; Tan, R. P.; Gougeon, M.; Carrey, J.; Gigoux, V.; Fourmy, D. Targeting a G-Protein-Coupled Receptor Overexpressed in Endocrine Tumors by Magnetic Nanoparticles To Induce Cell Death. *ACS Nano* **2014**, *8* (2), 1350–1363. <https://doi.org/10.1021/nn404954s>.
- (95) 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* **2014**, *35* (24), 6400–6411. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.036>.
- (96) Connord, V.; Clerc, P.; Hallali, N.; El Hajj Diab, D.; Fourmy, D.; Gigoux, V.; Carrey, J. Real-Time Analysis of Magnetic Hyperthermia Experiments on Living Cells under a Confocal Microscope. *Small* **2015**, *11* (20), 2437–2445. <https://doi.org/10.1002/sml.201402669>.
- (97) Clerc, P.; Jeanjean, P.; Hallali, N.; Gougeon, M.; Pipy, B.; Carrey, J.; Fourmy, D.; Gigoux, V. Targeted Magnetic Intra-Lysosomal Hyperthermia Produces Lysosomal Reactive Oxygen Species and Causes Caspase-1 Dependent Cell Death. *Journal of Controlled Release* **2018**, *270*, 120–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.050>.
- (98) Umeda, N.; Ueno, T.; Pohlmeier, C.; Nagano, T.; Inoue, T. A Photocleavable Rapamycin Conjugate for Spatiotemporal Control of Small GTPase Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (1), 12–14. <https://doi.org/10.1021/ja108258d>.
- (99) Zhang, K.; Cui, B. Optogenetic Control of Intracellular Signaling Pathways. *Trends in Biotechnology* **2015**, *33* (2), 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.11.007>.
- (100) Hoffmann, C.; Mazari, E.; Lallet, S.; Le Borgne, R.; Marchi, V.; Gosse, C.; Gueroui, Z. Spatiotemporal Control of Microtubule Nucleation and Assembly Using Magnetic Nanoparticles. *Nature Nanotech* **2013**, *8* (3), 199–205. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.246>.
- (101) Hoffmann, C.; Mazari, E.; Gosse, C.; Bonnemay, L.; Hostachy, S.; Gautier, J.; Gueroui, Z. Magnetic Control of Protein Spatial Patterning to Direct Microtubule Self-Assembly. *ACS Nano* **2013**, *7* (11), 9647–9654. <https://doi.org/10.1021/nn4022873>.

- (102) Georgelin, T.; Bombard, S.; Siaugue, J.-M.; Cabuil, V. Nanoparticle-Mediated Delivery of Bleomycin. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (47), 8897–8901. <https://doi.org/10.1002/anie.201003316>.
- (103) Silva, A. H.; Lima, E.; Mansilla, M. V.; Zysler, R. D.; Troiani, H.; Piscioti, M. L. M.; Locatelli, C.; Benech, J. C.; Oddone, N.; Zoldan, V. C.; Winter, E.; Pasa, A. A.; Creczynski-Pasa, T. B. Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles MPEG350- and MPEG2000-Coated: Cell Uptake and Biocompatibility Evaluation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2016**, *12* (4), 909–919. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.12.371>.
- (104) Cristofolini, T.; Dalmina, M.; Sierra, J. A.; Silva, A. H.; Pasa, A. A.; Pittella, F.; Creczynski-Pasa, T. B. Multifunctional Hybrid Nanoparticles as Magnetic Delivery Systems for siRNA Targeting the HER2 Gene in Breast Cancer Cells. *Materials Science and Engineering: C* **2020**, *109*, 110555. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110555>.
- (105) Tai, W.; Mahato, R.; Cheng, K. The Role of HER2 in Cancer Therapy and Targeted Drug Delivery. *Journal of Controlled Release* **2010**, *146* (3), 264–275. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.04.009>.
- (106) Fischer, R.; Fotin-Mleczek, M.; Hufnagel, H.; Brock, R. Break on through to the Other Side-Biophysics and Cell Biology Shed Light on Cell-Penetrating Peptides. *ChemBioChem* **2005**, *6* (12), 2126–2142. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500044>.
- (107) Stanzl, E. G.; Trantow, B. M.; Vargas, J. R.; Wender, P. A. Fifteen Years of Cell-Penetrating, Guanidinium-Rich Molecular Transporters: Basic Science, Research Tools, and Clinical Applications. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46* (12), 2944–2954. <https://doi.org/10.1021/ar4000554>.
