



HAL
open science

Nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de polymères zwitterioniques pour la micromanipulation de chromosomes dans le noyau de cellules vivantes

Fanny Delille

► To cite this version:

Fanny Delille. Nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de polymères zwitterioniques pour la micromanipulation de chromosomes dans le noyau de cellules vivantes. Matériaux. Université Paris sciences et lettres, 2022. Français. NNT : 2022UPSL042 . tel-04027909

HAL Id: tel-04027909

<https://pastel.hal.science/tel-04027909>

Submitted on 14 Mar 2023

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

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



THÈSE DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris, Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux

Nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de polymères zwitterioniques pour la micromanipulation de chromosomes dans le noyau de cellules vivantes

Soutenue par

Fanny Delille

Le 12 octobre 2022

École doctorale n°474

ED Frontières de l'Innovation en Recherche et Éducation

Spécialité

Chimie des matériaux

Composition du jury :

Sylvie BÉGIN-COLIN Professeure, Université de Strasbourg	<i>Présidente</i>
Christine MÉNAGER Professeure, Sorbonne Université	<i>Rapporteuse</i>
Andreas REISCH Maître de Conférences, Université de Strasbourg	<i>Rapporteur</i>
Laurence MOTTE Professeure, Université Sorbonne Paris Nord	<i>Examinatrice</i>
Thomas PONS Chargé de recherche, ESPCI Paris	<i>Directeur de thèse</i>
Nicolas LEQUEUX Professeur, ESPCI Paris	<i>Co-Directeur de thèse</i>

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury de cette thèse, Sylvie Bégin-Colin, Laurence Motte, Christine Ménager et Andreas Reisch pour l'attention qu'ils ont consacrée à l'étude de ma thèse, leur écoute et la discussion scientifique enrichissante qui a suivi ma présentation. Je suis reconnaissante envers les rapporteurs pour leurs retours constructifs sur mon manuscrit.

Ma plus profonde reconnaissance va à mes directeurs de thèse Thomas Pons et Nicolas Lequeux, qui m'ont suivie tout au long de ma thèse avec bienveillance, tout en apportant une bonne dose de bonne humeur au labo. Merci, j'ai eu une chance incroyable de travailler avec vous.

Je tiens à remercier Antoine Coulon qui m'a accueillie avec enthousiasme dans son laboratoire, m'a encadrée et fait confiance, ce qui m'a permis de réaliser les expériences les plus extraordinaires de ma thèse.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des collègues avec qui j'ai travaillé pendant ces trois ans. Sandrine, Alexandra et Céline, qui complètent l'équipe de permanents de Si2, merci d'apporter autant d'énergie, de rire et de recettes de cuisine à l'équipe. Merci aux anciennes doctorantes, Manon et Marion, pour leur accueil, on aurait aimé que vous restiez 3 ans de plus. Merci ensuite à Antoine, Mogha, Subha, Sheila, les grands frères/sœur, pour votre amitié et votre soutien tout au long de la thèse. Merci évidemment à Sophia, meilleure co-thésarde et partenaire de yoga. Sans oublier les plus jeunes qui ont contribué à la super ambiance dans le labo, Po, Yuzhou, Corentin, Mathias, Charlie, Lina, Ningyuan, et Nour et Henri les petits nouveaux. Un remerciement particulier pour Nicolas Kuszla, avec qui il a été très plaisant de travailler. Je remercie également les membres du labo d'Antoine pour leur aide et leur accueil chaleureux, Julia, Vittore, Kyra, Veer, Colin et Ilham.

Je tiens à remercier tous nos collaborateurs cités dans ce manuscrit sans qui ce travail n'aurait pas pu être accompli.

Je remercie Florence Gazeau et Clément Nizak, membres de mon comité de thèse, pour leur accompagnement pendant trois ans et leurs conseils avisés.

Je tiens à manifester ma gratitude à Sophie, Marie-Claude, Francis, Ricardo et Dimitri, sans qui le laboratoire ne pourrait pas fonctionner, et qui m'ont fourni les outils et les ressources dont j'avais besoin pour réaliser ce travail. Je remercie Camille Gaulon de l'école

doctorale FIRE pour son énergie pour nous proposer des cours et des accompagnements passionnants, ainsi que pour sa disponibilité, son écoute et ses encouragements.

Enfin je remercie mes amis et ma famille pour leur soutien tout au long de la thèse, et en particulier Florian.

Introduction générale

L'objectif de la thèse est de développer un outil pour micromanipuler un chromosome dans le noyau de cellules vivantes. Ce projet est né d'une collaboration entre l'équipe Synthèse et Imagerie des Sondes Inorganiques (SI²) du laboratoire Physique et Étude des Matériaux auquel j'appartiens et deux laboratoires à l'Institut Curie, le laboratoire Physico-Chimie Curie et le laboratoire Dynamique Spatio-temporelle des Fonctions Génomiques. Les laboratoires à l'Institut Curie s'intéressent à l'organisation du génome, c'est-à-dire l'ensemble de l'information génétique d'un organisme contenu dans chacune de ses cellules sous la forme de chromosomes, et la physique des chromosomes. En effet le génome est de plus en plus perçu comme un objet physique complexe, dont les propriétés physiques sont à prendre en compte notamment car elles ont une influence sur ses fonctions. Pour étudier les propriétés physiques du génome, il est proposé de développer un nouvel outil, qui va permettre d'appliquer une perturbation mécanique directement sur le génome et de manière contrôlée, pour pouvoir étudier la réponse du génome et ainsi mieux comprendre ses propriétés mécaniques.

L'outil proposé est une nanosonde magnétique accrochée à un chromosome sur une séquence précise de l'ADN. Une fois plongée dans un gradient de champ magnétique, la nanosonde est capable d'appliquer une force sur un chromosome et de le déplacer sur plusieurs microns.

Les nanosondes magnétiques sont des nanoparticules d'oxyde de fer. Un grand enjeu de la thèse est de contrôler leur chimie de surface. Il est tout d'abord nécessaire qu'elles soient stables dans le noyau de cellules vivantes, qui est un milieu complexe et encombré, mais aussi furtives, c'est-à-dire qu'elles n'interagissent pas avec les composants du noyau de manière non spécifique, et diffusent librement. Elles sont pour cela fonctionnalisées par des ligands copolymères à bloc, avec un bloc zwitterion sulfobobéaïne, polymère très hydrophile qui ne présente aucune affinité pour les biomolécules et permet d'éviter les interactions non spécifiques, et un bloc phosphonate qui permet un ancrage stable des ligands sur la nanoparticule. Le deuxième enjeu est de les accrocher sur un chromosome. Cette accroche se fait par l'intermédiaire de protéines conjuguées aux nanosondes, et qui seront capables de s'accrocher sur une séquence génomique spécifique. Enfin, il s'agit d'appliquer une force sur les nanosondes, grâce à une pointe magnétique, et de caractériser la force ainsi créée.

Manon Debayle, ancienne doctorante au laboratoire, avait étudié des polymères zwitterioniques à bloc, furtifs dans les noyaux des cellules, sur des nanocristaux de semi-

conducteur fluorescents. J'ai prolongé et adapté ses travaux à la stabilité dans le noyau des nanoparticules d'oxyde de fer, conçu des nanoparticules magnétiques capables de s'accrocher spécifiquement à une séquence *tetO*, et démontré leur capacité à micromanipuler cette séquence dans le noyau de cellules vivantes.

Ce travail sur la stabilité des nanoparticules en milieu biologique m'a amené à réfléchir à l'échelle supérieure, et à étudier la stabilité et le devenir de nanoparticules au niveau d'un organisme entier, une fois injectées dans la circulation sanguine.

Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres :

Le **Chapitre 1** : "Comment construire une nanosonde magnétique pour micromanipuler un chromosome ?" introduit tout d'abord le contexte biologique de l'étude. Il présente ensuite les nanoparticules d'oxyde de fer utilisées lors de la thèse, puis explique l'importance de la chimie de surface de la nanoparticule et dresse un état de l'art des différents polymères utilisables pour stabiliser des nanoparticules inorganiques.

Le **Chapitre 2** : "Des nanoparticules d'oxyde de fer avec des polymères zwitterioniques comme ligands de surface furtifs" décrit la préparation des nanosondes et leurs propriétés de stabilité colloïdale et de furtivité. Les synthèses des nanoparticules et de leurs ligands sont décrites, et une étude de la stabilité est réalisée.

Le **Chapitre 3** : "Les nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de zwitterions pour la micromanipulation magnétique d'un locus génomique" explique comment les nanoparticules sont accrochées sur l'ADN, et étudie ce ciblage. Le chromosome est ensuite manipulé avec une pointe magnétique et la calibration de la force est étudiée.

Le **Chapitre 4** : "Étude des interactions de nanoparticules recouvertes de zwitterions avec des macrophages" quitte la problématique du génome comme objet physique pour s'intéresser aux nanoparticules dans la circulation sanguine. Il est difficile pour des nanoparticules inorganiques de circuler longtemps dans le sang d'un être vivant sans être repérées et capturées par son système immunitaire. La capture de nanoparticules recouvertes de zwitterions par le système immunitaire est étudiée.

Table des matières

Introduction générale	iii
Liste des abréviations	ix
1 Comment construire une nanosonde magnétique pour micromanipuler un chromosome ?	1
1.1 Le génome, un objet physique complexe	2
1.1.1 L'organisation du génome dans le noyau des cellules	2
1.1.2 La transcription et la régulation des gènes	6
1.1.3 Les questions ouvertes	8
1.1.4 Les techniques existantes pour manipuler des chromosomes et leurs limitations	10
1.1.5 Élaboration d'une nouvelle méthode pour micromanipuler de la chromatine dans le noyau de cellules vivantes, en utilisant des nanoparticules magnétiques	11
1.2 Les nanoparticules d'oxyde de fer	13
1.2.1 Présentation des nanoparticules d'oxyde de fer	13
1.2.2 Propriétés des nanoparticules d'oxyde de fer	14
1.2.3 Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer	18
1.2.4 Applications des nanoparticules d'oxyde de fer	20
1.3 L'importance du contrôle de la chimie de surface des nanoparticules	27
1.3.1 Le rôle des ligands dans la stabilité colloïdale des nanoparticules d'oxyde de fer	27
1.3.2 Le rôle des ligands pour contrôler la couronne de protéines	27
1.3.3 Différentes stratégies pour obtenir les ligands de surface désirés	29
1.3.4 La fonction d'accroche	30
1.3.5 La fonction de solubilisation	32
1.3.6 Utilisation des ligands pour le ciblage des nanoparticules	35
1.4 Conclusion du chapitre - enjeux de la thèse	36
2 Des nanoparticules d'oxyde de fer avec des polymères zwitterioniques comme ligands de surface furtifs	39

2.1	Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer	40
2.1.1	Protocole de synthèse	40
2.1.2	Mesure de la taille des nanoparticules	43
2.1.3	Mesure du coefficient d'extinction molaire des nanoparticules	46
2.1.4	Détermination de la phase cristallographique synthétisée	48
2.1.5	Mesure de la magnétisation à saturation des nanocristaux	49
2.2	Synthèse des polymères zwitterioniques	51
2.2.1	Synthèse du premier bloc, le bloc poly(sulfobétaïne)	53
2.2.2	Synthèse du deuxième bloc, le bloc poly(phosphonate)	58
2.2.3	L'ajout d'une fonction réactive sur le polymère	60
2.3	Échange de ligands	64
2.3.1	Décapage de la surface des nanoparticules pour retirer les ligands acides oléiques et rendre les nanoparticules solubles dans l'eau	64
2.3.2	Ajout des polymères zwitterioniques P(SPE-bMAPC1) pour recouvrir la surface des nanoparticules	65
2.3.3	Mesure du diamètre hydrodynamique des nanoparticules avec ligands	67
2.3.4	Mesure de la densité de greffage des polymères sur les nanoparticules	68
2.4	Étude de la stabilité colloïdale et des interactions non spécifiques	73
2.4.1	Stabilité colloïdale	73
2.4.2	Interactions non spécifiques	75
3	Les nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de zwitterions pour la micromanipulation magnétique d'un locus génomique	85
3.1	Comment accrocher des nanoparticules magnétiques sur une séquence de l'ADN ?	86
3.1.1	L'accroche est médiée par un facteur de transcription	86
3.1.2	Accroche d'une protéine sur les nanoparticules : la GFP	89
3.1.3	Accroche de fluorophores sur les nanoparticules d'oxyde de fer	92
3.2	Ciblage d'un locus génomique par les nanoparticules magnétiques	96
3.2.1	Microinjection et colocalisation	96
3.2.2	Accumulation	98
3.2.3	Compter les nanoparticules par locus	99
3.3	Manipulation magnétique	100
3.3.1	Présentation du dispositif de manipulation magnétique	101
3.3.2	Déplacement du locus génomique	102
3.3.3	Calibration de la force appliquée sur le locus	108
3.3.4	Conclusion et perspectives	115
4	Étude des interactions de nanoparticules recouvertes de zwitterions avec des macrophages	117

4.1	Introduction : Le défi du temps de circulation des nanoparticules dans le sang <i>in vivo</i>	118
4.1.1	État de l’art	118
4.1.2	Les polymères zwitterioniques, de bons candidats pour améliorer le temps de circulation	121
4.2	Suivi de la circulation et la biodistribution de nanoparticules d’oxyde de fer chez des souris par IRM	122
4.2.1	Analyses des propriétés RMN des nanoparticules	122
4.2.2	Suivi des nanoparticules par IRM après injection	125
4.2.3	Perspectives	130
4.3	Études du comportement des nanoparticules <i>in vitro</i>	130
4.3.1	Présentation des deux types de nanoparticules utilisées, les nanoparticules d’oxyde de fer et les quantum dots	130
4.3.2	Étude <i>in vitro</i> avec des composants du sang	131
4.3.3	Études des interactions entre nanoparticules et cellules	134
4.3.4	Conclusions et perspectives sur ce projet	146
	Conclusion générale et perspectives	149
	Liste des publications, communications et posters	153
	Annexes	155
	Bibliographie	169

Liste des abréviations

- ϵ coefficient d'absorption molaire
- 3C** capture de la conformation des chromosomes
- ADN** acide désoxyribonucléique
- AIBN** azobisisobutyronitrile, initiateur de radicaux
- ARN** acide ribonucléique
- BSA** albumine de sérum bovin
- CADB** 4-cyanopentanoïque dithiobenzoate
- CRP** protéine C réactive
- Cy5** Cyanine 5
- DBCO** dibenzylcyclooctyne
- DLS** diffusion dynamique de la lumière
- DMF** N,N-diméthylformamide
- DMSO** Diméthylsulfoxyde
- EDC** 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
- FCS** spectroscopie de corrélation de fluorescence
- FP647** Fluorophore Fluoprobe qui absorbe à 647 nm et émet à 675 nm
- FRET** transfert d'énergie par résonance de Förster
- GFP** Protéine fluorescente verte
- GPC** chromatographie de perméation sur gel
- HEPES** acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
- ICP-AES** spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif
- IONP** nanoparticules d'oxyde de fer
- IRM** imagerie par résonance magnétique nucléaire
- MAPC1** (methacryloyloxy)methyl acide phosphonique
- MES** acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique
- MNP** Nanoparticules magnétiques
- N₃ stat** Polymère sulfobétaïne bloc phosphonate, avec des fonctions azotures réparties de manière statistique sur la chaîne de sulfobétaïne
- N₃ term** Polymère sulfobétaïne bloc phosphonate, avec une fonction azoture à l'extrémité de la chaîne de sulfobétaïne
- NH₂ stat** Polymère sulfobétaïne bloc phosphonate, avec des fonctions amines primaires réparties de manière statistique sur la chaîne de sulfobétaïne

NHS N-Hydroxysuccinimide
NOBF₄ nitrosonium tetrafluoroborate
NR nanobâtonnet
ophen orthophénanthroline
P(SPE) polymère sulfobétaïne synthétisé avec le monomère méthacrylate
P(SPE-b-MAPC1) Copolymère à bloc, avec un bloc polysulfobétaïne et un bloc phosphonate
P(SPP) polymère sulfobétaïne synthétisé avec le monomère méthacrylamide
PEG polyéthylène glycol
QD Quantum dot
RAFT Polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation
SPE 2-(N-3-Sulfopropyl-N,N-dimethyl ammonium)ethyl methacrylate, méthacrylate sulbétaïne
SPP 2-(N-3-Sulfopropyl-N,N-dimethyl ammonium)ethyl methacrylamide, méthacrylamide sulbétaïne
TAD domaine topologique associé
TEM microscope électronique en transmission
V50 2,2-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride, initiateur de radicaux

Chapitre 1

Comment construire une nanosonde magnétique pour micromanipuler un chromosome ?

Sommaire

1.1	Le génome, un objet physique complexe	2
1.1.1	L'organisation du génome dans le noyau des cellules	2
1.1.2	La transcription et la régulation des gènes	6
1.1.3	Les questions ouvertes	8
1.1.4	Les techniques existantes pour manipuler des chromosomes et leurs limitations	10
1.1.5	Élaboration d'une nouvelle méthode pour micromanipuler de la chromatine dans le noyau de cellules vivantes, en utilisant des nanoparticules magnétiques	11
1.2	Les nanoparticules d'oxyde de fer	13
1.2.1	Présentation des nanoparticules d'oxyde de fer	13
1.2.2	Propriétés des nanoparticules d'oxyde de fer	14
1.2.3	Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer	18
1.2.4	Applications des nanoparticules d'oxyde de fer	20
1.3	L'importance du contrôle de la chimie de surface des nanoparticules	27
1.3.1	Le rôle des ligands dans la stabilité colloïdale des nanoparticules d'oxyde de fer	27
1.3.2	Le rôle des ligands pour contrôler la couronne de protéines	27
1.3.3	Différentes stratégies pour obtenir les ligands de surface désirés	29
1.3.4	La fonction d'accroche	30
1.3.5	La fonction de solubilisation	32
1.3.6	Utilisation des ligands pour le ciblage des nanoparticules	35
1.4	Conclusion du chapitre - enjeux de la thèse	36

Ce chapitre commence par introduire le génome comme un objet physique complexe, puis présente les nanoparticules d'oxyde de fer qui seront utilisées comme nanosondes pour étudier la physique du génome, et enfin décrit la chimie de surface des nanoparticules, qui doit être bien contrôlée pour construire des nanosondes stables et furtives.

1.1 Le génome, un objet physique complexe

1.1.1 L'organisation du génome dans le noyau des cellules

On appelle le génome l'ensemble de l'information génétique d'un organisme. Elle est stockée dans une macromolécule appelée acide désoxyribonucléique (ADN), présente dans tous les êtres vivants, et stockée dans un noyau chez les organismes eucaryotes.

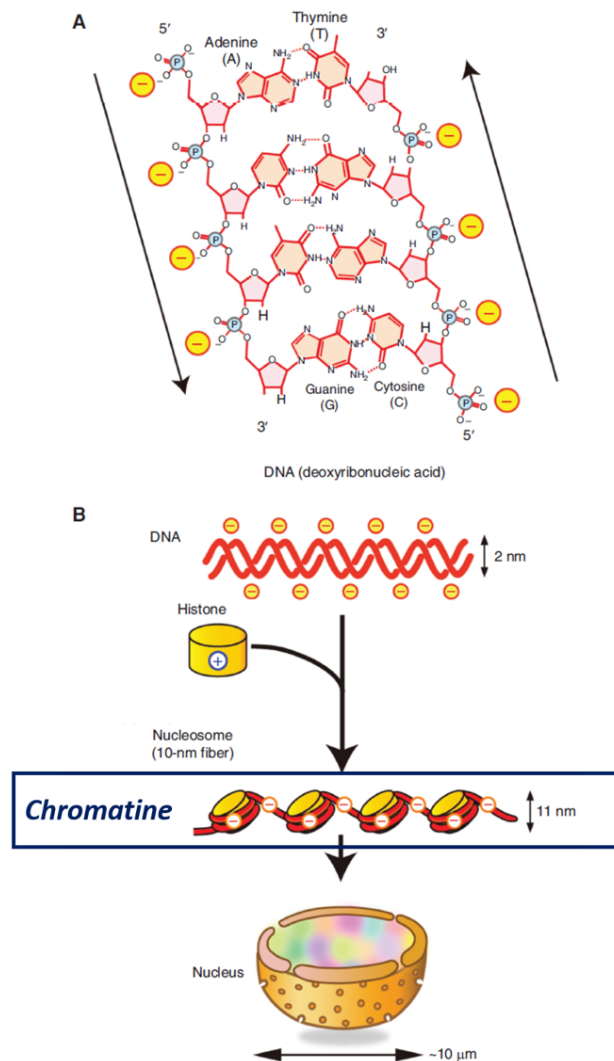


FIGURE 1.1 – A : Composition chimique de la macromolécule d'ADN, chargée négativement. B : La molécule d'ADN s'enroule autour de protéines chargées positivement - les histones - pour former des nucléosomes, qui ont un diamètre de 11 nm. C'est ce qu'on appelle la chromatine. Elle doit ensuite s'organiser pour rentrer dans un petit noyau, d'environ 10 μm de diamètre. D'après [1].

C'est un polymère double brin en forme de double hélice composé de quatre bases azotées, l'adénine, A, la thymine, T, la guanine, G, et la cytosine, C. Les bases se lient entre elles par des liaisons hydrogène et forment des paires, l'adénine avec la thymine et la guanine avec la cytosine. Les bases d'un brin sont liées par une liaison covalente entre un ose, le désoxyribose, et un groupe phosphate, chargé négativement. Cette structure est présentée Figure 1.1A. Le double brin d'ADN est fin, 2 nm de large, mais très long : il y a environ 2 m d'ADN dans un noyau. Le noyau d'une cellule humaine fait environ 10 μm de diamètre, l'ADN doit donc être compacté et organisé pour pouvoir rentrer dans ce petit espace (Figure 1.1B). Cette compaction doit se faire tout en conservant les fonctions du génome : par exemple la réplication, qui consiste à dédoubler l'ADN d'une cellule en vue de sa division, et la transcription, qui est la lecture des gènes de l'ADN en vue de leur expression.

On sait depuis les années 1970 que le brin d'ADN s'enroule autour de protéines, les histones, comme représenté Figure 1.1B, chez les eucaryotes. Ils s'associent en un octamère formé de quatre paires d'histones, les histones H2A, H2B, H3, et H4. Chaque histone possède une "queue" d'acides aminés non repliés qui sortent vers l'extérieur de l'octamère, représentée Figure 1.2. Ces acides aminés peuvent être modifiés chimiquement par méthylation ou acétylation. Le complexe formé d'un segment d'ADN entouré autour des histones s'appelle le nucléosome. Les queues des histones jouent un rôle dans les interactions avec les autres nucléosomes, qui peuvent alors être plus ou moins compactés. Les nucléosomes forment une structure de collier de perles sur la molécule d'ADN. On appelle cette structure la chromatine.

L'enroulement de l'ADN autour des histones permet de le compacter 5 fois, passant d'une longueur de 2 m à 40 cm. Les 40 cm de chromatine sont ensuite rangés dans un noyau de seulement 10 μm de diamètre, il existe donc d'autres mécanismes de compaction.

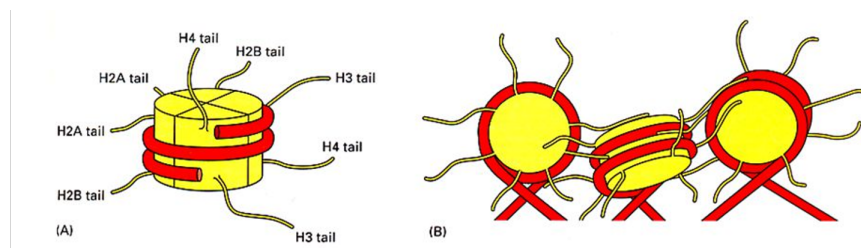


FIGURE 1.2 – A : octamère d'histones avec leurs queues, B : nucléosomes. D'après [2]

Ces connaissances permettent de construire un schéma comme celui de la Figure 1.3a, régulièrement trouvé dans les manuels. Ce schéma manque de précision sur la manière dont la chromatine est compactée en chromosome, et surtout est représentative de l'état du génome uniquement à un moment précis du cycle cellulaire, la division cellulaire ou mitose (Figure 1.3b). Pendant les autres moments du cycle cellulaire, qui représentent plus de 90% du temps, la chromatine n'est pas repliée en chromosomes.

Des progrès récents ont été faits dans la connaissance de l'organisation du génome hors de la division cellulaire, grâce au développement de nouvelles techniques, en biochimie,

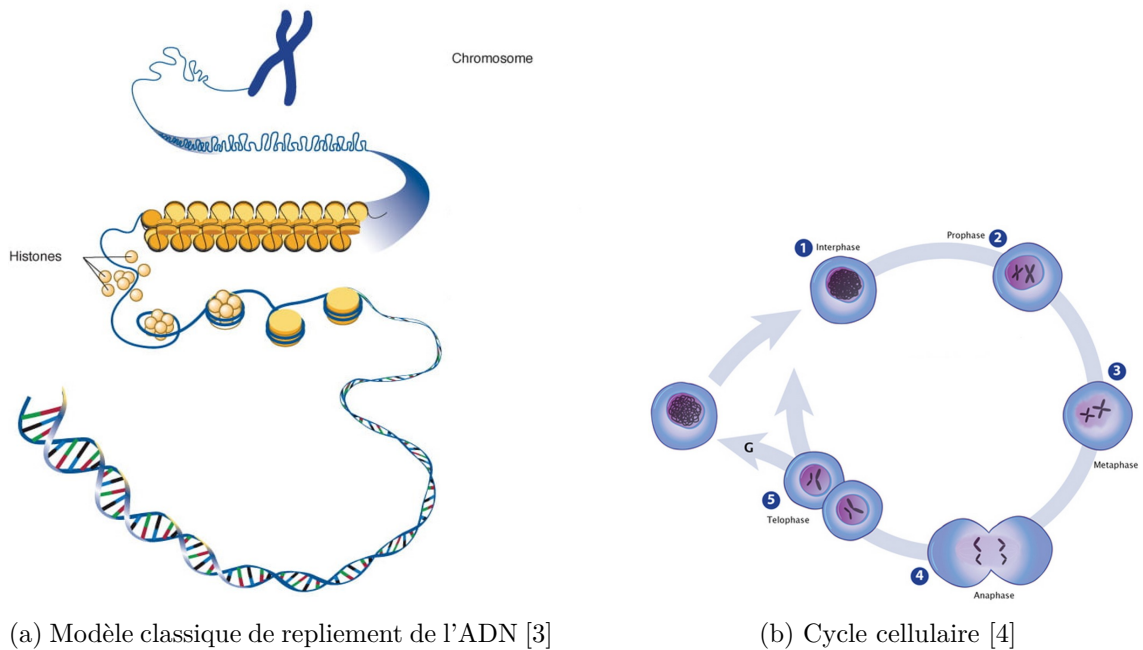


FIGURE 1.3 – Les chromosomes sont un état temporaire de compaction de la chromatine.

biophysique, imagerie et modélisation [5]. Une technique qui a été particulièrement utile est la capture de la conformation des chromosomes (3C) qui quantifie la fréquence à laquelle deux fragments d'ADN sont proches dans l'espace. Il apparaît que des régions de l'ADN éloignées sur l'ADN linéaire peuvent en réalité être proches spatialement. Ces découvertes ont permis de mettre en évidence différentes structures dans le noyau. La Figure 1.4 résume les connaissances sur l'organisation du génome eucaryote.

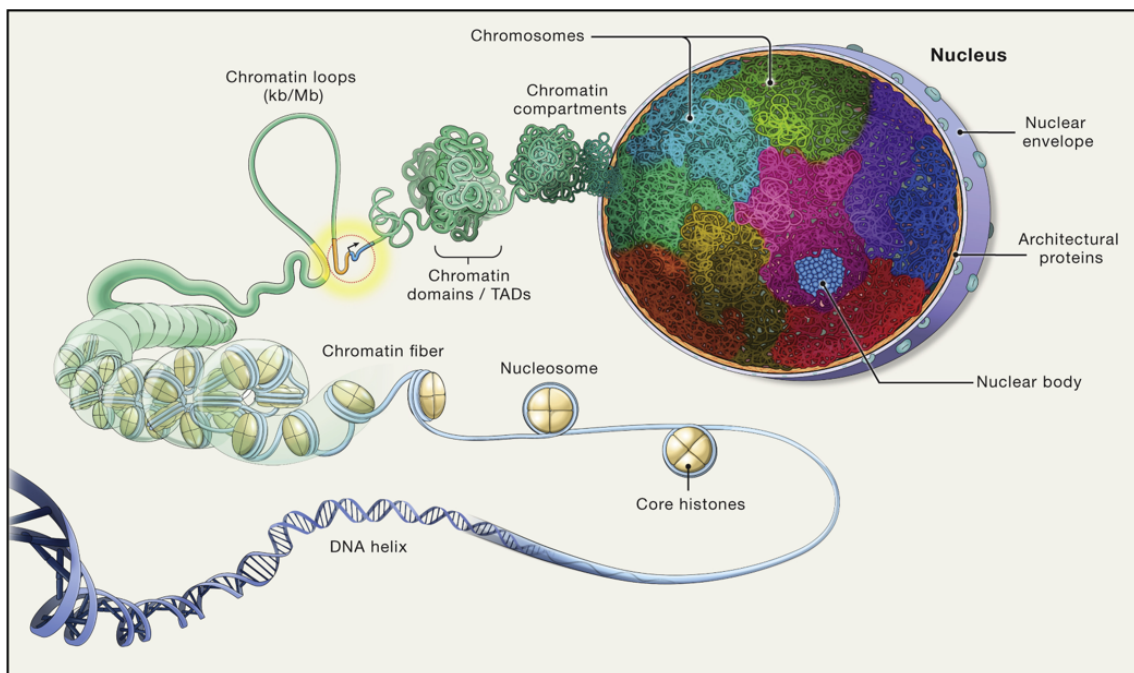


FIGURE 1.4 – Organisation du génome eucaryote, issu de [5].

L'ADN s'enroule autour d'histones pour former des nucléosomes et la chromatine, comme vu précédemment. La chromatine forme ensuite des boucles de manière dynamique. Des moteurs moléculaires, comme la cohésine ou la condensine, se lient à la chromatine et extrudent une boucle de chromatine à travers l'anneau formé par le complexe de cohésine. Ce processus de formation de boucle continue jusqu'à ce que le complexe de cohésine rencontre une protéine accrochée sur la chromatine, la protéine CTCF. Cette protéine agit comme un stop et bloque le processus d'extrusion de la boucle. Elle possède un sens : dans un sens elle bloque l'extrusion, dans l'autre sens elle peut passer dans la boucle et l'extrusion continue. L'extrusion d'une boucle s'arrête donc une fois que le complexe de condensine a rencontré deux protéines CTCF de sens opposé, une sur chaque brin, comme illustré Figure 1.5. Les boucles font de dix à plusieurs centaines de kilos de paires de bases [5]. Ce processus est dynamique, les moteurs forment des boucles en permanence [6].

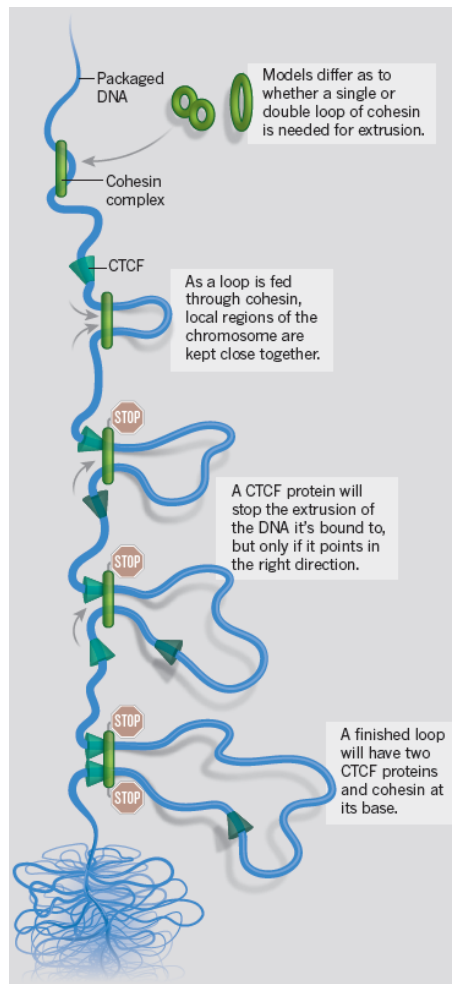


FIGURE 1.5 – Mécanisme de l'extrusion de boucle, issu de [7].

Le niveau supérieur d'organisation est les domaines topologiques associés (topologically associating domains, TAD). Ce sont des régions du génome qui préfèrent interagir entre elles plutôt qu'avec les autres régions environnantes. Elles font plusieurs centaines de kilobases de long et sont formées de boucles. Les barrières sont définies par deux protéines

CTCF de sens opposé.

Ensuite sont formés les compartiments de chromatine. On distingue deux types de compartiments : les compartiments A, qui correspondent à de l'euchromatine, c'est-à-dire de la chromatine sous forme active, qui contient des gènes exprimés, et des compartiments B, qui correspondent à l'hétérochromatine, chromatine plus condensée où les gènes ne sont pas exprimés.

Au niveau supérieur, les TAD issus de différents chromosomes se mélangent peu, et restent dans le territoire de leurs chromosomes. Les territoires sont visibles en microscopie en marquant différemment chaque chromosome (Figure 1.6). Leur emplacement dans le noyau est organisé : les régions actives sont plus fréquemment présentes au centre, les régions inactives sont situées à la périphérie du noyau, et sont parfois ancrées à la paroi nucléaire par un réseau de filaments protéiques appelés lamines nucléaires.

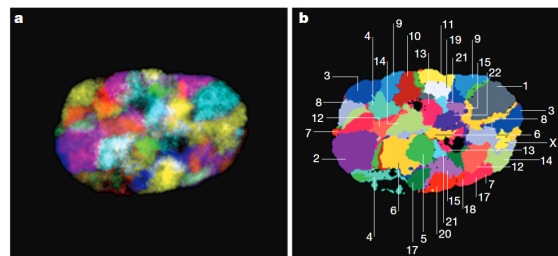


FIGURE 1.6 – A) Image par microscopie de fluorescence de 24 chromosomes, chacun d'une couleur différente. B) Identification des chromosomes [8, 9].

Après avoir décrit la structure de la chromatine, nous allons désormais nous intéresser à ses fonctions, et en particulier la transcription et la régulation des gènes.

1.1.2 La transcription et la régulation des gènes

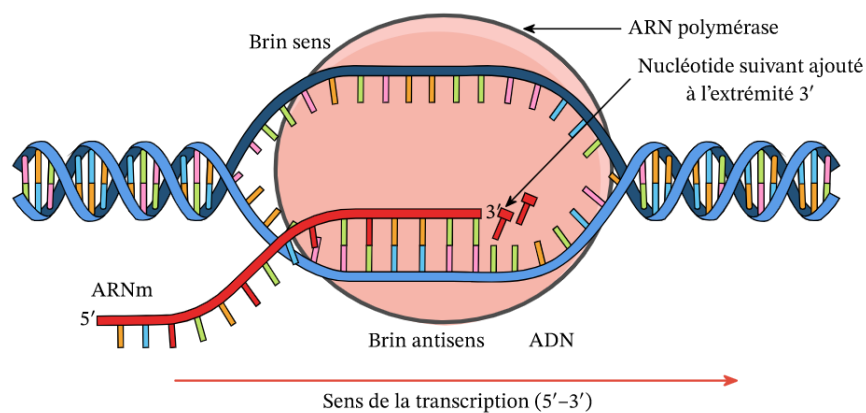


FIGURE 1.7 – Schéma de la transcription de l'ADN en ARN par la protéine ARN polymérase II.

Un gène est exprimé quand l'information génétique qu'il contient est lue et que cette lecture aboutit à la formation d'une protéine active. Le génome humain contient environ 20 000 gènes [10], qui ne sont pas tous exprimés en même temps. C'est ce qui explique que des cellules avec la même information génétique puissent avoir des fonctions très différentes. La régulation de l'expression des gènes a lieu en majorité au niveau de leur transcription. La transcription est le processus au cours duquel l'ADN est lu pour produire une molécule, l'ARN, qui servira de modèle pour la production d'une protéine. Le double brin d'ADN est ouvert et une protéine, l'ARN polymérase II, lit le code de paires de bases et le copie en une molécule d'acide ribonucléique (ARN) (Figure 1.7). La transcription d'un gène commence au niveau de son promoteur, une séquence de l'ADN situé avant le gène. La polymérase II se fixe sur le promoteur avec des protéines appelées facteurs de transcription.

Avant la transcription, il y a une étape de remodelage de la chromatine. En effet, en absence de transcription, la chromatine est compactée, et cela empêche l'accès de l'ARN polymérase II et des facteurs de transcription à l'ADN. Il y a deux mécanismes pour la décondenser. Le premier est la modification des queues d'histones (Figure 1.8). Les chaînes d'acides aminés qui forment les queues vont subir des modifications chimiques au niveau d'une amine primaire ou d'un acide carboxylique des acides aminés. Ce sont des acétylations, méthylations ou phosphorylations qui vont modifier les affinités entre histones. L'acétylation cache une fonction amine primaire positivement chargée qui permet l'interaction entre l'histone et l'ADN chargé négativement, elle a donc pour effet d'ouvrir la chromatine. La méthylation peut condenser ou décondenser la chromatine selon l'acide aminé sur laquelle elle est placée [11]. Tous les effets de ces modifications, appelées marques d'histones, ne sont pas encore compris.

Le second mécanisme pour décondenser la chromatine met en jeu des protéines qui consomment de l'énergie sous forme d'ATP pour déplacer, éjecter ou restructurer les nucléosomes, et qui permettent donc de laisser l'accès à l'ADN pour la transcription [13].

D'autres séquences de l'ADN, situées plus loin sur l'ADN, jouent aussi un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. Ces séquences sont appelées amplificateurs (enhancers en anglais). Lorsqu'ils sont liés à des facteurs de transcription, ils peuvent avoir un effet sur l'expression du gène, même s'il est situé jusqu'à 1 million de paires de bases de distance [14]. Cet effet est lié à une proximité spatiale : il y a une interaction entre l'amplificateur et le promoteur. Les facteurs de transcription liés à l'amplificateur peuvent alors interagir avec le promoteur et la polymérase et augmenter la transcription [15]. Cette interaction peut être décrite par la Figure 1.9. Le promoteur du gène B interagit avec son amplificateur lorsque la chromatine forme une boucle. La formation de boucles et de TAD joue donc un rôle important dans les interactions amplificateur - promoteur. La probabilité de contact entre un amplificateur et un promoteur diminue drastiquement si l'amplificateur ne se trouve pas dans le TAD du promoteur [16]. La véritable nature de l'interaction amplificateur - promoteur est toujours un sujet de recherche actif.

Il apparaît donc que les questions d'organisation du génome en 3D, et même 4D si

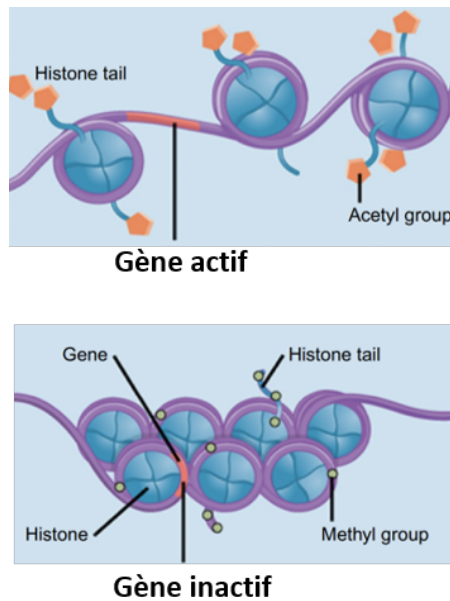


FIGURE 1.8 – Haut : L’acétylation des queues d’histones décondense la chromatine, l’ADN est accessible et le gène est actif. Bas : La méthylation des queues d’histones entraîne la condensation de la chromatine, le gène est inactif . D’après [12].

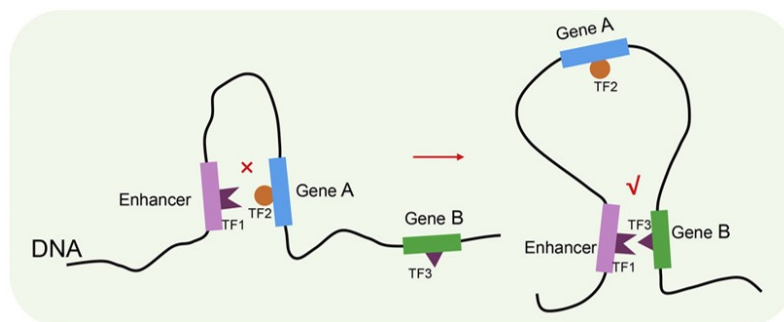


FIGURE 1.9 – Schéma de l’interaction entre un promoteur et un amplificateur, issu de [17].

l’on prend en compte la dimension temporelle, sont liées à celle de la régulation de la transcription.

1.1.3 Les questions ouvertes

De nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension de l’organisation du génome en 3D, comme la découverte du processus d’extrusion de boucle de chromatine, mais de nombreuses questions subsistent. La plus importante, qui n’est pour l’instant que partiellement comprise, concerne le lien entre la structure du génome et ses fonctions, par exemple la transcription [18, 5, 19].

Sur la Figure 1.10 l’organisation de la chromatine inactive (hétérochromatine, en noir) par rapport à la chromatine active (euchromatine, en gris clair) dans le noyau de la cellule est visible. L’hétérochromatine est localisée à des endroits précis de la cellule. Il y a donc un lien entre la disposition spatiale des gènes dans le noyau et leur activation. La nature de ce

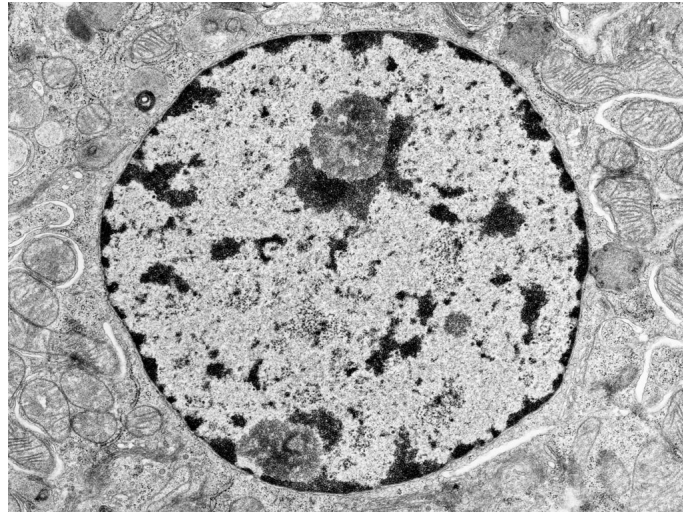


FIGURE 1.10 – Image du noyau d’une cellule au microscope électronique à transmission. La chromatine active (euchromatine) apparaît en gris clair, et la chromatine inactive (hétérochromatine) apparaît en noir [20].

lien est encore méconnue : est-ce que l’organisation du génome influence la transcription, ou est-ce qu’elle en est la conséquence [21] ? La ségrégation spatiale est-elle nécessaire à l’activation des gènes des compartiments A et répression de ceux du compartiment B ? Les compartiments sont-ils un résultat du niveau de transcription et des marques d’histones, ou sont-ils ce qui permet la transcription et la modification des histones ? Est-ce que les compartiments permettent d’avoir un effet mémoire de l’état de transcription de la cellule, ou est-ce qu’ils sont un moteur de changement dans le fonctionnement cellulaire [18] ?

Le rôle exact du TAD dans la transcription est aussi en cours d’investigation. Si des études montrent que sans TAD de nouvelles interactions non voulues entre promoteurs et amplificateurs apparaissent [22], d’autres montrent que la délétion des bordures du TAD ne gêne pas l’expression des gènes dans le développement [23, 15].

Il y a d’autres questions ouvertes dans le domaine dont la résolution pourra permettre de mieux comprendre l’influence de l’organisation du génome : les mécanismes de formation de cette organisation restent flous, et la nature physique de la chromatine est méconnue. La chromatine peut être modélisée comme un polymère, mais ses propriétés exactes sont encore à découvrir. Par exemple, est-ce que les différentes interactions entre séquences d’ADN peuvent conduire à une faible gélification de la chromatine ? [18]. Mieux connaître les propriétés physiques de la chromatine permettrait de mieux comprendre son mouvement et les mécanismes de formation des boucles, domaines, compartiments et territoires.

Au niveau biochimique, le rôle de moteurs moléculaires comme la cohésine et la condensine a été exposé, mais d’autres protéines doivent encore être identifiées pour complètement comprendre la formation de l’organisation du génome. À l’échelle supérieure, l’idée que la formation de régions dans la chromatine serait liée à un mécanisme de séparation de phases entre régions possédant des populations de protéines aux propriétés distinctes est

débatte [24].

De nouvelles techniques expérimentales sont nécessaires pour répondre à ces questions.

1.1.4 Les techniques existantes pour manipuler des chromosomes et leurs limitations

Les techniques actuellement utilisées pour étudier la physique du génome présentent des limitations. Les techniques de capture de la conformation des chromosomes (3C) donnent un résultat sur une population de cellules. Cela moyenne les phénomènes et rend difficile l'étude de processus rapides ou qui s'expriment avec une grande variation entre cellules, il serait donc intéressant d'étudier des cellules individuelles. La technique 3C, ainsi que l'hybridation in situ en fluorescence, où les séquences génomiques d'intérêt sont marquées par une sonde fluorescente, utilisent des cellules fixées, ce qui ne donne qu'une photo à un instant donné de l'organisation du génome et ne permet pas d'étudier de phénomènes dynamiques. Il est donc intéressant de développer de nouvelles méthodes pour étudier des cellules individuelles, et vivantes [21].

Pour pouvoir comprendre les propriétés physiques de la chromatine, les moteurs de l'organisation du génome, et les relations de cause et de conséquence entre l'organisation du génome et de ses fonctions, il est nécessaire de directement manipuler mécaniquement le génome, pouvoir modifier son organisation, étudier les conséquences de ces modifications, et étudier les propriétés physiques de ses constituants. Différents outils ont été développés pour appliquer une force sur le génome d'une cellule vivante [25, 26, 27, 28, 29, 30, 31]. Certains sont présentés Figure 1.11.

Le premier, Figure 1.11a [25], consiste à aspirer un noyau de cellule dans une micropipette, ce qui le déforme. La déformation du noyau est globale, et n'est donc pas spécifique à une région du génome. Une autre méthode consiste à appliquer une force via une bille accrochée à la surface de la cellule par des récepteurs de surface, les intégrines (Figure 1.11b) [26]. La force n'est pas appliquée directement sur le génome, mais est transmise au noyau par le cytosquelette, il n'est donc pas possible d'étudier directement la réponse du génome. Les méthodes présentées Figures 1.11c et 1.11d [30, 31] permettent d'appliquer une force directement sur la chromatine : des billes magnétiques de taille micrométriques sont introduites dans le noyau, et appliquent une force sur la chromatine quand elles sont soumises à un champ magnétique. Cependant leur grande taille, de l'ordre du micromètre, et leur absence de ciblage sur un gène, les rendent peu précises pour étudier la nature physique de la chromatine.

On cherche donc à développer un outil qui permet d'appliquer une perturbation mécanique fine et directe de la chromatine, et sur une zone spécifique du génome.

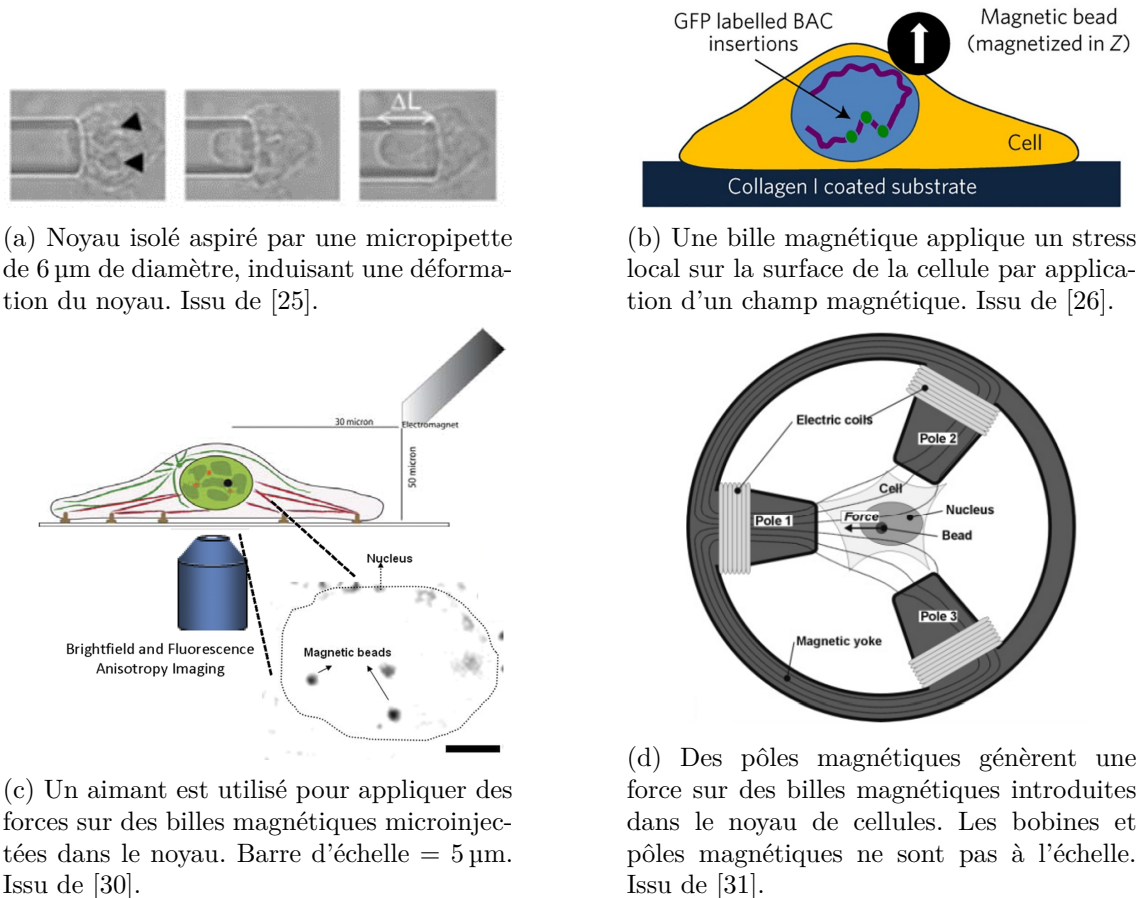
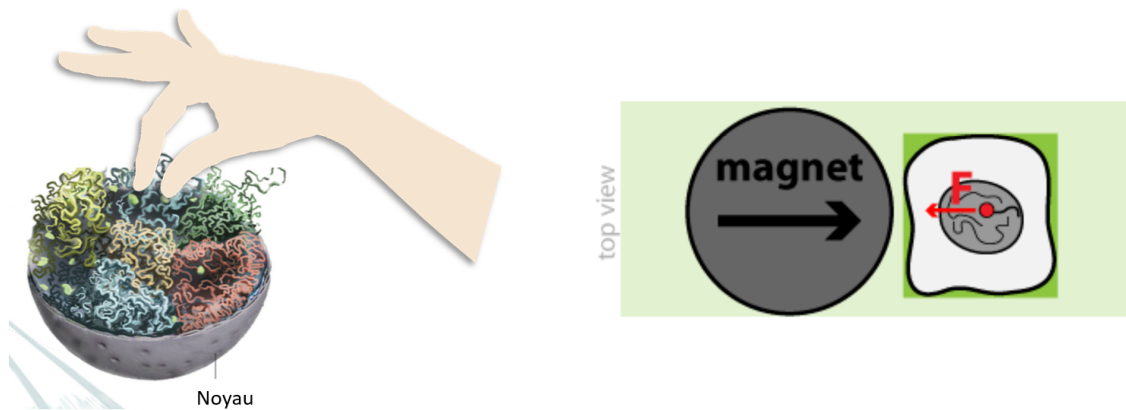


FIGURE 1.11 – Présentation de différentes techniques existantes pour appliquer une force mécanique sur le génome.

1.1.5 Élaboration d'une nouvelle méthode pour micromanipuler de la chromatine dans le noyau de cellules vivantes, en utilisant des nanoparticules magnétiques

Dans le cadre de cette thèse, nous souhaitons développer une nouvelle méthode expérimentale pour la manipulation mécanique active d'un locus génomique à l'intérieur du noyau d'une cellule vivante, tout en limitant la perturbation non contrôlée du génome. Cette méthode est analogue à une manipulation directe du génome en tirant sur une région précise avec ses doigts, comme représenté Figure 1.12a. Pour appliquer une force sans perturber le cytoplasme ni la membrane du noyau, la manipulation magnétique est choisie. La force est appliquée sur le génome via des sondes magnétiques accrochées à l'ADN, et plongées dans un gradient de champ magnétique, comme schématisé Figure 1.12b.

Pour limiter la perturbation de l'organisation globale du génome, les sondes magnétiques sont de taille nanométrique. Leur diamètre est d'environ 10 nm, de l'ordre de grandeur de la largeur de la fibre de chromatine, comme représenté sur l'échelle de taille de la Figure 1.13. Cette taille nanométrique doit aussi permettre aux nanosondes d'être injectées dans le noyau puis de diffuser librement pour atteindre leur cible sur le génome. Avec



(a) Une force mécanique, symbolisée par la main, est appliquée directement sur la chromatine.

(b) La force mécanique est appliquée par un gradient de champ magnétique sur des nanoparticules magnétiques.

FIGURE 1.12 – Principe du projet : appliquer une force directement sur la chromatine avec une nanosonde magnétique et un gradient de champ magnétique.

les gradients de champ qu'il est possible de mettre en place à proximité d'une cellule, une sonde nanométrique peut appliquer une force de l'ordre du femtoNewton, ce qui est trop faible pour manipuler la chromatine. Plusieurs nanosondes sont alors accrochées à l'ADN, de l'ordre du millier, pour atteindre une force de l'ordre du picoNewton. Les moteurs moléculaires présents dans le noyau, comme la condensine, appliquent une force de cet ordre [32]. Cette valeur de force est donc intéressante à appliquer pour pouvoir manipuler finement la chromatine. Nous souhaitons donc accrocher plusieurs nanosondes, réparties sur un brin d'ADN dans une région précise et choisie du génome. Les nanosondes sont des nanoparticules d'oxyde de fer.

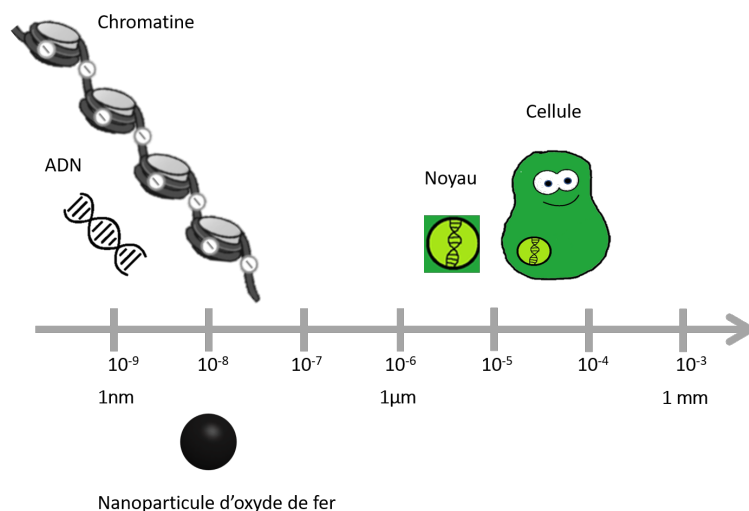


FIGURE 1.13 – Échelle de taille permettant de comparer la largeur de la molécule d'ADN, de la fibre de chromatine, la taille du noyau d'une cellule et d'une cellule par rapport au diamètre des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques utilisées.

La synthèse et l'utilisation des nanoparticules d'oxyde de fer comme nanosonde magnétique pour tirer sur la chromatine sont le sujet de cette thèse. Les deux parties suivantes du chapitre d'introduction décriront les nanoparticules d'oxyde de fer et leurs applications en biologie, et l'importance du contrôle de la chimie de surface de la nanoparticule.

1.2 Les nanoparticules d'oxyde de fer

1.2.1 Présentation des nanoparticules d'oxyde de fer

Le fer est un métal de transition, de numéro atomique 26. Ses degrés d'oxydation les plus couramment rencontrés sont le degré 0, pour le fer métallique $\text{Fe}_{(s)}$, le degré II, par exemple pour l'ion ferreux Fe^{2+} , et le degré III, par exemple pour l'ion ferrique Fe^{3+} .

Le fer au degré 0 n'est pas stable dans l'eau, le potentiel standard du couple d'oxydoréduction Fe^{2+}/Fe est $E^\circ(\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}) = -0,44 \text{ V}$. Il peut réagir avec des ions H^+ , donc le potentiel standard du couple avec le dihydrogène est $E^\circ(\text{H}^+/\text{H}_2) = 0 \text{ V}$, ou du dioxygène dissous : $(E^\circ(\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O}) = 1,3 \text{ V}$. Les ions ferreux ne sont pas stables non plus, ils réagissent avec le dioxygène dissous dans l'eau pour donner des ions ferriques : le potentiel standard du couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ est $E^\circ(\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}) = 0,77 \text{ V}$.

La forme du fer dans l'eau dépend aussi du pH. En effet les ions ferreux sont impliqués dans le couple acido-basique $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}(\text{OH})_2$, de produit de solubilité $pK_s \sim 15$, et les ions ferriques celui $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}(\text{OH})_3$, $pK_s \sim 39$. La forme majoritaire du fer dans l'eau dépend donc du potentiel et du pH.

Le fer solide est très présent dans la vie courante sous forme métallique, le plus souvent dans des alliages. Dans la nature il est plutôt rencontré sous forme d'oxyde de fer, c'est-

à-dire associé avec de l'oxygène.

Les oxydes de fer principaux sont :

- L'oxyde de fer(II) FeO appelé wustite. Le degré d'oxydation peut varier par oxydation du fer(II), il est parfois noté Fe_{1-x}O . La structure est cubique.
- L'oxyde de fer(III) qui existe sous deux phases : $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, l'hématite, de structure corindon et la maghémite, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ de structure spinelle inverse.
- La magnétite Fe_3O_4 composée d'un Fe(II) pour deux Fe(III). Sa structure est spinelle inverse aussi.

Un schéma de la structure spinelle inverse de la magnétite est présenté Figure 1.14. La structure spinelle est un empilement compact cubique à face centrées d'oxygène. Les ions Fe^{2+} et la moitié des ions Fe^{3+} occupent la moitié des sites octaédriques (sites B). L'autre moitié des ions Fe^{3+} occupe un huitième des sites tétraédriques (sites A). La structure est dite spinelle inverse car les cations divalents occupent les sites octaédriques. On appelle spinelle directe une structure où les cations divalents occupent les sites tétraédriques [33].

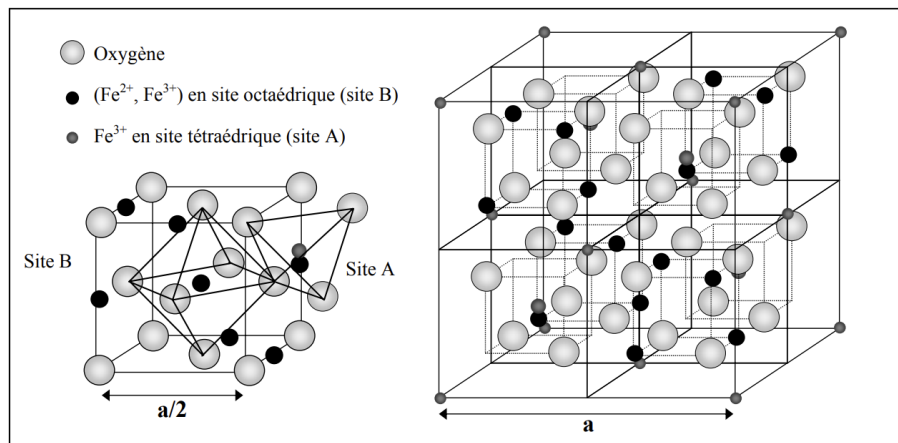


FIGURE 1.14 – Représentation de la structure spinelle inverse de la magnétite, issu de [33].

La magnétite est sensible à l'oxydation car elle peut facilement se transformer en maghémite, de même structure. Les cations Fe^{2+} se transforment en cations Fe^{3+} . Pour garder la neutralité de l'ensemble, un atome de fer sur 9 quitte la structure et est remplacé par une lacune [34].

1.2.2 Propriétés des nanoparticules d'oxyde de fer

Les oxydes de fer peuvent exister sous forme de nanoparticules, des particules de taille comprises entre 1 et 100 nm. Ces particules ont des propriétés qui diffèrent des propriétés du matériau massif notamment car elles ont un grand rapport surface sur volume. Dans le cadre de cette thèse, on s'intéresse aux propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer.

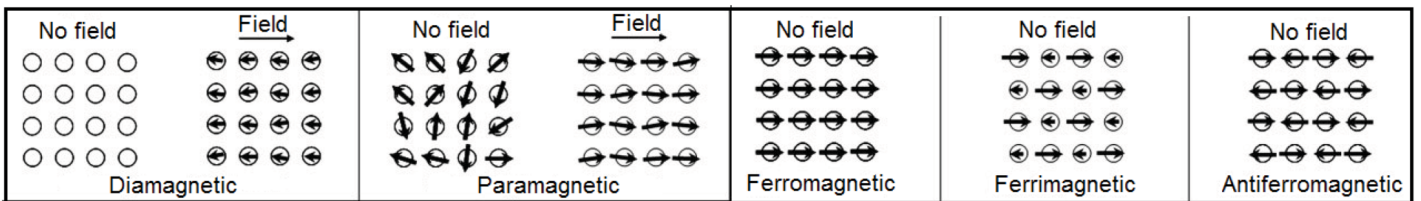
Notions de magnétisme

Les propriétés magnétiques d'un solide sont issues des propriétés quantiques des électrons. Elles sont décrites par le moment magnétique, qui traduit la tendance d'un dipôle magnétique à s'aligner dans la direction d'un champ magnétique extérieur. L'aimantation M d'un objet est son moment magnétique par unité de volume. Cette valeur peut dépendre du champ magnétique externe et a une valeur maximale appelée aimantation à saturation. Différents matériaux vont avoir une réponse différente à l'application d'un champ magnétique extérieur. Leur susceptibilité magnétique χ quantifie leur propension à s'aimanter dans un champ magnétique externe H [34].

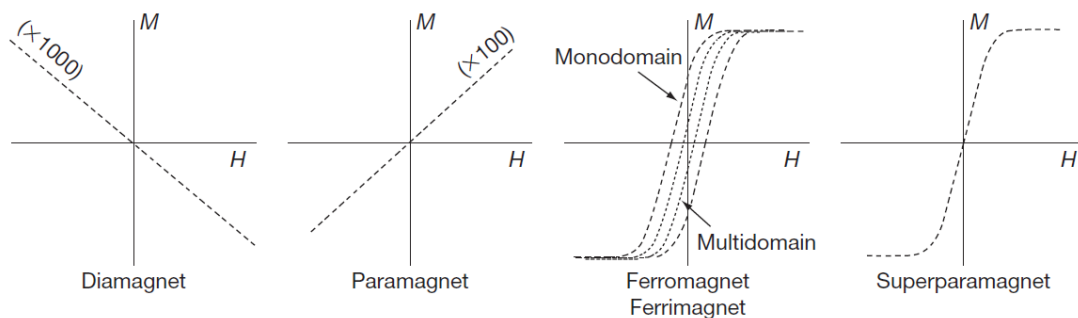
$$M = \chi \cdot H \quad (1.1)$$

Avec M l'aimantation, χ la susceptibilité magnétique et H le champ magnétique externe.

Les matériaux peuvent être classés en 5 groupes de comportement, décrits Figure 1.15. La Figure 1.15a illustre le comportement des dipôles magnétiques dans le matériau avec ou sans champ magnétique. La Figure 1.15b présente la courbe de la magnétisation M en fonction du champ H pour les matériaux.



(a) Description schématique des différents comportements magnétiques des matériaux. Les arrangements des dipôles magnétiques sont présentés pour chaque comportement, avec ou sans champ magnétique externe appliqué [35].



(b) Représentation de courbe de l'aimantation en fonction du champ magnétique externe appliqué H pour quatre comportements magnétiques [36].

FIGURE 1.15 – Description des différents comportements magnétiques des matériaux.

Le premier comportement est le diamagnétisme, qui caractérise des matériaux qui n'ont pas de dipôle magnétique en l'absence de champ. Leur susceptibilité est faible ($-10^{-6} > \chi > -10^{-3}$) et négative. Cela signifie que l'aimantation créée par un maté-

riau diamagnétique est dans la direction opposée au champ appliqué. L'eau, le cuivre et l'or sont par exemple diamagnétiques. Le second est le paramagnétisme. Les matériaux paramagnétiques ont des dipôles magnétiques qui sont orientés de manière aléatoire. Dans un champ magnétique externe, ils s'alignent sur le champ. Leur susceptibilité est faible, et positive ($10^{-6} < \chi < 10^{-1}$). L'aimantation résultante est donc faible. L'aluminium ou le dioxygène sont paramagnétiques.

D'autres matériaux, comme le fer, possèdent une aimantation même en l'absence de champ magnétique externe. On en distingue deux types : les matériaux ferromagnétiques, où les dipôles sont tous alignés de manière parallèle, et les ferrimagnétiques, où il y a aussi des dipôles alignés dans le sens inverse du champ, mais de plus faible intensité, ce qui confère une aimantation globale positive. Le dernier comportement est le comportement antiferromagnétique, où les dipôles sont alignés de manière parallèle et antiparallèle au champ, donc l'aimantation globale est nulle. Les matériaux magnétiques sont ceux qui sont ferro ou ferrimagnétiques. Au-delà d'une température appelée température de Curie l'énergie thermique devient plus forte que l'énergie d'alignement et le matériau devient paramagnétique. Ces températures sont très élevées, par exemple de 760°C pour le fer.

Les oxydes de fer en structure spinelle, soit la magnétite et la maghémite, sont ferrimagnétiques. L'aimantation à saturation est de 92 emu/g pour la magnétite et de 78 emu/g pour la maghémite. La wustite est antiferromagnétique. L'hématite est faiblement ferromagnétique, avec une aimantation à saturation de 1 emu/g [36].