- (108) Futaki, S.; Nakase, I. Cell-Surface Interactions on Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides Allow for Multiplex Modes of Internalization. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (10), 2449–2456. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00221>.
- (109) Walrant, A.; Cardon, S.; Burlina, F.; Sagan, S. Membrane Crossing and Membranotropic Activity of Cell-Penetrating Peptides: *Dangerous Liaisons?* *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (12), 2968–2975. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00455>.

- (110) Guidotti, G.; Brambilla, L.; Rossi, D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends in Pharmacological Sciences* **2017**, *38* (4), 406–424. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.01.003>.
- (111) Vivès, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (25), 16010–16017. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.25.16010>.
- (112) Joliot, A.; Pernelle, C.; Deagostini-Bazin, H.; Prochiantz, A. Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, *88* (5), 1864–1868. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1864>.
- (113) Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. The Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological Membranes. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269* (14), 10444–10450. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)34080-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)34080-2).
- (114) Deshayes, S.; Konate, K.; Aldrian, G.; Crombez, L.; Heitz, F.; Divita, G. Structural Polymorphism of Non-Covalent Peptide-Based Delivery Systems: Highway to Cellular Uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2010**, *1798* (12), 2304–2314. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.06.005>.
- (115) Morris, M. C.; Deshayes, S.; Heitz, F.; Divita, G. Cell-Penetrating Peptides: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. *Biology of the Cell* **2008**, *100* (4), 201–217. <https://doi.org/10.1042/BC20070116>.
- (116) Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. Arginine-Rich Peptides. An Abundant Source of Membrane-Permeable Peptides Having Potential as Carriers for Intracellular Protein Delivery. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (8), 5836–5840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007540200>.
- (117) Wender, P. A.; Mitchell, D. J.; Pattabiraman, K.; Pelkey, E. T.; Steinman, L.; Rothbard, J. B. The Design, Synthesis, and Evaluation of Molecules That Enable or Enhance Cellular Uptake: Peptoid Molecular Transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97* (24), 13003–13008. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.24.13003>.
- (118) Delaroche, D.; Aussedat, B.; Aubry, S.; Chassaing, G.; Burlina, F.; Clodic, G.; Bolbach, G.; Lavielle, S.; Sagan, S. Tracking a New Cell-Penetrating (W/R) Nonapeptide,

- through an Enzyme-Stable Mass Spectrometry Reporter Tag. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (5), 1932–1938. <https://doi.org/10.1021/ac061108l>.
- (119) Hällbrink, M.; Florén, A.; Elmquist, A.; Pooga, M.; Bartfai, T.; Langel, Ü. Cargo Delivery Kinetics of Cell-Penetrating Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2001**, *1515* (2), 101–109. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00398-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00398-4).
- (120) Oehlke, J.; Scheller, A.; Wiesner, B.; Krause, E.; Beyermann, M.; Klauschenz, E.; Melzig, M.; Bienert, M. Cellular Uptake of an α -Helical Amphipathic Model Peptide with the Potential to Deliver Polar Compounds into the Cell Interior Non-Endocytically. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1998**, *1414* (1–2), 127–139. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(98\)00161-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00161-8).
- (121) Deshayes, S.; Heitz, A.; Morris, M. C.; Charnet, P.; Divita, G.; Heitz, F. Insight into the Mechanism of Internalization of the Cell-Penetrating Carrier Peptide Pep-1 through Conformational Analysis. *Biochemistry* **2004**, *43* (6), 1449–1457. <https://doi.org/10.1021/bi035682s>.
- (122) Gao, C.; Mao, S.; Ditzel, H. J.; Farnaes, L.; Wirsching, P.; Lerner, R. A.; Janda, K. D. A Cell-Penetrating Peptide from a Novel PVII–PIX Phage-Displayed Random Peptide Library. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, *10* (12), 4057–4065. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(02\)00340-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00340-1).
- (123) Rhee, M.; Davis, P. Mechanism of Uptake of C105Y, a Novel Cell-Penetrating Peptide. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281* (2), 1233–1240. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509813200>.
- (124) Mueller, J.; Kretzschmar, I.; Volkmer, R.; Boisguerin, P. Comparison of Cellular Uptake Using 22 CPPs in 4 Different Cell Lines. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (12), 2363–2374. <https://doi.org/10.1021/bc800194e>.
- (125) Illien, F.; Rodriguez, N.; Amoura, M.; Joliot, A.; Pallerla, M.; Cribier, S.; Burlina, F.; Sagan, S. Quantitative Fluorescence Spectroscopy and Flow Cytometry Analyses of Cell-Penetrating Peptides Internalization Pathways: Optimization, Pitfalls, Comparison with Mass Spectrometry Quantification. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 36938. <https://doi.org/10.1038/srep36938>.
- (126) Palm-Apergi, C.; Lönn, P.; Dowdy, S. F. Do Cell-Penetrating Peptides Actually “Penetrate” Cellular Membranes? *Molecular Therapy* **2012**, *20* (4), 695–697. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.40>.

- (127) Jiao, C.-Y.; Delaroche, D.; Burlina, F.; Alves, I. D.; Chassaing, G.; Sagan, S. Translocation and Endocytosis for Cell-Penetrating Peptide Internalization. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284* (49), 33957–33965. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.056309>.
- (128) Ziegler, A.; Seelig, J. Contributions of Glycosaminoglycan Binding and Clustering to the Biological Uptake of the Nonamphipathic Cell-Penetrating Peptide WR 9. *Biochemistry* **2011**, *50* (21), 4650–4664. <https://doi.org/10.1021/bi1019429>.
- (129) Bechara, C.; Pallerla, M.; Zaltsman, Y.; Burlina, F.; Alves, I. D.; Lequin, O.; Sagan, S. Tryptophan within Basic Peptide Sequences Triggers Glycosaminoglycan-dependent Endocytosis. *FASEB j.* **2013**, *27* (2), 738–749. <https://doi.org/10.1096/fj.12-216176>.
- (130) Walrant, A.; Bauzá, A.; Girardet, C.; Alves, I. D.; Lecomte, S.; Illien, F.; Cardon, S.; Chaianantakul, N.; Pallerla, M.; Burlina, F.; Frontera, A.; Sagan, S. Ionpair- π Interactions Favor Cell Penetration of Arginine/Tryptophan-Rich Cell-Penetrating Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2020**, *1862* (2), 183098. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183098>.
- (131) Rothbard, J. B.; Jessop, T. C.; Lewis, R. S.; Murray, B. A.; Wender, P. A. Role of Membrane Potential and Hydrogen Bonding in the Mechanism of Translocation of Guanidinium-Rich Peptides into Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (31), 9506–9507. <https://doi.org/10.1021/ja0482536>.
- (132) Mitchell, D. J.; Steinman, L.; Kim, D. T.; Fathman, C. G.; Rothbard, J. B. Polyarginine Enters Cells More Efficiently than Other Polycationic Homopolymers: Cellular Uptake of Polyarginine. *The Journal of Peptide Research* **2000**, *56* (5), 318–325. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2000.00723.x>.
- (133) Nakase, I.; Tadokoro, A.; Kawabata, N.; Takeuchi, T.; Katoh, H.; Hiramoto, K.; Negishi, M.; Nomizu, M.; Sugiura, Y.; Futaki, S. Interaction of Arginine-Rich Peptides with Membrane-Associated Proteoglycans Is Crucial for Induction of Actin Organization and Macropinocytosis †. *Biochemistry* **2007**, *46* (2), 492–501. <https://doi.org/10.1021/bi0612824>.
- (134) Sagan, S.; Burlina, F.; D. Alves, I.; Bechara, C.; Dupont, E.; Joliot, A. Homeoproteins and Homeoprotein-Derived Peptides: Going in and Out. *CPD* **2013**, *19* (16), 2851–2862. <https://doi.org/10.2174/1381612811319160002>.

- (135) Derossi, D.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. Trojan Peptides: The Penetratin System for Intracellular Delivery. *Trends in Cell Biology* **1998**, *8*, 84–87. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)80017-2](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)80017-2).
- (136) Jobin, M.-L.; Blanchet, M.; Henry, S.; Chaignepain, S.; Manigand, C.; Castano, S.; Lecomte, S.; Burlina, F.; Sagan, S.; Alves, I. D. The Role of Tryptophans on the Cellular Uptake and Membrane Interaction of Arginine-Rich Cell Penetrating Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2015**, *1848* (2), 593–602. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.11.013>.
- (137) Christiaens, B.; Grooten, J.; Reusens, M.; Joliot, A.; Goethals, M.; Vandekerckhove, J.; Prochiantz, A.; Rosseneu, M. Membrane Interaction and Cellular Internalization of Penetratin Peptides: Penetratin Interaction with Biological Membranes. *European Journal of Biochemistry* **2004**, *271* (6), 1187–1197. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04022.x>.