Effet de la taille sur les propriétés magnétiques

La magnétite et la maghémite semblent être des matériaux intéressants pour faire des nanoparticules magnétiques. Cependant la petite taille des nanoparticules change les propriétés des matériaux, donc les propriétés du matériau massif ne sont pas directement transposables aux nanoparticules. En effet pour un matériau ferro ou ferrimagnétique massif, le matériau n'est pas composé d'un seul bloc de dipôles alignés dans le même sens car l'énergie magnétostatique stockée serait trop élevée. Il y a des régions différentes, au sein desquelles les dipôles sont alignés, mais ils ne sont pas alignés avec les dipôles des autres régions. Ces régions sont appelées domaines magnétiques ou domaines de Weiss [36]. Ces régions sont représentées Figure 1.16(a).

Dans le cas des nanoparticules, la taille de la particule est plus petite que la taille d'un domaine, il n'y a donc qu'un seul domaine. De plus pour des nanoparticules suffisamment petites, la barrière énergétique qui sépare les deux directions d'orientation $K_{eff}V$ est plus petite que l'énergie thermique k_bT :

$$K_{eff}V < k_bT \tag{1.2}$$

Ce qui est schématisé Figure 1.17.

Les dipôles sont alors orientés de manière aléatoire et la nanoparticule n'a pas d'aimantation en l'absence d'un champ magnétique extérieur, comme un matériau parama-

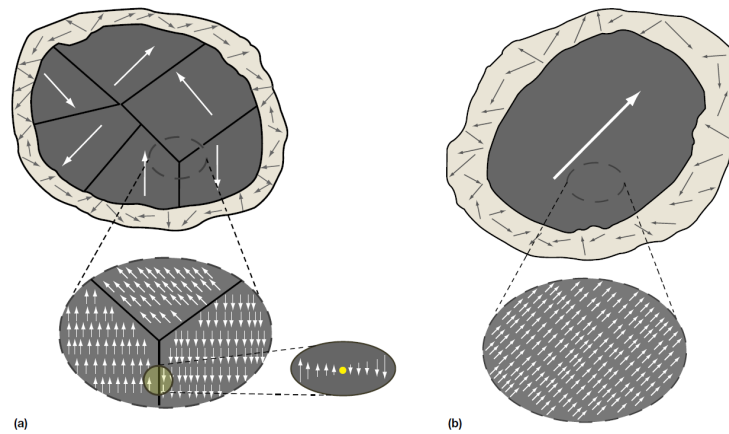


FIGURE 1.16 – Schéma explicatif de la présence de domaines magnétiques dans des matériaux. (a) La taille de la particule est suffisamment élevée pour voir apparaître différents domaines magnétiques qui ont des orientations magnétiques aléatoires entre eux. (b) La taille de la nanoparticule est plus faible, il n’y a qu’un seul domaine, et tous les dipôles du cœur sont alignés. Pour les deux particules la surface est caractérisée par un désordre des dipôles [36].

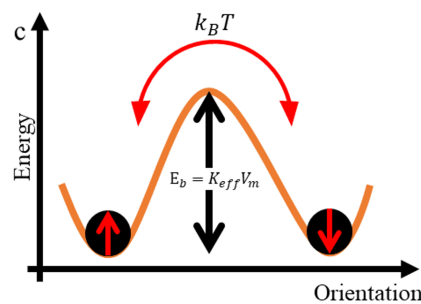


FIGURE 1.17 – Vue schématique de la barrière d’énergie entre deux orientations magnétiques comparée à l’agitation thermique [37].

gnétique. Lorsqu’un champ extérieur est appliqué, les dipôles s’alignent et une forte magnétisation apparaît, comme schématisé sur la courbe d’aimantation en fonction du champ Figure 1.15b. Ce comportement est appelé superparamagnétique.

Les nanoparticules ont une grande surface par rapport à leur volume, il y a beaucoup de dipôles à la surface. Ces dipôles ont plutôt tendance à s’aligner perpendiculairement à la surface, et ne contribuent donc pas à l’aimantation globale de la nanoparticule. Ce phénomène est représenté Figure 1.16. Il cause une diminution de l’aimantation à saturation pour le matériau, qui ne pourra pas atteindre celle du matériau massif [36]. Ce phénomène est appelé spin canting.

Les propriétés superparamagnétiques des nanoparticules de magnétite et maghémite en font de bons candidats pour des nanoparticules magnétiques.

Appliquer une force sur un dipôle magnétique

Un dipôle magnétique est soumis à une force s'il se trouve dans un gradient de champ, selon la formule :

$$\vec{F} = \vec{\nabla}(\vec{\mu} \cdot \vec{B}) \quad (1.3)$$

Avec \vec{F} la force exercée sur le dipôle de moment magnétique $\vec{\mu}$ dans un champ magnétique \vec{B} .

Il faut donc placer une nanoparticule d'oxyde de fer dans un gradient de champ magnétique pour pouvoir lui appliquer une force.

Le moment magnétique va s'aligner sur le champ magnétique donc :

$$\vec{F} = \mu \vec{\nabla} B \quad (1.4)$$

Pour augmenter la force à laquelle le dipôle est soumis, plusieurs paramètres sont modifiables. Le premier est le gradient de champ magnétique. Il est aussi possible de faire varier le moment magnétique μ , tout d'abord en changeant la valeur du champ magnétique jusqu'à atteindre l'aimantation à saturation. Une fois l'aimantation à saturation atteinte, le moment μ d'une nanoparticule peut être augmenté en augmentant sa taille, son moment magnétique étant proportionnel à son volume V .

$$\mu \propto V$$

Pour micromanipuler la chromatine, le volume de la nanoparticule doit rester restreint, pour éviter de perturber l'architecture du génome de manière non contrôlée, et pour que la nanoparticule puisse diffuser dans le noyau jusqu'à atteindre sa cible sur le génome. Pour augmenter la force appliquée sur la chromatine il est alors possible d'augmenter le nombre de nanoparticules accrochées à la chromatine.

1.2.3 Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer

Plusieurs voies de synthèse chimique existent pour la synthèse de nanoparticules magnétiques, par co-précipitation, par voie hydrothermale (en milieux aqueux à haute pression), par microémulsion et par décomposition thermique notamment [38].

La plus simple à mettre en œuvre et la plus utilisée est la synthèse par co-précipitation, issue du protocole de Massart publié en 1981 [39].

Synthèse par co-précipitation

Cette synthèse se réalise en milieu aqueux et à température ambiante. Les précurseurs sont des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} , en solution acide, pour éviter la présence des espèces $\text{Fe}(\text{OH})_2$ et $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Ces ions précipitent ensemble par ajout d'une base selon l'équation :



De nombreux paramètres sont contrôlés, le ratio des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} , la nature des anions, le pH, l'agitation et les ligands.

Cette méthode permet de synthétiser de grandes quantités de nanoparticules [40].

Synthèse par décomposition thermique d'un complexe de fer

Dans cette thèse la méthode employée est la décomposition thermique, qui permet un meilleur contrôle de la taille, la forme et la cristallinité des nanoparticules. Cette synthèse nécessite la décomposition thermique d'un complexe de fer dans un solvant organique à haut point d'ébullition avec des ligands qui stabilisent la nanoparticule formée. Les précurseurs de fer peuvent être des oléates, des acétylacétonates, des stéarates ou des carbonyles de fer.

Le principe est décrit par le diagramme de Lamer [41] représenté Figure 1.18.

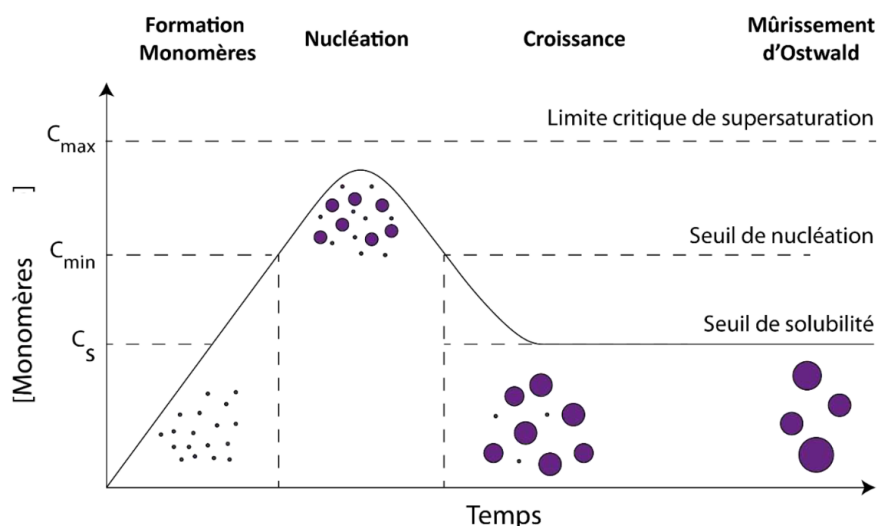


FIGURE 1.18 – Schéma de la nucléation et la croissance de nanocristaux [42].

Tout d'abord avec la décomposition du complexe de fer des monomères se forment, qui sont l'unité de base de la nanoparticule d'oxyde de fer, de charge nulle. Leur concentration augmente dans la solution jusqu'à atteindre et dépasser C_{min} , la concentration minimum de nucléation, car il y a sursaturation de la solution en monomère. À ce stade des nuclei de nanoparticules se forment, qui sont les germes de nanoparticules. Les monomères sont consommés par la formation de nuclei, ce qui fait baisser la concentration jusqu'à ce qu'elle repasse sous C_{min} le seuil de nucléation. La nucléation s'arrête alors et les germes de nanoparticules croissent avec les monomères restants en solution.

Pour que les nanocristaux formés aient la même taille, il est préférable qu'ils commencent tous leur croissance en même temps, il est donc nécessaire de bien séparer la nucléation et la croissance. Il est aussi nécessaire de contrôler le mûrissement d'Ostwald : à la fin de la réaction les petits cristaux qui ont une énergie de surface plus élevée risquent de se dissoudre, ce qui reforme des monomères et fait encore grossir les nanocristaux les

plus gros. Ce phénomène crée de la polydispersité dans la solution. Pour l'éviter, il faut arrêter la réaction avant la fin de la conversion totale des précurseurs [42].

La taille des nanocristaux formés est principalement contrôlée par le nombre de germes formés lors de l'étape de nucléation. Plus il y a de germes, plus il y aura de nanoparticules et donc plus elles seront petites à concentration de fer constante. Plusieurs paramètres ont une influence : la température et la vitesse de la rampe de température, la nature du solvant et son point d'ébullition, la nature du précurseur, la nature et la quantité de ligands [34, 43].

Il est aussi possible de contrôler la forme des nanocristaux en contrôlant la vitesse de croissance du nanocristal selon ses différentes faces cristallographiques. Certains ligands adhèrent spécifiquement sur certaines faces, ce qui ralentit leur croissance et permet de créer des nanoparticules de différentes formes, des cubes, des octaèdres ou des étoiles. [34, 44].

1.2.4 Applications des nanoparticules d'oxyde de fer

Des particules magnétiques de taille micrométrique sont couramment utilisées pour isoler des biomolécules ou des cellules spécifiques. Elles sont recouvertes par exemple d'un anticorps, d'une protéine ou de nucléotides pour se lier à la cellule ou biomolécule voulue, et sont ensuite séparées de la solution en étant attirées dans un champ magnétique.

À l'échelle nanométrique, les nanoparticules d'oxyde de fer possèdent plusieurs propriétés intéressantes qui en font de potentiels outils intéressants dans le domaine médical. Les domaines les plus explorés sont les nanoparticules pour le diagnostic, en tant qu'agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM), et en tant que traitement, dans le cadre de l'hyperthermie magnétique. La possible conjugaison de ces deux applications fait des nanoparticules d'oxyde de fer un agent théranostic, capable de coupler thérapie et diagnostic.

Agent de contraste en IRM

L'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) est une technique d'imagerie fondée sur les propriétés de résonance magnétique nucléaire du noyau d'hydrogène, un proton. Elle mesure un contraste qui dépend du temps de relaxation des protons de l'eau. En effet le temps de relaxation est très sensible à l'environnement chimique du proton, qui n'est pas le même entre différents tissus. Pour augmenter le contraste des images et ajouter une information fonctionnelle (tumeur, lésion) des agents de contraste sont utilisés. Les plus courants sont ceux au complexe de gadolinium, qui possède 7 électrons non appariés, ce qui le rend paramagnétique. Ce sont des agents dits T_1 car ils diminuent le temps de relaxation longitudinal T_1 des spins des protons après une excitation, ce qui augmente le signal mesuré. C'est un hypersignal : les zones contenant l'agent T_1 apparaissent en blanc. Les nanoparticules d'oxyde de fer, elles, diminuent le temps de relaxation transversal T_2 , ce qui crée une diminution du signal, un hyposignal, sur l'image IRM.

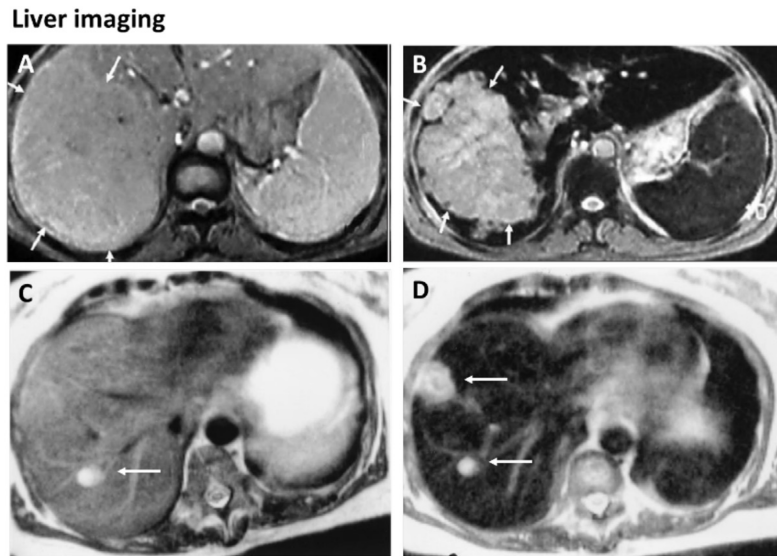


FIGURE 1.19 – Nanoparticules d’oxyde de fer pour l’imagerie du foie par IRM T_2 (A-B) Imagerie d’un carcinome du foie avant (A) et après (B) l’administration des nanoparticules. Le contour de la lésion est marqué de flèches. (C-D) Imagerie du foie avant (C) et après (D) injection des nanoparticules. Des métastases sont visibles au niveau des flèches [45].

Plusieurs agents de contraste T_2 ont été développés et ont été mis sur le marché. La plupart sont injectés dans la circulation sanguine par injection intraveineuse ou perfusion et permettent d’imager les macrophages qui captent les nanoparticules. La référence Endorem, aussi appelé Feridex, qui fonctionne comme le Cliavist, aussi appelé Resovist, contient des nanoparticules qui sont captées par les macrophages du foie. Ils servent à détecter des lésions du foie car celles-ci ne contiennent plus de macrophages. Le foie sain apparaît noir grâce aux nanoparticules dans les macrophages qui produisent un hyposignal, et les lésions sans macrophages apparaissent plus claires.

C’est ce qui est observé sur la Figure 1.19. Sur la Figure 1.19 (B) un gros carcinome est visible à gauche du foie, qui n’était pas visible avant les nanoparticules (A). Sur la Figure 1.19 (D) deux métastases sont visibles. Celle du haut n’était pas visible avant l’injection des nanoparticules. L’agent de contraste Sinerem cible les macrophages des ganglions lymphatiques pour détecter des métastases (Figure 1.20). Les images de gauche sont prises avant l’injection des nanoparticules et celles de droite 24 heures après. Les ganglions sont marqués par une flèche. Dans celui du haut, on observe que le ganglion devient noir après injection : il y a donc des nanoparticules. Cela signifie que des macrophages ont capté les nanoparticules et donc que le ganglion est fonctionnel. En revanche le ganglion du bas ne noircit pas, signe qu’il n’a pas capté de nanoparticules et donc qu’il n’est plus fonctionnel. Il y a une métastase.

Ces agents de contraste sont peu utilisés et ont parfois été retirés du marché par manque d’efficacité. Le fabricant du Sinerem a retiré sa demande d’autorisation de mise sur le marché européen pour efficacité non démontrée [46] et la distribution du Resovist en Europe s’est arrêtée en 2009 après avoir été acceptée en 2001 [47].

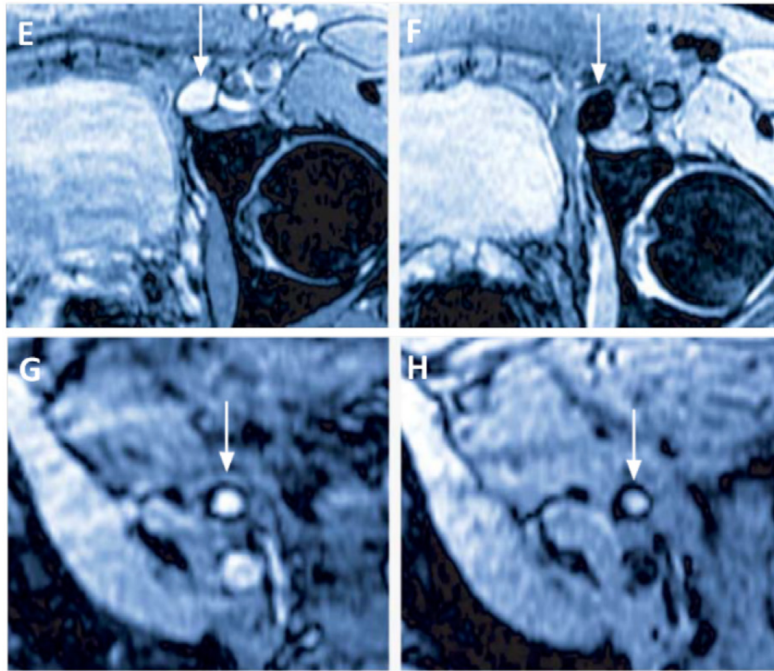
Lymph node imaging

FIGURE 1.20 – Nanoparticules d’oxyde de fer pour l’imagerie des ganglions lymphatiques par IRM T_2 (E-H) Imagerie de ganglions lymphatiques (flèches) avant (E, G) et 24 heures après (F,H) l’administration de nanoparticules [45].

Un hyposignal est plus difficile à interpréter, donc des nanoparticules d’oxyde de fer produisant un bon contraste T_1 sont aussi développées. Ce contraste est obtenu pour des nanoparticules qui sont plus paramagnétiques que superparamagnétiques. C’est le cas pour des nanoparticules de moins de 5 nm de diamètre pour lesquelles le domaine magnétique est petit et il y a beaucoup de spin canting, ce qui rend la nanoparticule plus paramagnétique que superparamagnétique. La Figure 1.21 compare des images pondérées T_2 (haut) obtenues avec des nanoparticules d’oxyde de fer superparamagnétiques avec une image pondérée T_1 (bas) grâce à des nanoparticules paramagnétiques [48].

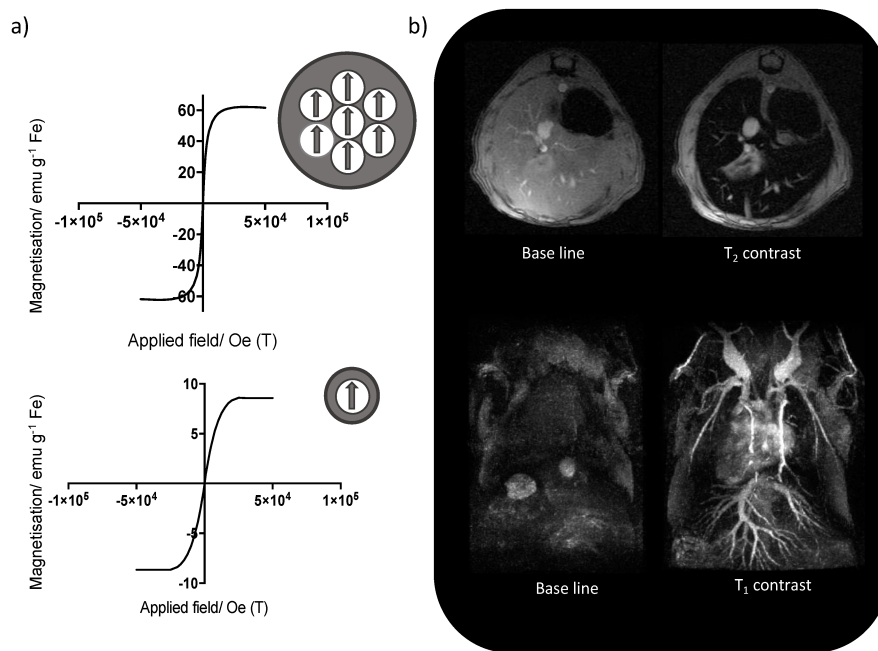


FIGURE 1.21 – (a) Courbes d’aimantation en fonction du champ magnétique appliqué pour des nanoparticules d’oxyde de fer superparamagnétiques (haut) et paramagnétiques (bas). (b) Foie de souris en IRM T_2 en utilisant les nanoparticules superparamagnétiques (haut) et IRM T_1 angiographie (imagerie des vaisseaux sanguins) avec des nanoparticules paramagnétiques [48].

Hyperthermie magnétique

Les nanoparticules d’oxyde de fer ont la propriété de produire de la chaleur quand elles sont placées dans un champ magnétique alternatif. C’est ce qu’on appelle l’hyperthermie magnétique. Cette propriété est utilisée dans le traitement du cancer. En effet les cellules d’une tumeur sont plus sensibles à une augmentation de la température : elles sont moins bien irriguées ce qui leur empêche d’évacuer efficacement la température. Ainsi il est possible de les cibler spécifiquement et d’éviter les effets secondaires. Une élévation de température jusqu’à 42–46°C permet la mort des cellules cancéreuses [36].

Pour de grosses nanoparticules magnétiques multidomaines (Figure 1.16(a)) la dissipation de la chaleur vient du cycle d’hystérésis de la courbe d’aimantation en fonction du champ magnétique extérieur. Cela correspond à l’énergie dissipée lors du mouvement des murs des domaines magnétiques. Pour des nanoparticules superparamagnétiques monodomaines il n’y a pas de cycle d’hystérésis, la dissipation de la chaleur vient de deux types de relaxation, la relaxation de Néel qui correspond au retour à l’équilibre du moment magnétique de la nanoparticule, et la relaxation de Brown qui correspond à un retour à l’équilibre des spins qui entraîne une rotation de la nanoparticule [34].

L’injection de nanoparticules dans la tumeur permet de l’échauffer localement en limitant les effets sur les tissus environnants, et permet de cibler une tumeur profonde. Des résultats intéressants ont été obtenus pour des tumeurs solides. La Figure 1.22 présente le

résultat d'une étude clinique de nanoparticules d'oxyde de fer pour le traitement du glioblastome, un cancer du cerveau, réalisée par l'entreprise MagForce et l'université de Berlin [49]. Des nanoparticules d'oxyde de fer sont injectées dans la tumeur par une aiguille, sous anesthésie générale. La tumeur est visible en IRM sur les images A et B. Les images B et C montrent les nanoparticules injectées dans la tumeur et l'augmentation de la température mesurée. Le traitement a duré 3 semaines avec 2 séances d'une heure par semaine. S'il n'a pas permis la guérison totale des patients, la survie est passée de 13,4 mois à 23,2 mois de médiane après la découverte de la tumeur. Ce traitement est désormais approuvé sur le marché [47].

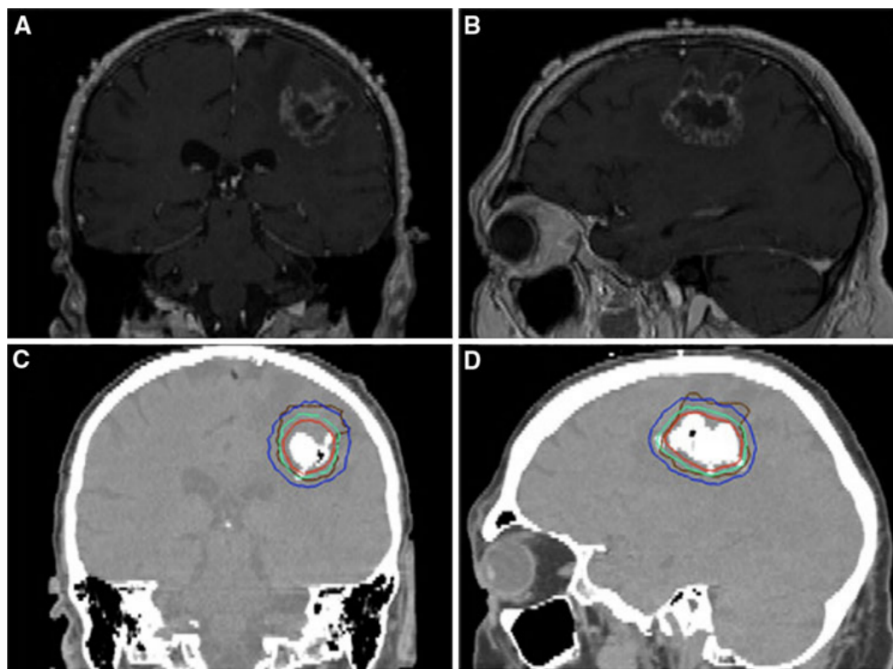


FIGURE 1.22 – A et B : IMR du cerveau avant traitement. C et D : Image par tomodensitométrie après injection des nanoparticules, visibles en blanc. Les lignes isothermales indiquent la température calculée, entre 40°C (bleu) et 50°C (rouge) à partir de la mesure d'un thermomètre (1 mm de diamètre) [49].

Micromanipulation extra et intracellulaire

Des nanoparticules d'oxyde de fer sont aussi utilisées pour réaliser des manipulations à l'extérieur ou à l'intérieur de cellules [50].

À l'extérieur de la cellule, des nanoparticules d'oxyde de fer ont par exemple été utilisées pour étudier l'activation de mécanorécepteurs [51]. Les nanoparticules sont accrochées à un récepteur de surface responsable de l'adhésion entre cellules, la protéine E-cadhérine, pour étudier sa réponse à une perturbation mécanique. Le résultat est présenté Figure 1.23. Lorsqu'une force suffisante est appliquée, une cascade de signalisation est enclenchée et des protéines du cytosquelette (actine et vinculine) sont recrutées autour des cadhérines.

Cet exemple illustre l'efficacité des nanoparticules d'oxyde de fer pour la micromani-

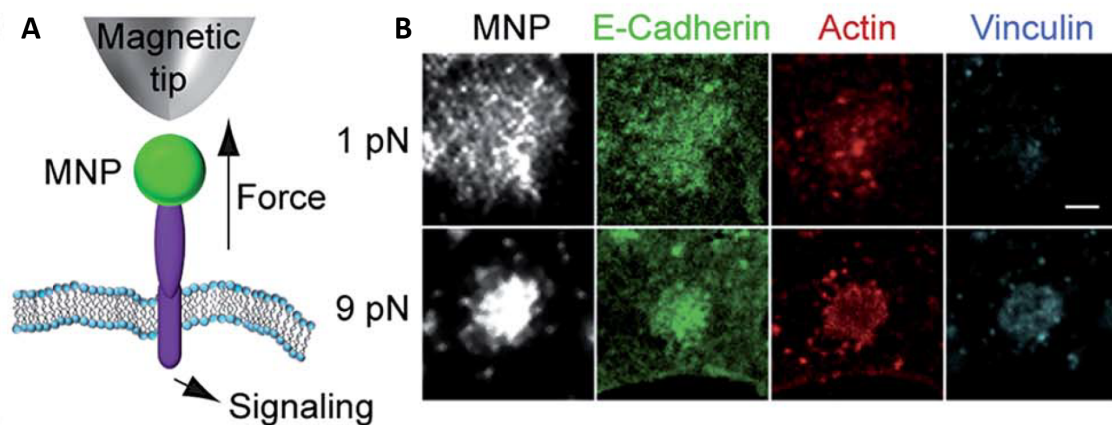
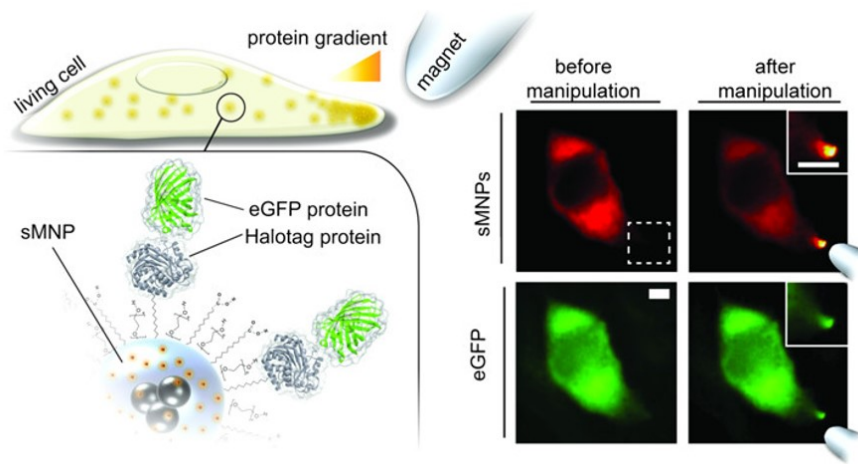


FIGURE 1.23 – A : Une pointe magnétique active un mécanorécepteur, l'E-cadhérine, en tirant sur une nanoparticule magnétique accrochée au récepteur, ce qui active une signalisation à l'intérieur de la cellule. B : Marquage immunofluorescent pour les nanoparticules magnétiques (MNP), la protéine E-cadhérine, et les marqueurs de l'activation du signal intracellulaire, l'actine et la vinculine. Pour une force de 9 pN, on observe le recrutement d'actine et de vinculine, car leur marquage colocalise avec celui des cadhérines. Barre d'échelle=2 μ m. Issu de [51].

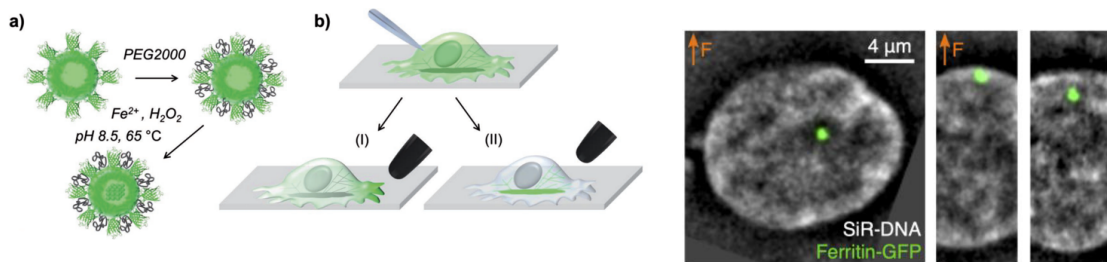
pulation à l'extérieur de la cellule. À l'intérieur de la cellule, en revanche, c'est un plus gros challenge, car le milieu intracellulaire est beaucoup plus complexe et encombré que le milieu extracellulaire.

Des exemples d'utilisation sont décrits Figure 1.24. Etoc et al. [55] ont utilisé des nanoparticules magnétiques de 500 nm de diamètre pour initier localement une cascade de signalisation de protéine qui entraîne une modification du cytosquelette d'actine et des changements dans la morphologie de la cellule. Cette équipe a ensuite utilisé des nanoparticules plus petites (45 nm de diamètre) [52] (Figure 1.24a), fonctionnalisées avec un ligand Halotag. Le ligand Halotag permet de se lier à une protéine d'intérêt si elle est fusionnée avec une protéine Halotag. Dans cette étude la lignée cellulaire utilisée produit une protéine GFP Halotag. Les nanoparticules s'y accrochent alors, ce qui permet de créer un gradient de protéines GFP à l'intérieur de la cellule après application d'un gradient de champ magnétique. Mais les nanoparticules utilisées, des agrégats de nanoparticules d'oxyde de fer entourées de silice, ont montré une diminution de leur stabilité après injection dans le cytoplasme, peut être liées à de l'agrégation lors de l'injection [56].

Liße et al. [53] ont créé un gradient de protéines à l'intérieur de cellules avec un autre type de nanoparticule magnétique : une cage de protéine, la ferritine, décorée de GFP et chargée avec un cœur d'oxyde de fer (Figure 1.24b). L'utilisation d'une cage de protéine, pegylée, permet d'augmenter la stabilité des nanoparticules dans les cellules. Keizer et al. [54] ont utilisé ce type de nanoparticules pour micromanipuler de la chromatine (Figure 1.24c). Ce type de nanoparticules présente un certain nombre de limitations : elles sont peu compactes du fait de la taille de la cage de protéine et des GFP qui les décorent, ce qui limite le nombre de nanoparticules accrochables sur un locus génomique,



(a) Gauche : Schéma d'une méthode pour créer un gradient de protéines dans le cytoplasme de cellules vivantes au moyen de nanoparticules magnétiques fonctionnalisées avec des ligands Halotag. Les nanoparticules réagissent avec les protéines GFP-Halotag présentes dans le cytoplasme, ce qui permet de créer un gradient de ces protéines lorsqu'une pointe magnétique est approchée. Droite : Image en microscopie de fluorescence du gradient créé lors de l'approche de la pointe magnétique. Les nanoparticules sont marquées en rouge, et les protéines GFP-Halotag en vert. Issu de [52].



(b) A : Synthèse de nanoparticules magnétiques à partir de protéines ferritine-GFP purifiées. La ferritine est tout d'abord pegylée puis chargée avec un cœur de magnétite. B : Après injection des nanoparticules ferritines, des protéines fusionnées avec des nanocorps anti-GFP sont ciblées, et peuvent ensuite être contrôlées par un gradient de champ magnétique créé par une pointe magnétique. Issu de [53].

(c) Noyau d'une cellule vivante en microscopie de fluorescence. Un locus génomique sur lequel sont accrochées des nanoparticules de ferritine est micromanipulé par application d'un gradient de champ magnétique. Issu de [54].

FIGURE 1.24 – Exemple d'utilisation de nanoparticules magnétiques pour la micromanipulation intracellulaire.

et donc la force applicable. De plus la cage de protéine empêche d'augmenter la taille du cœur d'oxyde de fer, ce qui augmenterait la force applicable sur une nanoparticule, celle-ci variant avec le volume du cœur d'oxyde de fer. Ces deux limitations forcent à cibler un locus génomique très répété, pour pouvoir accrocher un grand nombre de nanoparticules et donc appliquer une force suffisante. Enfin, elle ne peut s'accrocher à l'ADN que par un seul moyen, un nanocorps anti-GFP, ce qui rend le système peu versatile. Dans le cadre de ma thèse, je cherche à développer un nouveau type de nanoparticule magnétique pour la micromanipulation de chromatine dans le noyau de cellule vivante, qui soit entièrement synthétique, ce qui permet de changer la taille de la nanoparticule d'oxyde de fer pour la

rendre plus magnétique. L'absence de cage de protéine permettra plus de compacité, et donnera de la flexibilité sur les protéines et ligands greffables à la surface pour envisager plusieurs systèmes d'accroche sur la chromatine.

1.3 L'importance du contrôle de la chimie de surface des nanoparticules

1.3.1 Le rôle des ligands dans la stabilité colloïdale des nanoparticules d'oxyde de fer

Le but de cette thèse est de développer des nanoparticules d'oxyde de fer comme nanosondes magnétiques pour appliquer une force sur la chromatine. Le premier enjeu de leur développement est leur stabilité colloïdale. Des nanoparticules dans une solution sont stables colloïdalement si elles ne s'agrègent pas. Les nanosondes magnétiques ne doivent pas s'agréger, pour rester sous forme nanométrique afin de diffuser dans le noyau et cibler la chromatine.

Des nanoparticules resuspendues dans l'eau ont tendance à s'agréger car elles sont attirées entre elles par des forces de Van der Waals dues à des polarisations électroniques instantanées qui sont présentes dans tous les matériaux et sont toujours attractives.

Il est donc nécessaire d'introduire d'autres forces répulsives pour que les nanoparticules se repoussent et évitent l'agrégation. Ces forces répulsives peuvent être des forces électrostatiques, entre nanoparticules de même charge. Cependant les milieux physiologiques sont très salés, ce qui écrante les charges à la surface de la nanoparticule, et ne permet plus à la répulsion électrostatique d'éviter l'agrégation. Ainsi des nanoparticules s'agrègent sous l'action des forces de Van der Waals en milieu salé même si elles sont chargées. Pour atteindre la stabilité colloïdale il est nécessaire de modifier leur surface pour créer d'autres forces répulsives. Des ligands de surface sont ainsi accrochés à la surface des nanoparticules. Ces ligands sont souvent neutres, ce qui leur permet d'éviter des variations de charge en fonction du pH et donc leur permet d'être stables à tout pH. La stabilité est obtenue grâce à des forces de répulsion stérique. Des polymères hydrophiles sont majoritairement utilisés. Ils ont une forte affinité avec les molécules d'eau, grâce à des interactions hydrogène ou des interactions électrostatiques locales. Ils ont donc une entropie supérieure lorsqu'ils sont entourés d'eau que lorsqu'ils sont comprimés entre deux nanoparticules, ce qui crée la répulsion stérique [57].

1.3.2 Le rôle des ligands pour contrôler la couronne de protéines

Les nanosondes sont injectées dans des cellules vivantes, donc dans un milieu biologique complexe. Les ligands doivent également permettre de conserver la stabilité colloïdale dans un milieu qui a une composition très riche avec des ions, des protéines, des lipides et des petites molécules. C'est un défi car ces espèces ont tendance à s'accrocher aux ligands et donc perturber la répulsion stérique qui permettait la stabilité. C'est ce qu'on appelle

la couronne de protéines, même si elle peut contenir d'autres types de biomolécules [58]. Les interactions sont difficiles à prévoir en raison de la variété de biomolécules. Les protéines peuvent interagir directement avec la surface inorganique de la nanoparticule si le revêtement de ligand n'est pas assez dense pour empêcher leur accès à la surface inorganique. Elles interagissent également avec les ligands de surface par le biais d'interactions hydrophobes, électrostatiques ou de liaison hydrogène. Ces interactions peuvent être plus ou moins fortes. Les protéines faiblement liées sont en équilibre dynamique entre les états liés et non liés et forment ce que l'on appelle la "couronne dynamique". En revanche, les protéines fortement liées qui résistent aux procédures de lavage et de purification forment la "couronne dure", schématisée Figure 1.25.

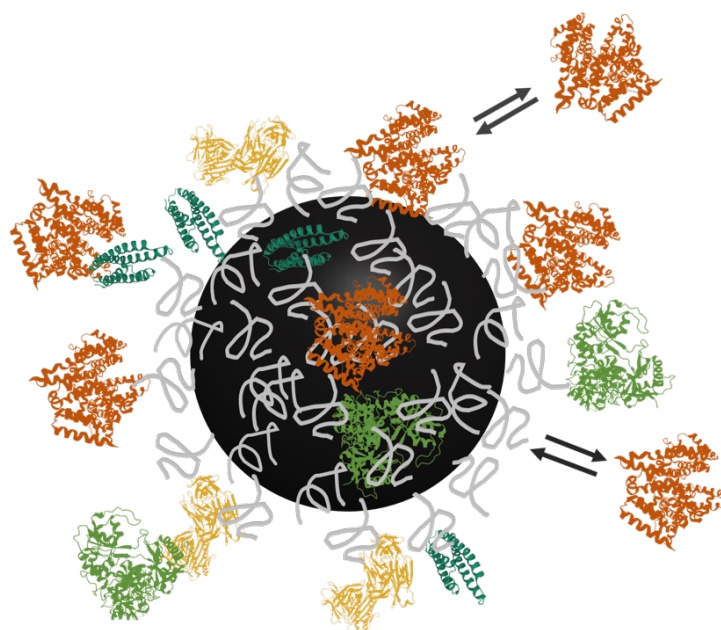


FIGURE 1.25 – Schéma de nanoparticules entourées de ligands de surface inorganiques et recouvertes de plusieurs protéines fortement liées (couronne dure) et de protéines faiblement liées et en équilibre avec les protéines de la solution (couronne dynamique).

La composition de la couronne de protéines est dynamique et évolue dans le temps [59]. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet Vroman. Les protéines plus concentrées ou qui diffusent plus vite accèdent plus rapidement à la surface de la nanoparticule et forment la première couronne de protéines, qui est ensuite remplacée par des protéines qui ont des affinités plus élevées, ancrées de manière plus stable à la surface de la nanoparticule. Une protéine ancrée à la surface de la nanoparticule est susceptible de subir des modifications conformationnelles pour optimiser son interaction, qui la dénature. Cette dénaturation peut avoir comme conséquence l'exposition de segments hydrophobes qui se trouvaient initialement cachés dans la structure de la protéine et qui deviennent maintenant accessibles pour d'autres interactions. Ces nouvelles interactions sont potentiellement plus fortes et peuvent conduire à la formation de plusieurs couches de protéines ou à l'agrégation des

nanoparticules.

La couronne de protéines affecte donc les propriétés physico-chimiques et colloïdales des nanoparticules, en modifiant leur stabilité colloïdale, leur taille hydrodynamique et leur potentiel zêta [57].

Il existe de nombreuses méthodes pour étudier la couronne de protéines [60]. La plus efficace pour connaître la composition de la couronne dure est la spectrométrie de masse. Étudier la couronne dynamique nécessite une mesure in situ sans lavage des nanoparticules pour ne pas perturber les équilibres. On utilise des méthodes indirectes qui mesurent un changement de taille : spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS), analyse de suivi des nanoparticules (NTA), diffusion dynamique de la lumière (DLS), de charge : électrophorèse capillaire ou de masse : microbalance à quartz (QCM).

Cette couronne de protéines a été très étudiée. Il apparaît qu'elle est très différente en fonction des conditions de l'expérience. Quelques principes généraux peuvent être déduits de ces expériences. Les ligands hydrophobes favorisent les interactions de Van der Waals avec les protéines : des protéines sont fortement liées à la nanoparticule, et des changements de conformation sont détectés. Les nanoparticules chargées positivement interagissent par interactions électrostatiques avec des protéines qui sont souvent chargées négativement. Des nanoparticules chargées négativement interagissent aussi électrostatiquement avec des protéines qui peuvent avoir des surfaces localement chargées positivement. Des ligands neutres apparaissent comme la meilleure option pour limiter la formation de la couronne de protéines. Ceux qui favorisent les liaisons hydrogène peuvent se lier par liaisons hydrogène avec les protéines. Ceux qui semblent être les plus efficaces sont les polymères hydrophiles qui ont une grosse couche d'hydratation. Il est difficile pour les biomolécules de remplacer cette couche d'hydratation bien en place [57].

La formation de la couronne de protéines peut parfois stabiliser les nanoparticules, mais dans notre application de nanosonde il serait préférable de la limiter car elle écranterait la nanoparticule et empêcherait le ciblage de la chromatine.

1.3.3 Différentes stratégies pour obtenir les ligands de surface désirés

Ainsi il est nécessaire de modifier la surface des nanoparticules et d'y accrocher des ligands qui vont permettre d'assurer la stabilité colloïdale dans un milieu biologique et limiter la formation de la couronne de protéines.

Ces ligands doivent pouvoir s'accrocher sur la surface inorganique de la nanoparticule et avoir des groupes hydrophiles pour permettre à la nanoparticule d'être soluble et stable en milieu aqueux. Il est possible d'ajouter des ligands lors de la synthèse des nanoparticules si elle est aqueuse, mais souvent les ligands nécessaires pour contrôler la synthèse ne sont pas adaptés pour la stabilité en milieux complexes. Pour les nanoparticules synthétisées par décomposition thermique, les ligands de synthèse sont des ligands organiques, souvent de l'acide oléique, qui ne permettent la stabilité colloïdale qu'en solvant organique apolaire. Pour modifier les ligands de surface, il y a alors plusieurs possibilités. La première est

d'encapsuler les nanoparticules dans une fine couche de silice. Les siloxanes réagissent avec les oxygènes à la surface de la nanoparticule. Elle permet une relative stabilité en milieu aqueux, des ligands peuvent être accrochés sur la silice, mais la limite est l'hydrolyse de la silice en milieu aqueux [61]. Il est aussi possible d'encapsuler des nanoparticules avec des ligands organiques par des polymères amphiphiles [62], mais cette construction n'est pas toujours très stable. De plus les parties hydrophobes des polymères peuvent interagir avec les protéines. Le plus simple est de complètement retirer les ligands de synthèse et de les remplacer par les ligands désirés, selon un protocole d'échange de ligands. La présentation de ces ligands va se faire en deux parties, la première présente les fonctions d'accroche des ligands sur la surface de la nanoparticule, et la deuxième présente les fonctions hydrophiles utilisées pour la solubilisation et la stabilité.

1.3.4 La fonction d'accroche

Plusieurs fonctions chimiques peuvent s'accrocher sur une nanoparticule d'oxyde de fer, par complexation de la surface ou formation de liaisons covalentes. Lorsqu'une stabilité prolongée est recherchée, des fonctions d'ancrage fortes sont souhaitées. Les acides carboxyliques, les catéchols, les silanes et les phosphonates sont parmi les fonctions chimiques qui se lient le plus efficacement aux nanoparticules d'oxyde de fer.

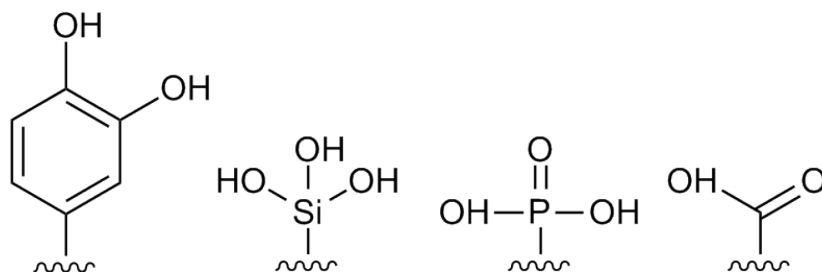


FIGURE 1.26 – Groupes d'ancrage : catéchol, silane, acide phosphonique et acide carboxylique [40].

La surface de l'oxyde de fer est composée d'oxyde ou d'hydroxyles (Figure 1.27), qui peuvent être protonés ou déprotonés en fonction du pH.

Silanes

Des groupes silanes ont une bonne réactivité avec la surface de la nanoparticule car ils réagissent de manière covalente avec les fonctions hydroxyles présentes à la surface de l'oxyde de fer. Cela permet d'atteindre un grand nombre de ligands à la surface de la nanoparticule, de Palma et al. [64] rapportent de 10 à 100 ligands par nm^2 .

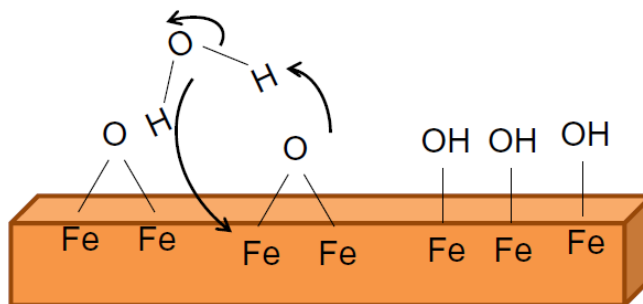


FIGURE 1.27 – Représentation schématique de la surface de la nanoparticule d'oxyde de fer [63].

Carboxylates

Les ions carboxylates se lient efficacement à la surface des nanoparticules, c'est notamment un acide carboxylique, l'acide oléique, qui est utilisé dans la synthèse. L'acide citrique est souvent utilisé pour stabiliser des nanoparticules d'oxyde de fer. Il peut se lier avec une ou deux fonctions carboxylate (Figure 1.28). Mais la liaison n'est pas très forte dans l'eau et les ligands carboxylates sont facilement échangés [65].

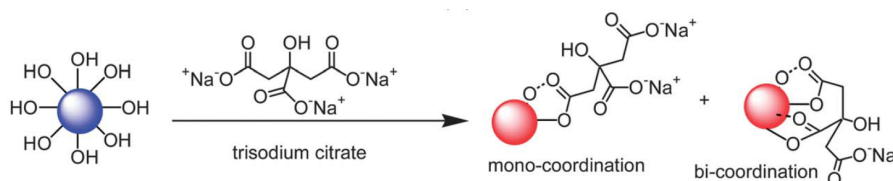


FIGURE 1.28 – L'accroche de citrate sur une nanoparticule peut se faire de façon monodentate ou bidentate [65].

Catéchols

La dopamine et d'autres dérivés du catéchol se lient également efficacement à la surface des nanoparticules magnétiques [88]. Une attention particulière doit être accordée à la nature des groupes substituants sur le cycle catéchol, car elle affecte directement l'affinité de liaison et la densité de greffage en surface, mais aussi la stabilité au pH des groupes d'ancrage. Il a été démontré que les ligands dérivés de la dopamine souffrent de re-protonation et de désorption aux bas pH. En outre, ils sont sensibles à l'oxydation médiée par le fer (III), ce qui entraîne la dégradation et la désorption des particules. La présence de substituants sur le cycle catéchol peut améliorer de manière significative la performance du ligand. En particulier, les dérivés de la 5-nitrodopamine et de la 5-nitroDOPA ont des fonctions d'ancrage beaucoup plus stables que les ligands de la dopamine. Ils se lient préférentiellement aux atomes de surface Fe^{2+} , ce qui les rend plus adaptés aux nanoparticules Fe_3O_4 [66, 65].

Phosphonates

Les phosphonates sont également des groupes d'ancrage très utilisés [67, 68, 69, 70] pour les nanoparticules dans des conditions biologiques grâce à la création de liaisons Fe-O-P, qui sont plus fortes que celles créées avec les acides carboxyliques [65]. La complexation de la surface du fer avec un ligand phosphonate la protège de plus de l'oxydation [71]. Une analyse infrarouge permet de mettre en évidence la formation d'un complexe [72] sans liaison P-OH : il semble donc que le phosphonate se lie à la surface par deux liaisons Fe-O-P, et donc que le complexe formé est au moins bidentate.

La multiplication de la fonction d'accroche

En plus de la sélection de la fonction chimique ayant la meilleure affinité pour la surface inorganique, une stratégie récurrente pour améliorer la stabilité est la multiplication des groupes d'ancrage sur la même molécule, pour bénéficier d'un effet multidentate. L'ajout de plusieurs groupes d'ancrage au ligand augmente son affinité pour la surface de la nanoparticule [73, 74]. Ces groupes multiples peuvent être incorporés de manière aléatoire dans des polymères statistiques, où ils sont intercalés avec d'autres monomères utilisés pour favoriser la solubilité dans l'eau, ou regroupés dans des copolymères à bloc. Les polymères statistiques sont généralement plus faciles à préparer, mais la présence de fonctions d'ancrage dans la couche polymère extérieure peut induire des interactions non spécifiques indésirables avec les biomolécules. De plus, la stabilité des polymères semble être améliorée lorsque les groupes d'ancrage sont regroupés en bloc, par rapport à une distribution statistique aléatoire, sur des nanocristaux de semi-conducteur [75].

Dans le cadre de cette thèse, un bloc de phosphonate a été choisi comme fonction d'accroche pour accrocher un ligand de surface sur les nanoparticules d'oxyde de fer.

1.3.5 La fonction de solubilisation

Plusieurs fonctions chimiques hydrophiles peuvent être utilisées pour assurer la stabilité colloïdale et le contrôle de la couronne de protéines des nanoparticules.

Les polysaccharides

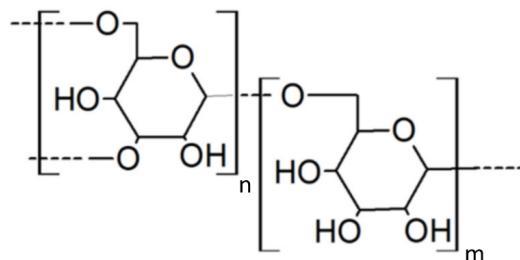


FIGURE 1.29 – Dextran

Les polysaccharides, tels que le dextran, le chitosan et l'amidon, ont été largement utilisés pour stabiliser les nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques. Le dextran a notamment été utilisé pour recouvrir des nanoparticules d'oxyde de fer utilisées comme agent de contraste, comme Feridex/Endorem, Sinerem/Combix et Resovist/Cliavist. C'est un polymère ramifié composé d'unité de glucose (Figure 1.29). Le polymère interagit par plusieurs interactions faibles avec la surface de l'oxyde de fer, via les fonctions hydroxyles. Pour éviter sa désorption trop rapide, il peut être chimiquement réticulé pour former un revêtement covalent autour de la nanoparticule [76]. Les polymères de dextran utilisés ont un poids moléculaire élevé, ce qui crée des nanoparticules avec des rayons hydrodynamiques élevés. De plus les polymères de dextran recouvrent souvent des agrégats de nanoparticules : par exemple l'Endorem est constitué de nanoparticules de 6 à 9 nm de diamètre, mais le diamètre hydrodynamique est compris entre 80 et 150 nm [77].

Le polyéthylène glycol (PEG)

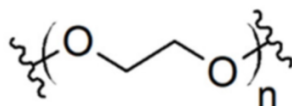


FIGURE 1.30 – Polyéthylène glycol (PEG)

Le polyéthylène glycol (PEG), un polymère composé de monomères d'éthylène glycol ($\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$) (Figure 1.30) est actuellement le ligand le plus utilisé pour les nanoparticules inorganiques dans les milieux biologiques. Il est très hydrophile, ce qui s'explique par la formation de liaison hydrogène entre l'oxygène du PEG et les hydrogènes des molécules d'eau. Grâce à cette grande affinité, les ligands PEG à la surface de nanoparticules inorganiques sont entourés d'eau sur un grand volume, ce qui évite l'agrégation des nanoparticules et limite l'adsorption des protéines. Le poids moléculaire du PEG est un facteur important, généralement une chaîne linéaire de 1 500 à 5 000 g/mol est utilisée [78].

La densité de greffage du PEG a une grande influence sur ses propriétés. Pour une densité faible, la molécule de PEG prend une conformation repliée, appelée "champignon". Avec l'augmentation de la densité de greffage, les chaînes sont forcées de s'étirer et prennent une conformation "brosse", qui permet la résistance à l'adsorption de protéines. Ce phénomène est schématisé Figure 1.31. C'est en conformation brosse que la répulsion des protéines est la plus efficace [78].

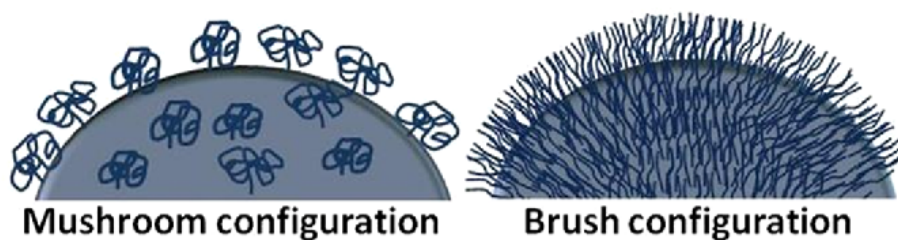


FIGURE 1.31 – Conformation "champignon" (gauche) ou "brosse" (droite) de polymères greffés sur une nanoparticule, d'après [79].

Les zwitterions

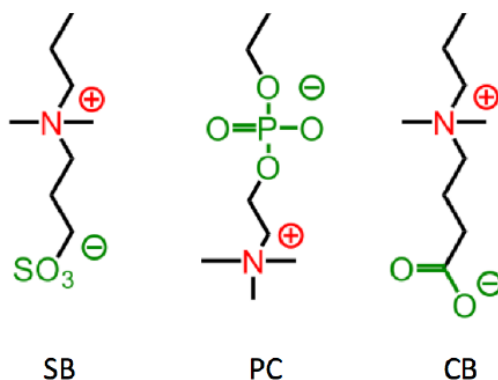


FIGURE 1.32 – Les trois zwitterions les plus utilisés : le sulfobétaïne (SB), le phosphorylcholine (PC) et le carboxybétaïne (PC), d'après [80].

Un zwitterion est composé de deux fonctions chimiques portant des charges opposées et séparées par une petite chaîne alkyle. Cette structure est similaire à celle des têtes polaires de beaucoup de phospholipides présentes dans les membranes de cellules. Les charges positives et négatives forment un dipôle électrique qui attire les molécules d'eau et les aligne [81] (Figure 1.33). Ce phénomène rend les zwitterions très hydrophiles, encore plus que le PEG.

La grande solvation des zwitterions forme une barrière d'énergie à surmonter pour une biomolécule qui voudrait s'adsorber. De manière générale, la diminution de la chaîne alkyle entre les deux charges opposées augmente le caractère hydrophile du zwitterion, ce qui diminue ses interactions hydrophobes avec des biomolécules. Une chaîne alkyle d'un ou deux carbones rend ces interactions quasiment nulles et donc empêche les zwitterions de se lier à la plupart des protéines [82]. Les zwitterions sont donc très efficaces pour éviter la formation de couronne de protéines [83], par exemple pour des quantum dots [84] ou des nanoparticules d'or, étudiées par Yang et al. [85]. Dans cette étude, les zwitterions sont plus efficaces que les PEG pour empêcher la formation de la couronne de protéines. Mais la comparaison entre PEG et zwitterions n'est pas toujours simple car le comportement

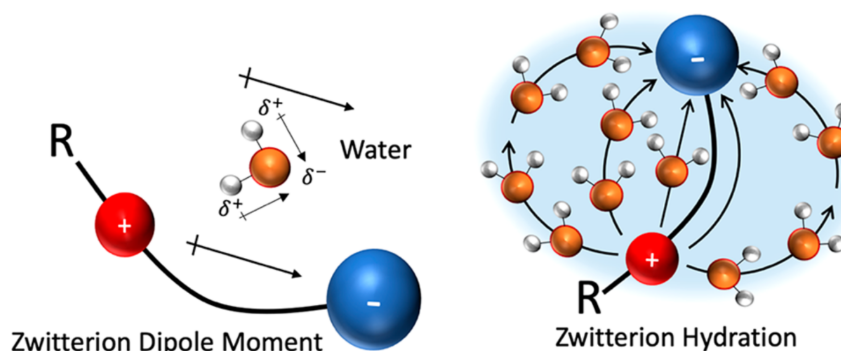


FIGURE 1.33 – Schéma du moment dipolaire créé par un zwitterion et de sa solvatation. Gauche : les charges positives et négatives génèrent un moment dipolaire. Droite : les molécules d'eau s'alignent sur le moment dipolaire du zwitterion [81].

du PEG dépend de sa densité de greffage et de sa masse molaire. L'affinité des zwitterions avec les ions les rend plus solubles quand la force ionique d'une solution augmente, ils portent une charge globale nulle ce qui évite des interactions électrostatiques à longue distance : ils sont donc très stables sur de larges gammes de pH, salinité, et concentration de protéines [57].

Les zwitterions sont souvent utilisés sous forme de polymère, mais peuvent aussi être utilisés en monomère pour obtenir des nanoparticules compactes, ce qui est utile si l'on souhaite par exemple une élimination des nanoparticules par les reins, qui nécessite des nanoparticules de moins de 5 nm de diamètre hydrodynamique [86].

Les zwitterions couramment utilisés dans des applications en nanobiosciences sont le sulfobetaine, le carboxybétaine et le phosphorylcoline (Figure 1.32). Dans notre laboratoire Debayle et al. [87] ont étudié le comportement de ces trois zwitterions sur des quantum dots et ont conclu sur l'absence de couronne de protéines dure et dynamique pour des quantum dots recouverts de polymères sulfobetaines.

Le sulfobetaine sera donc utilisé pour stabiliser les nanoparticules d'oxyde de fer dans le cadre de cette thèse.

1.3.6 Utilisation des ligands pour le ciblage des nanoparticules

Les ligands sont aussi utilisés pour le ciblage actif des nanoparticules. Dans le cadre de cette thèse, il s'agit de cibler une séquence d'ADN, dans d'autres applications il peut s'agir de cibler une tumeur ou un récepteur. Ce ciblage s'effectue le plus souvent via une biomolécule liée de manière covalente aux ligands de la nanoparticule. Les ligands sont pour cela modifiés pour contenir une fonction réactive, qui peut être un acide carboxylique, une amine, un thiol ou un azoture, et qui permet de réaliser une liaison covalente avec la biomolécule d'intérêt.

Il y a plusieurs types de biomolécules utilisées, par exemple des anticorps : l'anticorps anti-EGFR (epidermal growth factor receptor), qui est surexprimé dans beaucoup de cellules cancéreuses [88]. Des petites molécules sont aussi utilisées, comme l'acide folique, qui

cible le récepteur du folate, aussi surexprimé dans des cellules cancéreuses [89], ou la biotine, qui a une très forte affinité avec la protéine streptavidine. Pour cibler la chromatine c'est une protéine qui est utilisée : un facteur de transcription qui se lie spécifiquement sur une séquence précise de l'ADN.

1.4 Conclusion du chapitre - enjeux de la thèse

Ainsi, la première partie de ce chapitre a présenté le génome comme un objet physique complexe, et a illustré l'intérêt de construire de nouveaux outils pour l'étudier. Dans cette thèse un nouvel outil pour appliquer une force sur la chromatine est développé, grâce à une nanosonde magnétique.

La deuxième partie a présenté les nanoparticules d'oxyde de fer, ainsi que leurs propriétés. Dans cette thèse la nanosonde est une nanoparticule de magnétite ou maghémite superparamagnétique, ce qui lui permettra d'appliquer une force sur la chromatine dans un gradient de champ magnétique.

Enfin la dernière partie du chapitre a mis l'accent sur l'importance de la chimie de surface des nanoparticules. En effet, pour être stables, les nanoparticules doivent être fonctionnalisées par un ligand qui permettra de créer une répulsion stérique entre nanoparticules. Le ligand joue aussi un rôle important dans le contrôle de la couronne de protéines qui peut se former autour de la nanoparticule quand elle est dans un milieu biologique. Pour que la nanosonde magnétique puisse cibler l'ADN, il faut éviter qu'elle soit recouverte d'une couronne de protéines, pour être comme invisible dans le milieu biologique. On dit alors qu'elle est furtive.

Différentes fonctions chimiques qui peuvent servir à construire un ligand ont été présentées. Un polymère à bloc a été choisi pour recouvrir la nanosonde magnétique, composé d'un bloc sulfobétaïne pour la stabilité et la furtivité, et un bloc phosphonate pour s'accrocher à la surface de la nanoparticule. Le ciblage de la chromatine se fera par une protéine, un facteur de transcription qui s'accroche spécifiquement sur une séquence précise de l'ADN.

Enjeux

Ainsi, l'enjeu de cette thèse est de construire des nanosondes magnétiques capables d'appliquer une force directement sur la chromatine.

Le premier challenge est de contrôler la chimie de surface des nanosondes. Des ligands sont accrochés à la nanoparticule, et cette accroche doit être forte et stable dans le temps. Les ligands doivent rendre la nanoparticule furtive. Le critère de furtivité est essentiel, car les nanoparticules vont être injectées dans le noyau, et ne doivent pas y créer d'agrégats, pour permettre une détection efficace et une manipulation magnétique propre et précise. De plus il est nécessaire d'éviter la formation d'une couronne de protéine, qui empêcherait la diffusion des nanoparticules dans le noyau jusqu'à leur cible sur l'ADN. Ce critère de

furtivité est difficile à atteindre, car le noyau est un environnement complexe, encombré et chargé. Au LPEM, des études ont été réalisées sur la chimie de surface de nanoparticules de semi-conducteurs fluorescents, les quantum dots [90, 87]. Les zwitterions, et en particulier le suflobétaïne, ont montré des résultats prometteurs : ils permettent aux quantum dots de diffuser librement dans le cytoplasme d'une cellule vivante. Le polymère étudié était un copolymère à bloc avec un bloc d'accroche vinylimidazole. Dans cette thèse l'enjeu est de prolonger ces travaux, pour les adapter aux nanoparticules d'oxyde de fer en changeant le groupe d'accroche, remplacé par un groupe phosphonate, puis d'étudier la stabilité dans le noyau. C'est l'objet du chapitre 2 "Des nanoparticules d'oxyde de fer avec des polymères zwitterioniques comme ligands de surface furtifs".

Une fois des nanoparticules stables et furtives obtenues, le challenge est de les accrocher à l'ADN de manière robuste, spécifique et stable dans le temps, tout en conservant leur stabilité. Il est aussi important de pouvoir les détecter sur l'ADN, et d'estimer leur nombre. Ensuite le défi consiste à appliquer une force mécanique, pour perturber l'organisation du génome et étudier les propriétés de la chromatine. C'est l'objet du chapitre 3 "Les nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de zwitterions pour la micromanipulation magnétique d'un locus génomique".

Dans le chapitre 4 "Étude des interactions de nanoparticules recouvertes de zwitterions avec des macrophages", l'enjeu est de prolonger l'étude de la furtivité à l'échelle supérieure, en s'intéressant au devenir des nanoparticules dans la circulation sanguine.

Chapitre 2

Des nanoparticules d'oxyde de fer avec des polymères zwitterioniques comme ligands de surface furtifs

Sommaire

2.1 Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer	40
2.1.1 Protocole de synthèse	40
2.1.2 Mesure de la taille des nanoparticules	43
2.1.3 Mesure du coefficient d'extinction molaire des nanoparticules	46
2.1.4 Détermination de la phase cristallographique synthétisée	48
2.1.5 Mesure de la magnétisation à saturation des nanocristaux	49
2.2 Synthèse des polymères zwitterioniques	51
2.2.1 Synthèse du premier bloc, le bloc poly(sulfobétaïne)	53
2.2.2 Synthèse du deuxième bloc, le bloc poly(phosphonate)	58
2.2.3 L'ajout d'une fonction réactive sur le polymère	60
2.3 Échange de ligands	64
2.3.1 Décapage de la surface des nanoparticules pour retirer les ligands acides oléiques et rendre les nanoparticules solubles dans l'eau	64
2.3.2 Ajout des polymères zwitterioniques P(SPE-bMAPC1) pour recouvrir la surface des nanoparticules	65
2.3.3 Mesure du diamètre hydrodynamique des nanoparticules avec ligands	67
2.3.4 Mesure de la densité de greffage des polymères sur les nanoparticules	68
2.4 Étude de la stabilité colloïdale et des interactions non spécifiques	73
2.4.1 Stabilité colloïdale	73
2.4.2 Interactions non spécifiques	75

Dans ce chapitre nous allons présenter les nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées avec des ligands sulfobétaïnes, leur synthèse, leur caractérisation, et démontrer leurs propriétés de stabilité et furtivité nécessaires pour leur application en tant que nanosondes magnétiques dans le noyau. Manon Debayle, ancienne doctorante au laboratoire, a travaillé sur les zwitterions comme chimie de surface des quantum dots [87]. Ce travail étend ses résultats aux nanoparticules d'oxyde de fer.