- (138) Rydberg, H. A.; Matson, M.; Åmand, H. L.; Esbjörner, E. K.; Nordén, B. Effects of Tryptophan Content and Backbone Spacing on the Uptake Efficiency of Cell-Penetrating Peptides. *Biochemistry* **2012**, *51* (27), 5531–5539. <https://doi.org/10.1021/bi300454k>.
- (139) Swiecicki, J.-M.; Di Pisa, M.; Burlina, F.; Lécorché, P.; Mansuy, C.; Chassaing, G.; Lavielle, S. Accumulation of Cell-Penetrating Peptides in Large Unilamellar Vesicles: A Straightforward Screening Assay for Investigating the Internalization Mechanism: Accumulation of Cell-Penetrating Peptides. *Biopolymers* **2015**, *104* (5), 533–543. <https://doi.org/10.1002/bip.22652>.
- (140) Bechara, C.; Sagan, S. Cell-Penetrating Peptides: 20 Years Later, Where Do We Stand? *FEBS Letters* **2013**, *587* (12), 1693–1702. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.031>.
- (141) Swiecicki, J.-M.; Di Pisa, M.; Lippi, F.; Chwetzoff, S.; Mansuy, C.; Trugnan, G.; Chassaing, G.; Lavielle, S.; Burlina, F. Unsaturated Acyl Chains Dramatically Enhanced Cellular Uptake by Direct Translocation of a Minimalist Oligo-Arginine Lipopeptide. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (78), 14656–14659. <https://doi.org/10.1039/C5CC06116D>.
- (142) Amoura, M.; Illien, F.; Joliot, A.; Guitot, K.; Offer, J.; Sagan, S.; Burlina, F. Head to Tail Cyclisation of Cell-Penetrating Peptides: Impact on GAG-Dependent Internalisation

- and Direct Translocation. *Chem. Commun.* **2019**, 55 (31), 4566–4569. <https://doi.org/10.1039/C9CC01265F>.
- (143) Nischan, N.; Herce, H. D.; Natale, F.; Bohlke, N.; Budisa, N.; Cardoso, M. C.; Hackenberger, C. P. R. Covalent Attachment of Cyclic TAT Peptides to GFP Results in Protein Delivery into Live Cells with Immediate Bioavailability. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54 (6), 1950–1953. <https://doi.org/10.1002/anie.201410006>.
- (144) Madani, F.; Lindberg, S.; Langel, Ü.; Futaki, S.; Gräslund, A. Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. *Journal of Biophysics* **2011**, 2011, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2011/414729>.
- (145) Jones, A. T. Macropinocytosis: Searching for an Endocytic Identity and Role in the Uptake of Cell Penetrating Peptides. *J Cellular Mol Med* **2007**, 11 (4), 670–684. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00062.x>.
- (146) Lee, Y.-J.; Johnson, G.; Peltier, G. C.; Pellois, J.-P. A HA2-Fusion Tag Limits the Endosomal Release of Its Protein Cargo despite Causing Endosomal Lysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2011**, 1810 (8), 752–758. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.05.013>.
- (147) Steinbach, J. M.; Seo, Y.-E.; Saltzman, W. M. Cell Penetrating Peptide-Modified Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles with Enhanced Cell Internalization. *Acta Biomaterialia* **2016**, 30, 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.029>.
- (148) Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, 92 (16), 7297–7301. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297>.
- (149) Patil, M. L.; Zhang, M.; Taratula, O.; Garbuzenko, O. B.; He, H.; Minko, T. Internally Cationic Polyamidoamine PAMAM-OH Dendrimers for siRNA Delivery: Effect of the Degree of Quaternization and Cancer Targeting. *Biomacromolecules* **2009**, 10 (2), 258–266. <https://doi.org/10.1021/bm8009973>.
- (150) López-Laguna, H.; Cubarsi, R.; Unzueta, U.; Mangues, R.; Vázquez, E.; Villaverde, A. Endosomal Escape of Protein Nanoparticles Engineered through Humanized Histidine-Rich Peptides. *Sci. China Mater.* **2020**, 63 (4), 644–653. <https://doi.org/10.1007/s40843-019-1231-y>.
- (151) Midoux, P.; Pichon, C.; Yaouanc, J.-J.; Jaffrès, P.-A. Chemical Vectors for Gene Delivery: A Current Review on Polymers, Peptides and Lipids Containing Histidine

- or Imidazole as Nucleic Acids Carriers: Histidine-Rich Nucleic Acids Carriers. *British Journal of Pharmacology* **2009**, *157* (2), 166–178. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00288.x>.
- (152) Smith, S. A.; Selby, L. I.; Johnston, A. P. R.; Such, G. K. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30* (2), 263–272. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00732>.
- (153) Vermeulen, L. M. P.; De Smedt, S. C.; Remaut, K.; Braeckmans, K. The Proton Sponge Hypothesis_ Fable or Fact? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2018**, *129*, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.034>.
- (154) Sun, P.; Huang, W.; Kang, L.; Jin, M.; Fan, B.; Jin, H.; Wang, Q.; Gao, Z. SiRNA-Loaded Poly(Histidine-Arginine)₆-Modified Chitosan Nanoparticle with Enhanced Cell-Penetrating and Endosomal Escape Capacities for Suppressing Breast Tumor Metastasis. *IJN* **2017**, *Volume 12*, 3221–3234. <https://doi.org/10.2147/IJN.S129436>.
- (155) Galliani, M.; Tremolanti, C.; Signore, G. Nanocarriers for Protein Delivery to the Cytosol: Assessing the Endosomal Escape of Poly(Lactide-Co-Glycolide)-Poly(Ethylene Imine) Nanoparticles. *Nanomaterials* **2019**, *9* (4), 652. <https://doi.org/10.3390/nano9040652>.
- (156) Melikov, K.; Chernomordik, L. V. Arginine-Rich Cell Penetrating Peptides: From Endosomal Uptake to Nuclear Delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62* (23), 2739–2749. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5293-y>.
- (157) Li, Y.; Hoskins, J. N.; Sreerama, S. G.; Grayson, S. M. MALDI–TOF Mass Spectral Characterization of Polymers Containing an Azide Group: Evidence of Metastable Ions. *Macromolecules* **2010**, *43* (14), 6225–6228. <https://doi.org/10.1021/ma100599n>.
- (158) Massart, R.; Dubois, E.; Cabuil, V.; Hasmonay, E. Preparation and Properties of Monodisperse Magnetic Fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1995**, *149* (1–2), 1–5. [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(95\)00316-9](https://doi.org/10.1016/0304-8853(95)00316-9).
- (159) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Journal of Colloid and Interface Science* **1968**, *26* (1), 62–69. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5).
- (160) Santra, S.; Tapeç, R.; Theodoropoulou, N.; Dobson, J.; Hebard, A.; Tan, W. Synthesis and Characterization of Silica-Coated Iron Oxide Nanoparticles in Microemulsion:

- The Effect of Nonionic Surfactants. *Langmuir* **2001**, *17* (10), 2900–2906. <https://doi.org/10.1021/la0008636>.
- (161) Imhof, A.; van Blaaderen, A.; Dhont, J. K. G. Shear Melting of Colloidal Crystals of Charged Spheres Studied with Rheology and Polarizing Microscopy. *Langmuir* **1994**, *10* (10), 3477–3484. <https://doi.org/10.1021/la00022a020>.
- (162) Castell, J. V.; Cervera, M.; Marco, R. A Convenient Micromethod for the Assay of Primary Amines and Proteins with Fluorescamine. A Reexamination of the Conditions of Reaction. *Analytical Biochemistry* **1979**, *99* (2), 379–391. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(79\)80022-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(79)80022-6).
- (163) 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. D: Appl. Phys.* **2014**, *47* (49), 495003. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/47/49/495003>.
- (164) Hervault, A.; Thanh, N. T. K. Magnetic Nanoparticle-Based Therapeutic Agents for Thermo-Chemotherapy Treatment of Cancer. *Nanoscale* **2014**, *6* (20), 11553–11573. <https://doi.org/10.1039/C4NR03482A>.
- (165) Richard, J. P.; Melikov, K.; Vives, E.; Ramos, C.; Verbeure, B.; Gait, M. J.; Chernomordik, L. V.; Lebleu, B. Cell-Penetrating Peptides. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (1), 585–590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209548200>.
- (166) Benesty, J.; Chen, J.; Huang, Y.; Cohen, I. Pearson Correlation Coefficient. In *Noise Reduction in Speech Processing*; Springer Topics in Signal Processing; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2009; Vol. 2, pp 1–4. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00296-0_5.
- (167) Adler, J.; Parmryd, I. Quantifying Colocalization by Correlation: The Pearson Correlation Coefficient Is Superior to the Mander's Overlap Coefficient. *Cytometry* **2010**, *77A* (8), 733–742. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20896>.