2.1 Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer

Cette partie présente la synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer (IONP), qui seront les nanoparticules magnétiques nécessaires à l'application en tant que nanosonde magnétique.

Le but est de synthétiser des nanoparticules inorganiques avec un moment magnétique élevé et d'une taille de l'ordre de 10 nm afin de ne pas trop encombrer le noyau des cellules à étudier, et que les nanoparticules puissent diffuser librement. Le protocole utilisé pour la synthèse des IONP est un protocole de décomposition thermique à haute température, qui permet d'obtenir des nanocristaux monodisperses avec une bonne cristallinité. Le moment magnétique des nanoparticules peut être augmenté en synthétisant des nanoparticules de taille supérieure.

2.1.1 Protocole de synthèse

La synthèse de nanocristaux d'oxyde de fer est bien maîtrisée depuis plusieurs années. Ici le protocole utilisé est celui de Park [91]. Ce protocole est basé sur la décomposition d'un oléate de fer à haute température dans un solvant à haut point d'ébullition, l'octadécène (Figure 2.1).

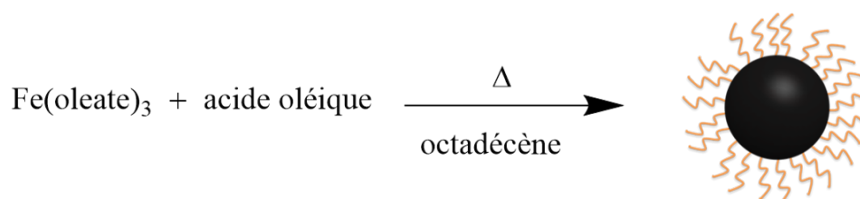


FIGURE 2.1 – Résumé de la synthèse de nanocristaux d'oxyde de fer. Les ligands acide oléique sont représentés en orange.

Synthèse de l'oléate de fer

L'oléate de fer est synthétisé à partir d'oléate de sodium et de chlorure de fer selon le protocole décrit ci-dessous. Étant donné que l'oléate de fer n'est pas stable dans le temps, la synthèse des IONP est réalisée avec un oléate de fer vieux de 2 semaines maximum [92].

Protocole de synthèse du précurseur oléate de fer

40 mmol (10,8 g) de chlorure de fer(III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich), 120 mmol (36,5 g) de sodium oléate (Sigma-Aldrich), 60 mL d'eau distillée, 80 mL d'éthanol et 140 mL d'hexane sont mélangés dans un ballon monocol de 500 mL avec un barreau aimanté. Le ballon est chauffé à 70°C pendant 4h dans un bain d'huile et sous agitation, avec un septum et une aiguille plantée dans le septum pour éviter une surpression à cause des vapeurs d'hexane. Au cours de la réaction, le chlorure de fer initialement présent dans la phase aqueuse se transforme en oléate de fer et passe dans la phase organique. À la fin de la réaction, 50 mL d'hexane sont ajoutés au milieu réactionnel. Afin de retirer le chlorure de fer et l'oléate qui n'auraient pas réagi, la phase organique est lavée plusieurs fois avec 30 mL d'eau distillée dans une ampoule à décanter jusqu'à ce que l'eau soit claire. Lors de l'agitation dans l'ampoule à décanter une émulsion brune peut se former, qui peut être cassée par l'ajout de méthanol. Après lavage, la phase organique est récupérée dans un ballon taré et l'hexane est évaporé à l'évaporateur rotatif. On obtient un liquide noir très visqueux.

Synthèse des nanocristaux

La synthèse des nanocristaux est réalisée en chauffant l'oléate de fer en présence d'acide oléique dans l'octadécène, un solvant à haut point d'ébullition (315°C). Lors du chauffage, l'oléate de fer se dissocie suite à la décarboxylation de l'oléate ce qui permet aux atomes de fer de s'associer pour former les nanoparticules. Pour que la synthèse puisse donner des nanocristaux monodisperses, il faut que les étapes de nucléation et de croissance des nanocristaux soient bien séparées. Ici les deux étapes sont séparées par une rampe de température très lente. La nucléation a lieu vers 240°C avec la dissociation d'un ligand oléate, alors que la croissance a lieu vers 300°C avec la dissociation des deux oléates restants [91]. Le protocole de cette synthèse est décrit ci-dessous, le montage expérimental est décrit Figure 2.2.

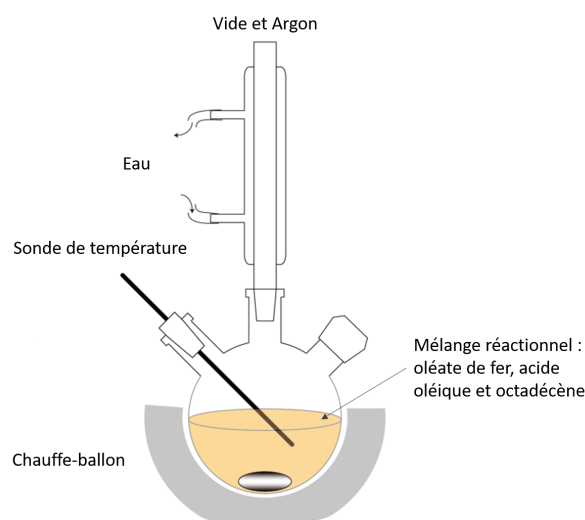


FIGURE 2.2 – Schéma du montage expérimental de la synthèse de nanocristaux d'oxyde de fer.

Protocole de synthèse des IONP

Pour synthétiser des oxydes de fer de 8 nm de diamètre, 5 mmol d'oléate de fer (4,5 g, dans l'hexane), 1,25 mmol d'acide oléique (400 μ L) et 25 g d'octadécène (31,7 mL) sont ajoutés dans un ballon tricol. Le montage expérimental est représenté Figure 2.2. Après dégazage à 30°C, le contenu du ballon est chauffé lentement jusqu'à 320°C selon une rampe de 3,3°C par minute. Le ballon est sous flux d'argon jusqu'à 180°C pour retirer entièrement l'eau et l'hexane restant, puis sous couverture d'argon. Une fois les 320°C atteints, le milieu réactionnel est chauffé à 320°C pendant 30 min. À la fin de la réaction, le ballon est refroidi et son contenu est précipité dans l'éthanol avec de l'acide oléique (5 mL de mélange réactionnel pour 5 mL d'acide oléique et 40 mL d'éthanol). Le précipité obtenu est un solide noir. Les nanocristaux sont ensuite repris dans l'hexane.

Après lavage, on obtient les IONP de la Figure 2.3, observées par microscopie électronique en transmission (TEM) grâce à Xiangzhen Xu au LPEM. Les IONP sont monodisperses, sphériques, et ont une bonne cristallinité, ce qui peut être observé sur l'image de TEM à haute résolution (Figure 2.3b).

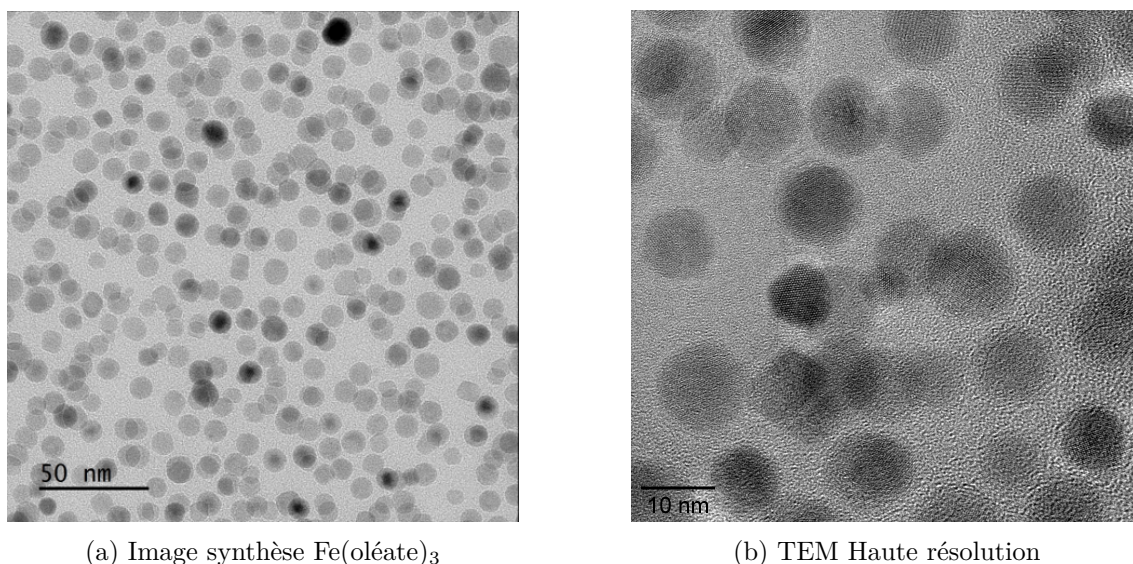


FIGURE 2.3 – Images TEM de synthèses nanocristaux avec Fe(oléate)₃

Un autre protocole a été testé, celui décrit par Sun [93, 94] avec du fer(III) acetylacé-tonate (Fe(acac)₃) comme précurseur. Ce protocole de synthèse n'a pas été retenu car les nanocristaux obtenus n'étaient pas monodisperses (Figure 2.4).

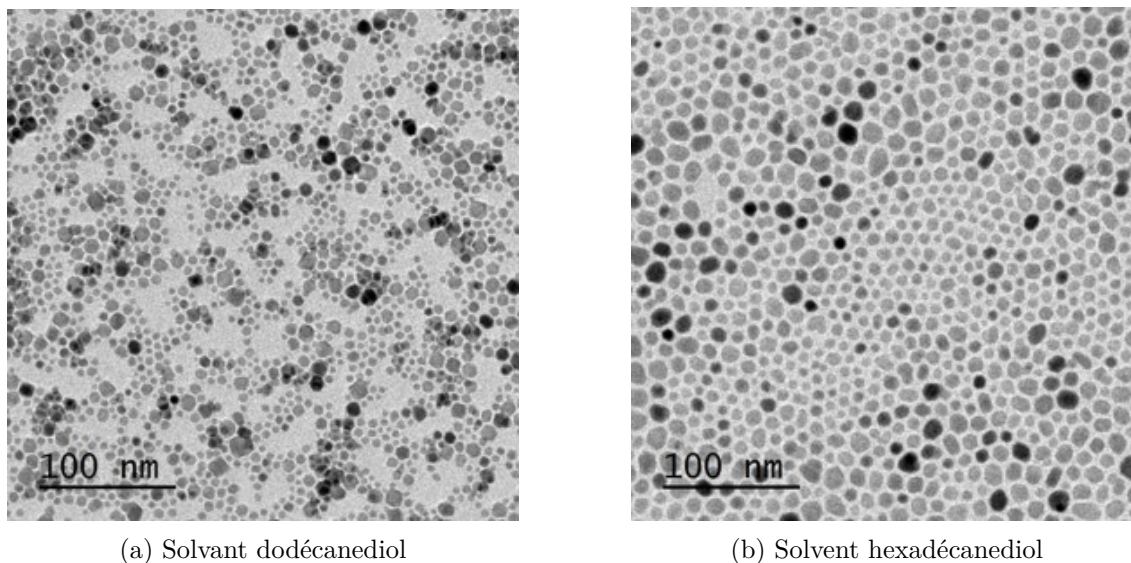


FIGURE 2.4 – Images TEM de synthèses nanocristaux avec du $\text{Fe}(\text{acac})_3$ dans deux solvants

2.1.2 Mesure de la taille des nanoparticules

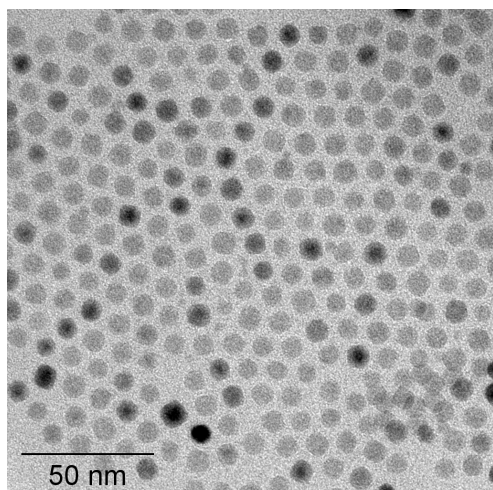
La taille des nanoparticules est mesurée sur les images TEM avec Matlab et la fonction *regionprops* qui détecte des régions sur des images et mesure leurs propriétés. Une distribution de taille est ainsi obtenue.

La Figure 2.5 présente les images TEM et la taille mesurée correspondante pour trois synthèses de IONP synthétisées avec des ratios acide oléique / oléate de fer différents. Plus le ratio acide oléique / oléate est élevé, plus les nanoparticules sont grosses. Ce phénomène a été observé notamment par Park et al. [91], Chen et al. [95] et Hufschimid et al. [96] mais les causes ne sont pas bien comprises. Une quantité supérieure de ligands dans le milieu réactionnel joue sûrement sur la stabilité des noyaux, mais il paraît contre intuitif qu’une plus grande quantité de ligands stabilisent une quantité plus faible de noyaux, amenant à des nanoparticules plus grosses pour la même quantité de fer. Salas et al. [97] suggèrent que l’acide oléique ralentit la formation des noyaux en stabilisant le précurseur, ce qui explique un nombre de noyaux plus faible et des nanoparticules plus grosses.

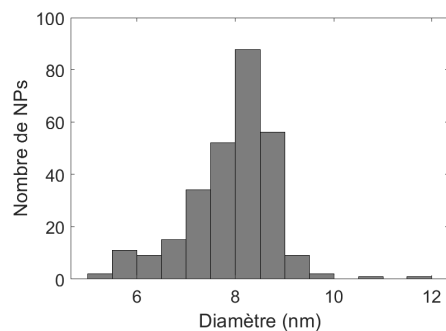
Les nanoparticules présentées Figure 2.5a ont été synthétisées avec un ratio acide oléique/ oléate de fer de 0,25. Le diamètre mesuré sur les images TEM sur 280 nanoparticules est de $7,9 \pm 0,9$ nm. Les nanoparticules Figure 2.5e ont été synthétisées avec un ratio acide oléique/ oléate de fer de 0,91 et sont plus grosses : $17,6 \pm 2$ nm de diamètre, mesuré sur 425 nanoparticules. Les nanoparticules de la Figure 2.5c ont un diamètre de $10,3 \pm 1,7$ nm, mesuré sur 2 566 nanoparticules. Cette synthèse a été réalisée selon le même protocole que les nanoparticules Figure 2.5a, avec un ratio acide oléique/ oléate de fer de 0,25, mais le diamètre obtenu est supérieur. Cela pourrait s’expliquer par l’utilisation d’un autre batch d’oléate de fer, qui était peut-être moins bien lavé et contenait peut-être encore de l’oléate libre, qui pourrait jouer le rôle de l’acide oléique lors de la synthèse et participer à l’augmentation du rayon. Bronstein et al. [98] ont montré que les conditions

de lavage ont une influence sur la structure et les propriétés de l'oléate de fer, et donc sur les nanoparticules produites. Certaines nanoparticules de 17,6 nm de diamètre semblent présenter une structure cœur/coque (Figure 2.5e). Il est possible qu'un cœur de wustite Fe_{1-x}O se soit formé lors de la synthèse. En effet il est reporté que pour des synthèses de nanoparticules de diamètre élevé, avec de l'acide oléique, la formation d'un cœur de wustite est favorisée [99].

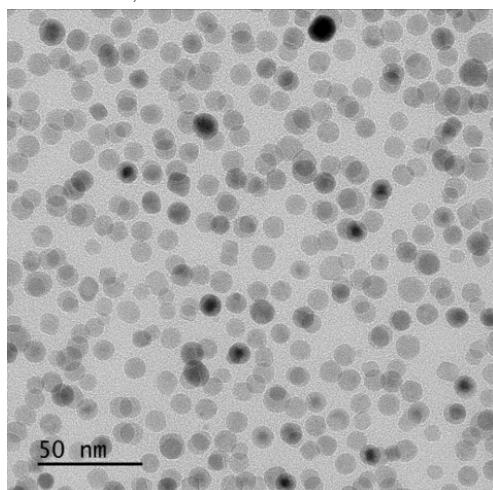
Ce protocole permet ainsi d'obtenir des IONP monodisperses de plusieurs tailles différentes. Dans la suite de ce travail de thèse les nanocristaux utilisés seront ceux de 8 nm (Figure 2.5a) et de 11 nm de diamètre (Figure 2.5c).



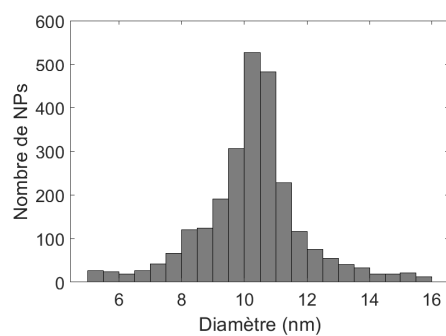
(a) Image TEM, ratio acide oléique/ oléate de fer de 0,25



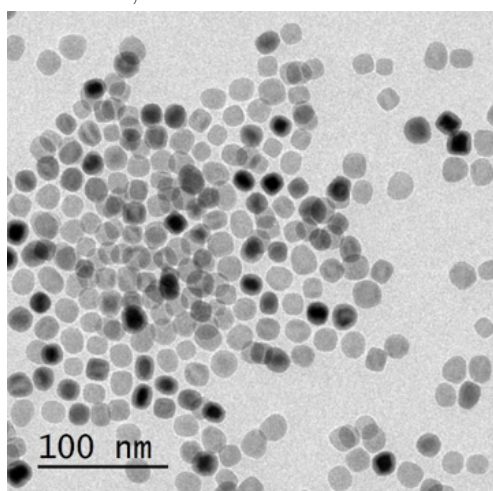
(b) Diamètre $7,9 \pm 0,9$ nm



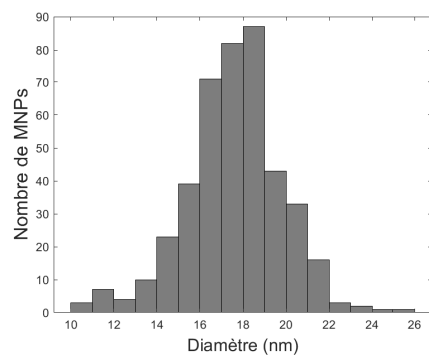
(c) Image TEM, ratio acide oléique/ oléate de fer de 0,25



(d) Diamètre $10,3 \pm 1,7$ nm



(e) Image TEM, ratio acide oléique/ oléate de fer de 0,91



(f) Diamètre $17,6 \pm 2$ nm

FIGURE 2.5 – Différents ratio acide oléique/ oléate de fer donnent différentes tailles de nanocristaux. Image TEM à gauche et histogramme des diamètres à droite.

2.1.3 Mesure du coefficient d'extinction molaire des nanoparticules

Dans la suite de la thèse il sera utile de pouvoir facilement mesurer la concentration en IONP d'une solution. Une méthode de mesure simple, rapide et non destructive est la spectroscopie visible. Plus une solution de IONP est concentrée, plus elle absorbe de la lumière dans le visible. Le spectre d'absorption UV-Visible des oxydes de fer est présenté Figure 2.8. L'absorption est proportionnelle à la concentration selon la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon lc$$

Où A est l'absorbance de la solution, mesurée au spectrophotomètre, ϵ est le coefficient d'absorption molaire, l est la longueur de la cuve dans laquelle se trouve la solution et c la concentration de la solution.

Il convient donc de mesurer ϵ pour les IONP.

Mesure à partir de la masse d'une quantité connue de nanoparticules

La première méthode employée a été de mesurer l'absorbance d'une solution de volume connu puis de la sécher à l'étuve pour en mesurer la masse. Le nombre de nanocristaux dans le volume pesé est estimé avec le diamètre moyen des nanocristaux, et la masse volumique de la maghémite (5.24 g/cm^3). Cette méthode donne une estimation peu précise du ϵ car la masse pesée contient aussi les ligands de surface, et peut aussi contenir des polymères d'octadécène, le solvant de la réaction. En effet, l'octadécène est un hydrocarbure insaturé qui peut polymériser spontanément avec lui-même aux fortes températures atteintes pendant la synthèse. Cette polymérisation forme des polymères qui ont la même solubilité que les nanocristaux stabilisés par les ligands acides oléiques. Ces polymères ne sont donc pas éliminés lors de lavage par précipitation, et sont stockés avec les nanocristaux [100].

Mesure à partir du dosage du fer avec l'orthophénanthroline

Une autre méthode de détermination du ϵ a été utilisée : le dosage précis du fer contenu dans une solution de IONP dissoutes dans l'acide chlorhydrique. Le dosage a été réalisé par la complexation du fer avec l'ophen en présence d'un réducteur, l'acide ascorbique.

L'ophen réagit avec le Fe(II) pour former un complexe stable de couleur rouge orangé, facilement dosable en spectroscopie visible, selon la réaction décrite en Figure 2.6. L'ophen réagit uniquement avec le Fe(II) sans réagir avec le Fe(III) ce qui permet de doser uniquement le Fe(II) dans un mélange. Pour doser la quantité totale de fer dans un échantillon, il faut ajouter un réducteur, comme l'acide ascorbique, qui permet de réduire le Fe(III) en Fe(II).

Dans le cas de l'étude de nanocristaux, ceux-ci sont préalablement dissous dans l'acide chlorhydrique à l'étuve à 60°C , pour que le fer soit libre pour réagir avec l'ophen. Le protocole détaillé est en Annexe 4.3.4.

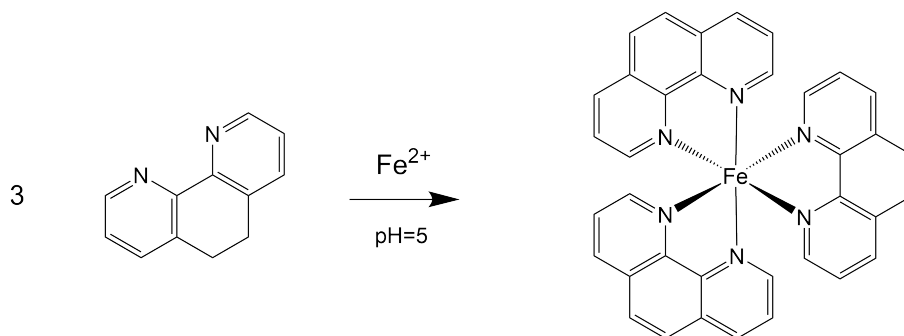


FIGURE 2.6 – Schéma de la réaction entre le Fe(II) et l’ophen, qui produit un complexe rouge orangé.

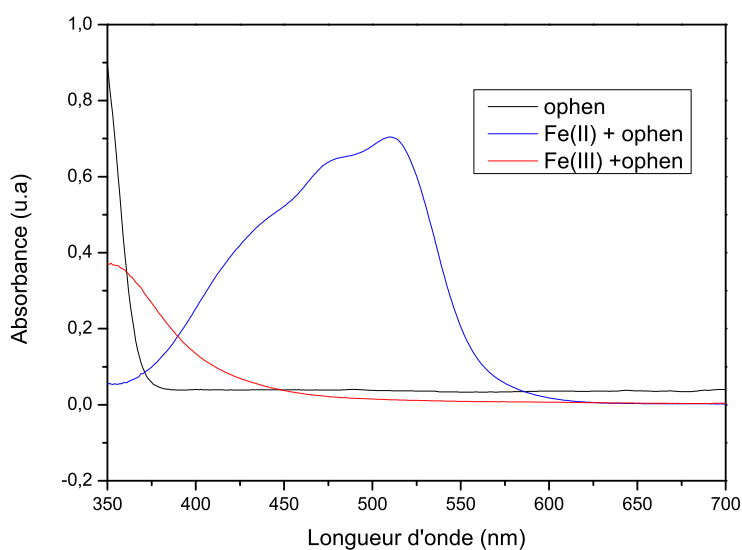


FIGURE 2.7 – Spectre d’absorption du complexe Fe-ophen. On observe que l’ophen ne forme pas de complexe coloré avec le Fe(III).

On trouve un ε deux fois plus élevé avec cette méthode de mesure qu’avec la mesure précédente, de $10 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 400 nm pour les IONP de 8 nm de diamètre.

Mesure à partir du dosage du fer par spectrométrie d’émission atomique à plasma à couplage inductif

Le résultat de la mesure de ε a été confirmé avec une analyse de l’échantillon par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-AES), technique de mesure très précise, par l’équipe de Bich-Thuy Doan, à Chimie Paris. Le dosage du fer par l’ophen permet une bonne mesure de la concentration en fer d’un échantillon car une différence de moins de 5% a été observée avec la mesure en ICP-AES. On en déduit un coefficient d’absorption molaire de $10 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 400 nm, en ayant soustrait l’absorbance à 800 nm, pour les IONP de 8 nm de diamètre. On en déduit par le calcul les coefficients pour les

autres tailles, le ε variant avec le volume de la nanoparticule :

diamètre des NC	ε en $\mu\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 400 nm
7.9 nm	10
10.3 nm	22
17.6 nm	110

TABLE 2.1 – Tableau récapitulatif des coefficients d'absorption molaire pour les nanocristaux (NC) synthétisés.

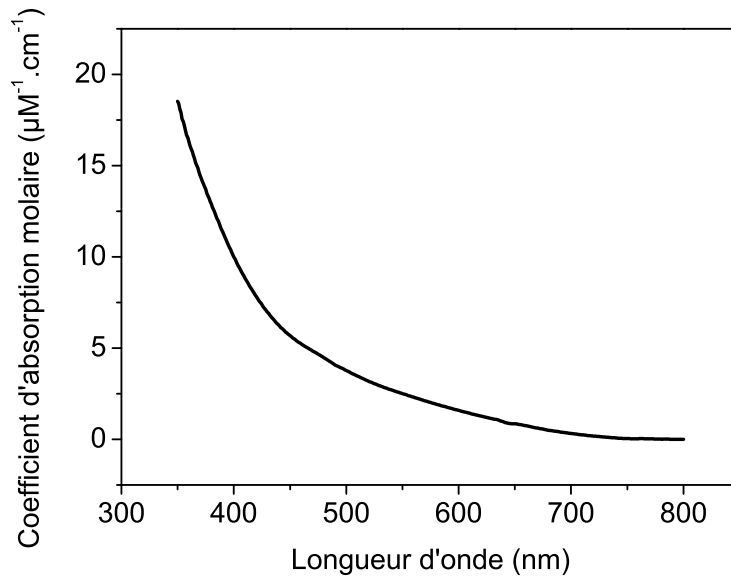


FIGURE 2.8 – Spectre d'absorption des nanocristaux d'oxyde de fer de 8 nm.

2.1.4 Détermination de la phase cristallographique synthétisée

Les IONP synthétisées peuvent être formés de phases cristallographiques différentes : la magnétite et la maghémite. La magnétite (Fe_3O_4) est un mélange de fer au degré d'oxydation II ($\text{Fe(II)}(1/3)$) et de fer au degré d'oxydation III ($\text{Fe(III)}(2/3)$). La maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) est composée uniquement de Fe(III) . Les deux cristaux ont des spectres de diffraction des rayons X, (DRX) similaires car ils ont la même structure spinelle et des paramètres de maille proches, ils ne peuvent donc pas être identifiés facilement par cette méthode. Afin de connaître le type de nanocristaux produits, le ratio de $\text{Fe(II)} / \text{Fe(III)}$ dans les nanocristaux synthétisés a été mesuré via le dosage avec de l'orthophénanthroline (ophen). L'ophen réagit uniquement avec le Fe(II) sans réagir avec le Fe(III) ce qui permet de doser uniquement le Fe(II) dans un mélange.

On observe que, quelques jours après la synthèse, 25 % des ions fer sont des ions Fe(II) pour les IONP de 11 nm de diamètre. Dans la magnétite pure il y a 1/3 de Fe(II) donc cela suggère que l'échantillon est composé de magnétite à 75 %. La mesure est refaite 12 mois

après la synthèse, l'échantillon ne contient plus que 6 % d'ions Fe(II). Pour les IONP de 8 nm de diamètre l'analyse réalisée 8 mois après la synthèse indique 4 % d'ions Fe(II). Ces résultats sont en accord avec ce qui est rapporté dans la littérature : les nanoparticules de magnétite sont très sensibles à l'oxydation et se transforment en maghémite, et ce d'autant plus qu'elles sont petites : les nanoparticules de moins de 8 nm sont composées exclusivement de maghémite [101]. La spectroscopie Mössbauer peut aussi être utilisée pour réaliser cette mesure car elle est sensible au degré d'oxydation des atomes de fer [102].

Il semble donc que, quelques mois après la synthèse, les nanoparticules sont composées majoritairement de maghémite. Ce résultat est confirmé dans la partie suivante grâce à la mesure de la magnétisation à saturation des nanocristaux.

2.1.5 Mesure de la magnétisation à saturation des nanocristaux

La magnétisation à saturation des nanocristaux est mesurée par Magnétomètre à échantillon vibrant (Vibrating-sample magnetometer, VSM). L'échantillon est placé dans un fort champ magnétique qui l'aimante. Son moment magnétique crée un champ qui varie dans le temps quand l'échantillon vibre. Ce champ magnétique induit un courant électrique dans les bobines de détection, qui est proportionnel au moment magnétique de l'échantillon. Les mesures ont été réalisées sur un appareil PPMS (Physical Property Measurement System) Quantum Design sur la Plateforme Mesures Physiques à Basses Températures de Sorbonne Université, par David Hrabovsky. Les mesures ont été réalisées sur des nanocristaux en solution aqueuse tamponnée à pH=7,5 avec un tampon HEPES, ou en solution dans le DMSO. Le changement de solvant des nanocristaux est décrit Partie 2.3. Les échantillons mesurés sont constitués de 8 μ L de solution de concentration connue (environ 10 μ M en nanoparticules) introduits dans une gélule, puis de 8 μ L d'huile de silicone ajoutés au-dessus de la solution pour éviter que le liquide ne bouge ainsi que les fuites.

Les courbes d'aimantation de la Figure 2.9 sont obtenues. Ici la contribution diamagnétique du porte-échantillon, du tube et de l'eau a été estimée en faisant un ajustement de courbe linéaire entre 10 000 et 20 000 (Ersted (Oe), puis a été soustraite. Pour les échantillons dans le DMSO aucune contribution diamagnétique n'est visible (il n'y a pas de baisse du moment magnétique à très fort champ), donc elle n'a pas été soustraite. La courbe de démagnétisation est incluse, il n'y a pas de rémanence de moment magnétique lors de la démagnétisation.

diamètre des NC	Solvant	emu/g	emu/NC
8 nm	tampon HBS	47	$6,6 \times 10^{-17}$
8 nm	DMSO	36	$5,1 \times 10^{-17}$
11 nm	tampon HBS	71	47×10^{-17}

TABLE 2.2 – Moment magnétique de différents nanocristaux d'oxyde de fer

Ces mesures d'aimantation ont été réalisées plusieurs mois après la synthèse des nano-

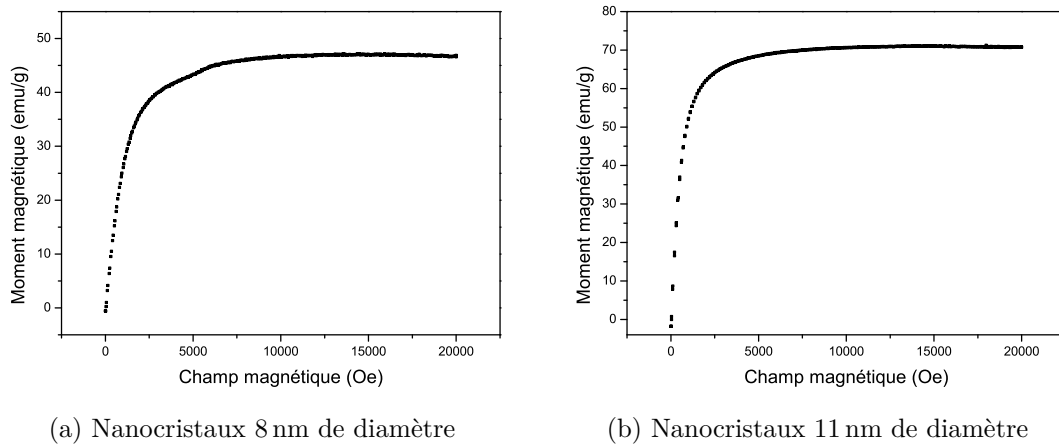


FIGURE 2.9 – Courbe d'aimantation à 310K des nanoparticules.

cristaux, ils sont donc composés majoritairement de Fer(III). L'aimantation à saturation de la maghémite est de 78 emu/g [36]. L'aimantation obtenue est donc proche de l'aimantation à saturation de la maghémite pour les nanocristaux de 11 nm de diamètre, ce qui confirme que ces nanocristaux sont composés de maghémite. Pour les nanocristaux de 8 nm l'aimantation obtenue est faible. Cette diminution est peut-être liée au phénomène spin canting, le non alignement selon le champ magnétique externe des dipôles de surface.

Des mesures similaires ont été réalisées au LPEM grâce à Brigitte Leridon avec un magnétomètre SQUID Quantum Design sur des échantillons de nanoparticules en poudre. Les nanoparticules recouvertes de ligands acides oléiques dans l'hexane, soit la solution stock juste après synthèses, sont séchées dans les gélules porte-échantillon. Des aimantations plus faibles ont été mesurées, de 15 emu/g pour les nanoparticules de 8 nm de diamètre cristallin et 60 emu/g pour les nanoparticules de 11 nm de diamètre cristallin. Cette valeur plus faible peut s'expliquer par la forme du dépôt non homogène qui pourrait induire un moment démagnétisant dans l'échantillon. Les mesures de magnétisation des nanocristaux recouverts de ligands, en solution, sont retenues.

2.2 Synthèse des polymères zwitterioniques

Les nanoparticules ont besoin de ligands pour assurer leur stabilité colloïdale. À la fin du protocole décrit ci-dessus, les IONP sont recouvertes d'acide oléique, qui permet leur stabilisation dans des solvants organiques comme l'hexane. Or pour leur application en tant que nanosondes magnétiques elles vont devoir être stables en milieu aqueux : les ligands doivent donc être changés. En plus de devoir assurer la stabilité colloïdale des nanoparticules d'oxyde de fer en milieux aqueux, les ligands doivent leur permettre d'être stables dans un environnement biologique complexe : le noyau d'une cellule vivante. Pour être efficace en tant que nanosonde, il est nécessaire que la nanoparticule soit aussi furtive, c'est-à-dire qu'elles n'interagissent pas avec son environnement biologique de manière non spécifique. Les zwitterions sont de bons candidats pour satisfaire à ces critères, comme expliqué dans le premier chapitre partie 1.3.5. Il a été démontré dans de précédents travaux [87] que des quantum dots recouverts de ligands zwitterioniques sont furtifs dans le cytoplasme de cellules vivantes. Cette partie va décrire la synthèse de ligands zwitterioniques capables de s'accrocher sur des IONP. Le zwitterion choisi dans le cadre de cette thèse est le sulfobétaïne, car c'est celui qui a montré les meilleurs résultats lors de l'étude de Debayle et al. [87]. Le ligand synthétisé est un polymère à bloc, contenant donc un bloc sulfobétaïne, et un deuxième bloc permettant l'accroche du ligand sur la nanoparticule. Un bloc phosphonate a été choisi comme groupement d'accroche, car il a montré de bons résultats sur des oxydes de fer [69, 103, 68, 104]. Des groupements azotures ou amines sont aussi introduits dans le polymère, en tant que fonctions réactives pour pouvoir ultérieurement ajouter des protéines, fluorophores ou petites molécules sur les polymères. La Figure 2.10 présente un schéma et la formule chimique du polymère utilisé.

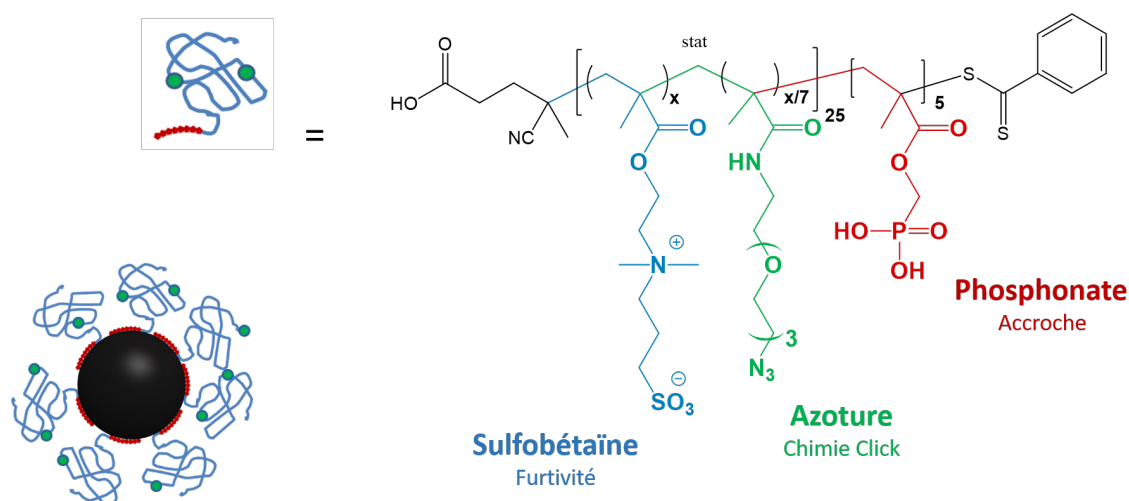


FIGURE 2.10 – Schéma d'une nanoparticule d'oxyde de fer entourée de ligands poly(sulfobétaïne/azoture-bloc phosphonate). Le bloc phosphonate est représenté en rouge sur le schéma, le bloc sulfobétaïne en bleu. En vert est représenté le groupe azoture, réparti statistiquement sur le bloc sulfobétaïne, qui est nécessaire pour la fonctionnalisation du polymère.

Polymérisation RAFT

La polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (en anglais Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT)) est employée pour synthétiser les polymères. Cette technique de polymérisation est utilisée dans le laboratoire depuis quelques années pour synthétiser des polymères zwitterioniques à bloc [105]. C'est un type de polymérisation radicalaire, c'est-à-dire que les réactifs sont des radicaux, des molécules possédant un électron non apparié, donc très réactifs. La polymérisation radicalaire classique, où des monomères radicaux réagissent ensemble pour former un polymère, a l'inconvénient de créer des chaînes de tailles très différentes : deux chaînes de polymères peuvent réagir ensemble ce qui arrête leur croissance. C'est une réaction de terminaison, réaction 5 de la Figure 2.11. Dans la polymérisation RAFT un agent de transfert de chaîne, ou agent RAFT, est utilisé pour contrôler la réaction. L'agent RAFT utilisé ici est un dithioester, espèce 1 de la Figure 2.11. Il réagit avec les chaînes en croissance pour les rendre temporairement inactives, on les appelle dormantes, par une réaction covalente réversible, c'est la réaction 2. Les chaînes dormantes ne peuvent pas subir de réaction de terminaison. La réaction avec le dithioester est réversible, une chaîne dormante peut transférer la fonction dithioester à une chaîne active. Celle-ci devient dormante, et la chaîne précédemment dormante redevient active et peut donc continuer sa croissance. C'est la réaction 4. La proportion des chaînes dormantes est bien plus grande que celle de chaînes actives, et l'équilibre est très rapide, donc toutes les chaînes ont le même temps de vie ce qui leur permet de grandir à la même vitesse et donc d'avoir la même taille. Ce phénomène permet d'avoir une évolution linéaire des masses molaires en nombre en fonction du ratio monomère/ agent RAFT et une dispersion limitée des masses molaires. L'agent RAFT est conservé après lavage du polymère donc chaque polymère peut donc agir comme un macro agent RAFT, ce qui permet de synthétiser un deuxième bloc sur le polymère [106, 107, 108].

$$DP_n = r * \frac{[Monomère]}{[CADB]} \quad (2.2)$$

Expérimentalement, on observe que tous les CADB ne sont pas actifs, ce qui augmente le DP_n , donc la quantité de CADB est choisie telle que :

$$[CADB] = 2 * \frac{[Monomère]}{[DP_{n,visé}]} \quad (2.3)$$

Ce ratio peut avoir besoin d'être ajusté selon le batch de CADB ou le DP_n visé. Debayle et al. [87] ont montré que le comportement des nanoparticules avec des zwitterions est indépendant de la masse molaire du groupe poly(zwitterion) entre 3 000 et 20 000 g/mol. Les masses molaires des polymères synthétisés sont dans cet intervalle.

L'amorçage de la réaction se fait de manière thermique, avec des initiateurs de radicaux qui se décomposent thermiquement en dégageant du diazote. Le 2,2-Azobis(2-méthylpropionamide) dihydrochloride (V50) est utilisé en milieu aqueux et l'azobisisobutyronitrile (AIBN) est utilisé en milieu organique. Ces molécules sont présentées Figure 2.12. La synthèse est réalisée de préférence en milieu organique, dans de l'acide acétique et avec de l'AIBN, car le CADB est plus soluble dans l'acide acétique que dans l'eau. La synthèse peut être réalisée dans l'eau avec du V50 comme initiateur pour des polymères longs, car la concentration de CADB est plus faible. Le schéma de la réaction est présenté Figure 2.13. On utilise 1/5 équivalent d'initiateur pour 1 équivalent de CADB. Ce ratio doit rester faible pour limiter le nombre de chaînes issues de l'amorceur sans agent RAFT. Le protocole de synthèse est décrit ci-dessous. Un monomère méthacrylamide (SPP) peut aussi être utilisé lors de cette synthèse. Sa réaction est plus lente, et pour éviter une hydrolyse du dithioester du CADB le temps de réaction est limité à 4 heures. Le rendement de la synthèse avec le SPP est donc plus bas, le monomère SPE lui est donc préféré. Le polymère obtenu est appelé P(SPE) ou P(SPP), en fonction du monomère utilisé.

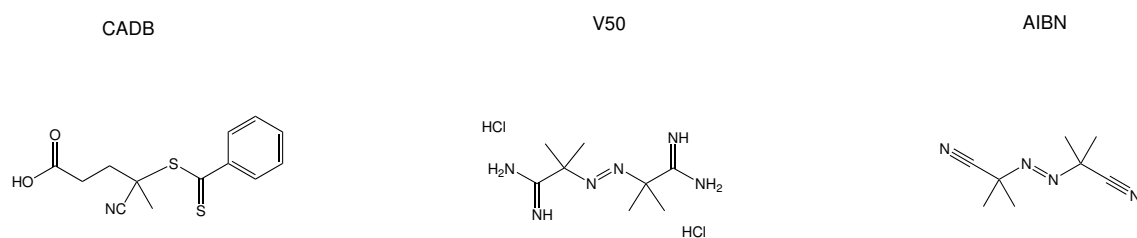


FIGURE 2.12 – Réactifs pour la synthèse de polymère RAFT. Le 4-cyanopentanoïque dithiobenzoate (CADB) est l'agent RAFT. Le 2,2-Azobis(2-méthylpropionamide) dihydrochloride (V50) et l'azobisisobutyronitrile (AIBN) sont les initiateurs de radicaux.

Protocole de synthèse du premier bloc sulfobétaïne : P(SPE)

Le polymère sulfobetaine méthacrylate a été synthétisé par polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (en anglais Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT)) comme décrit dans [105]. Le monomère sulfobetaine méthacrylate (3-((2-(méthacryloyloxy) ethyl) diméthylammonio) propane-1-sulfonate) (6.04 g, 21.6 mmol) est dissous dans 6 mL d'eau ultra pure dans un ballon puis 54 mL d'acide acétique sont ajoutés. L'agent de transfert de chaîne, l'acide 4-cyanopentanoïque dithiobenzoate (CADB) (1.208g, 4,32 mmol) et l'azobisisobutyronitrile (AIBN)(141mg, 0.864 mmol) sont ensuite ajoutés. Le mélange est agité, le ballon monocol est fermé avec un septum, de l'argon est mis à buller pendant une heure pour retirer toute trace d'oxygène dissous, puis chauffé à 70°C dans un bain d'huile pendant 4 heures. Le polymère est ensuite précipité dans l'acétone et purifié par dissolution dans un minimum d'eau puis reprécipité une fois dans l'acétone et une fois dans l'éthanol. Le polymère est enfin séché sous vide et stocké à 4°C jusqu'à utilisation.

La synthèse dans l'acide acétique avec initiateur AIBN est préférée pour des synthèses de polymère court (<5 000 g/mol) pour améliorer la solubilité du CADB dont la concentration est élevée. Pour une synthèse de polymère plus long la concentration en CADB est plus faible donc la synthèse peut être réalisée dans l'eau, avec un tampon acétate à pH=5, pour limiter l'hydrolyse du CADB, et avec du V50 comme initiateur. Il faut alors préalablement dissoudre le CADB dans un volume minimum de NaOH 0,2M pour le déprotoner et permettre sa solubilité dans l'eau. Cette étape doit être rapide car dans l'eau à pH basique le CADB s'hydrolyse vite.

Le rendement de la réaction est typiquement autour de 75 %. Il est estimé en RMN. La Figure 2.14 montre le spectre RMN du monomère SPE, en haut, et du produit de la réaction avant lavage, en bas. Les pics entre 5,5 et 6 ppm sont caractéristiques des alcènes, donc du polymère qui n'a pas réagi. En comparant leur intégration avec celle des autres pics du monomère il est possible de calculer le rendement, ici de 75 %. Ce calcul de rendement est en accord avec le rendement obtenu par pesée du produit sec après lavage. Un élargissement des pics des protons du monomère est visible sur le spectre après réaction, ce qui est caractéristique d'une polymérisation. Un spectre RMN du polymère après lavage et séchage permet aussi d'avoir une estimation du nombre de monomères par chaîne. Il est estimé en calculant le ratio de l'intensité des protons du CADB (h sur la Figure 2.15) avec ceux du sulfobétaïne. Sur la Figure 2.15 un DP_n de 17 est mesuré. Une analyse par chromatographie de perméation sur gel (Gel permeation chromatography, GPC), un type de chromatographie d'exclusion stérique, réalisée par Mohammed Hanafi au laboratoire Sciences et Ingénierie de la Matière Molle (SIMM) permet de conclure sur la masse molaire des polymères synthétisés. Les mesures de masse molaire en nombre obtenues par GPC confirment la validité des mesures par RMN. La technique de polymérisation RAFT permet d'avoir des chaînes de polymères monodisperses en nombre de monomères. La dispersité, définie comme le ratio de la masse molaire moyenne en masse sur la masse molaire moyenne en nombre, $D = Mw/Mn$, mesuré en GPC, est autour de 1.1. Un exemple de profil d'élution de GPC obtenu pour un P(SPE) est présenté Figure 2.16.

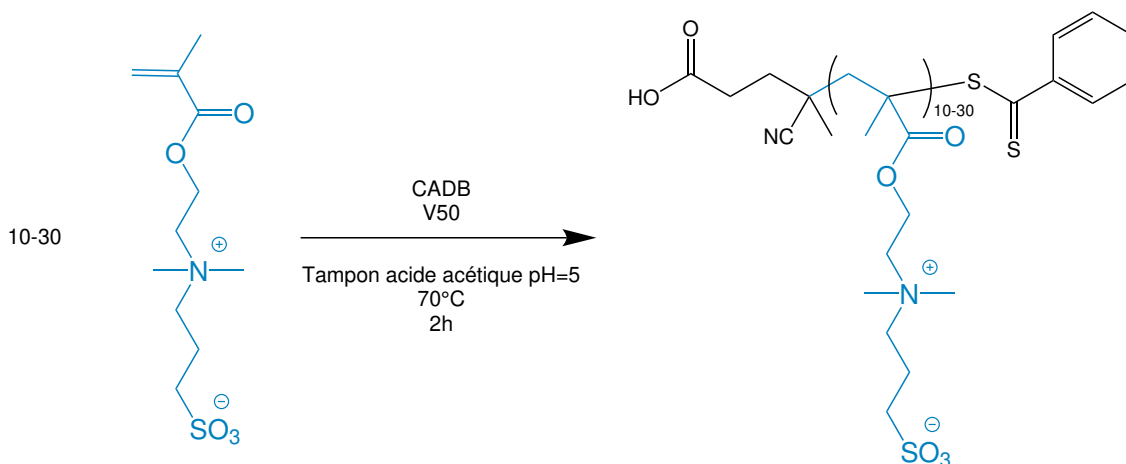


FIGURE 2.13 – Réaction de la synthèse du premier bloc : P(SPE)

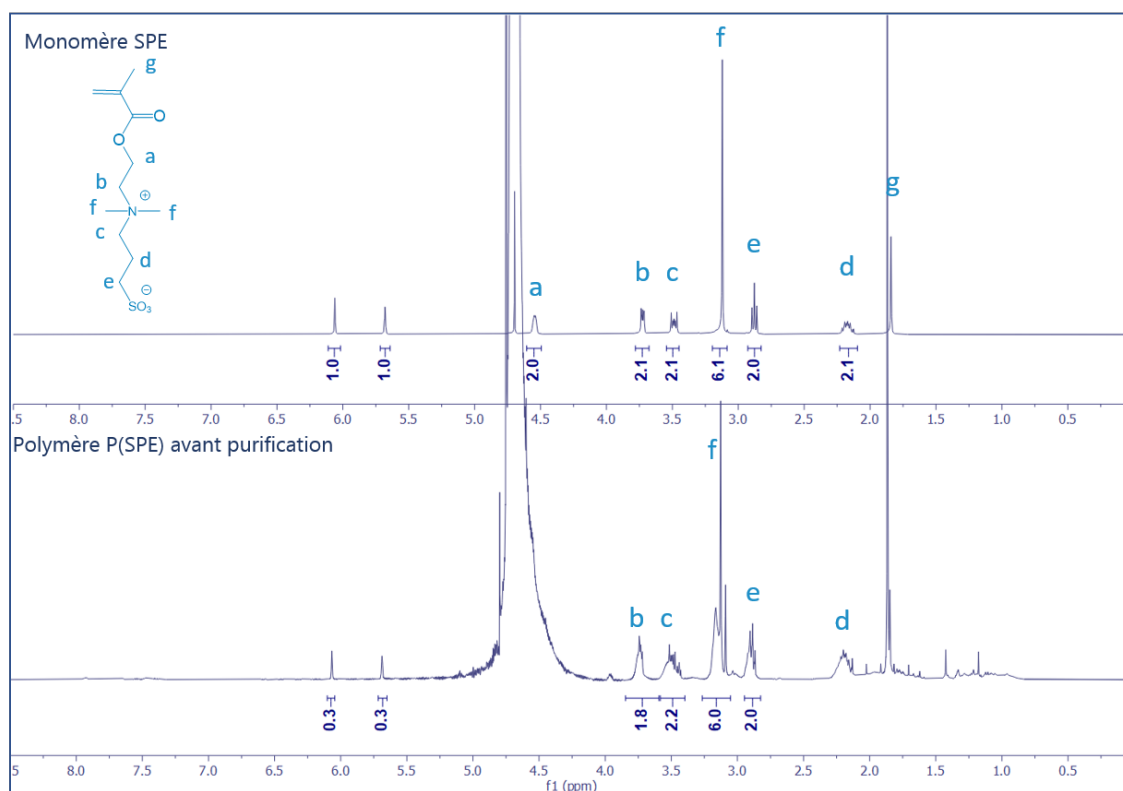


FIGURE 2.14 – Comparaison du spectre RMN du monomère SPE et du polymère P(SPE) avant lavage. Après la polymérisation, on observe un élargissement des pics des protons du polymère, et la diminution des pics des protons alcènes autour de 6 ppm du monomère méthacrylate.

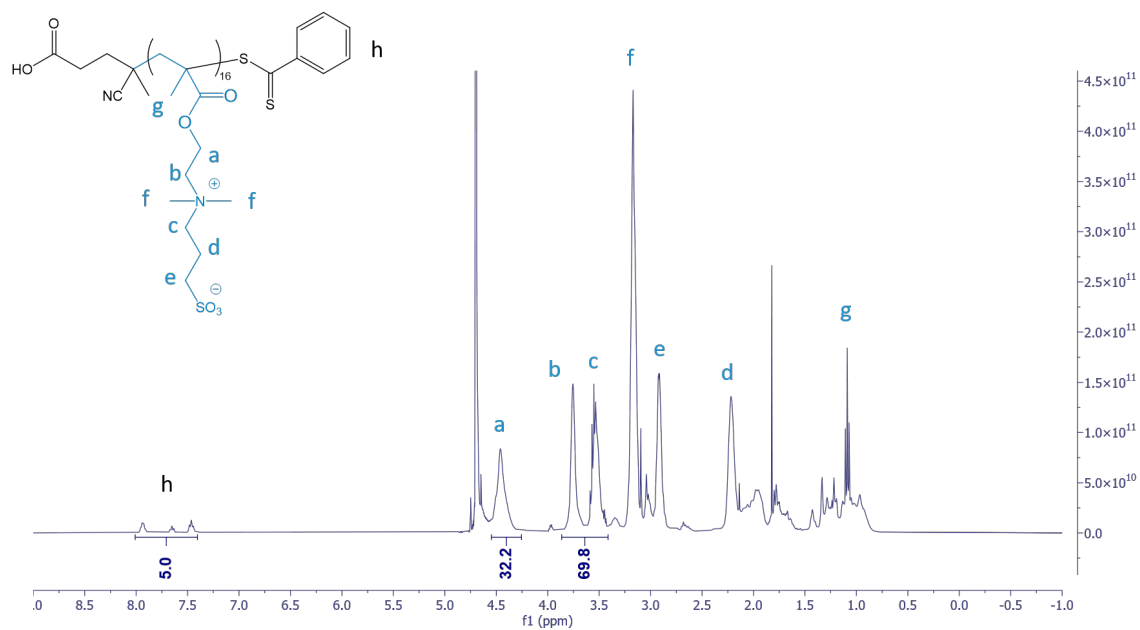


FIGURE 2.15 – RMN du premier bloc P(SPE) après lavage.

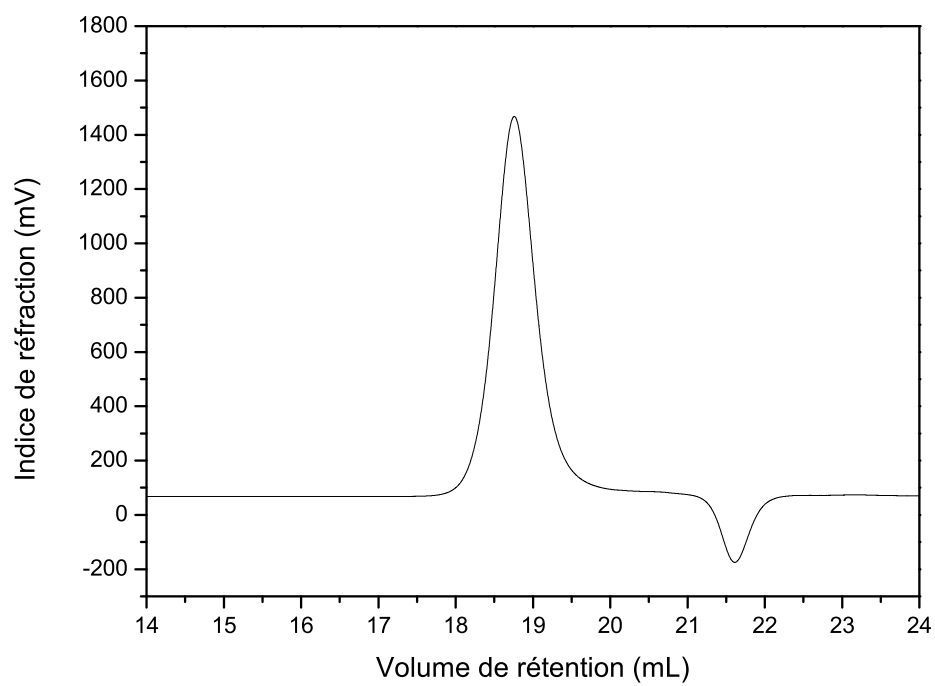


FIGURE 2.16 – GPC du bloc P(SPE) après lavage.

2.2.2 Synthèse du deuxième bloc, le bloc poly(phosphonate)

La polymérisation RAFT permet de faire des polymères à bloc. La deuxième étape de la synthèse est l'ajout d'un deuxième bloc de monomères phosphonate qui vont permettre l'accroche du polymère sur la nanoparticule. Le bloc poly(phosphonate) est composé d'environ cinq monomères phosphonates. On utilise du (methacryloyloxy)methyl acide phosphonique, nommé MAPC1, comme monomère pour la polymérisation comme illustré Figure 2.17. Le polymère poly(sulfobétaïne) avec un bloc phosphonate est nommé P(SPE-b-MAPC1). Le polymère issu de la première réaction joue le rôle d'un macro agent RAFT pour la synthèse du deuxième bloc. Le bon déroulement de la polymérisation est vérifié par RMN. La disparition des protons alcènes du monomère, et l'apparition de protons liés au bloc phosphonate sont visibles sur la Figure 2.18. L'intégration des protons du bloc phosphonate, (i), correspond à 5 monomères phosphonate. L'ajout du deuxième bloc entraîne une augmentation de la masse molaire mesurée en GPC : par exemple un polymère P(SPE) est passé d'une masse molaire moyenne en nombre $M_n=17\ 850$ à $M_n=18\ 560$ g/mol après réaction avec 5 équivalents de monomères phosphonates. Cette différence de masse correspond à l'ajout de 4 monomères ($M_w=180.1$ g/mol). La courbe de GPC de l'indice de réfraction en fonction du volume de rétention est présentée Figure 2.19. La différence de volume de rétention, donc de masse molaire, est visible entre les deux polymères. Le polymère P(SPE-b-MAPC1) a une masse molaire plus élevée, il passe moins de temps dans les pores de la colonne de GPC, donc il sort à un volume plus faible. Le détail du protocole est décrit ci-dessous.

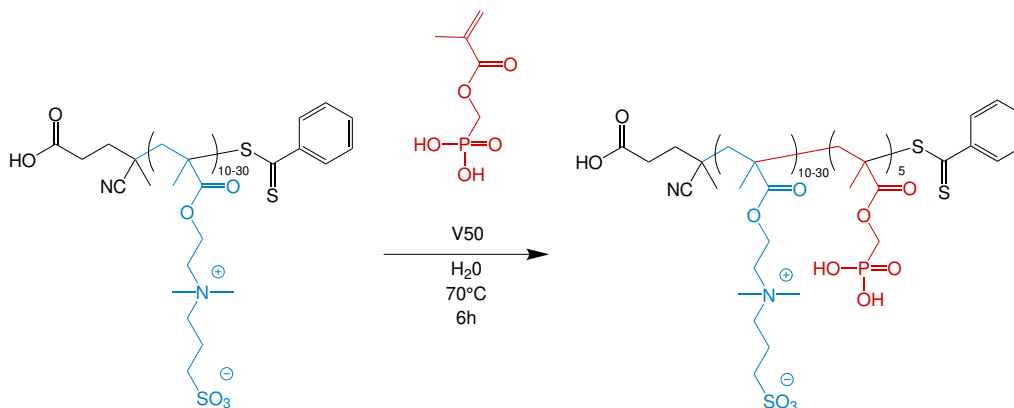


FIGURE 2.17 – Réaction de la synthèse du deuxième bloc, P(SPE-b-MAPC1).

Protocole de synthèse du deuxième bloc phosphonate : P(SPE-b-MAPC1)

1 équivalent du polymère P(SPE) préalablement synthétisé est dissous dans 20 mL d'eau dans un ballon monocol. 5 équivalents d'acide phosphonique methacrylate(MAPC1 acid, Specific Polymers, conservé à 4°C sous argon) (180,1 g/mol) et un équivalent de 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (V50) sont ajoutés. Le mélange est agité et de l'argon est mis à buller pendant une heure, puis le ballon est mis à chauffer à 70°C pendant 6h dans un bain d'huile. Le polymère est ensuite précipité dans l'acétone et purifié par dissolution dans un minimum d'eau puis reprécipité une fois dans l'acétone et une fois dans l'éthanol. Le polymère est enfin séché sous vide et stocké à 4°C jusqu'à utilisation.

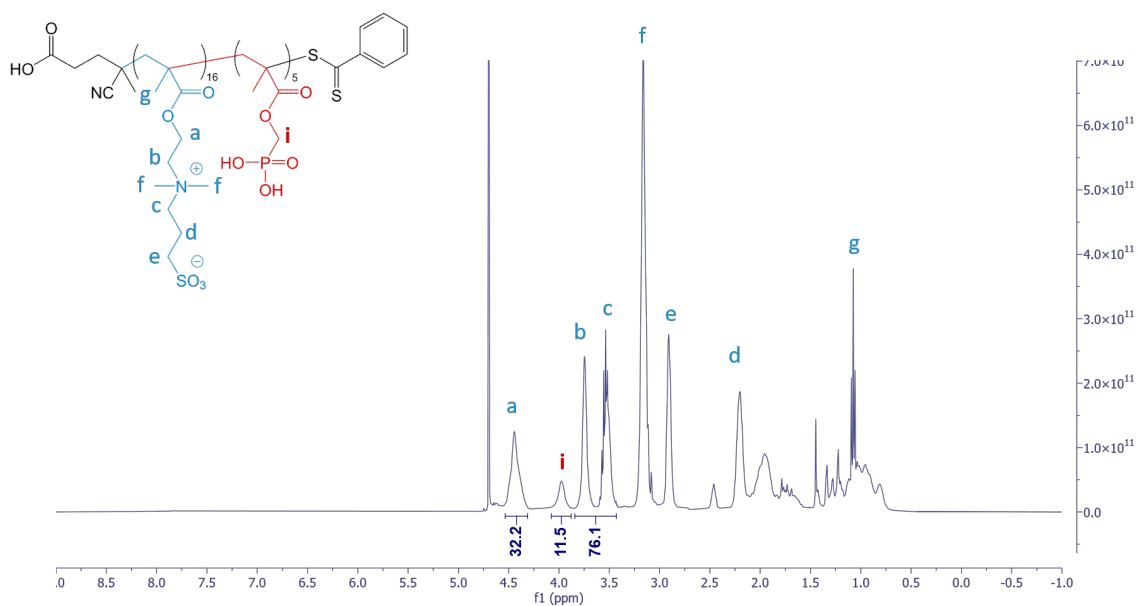


FIGURE 2.18 – RMN du polymère P(SPE-b-MAPC1), après synthèse du deuxième bloc et après lavage.

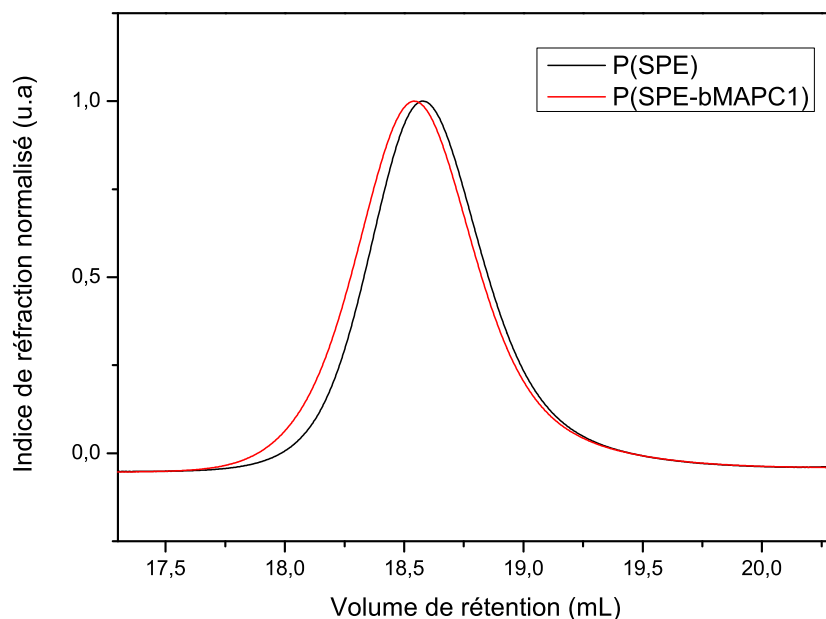


FIGURE 2.19 – Superposition des courbes de GPC du polymère P(SPE) et P(SPE-bMAPC1), soit après la réaction avec le phosphonate.

2.2.3 L'ajout d'une fonction réactive sur le polymère

Les étapes précédentes permettent de synthétiser un polymère à bloc sulfobetaine-phosphonate, P(SPE-b-MAPC1). On introduit des fonctions réactives dans le polymère pour pouvoir greffer des colorants fluorescents et fonctionnaliser les nanoparticules magnétiques avec des protéines pour qu'elles puissent cibler la chromatine. Ces fonctions réactives peuvent être un azoture (N_3) ou une amine primaire (NH_2). La fonction peut être placée à l'extrémité du polymère ou répartie de manière statistique dans la chaîne de sulfobetaine. Les différentes structures de polymères alors obtenues sont présentées Figure 2.20 Ces deux types de polymères ont été synthétisés pour comparer leur efficacité lors de réaction de couplage avec un fluorophore ou une protéine.

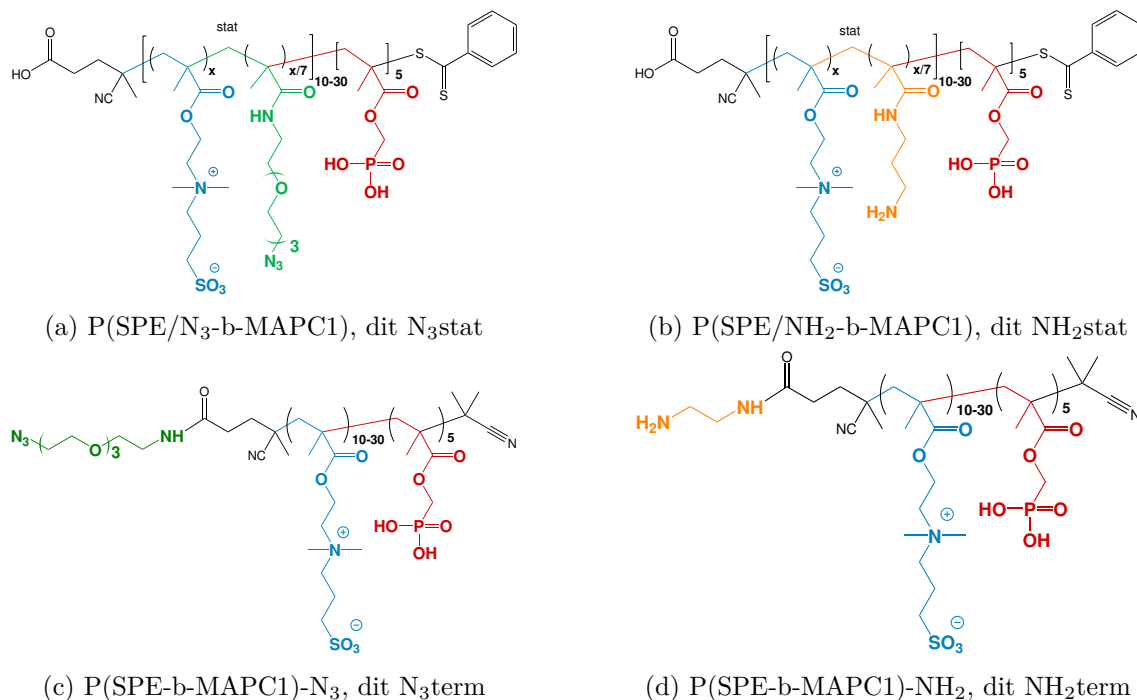


FIGURE 2.20 – Les différents types de polymères, avec la fonction réactive azoture ou amine, répartie de manière statistique dans la chaîne de sulfobétaïne (dit "stat") ou placée à l'extrémité du polymère (dit "term").

Ajout d'une fonction réactive en statistique sur la chaîne sulfobétaïne

Pour la répartition statistique, des monomères possédant une fonction amine ou azoture sont ajoutés dans la première étape de synthèse, et réagissent en même temps que les monomères sulfobétaïnes, selon la réaction Figure 2.22. Le ratio azoture ou amine / sulfobétaïne est fixé à 1/7. Le polymère sulfobétaïne avec des azotures en statistique est noté P(SPE/N₃), celui avec des amines P(SPE/NH₂). Les monomères sont des méthacrylates ou méthacrylamides. Le monomère amine, N-(3-Aminopropyl)méthacrylamide hydrochlorure, est disponible commercialement, le monomère azoture doit être synthétisé.

La synthèse du monomère azoture se fait en ajoutant un méthacrylate sur la molécule 11-azido-3,6,9-trioxaundécane-1-amine (NH₂-PEG-N₃). Le chlorure d'acyle de l'acide méthacrylique, le méthacryloyle chloride, réagit sur l'amine pour créer une fonction amide selon une réaction de Schotten-Baumann (Figure 2.21).

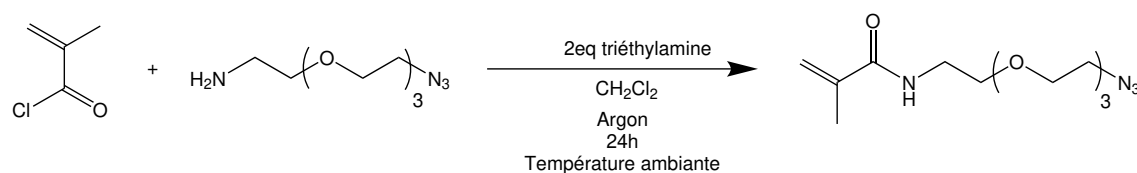


FIGURE 2.21 – Schéma de la réaction de la synthèse du monomère azoture méthacrylate.

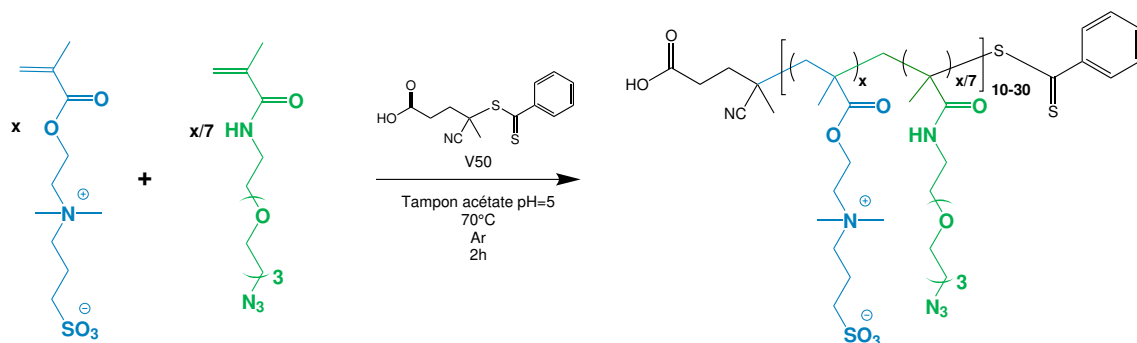


FIGURE 2.22 – Réaction de synthèse du premier bloc avec ajout d'un monomère azoture en statistique, P(SPE/N₃).

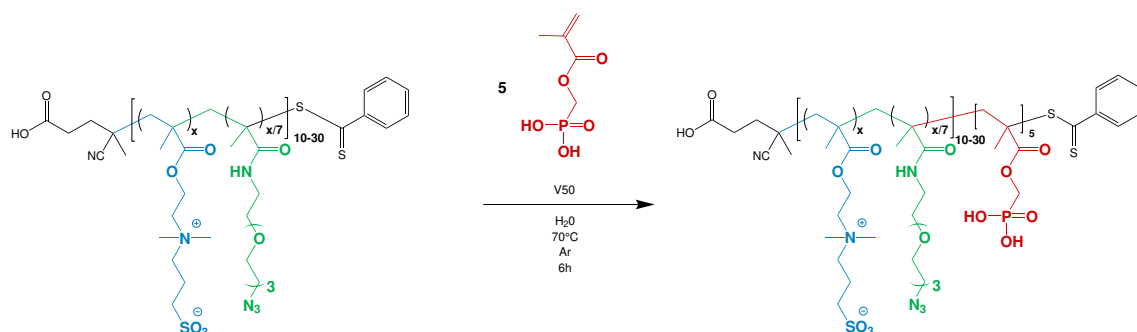


FIGURE 2.23 – Réaction de synthèse du deuxième bloc sur le bloc avec le monomère azoture en statistique, P(SPE/N₃-b-MAPC1).

Protocole de synthèse du monomère méthacrylamide azoture

1 équivalent de 11-azido-3,6,9-trioxaundécane-1-amine (NH₂-PEG-N₃) (Sigma) (218,25 g/mol, 0,5g, 2,3 mmol), 1 équivalent de méthacryloyle chlorure (104,535 g/mol) et 2 équivalents de triéthylamine (101,19 g/mol, 4,6 mmol, 641 µL), et 20 mL de dichlorométhane, anhydres, sont mis dans un ballon purgé avec de l'argon et fermé par un septum, avec une seringue. La triéthylamine sert à capter l'acide chlorhydrique et à éviter son dégagement sous forme gazeuse. La réaction dure 24 heures, sous agitation et à température ambiante. Une chromatographie sur colonne de silice est ensuite réalisée pour purifier le produit. L'éluant est un mélange dichlorométhane 10 : 0,2 méthanol. La chromatographie sur couche mince est utilisée pour détecter la fraction dans laquelle est le produit. Le solvant est ensuite retiré à l'évaporateur rotatif, et le monomère est stocké à 4°C jusqu'à utilisation.

Protocole de synthèse P(SPE/N₃) ou P(SPE/NH₂)

Pour ajouter une fonction amide ou azoture en statistique dans le bloc zwitterion, 1 monomère amine ou azoture pour 7 monomère sulfobétaïne est ajouté lors de la synthèse du premier bloc. Le monomère azoture est celui préalablement synthétisé, le monomère amine est le N-(3-aminopropyl)méthacrylamide hydrochloride (Sigma-Aldrich)

Protocole de synthèse P(SPE/N₃-b-MAPC1) ou P(SPE/NH₂-b-MAPC1)

Le protocole de synthèse des polymères P(SPE/N₃-b-MAPC1) et P(SPE/NH₂-b-MAPC1) est le même que celui de la synthèse du polymère P(SPE-b-MAPC1), en remplaçant le P(SPE) par du P(SPE/N₃) ou P(SPE/NH₂). Soit : 1 équivalent du polymère P(SPE/N₃) ou P(SPE/NH₂) préalablement synthétisé est dissous dans 20 mL d'eau dans un ballon monocol. 5 équivalents d'acide phosphonique methacrylate(MAPC1 acid, Specific Polymers, conservé à 4°C sous argon) (180,1 g/mol) et un équivalent de 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (V50) sont ajoutés. Le mélange est agité et de l'argon est mis à buller pendant une heure, puis le ballon est mis à chauffer à 70°C pendant 6h dans un bain d'huile. Le polymère est ensuite précipité dans l'acétone et purifié par dissolution dans un minimum d'eau puis reprécipité une fois dans l'acétone et une fois dans l'éthanol. Le polymère est enfin séché sous vide et stocké à 4°C jusqu'à utilisation.

Ajout d'une fonction réactive à l'extrémité du polymère

Pour ajouter une fonction réactive à l'extrémité du bloc zwitterion, la fonction acide carboxylique sur l'agent de transfert CADB est utilisée. Cet acide carboxylique peut réagir avec une amine par une réaction peptidique. La réaction peptidique a été fréquemment utilisée au cours de cette thèse, son fonctionnement est décrit en Annexe 4.3.4. La fonction acide carboxylique est activée au carbodiimide, avec du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et du N-hydroxysuccinimide (NHS). La molécule utilisée est soit de l'éthylène diamine pour avoir une fonction amine terminale, ou le 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine pour avoir une fonction azoture. Pour éviter une compétition avec la fonction dithioester lors de cette réaction, elle est d'abord supprimée par réaction radicalaire avec de l'AIBN en excès (Figure 2.24). L'efficacité de cette réaction est contrôlée par RMN, avec la disparition des protons du groupe phényle entre 7,5 et 8 ppm. Le protocole des réactions est décrit ci-dessous.

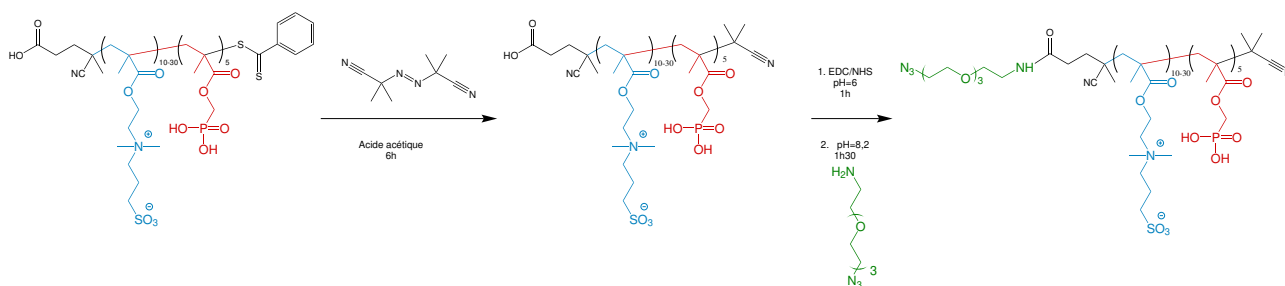


FIGURE 2.24 – Schéma de la réaction de la synthèse du polymère avec l'azoture en position terminale.

Protocole synthèse du polymère P(SPE-bMAPC1)-N₃ ou P(SPE-bMAPC1)-NH₂

Pour retirer le groupe dithioester, le polymère est d'abord dissous dans 1 mL d'eau dans un ballon monocol puis 50 équivalents d'AIBN et 8 mL d'acide acétique sont ajoutés. Le volume d'acide acétique peut être augmenté si l'AIBN ne se dissout pas bien. Le mélange est agité, le ballon monocol est fermé avec un septum, de l'argon est mis à buller pendant une heure pour retirer toute trace de dioxygène dissous, puis chauffé à 70°C dans un bain d'huile pendant 4 heures. Le polymère est ensuite précipité dans l'acétone et purifié par dissolution dans un minimum d'eau puis reprécipité une fois dans l'acétone et une fois dans l'éthanol. Le polymère est enfin séché sous vide et stocké à 4°C jusqu'à la prochaine étape.

Ajout de la fonction réactive par réaction peptidique :

10 équivalents d'EDC et de NHS sont ajoutés dans une solution contenant le polymère avec un tampon MES à pH=6 100 mM MES/150 mM NaCl. Après une heure de réaction à température ambiante l'acide carboxylique est activé, donc l'éthylène diamine ou le NH₂-PEG-N₃ (Sigma Aldrich) peut être ajouté. Mais la fonction amine doit être déprotonée pour pouvoir réagir, donc le pH doit être basique, mais pas trop basique, car cela augmente la cinétique d'hydrolyse de l'acide carboxylique activé. Un pH à 8,2 est le meilleur compromis. Le pH est donc ajusté à 8,2 avec un tampon HEPES. Après 2 heures de réaction le polymère est précipité trois fois dans l'acétone pour être purifié, puis séché sous cloche à vide avant stockage à 4°C jusqu'à utilisation.

2.3 Échange de ligands

Lors de la synthèse des IONP, celles-ci sont stabilisées par de l'acide oléique. C'est ce qui leur donne leur stabilité colloïdale lorsqu'ils sont stockés dans l'hexane. Ces ligands acides oléiques permettent la solubilisation et la stabilité dans un milieu apolaire mais non dans un milieu aqueux, il faut donc procéder à un échange de ligands afin de retirer les ligands acides oléiques et mettre les ligands zwitterioniques, qui permettront aux IONP d'être stables dans l'eau et furtives dans les milieux biologiques. Le protocole est schématisé Figure 2.25. Il consiste en deux étapes : dans la première, les ligands acides oléiques sont complètement retirés de la surface de la nanoparticule, puis dans la deuxième, les poly(zwitterion-b-phosphonate) sont attachés à la surface des nanoparticules.

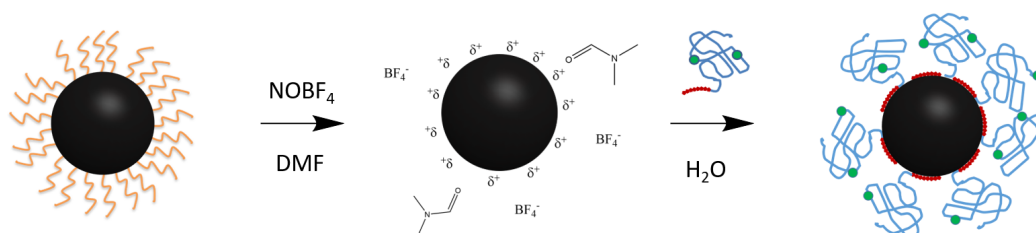


FIGURE 2.25 – Schéma du protocole d'échange de ligands.

2.3.1 Décapage de la surface des nanoparticules pour retirer les ligands acides oléiques et rendre les nanoparticules solubles dans l'eau

La première étape est issu du protocole de Dong et al. [109]. Le principe est de décaper la surface des nanoparticules avec du nitrosonium tetrafluoroborate (NOBF₄) pour retirer

les ligands acides oléiques. Les nanoparticules dans l'hexane sont mises en contact avec le NOBF_4 dans le diméthylformamide (DMF). Les deux solvants ne sont pas miscibles, deux phases se forment. Les ions NO^+ réagissent avec des molécules d'eau présentes en petite quantité dans le milieu pour former de l'acide nitreux, HNO_2 , $\text{pK}_a=3,4$. Dong et al. [109] font l'hypothèse que cette acidification entraîne la reprotonation des molécules d'acide oléique qui sont sous forme oléate pour réagir avec la surface de la nanoparticule, et que cette reprotonation cause le départ du ligand de la surface de la nanoparticule. Les nanoparticules se retrouvent alors sans ligands avec juste des charges de surface dues aux ions fer, et migrent dans le DMF. Le DMF très polaire et les ions BF_4^- vont alors se mettre autour des nanoparticules et les stabiliser, comme illustré Figure 2.25. Après lavage les nanoparticules sont stockées dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et sont stables plusieurs mois.

Protocole de décapage des nanoparticules

4 nanomoles d'IONP dans l'hexane sont lavées pour retirer l'excès d'acide oléique par addition de 1 mL d'éthanol suivi de centrifugation. Les nanoparticules sont ensuite resuspendues dans l'hexane. Sont ensuite ajoutés 500 μL d'une solution de nitrosonium tétrafluoroborate (NOBF_4) à 25 mg/mL dans le diméthylformamide (DMF). Deux phases se forment. Le mélange est agité doucement pendant 12h. Les nanoparticules une fois décapées passent de la phase supérieure hexane à la phase inférieure DMF. Après trois lavages avec une solution 50/50 toluène/hexane suivis de centrifugation, les 4 nanomoles de nanoparticules sont resuspendues dans 100 μL de diméthylsulfoxyde (DMSO) dans lequel elles sont stables pour plusieurs mois.

2.3.2 Ajout des polymères zwitterioniques P(SPE-bMAPC1) pour recouvrir la surface des nanoparticules

Afin d'ajouter les ligands zwitterioniques les nanoparticules sont redispersées dans une solution d'eau ultrapure contenant les polymères en excès. Le phosphonate est une espèce acide : il possède deux acidités, avec un pK_a autour de 3 pour la première et de 5-6 pour la deuxième [68]. L'interaction entre les phosphonates et la surface d'une nanoparticule d'oxyde de fer est favorisée par des interactions électrostatiques, [104, 67]. Les groupes phosphonates négativement chargés sont attirés par la surface de la nanoparticule de fer positivement chargée. Pour que cette interaction se fasse il faut donc être à un pH supérieur au premier pK_a du phosphonate, pour qu'ils soient chargés négativement, et inférieur au point isoélectrique des nanoparticules, pH où le potentiel zêta est nul car il y a autant de charges positives que négatives à la surface de la nanoparticule. Pour des IONP non fonctionnalisées ce point est autour de $\text{pH}=7$ [104].

Le pH lors de l'échange doit donc être situé entre 2 et 7. Cette situation est résumée Figure 2.26. La solution de polymères dans l'eau possède une acidité autour de $\text{pH}=3,5$, ce qui convient. Aucun tampon n'est ajouté à cette étape car les nanoparticules ne sont pas stables dans une solution salée, qui sûrement écrantent les charges responsables de la stabilité des nanoparticules. Le mélange est soniqué pendant 5 min puis le pH est remonté jusqu'à 7.5 par ajout de gouttes de sodes. En effet au bout de 5 min les ligands phos-

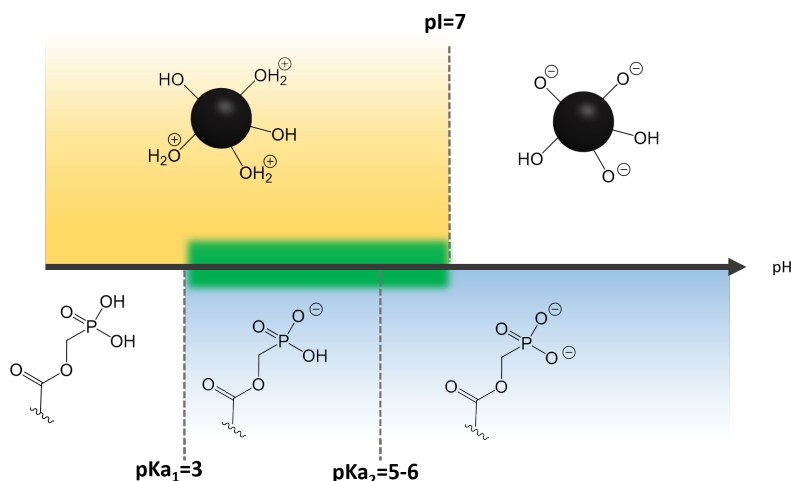


FIGURE 2.26 – Schéma des conditions de pH nécessaires pour la fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer, représentées en vert, selon le point isoélectrique (pI) des nanoparticules non fonctionnalisées et du pKa d'un ligand phosphonate. Adapté de [68].

phosphonates se sont adsorbés sur la surface de la nanoparticule, augmenter le pH permet de totalement déprotoner les phosphonates pour qu'ils puissent finir de s'adsorber à la surface de la nanoparticule.

Après 12 heures de réaction à température ambiante, les ligands ont recouvert la surface des nanoparticules, et elles sont donc stables dans l'eau dans une grande gamme de pH et de salinité. Lors de l'ajout d'eau sur les nanoparticules dans le DMSO leur stabilité diminue, et quelques agrégats se forment. Ils sont retirés par ultracentrifugation sur gradient de saccharose. D'autres protocoles ont été testés pour tenter d'éviter la formation des agrégats, en passant par un petit ligand acide 3-phosphonopropionique (Figure 2.27). Il possède un groupe acide carboxylique déprotoné à pH=7 pour stabiliser les nanoparticules et un seul groupe phosphonate et donc aurait une moins bonne affinité avec la surface que le bloc phosphonate. Il est soluble dans le DMSO et donc peut fonctionnaliser les nanoparticules dans le DMSO et ensuite favoriser leur passage dans l'eau avec l'acide carboxylique. Cette stratégie n'a pas permis de diminuer le nombre d'agrégats après échange et n'a donc pas été retenue.

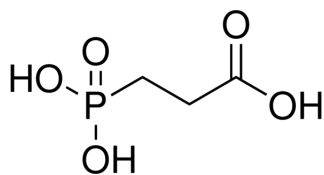


FIGURE 2.27 – Acide 3-phosphonopropionique

Protocole d'ajout des polymères P(SPE-bMAPC1)

Pour ajouter le ligand poly(zwitterion-b-acide phosphonique), 10 mg du polymère poly(zwitterion-b-acide phosphonique) préalablement synthétisé est dissous dans 1 mL d'eau ultrapure. Cette solution est ajoutée à 4 nanomoles de nanoparticules décapées dans le DMSO. Le mélange est trouble et a un pH autour de 3,5. Il est soniqué pendant 5 min puis le pH est ajusté à 7.5 par ajout de quelques dizaines de microlitres d'une solution de NaOH à 0,1M. Le mélange réagit 12 heures à température ambiante. À la fin de la réaction la solution est translucide. Les nanoparticules sont désormais recouvertes par les ligands polymériques et sont stables à tous pH et toute salinité. Lors de l'attache des ligands les nanoparticules passent dans l'eau dans un état de moindre stabilité colloïdale, à ce moment-là des agrégats peuvent se former. Ils peuvent être retirés par centrifugation 10 min à 22 000 g dans une solution salée, mais le mieux pour retirer l'excès de polymères et tous les agrégats potentiels est de trier selon la taille par ultracentrifugation (268,000 g, 25 min) sur gradient de saccharose 10-40 % en masse dans un tampon 100 mM HEPES/Na, 150 mM NaCl, pH=7,5. Les nanoparticules non agrégées forment une bande après centrifugation sur le gradient de saccharose qui est extraite avec un appareil BioComp Instruments, Inc., Fredericton, NB, Canada. L'excès de saccharose est lavé par une série d'ultrafiltration à travers une membrane Vivaspin 100kDa. Les nanoparticules purifiées sont finalement resuspendues dans un tampon 100 mM HEPES/Na, 150 mM NaCl, pH 7.5 et stockée à 4°C jusqu'à utilisation. Le tampon phosphate est évité afin d'éviter une compétition avec les ligands phosphonates.

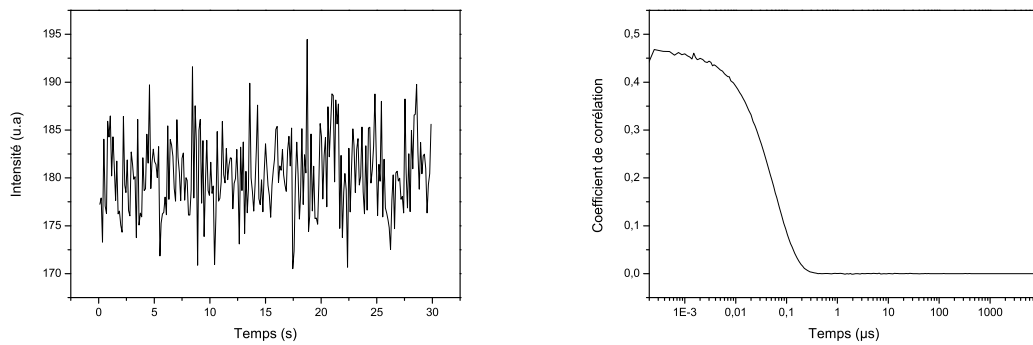
Dans la suite de ce manuscrit, les nanoparticules recouvertes de ligands sont nommées IONP pour "nanoparticules d'oxyde de fer", suivi de son diamètre cristallin (8 ou 11) et du type de polymère avec lequel elles sont fonctionnalisées (N₃ ou NH₂, statistique (s) ou terminal (t)). Par exemple des nanoparticules de 8 nm de diamètre cristallin recouvertes de polymère N₃ statistique sera nommée IONP-8-N₃s.

2.3.3 Mesure du diamètre hydrodynamique des nanoparticules avec ligands

Le diamètre cristallin des nanoparticules peut être mesuré au TEM mais une fois dans l'eau avec les ligands le diamètre apparent est plus élevé. Le diamètre hydrodynamique, issu du coefficient de diffusion, des nanoparticules est mesuré avec la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS pour dynamic light scattering en anglais). Pour les nanoparticules de 8 nm de diamètre cristallin au TEM le diamètre hydrodynamique mesuré en DLS est de 22 nm (Figure 2.29), soit plus du double du diamètre mesuré au TEM. Pour celles de 11 nm de diamètre cristallin, le diamètre hydrodynamique mesuré en DLS est de 28 nm. En DLS, la solution est éclairée par un faisceau laser collimaté et le rayon est déduit des fluctuations temporelles de l'intensité de la lumière diffusée par la solution de IONP et récoltée par un détecteur ponctuel (Figure 2.28a). La fonction de corrélation temporelle de cette mesure est tracée (Figure 2.28b). Un ajustement de cette courbe donne un temps caractéristique, relié au coefficient de diffusion. Le rayon hydrodynamique est ensuite déduit grâce à la relation de relation de Stokes-Einstein :

$$R_H = \frac{k_b T}{6\pi\eta D}$$

avec k_b , la constante de Boltzmann, T , la température et η la viscosité dynamique du milieu.



(a) Fluctuations temporelles de l'intensité

(b) Courbe de corrélation

FIGURE 2.28 – Fluctuations temporelles de l'intensité de la lumière diffusée par la solution de IONP-8-N₃s et la courbe de corrélation temporelle correspondante

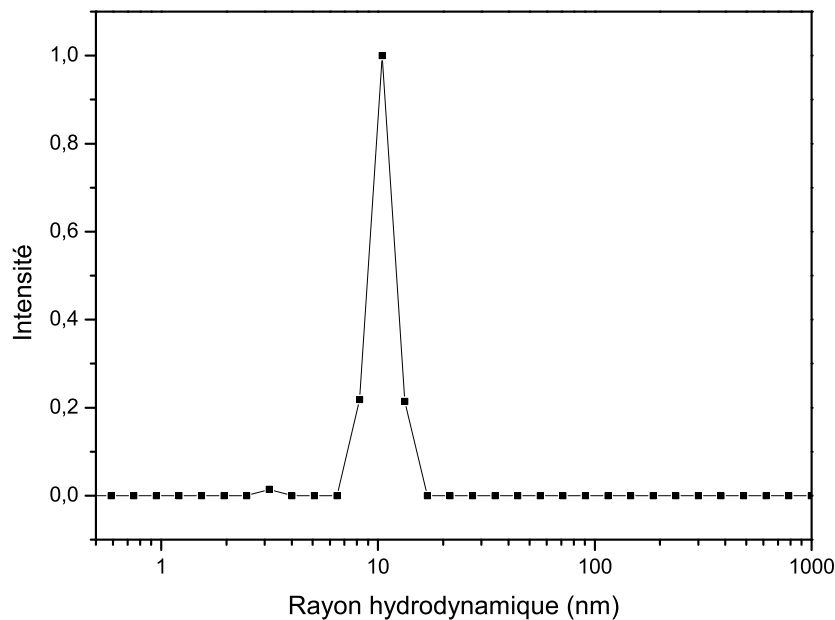


FIGURE 2.29 – Distribution en taille hydrodynamique des IONP-8-N₃s de rayon cristallin 4 nm obtenues par DLS, pondérée par l'intensité de lumière diffusée.

2.3.4 Mesure de la densité de greffage des polymères sur les nanoparticules

Estimation par analyse élémentaire

Les propriétés de stabilité et furtivité des nanoparticules peuvent dépendre de la densité de greffage des polymères à leur surface. Il est possible de la mesurer en utilisant l'analyse élémentaire pour mesurer le nombre d'atomes de fer, soufre et phosphore dans un échantillon de nanoparticules recouvertes de ligands. En effet le soufre et le phosphore sont les seuls éléments du polymère facilement détectables en analyse élémentaire. La technique de Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (Inducti-

vely Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy ICP-AES en anglais) a été utilisée. Les expériences ont été réalisées à l’institut de Physique du Globe avec Laure Cordier.

Protocole de la mesure de densité de greffage par ICP-AES

Les échantillons préalablement en solution dans un tampon HEPES sont lavés quatre fois avec du tampon bicarbonate 5 mM à pH=7,5 par ultrafiltration, pour retirer toute trace d’HEPES qui contient du soufre. Les nanoparticules sont dissoutes dans 50 μL d’acide nitrique pur (65-69 %) et placées pendant une nuit à l’étuve. Les échantillons sont ensuite dilués juste avant la mesure avec de l’acide nitrique à 2 % pour atteindre un volume d’environ 10 mL (mesuré précisément). Les mesures sont réalisées par Laure Cordier sur plateforme d’analyse haute résolution PARI de l’institut de Physique du Globe de Paris, sur une machine Spectrogreen Spectro. Des gammes étalons en fer, soufre et phosphore sont réalisées. Deux échantillons de blanc sont réalisés, un avec seulement de l’acide nitrique à 2 %, et un avec du tampon bicarbonate auquel 50 μL d’acide nitrique pur sont ajoutés, et passé à l’étuve une nuit, comme les nanoparticules. Les intensités sont mesurées pour trois longueurs d’onde pour chaque élément. Les mesures sont réalisées en triplicat.

Analyse des résultats : La concentration massique en chaque élément des échantillons est calculée grâce à la gamme étalon. Le résultat considéré est la moyenne des résultats obtenus pour les triplicats, et pour les trois longueurs d’onde. Les échantillons contenant du polymère seul permettent de mesurer le nombre de phosphore et soufre par chaîne de polymère, après estimation du nombre de chaînes de polymère présente dans l’échantillon grâce à la valeur la masse molaire du polymère mesurée par GPC. Les échantillons contenant des nanoparticules permettent d’estimer une densité de greffage, en nombre de chaînes/ nm^2 ou mg de polymère/ m^2 . Le nombre de nanoparticules est tout d’abord estimé à partir de la concentration massique en fer mesurée par l’échantillon divisée par la masse moyenne d’une nanoparticule, estimée avec la mesure du diamètre cristallin moyen mesuré au TEM, et la masse volumique de la maghémite. Un nombre d’atomes de phosphore et de soufre par nanoparticule peut donc ensuite être déduit.

Tout d’abord différents polymères sont analysés seuls. L’analyse élémentaire donne des résultats cohérents concernant le nombre de soufres et de phosphore par chaîne (Tableau 2.3), en accord avec ce qui a été estimé par RMN du polymère.

masse molaire du polymère (g/mol)	nombre de P par polymère mesuré en RMN	nombre de P par polymère mesuré en ICP	nombre de S par polymère mesuré en RMN	nombre de S par polymère mesuré en ICP
5600	5	5,7	17	17,2
20300	5	3,2	65	63
11000	5	3,1	31	34,6

TABLE 2.3 – Résultats ICP - AES pour des échantillons de polymère seuls.

La densité de greffage du polymère sur la surface des nanoparticules est ensuite estimée. Différents échantillons sont analysés (Tableau 2.4) : de différentes taille de nanoparticules, pour étudier l’influence du rayon de courbure de la surface, et de différentes tailles de polymère, afin d’étudier si le taux de greffage maximum est atteint par encombrement de la surface par le bloc d’accroche phosphonate, ou par l’encombrement stérique des chaînes sulfobétaïnes.

Le Tableau 2.4, qui présente les résultats calculés à partir de l’élément phosphore, suggère que le nombre de chaînes/ nm^2 de surface de nanoparticule est constant, à environ 0,4 chaîne/ nm^2 , et n’est affecté ni par le rayon de courbure de la nanoparticule ni par la

masse molaire du polymère (g/mol)	diamètre de la NP au TEM	nombre de chaînes/nm ² (P)	mg de polymère/m ² (P)
5 600	8 nm	0,38	4,4
5 600	11 nm	0,42	4,9
20 300	8 nm	0,46	12,4
11 000	11 nm	0,46	6,2

TABLE 2.4 – Densité de greffage mesurée par ICP-AES, calculée à partir des résultats du phosphore.

taille de la chaîne de sulfobétaïne. Il semblerait donc que ce soit l'encombrement de la surface de la nanoparticule par le bloc phosphonate qui fixe le taux de greffage.

Mais l'analyse à partir de l'élément soufre (Tableau 2.5) présente un taux de greffage différent, d'environ la moitié de celui mesuré à partir du phosphore.

masse molaire du polymère (g/mol)	diamètre de la NP au TEM	nombre de chaînes/nm ² (S)	mg de polymère/m ² (S)
5 600	8 nm	0,18	1,7
5 600	11 nm	0,08	0,7
20 300	8 nm	0,18	6,2
11 000	11 nm	0,17	3,2

TABLE 2.5 – Densité de greffage mesurée par ICP-AES, calculée à partir des résultats du soufre.

Les résultats de l'analyse du polymère seul ayant montré un ratio P/S conforme à ce qu'il était attendu, il y a donc une différence entre le ratio P/S observé sur le polymère avant et après échange. On se demande s'il y a une dégradation du polymère pendant l'échange, qui entraînerait le départ du groupe sulfonate et expliquerait la diminution de la quantité de soufre mesurée. Pour tester cette hypothèse, un spectre RMN du polymère en excès qui ne s'est pas accroché sur les nanoparticules après l'échange a été réalisé et n'a montré ni appauvrissement en phosphore ni dégradation du polymère.

La raison de la différence de résultat entre le soufre et le phosphore reste donc inexpliquée. Il est possible de retenir que la densité de greffage du polymère sur les nanoparticules est de l'ordre du milligramme par m², ce qui est le résultat trouvé par Debayle et al. [87] lors de l'étude sur les quantum dots. Le taux de couverture de la surface par les polymères est compliqué à calculer car on ne connaît pas la surface qu'un polymère recouvre. Cela dépend de la conformation de la chaîne sulfobétaïne, et du nombre de groupes phosphonates qui s'accrochent sur la surface.

Estimation via le nombre de fluorophore greffables

Pour confirmer ces résultats, une autre méthode a été mise en œuvre pour compter les polymères. L'idée est de faire réagir un excès de fluorophores sur les fonctions réactives des polymères, puis de les compter grâce à leur absorbance. Cela permet de donner une esti-

mation du nombre de fonctions réactives présentes sur le polymère, et donc de polymères. Cette méthode est indirecte et comporte une part d'imprécision, car sur les polymères statistiques on connaît le nombre de monomères de fonctions réactives ajoutés lors de la synthèse, mais pas le nombre exact présent dans le polymère. Pour la fonction réactive en terminale, on ne connaît pas le rendement de la réaction, donc la proportion exacte de polymère possédant la fonction. Cependant cette méthode peut donner une estimation.

Des ligands possédant une fonction réactive azoture ont été utilisés. Ils réagissent avec un colorant FP647, qui absorbe à 647 nm avec un coefficient d'absorption molaire $\varepsilon(647\text{ nm}) = 0.25\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Le colorant est fonctionnalisé avec la fonction dibenzylcyclooctyne (DBCO) et réagit avec l'azoture par chimie click. Le fluorophore FP647-DBCO est préparé à partir d'un fluorophore avec une fonction N-Hydroxysuccinimide (NHS) par couplage peptidique (décrit Annexe 4.3.4) avec une dibenzocyclooctyne-amine (DBCO-NH₂). La synthèse est décrite ci-dessous :

Protocole synthèse de fluorophore FP647-DBCO

100 nmoles de fluorophore FP647-NHS (Interchim) réagissent avec 1 équivalent de (DBCO-NH₂) (Sigma Aldrich) dans 250 μL de DMSO anhydre, pour éviter l'hydrolyse du NHS. La réaction dure trois heures, à température ambiante et protégée de la lumière. Le produit de la réaction est lavé par précipitation dans 1 mL de toluène, puis est repris dans 100 μL de DMSO anhydre, aliquoté à 10 mM et stocké à -20°C .

Le fluorophore modifié DBCO réagit ensuite avec la fonction azoture du polymère accroché sur la nanoparticule, selon la réaction décrite sur le schéma Figure 2.30, selon le protocole décrit ci-dessous.

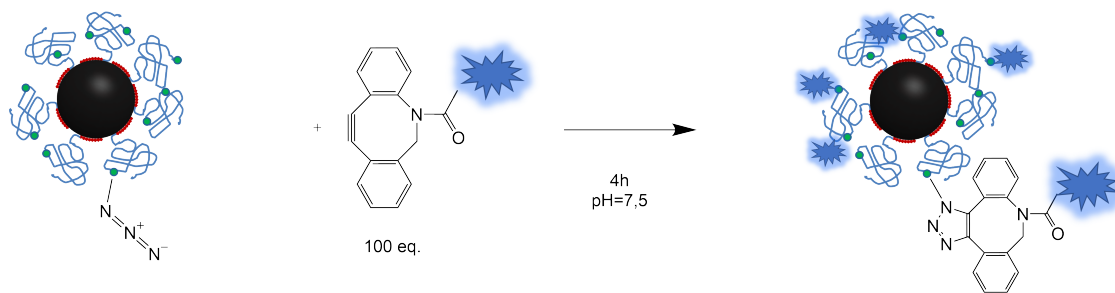


FIGURE 2.30 – Schéma de la réaction des IONP-N₃s avec des fluorophores-DBCO.

Protocole réaction de IONP-N₃ avec un fluorophore DBCO

100 équivalents de fluorophores FP647-DBCO (stocké à -20°C dans le DMSO anhydre à 10 mM) sont ajoutés sur les IONP-N₃ dans un tampon HPS/NaCl 100/150 mM. Après 3 heures de réaction à température ambiante à l'abri de la lumière les IONP-N₃ sont lavés 4 fois par ultrafiltration sur membrane 100 kDa. Le fluorophore en excès passe à travers la membrane, pas les nanoparticules.

Le nombre de fluorophores par nanoparticule est calculé pour trois polymères différents. Le premier a une masse molaire de 10 000 g/mol et possède des azotures répartis de manière statistique sur la chaîne, 1 pour 7 sulfobétaïnes d'après la synthèse. Cela fait environ 28

monomères sulfobétaïnes et 4 monomères azotures par chaîne. Il est appelé polymère N₃ stat. Le deuxième a une masse molaire de 4000 g/mol, soit environ 11 monomères sulfobétaïnes, et possède un azoture à l'extrémité de la chaîne. Il est appelé N₃ term. Le dernier est un polymère avec une amine primaire comme fonction réactive, réparties en statistique sur la chaîne, 1 pour 7 sulfobétaïnes d'après la synthèse. Il a une masse molaire de 13000 g/mol, ce qui fait environ 34 monomères sulfobétaïnes et 6 monomères amines par chaîne. Il est appelé NH₂ stat. Le fluorophore utilisé pour réagir sur l'amine primaire est le FP647-NHS, par couplage peptidique (Annexe 4.3.4). Deux tailles de nanoparticules, de 8 ou 11 nm de diamètre cristallin, sont étudiées.

diamètre des NCs	type de polymère	nb fluorophore	fluorophore/ nm ²
8 nm	N ₃ term	5	0,02
8 nm	N ₃ stat	12	0,06
11 nm	N ₃ term	23	0,06
11 nm	N ₃ stat	34	0,09
8 nm	NH ₂ stat	60	0,30

TABLE 2.6 – Étude du nombre de fluorophores greffables sur différents types de nanoparticules d'oxyde de fer

On observe Tableau 2.6 que le nombre de colorants augmente quand la taille de la nanoparticule augmente, ce qui paraît normal car la surface est plus importante, il y a plus de polymères donc plus de fonctions réactives. En revanche, leur nombre augmente plus que l'augmentation de la surface, qui est d'un facteur 1,89, ce qui n'est pas expliqué. Le polymère N₃stat a une densité de fluorophores supérieure à celle du polymère N₃term, ce qui peut s'expliquer par la quantité légèrement plus élevée de fonctions N₃ par rapport au sulfobétaïnes. Le nombre de fluorophores par nm² est inférieur au nombre de polymères par nm² trouvé en ICP (Tableaux 2.4 et 2.5). Les fonctions amines réagissent plus avec les fluorophores, le nombre de fluorophores par nm² est de l'ordre du nombre de polymères par nm² trouvé en ICP. Il y a plusieurs fonctions réactives sur les polymères statistiques, il semble que, pour les azotures comme pour les amines, toutes les fonctions réactives ne réagissent pas avec le fluorophore. Peut-être que certaines fonctions sont cachées dans la pelote de polymères et sont par conséquent inaccessibles.

2.4 Étude de la stabilité colloïdale et des interactions non spécifiques

Une fois les nanoparticules recouvertes de ligands il convient de caractériser leur stabilité colloïdale dans des milieux complexes, et leur propension aux interactions non spécifiques. Ici leurs interactions avec des protéines en milieu modèle ainsi que leur diffusion dans le cytoplasme et noyau de cellules vivantes sont étudiées.

2.4.1 Stabilité colloïdale

Quantification de la stabilité d'ancrage des polymères sur les nanoparticules

Tout d'abord, on souhaite tester la stabilité des fonctions d'ancrage des polymères sur la nanoparticule. Il est souhaitable que les polymères soient bien accrochés à la surface de la nanoparticule. En effet, si une protéine est accrochée sur un ligand, il ne faut pas pouvoir perdre la fonctionnalité de la nanoparticule en cas de départ du ligand. Un ancrage faible pourrait aussi causer le remplacement des ligands par des protéines qui auraient une affinité avec la surface de la nanoparticule, ce qui causerait une perte de stabilité. Les IONP-8-N₃s marquées par un fluorophore sont utilisées pour étudier la stabilité de l'ancrage. Elles sont incubées avec un excès de polymère non marqué. Pour chaque point temporel de la Figure 2.31 une fraction de l'échantillon est prélevé et les polymères libres sont séparés des nanoparticules par ultracentrifugation. Les nanoparticules, plus denses que les polymères, forment un culot alors que les polymères restent dans le surnageant. Le nombre de fluorophores par nanoparticules est mesuré et comparé au nombre initial. Ce nombre est stable dans le temps, signe que les ligands présents sur les nanoparticules ne se sont pas échangés avec les ligands non marqués de la solution. Moins de 5% des polymères se sont dissociés au bout d'une semaine (Figure 2.31), l'ancrage des ligands est donc très bon.

Protocole de quantification de la stabilité de l'ancrage des polymères sur les nanoparticules IONP-8-N₃s

1 nanomole de IONP-8 recouvertes de polymère P(SPE/N₃-bMAPC1) statistique (IONP-8-N₃s) et couplées avec un fluorophore FP647 est incubée avec 500 nanomoles de polymère P(SPE-bMAPC1) (Mw=8300 g/mol) dans 500 µL de tampon HPS/NaCl 150 mM pH=7,5. À intervalles définis, 0,1 nanomoles de nanoparticules sont prélevées et ultracentrifugées pendant 30 min à 50 000 tour/min pendant 30 min dans un rotor MLA130. Les nanoparticules tombent dans le fond du tube, alors que les polymères non liés restent dans le surnageant. La quantité de polymère initial toujours présent sur la nanoparticule est estimée par absorption à 647 nm, longueur d'onde d'absorption du fluorophore présent uniquement sur les polymères initiaux.

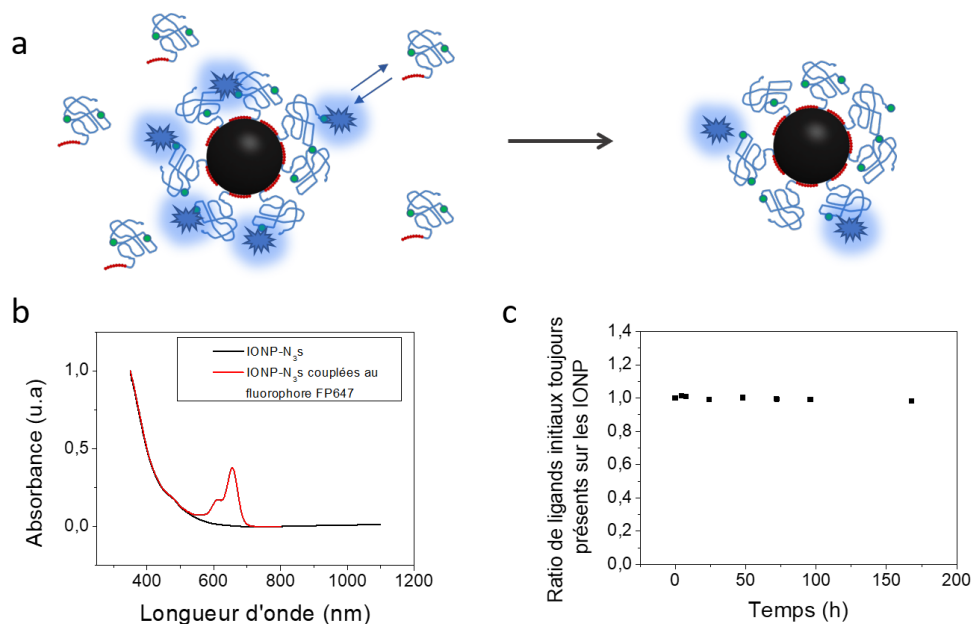


FIGURE 2.31 – Mesure de la constante d’ancrage des ligands sur les nanoparticules IONP-8-N₃s. A : schéma explicatif de l’expérience. B : spectre d’absorption UV/Visible des IONP-8-N₃s marquées avec un fluorophore FP647. C : le ratio de ligands toujours présent sur la nanoparticule au cours du temps.

Stabilité à différents pH et à forte salinité

La stabilité des nanoparticules à différents pH et dans des conditions de forte salinité a aussi été étudiée (Figure 2.32). Les nanoparticules IONP-11-N₃s ont été placées dans différents tampons, pH=5, 6, 7.5 et 9, à 150 mM en NaCl, et dans une solution de NaCl saturée (~5M). Après chaque temps d’incubation les nanoparticules sont centrifugées 10 min à 18000g pour retirer les agrégats potentiels. L’absorbance est comparée avec l’absorbance de départ pour quantifier le ratio de IONP-11-N₃s toujours stables. Les nanoparticules restent très stables au cours du temps avec moins de 10% agrégé après 26 jours à température ambiante.

Protocole du test de stabilité à différents pH et à forte salinité

Des IONP-11 recouvertes de polymère P((SPE-N₃)-b-MAPC1) (IONP-11-N₃s) sont diluées dans des tampons HEPES et MES à pH 5, 6, 7.5, 9 à 150 mM en NaCl et dans de l’eau à 5 M en NaCl, puis stockés à température ambiante. À des intervalles de temps définis, un aliquot de la solution est prélevé, centrifugé à 18 000 g pendant 10 min pour éliminer les agrégats potentiels, puis l’absorption du surnageant est comparée à l’absorption de la solution initiale.

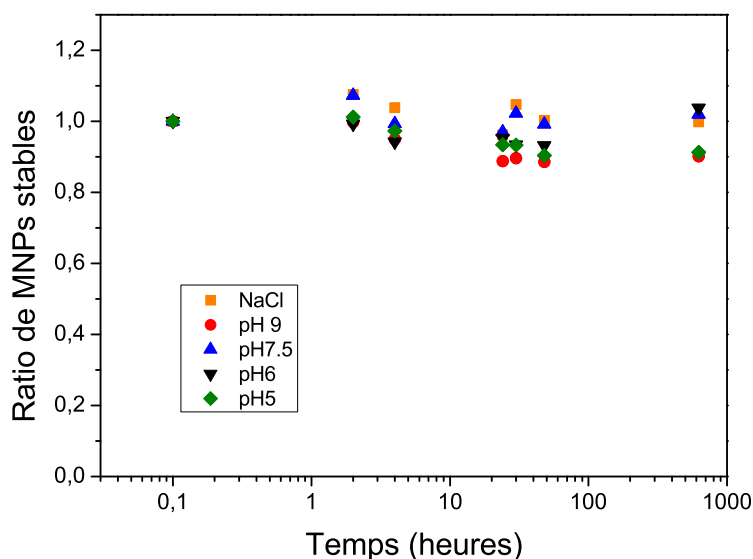


FIGURE 2.32 – Ratio de nanoparticules IONP-11-N₃s stables au cours du temps à différents pH et dans une solution de NaCl saturée.

2.4.2 Interactions non spécifiques

Les ligands zwitterioniques ont pour rôle de rendre les nanoparticules furtives. Être furtives signifie ne pas avoir d'interactions non spécifiques avec son environnement, composé ici de protéines, organelles, membranes ou ADN. Pour l'application en tant que nano-sonde magnétique dans le noyau, cette propriété est particulièrement importante car il est nécessaire que les IONP puissent diffuser librement dans le noyau sans s'accrocher aux composants du noyau. Cette accroche causerait la perte de la stabilité colloïdale des IONP et leur agrégation. De plus des interactions non spécifiques pourraient entraîner des amas de nanoparticules à des endroits non contrôlés du noyau, et être confondus avec la séquence génomique ciblée. Cette furtivité est tout d'abord étudiée *in vitro* en caractérisant les interactions entre IONP et protéines modèles, puis dans le cytoplasme d'une cellule et enfin dans le noyau.

Masquage des fonctions azotures ou amines primaires

Une IONP fonctionnalisée avec des fluorophores ou des protéines a toujours des fonctions azotures ou amines primaires sur ses polymères qui n'ont pas réagi. Ces fonctions peuvent entraîner des interactions non spécifiques. Pour s'assurer de la furtivité des nanoparticules, il convient de les masquer. Pour les azotures une réaction est réalisée entre les IONP-N₃ et du DBCO-COO⁻, (Figure 2.34) issu de l'hydrolyse du DBCO-NHS (Figure 2.33). Après cette réaction les fonctions azotures sont remplacées par des fonctions carboxylates, qui sont chargées négativement et donc plus furtives, car la plupart des biomolécules sont chargées négativement. Le protocole est décrit ci-dessous. Si la fonction réactive est une amine à la place de l'azoture, une réaction de couplage peptidique est réa-

lisée avec du bis(3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester) subérique acide, ou bis(NHS), une molécule contenant deux fonctions NHS. La première va réagir sur les amines primaires à l'extérieur du polymère, et la seconde va s'hydrolyser en acide carboxylique, comme décrit en Annexe 4.3.4. L'excès de bis(NHS) par rapport aux nanoparticules rend peu probable une réaction de deux nanoparticules sur la même molécule bis(NHS).

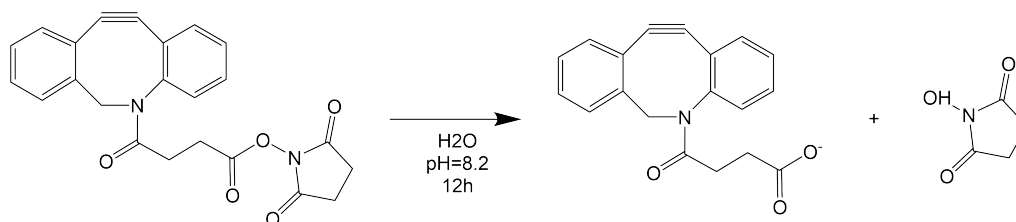


FIGURE 2.33 – Hydrolyse du DBCO-NHS en DBCO acide carboxylique.

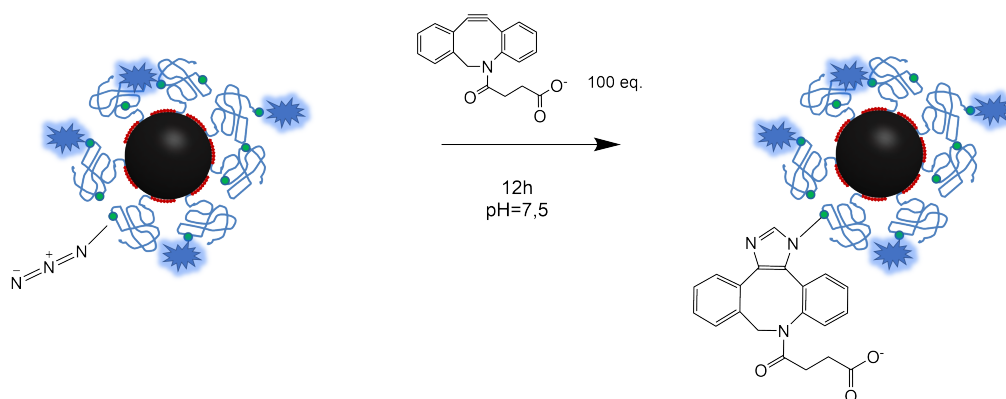


FIGURE 2.34 – Réaction entre les IONP-N₃s décorées par les fluorophores et du DBCO-COOH pour cacher les fonctions azotures résiduelles.

Protocole pour cacher les fonctions azotures résiduelles sur les IONP-N₃

Le DBCO-NHS est hydrolysé en le diluant dans du tampon HPS à pH=8,2 pendant 12h. Une fois hydrolysé, le DBCO-NHS devient du DBCO-COOH. 100 équivalents de ce DBCO-COOH sont mélangés avec 1 équivalent de IONP-N₃-FP647 et réagissent pendant 12h à température ambiante à l'abri de la lumière. Après réaction les IONP-N₃-FP647 sont lavés 4 fois par ultrafiltration sur membrane 100kDa. Le DBCO-COOH en excès passe à travers la membrane, pas les IONP-N₃-FP647. Les IONP-N₃-FP647 ainsi préparés sont conservés à 4°C jusqu'à utilisation. Elles peuvent être conservées plusieurs semaines.

Étude de la couronne de protéine dynamique

Pour étudier le niveau d'interactions non spécifiques avec des protéines modèles, le rayon hydrodynamique des nanoparticules est mesuré. En effet une interaction des nanoparticules avec des protéines se traduit par une augmentation du rayon hydrodynamique comme illustré Figure 2.35.

Pour cette étude la spectroscopie de corrélation de fluorescence (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) est utilisée. Elle est choisie car elle permet de mesurer la

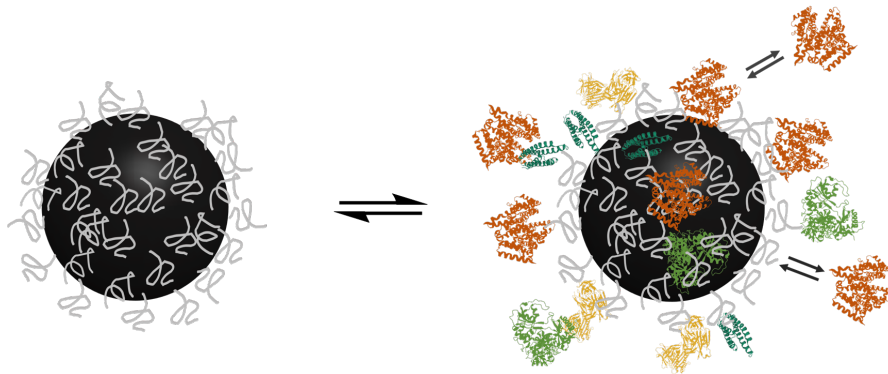


FIGURE 2.35 – L’adsorption de protéines sur les IONP cause une augmentation du rayon hydrodynamique.

couronne dynamique de protéines, c’est-à-dire des interactions temporaires des protéines avec les polymères, car elle mesure le rayon *in situ* et sans lavage des nanoparticules. Cette technique déduit le coefficient de diffusion des objets à partir de fluctuation de la lumière comme la DLS, mais elle mesure la fluorescence des nanoparticules à la place de la diffusion de la lumière. Cela permet de réaliser des mesures dans des échantillons complexes, non analysables en DLS car les protéines en grande concentration, qui ont des rayons hydrodynamiques proches de ceux des nanoparticules, diffusent aussi la lumière et faussent la mesure. La FCS mesure la fluctuation de l’intensité de fluorescence dans un volume confocal. Les protéines de la solution, non fluorescentes, ne sont pas détectées. Cette fluctuation d’intensité de fluorescence est liée au temps de diffusion des nanoparticules fluorescente dans le volume confocal. Plus elles sont grosses, plus elles diffusent lentement et plus les fluctuations mesurées sont lentes. Le coefficient de diffusion est calculé à partir des mesures de fluctuations en traçant une courbe de corrélation $G(\tau)$ définie par [80] :

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t + \tau)I(t) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} - 1 \quad (2.4)$$

Avec $I(t)$ l’intensité lumineuse mesurée à un temps t .

Expérimentalement on obtient par exemple la courbe de la Figure 2.36 :

Cette courbe est ajustée par la fonction suivante, qui prend en compte le passage dans l’état triplet qui éteint momentanément certains fluorophores :

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left(\frac{1 - T + T \cdot e^{-\left(\frac{\tau}{\tau_{triplet}}\right)}}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right) \cdot \sqrt{1 + \kappa^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}\right) + base \quad (2.5)$$

N correspond au nombre moyen de particules fluorescentes dans le volume confocal $\tau_{triplet}$, le temps que passe un fluorophore dans l’état triplet, T la proportion de fluorophores dans l’état triplet. κ est estimé par calibration avec un fluorophore dont on connaît le coefficient de diffusion, le cyanine 5, Cy5 : $(3.6 \pm 0.01 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, Pico Quant).

Cet ajustement permet d’obtenir τ_D le temps de diffusion des nanoparticules dans

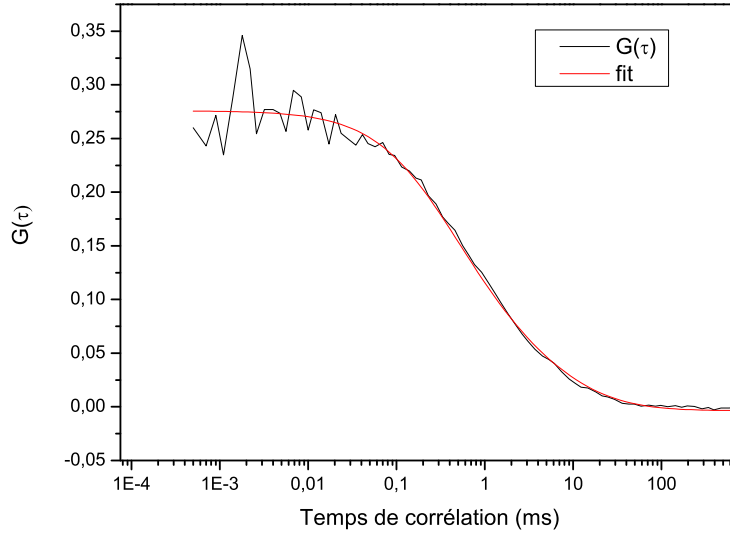


FIGURE 2.36 – Courbe de corrélation $G(\tau)$ pour des IONP-8-N₃s, fonctionnalisées avec des fluorophores.

le volume confocal, dont on déduit ensuite le coefficient de diffusion à partir de w_0 , la dimension du volume confocal calibrée avec le Cy5 :

$$D = \frac{w_0^2}{4\tau_D} \quad (2.6)$$

Le rayon hydrodynamique de l'objet en est ensuite déduit à partir du coefficient de diffusion D et de la relation de Stokes-Einstein :

$$R_H = \frac{k_b T}{6\pi\eta D} \quad (2.7)$$

avec k_b la constante de Boltzmann, T , la température et η , la viscosité dynamique du milieu.

Le rayon hydrodynamique des nanoparticules est mesuré après incubation avec une concentration croissante d'albumine de sérum bovin (BSA). L'albumine est la protéine majoritaire du sang. L'ajout de BSA dans le milieu modifie sa viscosité dynamique, elle est donc corrigée selon la formule $\eta_{solutionBSA} = \eta_0(1 + \alpha c)$ avec η_0 la viscosité de l'eau (1cP), c la concentration de BSA et α la concentration intrinsèque de BSA ($\alpha = 3.7 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$) [87, 110]. Le rayon hydrodynamique mesuré n'augmente pas quand la concentration en BSA augmente (Figure 2.37), signe de l'absence d'interactions entre les protéines et les nanoparticules. Pour étudier les interactions avec un milieu plus complexe, les nanoparticules sont aussi incubées dans une solution contenant une quantité croissante de plasma de souris. Il n'y a pas d'augmentation visible du rayon hydrodynamique non plus. L'ajout de plasma dans la solution augmente aussi la viscosité de la solution proportionnellement à la quantité

de plasma ajoutée, ce qui est pris en compte avec la formule $\eta_{solutionplasma} = \eta_0(1 + \eta_p p)$ avec η_0 la viscosité de l'eau (1cP), p la proportion de plasma et η_p la viscosité du plasma, La valeur prise est celle de la référence [111] : 1,31 cP.

Protocole de mesure du rayon hydrodynamique des IONP par FCS

Les mesures de FCS ont été effectuées sur un appareil MicroTime 200 (PicoQuant). Un laser à 637 nm (Coherent) est réfléchi par un miroir dichroïque et focalisé par un objectif à immersion dans l'huile (100x, 1,4 NA, Olympus) dans une gouttelette de solution de IONP, 30 μm au-dessus de la surface de la lamelle. L'émission de fluorescence est ensuite collectée à travers l'objectif, transmise par le miroir dichroïque et un filtre passe-bande (700/75 nm), focalisée à travers un diaphragme et couplée à deux photodiodes à avalanche (PDM Series, MPD). Le signal de la photodiode a été traité par un système HydraHarp (Pico-Quant) et la fonction de corrélation croisée des deux signaux de photodiode a été calculée par le logiciel MicroTime. [80]. Pour les mesures avec des protéines, les IONP sont incubées pendant au moins 10 min à température ambiante avec de la BSA (Sigma) ou du plasma de souris (Innovative Research).

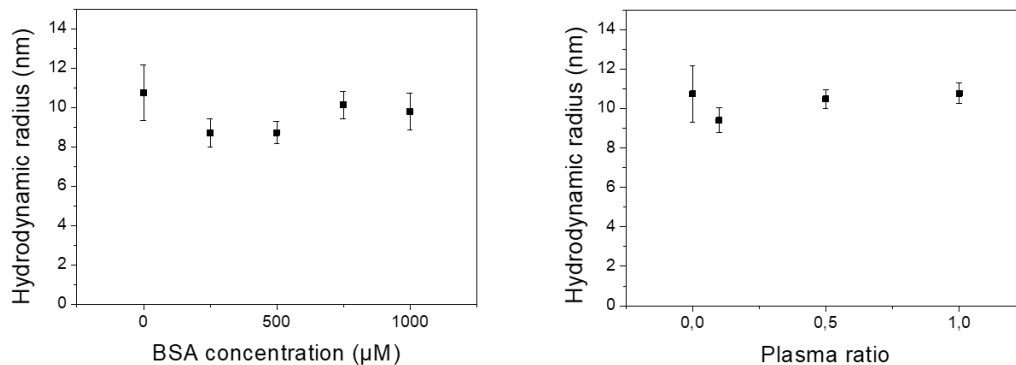


FIGURE 2.37 – Évolution du rayon hydrodynamique de IONP-8-N₃s en fonction de la concentration en BSA (gauche) ou du ratio de plasma contenu dans le tampon (droite).

Étude de la diffusion dans le cytoplasme

Après avoir démontré les très bonnes propriétés de furtivité des IONP sulfobétaïnes avec des protéines modèles *in vitro*, nous nous sommes intéressés au comportement dans des cellules. Des IONP fonctionnalisées avec un fluorophore FP647 ont été micro-injectées dans le cytoplasme de cellule vivante de type RPE-1. La Figure 2.38 est une image en microscopie de fluorescence d'une cellule micro-injectée. Cette image montre une répartition homogène des IONP dans le cytoplasme, qui ne ne semblent pas s'agglomérer ni s'accumuler dans un endroit spécifique de la cellule. Cela suggère que la taille des IONP permet leur diffusion dans le cytoplasme, et donc qu'elles n'ont que peu d'interactions avec les composants du cytoplasme. En effet le cytosquelette peut être considéré comme un réseau avec des pores d'une taille d'environ 50 à 70 μm [112]. Une expérience de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) à l'institut Curie avec Bassam Hajj et Elie Balloul a été réalisée pour confirmer la diffusion libre des nanoparticules dans le cytoplasme. La courbe d'autocorrélation Figure 2.39 est obtenue. Un ajustement de la courbe permet de

mesurer un coefficient de diffusion de l'ordre de quelques $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Cet ordre de grandeur est cohérent avec une bonne diffusion dans le cytoplasme, comme reporté précédemment pour des particules de taille similaire qui diffusent librement sans rencontrer d'interactions non spécifiques [87, 112, 113, 114].

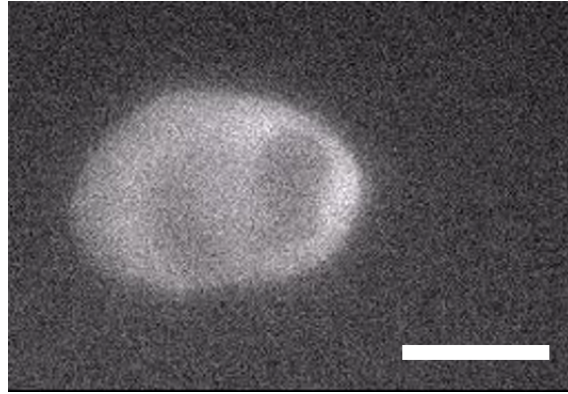


FIGURE 2.38 – Image au microscope de fluorescence d'une cellule RPE-1 microinjectée avec des IONP-8-N₃S-FP647. Barre d'échelle = 20 μm .