- (168) Busetto, S.; Trevisan, E.; Patriarca, P.; Menegazzi, R. A Single-Step, Sensitive Flow Cytofluorometric Assay for the Simultaneous Assessment of Membrane-Bound and Ingested *Candida Albicans* in Phagocytosing Neutrophils. *Cytometry* **2004**, *58A* (2), 201–206. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20014>.
- (169) Swiecicki, J.-M.; Thiebaut, F.; Di Pisa, M.; Gourdin -Bertin, S.; Tailhades, J.; Mansuy, C.; Burlina, F.; Chwetzoff, S.; Trugnan, G.; Chassaing, G.; Lavielle, S. How to Unveil Self-Quenched Fluorophores and Subsequently Map the Subcellular Distribution of

- Exogenous Peptides. *Scientific Reports* **2016**, *6* (1).
<https://doi.org/10.1038/srep20237>.
- (170) Robert, D.; Pamme, N.; Conjeaud, H.; Gazeau, F.; Iles, A.; Wilhelm, C. Cell Sorting by Endocytotic Capacity in a Microfluidic Magnetophoresis Device. *Lab Chip* **2011**, *11* (11), 1902. <https://doi.org/10.1039/c0lc00656d>.
- (171) Najjar, K.; Erazo-Oliveras, A.; Mosior, J. W.; Whitlock, M. J.; Rostane, I.; Cinclair, J. M.; Pellois, J.-P. Unlocking Endosomal Entrapment with Supercharged Arginine-Rich Peptides. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28* (12), 2932–2941. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00560>.
- (172) López-Laguna, H.; Cubarsi, R.; Unzueta, U.; Mangues, R.; Vázquez, E.; Villaverde, A. Endosomal Escape of Protein Nanoparticles Engineered through Humanized Histidine-Rich Peptides. **2019**, *63* (4), 10.
- (173) Selby, L. I.; Cortez-Jugo, C. M.; Such, G. K.; Johnston, A. P. R. Nanoescapology: Progress toward Understanding the Endosomal Escape of Polymeric Nanoparticles: Endosomal Escape of Polymeric Nanoparticles. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* **2017**, *9* (5), e1452. <https://doi.org/10.1002/wnan.1452>.
- (174) Hu, Y.; Litwin, T.; Nagaraja, A. R.; Kwong, B.; Katz, J.; Watson, N.; Irvine, D. J. Cytosolic Delivery of Membrane-Impermeable Molecules in Dendritic Cells Using PH-Responsive Core–Shell Nanoparticles. *Nano Lett.* **2007**, *7* (10), 3056–3064. <https://doi.org/10.1021/nl071542i>.
- (175) Galliani, M.; Tremolanti, C.; Signore, G. Nanocarriers for Protein Delivery to the Cytosol: Assessing the Endosomal Escape of Poly(Lactide-Co-Glycolide)-Poly(Ethylene Imine) Nanoparticles. *Nanomaterials* **2019**, *9* (4), 652. <https://doi.org/10.3390/nano9040652>.
- (176) Chen, J.; Li, J.; Zhou, J.; Lin, Z.; Cavalieri, F.; Czuba-Wojnilowicz, E.; Hu, Y.; Glab, A.; Ju, Y.; Richardson, J. J.; Caruso, F. Metal–Phenolic Coatings as a Platform to Trigger Endosomal Escape of Nanoparticles. *ACS Nano* **2019**, *13* (10), 11653–11664. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b05521>.
- (177) Jin, R.; Liu, L.; Zhu, W.; Li, D.; Yang, L.; Duan, J.; Cai, Z.; Nie, Y.; Zhang, Y.; Gong, Q.; Song, B.; Wen, L.; Anderson, J. M.; Ai, H. Iron Oxide Nanoparticles Promote Macrophage Autophagy and Inflammatory Response through Activation of Toll-like Receptor-4 Signaling. *Biomaterials* **2019**, *203*, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.02.026>.

- (178) Wang, J.; Li, Y.; Duan, J.; Yang, M.; Yu, Y.; Feng, L.; Yang, X.; Zhou, X.; Zhao, Z.; Sun, Z. Silica Nanoparticles Induce Autophagosome Accumulation via Activation of the EIF2AK3 and ATF6 UPR Pathways in Hepatocytes. *Autophagy* **2018**, *14* (7), 1185–1200. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1458174>.
- (179) Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magn.* **1981**, *17* (2), 1247–1248. <https://doi.org/10.1109/TMAG.1981.1061188>.