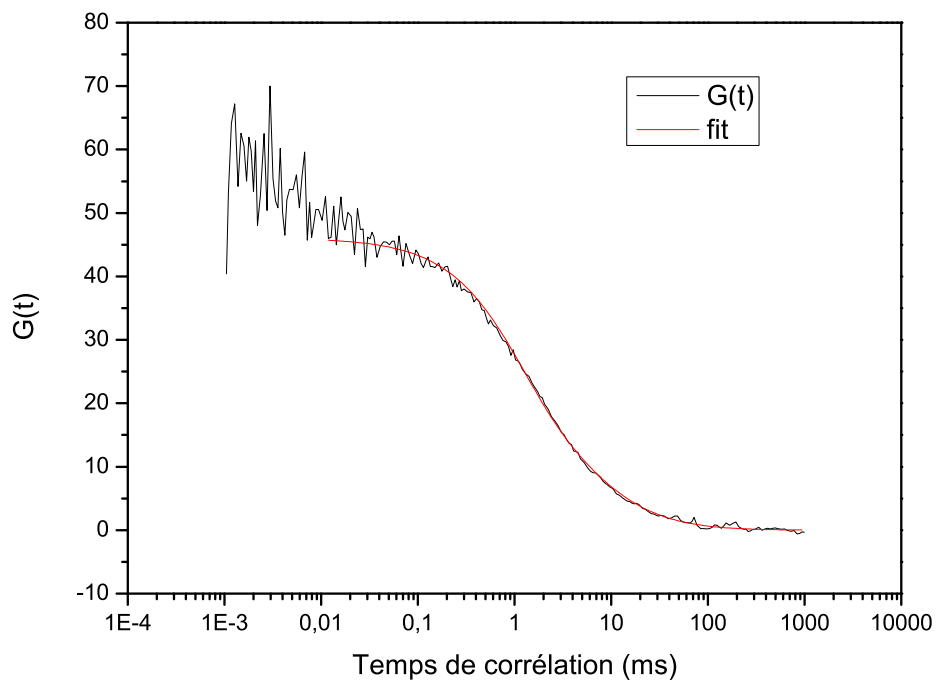


FIGURE 2.39 – Courbe de corrélation pour des IONP-8-N₃S-FP647 dans une cellule.

Étude de la diffusion dans le noyau de quantum dots

La diffusion dans le noyau des IONP n'a pas été étudiée par FCS, mais Veer Keizer, à l'institut Curie, a étudié la diffusion dans le noyau de quantum dots fonctionnalisés avec le même ligand polymérique sulfobétaïne. L'utilisation de quantum dots, nanoparticules fluorescentes très brillantes, permet de suivre la trajectoire d'une nanoparticule dans le noyau si les nanoparticules sont suffisamment diluées. C'est ce qu'on observe Figure 2.40. En A les points blancs sont des quantum dots visibles en microscopie de fluorescence. En B sont reconstituées les trajectoires des QD suivis. Ces trajectoires permettent de calculer le déplacement quadratique moyen des QD. Le déplacement quadratique moyen est lié au coefficient de diffusion selon la formule :

$$r^2(t) = 4Dt$$

Le coefficient de diffusion est ici calculé sur des trajectoires de 30ms. Sur des trajectoires plus longues est mesuré le coefficient α , qui permet de détecter une diffusion anormale et qui est définie comme :

$$r^2(t) \propto t^\alpha$$

Un coefficient α de 1 correspond à une diffusion brownienne, un coefficient inférieur à 1 un comportement subdiffusif. Sur la droite de la Figure 2.40 est représenté le coefficient α en fonction du coefficient de diffusion D mesuré entre 0 et 30ms, sous la forme d'une carte thermique pour chaque trajectoire. Le coefficient de diffusion est de l'ordre du $\mu\text{m}^2/\text{s}$, et le coefficient α est proche de 1, ce qui décrit un comportement diffusif attendu pour les nanoparticules [115]. Il semble donc que le polymère sulfobétaïne ait une chimie de surface qui permet une bonne diffusion dans le noyau.

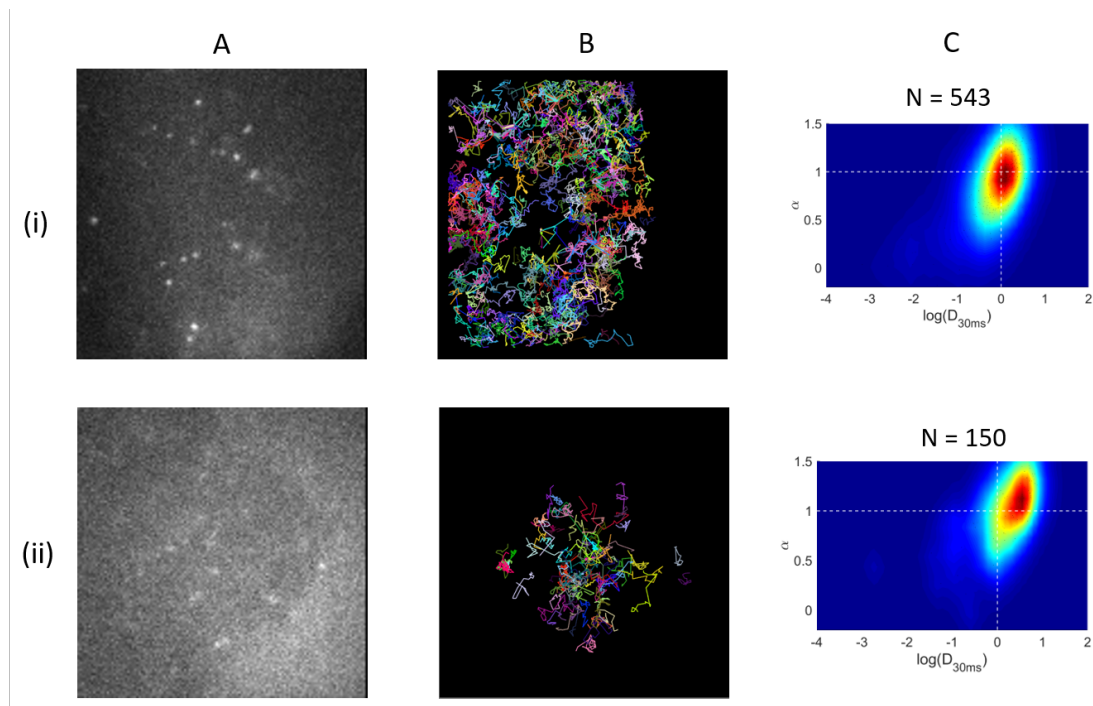


FIGURE 2.40 – Diffusion de QD dans le noyau de cellules vivantes. A : Images brutes des QD dans le noyau, acquises par microscopie de fluorescence. B : Déplacement des QD au cours du temps C : Heat map du coefficient de diffusion vs le coefficient α .

Ces deux premières parties ont donc décrit comment sont préparées des nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de ligands polymères à bloc, avec un bloc sulfobétaïne qui sert à solubiliser les nanoparticules et les rendre furtives, et un bloc phosphonate pour accrocher les polymères à la surface. La première partie a présenté la synthèse des nanoparticules par décomposition thermique, puis la synthèse des ligands polymères. Ensuite l'échange de ligands qui permet d'accrocher les polymères à la surface de la nanoparticule a été décrit. La seconde partie a démontré la stabilité colloïdale des nanoparticules dans des milieux biologiques complexes, ainsi que leur capacité à éviter les interactions non spécifiques avec des milieux modèles comme avec les composants du cytoplasme et du noyau. Ces IONP sont donc de bonnes candidates pour servir de nanosondes magnétiques dans le noyau. Il est à noter que cette chimie de surface furtive peut aussi être utile dans d'autres applications, par exemple une collaboration est en cours avec l'équipe de David Perrais, Trafic membranaire synaptique, à l'université de Bordeaux, qui utilise des QD recouverts de ligands sulfobétaïnes pour étudier le mouvement de récepteurs synaptiques. Les polymères sulfobétaïne bloc phosphonate sont aussi utilisés sur un autre type de nanoobjet, des nanobâtonnets (nanorods, NR) de phosphate de lanthanes dopés à l'euporium qui ont une luminescence polarisée. Dans le cadre d'une collaboration avec Zijun Wang, Jongwook Kim et Thierry Gacoin, au Laboratoire de Physique de la Matière condensée à l'École Polytechnique, il a été montré que le polymère P(SPE-b-MAPC1) permet une bonne solubilité des NR dans des milieux biologiques, et réduit les interactions non spécifiques [116]. Ces

travaux sont décrits en Annexe 4.3.4.

Chapitre 3

Les nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de zwitterions pour la micromanipulation magnétique d'un locus génomique

Sommaire

3.1	Comment accrocher des nanoparticules magnétiques sur une séquence de l'ADN ?	86
3.1.1	L'accroche est médiée par un facteur de transcription	86
3.1.2	Accroche d'une protéine sur les nanoparticules : la GFP	89
3.1.3	Accroche de fluorophores sur les nanoparticules d'oxyde de fer	92
3.2	Ciblage d'un locus génomique par les nanoparticules magnétiques	96
3.2.1	Microinjection et colocalisation	96
3.2.2	Accumulation	98
3.2.3	Compter les nanoparticules par locus	99
3.3	Manipulation magnétique	100
3.3.1	Présentation du dispositif de manipulation magnétique	101
3.3.2	Déplacement du locus génomique	102
3.3.3	Calibration de la force appliquée sur le locus	108
3.3.4	Conclusion et perspectives	115

Ce chapitre présente l'utilisation des nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de zwitterions pour appliquer une force sur la chromatine. Les différents défis à relever sont l'accroche des nanoparticules sur la chromatine, l'application d'une force sur les nanoparticules et la quantification de la force.

Dans notre modèle, l'accroche des nanoparticules magnétiques sur la chromatine se fait via la protéine TetR, un facteur de transcription, qui s'accroche sur la séquence *tetO* sur l'ADN. La protéine TetR est fusionnée avec un petit anticorps anti protéine fluorescente verte (green fluorescent protein, GFP) qui reconnaît une GFP accrochée aux polymères qui recouvrent les nanoparticules.

Ce chapitre va tout d'abord présenter le système TetR, puis expliquer comment une GFP est accrochée sur les nanoparticules. Ensuite le ciblage de la chromatine par les nanoparticules microinjectées dans le noyau de cellules vivantes sera étudié. Puis l'application d'une force sur la chromatine grâce à une pointe magnétique sera présentée. Enfin des pistes pour quantifier cette force seront développées.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire d'Antoine Coulon à l'Institut Curie, Dynamique Spatio-temporelle des Fonctions Génomiques.

3.1 Comment accrocher des nanoparticules magnétiques sur une séquence de l'ADN ?

3.1.1 L'accroche est médiée par un facteur de transcription

Il est nécessaire d'accrocher les nanosondes magnétiques solidement et spécifiquement sur une région précise de l'ADN, appelée locus génomique, afin de pouvoir y appliquer une force. Il faut aussi pouvoir accrocher un grand nombre de nanoparticules.

En effet, dans ce projet la taille des nanoparticules utilisables est limitée : une trop grosse nanoparticule ne pourrait pas diffuser librement dans le noyau de la cellule pour pouvoir atteindre le locus génomique. Etoc et al. [112] rapportent que des nanoparticules de moins de 25 nm de rayon hydrodynamique diffusent librement dans le cytoplasme. Bubak et al. [115] rapportent que pour des nanoparticules de plus de 20 nm de rayon hydrodynamique le coefficient de diffusion dans le noyau diminue. Dans notre étude, les nanoparticules choisies ont un rayon hydrodynamique de 14 nm, ce qui leur permet de bien diffuser dans le noyau. L'aimantation induite d'une nanoparticule de cette taille reste faible, de l'ordre de $5 \cdot 10^{-16}$ emu, il est aussi nécessaire d'accrocher un grand nombre de nanoparticules sur le locus génomique, pour pouvoir appliquer une force suffisante. Il faut donc trouver un moyen d'accrocher solidement plusieurs nanoparticules sur un même locus génomique, ce qui se fera ici grâce à des protéines.

Dans les cellules plusieurs protéines ont la capacité de s'accrocher sur l'ADN, comme les polymérases, qui répliquent puis transcrivent l'ADN ; les histones, autour desquels l'ADN s'enroule ; et les facteurs de transcription, qui servent à réguler la transcription de l'ADN, c'est-à-dire la production d'ARN. Dans cette étude les nanoparticules sont accrochées à

l'ADN via un facteur de transcription : le répresseur de la tétracycline, TetR.

TetR est une protéine qui régule la production de la protéine *tetA*, qui est utilisée par des bactéries pour résister à un antibiotique : la tétracycline. Sur l'ADN, la séquence codant pour le gène de la protéine *tetA* est précédée d'une séquence appelée *tetO*. En l'absence de l'antibiotique tétracycline, la protéine TetR se lie à la séquence d'ADN *tetO* avec une grande spécificité. Cela empêche l'ARN polymérase de transcrire le gène de la protéine *tetA*, donc la protéine n'est pas produite. En revanche, la présence de tétracycline cause un changement de conformation chez TetR qui se décroche alors de la séquence *tetO*, ce qui permet la transcription du gène *tetA* : la bactérie peut alors se défendre contre la tétracycline [117] [118].

TetR est donc une protéine qui s'accroche de manière très spécifique sur la séquence *tetO* selon le schéma Figure 3.1.

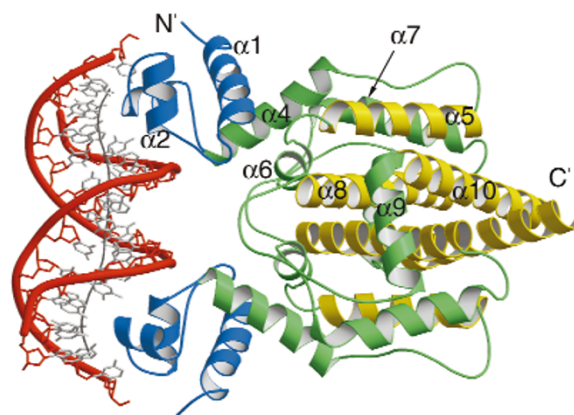


FIGURE 3.1 – Schéma de la structure du complexe TetR-*tetO*, issu de [118]. Les domaines de TetR qui se lient à l'ADN sont représentés en bleu.

Dans cette étude, la lignée cellulaire utilisée est la U2OS 263, développée par Janicki et al. en 2004 [119] pour étudier l'expression des gènes. Cette lignée est issue de la lignée cellulaire U2OS, d'ostéosarcome humain, et a été génétiquement modifiée pour ajouter, sur le chromosome 1, ≈ 200 copies d'un bloc de 20 kilobases qui contient, entre autres, 96 sites de liaison *tetO*. Il y a donc environ 20 000 sites de liaison pour une protéine TetR, ce qui permet d'accrocher un grand nombre de nanoparticules. Ce locus est une région condensée et inactive, c'est de l'hétérochromatine, située dans de l'euchromatine. Cette lignée cellulaire a été beaucoup utilisée en recherche pour étudier des modifications de la chromatine, le recrutement de l'ARN polymérase II, et la synthèse d'ARN durant l'induction du gène ajouté [54].

Dans cette étude on souhaite accrocher des IONP à la protéine TetR. Pour cela les laboratoires d'Antoine Coulon et de Daniele Fachinetti (Mécanismes moléculaires de la dynamique des chromosomes) ont modifié la lignée U2OS 263 en ajoutant dans son génome un plasmide codant pour la protéine TetR fusionnée avec un nanocorps anti-GFP et une protéine mCherry. Un nanocorps est un fragment d'anticorps composé d'un seul domaine

d'anticorps. Il est donc beaucoup plus petit qu'un anticorps, mais reste capable de se lier spécifiquement à son antigène, ici la GFP. La mCherry est une protéine fluorescente qui absorbe la lumière entre 540 et 590 nm et émet entre 550 et 650 nm. Elle est utilisée dans cette étude pour visualiser la protéine, et donc le locus, en microscopie de fluorescence. La lignée ainsi modifiée produit cette protéine, appelée TetR-mCherry- α GFP.

Ainsi pour lier une IONP à cette protéine et donc au locus génomique il faut accrocher une GFP sur les IONP. On obtiendra donc la construction décrite sur le schéma de la Figure 3.2. Une GFP est accrochée sur les polymères qui entourent la nanoparticule. Dans le noyau des cellules, la protéine TetR-mcherry- α GFP reconnaît la GFP via le nanocorps et se lie à la IONP. La protéine reconnaît aussi la séquence *tetO* répétée de la lignée U2OS 263, donc la IONP se lie au locus génomique sur le chromosome 1 via la protéine TetR-mcherry- α GFP. Pour pouvoir visualiser les IONP dans le noyau des cellules, un fluorophore est ajouté sur les polymères.

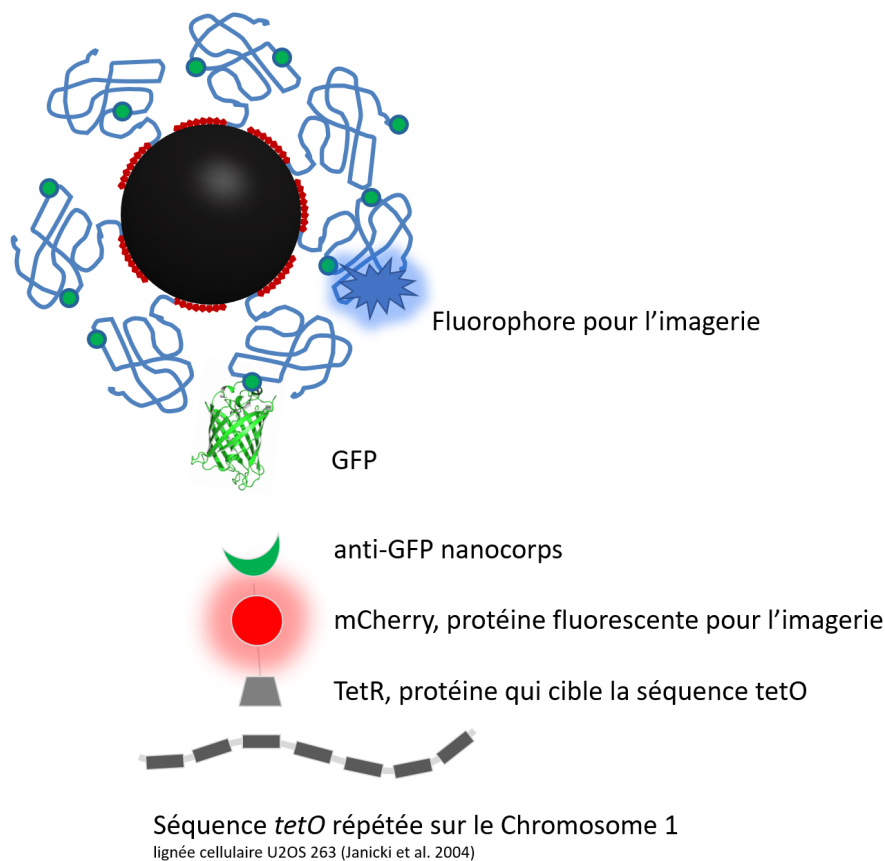


FIGURE 3.2 – Schéma explicatif du ciblage de la chromatine par les IONP. Des IONP conjuguées à de la GFP sont introduites dans le noyau de cellules. Elles y sont reconnues par un nanocorps anti-GFP fusionné avec la protéine TetR qui cible la séquence *tetO* qui a été ajoutée sur le chromosome 1.

3.1.2 Accroche d'une protéine sur les nanoparticules : la GFP

Ainsi, pour pouvoir obtenir la construction de la Figure 3.2 dans le noyau des cellules, il faut préalablement synthétiser des IONP avec de la GFP et des fluorophores. On souhaite donc ajouter une GFP sur les IONP. L'accroche de la GFP à la IONP doit être suffisamment solide pour résister à la force magnétique qui s'appliquera sur les IONP. L'idéal est donc d'avoir une liaison covalente entre la GFP et la IONP. Ici, une liaison covalente est créée entre le polymère des IONP et la GFP avec une réaction de chimie click. Les réactions de chimie click ont un bon rendement, des conditions de réactions simples et sont bio-orthogonales, c'est-à-dire que les groupes fonctionnels de la réaction ne réagissent pas sur les groupes fonctionnels habituellement présents dans les systèmes biologiques, comme les amines, les acides carboxyliques ou les thiols. Cela permet d'avoir des réactions très spécifiques [120]. Un couplage peptidique précédé d'une activation des acides carboxyliques peut, par exemple, conduire à la réaction de deux protéines entre elles, voir à une réticulation, car les protéines possèdent les deux fonctions réactives, les acides carboxyliques et les amines, donc la réaction de chimie click est plus adaptée. Ici la réaction est sans catalyseur cuivre, entre un dibenzocyclooctyne (DBCO) et un azoture (N_3). Un polymère comprenant des azotures est utilisé pour recouvrir les IONP et le DBCO est lié à la protéine. Le polymère utilisé est un polymère sulfobetaine avec des azotures en statistique décrit dans la partie 2.2.3, nommé P(SPE/ N_3 -bMAPC1), ou N_3 stat . Le DBCO est ajouté par réaction peptidique entre un DBCO-N-hydroxysuccinimidyl ester (DBCO-NHS) (Figure 3.3) et une GFP.

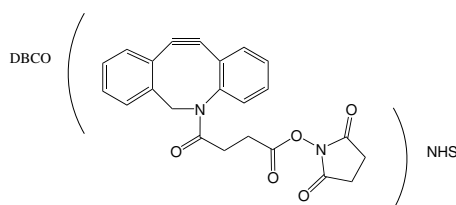


FIGURE 3.3 – Structure du Dibenzocyclooctyne-N-hydroxysuccinimidyl ester, DBCO-NHS.

Le NHS est un activateur d'acide carboxylique qui permet de former une liaison peptidique entre le DBCO et des amines primaires de la GFP (présentes sur le bout N terminal de la protéine et sur les acides aminés lysine). Le schéma de la réaction est présenté Figure 3.4. Le bon déroulement de la réaction est vérifié par spectrophotométrie UV-visible : la GFP absorbe à 488 nm avec $\varepsilon(488 \text{ nm}) = 55\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et le DBCO absorbe à 310 nm avec $\varepsilon(310 \text{ nm}) = 12\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et forme une épaulement reconnaissable sur le spectre de la GFP. La réaction a un bon rendement : une réaction avec 5 équivalents de DBCO-NHS par rapport à la GFP donne 5 DBCO sur la GFP. 5 DBCO sur la GFP est un nombre un peu élevé : trop de DBCO pourraient dénaturer la GFP, empêcher sa reconnaissance par le nanocorps ou introduire des interactions non spécifiques dans la cellule. 1 seul DBCO par GFP diminue l'efficacité de couplage de la GFP sur les IONP- N_3 s, donc le nombre de

DBCO par GFP a donc été fixé à 2. 2 équivalents de DBCO lors de la réaction avec la GFP donnent 2 DBCO par GFP, cf. le protocole ci-dessous. Le DBCO-NHS s'hydrolyse facilement au contact de l'eau, il est conservé par aliquots à -20°C dans le DMSO anhydre.

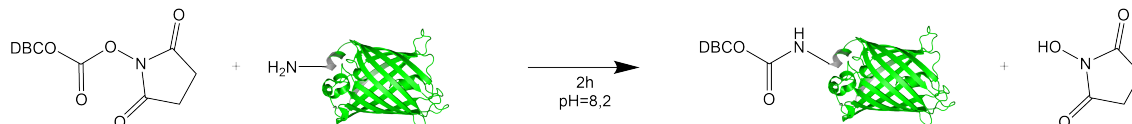


FIGURE 3.4 – Schéma de la réaction de la GFP avec le DBCO-NHS : réaction peptidique activée par le NHS.

Protocole synthèse de GFP-DBCO

1 nanomole de GFP (Gene And Cell Technologies) ($5\ \mu\text{L}$), 2 nanomoles (2eq.) de DBCO-NHS (Sigma-Aldrich) (à $0,5\ \text{mg/mL}$ dans le DMSO anhydre) et $20\ \mu\text{L}$ de tampon HPS/NaCl $50/150\ \text{mM}$ $\text{pH} = 8,2$ sont mélangés dans un tube eppendorf. Après 2h de réaction à température ambiante la GFP est lavée trois fois par ultrafiltration sur membrane avec un seuil de $10\ \text{kDa}$, pour laisser passer le DBCO-NHS non réagi, mais conserver la GFP de taille $28\ \text{kDa}$. La GFP-DBCO se conserve quelques jours à 4°C .

La GFP-DBCO réagit ensuite avec les IONP- N_3s selon la réaction schématisée Figure 3.5. Pour l'application envisagée, il est souhaitable de minimiser le nombre de IONP- N_3s sans GFP, mais aussi d'éviter d'avoir trop de GFP sur les IONP- N_3s , car cela augmente leur rayon hydrodynamique, et pourrait causer un encombrement sur le locus génomique qui réduirait le nombre de IONP- N_3s accrochées. Une IONP- N_3s avec plusieurs GFP peut aussi se lier à plusieurs protéines TetR et donc remplir plusieurs emplacements *tetO*.

Le compromis est fixé à 3 GFP par nanoparticule, car avec ce ratio la quantité de nanoparticules sans GFP est estimée à 5%, ce qui est acceptable. En effet, il y a de nombreuses fonctions azotures par rapport aux GFP introduites, le nombre de GFP par IONP- N_3s suit alors une distribution de Poisson de paramètre $\lambda = 3$. Pour 3 GFP par IONP- N_3s il y a alors $e^{-3} = 0.0498$ soit 5% de nanoparticules sans GFP.

10 équivalents de GFP par rapport aux nanoparticules donnent environ 6 GFP par nanoparticules, donc pour atteindre 3 GFP par nanoparticules, les IONP- N_3s sont mélangées à 5 équivalents de GFP-DBCO selon le protocole décrit ci-dessous.

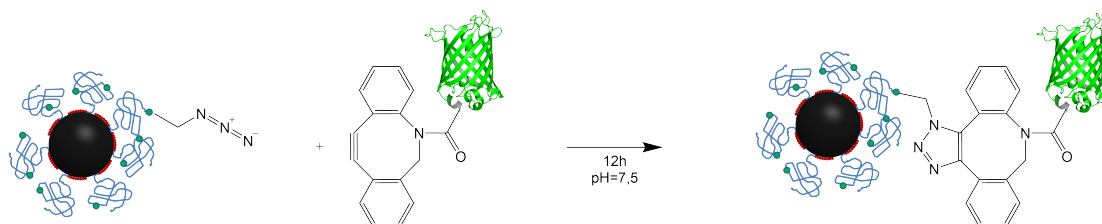


FIGURE 3.5 – Schéma de la réaction de la GFP-DBCO avec les IONP- N_3s .

Protocole bioconjugaison de la GFP sur les IONP-N₃s par chimie click sans cuivre

1 équivalent de IONP-N₃s est mélangé avec 5 équivalents de GFP-DBCO préalablement synthétisés dans quelques microlitres de tampon HPS/NaCl 10/150 mM pH=7,5. Après 12h de réaction à température ambiante à l'abri de la lumière, les IONO sont lavées trois fois par ultrafiltration avec un seuil de 100 kDa pour permettre de conserver les IONP, mais retirer les GFP, de taille 28 kDa, qui n'ont pas réagi. Les IONP-GFP ainsi synthétisées se conservent plusieurs semaines à 4°C.

L'absorption de la GFP est utilisée pour calculer le nombre moyen de GFP accrochées sur les nanoparticules. La fluorescence donnerait un signal plus intense, mais il y a un risque qu'elle soit en partie éteinte par la proximité de la nanoparticule d'oxyde de fer, ce qui donnerait un résultat faussé. L'absorption est mesurée à 488 nm, le pic d'absorption de la GFP dans le visible.

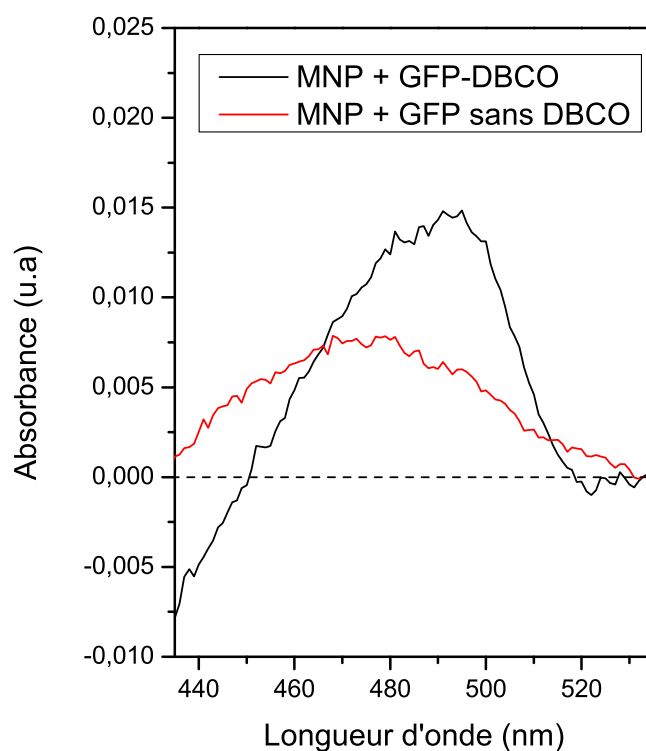


FIGURE 3.6 – Spectre d'absorption des IONP-N₃s après réaction avec des GFP-DBCO (noir) et des GFP sans DBCO (rouge). L'absorption des IONP-N₃s seules a été soustraite.

La Figure 3.6 présente le spectre d'absorption des IONP-N₃s qui ont réagi avec de la GFP-DBCO, en rouge, et en noir le spectre de IONP-N₃s qui ont réagi avec de la GFP sans DBCO, comme contrôle, après lavage. Sur les deux spectres, l'absorption des IONP seules a été soustraite pour mieux visualiser l'absorption due à la GFP. L'absorbance à 488 nm est plus intense pour les IONP qui ont réagi avec des GFP-DBCO que pour le contrôle sans DBCO. Il y a aussi une bosse sur le spectre des IONP avec de la GFP sans

DBCO, cependant le maximum n'est pas à 488 nm, ce qui suggère que cette absorption n'est pas liée à de la GFP. Les GFP ont donc bien réagi avec les nanoparticules, et de manière spécifique par chimie click. En prenant un coefficient d'absorption molaire $\varepsilon(488\text{ nm}) = 55\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, il y a ici 3 GFP par IONP sur les IONP.

3.1.3 Accroche de fluorophores sur les nanoparticules d'oxyde de fer

Les IONP-GFP sont fluorescentes sur le canal de la GFP, mais cette fluorescence est peu intense. Un fluorophore est donc ajouté sur les polymères pour pouvoir visualiser facilement les IONP dans les noyaux des cellules. Le fluorophore utilisé est le FP647-DBCO (Interchim), il réagit sur les azotures résiduels du polymère comme présenté dans la partie 2.4.1, selon la réaction du schéma Figure 3.7. Le fluorophore est ajouté en large excès pour maximiser le nombre de fluorophores par IONP. Un fluorophore AF488 DBCO (Interchim) peut aussi être utilisé afin que sa fluorescence s'ajoute à celle de la GFP, ce qui évite de consommer deux canaux de fluorescence sur le microscope.

Propriétés en absorbance

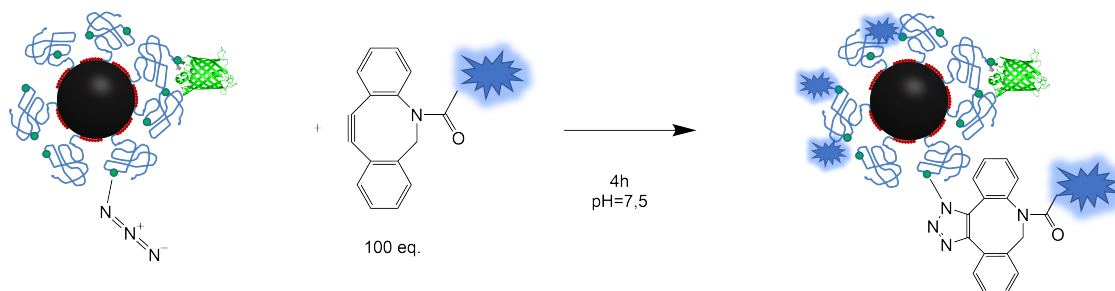


FIGURE 3.7 – Schéma de la réaction des IONP-GFP avec les fluorophores FP647.

Une fois les fluorophores ajoutés sur les IONP-GFP, le spectre d'absorption en Figure 3.8 est obtenu.

Le nombre de fluorophores par IONP est compté par absorption à 647 nm, avec $\varepsilon(647\text{ nm}) = 0.25\ \mu\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Il y a par exemple 8 fluorophores FP647 sur les IONP-GFP (8nm de diamètre TEM) de la Figure 3.8.

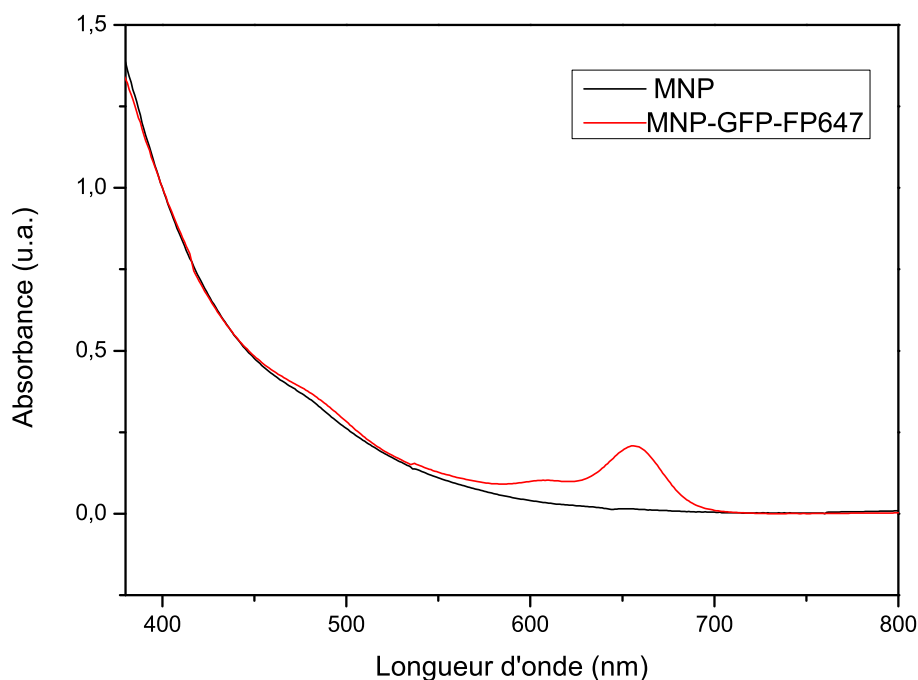


FIGURE 3.8 – Spectre d’absorption des IONP-8-N₃s conjuguées à la GFP et au fluorophore FP647.

Propriétés d’émission et extinction de fluorescence

Les IONP-GFP-FP647 ont le spectre d’émission suivant, Figure 3.9.

Une fois sur les IONP, les fluorophores ont une intensité de fluorescence plus faible qu’attendu. Une solution de fluorophores libres avec la même absorbance à 647 nm a une fluorescence de 5 à 20 fois plus intense. Cette extinction est observée pour les fluorophores FP647, qui absorbent à 647 nm et les AF488, qui absorbent à 488 nm. Cette diminution de la fluorescence n’est pas due à un transfert d’énergie par résonance de Förster (Förster resonance energy transfer, FRET), car les spectres d’absorption des IONP-N₃s et d’émission du colorant FP647 ne se recouvrent pas, cf. Figure 3.9b. Il semble donc que la proximité des oxydes de fer crée une extinction de la fluorescence des fluorophores. L’extinction de fluorescence est aussi observée pour des IONP-N₃s avec un seul fluorophore accroché en moyenne par nanoparticule, ce qui permet de conclure que cette extinction est due à la présence de la nanoparticule et non à la présence de plusieurs fluorophores mitoyens.

Une extinction de fluorescence de fluorophores à proximité des nanoparticules est bien connue dans le cas des nanoparticules d’or [121] et a aussi été observée pour les nanoparticules d’oxyde de fer [122]. Jang et al. [122] ont étudié le niveau d’extinction de fluorescence d’un fluorophore Cyanine 5,5 autour de nanoparticules d’oxyde de fer entourées d’une coque de silice, en fonction de l’épaisseur de la coque de silice. Le fluorophore Cyanine 5,5 est un fluorophore un peu plus rouge (excitation 684 nm, émission 710 nm)

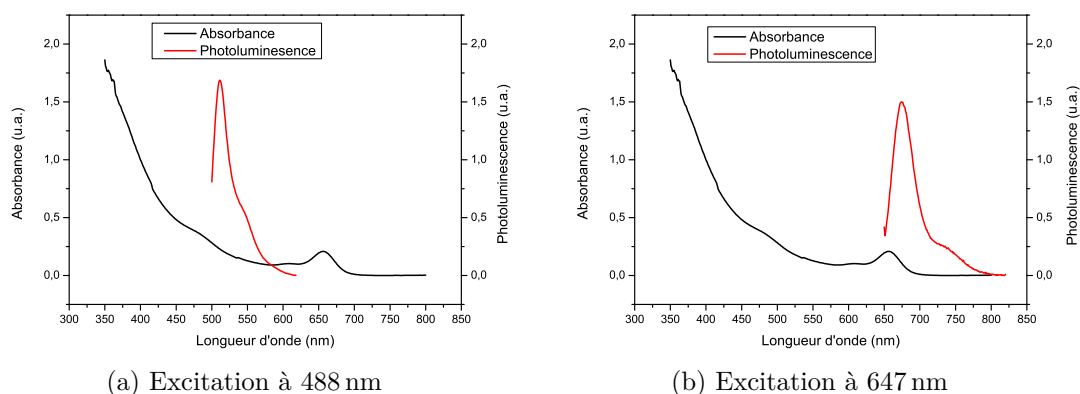


FIGURE 3.9 – Superposition du spectre d’absorption (noir) et d’émission (rouge) des IONP-GFP-FP647.

que le FP647 utilisé dans cette thèse (excitation 647 nm, émission 675 nm). Comme pour le FP647, aucun transfert d’énergie de type FRET n’est attendu entre le fluorophore et les nanoparticules. Pour des nanoparticules de 13 nm de diamètre avec une coque de silice de 3,5 nm d’épaisseur, la fluorescence est 3,3% de celle attendue (extinction de 96,7%). Une coque en silice bien plus épaisse, de 55 nm d’épaisseur, permet de retrouver la fluorescence attendue, à 98,4% (extinction de 1,6%). Pour l’application des nanoparticules en tant que nanosonde, il n’est pas possible d’introduire une coque de silice aussi épaisse pour retrouver un bon niveau de fluorescence, mais il est possible d’augmenter la taille du polymère.

Le taux d’extinction est étudié pour des IONP avec des fluorophores FP647, sans GFP, de deux tailles différentes (8 et 11 nm de diamètre au TEM) et avec deux polymères différents : un polymère P(SPE/N₃-bMAPC1), avec les azotures répartis de manière statistique sur la chaîne, appelé polymère N₃ stat, de masse molaire 10 000 g/mol, ou un P(SPE-bMAPC1)-N₃, avec un seul azoture ajouté à l’extrémité du polymère, appelé polymère N₃ term, de masse molaire 4 000 g/mol. Leur synthèse est décrite dans la partie 2.2.3. Le polymère N₃ term est plus court pour éviter un repliement trop important du polymère sous forme de champignon qui risquerait de cacher l’azoture terminal dans une pelote de polymère et le rendrait inaccessible pour la fonctionnalisation. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.1. Le nombre moyen de fluorophores accrochés pour chaque IONP est indiqué, ainsi que le pourcentage de fluorescence obtenu par rapport au niveau attendu (le niveau attendu est le niveau de fluorescence d’une solution de fluorophore libre de même absorbance à 647 nm). Dans la dernière colonne est indiqué le nombre de fluorophores équivalents, c’est-à-dire le nombre de fluorophores libres qui correspond à l’intensité de fluorescence d’une IONP.

Ces résultats soulignent que l’extinction de fluorescence est plus élevée pour les nanoparticules de diamètre plus élevé. L’extinction est aussi plus élevée pour le polymère N₃ term, plus petit. Cela peut s’expliquer par une distance plus faible entre le fluorophore

diamètre des IONP	type de polymère	nb fluorophore	%fluo	nb fluorophore éq.
8 nm	N ₃ term	5	8	0,4
8 nm	N ₃ stat	12	20	2,3
11 nm	N ₃ term	23	3	0,6
11 nm	N ₃ stat	34	7	2,4

TABLE 3.1 – Tableau récapitulatif de l’extinction des fluorophores FP647 accrochés sur des IONP de différentes tailles et fonctionnalisées avec différents polymères.

et la surface de la nanoparticule. Finalement les nanoparticules plus grosses diminuent davantage la fluorescence des fluorophores, mais possèdent aussi un plus grand nombre de fluorophores grâce à leur surface plus grande. Leur intensité de fluorescence est finalement la même que celle de nanoparticules plus petites. Il aurait été intéressant pour la suite de l’étude d’avoir des nanoparticules plus fluorescentes, mais cela ne semble pas possible en gardant les propriétés de taille et de furtivité des nanoparticules. La suite de l’étude est donc réalisée sur ces IONP.

Avec ces ratios fluorophores/MNP, la présence des fluorophores ne perturbe pas les propriétés de furtivité, ce sont les mêmes fluorophores que ceux utilisés pour les études de furtivité dans le chapitre 2. Dans les expériences de micromanipulation suivantes, les IONP de 11 nm de diamètre cristallin avec le polymère N₃ stat sont utilisées. Elles sont appelées MNP, pour "magnetic nanoparticles".

Cacher les fonctions azotures restantes

Avant l’injection dans les cellules, les dernières fonctions azotures sur les IONP-N₃ qui n’auraient pas réagi sont cachées, car elles risquent de créer des interactions non spécifiques dans les cellules. Les IONP-GFP-FP647 réagissent avec un DBCO-NHS hydrolysé en DBCO acide carboxylique selon la réaction schématisée Figure 3.10 et le protocole décrit dans la partie 2.4.2.

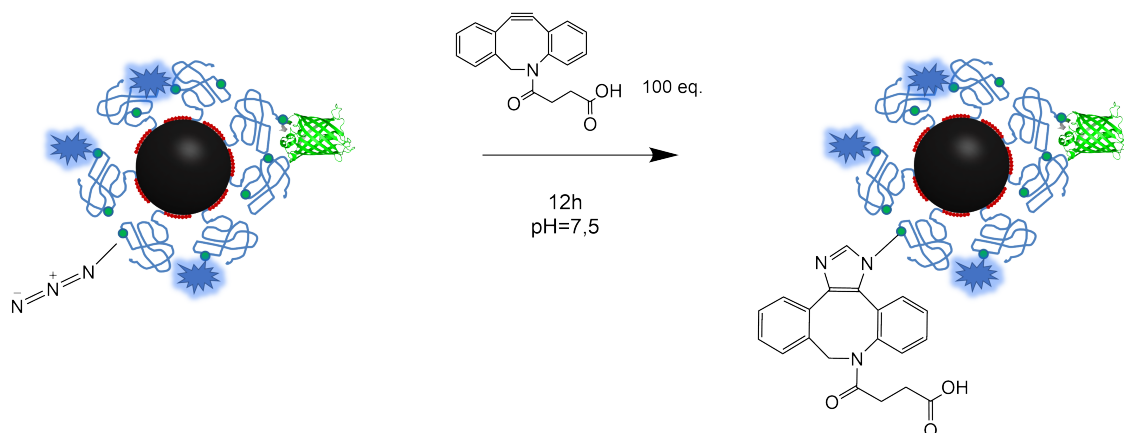


FIGURE 3.10 – Schéma de la réaction des IONP-GFP-FP647 avec du DBCO-NHS hydrolysé pour cacher les fonctions azotures résiduelles.

3.2 Ciblage d'un locus génomique par les nanoparticules magnétiques

3.2.1 Microinjection et colocalisation

Des nanoparticules magnétiques fluorescentes conjuguées à de la GFP ont ainsi été synthétisées. La GFP a pour but de cibler la répétition *tetO*, située sur le chromosome 1, via un nanobody anti-GFP fusionné à une protéine TetR. Le but de ces nanosondes est d'étudier la dynamique de la chromatine dans des cellules vivantes. Les MNP sont introduites dans le noyau des cellules par microinjection, puis l'efficacité du ciblage et le déplacement du locus est étudié par microscopie de fluorescence.

La microinjection consiste en l'injection d'un faible volume d'une solution dans le cytoplasme ou noyau d'une cellule vivante grâce à une très fine aiguille qui envoie un flux continu de solution de MNP. En contrôlant la position et la hauteur de l'aiguille, il est possible d'injecter un volume de solution dans le noyau des cellules (environ 10 % du volume du noyau) sans compromettre leur viabilité. La Figure 3.11 montre l'image en transmission des cellules avec l'aiguille au-dessus. L'aiguille est chargée avec une solution de MNP à 0,1 μM avec 1 mg/mL de polymère P(SPE) libre. L'aiguille, d'un diamètre interne de 500 nm, a tendance à se boucher. Pour limiter ce phénomène du polymère P(SPE) est introduit en excès dans la solution injectée. Le verre est une surface très chargée et les polymères polyzwitterion ont tendance à s'y adsorber. Le polymère en excès a donc pour but de recouvrir le verre de l'aiguille et ainsi d'éviter les interactions entre les MNP et le verre qui pourraient boucher l'aiguille. Pour éviter que l'aiguille ne se bouche, la solution de MNP est aussi centrifugée dans un tube Eppendorf à 12 000 g pendant 5 min pour faire tomber dans le fond du tube des agrégats potentiels, et uniquement le haut de la solution est prélevé pour être introduit dans l'aiguille.

Protocole d'imagerie et microinjection des cellules

Les cellules U2OS-263-TetR-mCherry- α GFP sont mises en culture dans une boîte de pétri FluoroDish (Ibidi) de 35 mm de diamètre dans leur milieu de culture, au plus tard 12 h avant l'expérience. Les cellules sont imagées avec un microscope à champ large (Nikon, Eclipse Ti2) avec une lampe Spectra-X light (Lumencor), un objectif à huile 100x/1.49NA (Nikon, CFI Apochromat), une caméra iXon Life 888 EM-CCD (Andor), une platine HLD117NN (Prior) avec un axe vertical piézoélectrique, une platine piezo a Nano-ZL100 (Mad City Labs) et une enceinte (Okolab) pour maintenir l'humidité et la chaleur à 37°C. Le microscope est contrôlé par le logiciel MicroManager. Le système de microinjection est un InjectMan 4 et FemtoJet 4i (Eppendorf) et l'aiguille est une aiguille Femtotip (Eppendorf). Pendant toute la durée de l'expérience, une pression de compensation est appliquée dans l'aiguille. Cette pression permet d'éviter que le milieu de culture ne remonte dans l'aiguille. Il y a donc toujours un léger flux sortant de l'aiguille, ce qui lui évite aussi de se boucher. Cette pression est fixée à 70 hPa. Lors de l'injection, la pression est fixée à 80 hPa pendant tout le temps de l'injection, fixé à 0,2 s. L'aiguille femtotip est chargée avec 3 μL d'une solution de MNP à 0,1 μM avec 1 mg/mL de P(SPE). Ces 3 μL sont prélevés sur le dessus du tube Eppendorf après centrifugation 5 min à 12 000 g pour être sûr de ne pas charger d'agrégats dans l'aiguille. Au cours de l'expérience, le couvercle étant retiré du fluorodish pour permettre à l'aiguille d'être en contact avec les cellules, 500 μL d'eau ultrapure et autoclavée sont ajoutés à la boîte de pétri pour compenser l'évaporation. Les images sont acquises avec un temps d'exposition de 100 ms et une puissance de 5 % sur la lampe Spectra-X. Les Z-stacks sont pris de 3 à -3 μm avec $\delta=0,3 \mu\text{m}$.

Protocole de culture cellulaire

Les cellules U2OS 263 TetR - mCherry - α GFP sont cultivées dans un milieu DMEM/F12, HEPES, sans phénol red (ThermoFischer), avec 10 % de sérum de veau fœtal (Sigma-Aldrich) et 1 % de pénicilline/streptomycine (Sigma-Aldrich) à 37 °C et 5 % CO₂. Les cellules sont repiquées régulièrement, tous les 2 ou 3 jours, à 1/4 ou 1/8, avec de la TrypLE (Gibco) pour les détacher du fond de la boîte de pétri dans laquelle elles sont cultivées.

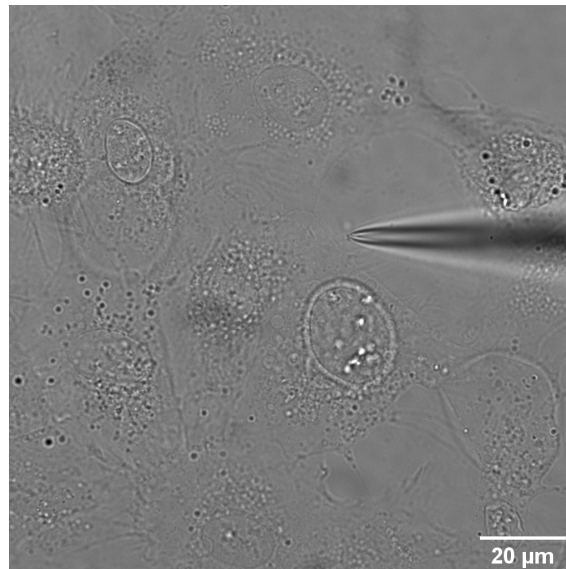


FIGURE 3.11 – Image au microscope en transmission de l’aiguille de micro-injection au-dessus des cellules. La cellule sous l’aiguille a été injectée.

Pour étudier l’efficacité du ciblage des MNP sur ce locus, la microscopie de fluorescence est utilisée. Les cellules sont visibles en transmission. La protéine TetR fusionnée avec la mCherry s’accroche sur sa séquence *tetO*, donc le canal mCherry permet de voir le locus génomique à cibler. Les MNP sont visibles sur le canal rouge lointain. La Figure 3.12 montre en A le canal de la mCherry : on distingue 6 cellules avec 6 points lumineux qui correspondent aux locus. La Figure 3.12B montre les mêmes cellules, mais via le canal rouge lointain. On voit les MNP qui ont été injectées dans 6 cellules. La Figure 3.12C est la superposition des deux précédentes figures, avec en vert les MNP-GFP injectées et en rouge la protéine TetR-mCherry- α GFP. Les locus colocalisent, donc les MNP-GFP ont bien ciblé le locus. Une cellule en haut au milieu n’exprime pas la protéine de liaison TetR-mCherry- α GFP, probablement parce que le transgène précédemment inséré a été éliminé lors d’une recombinaison génétique (fréquentes dans des lignées cellulaires cancéreuses comme les U2OS). Dans cette cellule les MNP ne s’agrègent pas en un point, preuve que c’est la présence de la protéine de liaison qui est responsable du recrutement des MNP au niveau du locus. La cellule centrale n’a pas été injectée.

Cibler la chromatine avec des MNP-GFP fonctionne pour la lignée cellulaire exprimant la protéine TetR-mCherry- α GFP, mais permet uniquement de cibler la répétition *tetO* sur le chromosome 1. Une autre approche a été testée pour pouvoir cibler d’autres loci et

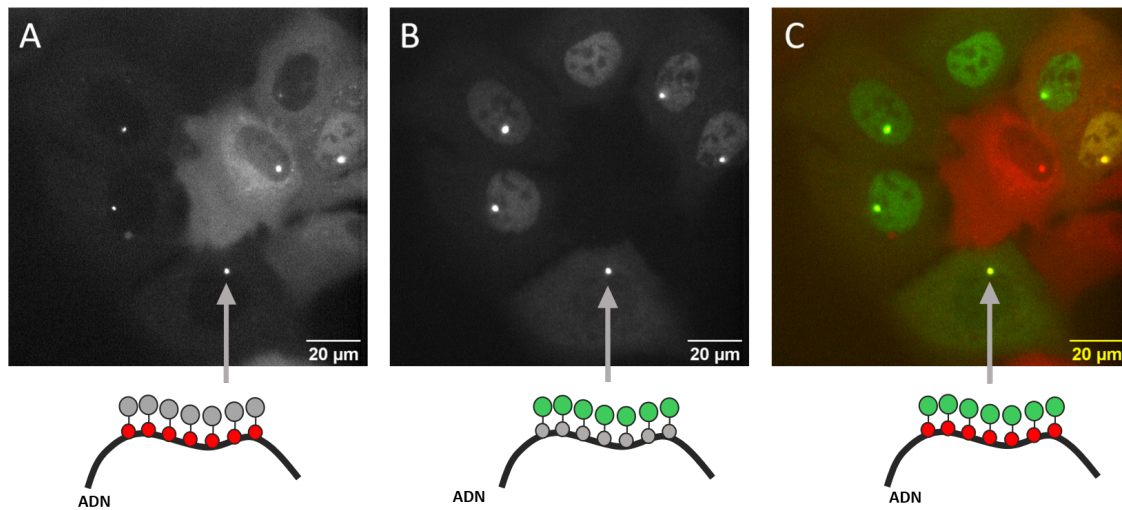


FIGURE 3.12 – Image en microscopie de fluorescence de 7 cellules. Le noyau de 6 de ces cellules est microinjectées avec des MNP-GFP-fluorophore. A : canal de la mCherry, c'est-à-dire de la protéine TetR-mCherry- α GFP qui s'accumule au locus à cibler B : canal du fluorophore des MNP injectées dans le noyau C : Superposition de la première (rouge) et de la deuxième (vert) image.

d'autres lignées cellulaires. Elle est fondée sur l'utilisation de la protéine deadCas9, et est décrite en Annexe 4.3.4

3.2.2 Accumulation

Une fois injectées dans le noyau les MNP s'accumulent donc au locus. Pour étudier cette accumulation, des images de cellules injectées ont été prises pendant les vingt premières minutes après l'injection. L'intensité de fluorescence au niveau du locus est mesurée et suivie au cours du temps. Le logiciel ImageJ est utilisé pour mesurer la fluorescence du locus. On observe une augmentation de l'intensité de fluorescence pendant les premières minutes, puis l'intensité atteint un plateau. Les MNP mettent donc quelques minutes pour s'accumuler au locus.

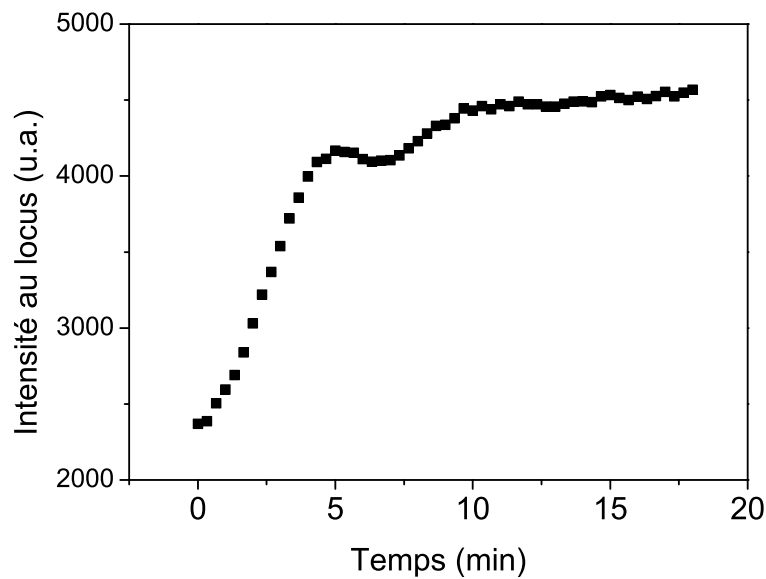


FIGURE 3.13 – Évolution de l'intensité de fluorescence sur le locus génomique au cours du temps après injection de MNP GFP dans le noyau de la cellule, sur le canal rouge lointain.

3.2.3 Compter les nanoparticules par locus

Il est intéressant de pouvoir compter le nombre de MNP au locus, notamment pour pouvoir ensuite déduire la force qui y est appliquée. Pour cela, l'intensité de fluorescence du locus est utilisée, car elle est proportionnelle au nombre de MNP au locus. Pour avoir accès à un nombre absolu, il faut connaître l'intensité d'une unique MNP sur ce microscope. Pour mesurer cette intensité, une très faible quantité de MNP sont injectées dans le cytoplasme de cellules (concentration de 25 nM de MNP dans l'aiguille). Cette faible concentration permet de voir des MNP uniques dans le cytoplasme des cellules avec la lampe Spectra-X à une puissance de 100 % et une exposition de 5 ms. Les MNP sont injectées dans le cytoplasme, car sa finesse à certains endroits permet de limiter la diffusion en z des MNP. Ces images permettent de mesurer l'intensité de la MNP pour une lampe Spectra-X à 100 % (Figure 3.14a). L'intensité d'un objet est proportionnelle à la puissance de la lampe et à la durée d'exposition, ce qui permet de déduire l'intensité d'une MNP pour les conditions d'imagerie usuelles (Spectra-X à 5 % et exposition de 100ms). Pour vérifier que les MNP observées sont bien des MNP uniques et non des agrégats de quelques MNP, un laser de plus forte puissance, 180 mW, a été utilisé. La densité de points lumineux entre les deux images Figure 3.14b est comparée. Une densité similaire est observée, ce qui signifie que le laser ne révèle pas de MNP de plus faible intensité qui seraient invisibles à la lampe, et donc que les points observés sur la Spectra-X sont bien des MNP uniques. Les mesures sont faites sur des vidéos des MNP avec une image toutes les 5 ms. Pour mesurer l'intensité de fluorescence d'une MNP, une zone d'intérêt est sélectionnée autour de la MNP. La somme des valeurs des pixels de la zone est calculée (outil Rawintden sur ImageJ). À cette valeur

est soustraite la somme des valeurs des pixels d'une zone de même taille ne contenant pas de MNP et proche de la zone initiale, pour retirer le bruit de fond. En ajustant la valeur obtenue dans ces conditions d'imagerie (Spectra-X à 100 % et exposition de 5 ms) l'intensité lumineuse d'une MNP dans les conditions d'imagerie usuelles (Spectra-X à 5 % et exposition de 100 ms) est déduite. L'analyse se fait sur des MNP mobiles, c'est-à-dire qui ont changé de place sur l'image suivante (5 ms plus tard), pour s'assurer qu'elles diffusent, et éviter d'analyser des agrégats, ou des composants de la cellule. L'intensité des MNP est mesurée est de 425 u.a de médiane, avec un écart type de 115 u.a (mesure réalisée sur 10 MNP). La médiane est prise en compte, car elle est moins sensible à la perturbation créée par la mesure d'un agrégat de plusieurs MNP.

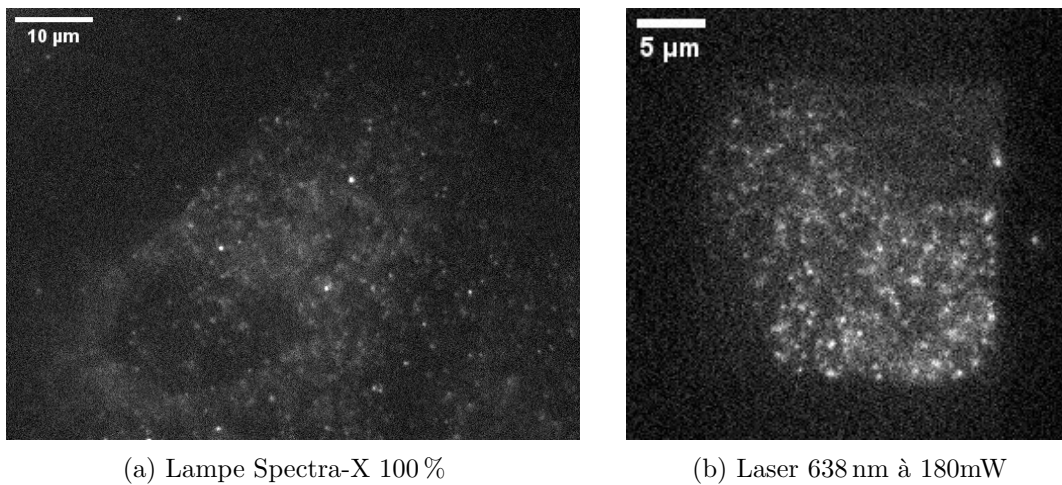


FIGURE 3.14 – MNP injectées en faible concentration dans le cytoplasme de cellules vivantes pour mesurer la fluorescence d'une MNP unique.

Cette valeur permet d'estimer le nombre de MNP fixées à un locus. Sur la Figure 3.12B, le locus le plus lumineux (au milieu à gauche) contient 2 000 MNP, les deux autres locus de gauche 1 000, et ceux de droite 350. Il y a 20 000 sites de liaison pour la protéine TetR par cellule, donc environ un site sur dix est occupé pour la cellule avec le plus de MNP. La quantité de MNP au locus peut varier en fonction de plusieurs facteurs : la quantité de MNP injectée dans chaque cellule n'est pas constante et l'accessibilité de l'ADN au niveau du locus et le niveau d'expression de la protéine TetR-mCherry-aGFP peuvent varier.

3.3 Manipulation magnétique

L'accumulation de MNP obtenue sur un locus génomique a pour but d'appliquer une force sur le locus. Un dipôle magnétique est soumis à une force s'il se trouve dans un gradient de champ, selon la formule :

$$\vec{F} = \vec{\nabla}(\vec{\mu} \cdot \vec{B})$$

Avec \vec{F} la force exercée sur le dipôle de moment magnétique $\vec{\mu}$ dans un champ magné-

tique \vec{B} .

Il faut donc placer le locus dans un gradient de champ magnétique pour pouvoir appliquer une force.

3.3.1 Présentation du dispositif de manipulation magnétique

Un aimant avec un rayon de courbure faible permet de créer un fort gradient de champ magnétique [123]. Le système de manipulation magnétique actuellement développé dans le laboratoire d'Antoine Coulon est une pointe magnétique qui se place sur le bras motorisé de l'aiguille d'injection, ce qui permet de contrôler sa position dans l'espace voir Figure 3.15.

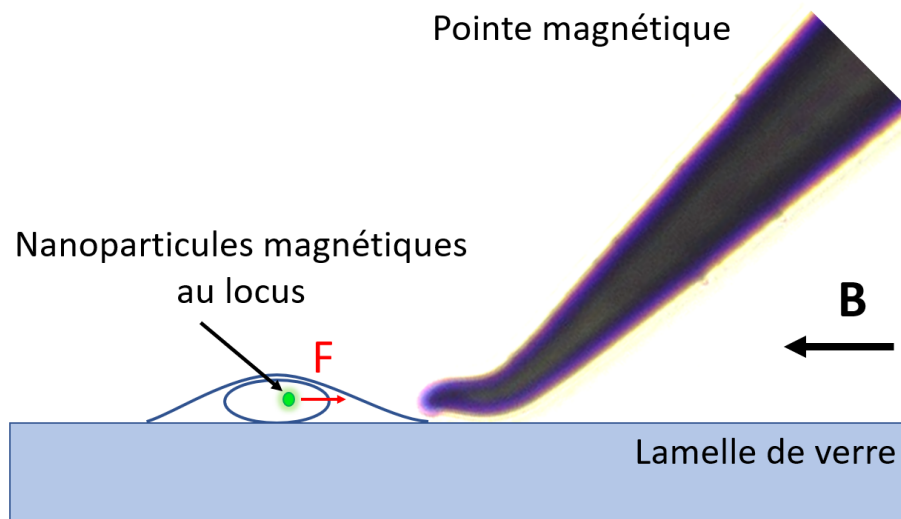
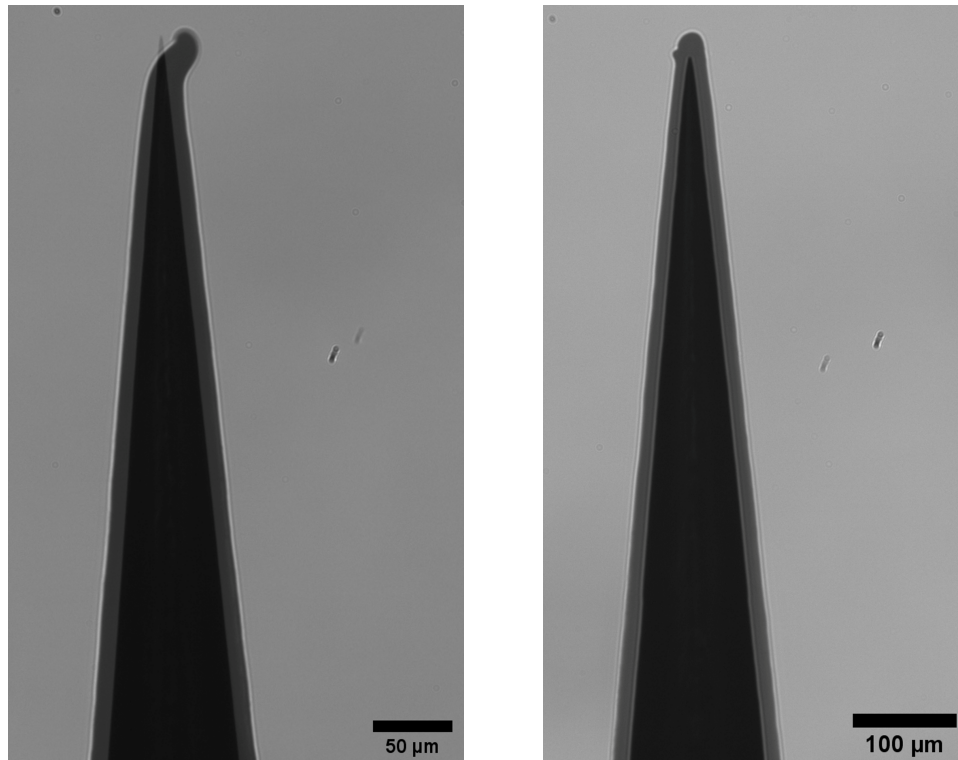


FIGURE 3.15 – Schéma de la pointe magnétique s'approchant d'une cellule. Le locus génomique (vert) est dans le noyau d'une cellule.

La pointe magnétique est une pointe de tungstène avec un rayon de courbure de $0,5 \mu\text{m}$ (ptg20-0,5, Microworld). Pour être magnétique, elle est recouverte de permalloy, alliage nickel fer de grande perméabilité magnétique, par électrodéposition. La pointe est plongée dans un bain contenant des sels de fer et de nickel au-dessus d'une plaque de permalloy. Un courant continu est appliqué entre la pointe et la plaque de permalloy. Les cations métalliques sont réduits à la surface de la pointe, formant une couche de permalloy. Le protocole est décrit dans Yapici et al. [124]. L'électrodéposition a été réalisée par Simon Dumas au laboratoire Macromolécules et Microsystèmes en Biologie et en Médecine (MMBM). Sur la Figure 3.16 la pointe de tungstène est visible sous la couche de permalloy. L'électrodéposition a été réalisée pendant 8h50 à $0,5 \text{ mA}$. Les deux pointes ont été utilisées pour faire de la manipulation. La première est un peu tordue, car la pointe était située trop près de la plaque de permalloy pendant l'électrodéposition. Trois aimants permanents en néodyme (NdFeB) (magnétiques.fr) sont ajoutés plus haut sur la pointe pour la magnétiser.

La pointe est ensuite manipulée jusqu'à être proche de la cellule. Il est possible de faire varier le gradient du champ magnétique au locus en bougeant la pointe.



(a) Pointe 1, légèrement tordue,
utilisée Figure 3.17.

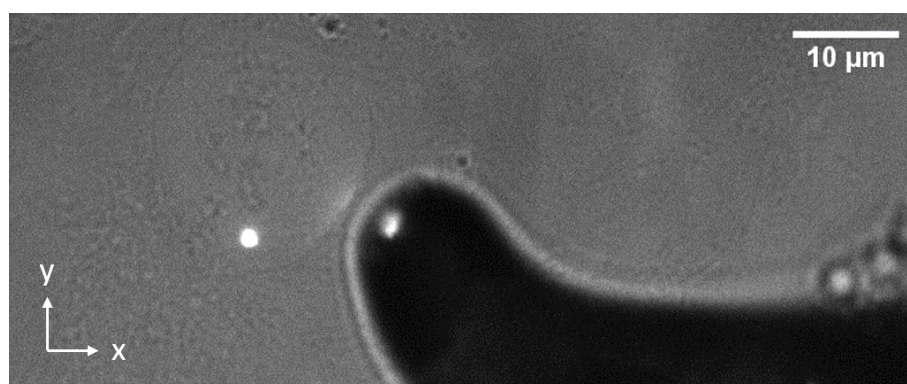
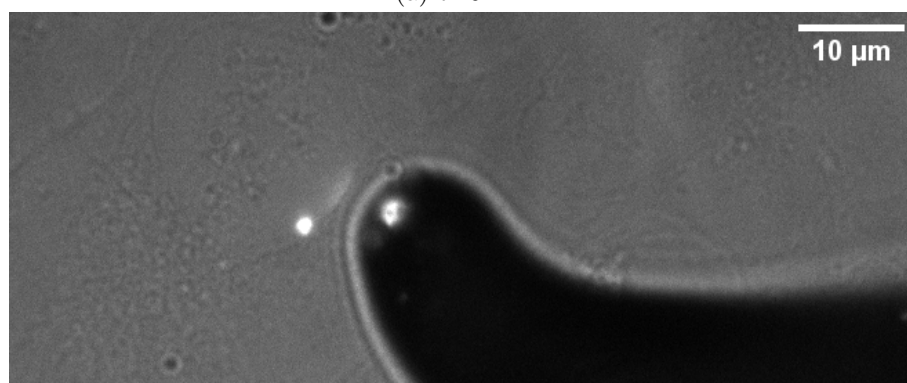
(b) Pointe 2,
utilisée Figures 3.19, 3.20, 3.21.

FIGURE 3.16 – Pointes magnétiques de tungstène après électrodéposition de permalloy. Chaque image est la superposition des images de la pointe avant et après électrodéposition, permettant d’apprécier l’épaisseur du dépôt.

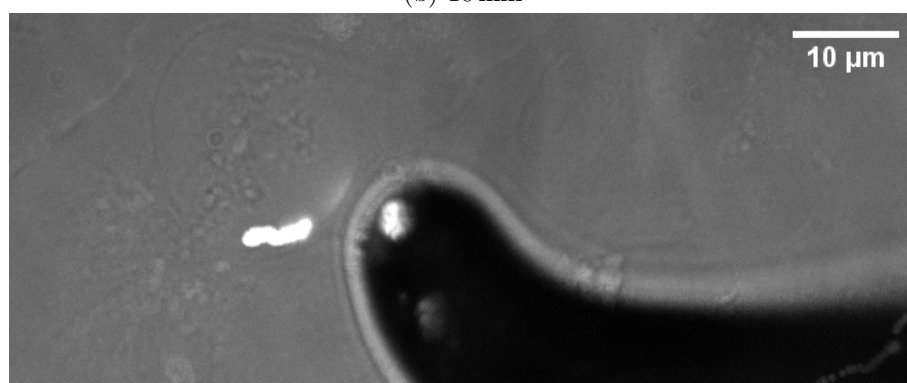
3.3.2 Déplacement du locus génomique

Une force est appliquée sur un locus génomique selon le schéma Figure 3.15. Des cellules sont injectées avec une solution de MNP comme décrit en 3.2.1. La manipulation est réalisée au moins une heure après, afin de s’assurer que les MNP sont bien accumulées au locus et que la cellule a bien supporté la microinjection. La Figure 3.17 présente un exemple de manipulation. Il y a 2 500 MNP au locus, qui est bien visible sous la forme d’un point blanc. Le locus est immobile pendant plusieurs minutes, puis à $t=0$ min la pointe magnétique est approchée du noyau (Figure 3.17a). Une image est prise toutes les 10 secondes. À $t=10$ min, le locus s’est déplacé en direction de la pointe jusqu’au bord du noyau (Figure 3.17b), puis ne bouge plus, car il a atteint la membrane nucléaire interne. Sur la Figure 3.17c est représentée une superposition de toutes les images entre 0 et 12,5 min selon le type de projection "Maximum Intensity" sur le logiciel ImageJ, ce qui permet de mettre en valeur la trajectoire du locus au cours du temps. De 0 à 10 min le locus s’est déplacé de $5 \mu\text{m}$, soit une vitesse moyenne de $0,5 \mu\text{m}/\text{min}$.

Le déplacement du locus au cours du temps selon les axes (x,y) qui définissent le plan de l’image est représenté Figure 3.18. L’incertitude sur la mesure est estimée en prenant l’écart maximal réalisé en pointant 5 fois le locus sur la même image. Cet écart est de

(a) $t=0$ min

(b) 10 min

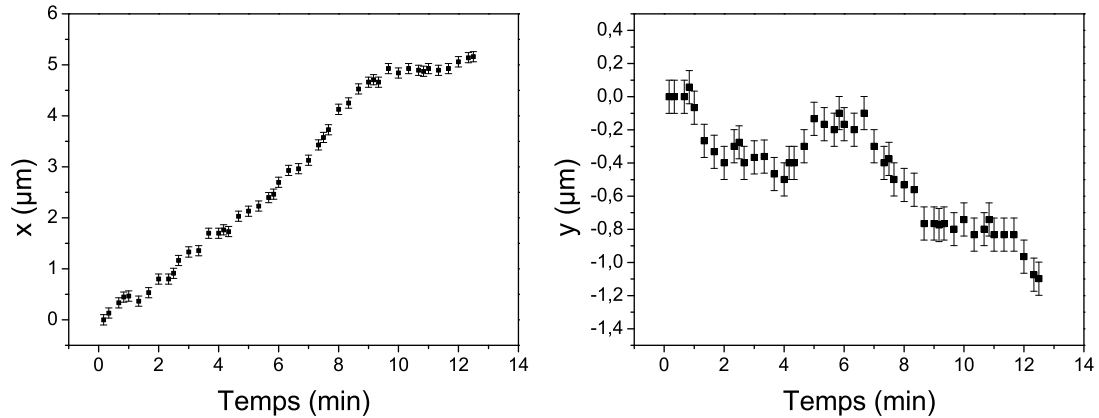


(c) Superposition de toutes les images en prenant la valeur maximale de chaque pixel au cours du film.

FIGURE 3.17 – Micromanipulation d'un locus génomique lié à des MNP de 11 nm de diamètre cristallin. Les images sont la somme des images en lumière transmise (montrant les cellules et la pointe magnétique) et des images dans le canal 637 nm (montrant les MNP accumulées au locus).

0,1 μm , soit environ 10 % du diamètre du locus.

Il semble qu'il y ait un obstacle sur le trajet du locus entre 8 et 10 min sur l'axe x et 6 et 8 min sur l'axe y. Après 10 min, le locus ne bouge plus, il a atteint la membrane nucléaire. Le déplacement mesuré à partir de 12 min correspond à un mouvement de la membrane nucléaire. Cette mesure a été réalisée avec la pointe 1.



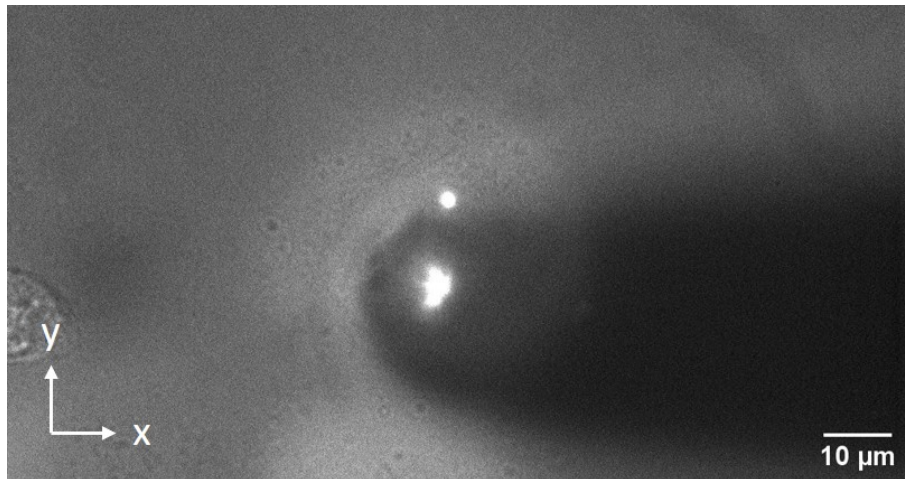
(a) Déplacement du locus selon l'axe x.

(b) Déplacement du locus selon l'axe y.

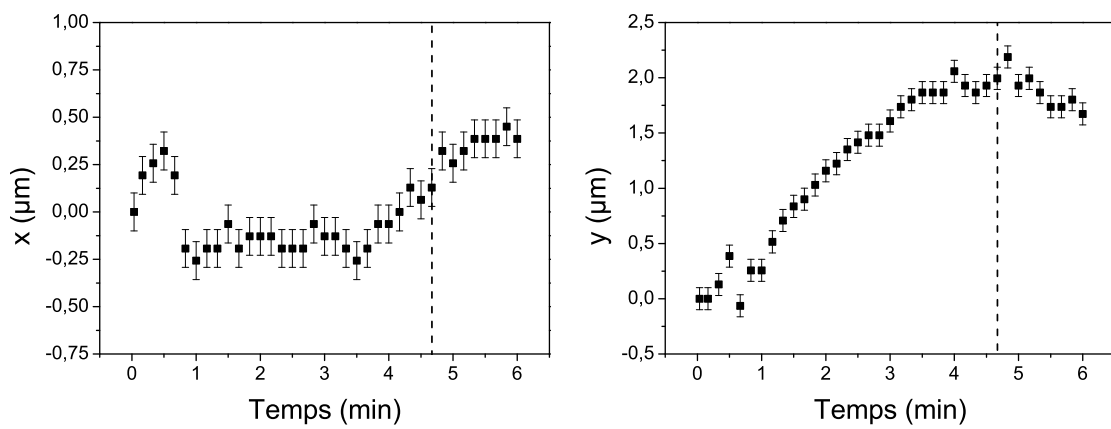
FIGURE 3.18 – Déplacement du locus selon les axes x et y, 2 500 MNP au locus. Le locus s'arrête car il touche la membrane nucléaire.

D'autres déplacements ont été suivis avec la pointe 2 et différentes positions de la pointe. Sur la Figure 3.19, la pointe est placée sous le locus, qui se déplace alors selon l'axe y. Les Figures 3.20 et 3.21 représentent le déplacement du même locus, mais avec la pointe dans deux positions différentes : à droite du locus pour la Figure 3.20 et à gauche/au-dessus du locus Figure 3.21. La pointe est toujours située suffisamment au-dessus de la cellule selon l'axe z pour éviter de la toucher, car cela perturberait la cellule qui se rétracterait, faussant les mesures de déplacements. Sur les Figures 3.19, 3.20 et 3.21, le déplacement du locus une fois la pointe retirée, c'est-à-dire en absence de champ magnétique, est aussi mesurée. L'instant où le champ magnétique est retiré est symbolisé par la ligne verticale en pointillés. Sur les Figures 3.19 et 3.21, le locus ne bouge pas beaucoup une fois le champ retiré alors que sur la Figure 3.20 il revient à sa position initiale en x. Pour d'autres cellules le locus ne bouge pas lors de l'application de la force. Sur la Figure 3.17, le locus s'arrête quand il touche la membrane nucléaire, alors que sur les Figures 3.19, 3.20 et 3.21 il s'arrête avant d'avoir touché la membrane, sûrement arrêté par un obstacle. Il y a donc une variabilité entre les cellules. Les vitesses moyennes de déplacement sont aussi variables, et ne sont pas proportionnelles au nombre de MNP au locus. Sur la Figure 3.18, la vitesse moyenne est de 0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ pour 2 500 MNP au locus, Figure 3.19 0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ pour 3 500 MNP au locus, Figure 3.20 0,25 $\mu\text{m}/\text{min}$ pour 1 500 MNP au locus et Figure 3.21 0,83 $\mu\text{m}/\text{min}$ pour 1 500 MNP au locus.

Le système a donc permis le déplacement du locus génomique et donc l'application d'une force sur la chromatine.

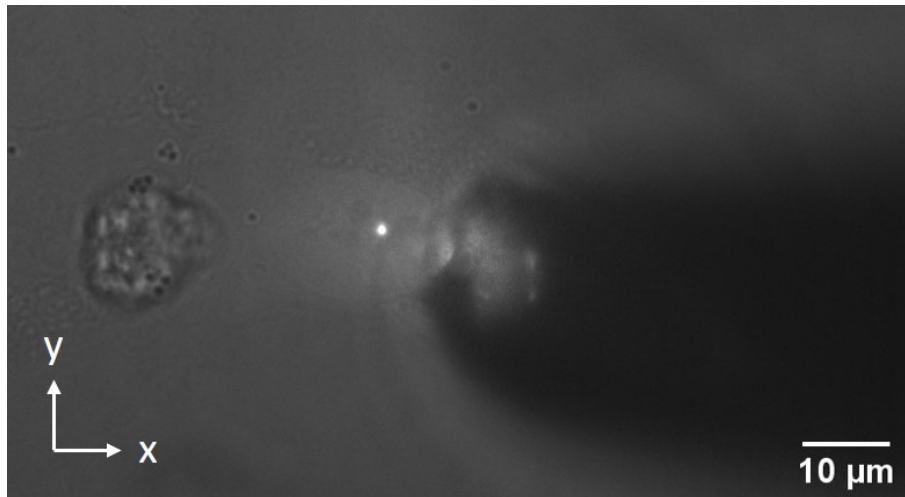


(a) La pointe est située en dessous du locus.

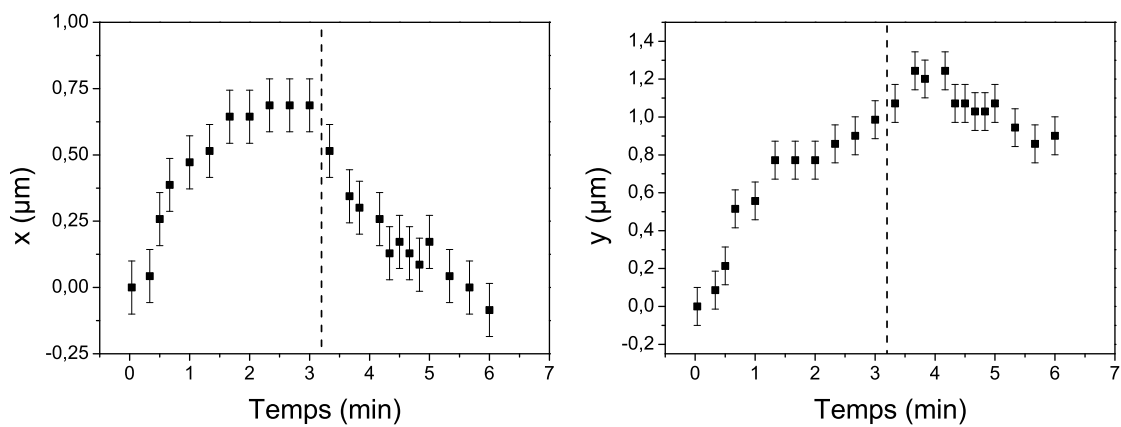


(b) Déplacement du locus selon l'axe x . La (c) Déplacement du locus selon l'axe y . La ligne en pointillés marque l'arrêt du gradient de champ magnétique.

FIGURE 3.19 – Déplacement du locus selon les axes x et y , 3 500 au locus. Le locus s'arrête avant d'atteindre la membrane, et reste immobile après l'arrêt du gradient de champ.

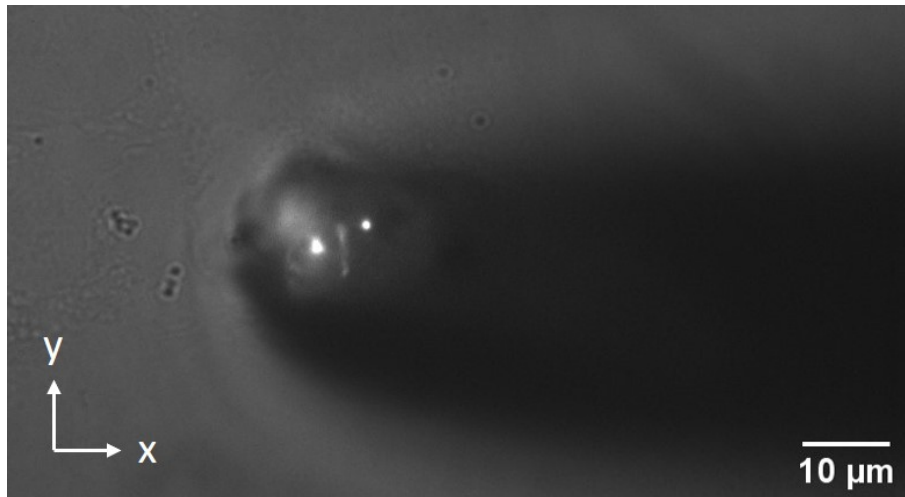


(a) La pointe est située à droite du locus.

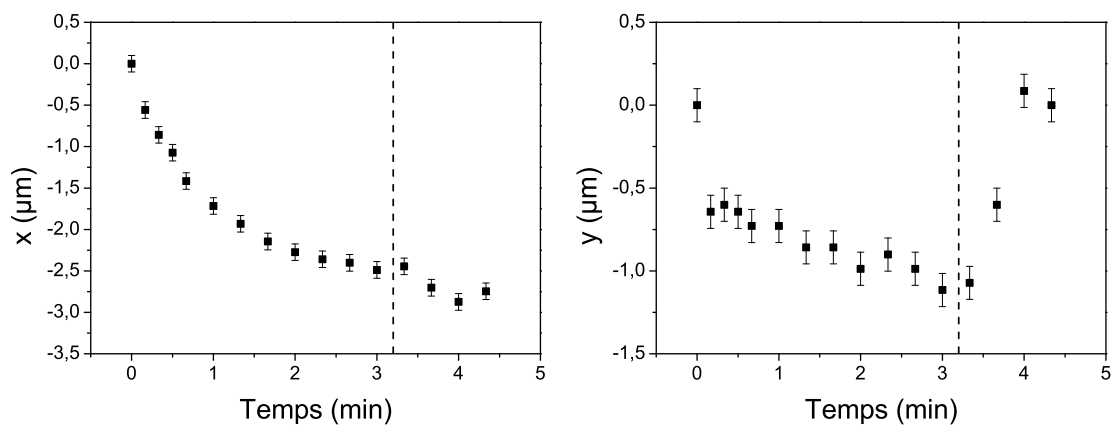


(b) Déplacement du locus selon l'axe x. La (c) Déplacement du locus selon l'axe y. La ligne en pointillés marque l'arrêt du gradient de champ magnétique.

FIGURE 3.20 – Déplacement du locus selon les axes x et y, 1 500 MNP au locus. Le locus s'arrête avant d'atteindre la membrane, et retourne vers sa position initiale après l'arrêt du gradient de champ magnétique.



(a) La pointe est située à gauche et au-dessus du locus.



(b) Déplacement du locus selon l'axe x. La (c) Déplacement du locus selon l'axe y. La ligne en pointillés marque l'arrêt du gradient de champ magnétique.

FIGURE 3.21 – Déplacement du locus selon les axes x et y, 1 500 MNP au locus. Le locus s'arrête avant d'atteindre la membrane, et retourne vers sa position initiale en y après l'arrêt du gradient de champ magnétique, mais pas en x.

3.3.3 Calibration de la force appliquée sur le locus

Le locus se déplace au cours du temps sous l'effet de la pointe magnétique. Il serait intéressant de calculer la force appliquée sur le locus, afin de la comparer avec d'autres forces en jeu dans le noyau des cellules.

Avec le moment magnétique des particules et le gradient de champ magnétique

Deux approches sont envisagées pour mesurer cette force. La première est de déduire la force de l'équation :

$$\vec{F} = \vec{\nabla}(\vec{\mu} \cdot \vec{B}) \quad (3.1)$$

Avec \vec{F} la force exercée sur le dipôle de moment magnétique $\vec{\mu}$ dans un champ magnétique \vec{B} .

Le moment magnétique s'aligne sur le champ magnétique donc :

$$\vec{F} = \mu \vec{\nabla} B \quad (3.2)$$

On cherche donc à connaître le moment magnétique de l'amas de nanoparticules au locus et le gradient du champ appliqué par la pointe. Le calcul du gradient du champ est en cours d'étude dans le laboratoire Dynamique Spatio-temporelle des Fonctions Génomiques par Colin Morand. Le moment magnétique du locus est la somme des moments magnétiques des MNP accrochées au locus. Le nombre de MNP au locus peut être déterminé par fluorescence comme expliqué dans la partie 3.2.3. Le moment magnétique des MNP est mesuré par magnétomètre à échantillon vibrant (Vibrating-sample magnetometer, VSM), décrit dans la Partie 2.1.5.

Antoine Coulon et ses collaborateurs ont travaillé sur la manipulation de la chromatine avec des nanosondes magnétiques avec un autre type de nanoparticules, issues de la ferritine. Les résultats sont présentés dans l'article "Live-cell micromanipulation of a genomic locus reveals interphase chromatin mechanics" de Keizer et al. [54]. La ferritine est une protéine intracellulaire qui stocke le fer. Elle forme une cage creuse où le fer est stocké sous forme d'oxyde de fer. Les nanoparticules magnétiques utilisées dans [54] sont des cages de ferritine recombinantes avec de la GFP, chargée avec un cœur de fer. La ferritine est décorée de 24 GFP [53].

Les MNP recouvertes de polymères zwitterioniques et fonctionnalisées avec de la GFP sont développées pour pouvoir appliquer des forces plus intenses qu'avec les nanoparticules ferritine. En effet, il est possible de contrôler la taille et la composition de la nanoparticule d'oxyde de fer lors de sa synthèse, et donc de synthétiser des nanoparticules avec un moment magnétique plus élevé. Les MNP de 11 nm de diamètre ont un moment magnétique de l'ordre de 10 fois supérieur à celui des nanoparticules ferritine, cf tableau 3.2.

Les MNP zwitterioniques ne possèdent pas 24 GFP à leur surface, mais 3 en moyenne. Cela permet à chaque MNP zwitterionique d'occuper moins de sites d'ADN que la ferritine. Ainsi, en ciblant un même site génomique, on peut s'attendre avec les MNP zwitterioniques

diamètre des MNP	Solvant	emu/g	emu/MNP
8 nm	tampon HBS	47	$6,6 \times 10^{-17}$
11 nm	tampon HBS	71	47×10^{-17}
ferritine 7 nm	tampon HBS	54-84	$5 - 8 \times 10^{-17}$

TABLE 3.2 – Moment magnétique de différentes nanoparticules magnétiques d’oxyde de fer, synthétisées par décomposition thermique, et de la ferritine, synthétisée par voie aqueuse.

à une force 10 fois supérieure qu’avec les MNP ferritine, et plus encore si plus de MNP peuvent s’accrocher. Les MNP zwitterioniques ont un moment magnétique supérieur tout en ayant environ la même compacité que les nanoparticules de ferritine : les MNP ont un diamètre hydrodynamique de 28 nm (cf partie 2.3.3) pour un diamètre cristallin au TEM de $10,3 \pm 1,7$ nm. Une mesure de FCS a montré une absence d’augmentation significative du diamètre hydrodynamique après conjugaison avec la GFP. Les nanoparticules de ferritine ont un diamètre cristallin au TEM de $7,1 \pm 0,5$ nm pour un diamètre hydrodynamique de 28 nm [53]. Les diamètres hydrodynamiques sont mesurés par diffusion dynamique de la lumière (DLS).

Calibration indirecte de la force autour de micropiliers avec des microsphères

Dans l’étude de Keizer et al. [54], les cellules exprimant la protéine TetR-mCherry-antiGFPnanocorps sont utilisées pour accrocher les nanoparticules ferritines à la chromatine. Un réseau de micropiliers magnétiques en permalloy permet d’appliquer des cycles de traction-relâchement sur le locus génomique. Le réseau de micropiliers est décrit Figure 3.22.

Un déplacement génomique de l’ordre du micron par minute, en réponse à des forces proches du piconewton, a été observé. Ces mesures couplées à des modélisations de polymères ont permis de démontrer que la chromatine est fluide et ne se comporte pas comme un gel, contrairement à ce qui était auparavant attendu [125, 126, 31]. Le temps et la valeur de la force nécessaires pour déplacer la chromatine mesurée dans cette étude sont de l’ordre de grandeur de ceux de moteurs moléculaires, ce qui suggère qu’ils seraient capables d’organiser le génome dans l’espace. Pour la ferritine la carte des forces créée autour des micropiliers magnétiques (Figure 3.23) a été élaborée. La carte du champ a été simulée, puis la carte de force a été calibrée à partir d’une image de ferritine libre en solution autour des piliers. Le détail est donné dans Keizer et al. [54]. Il est plus simple de cartographier le champ créé par les micropiliers que celui créé par la pointe magnétique, mais les micropiliers sont fixes, donc il n’est pas possible de contrôler la position du champ par rapport au locus. C’est pour cela que le système de pointe magnétique est en cours de développement.

Pour compléter l’étude de Keizer et al. [54], une autre méthode a été développée pour calculer la force appliquée au locus, afin de pouvoir confirmer les résultats. Cette fois-ci, des nanoparticules-ferritine sont accrochées sur des microsphères de polystyrène de $5 \mu\text{m}$

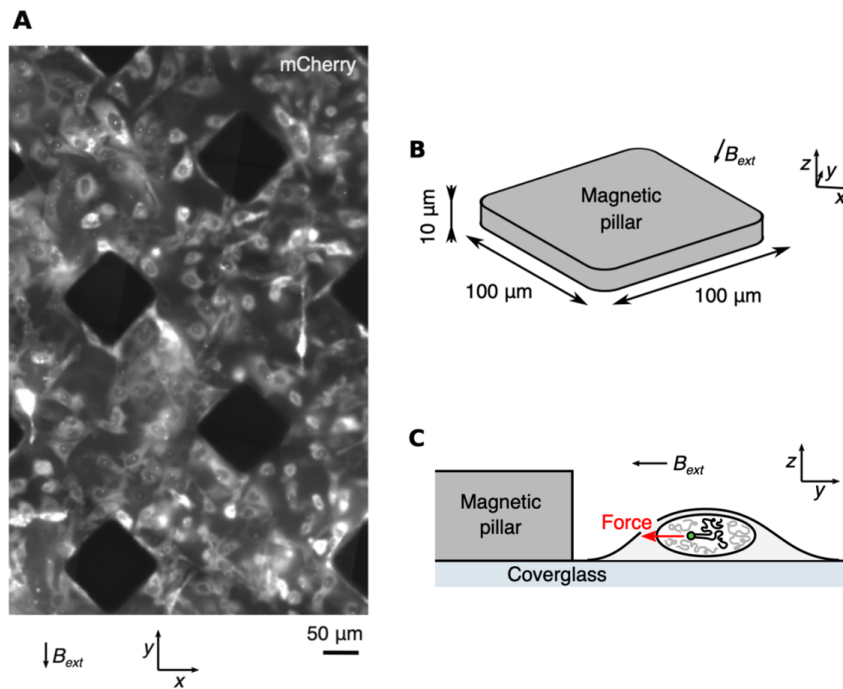


FIGURE 3.22 – Les micropiliers magnétiques (A) Région de la lamelle de verre montrant plusieurs micropiliers (carrés noirs) avec des cellules exprimant la protéine tetR-mCherry-antiGFP. Canal de la mCherry. (B) Schéma des micropiliers (C) Schéma d'une cellule proche du coin d'un micropilier. Figure issue de [54].

de diamètre. Ces microsphères recouvertes de ferritine sont sensibles au gradient de champ et sont attirées par les micropiliers. En mesurant leur vitesse, il est possible de trouver la force à laquelle elles sont soumises grâce à la formule suivante :

$$\vec{F} = \frac{k_B T}{D} \vec{v} \quad (3.3)$$

avec k_B la constante de Boltzmann, T la température et D le coefficient de diffusion des microsphères en l'absence de force, mesuré à partir de l'ajustement de la courbe du déplacement quadratique moyen des microsphères lors de leur sédimentation.

En mesurant la fluorescence des billes, il est donc possible de relier un niveau de fluorescence à une force. Cela permet donc de déduire la force appliquée à un locus en fonction de sa fluorescence, et ce sans compter les MNP au locus, donc sans passer par la mesure de la fluorescence d'une nanoparticule unique, ce qui limite la propagation des erreurs. Dans l'étude "Live-cell micromanipulation of a genomic locus reveals interphase chromatin mechanics" [54] j'ai participé à la fonctionnalisation des microsphères, le contrôle de leur adsorption sur le verre des lamelles de verre, la mesure de leur coefficient de diffusion et les expériences d'attraction par les micropiliers.

Les ferritines sont accrochées aux microsphères par des anticorps. Les microsphères de polystyrène sont carboxylées, mais présentent tout de même des patches hydrophobes sur lesquels les anticorps s'adsorbent. Les anticorps sont ensuite réticulés par liaison peptidique

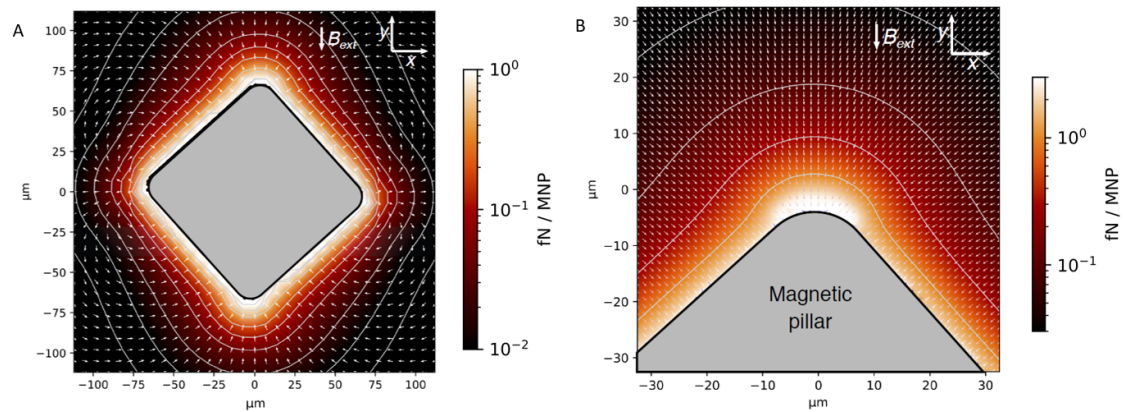


FIGURE 3.23 – Carte des forces autour d’un micropilier, exprimé en fN par nanoparticule de ferritine, issue de [54].

grâce à l’ajout d’EDC qui active les acides carboxyliques. La ferritine est ensuite incubée avec les microsphères anticorps. La synthèse de ces microsphères ferritine se résume selon le schéma Figure 3.24 et le protocole décrit ci-dessous.

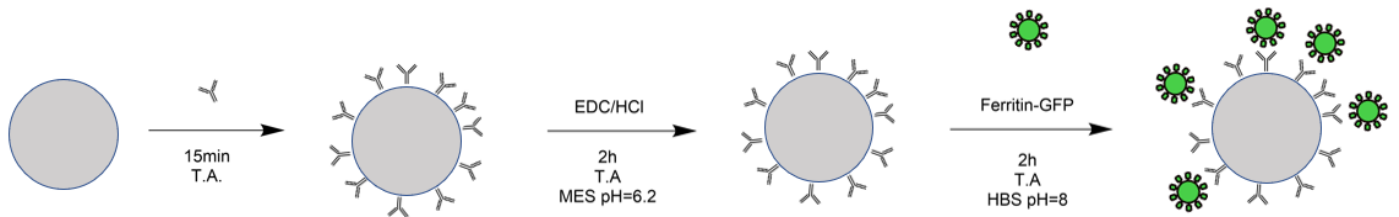


FIGURE 3.24 – Schéma de la réaction des microsphère avec des anticorps anti-GFP, puis avec de la ferritine.

Protocole synthèse des microsphères ferritine GFP

Des microsphères en polystyrène carboxylées de 5 μm de diamètre (Alpha Nanotech) sont recouvertes de nanoparticules ferritine GFP grâce à un anticorps monoclonal anti-GFP (3E6, ThermoFischer). Après lavage par centrifugation (500 tr/min, 2min) avec un tampon acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique (MES) 50 mM pH=6,2, les microsphères sont incubées avec 10^7 anticorps par microsphère pendant 15min sur un agitateur rotatif. Sont ensuite ajoutés 10 μg par μg d’anticorps de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) (Sigma-Aldrich) fraîchement dilué dans le tampon à pH = 6,2. Après 2heures de réaction à température ambiante, les anticorps en excès et l’EDC sont lavés par centrifugation (2000 tr/min, 5min) et les billes sont resuspendues dans un tampon 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH = 8.0. Les microsphères recouvertes d’anticorps sont ensuite incubées avec 10^6 ferritine-GFP nanoparticules par microsphères à température ambiante pendant deux heures avant de laver les ferritines non liées par centrifugation.

Des microsphères recouvertes de ferritine sont ainsi obtenues. La Figure 3.25 gauche représente les microsphères de polystyrène selon un schéma à l’échelle, et à droite montre une image des microsphères en fluorescence, qui permet de voir la ferritine GFP autour des microsphères, et en transmission, pour voir la microsphère seule.

Les microsphères sont ensuite attirées par des micropiliers (Figure 3.26). Ces micropi-

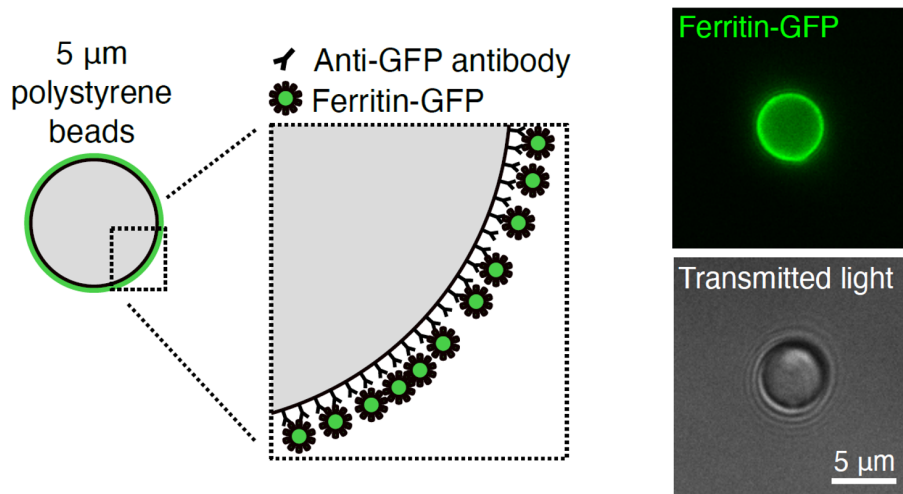


FIGURE 3.25 – À gauche un schéma à l'échelle des microsphères recouvertes de ferritine. À droite en haut une image de microsphère recouverte de ferritine en fluorescence. À droite en bas la même microsphère en transmission. Figure issue de [54].

liers sont faits de permalloy et sont aimantés par un aimant permanent situé de part et d'autre du réseau de micropilier. Leur fabrication est décrite dans Bongaerts et al. [127] et Toraille, Aizel et al. [128]. Les microsphères recouvertes de GFP sont déposées sur la puce de microaimants en situation très diluée. Pour limiter l'adhésion des microsphères sur la lamelle de verre, un excès de sérum d'albumine bovin (BSA) est ajouté au tampon et la puce de microaimants est incubée avec 10 mg de BSA dans 200 μL de tampon pendant 10 min, puis lavée deux fois, avant les expériences de manipulation.

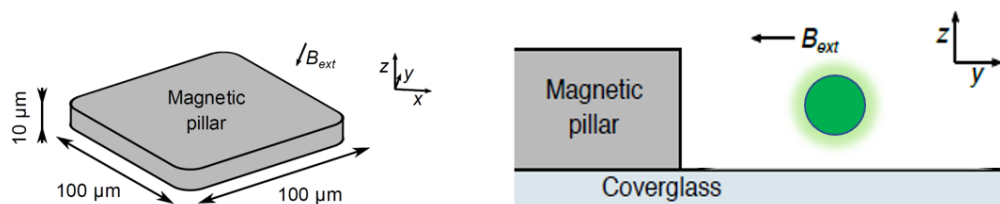
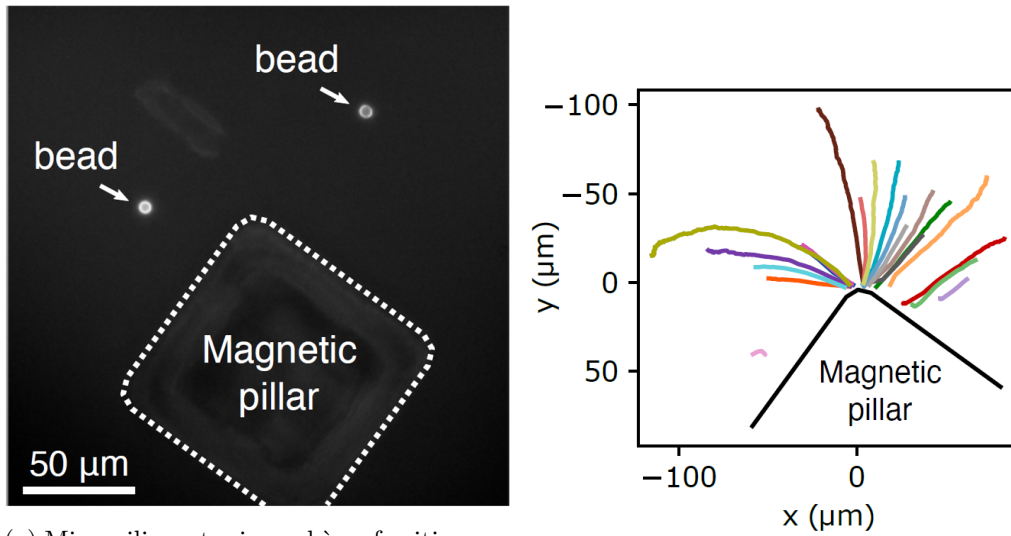


FIGURE 3.26 – Schéma des micropiliers avec une microsphère recouverte de nanoparticules ferritine, adapté de [54].

La Figure 3.27a représente un micropilier avec des microsphères ferritine à proximité. Quand le pilier est aimanté par l'ajout du gros aimant permanent, les microsphères sont attirées par le micropilier. La Figure 3.27b représente la trajectoire de microsphères attirées par le pilier.

La force appliquée sur les microsphères est ensuite calculée selon l'équation 3.3. Sur les graphes de la Figure 3.28, la force appliquée sur la microsphère est tracée en fonction



(a) Micropiliers et microsphères ferritine, canal de la GFP.

(b) Trajectoires des microsphères.

FIGURE 3.27 – Les microsphères sont attirées par les micropiliers quand ils sont aimantés [54].

de sa distance au pilier en micromètre. Les cercles vides sont les mesures de force à partir de la vitesse instantanée des microsphères. Les lignes sont la valeur de force prédite par la fluorescence des microsphères et la carte de force (déterminée à partir du gradient de champ magnétique simulé). Les deux mesures concordent, par conséquent les deux méthodes de mesure semblent valides. Les analyses ont été réalisées par Antoine Coulon et sont issues de l'article Keizer et al. [54].

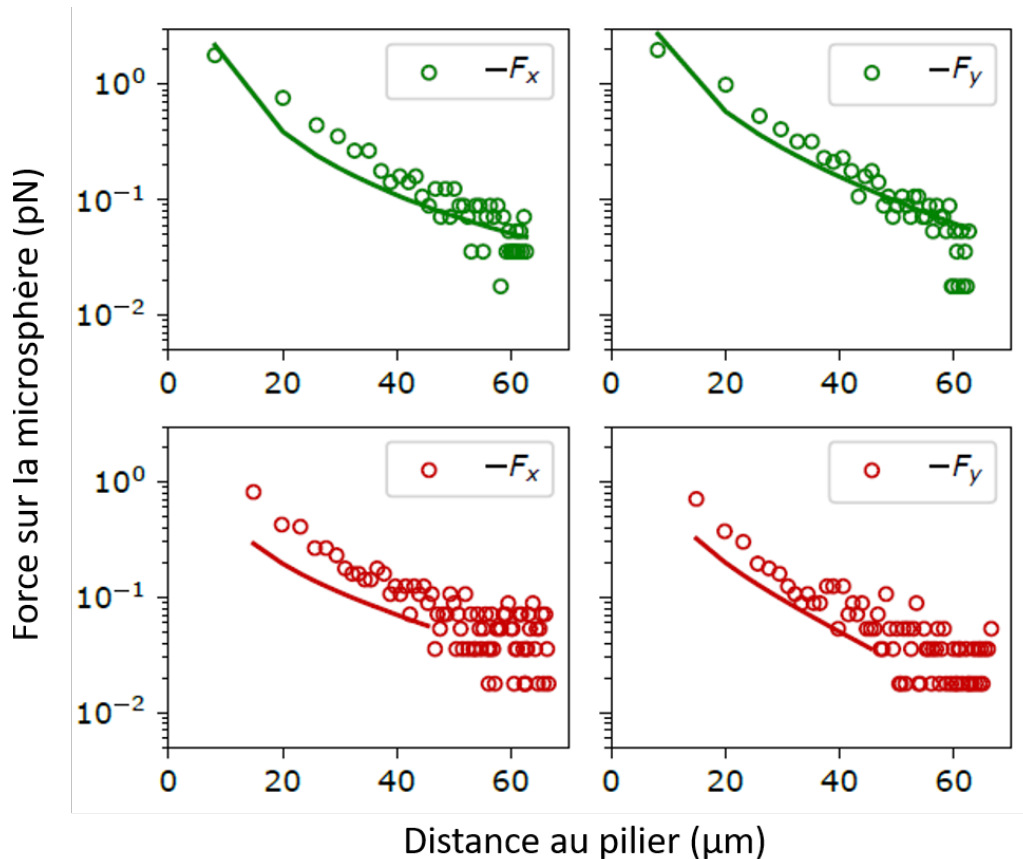


FIGURE 3.28 – Tracé de la force appliquée sur les billes en fonction de la distance au pilier en μm . Les cercles sont la mesure de la force à partir de la vitesse des billes, et en trait plein est représentée la force déduite du niveau de fluorescence des microsphères et de la carte de force de la Figure 3.23 [54].

Comparaison de la force mesurée avec les forces en jeu dans le noyau

Sur la Figure 3.23, le gradient de champ créé par le micropilier permet d'appliquer une force de 0,1 à 1 fN par nanoparticule de ferritine. Pour un locus sur lequel 1000 nanoparticules de ferritine sont accrochées, cela correspond à une force appliquée de 0,1 à 1 pN. Ces valeurs peuvent être comparées avec des valeurs de force obtenues *in vitro* avec des systèmes de pinces optiques ou magnétiques. Un brin d'ADN peut être soumis à une force de plusieurs dizaines de picoNewton sans se casser [129, 130]. La force nécessaire pour casser l'interaction ADN histone et donc débobiner l'ADN des nucléosomes est estimée à 12 pN [131]. Les forces mises en jeu dans nos expériences sont donc inférieures, et sont de l'ordre des forces appliquées par des protéines, comme les moteurs moléculaires. La myosine, un moteur moléculaire qui sert à déplacer des organites sur les filaments du cytosquelette dans le cytoplasme, génère une force de 4 pN [129]. La condensine, un moteur moléculaire qui participe à extruder les boucles de chromatine, donc un acteur essentiel de l'organisation du génome, génère une force de l'ordre de 0,4 pN [32], ce qui est l'ordre de grandeur de la force appliquée dans l'étude de Keizer et al. [54]. Cette étude a ainsi

démontré qu'une force de l'ordre de celle des moteurs moléculaires à l'œuvre dans le noyau est capable de déplacer un locus sur plusieurs microns, donc ces moteurs seraient capables de réorganiser le génome dans l'espace. Les valeurs de force citées ici étant issues d'expérience de pinces optiques et magnétiques, uniquement *in vitro*, il est possible que dans la cellule les valeurs de force soient en réalité différentes.

Les MNP zwitterioniques ont une aimantation 10 fois supérieure à celle des nanoparticules de ferritine. Les forces applicables peuvent alors atteindre 10pN. Ce sont les forces mises en jeu par exemple par la protéine ARN polymérase. Ces nanoparticules pourront donc être utilisées pour étudier d'autres phénomènes. Elles pourront aussi être utilisées pour appliquer des forces sur d'autres sections de l'ADN, moins répétées, et ainsi étudier d'autres fractions de la chromatine qui peuvent avoir des comportements différents, en fonction par exemple du niveau d'expression de leurs gènes.

3.3.4 Conclusion et perspectives

Ce chapitre a présenté une manière d'accrocher des nanoparticules à de la chromatine pour lui appliquer une force. Une protéine, de la GFP, a été accrochée sur des nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de ligands polysulfobétaïne-bloc phosphonate grâce à de la chimie click. Les nanoparticules ont ensuite été injectées dans le noyau de cellules vivantes et ont ciblé de manière efficace un locus génomique sur le chromosome 1 grâce à une protéine TetR-nanocorps anti-GFP. Des milliers de nanoparticules s'accrochent au locus en quelques minutes. Le locus a ensuite été déplacé de plusieurs micromètres en quelques minutes grâce à une pointe magnétique. Enfin deux méthodes de calibration de la force ont été présentées. Ce système de nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de zwitterions pourra, à la suite de futures recherches, aussi cibler d'autres locus grâce à une dCas9, ce qui permettra d'étudier les propriétés de la chromatine à d'autres endroits du génome.

En effet, l'étude de Keizer et al. remet en question la précédente vision de la chromatine comme un polymère rigide, et gélifié à la suite de nombreuses interactions avec d'autres segments du polymère [125, 126, 31]. Keizer et al. ont démontré que la chromatine est fluide, et se comporte comme un polymère libre, avec peu d'effet d'interactions avec d'autres régions de la chromatine dans le noyau pourtant encombré. Il est ainsi possible qu'il y ait différents domaines, avec des régions où la chromatine a beaucoup d'interactions et se comporte comme un gel, et d'autres régions où elle serait fluide, ce qui réconcilierait les deux observations. Ce comportement pourrait être lié à l'état condensé (hétérochromatine) ou décondensé (euchromatine), et aux différences d'activité transcriptionnelle entre ces états [132].

Les nanosondes magnétiques présentées dans ce chapitre pourraient permettre le déplacement d'un locus génomique pour le déplacer dans un autre compartiment ou domaine topologique associé (TAD). Couplées à des marquages pour mettre en valeur l'activité des gènes, ces expériences pourront étudier l'influence de la position spatiale et l'environne-

ment du gène sur la transcription. Cela pourra permettre de déterminer si ce sont les compartiments qui rendent les gènes actifs, ou si l'activité des gènes crée le compartiment. Est-ce que déplacer un gène actif dans de l'hétérochromatine la transformerait en euchromatine, ou est-ce que ce déplacement inactiverait le gène ? Cette région à déplacer ne pourra pas être artificiellement ajoutée comme le segment *tetO*, les séquences répétées comporteront moins de répétitions, il est donc nécessaire d'avoir des sondes permettant d'appliquer une plus grande force avec moins de nanoparticules. L'utilisation des IONP zwitterioniques, couplée à une accroche par la dCas9, sera donc particulièrement intéressante.

Des propriétés physiques différentes entre régions pourraient être liées à l'état de la chromatine, condensée ou décondensée, et aux modifications chimiques des queues des histones. Pour confirmer cette hypothèse, les MNP pourront être utilisées pour appliquer une force sur un locus en présence ou en l'absence de drogue modifiant les queues des histones. Il serait ainsi possible d'étudier le rôle des marques d'histones dans un processus de gélification de la chromatine.

Chapitre 4

Étude des interactions de nanoparticules recouvertes de zwitterions avec des macrophages

Sommaire

4.1	Introduction : Le défi du temps de circulation des nanoparticules dans le sang <i>in vivo</i>	118
4.1.1	État de l'art	118
4.1.2	Les polymères zwitterioniques, de bons candidats pour améliorer le temps de circulation	121
4.2	Suivi de la circulation et la biodistribution de nanoparticules d'oxyde de fer chez des souris par IRM	122
4.2.1	Analyses des propriétés RMN des nanoparticules	122
4.2.2	Suivi des nanoparticules par IRM après injection	125
4.2.3	Perspectives	130
4.3	Études du comportement des nanoparticules <i>in vitro</i>	130
4.3.1	Présentation des deux types de nanoparticules utilisées, les nanoparticules d'oxyde de fer et les quantum dots	130
4.3.2	Étude <i>in vitro</i> avec des composants du sang	131
4.3.3	Études des interactions entre nanoparticules et cellules	134
4.3.4	Conclusions et perspectives sur ce projet	146

4.1 Introduction : Le défi du temps de circulation des nanoparticules dans le sang *in vivo*

4.1.1 État de l'art

Durant les dernières décennies, de nombreuses nanoparticules ont été développées et des découvertes prometteuses dans le domaine de la nanomédecine ont été réalisées. Des progrès ont été faits pour développer des agents de contraste, des agents d'imagerie et des nanoparticules à visées thérapeutiques grâce à leurs propriétés physiques (photothermie, magnétothermie), ou des vecteurs pour la délivrance de médicaments. Les nanoparticules d'or, les quantum dots et les nanoparticules d'oxyde de fer ont été très étudiées, mais de nombreux autres types de nanoparticules organiques ou inorganiques ont aussi été développés avec des propriétés intéressantes.

Un important défi qu'il reste à relever pour l'utilisation des nanoparticules en médecine n'est pas des moindres : réussir à atteindre la zone du corps humain ciblée. Une méthode privilégiée d'administration des nanoparticules est l'injection par intraveineuse dans la circulation sanguine. Cette méthode d'administration devrait en théorie permettre aux nanoparticules de visiter tout le corps via la circulation et de s'accumuler sur leur lieu d'action, souvent un organe malade ou à imager, par un ciblage actif ou passif. Cependant, une analyse de la littérature de la nanomédecine du cancer présenté par Wilhelm et al. [133] met en lumière la faible proportion des nanoparticules qui atteignent une tumeur solide : 0.7% de médiane. C'est un problème, car la dose d'agent thérapeutique ou d'imagerie est alors trop faible pour avoir un effet thérapeutique ou produire un signal, ou il devient nécessaire d'injecter une grande quantité de nanoparticules, ce qui augmente la toxicité du traitement.

Les nanoparticules sont capturées par des macrophages

La plupart des nanoparticules sont détectées et captées par les cellules phagocytaires, "cellules mangeuses" du système immunitaire. Elles filtrent le sang pour retirer les débris, bactéries, virus ou des particules étrangères à l'organisme. Les principales cellules impliquées dans la détection et la capture des nanoparticules sont les macrophages, qui sont les cellules phagocytaires situées dans les tissus. La plus importante population de macrophage est les cellules de Kupffer, situées dans le foie. Il y a aussi des macrophages dans la rate, les ganglions lymphatiques, et tous les tissus. Les macrophages du foie sont les principaux responsables de la détection et la capture des nanoparticules [134]. Ils sont accrochés aux parois des vaisseaux sanguins dans le foie. La capture des nanoparticules par les macrophages les empêche d'atteindre l'organe cible. Une manière de quantifier les chances des nanoparticules d'atteindre leur cible est de mesurer leur temps de circulation dans le système sanguin d'un individu. Plus celui-ci est long, plus les nanoparticules ont une chance élevée de rejoindre leur cible. Ainsi, réussir à augmenter ce temps de circulation est un enjeu majeur de la nanomédecine. Pour ce faire, il est nécessaire de comprendre les

phénomènes qui causent la capture des nanoparticules par les macrophages.

L'idée communément admise est que les nanoparticules sont détectées puis capturées par les macrophages via la couronne de protéines adsorbées à leur surface. Cette reconnaissance est un mécanisme complexe auquel participent de nombreuses protéines, appelées opsonines. Il y a deux catégories principales d'opsonines. La première est les protéines dites "du complément". Ce sont des protéines du sang chargées de détecter des agents pathogènes de manière non spécifique, dans le cadre de l'immunité innée. La deuxième sont les anticorps, des protéines produites par le système immunitaire adaptatif pour détecter les agents pathogènes de manière spécifique. Il est à noter que la liste complète des protéines impliquées dans le mécanisme de reconnaissance est inconnue, et que certaines protéines du sang peuvent agir à l'encontre de ce mécanisme, comme les dysopsonines, qui ont un effet inverse et inhibent la reconnaissance par les macrophages [135].

Les macrophages du foie sont particulièrement efficaces pour détecter et capter les nanoparticules. Plusieurs raisons expliquent cette efficacité; tout d'abord ils sont nombreux, ensuite il existe plusieurs mécanismes de reconnaissance et d'internalisation, décrit Figure 4.1 : la phagocytose, la macropinocytose et l'endocytose avec ou sans récepteur.

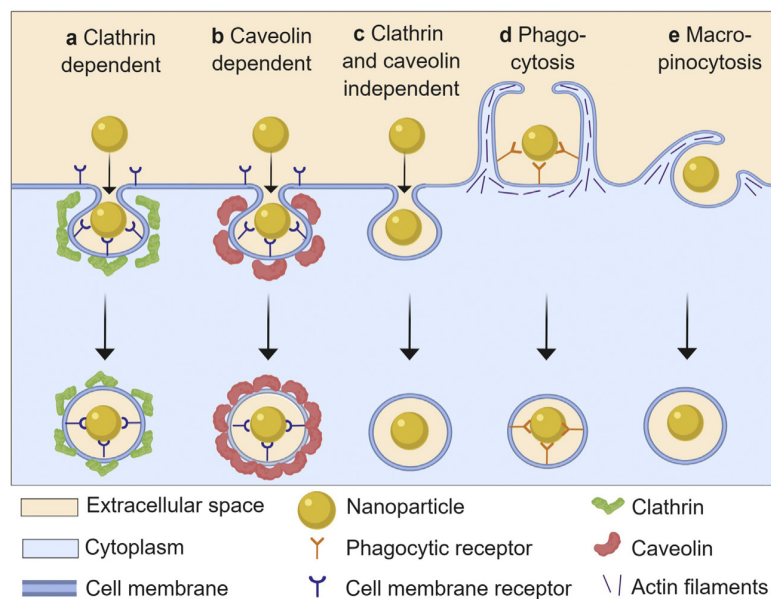


FIGURE 4.1 – Schéma récapitulatif des différents types de capture de nanoparticules [136]. Tous ces mécanismes ont été rapportés comme utilisés par les macrophages [137].

La phagocytose est le processus par lequel une cellule englobe un gros objet solide, par exemple une bactérie, qui a été marquée par des opsonines. La macropinocytose est non spécifique, la cellule englobe un volume du fluide environnant, forme une vésicule et l'intègre. L'endocytose peut être déclenchée par des récepteurs ou par l'activation de radeaux lipidiques. On parle dans ce cas d'endocytose sans récepteur. Dans l'endocytose à récepteur, une vésicule est formée suite à l'activation de récepteurs membranaires. La vésicule peut être formée grâce à des protéines clathrine ou cavéoline [136]. Des études

montrent que les nanoparticules interagissent avec plusieurs récepteurs à la surface des macrophages : les récepteurs éboueurs, qui reconnaissent les lipoprotéines de basse densité, les récepteurs Fc qui se lient aux anticorps, les récepteurs du complément, qui reconnaissent les protéines du complément, et aussi les récepteurs de sucres, le mannose et le galactose, et du folate, la vitamine B9. Les origines des interactions entre les nanoparticules et ces récepteurs sont encore peu comprises.

L'efficacité des macrophages du foie tient aussi à leur position stratégique : sur la paroi des microcapillaires du foie. Le système de microcapillaire permet de créer une grande surface de contact entre le sang et la paroi des vaisseaux, où sont placés les macrophages. De plus le flux du sang ralentit dans ces microcapillaires, ce qui augmente le temps de contact des nanoparticules dans le sang avec les macrophages. Ces deux phénomènes permettent aux macrophages de détecter et donc de capturer une grande proportion des nanoparticules [137].

Stratégies pour diminuer la capture des nanoparticules par les macrophages

Il paraît donc difficile pour les nanoparticules d'échapper à ces macrophages. Plusieurs pistes pour y arriver sont tout de même explorées :

La première, la plus radicale, est de tuer les macrophages du foie avec une drogue spécifique, par exemple des liposomes clodronate [138]. Cela augmente la dose de nanoparticules qui arrive à la tumeur, mais elle plafonne à 2%, ce qui suggère que d'autres macrophages d'autres tissus ont ingéré les nanoparticules. De plus tuer les macrophages peut avoir des effets indésirables sur les patients. Une alternative serait de les bloquer avec par exemple du chlorure de gadolinium [139, 140] ou de la chloroquine [141].

Il est aussi possible de saturer les macrophages avec par exemple un polymère, le dextran [142], ou une grande quantité de nanoparticules : Ouyang et al. [143] ont trouvé qu'en injectant plus de mille milliards des nanoparticules dans une souris les cellules de Kupffer sont débordées, ne captent plus les nanoparticules restantes et donc la dose qui atteint la tumeur augmente. Le principal inconvénient est la toxicité supplémentaire que cette saturation peut apporter.

Une autre stratégie est celle du camouflage dans une membrane de globule rouge, pour s'inspirer de la capacité de circulation de ces cellules [144, 145].

Un organisme utilise des marqueurs, appelés marqueurs du soi, pour distinguer les éléments qui le constituent des corps étrangers, et éviter que le système immunitaire ne détruise tout l'organisme. Une solution complémentaire consiste donc à déguiser la nanoparticule avec un de ces marqueurs, par exemple le peptide CD47 qui se lie au récepteur SIRP α du macrophage et ralentit la capture [146].

Il pourrait par ailleurs être intéressant d'étudier l'utilisation de vasodilatateurs pour augmenter le diamètre des vaisseaux sanguins et augmenter la vitesse du flux sanguin dans le foie et donc limiter le temps de contact des nanoparticules avec les macrophages [137].

Aucune de ces stratégies n'a pour l'instant été suffisamment efficace, soit parce que,

malgré une diminution, la capture des nanoparticules par les macrophages est toujours trop élevée, soit parce que la toxicité engendrée est trop importante.

La stratégie que nous explorons consiste à rendre les nanoparticules invisibles en supprimant leurs interactions avec les opsonines. Si ce sont bien ces protéines qui permettent aux macrophages de reconnaître les nanoparticules comme des corps étrangers à éliminer, supprimer l'interaction nanoparticules protéines devrait pouvoir augmenter le temps de circulation. Recouvrir les nanoparticules de polyéthylène glycol (PEG) est une piste très répandue, mais il est immunogène : des anticorps anti-PEG existent dans le corps, ou peuvent apparaître après des injections multiples, ce qui fait qu'en cas d'injections multiples le PEG est détecté et éliminé [147]. Les zwitterions sont aussi connus pour limiter l'adsorption des protéines et sont de bons candidats comme polymères pour une chimie de surface furtive.

4.1.2 Les polymères zwitterioniques, de bons candidats pour améliorer le temps de circulation

Les polymères zwitterioniques ont montré de bonnes propriétés pour limiter l'adsorption des protéines dans l'article de Debayle et al. [87]. La Figure 4.2 montre des résultats d'adsorption de protéines pour trois types de zwitterions : un sulfobétaïne (a), un carboxybétaïne (b) et un phosphorylcholine (c). (i) présente la structure du zwitterion, (ii) des résultats d'adsorption de la couronne dure par dosage avec de la fluorescamine, comme décrit en Annexe 4.3.4, (iii) la mesure du rayon hydrodynamique par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) et (iv) la mesure de la diffusion dans le cytoplasme de cellules vivantes par suivi de particule unique, comme décrit partie 2.4.2. Le zwitterion sulfobétaïne montre le meilleur comportement *in vitro*, avec une absence ou très faible couronne dure ou dynamique lors d'incubations avec de l'albumine de sérum bovin, ou du sérum, et *in cellulo*, où son comportement est diffusif. La phosphorylcholine présente de l'agrégation *in vitro* mais diffuse bien *in cellulo*.

Dans le premier chapitre de cette thèse des résultats intéressants ont également été présentés pour les nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de ligand sulfobétaïne bloc phosphonate. Dans la partie 2.4.2 l'absence de couronne de protéine dynamique a été démontrée après incubation avec des quantités croissantes de BSA, et des proportions croissantes de plasma. Ces nanoparticules ont aussi prouvé leur caractère diffusif dans le cytoplasme d'une cellule vivante lors d'une expérience de FCS.

Ces résultats montrent que les protéines ne s'accrochent pas sur les nanoparticules fonctionnalisées par un zwitterion sulfobétaïne, ni *in vitro*, ni *in cellulo*. Si *in vivo* les opsonines ne s'accrochent pas non plus, cela pourra diminuer la capture des nanoparticules par les macrophages.

In vivo, les zwitterions ont montré de très bon temps de circulation pour des macromolécules modifiées. Zhang et al. [148] ont encapsulé une protéine, l'uricase, dans un gel de carboxybétaïne. Le carboxybétaïne utilisé dans cette étude n'est pas le même que celui

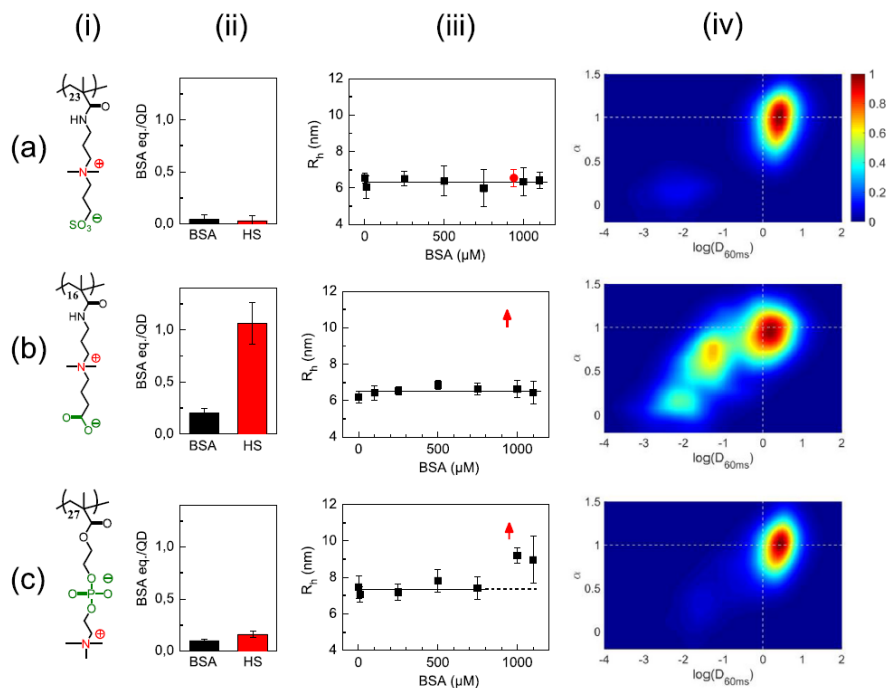


FIGURE 4.2 – Influence du type de zwitterion attaché à la surface de QD sur l’adsorption de protéines et la diffusion dans le cytoplasme. (i) structure d’un zwitterion (a) sulfobétaïne, (b) carboxybétaïne, (c) phosphorylcholine. (ii) nombre moyen de BSA adsorbé par QD après incubation dans une solution de BSA ou de sérum humain complet, couronne dure (iii) Rayon hydrodynamique des QD mesuré par FCS en fonction de la concentration en BSA (noir) ou dans du sérum (rouge). La flèche rouge représente une agrégation des QD. (iv) Tracé en densité des mesure de mobilité par suivi de QD unique dans le plan $\alpha - \log(D_{60\text{ms}})$ comme présenté section 2.4.2 Les lignes blanches en pointillées représentent les conditions d’un mouvement brownien. Issu de [87].

Figure 4.2 car il possède deux carbones entre les deux ions, contre quatre Figure 4.2. Cette nanoparticule organique a montré un temps de demi-vie dans le sang de 135 heures, et des injections répétées n’ont pas montré de réaction immunogène, ce qui est prometteur.

Fonctionnaliser des nanoparticules avec des zwitterions pourrait donc être une stratégie pour réduire la capture par les macrophages et augmenter le temps de circulation des nanoparticules.

4.2 Suivi de la circulation et la biodistribution de nanoparticules d’oxyde de fer chez des souris par IRM

4.2.1 Analyses des propriétés RMN des nanoparticules

Le temps de circulation de nanoparticules d’oxyde de fer recouvertes de ligands zwitterions sulfobétaïne a donc été analysé, pour voir si une faible adsorption de protéines *in vitro* et *in cellulo* conduirait à un temps de circulation prolongé de nanoparticules, et une reconnaissance limitée par les macrophages. Des analyses de temps de circulation des

oxydes de fer sur des souris par imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) ont été réalisées *in vivo* dans la souris à Chimie Paris avec Clémentine Lesbats, Sarah Boumati et Bich-Thuy Doan.

L'IRM est une technique d'imagerie fondée sur les propriétés de résonance magnétique nucléaire (RMN) du noyau d'hydrogène, un proton. Elle mesure un contraste qui dépend du temps de relaxation des protons de l'eau. Chaque proton possède un moment magnétique aligné sur son axe de rotation. Pour les mesures de RMN un champ magnétique extérieur B_0 est appliqué qui aligne les moments magnétiques. Leur somme crée un vecteur d'aimantation macroscopique M aligné sur le champ, selon l'axe z . Lors de l'excitation du système par une impulsion radiofréquence B_1 les moments magnétiques se retrouvent dans le plan (x,y) perpendiculaire à z . À la fin de l'excitation par B_1 l'aimantation globale revient à son état initial d'équilibre, c'est-à-dire que l'aimantation sur l'axe z M_z va passer de 0 à son maximum M_0 , l'aimantation avant l'application de B_1 , et l'aimantation dans le plan xy M_{xy} va revenir à 0, selon les équations 4.1 et 4.2. Deux temps caractéristiques peuvent ainsi être décrits, T_1 le temps caractéristique de la relaxation longitudinale selon l'axe z , et T_2 le temps caractéristique de la relaxation transversale.

$$M_z(t) = M_0.(1 - e^{-t/T_1}) \quad (4.1)$$

$$M_{xy}(t) = M_0.e^{-t/T_2} \quad (4.2)$$

Ces temps varient en fonction de l'environnement de l'atome d'hydrogène. Il est donc possible de différencier certains types de tissus, notamment les tissus adipeux. Cependant, le contraste entre deux types de tissus différents est le plus souvent faible. Pour pallier ce problème, et ajouter un marquage fonctionnel, un agent de contraste est souvent utilisé. Il fait varier les temps T_1 ou T_2 . Les nanoparticules d'oxyde de fer modifient les propriétés magnétiques locales et réduisent le temps T_2 , ce sont donc principalement des agents T_2 , ce qui rend leur présence détectable en IRM. L'efficacité d'un agent de contraste est définie par sa relaxivité r . En présence d'un agent de contraste, la relaxation est modifiée selon la formule :

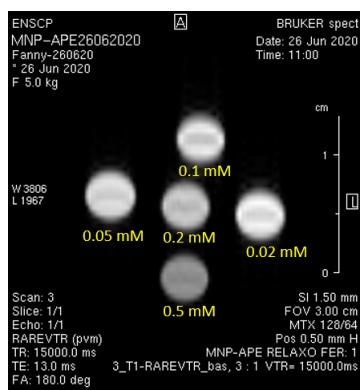
$$\frac{1}{T_{1,2}} = \frac{1}{T_{1,2}^0} + r_{1,2}.[Fe] \quad (4.3)$$

avec $T_{1,2}$, ie T_1 ou T_2 le temps de relaxation observé, $T_{1,2}^0$ le temps de relaxation des protons sans agent de contraste, $r_{1,2}$ le taux de relaxation des nanoparticules d'oxyde de fer et $[Fe]$ la concentration en fer.

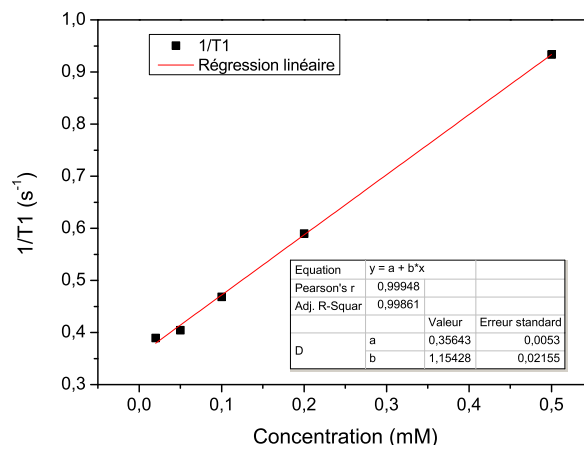
La relaxivité est donc la pente de la droite obtenue en traçant $\frac{1}{T}$ en fonction de la concentration en fer d'un échantillon de nanoparticules d'oxyde de fer.

Ces mesures sont faites à 7 Tesla sur un spectromètre Bruker Avance 300 à 300 MHz, le même appareil qui est utilisé pour l'imagerie de la souris. Les échantillons sont des tubes remplis de nanoparticules d'oxyde de fer de 8 nm de diamètre cristallin de concentration

en fer croissante. La concentration en fer a été mesurée par ICP. Pour calculer le r_1 la séquence "Rapid acquisition with relaxation enhancement at variable TR" RARE-VTR est utilisée, et la séquence "multi-slice multi-echo spin-echo" MSME est utilisée pour mesurer le r_2 . Les résultats sont présentés Figures 4.3 et 4.4. Sur ces figures, il est clairement visible que les nanoparticules d'oxyde de fer sont des agents r_2 car le contraste est bien meilleur en T_2 . Il est mesuré $r_1 = 1,15 s^{-1} mM^{-1}$ et $r_2 = 68,6 s^{-1} mM^{-1}$. Plus la valeur de r_2/r_1 est haute, plus l'agent de contraste T_2 est considéré bon. Ici $r_2/r_1 = 59,65$ pour des nanoparticules de 8nm de diamètre cristallin. Cette valeur est correcte, par exemple pour l'agent de contraste commercial Cliavist®, composé de nanoparticules d'oxyde de fer de 4nm de diamètre agrégées en clusters de 55 à 65 nm, elle est de 78 à 7T [103].

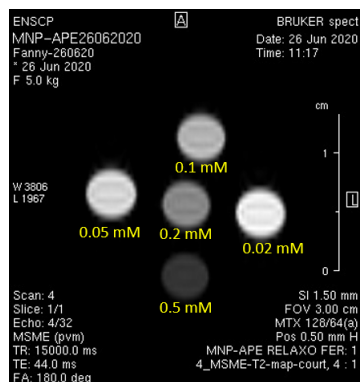


(a) Image des tubes pondérée T_1

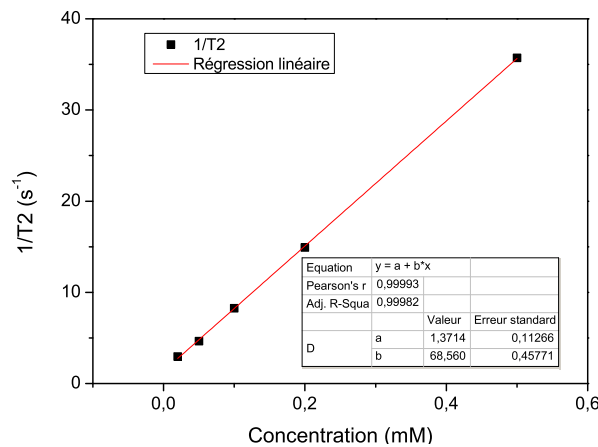


(b) Régression linéaire pour le calcul de r_1

FIGURE 4.3 – Calcul de la relaxivité r_1 pour les nanoparticules d'oxyde de fer de diamètre cristallin de 8 nm.



(a) Image des tubes pondérée T_2



(b) Régression linéaire pour le calcul de r_2

FIGURE 4.4 – Calcul de la relaxivité r_2 pour les nanoparticules d'oxyde de fer de diamètre cristallin de 8 nm.

4.2.2 Suivi des nanoparticules par IRM après injection

L'IRM permet donc de suivre la biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer après leur injection dans le sang. Les nanoparticules étudiées ont un diamètre cristallin de 8 nm et sont recouvertes de ligands polysulfobétaïne bloc phosphonate (P(SPE-b-MAPC1)), de masse molaire 5900 g/mol. 100 μ L d'une solution de IONP à 10 mM en Fe (souris 1) ou 20 mM en Fe (souris 2 et 3) à 150 mM en NaCl sont injectées dans la queue de la souris BALB/c anesthésiée. Le volume total de sang dans une souris est d'environ 2 mL. La concentration en fer dans le sang de la souris est donc de 0,5 mM pour la souris 1 et de 1 mM pour la souris 2, soit une concentration en IONP de 50 nM (souris 1) ou 100 nM (souris 2 et 3). Une acquisition dynamique est réalisée pendant 40 min avec l'injection au bout de 3 min. Une acquisition est ensuite réalisée à 3h, 5h, 24h, 48h, et 6 jours après l'injection. Les résultats sont présentés Figures 4.6b, 4.7b et 4.8b. Une barre verticale à 3 min symbolise l'injection.

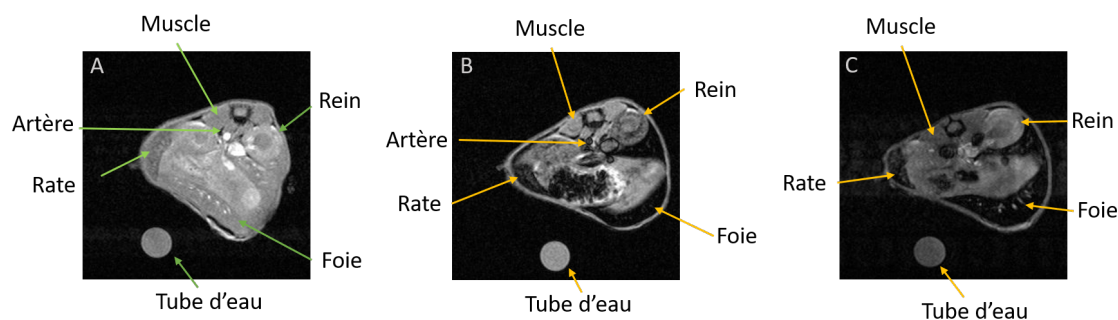
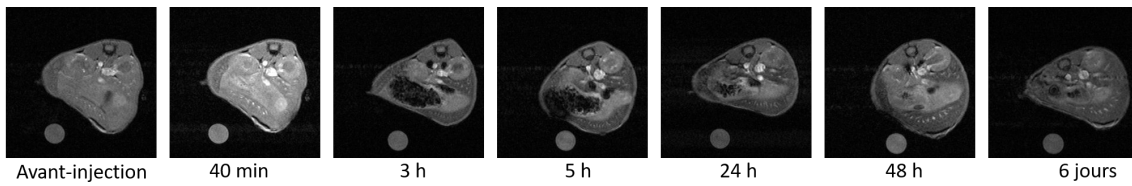


FIGURE 4.5 – Description des organes visibles sur la coupe transverse de souris. À gauche, avant injection des nanoparticules, au milieu, 40 min après injection, et à droite 6 jours après injection.

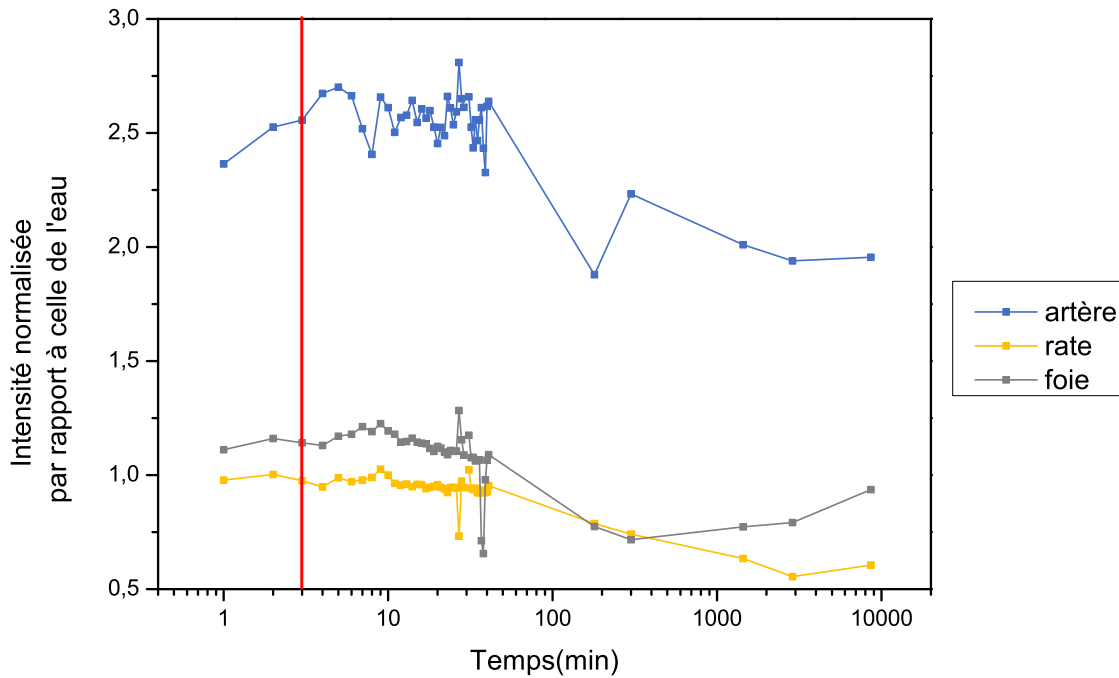
L'acquisition RMN est faite sur une coupe transverse de la souris. Les organes visibles sur cette coupe sont indiqués Figure 4.5. La première image montre la coupe avant injection, et les deux secondes après injection. Le foie et la rate sont bien visibles, ils deviennent noirs après injection. Des muscles et un rein sont aussi visibles. L'artère est bien visible avant injection, en blanc. Le signal T_2 des nanoparticules d'oxyde de fer est un hyposignal : la présence des IONP induit un obscurcissement de l'image. L'analyse est réalisée en sélectionnant des zones correspondant aux organes suivants : le foie, la rate, l'artère et un tube d'eau situé à côté de la souris pour normaliser le signal. Le signal de la zone d'un organe est divisé par la valeur du signal sur le tube d'eau.

3 souris ont été injectées. La première a été injectée avec une solution de IONP de concentration de 10 mM en fer. De manière surprenante, aucun changement de contraste n'est visible pendant les 40 premières minutes, même dans l'artère. Au bout de trois heures, une légère diminution du signal est visible dans le foie et la rate. Au bout de 6 jours le signal dans le foie et la rate est toujours légèrement inférieur au signal avant injection.

Le signal étant faible, les deux souris suivantes ont été injectées avec deux fois plus



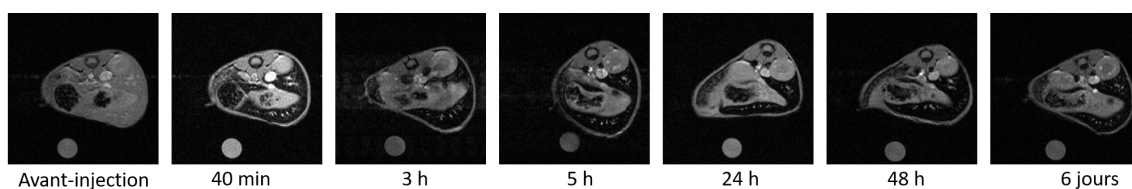
(a) Souris 1, Image IRM de la coupe transverse au cours du temps.



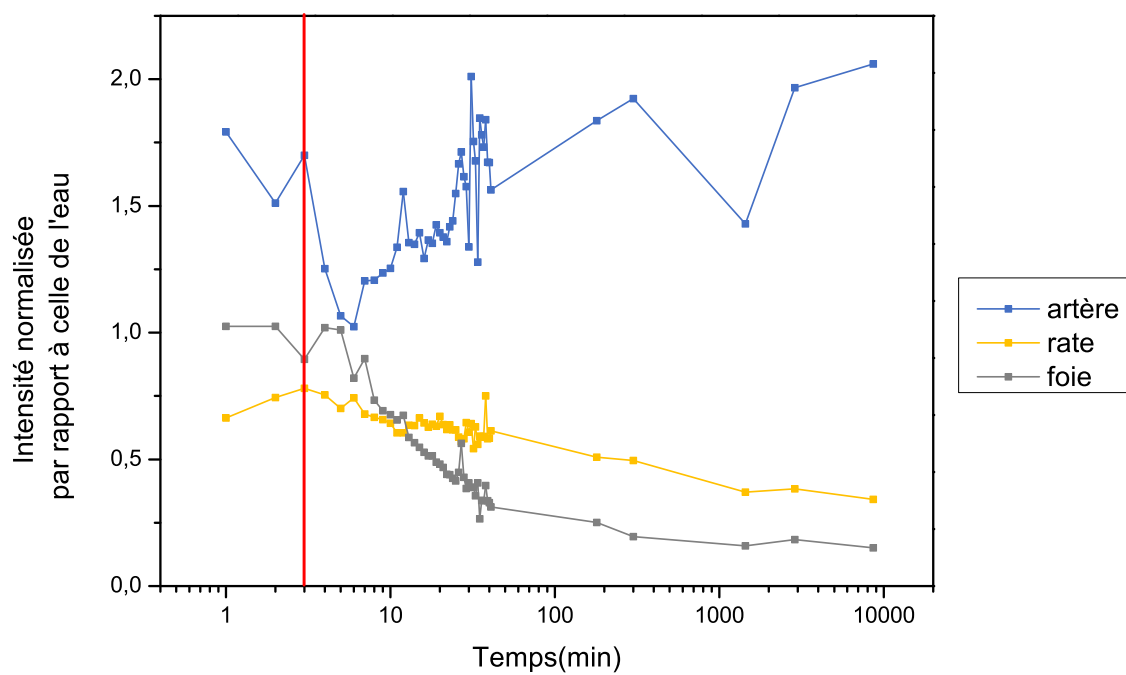
(b) Souris 1, évolution du signal IRM au cours du temps. La barre verticale symbolise l'injection.

FIGURE 4.6 – Souris 1, 100 μ L de IONP à 10 mM en fer injectés.

de IONP (concentration de 20 mM en fer). Pour ces deux souris, une diminution forte du signal est visible dans les artères après injection, signe que les IONP sont bien visibles dans le sang. Pour la souris 3 au bout de 10 min une forte diminution du signal est visible dans la rate et le foie, ce qui est normal, car ces organes sont richement vascularisés. 3 heures après l'injection, le signal dans l'artère est revenu à son niveau initial, signe que les IONP ont été éliminées du sang, mais le signal reste faible dans le foie et la rate parce que les IONP y sont capturées.

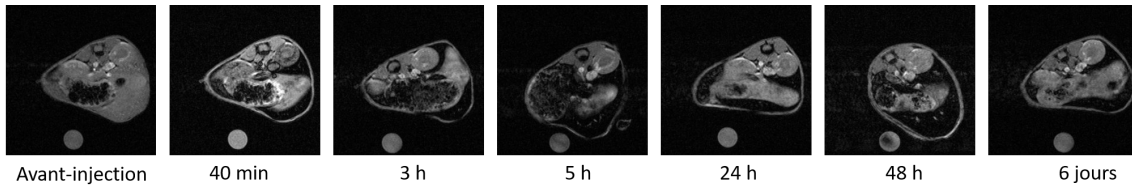


(a) Souris 2, Image IRM de la coupe transverse au cours du temps.

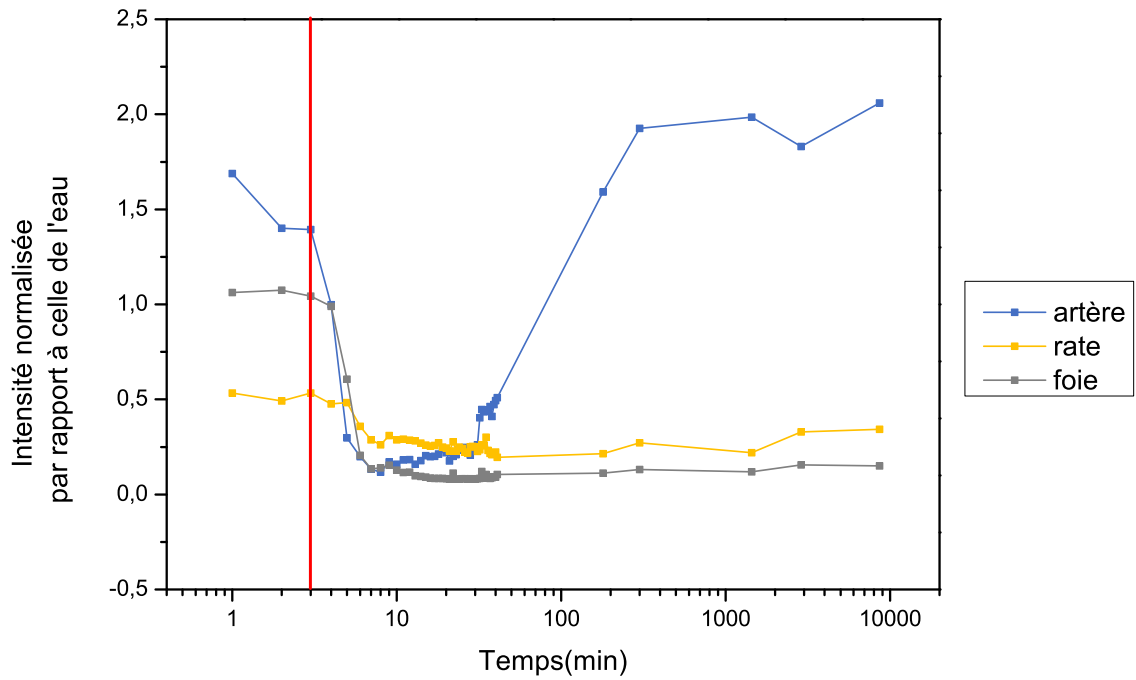


(b) Souris 2, évolution du signal IRM au cours du temps.

FIGURE 4.7 – Souris 2, 100 μ L de IONP à 20 mM en fer injectés.



(a) Souris 3, Image IRM de la coupe transverse au cours du temps.



(b) Souris 3, évolution du signal IRM au cours du temps.

FIGURE 4.8 – Souris 3, 100 μ L de IONP à 20 mM en fer injectés.

Le signal S mesuré sur les images IRM est lié au temps T_2 selon la formule :

$$\frac{S}{S_0} \propto e^{-\frac{TE}{T_2}} \quad (4.4)$$

avec TE le temps d'écho, temps entre l'impulsion de B_1 et le recueil de l'écho de spin. Or

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_2^0} + r_2 \cdot [Fe] \quad (4.5)$$

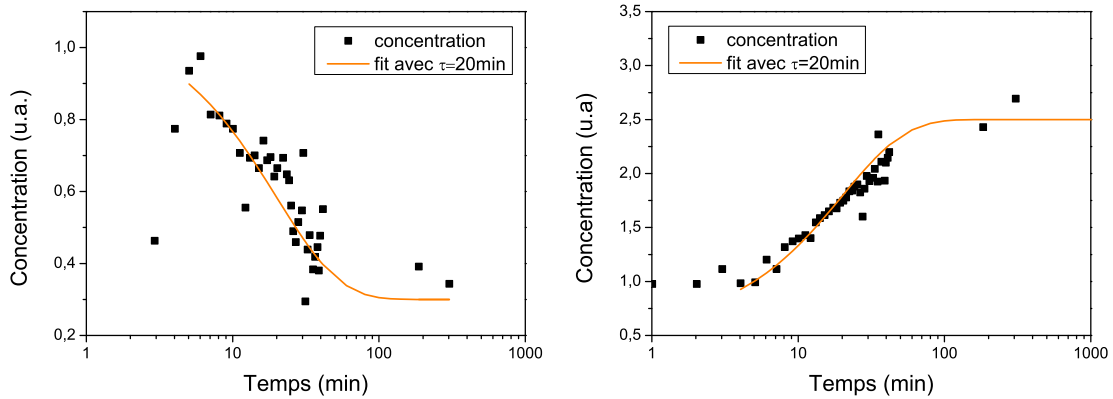
donc

$$\frac{S}{S_0} \propto e^{-r_2 \cdot c \cdot TE} \quad (4.6)$$

Tracer le logarithme du signal en fonction du temps permet donc d'accéder à l'évolution de la concentration en IONP au cours du temps. La Figure 4.9 trace $1 - \ln(S)$ et présente donc l'évolution de la concentration en IONP dans les artères et dans le foie de la souris 2. On suppose que la vitesse de capture des IONP par les macrophages est proportionnelle à leur concentration et suit donc une cinétique de premier ordre, la courbe est alors ajustée avec une fonction mono-exponentielle de la forme :

$$a_0 + a \cdot e^{-\frac{(t-t_0)}{t_c}} \quad (4.7)$$

avec $t_0 = 5 \text{ min}$ et $t_c = 20 \text{ min}$. Les deux courbes semblent être correctement ajustées par cette fonction (affichée en orange).



(a) Concentration en IONP au cours du temps, (b) Concentration en IONP au cours du temps, pour le sang. pour le foie.

FIGURE 4.9 – Concentration en IONP au cours du temps déduite du signal RMN, dans le sang et le foie, pour la souris 2.

Le temps caractéristique de circulation des IONP dans le sang semble donc être de 20 minutes. Cette valeur est supérieure à celle de l'agent de contraste commercial Clivist® fonctionnalisé avec du dextran (6 min) ou celle de nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées avec de l'acide polyacrylique (5 min), mais est inférieure à celle de na-

noparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées avec du PEG 2k(82 min) ou 5k (60 min) de diamètre hydrodynamique similaire [103]. Cependant dans les expériences avec du PEG [103] la dose de nanoparticules injectées était plus faible que dans notre expérience avec les zwitterions, 100 μ L à 5 mM en fer contre 100 μ L à 10 ou 20 mM en fer injectés. Il est possible que les résultats de circulation puissent être meilleurs en injectant des quantités de IONP différentes ou avec un polymère sulfobétaïne de taille différente.

4.2.3 Perspectives

Le temps de circulation obtenu pour les nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de ligands sulfobétaïne n'est pas très élevé. Les IONP sont détectées dans le foie et la rate, ils ont donc été captés par des macrophages. Ce résultat est étonnant, car les IONP *in vitro* n'interagissent pas avec les composants du sérum et du plasma. Cela suggère qu'ils ne sont pas ou peu recouverts d'opsonines dans le sang. Les opsonines sont les protéines ou biomolécules qui étiquettent les particules comme des corps étrangers que les macrophages doivent capturer. En leur absence on se demande donc comment les IONPs sont détectées par les macrophages comme étant une particule étrangère à ingérer. Pour répondre à cette question, nous avons décidé d'investiguer sur un modèle plus proche de ce qui se passe dans la souris que les études *in vitro* sur du sérum, c'est-à-dire étudier les interactions entre les IONP et des cellules de macrophages en culture.

4.3 Études du comportement des nanoparticules *in vitro*

4.3.1 Présentation des deux types de nanoparticules utilisées, les nanoparticules d'oxyde de fer et les quantum dots

Des nanocristaux fluorescents de semi-conducteurs, appelés Quantum Dots (QD), sont utilisés dans ce projet, car ils peuvent aussi être fonctionnalisés avec des zwitterions, et leurs propriétés de fluorescence facilitent leur détection. Ce sont des QD avec un cœur de cadmium et sélénium et une coque de sulfure de cadmium puis sulfure de zinc (CdSe/CdS/ZnS) [149]. Leurs spectres d'absorption et d'émission sont présentés Figure 4.10.

Ils sont fonctionnalisés avec des ligands sulfobétaïne ou phosphorylcholine (décrit Figure 4.2) et un bloc d'accroche vinylimidazole. La synthèse des ligands est décrite par Tasso et al. [90] et Debayle et al. [87]. Les zwitterions sulfobétaïne et phosphorylcholine sont comparés.

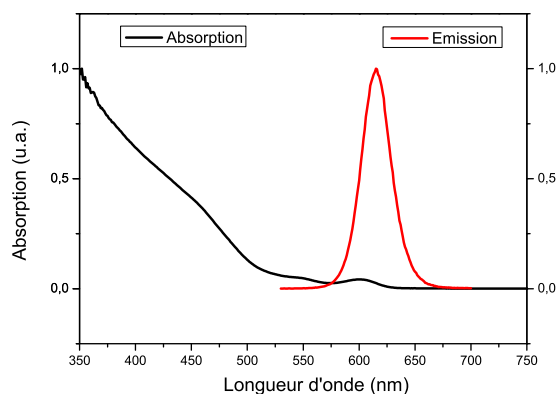


FIGURE 4.10 – Spectre d'absorption et d'émission des QD.

Les IONP utilisées ici sont fonctionnalisées avec un polymère P(SPP/NH₂-bMAPC1) de masse molaire 13 000 g/mol. Le monomère N-(3-aminopropyl)méthacrylamide, situé en statistique sur la chaîne de polymère sulfobétaïne, apporte une fonction amine primaire au polymère. Un fluorophore FP647-NHS est accroché sur l'amine par couplage peptidique. Les IONP réagissent avec du bis-NHS en excès pour cacher les fonctions amines restantes après le couplage avec le fluorophore ce qui permet de ne pas introduire d'interactions non spécifiques dues aux amines primaires, comme rapporté par Debayle et al. [87]. Ces réactions sont décrites Chapitre 2.

4.3.2 Étude *in vitro* avec des composants du sang

Dans les travaux de Debayle et al. [87] le rayon hydrodynamique de QD recouverts de différents zwitterions a été étudié dans du sérum. Il est aussi intéressant d'étudier le plasma, qui a une composition différente et plus riche [58]. Le plasma et le sérum sont du sang dont on a retiré toutes les cellules, mais le sérum est le surnageant obtenu après coagulation et centrifugation du sang alors que le plasma est le surnageant de sang non coagulé, obtenu après centrifugation du sang auquel on a ajouté des anti-coagulants. Le plasma est plus riche que le sérum, car la coagulation enlève plus de composants du sang qui sont éliminés par centrifugation. Il est donc intéressant d'étudier le comportement des nanoparticules dans le plasma, modèle plus proche du sang.

Tout d'abord, la stabilité des oxydes de fer vis-à-vis de l'anticoagulant est vérifiée en les incubant avec deux anticoagulants les plus utilisés, le citrate à 3,8% et l'héparine à 60 µg/mL. Les IONP fonctionnalisées avec un colorant sont incubées avec les anticoagulants, et sont centrifugées à différents intervalles de temps pour vérifier leur stabilité. La stabilité ne diminue pas pour l'héparine, et diminue de 5% pour le citrate après 24 heures, peut-être car le citrate concurrence les phosphonates pour l'accroche sur la surface des IONP (Figure 4.11). Le plasma utilisé dans la suite de l'étude est du plasma de souris BALB/c stabilisé à l'héparine (Innovative Research).

Des mesures de rayons hydrodynamiques par spectroscopie de corrélation de fluores-

cence (FCS) ont été réalisées sur les QD après incubation avec du plasma (Figure 4.12), pour compléter l'étude de Debayle et al. [87]. Les mesures ont été réalisées avec un laser à 488 nm, et le rayon a été calibré avec le temps de diffusion de la fluorescéine ($4,25 \pm 0,01 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, Pico Quant). Ces expériences ont été réalisées par Nicolas Kuszla, que j'ai co-encadré en projet de recherche dans le laboratoire. Les nanoparticules ont été incubées dans du tampon avec un ratio croissant de plasma, de 0 à 90%. La viscosité du plasma est prise en compte, en pondérant la viscosité du milieu en fonction de la quantité de plasma présent. La valeur prise est celle de la référence [111], 1,31 cP. Pour les QD sulfobétaine on observe une très légère augmentation du rayon hydrodynamique, d'environ 1nm. (Figure 4.12). Peut-être que des petits composants du plasma s'adsorbent, ou la viscosité du plasma utilisée pour le calcul du rayon hydrodynamique est sous-estimée. En revanche pour les QD phosphorylcholine une nette augmentation du rayon hydrodynamique est visible, qui va jusqu'à l'agrégation à 90% de plasma. Les composants du plasma interagissent donc avec les ligands phosphorylcholine.

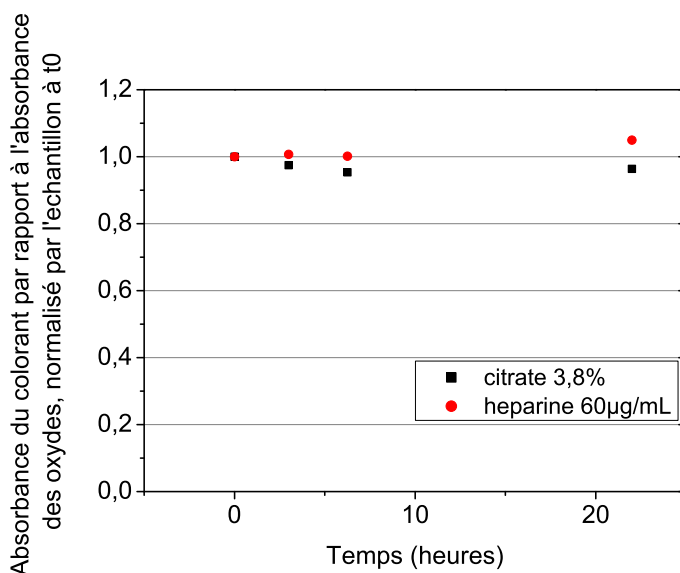


FIGURE 4.11 – Test de stabilité des IONP dans une solution de citrate à 3,8% et d'héparine à 60 µg/mL.

L'agrégation des QD phosphorylcholine dans le plasma pourrait être liée à la protéine C réactive (C-reactive protein, CRP). C'est une protéine du plasma et un marqueur de l'inflammation dont la concentration dans le sang chez l'homme est comprise entre 0.8 mg/L and 3.0 mg/L, mais qui augmente d'un facteur pouvant aller jusqu'à 10 000 lors d'une inflammation. Son rôle est de repérer les cellules et bactéries mortes pour activer le système du complément, une partie du système immunitaire inné. Ce repérage se fait, car la protéine C réactive se lie notamment à la phosphatidylcholine (ou lécithine), un composant majeur des membranes de cellules. Lorsque les cellules meurent, les phosphatidylcholines deviennent disponibles pour se lier à la protéine C- réactive et sont alors détectées. Les

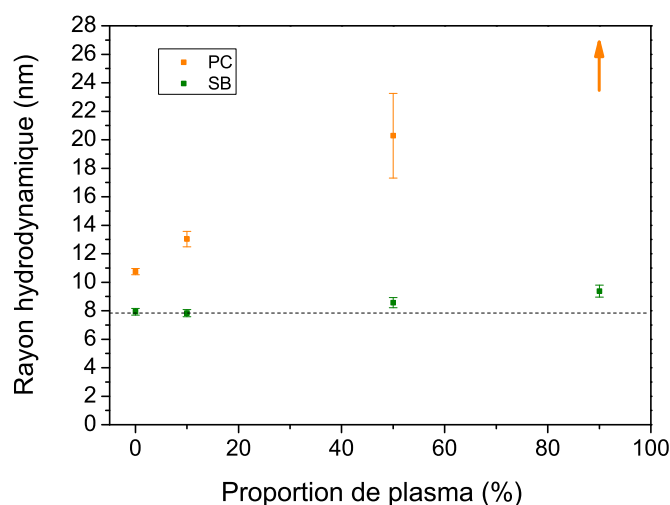


FIGURE 4.12 – Rayon hydrodynamique mesuré en FCS pour des QD phosphorylcoline (PC) ou sulfobétaïne (SB) en fonction de la proportion de plasma dans le milieu d'incubation.

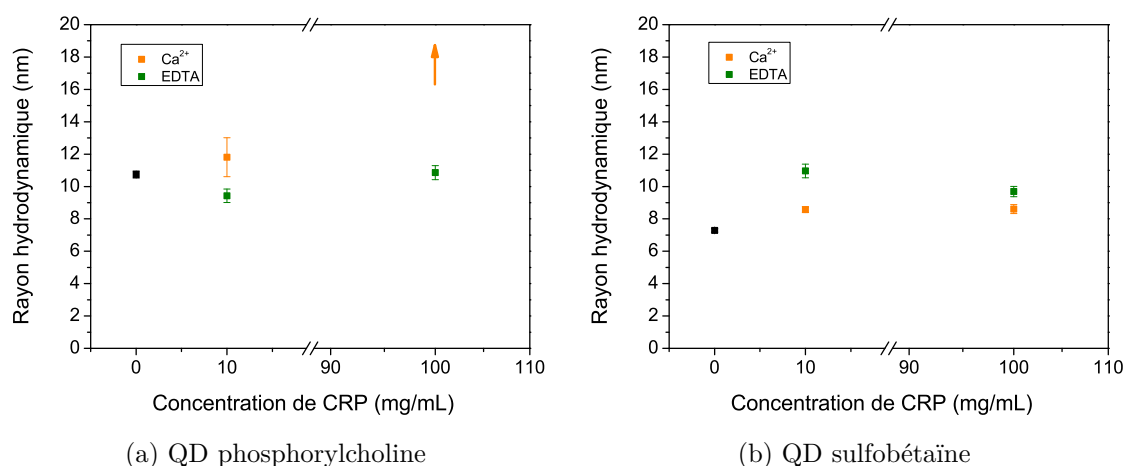


FIGURE 4.13 – Rayon hydrodynamique mesuré en FCS pour des QD phosphorylcoline (a) ou sulfobétaïne (b) en fonction de la concentration en CRP dans la solution. En orange, la mesure a été réalisée dans une solution contenant 2,5 mM de calcium pour activer la CRP, en vert la solution contient de l'EDTA pour s'assurer de l'absence de calcium et désactiver la CRP.

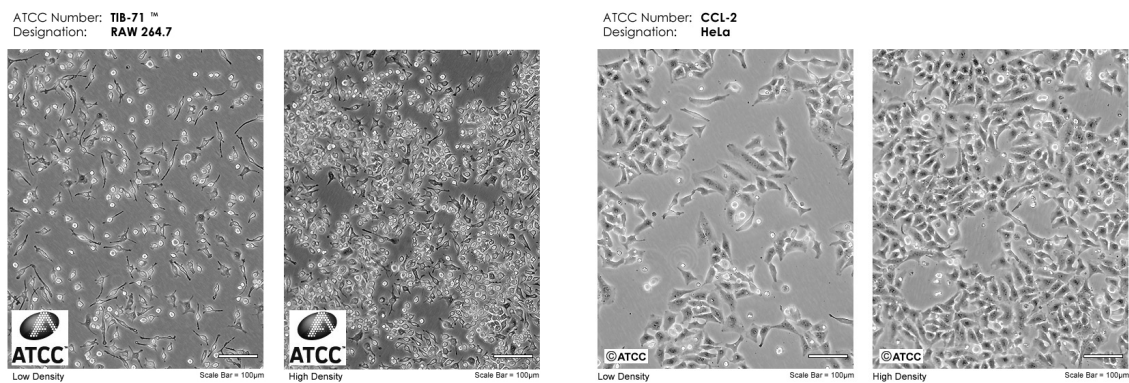
phosphatidylcholines possèdent à leur extrémité un zwitterion phosphorylcholine. C'est cette fonction qui est détectée par la CRP, uniquement en présence de calcium. Il paraît donc possible que ce soit la protéine C réactive qui se lie à la phosphorylcholine. On cherche à savoir si cette protéine serait également capable de reconnaître le sulfobétaïne.

Pour cette étude, des mesures de rayon hydrodynamique ont été réalisées en incubant des QD recouverts de phosphorylcholine et de sulfobétaïne avec de la CRP purifiée (Prospect Bio). Les incubations ont été réalisées à deux concentrations, 10 mg/mL, qui

correspond à une légère inflammation, et 100 mg/mL, qui correspond à une plus grosse inflammation. Les incubations sont aussi réalisées dans deux conditions : avec du calcium à 2,5 mM - soit la concentration de calcium dans le sang - et avec de l'éthylènediamine-tétraacétate (EDTA), complexant fort qui complexe le calcium et permet de s'assurer de son absence dans la solution. La solution avec du calcium correspond donc à une CRP activée, et avec l'EDTA à une CRP désactivée, incapable de se lier au phosphorylcholines. Les résultats sont présentés Figure 4.13. Pour la phosphorylcholine, avec la CRP activée, on observe une augmentation du rayon hydrodynamique pour 10 mg/mL de CRP, et pour 100 mg/mL une agrégation des QD. La CRP désactivée ne cause pas d'augmentation du rayon. Il semble donc que la CRP reconnaisse les ligands phosphorylcholines des QD. Au contraire, pour les QD sulfobétaïne, il n'y a pas d'augmentation significative du rayon hydrodynamique, ni de différence entre la CRP activée ou non. Il semble donc que la CRP ne puisse pas reconnaître le sulfobétaïne, ce qui confirme que le sulfobétaïne est un bon candidat pour la furtivité des nanoparticules dans la circulation sanguine.

4.3.3 Études des interactions entre nanoparticules et cellules

Des études sont ensuite réalisées sur des cellules, afin de mieux comprendre les interactions nanoparticules/cellules, et surtout nanoparticules/macrophages, et donc les raisons de la capture des nanoparticules *in vivo*. Ces interactions sont étudiées sur deux lignées cellulaires : la lignée de macrophage de souris RAW 264.7 - lignée immortelle de macrophage de souris, considérée comme un bon modèle de macrophage - et les cellules HeLa - lignée de cellules humaines immortelles la plus ancienne et la plus commune - utilisée comme contrôle pour discerner les mécanismes propres aux macrophages des mécanismes en cours aussi sur les cellules classiques. Des images des cellules RAW 264.7 et HeLa sont présentées Figure 4.14.



(a) Cellules RAW 264.7

(b) Cellules HeLa

FIGURE 4.14 – Cellules observées au microscope optique

Protocole de culture cellulaire

Les cellules de macrophages de souris RAW 264.7 proviennent du laboratoire de Jacques Fattaccioli à l'Institut Pierre-Gilles de Gennes (IPGG). Elles ont été achetées à l'European Collection of Authenticated Cell Cultures (Public Health England, United Kingdom), référence 91062702. Elles sont cultivées dans des flacons de culture cellulaire T75 avec du DMEM 4.5 gL (Thermo Fischer, référence 21969035), dans lequel est ajouté 10% de sérum de veau foetal (Sigma-Aldrich), 1% de pénicilline/streptomycine et 2 mM de L-Glutamine (Thermo Fischer). La culture est réalisée à 37°C et 5% CO₂. Les cellules sont repiquées régulièrement, tous les 2 à 3 jours, à 1/5 ou 1/10, et détachées du fond du flacon avec un grattoir à cellules.

Les cellules HeLa sont cultivées dans le même milieu de culture que les RAW 267.4, à 37°C et 5% CO₂. Elles sont repiquées tous les 3 ou 4 jours à 1/8. Elles sont détachées du flacon avec de la TryPLE (Thermo Fischer) après lavage au tampon PBS.

Étude des interactions entre QD et cellules par imagerie

Les interactions nanoparticules/cellules ont d'abord été étudiées par imagerie de fluorescence, grâce aux propriétés de fluorescence des QD. Ces expériences ont été faites par Nicolas Kuszla. Les QD sont incubés avec les cellules dans du milieu de culture pendant une heure, temps supérieur au temps caractéristique de capture des nanoparticules *in vivo* mesuré dans les expériences précédemment présentées partie 4.2.2. Après incubation les cellules sont lavées, fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) pour les conserver, puis imagées sur un microscope à champ large.

Protocole étude des interactions QD et macrophages par imagerie

Préparation des échantillons pour l'imagerie

Les cellules sont incubées pendant 3 jours dans des chambres de culture sur lames à 8 compartiments (LabTek). Un temps d'incubation de 3 jours permet aux cellules d'être bien accrochées sur la lamelle de verre et de ne pas se décrocher lors du lavage des cellules. Il a été essayé de recouvrir les puits de polyallylamine en incubant 0,1 mg/mL à pH=8 pendant 10 minutes, mais cela n'a pas amélioré l'accroche des cellules à la lamelle de verre. Les cellules sont incubées avec 50 000 cellules RAW 267.4 par puits et 25 000 cellules HeLa (plus grosses) dans 500 µL de milieu de culture. Les cellules sont ensuite incubées 3 jours à 37°C à 5% de CO₂. Au bout de 3 jours le milieu de chaque puits est retiré par aspiration. Les cellules sont lavées avec 500 µL de milieu DMEM. 500 µL du milieu d'incubation sont ajoutés, dont la composition varie selon l'étude réalisée. Les cellules sont incubées avec des QD à 50 ou 200 nM une heure à 37°C à 5% de CO₂. Au bout d'une heure le milieu d'incubation est retiré, les cellules sont rincées avec 500 µL de PBS. 400 µL de paraformaldéhyde (PFA) à 4% sont ajoutés pour fixer les cellules. Le PFA réagit pendant 30 min à température ambiante, avant d'être retiré. Les puits sont ensuite remplis avec 400 µL de PBS. Ils peuvent être conservés quelques jours à 4°C recouverts de parafilm.

Imagerie et analyse des résultats

Les puits sont imagés avec un microscope champ large, une lampe, un miroir dichroïque à 480nm, un filtre passe haut en émission à 485nm et en excitation 450/50nm. La fluorescence d'une cellule est mesurée en prenant la moyenne de la valeur des pixels d'une zone entourant la cellule multipliée par l'aire de la zone. La valeur moyenne est tout d'abord soustraite de la moyenne d'une zone sans cellule. Ensuite la valeur de la fluorescence retenue pour une condition est la moyenne de la fluorescence des cellules, et la barre d'erreur est l'erreur à la moyenne, soit l'écart type sur la valeur des cellules divisée par la racine du nombre de cellules analysées.

La Figure 4.15 présente des QD internalisés par les macrophages. En effet on voit qu'il

n'y a pas de QD au niveau du noyau, signe qu'ils sont dans le cytoplasme de la cellule et non pas accrochés dessus. Le niveau de fluorescence sur les QD est mesuré et est utilisé pour quantifier le niveau d'interaction entre les QD et les macrophages.

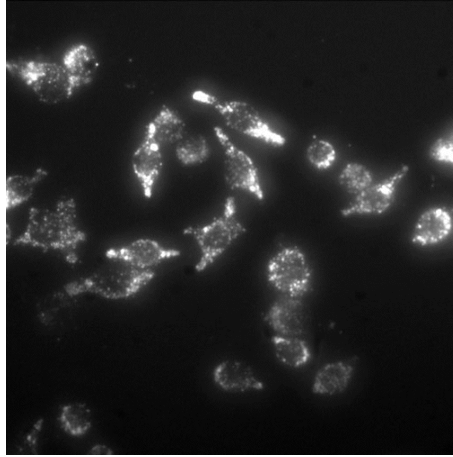


FIGURE 4.15 – Macrophages RAW 267.4 incubés avec des QD. Image en microscopie de fluorescence.

Étude des interactions des macrophages avec des QD fonctionnalisés avec différentes chimies de surface La Figure 4.16 présente le niveau de fluorescence mesuré pour des QD sulfobétaïne et phosphorylcholine incubées avec des cellules RAW et HeLa. Les incubations sont réalisées à deux concentrations différentes, 50 et 200 nM en QD. Ces concentrations sont comparables à celles des souris suivies en IRM partie 4.2.2, qui avaient 50 ou 100 nM de IONP dans le sang. On observe que les cellules RAW capturent plus de QD que les HeLa, ce qui était attendu, car ce sont des macrophages. Le nombre de QD capturés augmente avec la concentration. Les QD phosphorylcholine sont plus capturés que les QD sulfobétaïnes. Un contrôle positif a été réalisé avec des QD-NH₂, la fonction amine positive a été décrite par Debayle et al. [87] comme augmentant fortement l'interaction des QD avec les biomolécules, et effectivement l'accroche des QD sur les cellules est bien plus élevée pour les QD-NH₂ (Figure 4.17).

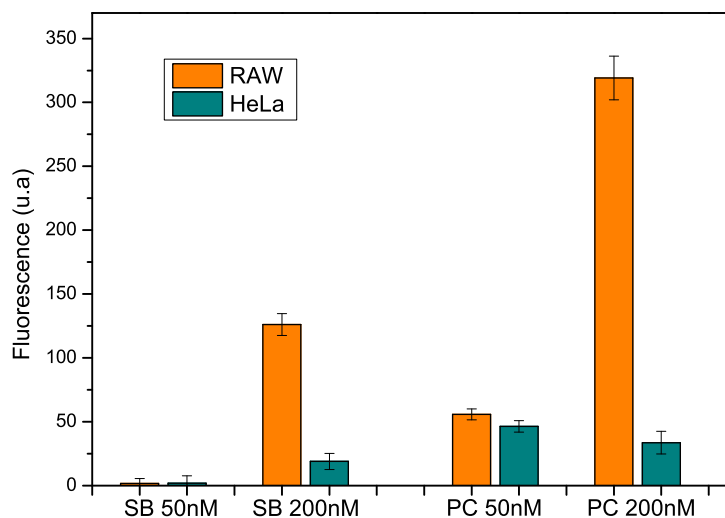


FIGURE 4.16 – Intensité de fluorescence mesurée sur des cellules RAW ou HeLa après incubation avec des QD sulfobétaïne ou phosphorylcholine à deux concentrations, 50 nM ou 200 nM.

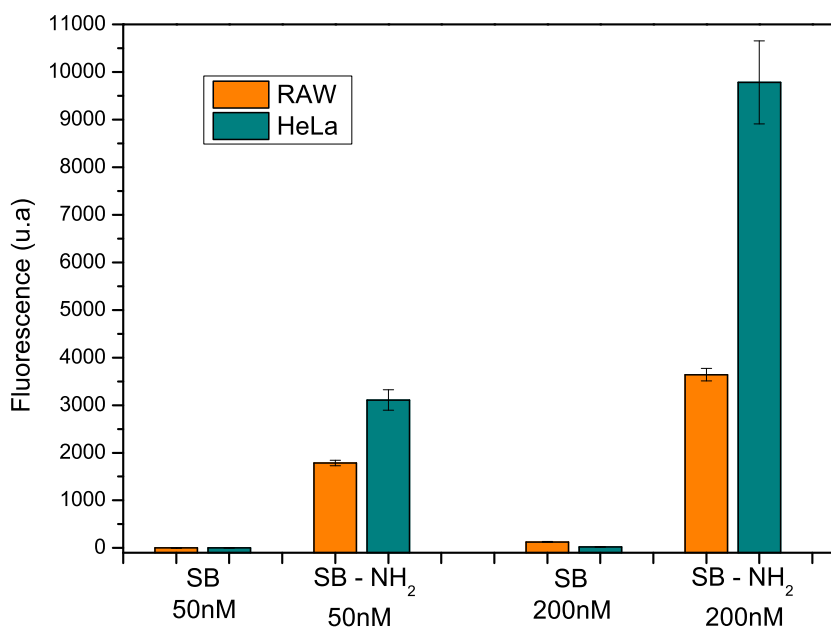


FIGURE 4.17 – Intensité de fluorescence mesurée sur des cellules RAW ou HeLa après incubation avec des QD sulfobétaïne, ou sulfobétaïne avec des amines primaires, à deux concentrations, 50 nM ou 200 nM.

Étude des interactions des QD avec des macrophages en présence de plasma

Pour imiter le comportement de nanoparticules dans la circulation sanguine au contact des macrophages, les QD sont incubés avec du plasma de souris, Figure 4.18. Les QD phosphorylcholine sont incubés dans du DMEM sans sérum de veau foetal, ou dans du

plasma de souris, avec des cellules RAW ou HeLa (Figure 4.18a). On observe qu'en présence de plasma, les QD phosphorylcholine interagissent plus avec les cellules RAW, mais moins avec les cellules HeLa. Il a été vu en FCS que les QD phosphorylcholine se lient à des composants du plasma. Il semble que ces composants permettent d'augmenter la capture des QD phosphorylcholine pour les cellules RAW, ce sont peut-être des opsonines. Ces composants permettent au contraire de diminuer les interactions avec les cellules HeLa, car il n'y a pas de récepteurs de ces opsonines sur les cellules HeLa. Le comportement avec les cellules RAW est différent pour les QD sulfobétaïne, Figure 4.18b. Une augmentation de la quantité de plasma dans un milieu DMEM conduit à une diminution de la capture. Cela suggère que les QD sulfobétaïne n'interagissent pas avec les opsonines du plasma, comme vu sur les expériences de mesure de rayon hydrodynamique. Au contraire il est possible que les opsonines se lient sur les récepteurs des macrophages et prennent la place de QD qui interagissaient avec des interactions moins spécifiques.

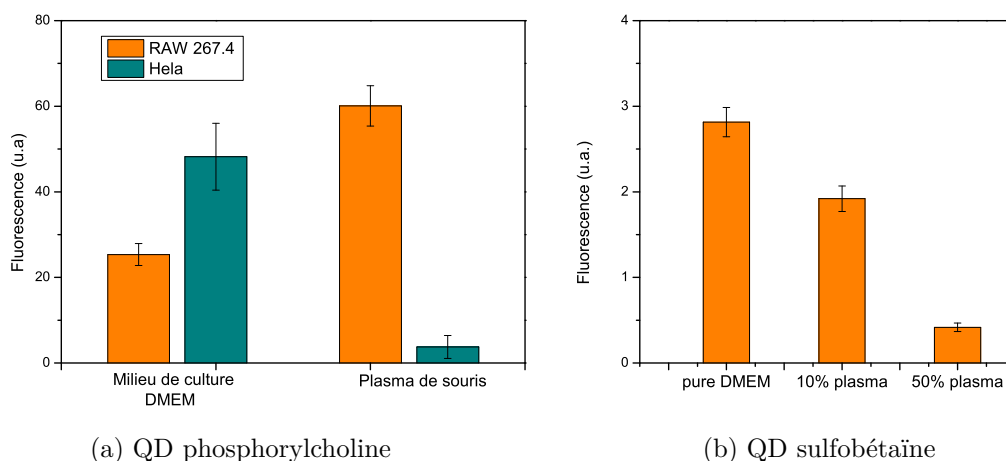


FIGURE 4.18 – Intensité de fluorescence mesurée sur des cellules RAW ou HeLa après incubation avec des QD dans le milieu de culture DMEM ou dans du plasma.

Étude de l'influence du polymère sulfobétaïne On cherche à comprendre les causes des interactions QD sulfobétaïne/macrophage. Une hypothèse est que les QD reconnaissent les polymères sulfobétaïnes. Pour la tester, des QD sulfobétaïne sont incubés avec des cellules RAW avec et sans 10% de plasma dans le milieu, et avec et sans un excès de polymère sulfobétaïne libre dans le milieu, à 1 mg/mL (Figure 4.19). On observe que l'ajout de polymère libre diminue le taux de capture des nanoparticules par les macrophages. Lorsque les QD sont incubés avec le polymère libre, le niveau de capture est le même avec et sans plasma. Le polymère libre prendrait donc la place des QD à la surface des macrophages, ce qui suggère que les macrophages reconnaissent les QD via leurs ligands sulfobétaïnes. Les polymères jouent le rôle d'un leurre pour saturer les macrophages *in vivo*. Cette piste pourrait être explorée pour réduire la capture des macrophages *in vivo*.

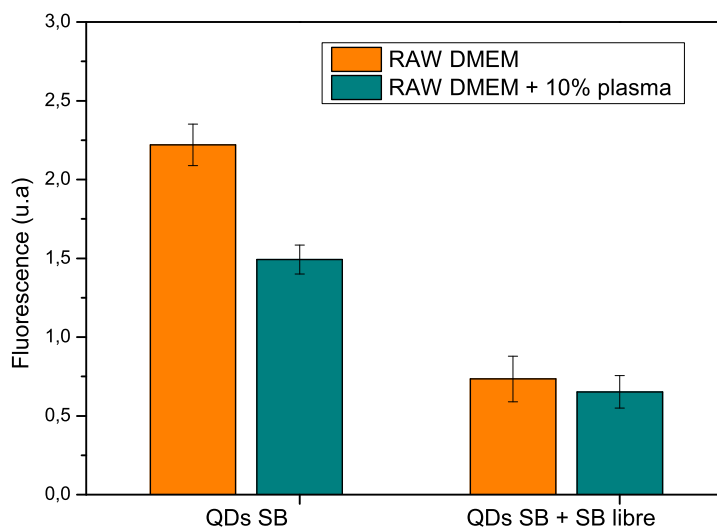


FIGURE 4.19 – Intensité de fluorescence mesurée sur des cellules RAW après incubation avec des QD dans le milieu de culture DMEM avec ou sans plasma, et avec ou sans polymère libre sulfobétaïne.

Les études des interactions QD/cellules par imagerie illustrent l'efficacité supérieure des QD sulfobétaïne par rapport aux QD phosphorylcholine pour réduire la capture des QD par les macrophages. Les QD sulfobétaïne présentent une faible interaction avec les macrophages quand ils sont incubés dans le plasma. Les cellules RAW interagissent avec le polymère sulfobétaïne libre, ce qui peut être une piste pour saturer les macrophages *in vivo* et augmenter le taux de nanoparticules qui atteignent leur cible.

Étude des interactions entre IONP et macrophages par cytométrie en flux

Les analyses par imagerie nécessitent d'analyser les cellules une par une et sont donc longues à réaliser et à analyser. On souhaite compléter l'étude avec des mesures plus précises, rapides, et qui permettent d'analyser un plus grand nombre de cellules, un protocole a donc été développé avec un cytomètre en flux.

La cytométrie en flux est une technique qui permet de mesurer certaines caractéristiques optiques de cellules en suspension. Les caractéristiques sont mesurées sur cellule unique et de manière très rapide ce qui permet d'en analyser plusieurs milliers ou dizaines de milliers en quelques minutes. Un flux de la suspension de cellules passe dans un capillaire devant un faisceau laser. Des détecteurs mesurent la fluorescence de chaque objet détecté, la diffusion de la lumière dans l'axe du laser (forward scatter) qui est liée à la taille de l'objet, et la diffusion de la lumière à 90°C (side scatter) qui est liée à la forme et la granularité de l'objet.

Cette technique permet de mesurer rapidement et de manière quantitative la fluorescence d'un grand nombre de cellules incubées avec des nanoparticules.

Ces expériences sont faites avec des IONP stabilisées par des sulfobétaïnes conjuguées

à des fluorophores FP647 sur des cellules RAW 267.4. en collaboration avec Yuzhou Pu, doctorant et et Juichi Bainvel-Sato, stagiaire au laboratoire.

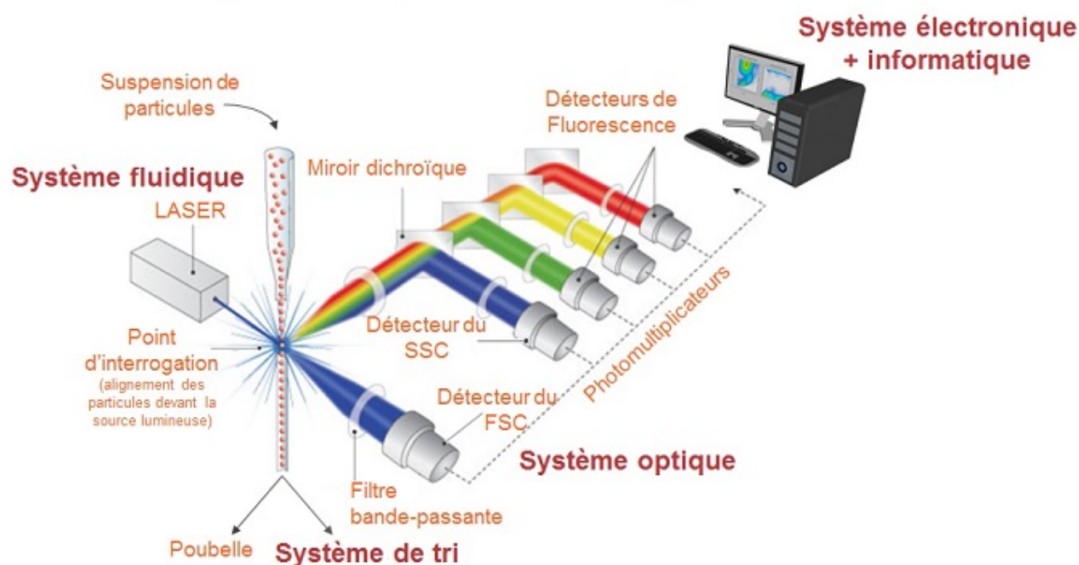


FIGURE 4.20 – Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux, [150].

Protocole cytométrie en flux

Les cellules RAW 267.4 sont incubées dans une plaque 6 puits jusqu'à ce qu'elles recouvrent environ 60% du fond du puits. Le milieu de culture est retiré et remplacé par du DMEM pur (sans sérum de veau fœtal) pour étudier l'interaction entre cellules et IONP en l'absence de protéines. Les IONP sont ensuite ajoutées au milieu de culture puis les cellules sont incubées une heure avec les IONP. Après une heure le milieu est retiré par aspiration, les cellules sont lavées avec 1mL de PBS, puis 500 μ L de tampon PBS est ajouté dans chaque puits. Les cellules sont alors grattées avec un grattoir à cellule. L'échantillon de cellules dans le PBS est pipeté vigoureusement pour défaire les agrégats de cellules qui fausseraient la mesure de fluorescence en cytométrie. L'absence d'agrégat de cellules est vérifiée au microscope. La solution de cellules dans le PBS est ensuite mise dans les tubes spéciaux du cytomètre.

Analyse avec le cytomètre en flux Guava EasyCyte (Merck Millipore)

Chaque échantillon est agité pendant 3 secondes avant le prélèvement pour être homogène. Le flux dans le cytomètre est réglé à 0.6 μ L/s. Il y a environ 500 cellules/ μ L dans les échantillons. La mesure de fluorescence est réalisée sur le canal "RedR", avec un laser qui excite à 642nm et une émission mesurée à 661 nm avec une largeur de 15nm. Avant chaque série de mesures le gain du cytomètre est réglé pour maximiser l'écart entre l'échantillon de plus fort et de plus faible fluorescence. Il est généralement d'environ 10 pour un maximum à 1000. Un seuil est appliqué sur la valeur de diffusion latérale nécessaire pour considérer une variation de fluorescence comme une cellule. Pour chaque échantillon la fluorescence de 5 000 ou 10 000 cellules est mesurée.

Pour chaque cellule le détecteur mesure la fluorescence du fluorophore FP647, qui est lié à la quantité de IONP liées à la cellule. Le cytomètre mesure 5 000 ou 10 000 cellules par condition et trace ensuite la fréquence de chaque intensité de fluorescence obtenue.

Le graphe Figure 4.21 présente les histogrammes normalisés pour des cellules incubées avec des quantités croissantes de IONP fluorescentes. Plus la quantité de IONP est élevée, plus les cellules sont fluorescentes. Pour les cellules incubées sans IONP (courbe bleue) le

niveau de fluorescence mesuré est très faible et correspond à l'autofluorescence des cellules. Pour des concentrations élevées, les cellules sont plus fluorescentes et la distribution est plus large. La moyenne des fluorescences mesurées est prise en compte pour quantifier le niveau d'interaction IONP/cellule, et est tracée sur le graphe Figure 4.22a. La distribution de fluorescence est large, mais comme la mesure a été faite sur un grand nombre de cellules, l'erreur à la moyenne est très faible, de l'ordre de la taille du carré sur la Figure 4.22a. Le cytomètre donne des résultats sous la forme de la Figure 4.21, mais pour la suite de l'étude le résultat donné sera celui de la moyenne des intensités de fluorescence mesurées sur l'échantillon. À noter que l'ajustement du gain du cytomètre est fait entre chaque série de mesures, donc le niveau de fluorescence mesuré n'est pas comparable entre les graphes. Une mesure a été répétée trois fois dans les mêmes conditions, l'écart type mesuré entre les trois mesures est de 14%. Les autres mesures n'ont pas été réalisées en triplicat, mais on peut supposer que la dispersion des mesures sera du même ordre de grandeur.

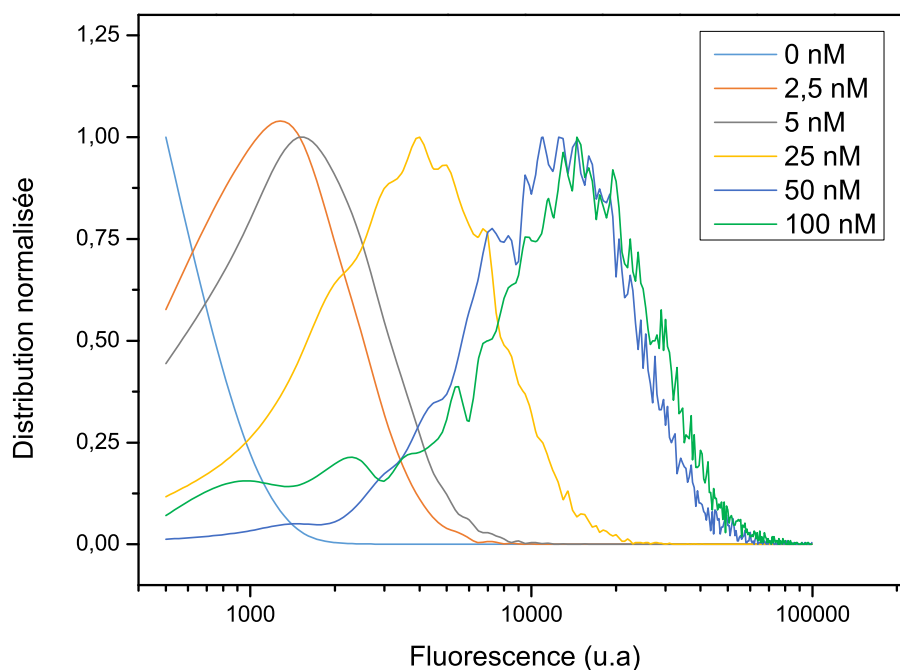
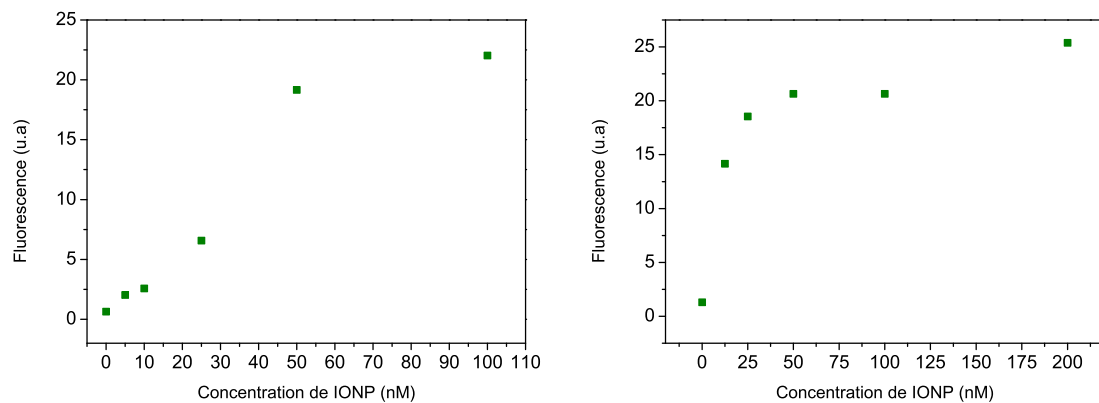


FIGURE 4.21 – Distribution de la fluorescence mesurée pour des cellules RAW incubées avec une concentration croissante (de 0 à 100 nM) de IONP décorées de 30 fluorophores. Le maximum des courbes est normalisé à 1 pour faciliter la visualisation. Mesuré par cytométrie en flux.



(a) Fluorescence en fonction de la concentration en IONP pour 30 fluorophores par IONP. (b) Fluorescence en fonction de la concentration en IONP pour 60 fluorophores par IONP.

FIGURE 4.22 – Étude de l'influence du nombre de fluorophores par IONP sur la capture par les macrophages. Mesuré par cytométrie en flux.

Étude des interactions des IONP avec des macrophages en présence de plasma

L'influence de l'incubation des nanoparticules dans du plasma, précédemment étudiée par imagerie (Figure 4.18) a été aussi étudiée par cytométrie en flux (Figure 4.23). Le niveau de fluorescence de cellules RAW incubées sans nanoparticules dans le DMEM, avec 100 nM de nanoparticules (38 fluorophores par IONP) dans le DMEM, et avec 100 nM de IONP dans du plasma de souris pur a été étudié. Une diminution d'un facteur 8 est observée entre les cellules incubées avec des IONP dans du DMEM et du plasma. Ces résultats confirment les résultats obtenus par imagerie : les composants du plasma interagissent avec les macrophages et cette interaction diminue le taux de reconnaissances des IONP.

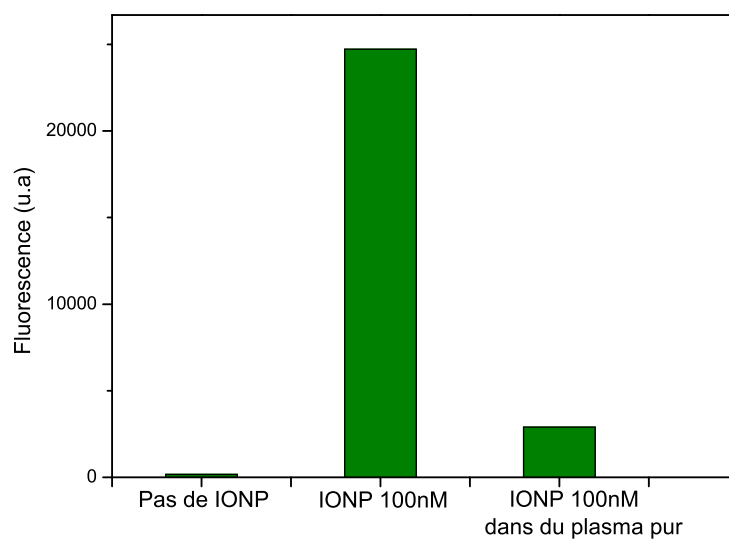


FIGURE 4.23 – Fluorescence pour des cellules RAW incubées sans IONP dans du DMEM, avec 100 nM de IONP avec 38 fluorophores/IONP dans du DMEM, et avec 100 nM de IONP dans du plasma de souris pur, mesuré par cytométrie en flux.

Étude de l'influence des fluorophores sur les interactions IONP/macrophages

Sur la Figure 4.22a les IONP sont conjuguées à 30 fluorophores. Cette étude a aussi été réalisée avec des IONP conjuguées à 60 fluorophores en moyenne, Figure 4.22b. Le comportement est différent : en effet pour des IONP avec 30 fluorophores on observe une évolution linéaire de l'interaction IONP/macrophage avec l'augmentation de la concentration, alors que pour les IONP avec 60 fluorophores le niveau de fluorescence sature beaucoup plus vite. Il est possible que les sites d'interactions à la surface des macrophages soient saturés au niveau du plateau. L'atteinte plus rapide du plateau pour les IONP avec 60 fluorophores est le signe d'une plus grande interaction des IONP avec les macrophages. Ces résultats semblent indiquer que le nombre de fluorophores sur les polymères a une influence sur les interactions entre macrophages et IONP. Pour étudier cette influence, une étude a été réalisée sur les interactions entre IONP et macrophages en fonction du nombre de fluorophores accrochés sur les IONP. La Figure 4.24 présente le niveau de fluorescence pour des cellules incubées avec des IONP liées à un nombre croissant de fluorophores. Pour un nombre de fluorophores inférieur à 30, le niveau de fluorescence des cellules est stable. Pour un nombre de fluorophores supérieur, le niveau de fluorescence augmente, signe que les cellules interagissent avec les fluorophores. Cette courbe a été tracée en prenant en compte l'augmentation de la fluorescence par IONP quand le nombre de fluorophores augmente. Le nombre de fluorophores par IONP pour la suite de l'étude sera toujours inférieur à 30.

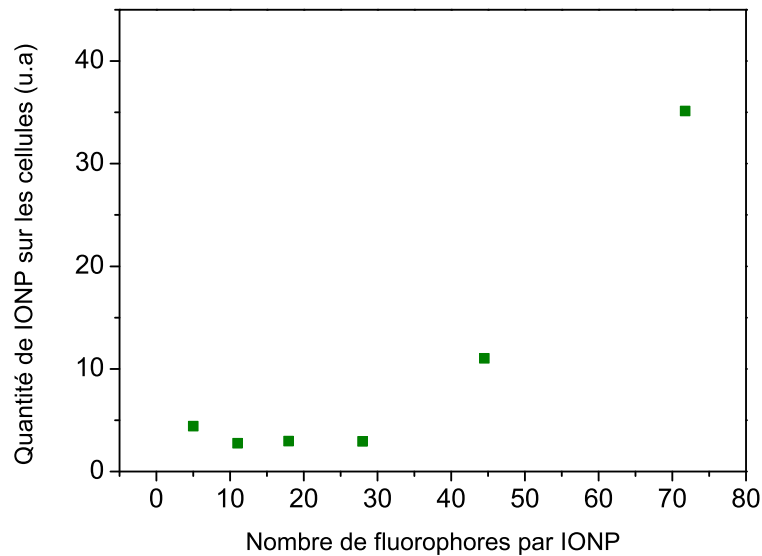


FIGURE 4.24 – Influence du nombre de fluorophores sur les IONP sur leur interaction avec les cellules RAW. Mesuré par cytométrie en flux.

Étude des interactions des macrophages avec les polymères P(SPP/NH₂-bMAPC1)

Il apparaît que, même avec un faible nombre de fluorophores par IONP, les IONP interagissent avec les macrophages, comme observé en imagerie avec les QD. L'hypothèse est que le polymère autour des IONP soit reconnu par les macrophages. Pour la tester une quantité constante de IONP est incubée avec des cellules, mais avec une quantité croissante de polymère libre. Le polymère libre est incubé avec les macrophages 10 min avant l'ajout de IONP. Le polymère est celui qui recouvre les IONP, soit ici le polymère P(SPP/NH₂-bMAPC1). Les résultats sont présentés Figure 4.25. L'étude est réalisée avec deux échantillons de IONP, un possédant 5 fluorophores en moyenne par IONP, et l'autre 11. Les deux échantillons ont un comportement similaire : l'augmentation de la concentration en polymère libre dans le milieu lors de l'incubation diminue les interactions avec les macrophages. Cette interaction semble ensuite faire un plateau autour de 30 % de l'interaction sans polymère libre. Ces résultats suggèrent que les polymères seuls interagissent avec les macrophages et prennent la place des IONP sur les lieux d'interactions des IONP à la surface des macrophages, par exemple des récepteurs de surface. Il est cependant étrange que les interactions IONP - macrophages ne tendent pas vers 0 pour les hautes concentrations de polymères. Ce plateau pourrait être dû à un autre mécanisme de reconnaissance et de capture des QD par les macrophages, qui ne passeraient pas par le récepteur saturé par les polymères libres.

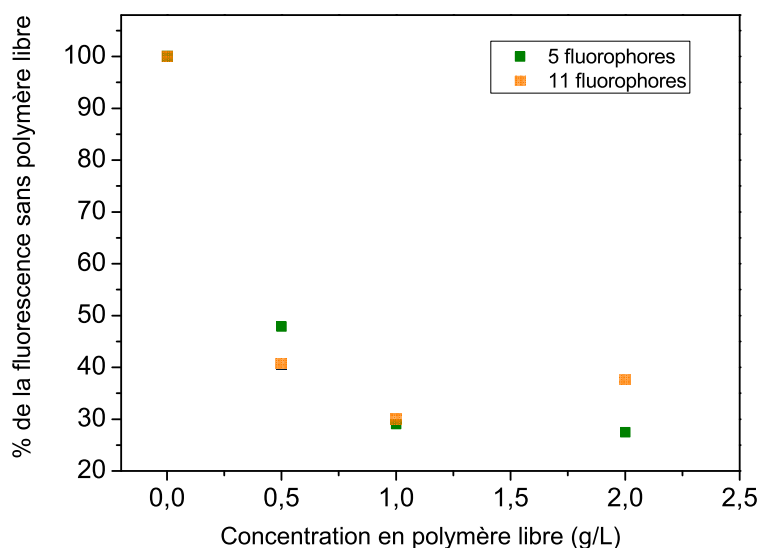


FIGURE 4.25 – Étude de la capture des IONP par les macrophages en fonction de la concentration de polymère libre P(SPP/NH₂-bMAPC1) dans la solution, pour des IONP marquées par 5 ou 11 fluorophores. Mesuré par cytométrie en flux.

Étude des interactions des macrophages avec les polymères P(SPE) L'ajout d'un polymère P(SPP/NH₂-bMAPC1) diminue les interactions IONP/macrophage. On se demande quelle fonction du polymère interagit avec les macrophages, et quelle est l'influence de la taille de l'objet reconnu par le macrophage. Des IONP recouvertes de polymère marqué sont incubées avec des macrophages et avec des quantités croissantes de polymère libre sulfobétaïne deux tailles différentes : 10 000 g/mol et 100 000 g/mol, pour étudier l'influence de la taille de l'objet (Figure 4.26). Peut-être qu'un polymère plus gros est plus efficace pour se lier aux récepteurs de surface des macrophages. La diminution de l'interaction est moins forte que Figure 4.25, lorsque les polymères libres sont du P(SPP/NH₂-bMAPC1), soit avec des monomères avec une fonction amine et un bloc phosphonate, en plus du poly(sulfobétaïne). Ce sont peut-être ces fonctions qui interagissent avec la membrane. Il est aussi possible que l'ajout de polymère P(SPP/NH₂-bMAPC1) ait comblé des trous dans la couverture de polymère des IONP. Si c'est via ces trous, qui laissent la surface de la IONP accessible, que les macrophages reconnaissent les IONP, les combler partiellement in situ permettrait de diminuer la capture. Il n'y a pas de différence entre les cellules incubées avec les polymères de 10 000 ou 100 000 g/mol. Peut-être que pour le mécanisme de reconnaissance du polymère par le macrophage la taille n'intervient pas, mais comme la diminution n'est franche dans aucun des deux cas il est difficile de conclure.

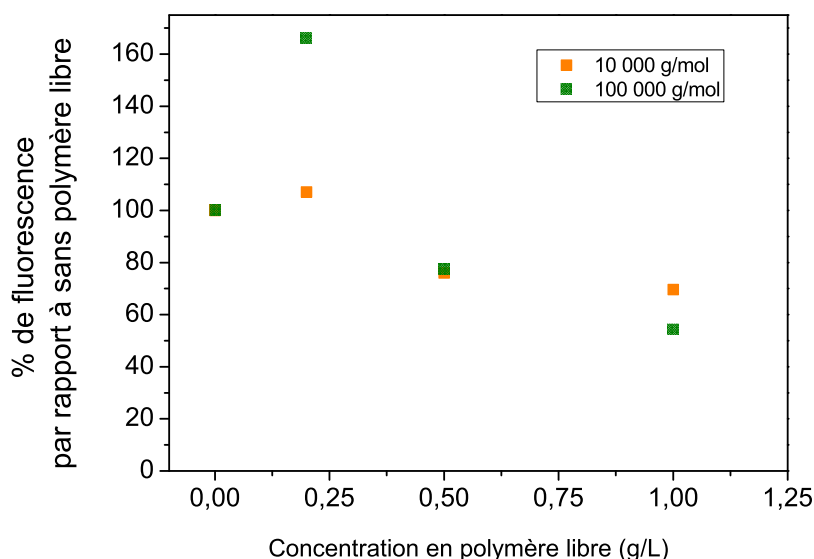


FIGURE 4.26 – Étude de la capture de IONP en fonction de la concentration en polymère libre de la solution. Deux polymères libres poly(sulfobétaïnes) ont été utilisés, de 10 000 et 100 000 g/mol. Mesuré par cytométrie en flux.

4.3.4 Conclusions et perspectives sur ce projet

Ce projet a pour but d'étudier la circulation dans le sang des nanoparticules recouvertes de polymères zwitterioniques. Des nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de ligands poly(sulfobétaïnes) avec un bloc d'accroche phosphonate ont un temps caractéristique de circulation mesuré par IRM de 20 minutes environ chez la souris. Ils sont capturés dans le foie et la rate, très certainement par le système immunitaire, dont principalement des macrophages. Plusieurs expériences ont été réalisées pour expliquer cette capture et tenter de la diminuer. Les interactions de nanoparticules avec du plasma, biofluide modèle le plus proche du sang, ont été étudiées. Les composants du plasma ne collent pas sur des quantum dots et nanoparticules d'oxyde de fer recouverts de ligands poly(sulfobétaïne). Les QD recouverts de ligands poly(phosphorylcholine) en revanche, s'agrègent dans le plasma. La capture des nanoparticules par des macrophages immortels en culture a ensuite été étudiée par imagerie, avec des quantum dots, et par cytométrie en flux, avec des nanoparticules d'oxyde de fer. Avec l'imagerie il est possible d'observer comment les nanoparticules se répartissent au niveau de la cellule, et de déterminer si la nanoparticule est collée sur la membrane ou internalisée. La cytométrie en flux ne donne pas cette information, mais permet d'analyser le niveau de fluorescence d'un plus grand nombre de cellules, et plus rapidement. Il a été montré que les QD sulfobétaïne interagissent moins avec les macrophages que les QD phosphorylcholine. Il semble qu'une partie de la reconnaissance des nanoparticules par les macrophages passe par le ligand poly(sulfobétaïnes), et qu'il y ait plusieurs mécanismes de reconnaissance et de capture. Injecter un excès de poly(sulfobétaïne) dans la circulation pourrait diminuer la capture des nanoparticules.

Cette étude est encore en cours, les résultats pourront être confirmés et approfondis et les hypothèses vérifiées par de futures expériences.

Dans le futur, il serait intéressant d'étudier les interactions macrophages/cellules avec des modèles se rapprochant encore des conditions *in vivo*, par exemple avec des nanoparticules qui circulent dans des canaux recouverts de macrophages mimant des vaisseaux sanguins. Ces expériences pourraient permettre d'étudier l'influence de la circulation et du flux sur la reconnaissance et la capture des nanoparticules.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Après le premier chapitre introductif, le chapitre 2 présente la synthèse et la caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de zwitterions. Ce sont des nanoparticules de maghémite, d'un diamètre cristallin d'environ 10 nm, synthétisées par décomposition thermique. Les ligands sont des copolymères à bloc, avec un bloc sulfobétaïne qui permet la solubilisation des nanoparticules dans l'eau et lui confèrent des propriétés de furtivité, et un bloc phosphonate qui permet l'accroche sur la nanoparticule. Leur synthèse par polymérisation RAFT est décrite. Un protocole d'échange de ligand a été mis au point pour échanger les ligands de synthèse par les ligands zwitterioniques. La stabilité colloïdale et le faible niveau d'interactions non spécifiques des nanoparticules recouvertes de ligand poly(sulfobétaïne - bloc phosphonate) est vérifiée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS).

Dans le chapitre 3 la bioconjugaison de la GFP sur les ligands de la nanoparticule a été réalisée avec succès. Cette GFP permet de cibler un locus génomique sur une lignée cellulaire, de manière rapide et spécifique. Des milliers de nanoparticules s'accrochent au locus. La manipulation des nanoparticules présentes au locus est ensuite réalisée grâce à une pointe magnétique qui crée un gradient de champ qui attire les nanoparticules. Les nanoparticules d'oxyde de fer réussissent donc à micromanipuler un locus génomique sur plusieurs microns en quelques minutes. Deux pistes pour mesurer la force appliquée sur le locus génomique sont explorées.

Le chapitre 4 étudie l'interaction entre des nanoparticules et le système immunitaire. Les nanoparticules d'oxyde de fer ne forment pas de couronne de protéines *in vitro* et *in cellulo*, peut-être que cela les rend invisibles vis-à-vis des macrophages ? Une étude chez la souris par IRM a invalidé cette hypothèse, car le temps caractéristique mesuré de circulation dans le sang n'est que de 20 min. Des études des interactions entre nanoparticules et macrophages en culture ont ensuite été réalisées, par imagerie et par cytométrie en flux. Des méthodes d'analyse ont ainsi été développées. Elles ont confirmé les résultats de Debayle et al. [87] : le sulfobétaïne est le zwitterion le plus furtif. Il apparaît qu'une partie de la reconnaissance des nanoparticules par les macrophages passe par les zwitterions,

quand une autre partie en est indépendante. Une stratégie pour augmenter la circulation pourrait être de leurrer et saturer les macrophages avec du polymère libre.

Perspectives

Les résultats du chapitre 2 sont encourageants pour la fonctionnalisation de nanoparticules avec des ligands sulfobétaïne. Les polymères développés pourraient continuer à être adaptés à d'autres types de nanobjets, comme cela a été fait avec les nanobâtonnets de phosphate de lanthanes. Un groupe d'accroche phosphonate peut être utilisé car il est capable de complexer plusieurs oxydes. Il est aussi possible de modifier la fonction d'accroche pour cibler d'autres surfaces.

À court terme, les perspectives du chapitre 3 incluent l'estimation du gradient de champ créé par la pointe magnétique pour connaître la force appliquée sur les nanoparticules par celle-ci. Ensuite les nanosondes pourront être utilisées pour étudier la physique de la chromatine. Il pourrait être utile de rendre les nanoparticules plus magnétiques, en augmentant un peu la taille de la nanoparticule ou en optimisant sa composition. Il sera aussi intéressant de pouvoir cibler d'autres régions du génome, afin d'étudier l'influence de la position de l'application de la force.

Les expériences de ciblage et manipulation avec des nanoparticules recouvertes de zwitterions ont montré une grande spécificité du ciblage, et un comportement furtif des nanoparticules dans les cellules. Il me semble que la fonctionnalisation sulfobétaïne est tout à fait adaptée pour des études impliquant des nanoparticules et des cellules, et pourra être étendu à d'autres problématiques de recherche. Une collaboration est par exemple en cours avec l'équipe de David Perrais, Trafic membranaire synaptique, à l'université de Bordeaux, qui utilise des quantum dots recouverts de ligands sulfobétaïnes pour étudier le mouvement de récepteurs synaptiques.

Cette thèse a permis de développer deux méthodes pour étudier l'interaction entre des nanoparticules et des macrophages, par imagerie et par cytométrie en flux. Elles vont continuer à être utilisées au laboratoire pour tenter de comprendre comment les macrophages détectent et captent les nanoparticules recouvertes de zwitterions. Plusieurs types de nanoparticules vont être étudiés, comme des quantum dots ou des nanoparticules d'or, afin d'évaluer l'influence de la surface de la nanoparticule dans l'interaction. Il serait aussi intéressant d'étudier par IRM chez la souris l'influence de l'injection de nanoparticules avec une grande dose de polymère libre visant à saturer les macrophages.

Pour continuer à mieux comprendre la capture des nanoparticules par les macrophages, il serait intéressant de construire un modèle d'étude reproduisant le flux du sang dans les microcapillaires du foie, afin d'étudier l'influence du flux, et s'il pourrait être un paramètre à contrôler pour diminuer la capture.

Il me semble que les macrophages sont incroyablement efficaces à détecter et capter tout corps étranger injecté dans la circulation sanguine. Pour limiter la capture par le système immunitaire, d'autres modes d'administration des nanoparticules peuvent aussi

être envisagés, en fonction de l'activité voulue de la nanoparticule, par exemple par inhalation si on souhaite cibler les poumons, par injection sous la peau, ou directement par injection dans une tumeur. Cela permettrait de limiter le passage des nanoparticules dans le foie, et donc la capture par les macrophages s'y trouvant. Limiter cette capture permettrait d'augmenter l'efficacité des nanoparticules et de réduire leur toxicité, car la dose de nanoparticules pourra être réduite.

Liste des publications, communications et posters

Articles

- Fanny Delille, Elie Balloul, Bassam Hajj, Mohamed Hanafi, Xiangzhen Xu, Simon Dumas, Antoine Coulon, Nicolas Lequeux, Thomas Pons "Sulfobetaine-phosphonate block copolymer coated iron oxide nanoparticles for genomic locus targeting and magnetic micromanipulation in the nucleus of living cells ", Article en préparation, 2023.
- Zijun Wang, Fanny Delille, Sophie Bartier, Thomas Pons, Nicolas Lequeux, Bruno Louis, Jongwook Kim et Thierry Gacoin "Zwitterionic Polymers towards the Development of Orientation-Sensitive Bioprobes", *Langmuir*, 2022, 38(34) ; DOI : 10.1021/acs.langmuir.2c01286, [116]
- Veer I. P. Keizer, Simon Grosse-Holz, Maxime Woringer, Laura Zambon, Koceila Aizel, Maud Bongaerts, Fanny Delille, Lorena Kolar-Znika, Vittore F. Scolari, Sebastian Hoffmann, Edward J. Banigan, Leonid A. Mirny, Maxime Dahan, Daniele Fachinetti et Antoine Coulon, "Live-cell micromanipulation of a genomic locus reveals interphase chromatin mechanics", *Science* 2022 ; DOI : 10.1126/science.abi9810, [54]

Article de revue

- Fanny Delille, Yuzhou Pu, Nicolas Lequeux et Thomas Pons "Designing the Surface Chemistry of Inorganic Nanocrystals for Cancer Imaging and Therapy", *Cancers*, 2022, 14(10), 2456 ; DOI : 10.3390/cancers14102456, [57]

Communication orale

- Fanny Delille, Elie Balloul, Veer I. P. Keizer, Bassam Hajj, Antoine Coulon, Nicolas Lequeux et Thomas Pons ACS Fall 2022, Division of Colloid & Surface Chemistry, Aout 2022, Chicago USA. "Zwitterionic nanoparticles for manipulating chromosomes in live cells"

Posters

Fanny Delille, Elie Balloul, Veer I. P. Keizer, Bassam Hajj, Antoine Coulon, Nicolas Lequeux et Thomas Pons "Zwitterionic nanoparticles for manipulating chromosomes in live cells"

- Internet nanoGe Conference on Nanocrystals (iNCNC) Juin 2021
- École résidentielle interdisciplinaire en nanosciences et nanotechnologies ERIN², Erquy, juillet 2021
- C’Nano 2021, Toulouse, novembre 2021
- 17th course on Epigenetic, Institut Curie, Paris, mars 2022

Annexes

Dosage du Fer(II) et Fer(III) dans les nanocristaux par l'orthophénanthroline

Pour doser le fer avec l'orthophénanthroline (ophen), les nanoparticules sont préalablement dissoutes dans de l'acide chlorhydrique, typiquement 50 μL de solution d'oxyde de fer décapés à 20 μM dans 400 μL d'acide chlorhydrique à 1M, pendant une heure à l'étuve à 60°C. Le volume est à ajuster si la valeur trouvée ne tombe pas dans la gamme. Des MNPs décapées sont utilisées pour qu'elles soient solubles dans l'acide chlorhydrique. Voir le protocole de décapage Partie 2.3.1.

Préparation de la gamme

Une gamme d'étalonnage est préparée avec 5 échantillons ayant une concentration en Fe(III) croissant, 50, 100, 200, 300, 350 μM . Pour un volume total de 3 mL de solution, sont ajoutés 600 μL de tampon acétate à pH=5, 0,5/0,15 acétate/NaCl, 300 μL d'acide ascorbique à 20 mg/mL et 45 μL d'ophen à 6,6g/L. La solution d'ophen est dans 1/2 éthanol/eau pour améliorer sa solubilité. L'absorbance du complexe est mesurée à 508 nm.

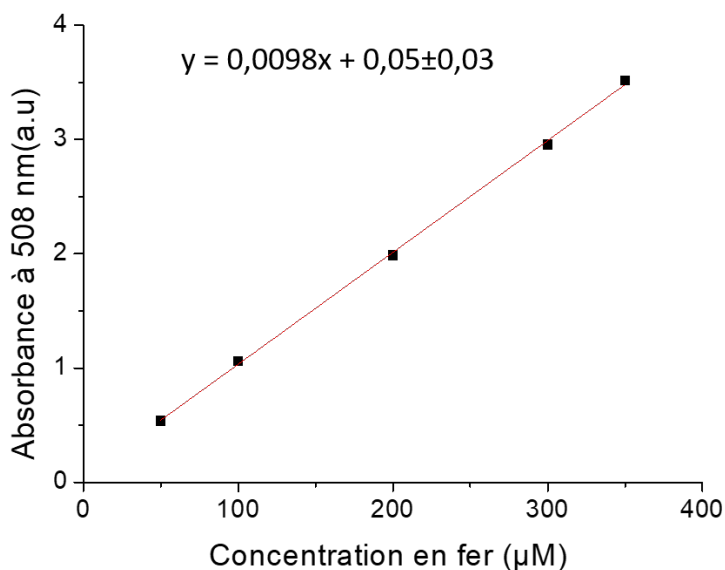


FIGURE 27 – Courbe d'étalonnage du dosage avec l'orthophénanthroline.

Couplage peptidique par intermédiaire d'ester actifs

Les réactions de couplage peptidique, c'est-à-dire les réactions covalentes entre une amine primaire et un acide carboxylique pour former une liaison amide, ont été très utilisées dans le cadre de cette thèse. Pour que la réaction soit efficace l'acide carboxylique est activé sous forme d'ester. La réaction est décrite Figure 28. L'acide carboxylique réagit avec le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) en présence de N-hydroxysuccinimide (NHS) ou un dérivé soluble dans l'eau, le sulfo-NHS. L'acide carboxylique réagit d'abord avec l'EDC, plus réactif mais moins stable, puis avec le NHS. Cette réaction se fait dans le DMSO anhydre ou dans l'eau tamponnée à pH=6 si le produit NHS est utilisé tout de suite, car il est sensible à l'hydrolyse dans l'eau. Pour créer la liaison amide, l'acide carboxylique activé avec le NHS est ensuite mis en contact avec l'amine primaire (2 sur le schéma). Si l'amine primaire est soluble dans le DMSO, le solvant choisi est le DMSO anhydre. Si l'amine n'est soluble que dans l'eau le pH de cette étape doit être contrôlé. En effet un pH trop élevé causerait l'hydrolyse du composé NHS trop rapidement, et un pH trop faible entraînerait la protonation de l'amine ce qui réduit sa réactivité. Le compromis est trouvé à pH=8,2. Les tampons contenant des amines sont à éviter, dans cette thèse l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) est utilisé. La réaction dure deux heures à température ambiante.

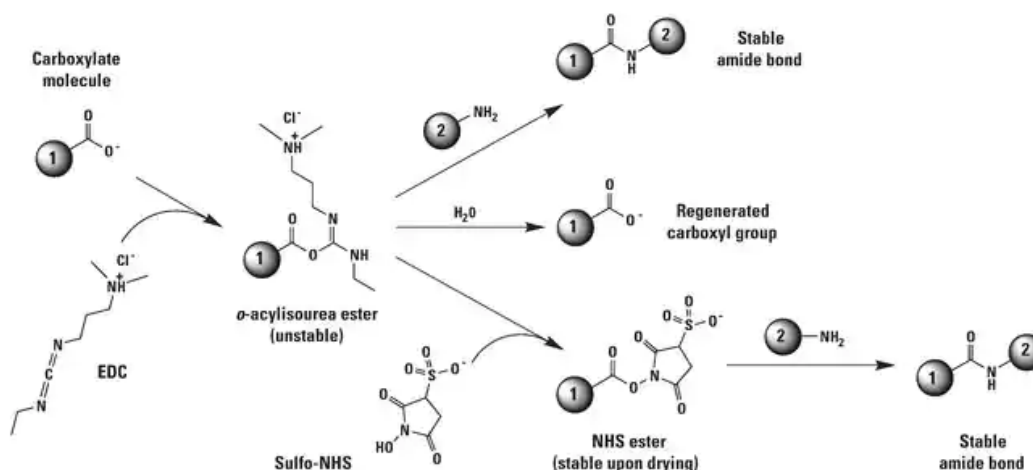


FIGURE 28 – Réaction de couplage peptidique, Fischer Scientific.

Polymère sulfobétaine bloc phosphonate pour des nanobâtonnets de terre rare à émission polarisée

Présentation des nanobâtonnets

Zijun Wang, Jongwook Kim et Thierry Gacoin, au Laboratoire de Physique de la Matière condensée à l'École Polytechnique, travaillent sur des nanobâtonnets (nanorods, NR) de phosphate de lanthanes dopés à l'euporium qui ont une luminescence polarisée. Cette propriété permet aux NR de servir de nanosonde pour étudier les contraintes de cisaillement dans des canaux microfluidiques [151]. Ces résultats sont prometteurs et permettent d'envisager l'utilisation de ces NR pour étudier des flux dans des milieux biologiques, par exemple autour de cellules ciliées. Pour pouvoir arriver à cette utilisation, les NR ont besoin eux aussi d'être stables dans un milieu biologique. Les polymères poly(zwitterion bloc phosphonate)(P(SPE-b-MAPC1)) présentés ci-dessus ont permis d'obtenir des NR stables dans des milieux physiologiques tout en conservant leurs propriétés optiques. Ces résultats sont rassemblés dans l'article "Zwitterionic Polymers towards the Development of Orientation-Sensitive Bioprobes", Zijun Wang, Fanny Delille, Sophie Bartier, Thomas Pons, Nicolas Lequeux, Bruno Louis, Jongwook Kim et Thierry Gacoin [116]. Dans ce projet j'ai réalisé la synthèse des polymères, échangé avec Zijun, Jongwook et Thierry pour élaborer le protocole de greffage des polymères sur les NR, et étudié les interactions des NR recouverts de polyzwitterion avec de l'albumine de sérum bovin (BSA).

Les NR utilisés dans cette étude sont des nanobâtonnets de phosphate de lanthanes monazite dopés à l'euporium $\text{LaPO}_4 : 5\% \text{Eu}^{3+}$, ce qui leur donne leur propriété de luminescence. Ils ont une longueur moyenne de 150 nm et un rapport d'aspect entre 18 et 35 Figure 29. Leur synthèse est décrite dans l'article de Zijun Wang [152].

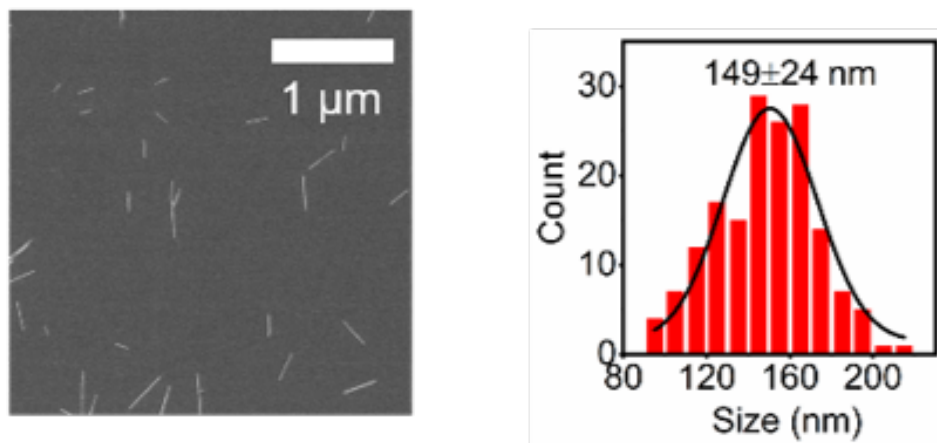


FIGURE 29 – Microscopie électronique à balayage des NR fonctionnalisés avec un histogramme de la distribution de longueur, issu de "Zwitterionic Polymers towards the Development of Orientation-Sensitive Bioprobes", [116].

Greffage des ligands zwitterioniques sur les nanobâtonnets

Après synthèse, les NR sont stables dans une solution d'acide nitrique de pH=1 à 3 grâce à la répulsion électrostatique entre les charges de surface, dues aux ions La^{3+} et Eu^{3+} . Le protocole de greffage a été élaboré par Zijun en discussion avec nous. Les NR sont mélangés avec le polymère P(SPE-b-MAPC1) et sont soniqués pendant une heure. Puis le pH de la solution est remonté jusqu'à un pH neutre pour permettre de déprotonner l'acide phosphonique du groupe MAPC1 afin qu'ils puissent se lier aux ions à la surface du NR. Les NR sont ensuite chauffés par micro-ondes à 100°C pendant 1 heure. Les NR sont finalement lavés par ultrafiltration pour retirer l'excès de polymère. Le passage des NR au micro-ondes permet d'augmenter la stabilité colloïdale post greffage.¹

Plusieurs caractérisations des NR fonctionnalisés ont été faites au Laboratoire de Physique de la Matière Condensée Figure 30. Une analyse thermogravimétrique montre qu'un échantillon de NR fonctionnalisé chauffé de la température ambiante à 800°C à 10°C/min perd 4,3% de sa masse avant 300°C, ce qui correspond à une perte d'eau, puis 19,2% de sa masse entre 300 et 580°C, ce qui correspond à la décomposition du polymère. Cette perte de masse équivaut à une densité de greffage de 3 mg/m², qui est de l'ordre de grandeur de ce qui a été mesuré sur les nanoparticules d'oxyde de fer par ICP-AES Partie 2.3.4. Les analyses de DLS montrent que les NR sont stables et ne forment pas d'agrégats une fois fonctionnalisés. Une étude en fonction du pH montre une stabilité des NR sur une gamme de pH entre 4 et 12 en présence de sel. L'absence de stabilité à faible pH est due à la reprotonation des phosphonates : en effet les pKa des phosphonates sont situés autour de 2 pour la première acidité et de 7 pour la deuxième [67]. La reprotonation cause le décrochage des ligands et donc la perte de stabilité des NR.

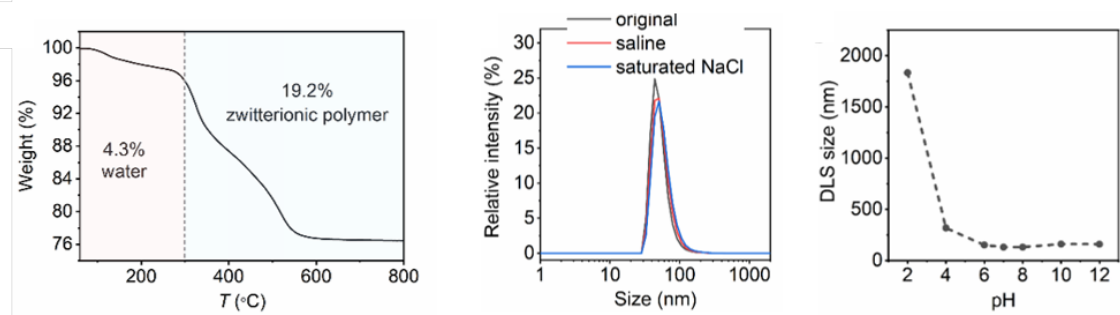


FIGURE 30 – Étude de la stabilité colloïdale des NR recouverts de polymères zwitterioniques. À gauche : Analyse thermogravimétrique des NR fonctionnalisés, chauffage de la température ambiante à 800°C à 10°C/min. Au milieu : Le rayon hydrodynamique mesuré par DLS des NR avant fonctionnalisation et après fonctionnalisation dans une solution de NaCl à 150 mM ou saturée. À droite rayon hydrodynamique mesuré en DLS en fonction du pH à force ionique fixée équivalente à 150 mM NaCl. Caractérisations faites par Zijun Wang, issues de [116].

1. Cette étape a également été essayée pour le greffage sur les nanoparticules d'oxyde de fer, mais n'a pas permis de diminuer le nombre d'agrégats produits lors de l'échange.

Conservation de l'émission polarisée

Les NR de $\text{LaPO}_4 : 5\% \text{Eu}^{3+}$ ont des propriétés d'émission polarisée qui en font des potentielles sondes d'intérêt. Il est important que la fonctionnalisation par les polymères conserve ces propriétés. C'est ce qui a été vérifié au Laboratoire de Physique de la Matière Condensée. La Figure 31 présente l'émission polarisée des NR zwitterioniques en phase nématique excités à 394 nm avec une lumière polarisée parallèlement ou perpendiculairement à l'orientation des NR. Le spectre est différent en fonction de la polarisation, donc la polarisation de l'émission est conservée avec la fonctionnalisation par les zwitterions.

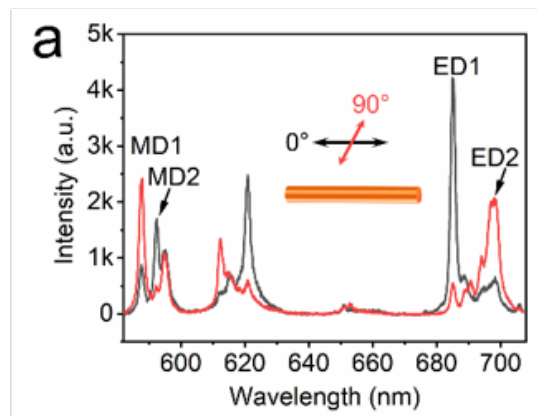


FIGURE 31 – Spectre d'émission polarisé de NR recouverts de polymères zwitterioniques, excitation à 394 nm. Le polariseur a un angle de 90° entre les deux spectres (noir et orange) [116].

Étude de la couronne dure de protéines autour des nanobâtonnet

Il est nécessaire pour être stable dans un milieu biologique complexe que les NR aient des interactions limitées avec le matériel biologique, comme les protéines. L'interaction des NR de type couronne dure avec de l'albumine de sérum bovin (BSA) a été étudiée en incubant les NR avec une solution à 1 mM en BSA et en dosant la quantité de BSA restant sur les NR après plusieurs lavages, pour éliminer les BSA non liées ou faiblement liées aux NR. Le dosage a été fait avec de la fluorescamine, molécule qui devient fluorescente en présence d'amines, ici les amines primaires présentes sur la BSA (Figure 32), selon le même protocole que celui pour étudier la couronne dure autour de QD dans [87].

Les résultats sont présentés Figure 33. La quantité de BSA par NR est estimée en considérant une taille fixe de NR de 150 nm de long et 10 nm de large. Le seuil de détection, obtenu à partir de l'écart type sur la mesure du blanc, c'est-à-dire le niveau de fluorescence mesuré dans une solution sans BSA, est de 0,16 BSA par NR. Après 6 lavages, 0,8 BSA sont détectées sur les NR, ce qui correspond à une protéine pour $6\,000\text{ nm}^2$ de surface de NR, un niveau très faible. Les ligands zwitterioniques sont donc efficaces pour éviter la formation de couronne dure.

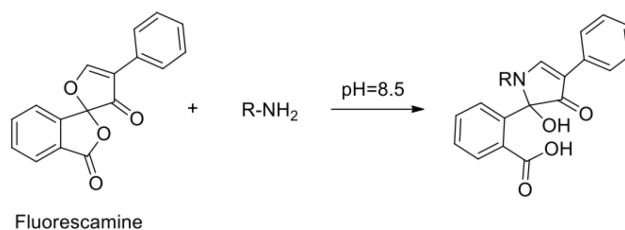


FIGURE 32 – Réaction entre la fluorescamine et les amines primaires. Seul le produit de la réaction est fluorescent [80].

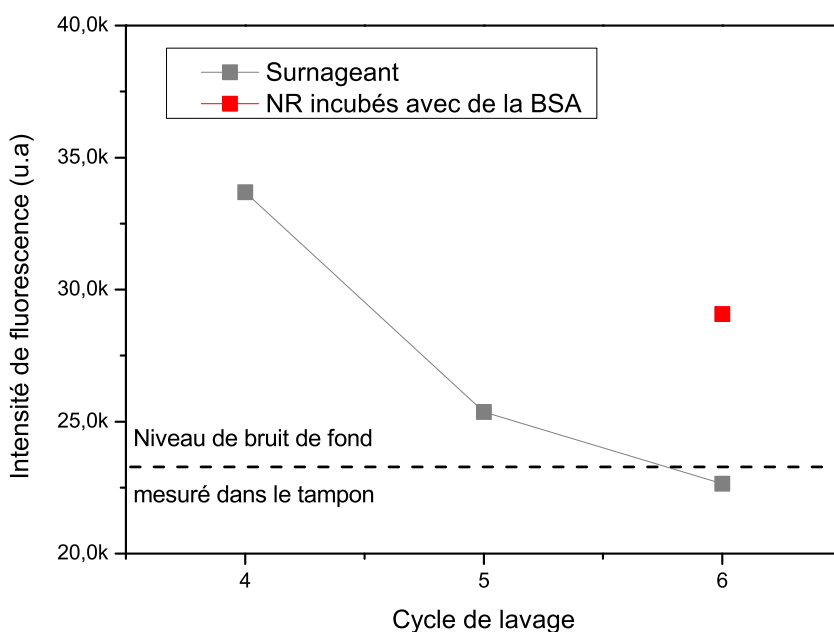


FIGURE 33 – Niveau de fluorescence à la longueur d'onde de la fluorescamine, en gris pour les surnageants après les 4, 5 et 6 ème lavages et en rouge pour les NR incubés avec la BSA après le 6ème lavage. La droite en pointillé représente le bruit de fond, l'intensité mesurée dans un échantillon ne contenant pas de protéine.

Protocole de mesure de la couronne dure de protéines sur les nanobâtonnets de phosphate de lanthanes

Les nanobâtonnets (NRs) (0.027% fraction volumique, 38 nM de NRs, 66 μ L) sont incubés dans une solution de 1 mL de BSA à 1 mM (26000 BSA par NR) dans un tampon HEPES/Na 10 mM, NaCl 50 mM (pH=7,5) pendant une heure. Les nanoparticules sont ensuite lavées par six cycles de centrifugation à 23 000 g pendant 5 minutes. Après chaque cycle le surnageant contenant les protéines non adsorbées est retiré et les NRs sont redispersés dans le tampon HEPES/Na. Après le dernier cycle de centrifugation les NRs sont redispersés dans 1,5 mL de tampon HEPES/Na buffer 0.1 M pH=8.5. Le dernier surnageant contient une quantité de protéines sous le seuil de détection. La quantité de protéines est mesurée par fluorescence avec le test à la fluorescamine. La fluorescamine réagit avec les amines primaires de la BSA en formant un produit très fluorescent (Figure 32). La concentration de protéine est estimée grâce à une calibration en utilisant de la BSA. 1.5 mL d'une solution de concentration connue de BSA dans le tampon HEPES/Na 0.1 M pH=8.5 est mélangé avec 0.5 mL de fluorescamine à 0.3 mg/mL dans l'acétone. La fluorescence est mesurée à 518 nm avec une excitation à 390 nm (Figure 34).

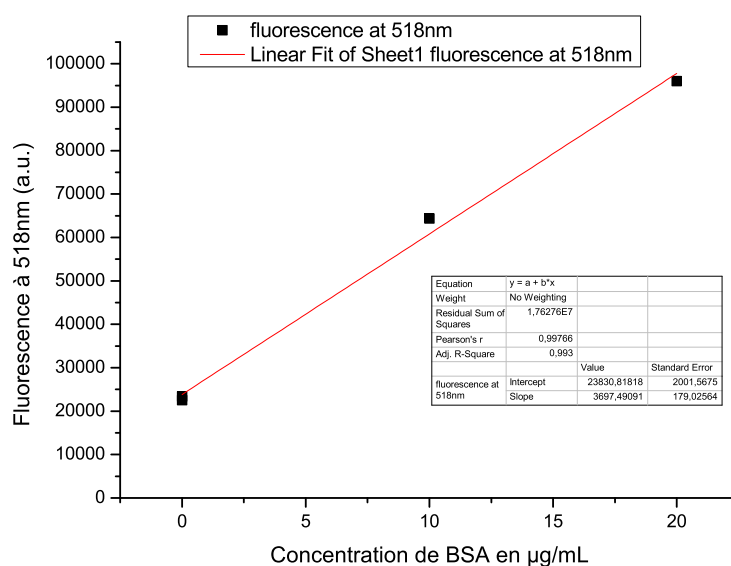


FIGURE 34 – Calibration du test à la fluorescamine avec des concentrations connues de BSA.

Ainsi un autre type de nanoobjet, les nanobâtonnets de phosphate de lanthanes, ont été recouverts de polymères sulfobétaïne bloc phosphonate avec succès. Un protocole de greffage des ligands a été élaboré, la conservation des propriétés de luminescence polarisée a été vérifiée, et il a été mis en évidence qu'une protéine modèle ne s'accroche pas sur les nanobâtonnets. Les polymères sulfobétaïnes bloc phosphonate permettent donc à plusieurs types de nanoparticules d'aller vers une application dans des milieux biologiques.

Essai d'une autre stratégie d'accroche de nanoparticules sur la chromatine avec des Quantum Dot

Cibler la chromatine avec des MNP-GFP fonctionne pour la lignée cellulaire exprimant la protéine TetR-mCherry- α GFP, mais permet uniquement de cibler la répétition *tetO* sur le chromosome 1. Une autre approche a été testée pour pouvoir cibler d'autres loci et d'autres lignées cellulaires. Elle est fondée sur l'utilisation de la protéine deadCas9. La protéine Cas9 fait partie du système CRISPR-Cas qui permet aux bactéries de se défendre contre des virus. Les virus injectent leur ADN dans les bactéries afin qu'elles le répliquent et produisent de nouveaux virus. Le système CRISPR-Cas permet de détecter ces segments d'ADN étrangers et de les couper pour les retirer du génome de la bactérie. La protéine Cas9 est celle qui, liée à un ARN guide, reconnaît la séquence d'ADN, s'y lie et la coupe. La deadCas9 (dCas9) est une version mutée de la Cas9. Les nucléases qui coupent l'ADN ont été désactivées, elle permet uniquement de cibler la séquence d'ADN complémentaire de son ARN guide, sans le couper. Cette protéine permet donc de cibler différentes séquences de l'ADN, en changeant l'ARN guide auquel elle se lie.

Accrocher des MNP à la dCas9 permettrait donc de cibler d'autres régions du génome. Le laboratoire Dynamique Spatio-temporelle des Fonctions Génomiques d'Antoine Coulon collabore avec le laboratoire Édition du génome, réparation de cassures double-brin de l'ADN et réponses cellulaires, au Muséum national d'Histoire naturelle (MNHN). Ces derniers ont purifié une protéine dCas9 fusionnée avec une streptavidine monomérique. La streptavidine est une protéine qui a une très forte interaction avec la biotine, une petite molécule. Cette interaction est une des plus fortes interactions non covalentes connues, avec une constante de dissociation du complexe streptavidine-biotine (K_d) de l'ordre de 10^{-15} M. Ce lien est très utilisé pour accrocher des biomolécules entre elles ou sur une surface. La streptavidine est formée de 4 monomères, chacun pouvant se lier à une biotine. Ici la dCas9 est fusionnée avec une streptavidine modifiée mSA2 afin d'être monomérique, pour éviter qu'une protéine streptavidine ne se lie à plusieurs biotines et ne forme des agrégats. La mSA2 possède une affinité moins forte avec la biotine que la streptavidine non modifiée, mais qui reste très élevée, $K_d \propto 10^{-9}$ M. La protéine dCas9-mSA2 purifiée pourrait donc se lier à des nanoparticules possédant des biotines à leur surface. Dans cette étude des QD, nanocristaux de semi-conducteurs fluorescents, ont été utilisés pour faciliter la visualisation des nanoparticules.

Synthèse des QD-biotine

Des quantum dots (QD) fonctionnalisés par des polymères P(SPP/NH₂), donc avec des fonctions réactives amines, sont utilisés pour créer des QD-biotine. La biotine est une petite molécule possédant une fonction acide carboxylique qui peut être modifiée sans compromettre la reconnaissance de la biotine par la streptavidine. Cette fonction acide carboxylique est donc activée pour pouvoir réagir sur les amines primaires présentes sur

les QD-NH₂. La biotine est activée par réaction avec de l'EDC/NHS (Figure 35) comme décrit précédemment.

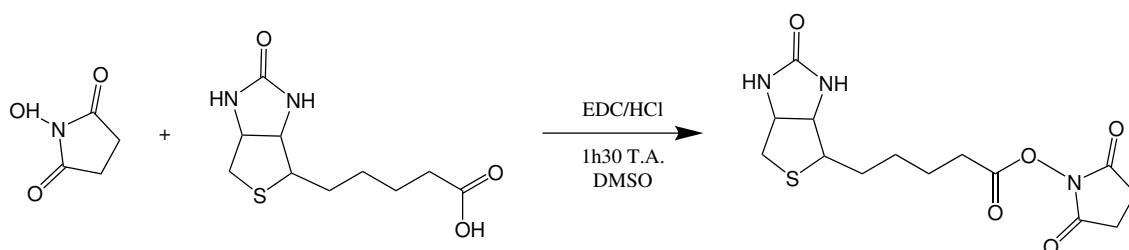


FIGURE 35 – Schéma de la synthèse de biotine-NHS.

La biotine réagit ensuite sur les QD-NHS par réaction peptidique, Figure 36. Le protocole est décrit ci-dessous.

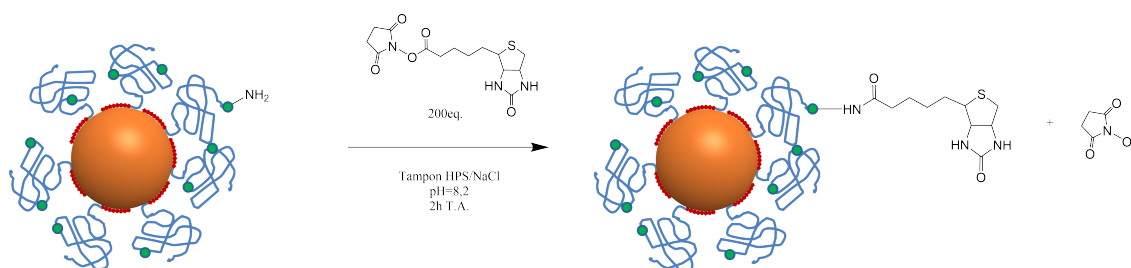


FIGURE 36 – Schéma de la synthèse de QD biotine.

Protocole synthèse de QD-biotine

Les QD-biotine sont préparés à partir de QD recouverts d'un polymère P(SPP/APMA-bVIM), c'est-à-dire un polymère polysulfobetaine - méthacrylamide, avec des monomères APMA (1/7), et un bloc vinylimidazole pour l'accroche. le bloc APMA permet l'accroche d'une biotine par NHS.

Synthèse de la biotine NHS :

Le NHS est ajouté par réaction peptidique sur l'acide carboxylique de la biotine. De la biotine (Sigma) (40 μ mol, 9,6mg) est mélangée avec de l'EDC/HCl (60 μ mol, 11,5mg) et du NHS (60 μ mol, 7mg) dans du DMSO anhydre. La réaction dure 1h30 à température ambiante. La biotine-NHS ainsi obtenue est aliquotée et conservée à -20°C sans purification.

Cette biotine-NHS est utilisée pour faire des QD-biotine en faisant réagir des QD-NH₂ (1 nmol, 24 μ L à 42 μ M) avec 200équivalents de la biotine NHS (2,5 μ L à 80 mM) auxquels sont ajoutés 10 μ L de tampon HPS/NaCl 0,5/0,15 M à pH=8,2. Après 2heures de réaction les QD sont lavés par ultrafiltration. Les amines résiduelles réagissent avec un excès de bisNHS comme décrit dans la partie 2.4.1.

Reconnaissance QD-biotine - streptavidine

Pour vérifier l'efficacité du lien biotine - streptavidine, les QD-biotine sont incubés avec des billes d'agarose recouvertes de streptavidine ou de biotine (Sigma-Aldrich), pour faire un contrôle.

Après incubation pendant 10 min, les billes sont lavées par centrifugation. Sur la Figure 37, les tubes Eppendorf en haut sont les billes après incubation et trois lavages. Les tubes en bas sont le surnageant du premier lavage. La première colonne est l'incubation

des billes streptavidine avec des QD-biotine. La seconde, l'incubation de billes biotine avec des QD-biotine, et la troisième, les QD-NH₂ (avant réaction avec la biotine) incubées avec des billes streptavidine. On observe que dans le cas de l'incubation des QD-biotine avec des billes streptavidine tous les QD sont restés sur les billes, sans QD dans le surnageant, alors que dans les autres conditions les QD restent dans le surnageant. Les QD-biotine s'accrochent donc de manière efficace à des protéines streptavidine.

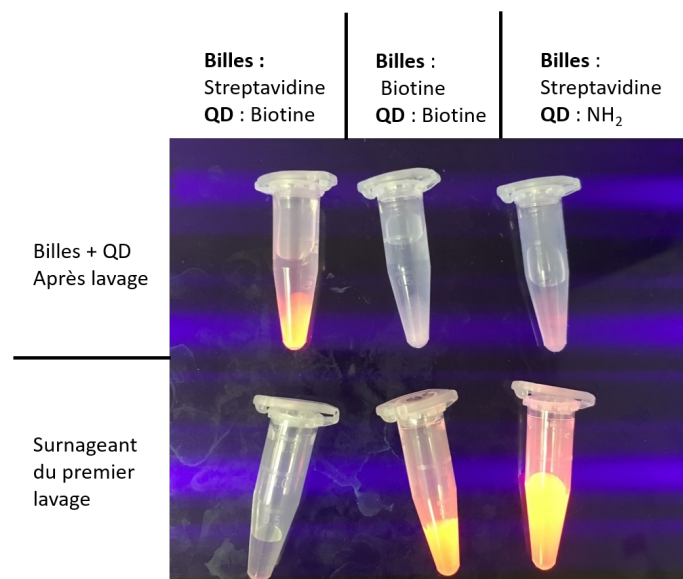


FIGURE 37 – Étude de l'efficacité de la reconnaissance des QD-biotine par la streptavidine, avec des billes d'agarose. Les tubes sont placés sur une table UV qui révèle la présence de QD. En haut : à gauche billes streptavidine + QD-biotine. Au milieu : billes biotine + QD-biotine. À droite : billes streptavidine + QD-NH₂. En bas, le premier surnageant issu du lavage des billes du tube supérieur.

Bioconjugaison QD-biotine et protéine dCas9

L'étape suivante est de vérifier l'accroche des QD-biotine sur la protéine dCas9-mSA2 après incubation *in vitro*. Cette étude a été réalisée dans le laboratoire Dynamique Spatio-temporelle des Fonctions Génomiques avec Julia Ronsch. Les QD-biotine et la dCas9 sont incubés à différents ratios QD/dCas9, et l'efficacité du couplage est étudiée en observant la migration sur gel de l'échantillon.

Le gel utilisé est un gel de polyacrylamide en conditions natives, c'est à dire non dénaturantes, donc les protéines gardent leur conformation, ce qui permet à la streptavidine de rester liée à la biotine. Un courant continu est appliqué à chaque extrémité du gel, qui provoque la migration de l'échantillon chargé dans le gel. La vitesse de migration dépend de la charge et la taille des objets. Le gel est tamponné à pH neutre avec du tampon bis-Tris. Les QD sont chargés légèrement négativement : leur potentiel zêta est de -10mV [87], ce qui leur permet de migrer dans le gel vers l'anode. La dCas9 a un point isoélectrique de 9, elle est donc chargée positivement à pH neutre. Pour qu'elle puisse migrer

dans le gel du bleu de Coomassie G-250 est ajouté à l'échantillon. Cette molécule se lie aux protéines sans les dénaturer et leur donne une charge négative. Une dCas9 liée à un QD est beaucoup plus grosse qu'une dCas9 seule, elle migrera donc plus lentement dans le gel.

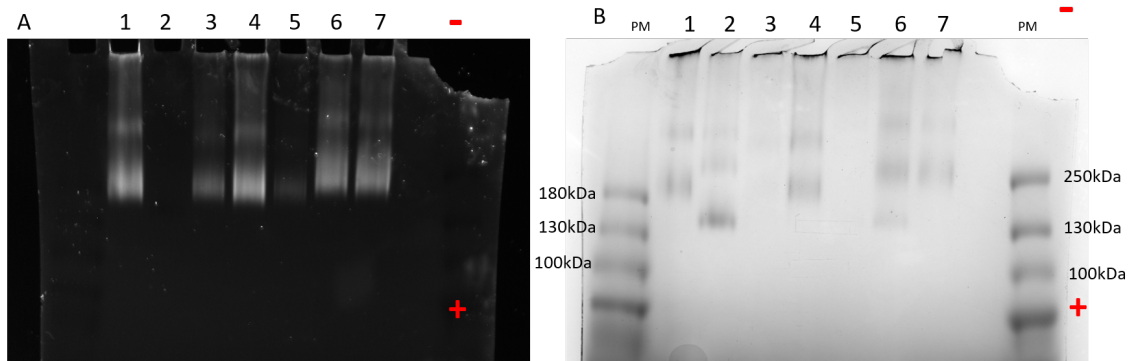


FIGURE 38 – gel d'électrophorèse. A : l'image de fluorescence, les QD sont visibles. B le gel est teint par du bleu de Coomassie, les protéines sont visibles. Les premières et dernières colonnes, visibles uniquement sur la figure B et marquées PM, sont des marqueurs de poids moléculaire.

	1	2	3	4	5	6	7
	QD-biotine	dCas9	dCas9 +QD-biotine	dCas9 +QD-biotine	dCas9 +QD-biotine	dCas9 +QD-SPE	QD-SPE
dCas9 :QD ratio			1 : 1	1 : 2	1 : 0,5	1 : 1	
dCas9-mSA2	0	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	0
QD	5 μ M	0	5 μ M	10 μ M	2,5 μ M	5 μ M	5 μ M

TABLE 1 – Description du contenu des puits du gel de la Figure 38.

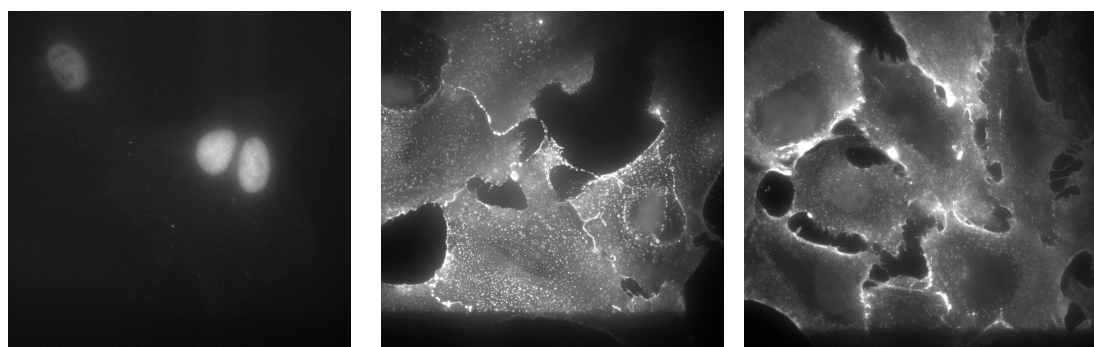
La Figure 38B est une image du gel teint avec du bleu de Coomassie, qui marque les protéines, et semble aussi marquer les QD. Les colonnes tout à droite et tout à gauche sont des marqueurs de poids moléculaire. Le puits 2 contient la dCas9 seule. La bande qui a le plus migré correspond à un poids moléculaire de 160 kDa, ce qui correspond au poids moléculaire attendu. D'autres bandes sont visibles à des poids moléculaires plus élevés, ce qui signifie que la dCas9 forme des agrégats. La Figure 38A est le même gel observé en fluorescence : seul les QD sont visibles. Le puits 1 contient uniquement des QD-biotine, et le puits 7 uniquement des QD-SPE, non fonctionnalisés avec de la biotine. Ils migrent dans le gel à cause de leur potentiel zêta négatif. Les puits 3, 4 et 5 contiennent des QD-biotine qui ont été incubés avec différents ratios de dCas9. Les puits 1 et 3 ont été chargés avec la même quantité de QD. Les QD visibles dans le gel ont migré autant que les QD sans dCas9, ce qui signifie que ces QD n'ont pas interagi avec la dCas9. Mais la tache est moins

intense, ce qui suggère que moins de QD ont migré. Il est possible que le complexe QD - dCas9 n'entrent pas dans le gel, peut être parce que le complexe est trop gros, cette diminution d'intensité serait due à une interaction QD / dCas9. Un contrôle a été fait en incubant des QD-SPE, c'est-à-dire sans biotine, avec la dCas9. Ces QD (puits 6) ont la même migration, et à la même intensité, que les QD-SPE sans dCas9, donc il n'y a pas d'interaction entre ces QD et la dCas9. L'interaction entre dCas9 et QD-biotine semble donc spécifique. Les QD semblent donc convenir pour des marquages de locus génomiques.

Protocole réaction QD-Cas9 et gel d'électrophorèse

Les QD sont incubés avec de la dCas9 à 5 μM dans 20 μL de volume total, avec du tampon KCl à 300 mM, pendant 20 min à 24°C. Il y a sept échantillons différents décrits dans le tableau 1. Le gel de polyacrylamide utilisé est un gel NativePage 4-16% Bis- Tris (Lifes technologies). 7,5 μL de la solution sont mélangés avec 2,5 μL de NativePAGE Sample Buffer, 1 μL NativePAGE 5% G-250 Sample Additive et sont chargés sur le gel. La migration du gel se fait à 150 V avec un générateur BioRad.

Injection des QD-dCas9 dans le noyau des cellules vivantes



(a) QD-biotine 1 μM comme contrôle (b) QD-biotine-dCas9-mSA2 1 μM (1 :1) (c) QD-SPE + dCas9-mSA2 1 μM (1 :1)

FIGURE 39 – Images prises au microscope de fluorescence sur le canal des QD après injection des QD dans les noyaux de cellules vivantes.

Sur la Figure 39a, des QD-biotine sans dCas9 sont injectés dans trois noyaux de cellules. Ils se répartissent uniformément dans le noyau sans former d'agrégats. Sur la Figure 39b, des QD-biotine incubés avec de la dCas9 sont injectés dans les noyaux de cellules. Les QD forment ici des agrégats partout dans le cytoplasme des cellules et sur la membrane des cellules. Sur la Figure 39c, des QD-SPE incubés avec la dCas9 sont injectés. Le même type d'agrégats dans le cytoplasme est observé, ce qui est étonnant, car sur le gel d'électrophorèse ils ne semblaient pas interagir avec la dCas9. Il semble que la dCas9 forme des agrégats, comme vu *in vitro*. La protéine a peut-être eu des problèmes de stockage, ou cette version n'est peut-être pas très stable. Ainsi, ces QD-biotine-dCas9-mSA2 ne conviennent pas pour cibler un locus génomique.

Les protéines purifiées sont difficiles à manipuler et peuvent se dégrader vite. Une piste en cours d'étude dans le laboratoire d'Antoine Coulon serait de modifier une lignée

cellulaire avec un plasmide pour qu'elle exprime une dCas9- α GFP, afin que la cellule produise sa propre dCas9. Il serait alors possible de cibler un autre locus génomique que celui de la séquence *tetO*.

Bibliographie

- [1] Kazuhiro MAESHIMA, Shiori IIDA et Sachiko TAMURA. « Physical nature of chromatin in the nucleus ». In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 13.5 (2021), a040675. DOI : 10.1101/cshperspect.a040675.
- [2] Alberts et AL. *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*. Garland, 2002.
- [3] Faculty in the SCHOOL OF BIOLOGICAL SCIENCES AT GEORGIA TECH. *Chromatin*. 2013. URL : <https://bioprinciples.biosci.gatech.edu/module-4-genes-and-genomes/4-1-cell-division-mitosis-and-meiosis/> (visité le 20/07/2022).
- [4] Nature EDUCATION. *Chromatin condensation changes during the cell cycle*. 2013. URL : <https://www.nature.com/scitable/topicpage/chromosomes-14121320/> (visité le 20/07/2022).
- [5] Tom MISTELI. « The self-organizing genome : principles of genome architecture and function ». In : *Cell* 183.1 (2020), p. 28-45. DOI : 10.1016/j.cell.2020.09.014.
- [6] Geoffrey FUDENBERG et al. « Formation of chromosomal domains by loop extrusion ». In : *Cell reports* 15.9 (2016), p. 2038-2049. DOI : 10.1016/j.celrep.2016.04.085.
- [7] Elie DOLGIN. « A loop of faith ». In : *Nature* 544.7650 (2017), p. 284-286. DOI : 10.1038/544284a.
- [8] Michael R SPEICHER et Nigel P CARTER. « The new cytogenetics : blurring the boundaries with molecular biology ». In : *Nature reviews genetics* 6.10 (2005), p. 782-792. DOI : 10.1038/nrg1692.
- [9] Andreas BOLZER et al. « Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes ». In : *PLoS biology* 3.5 (2005), e157. DOI : 10.1371/journal.pbio.0030157.
- [10] Steven L SALZBERG. « Open questions : How many genes do we have ? » In : *BMC biology* 16.1 (2018), p. 1-3. DOI : 10.1186/s12915-018-0564-x.
- [11] Andrew J BANNISTER et Tony KOUZARIDES. « Regulation of chromatin by histone modifications ». In : *Cell research* 21.3 (2011), p. 381-395. DOI : 10.1038/cr.2011.22.

- [12] Arie S. MOBLEY. « Chapter 4 - Induced Pluripotent Stem Cells ». In : *Neural Stem Cells and Adult Neurogenesis*. Sous la dir. d'Arie S. MOBLEY. Academic Press, 2019, p. 67-94. DOI : 10.1016/B978-0-12-811014-0.00004-4.
- [13] Vladimir B TEIF et Karsten RIPPE. « Predicting nucleosome positions on the DNA : combining intrinsic sequence preferences and remodeler activities ». In : *Nucleic acids research* 37.17 (2009), p. 5641-5655. DOI : 10.1093/nar/gkp610.
- [14] Len A PENNACCHIO et al. « Enhancers : five essential questions ». In : *Nature Reviews Genetics* 14.4 (2013), p. 288-295. DOI : 10.1038/nrg3458.
- [15] Maciej KERLIN. « Gene coregulation in cis within the 3D genome – A single-molecule imaging study ». Thèse de doct. Sorbonne Université, 2021.
- [16] Jessica ZUIN et al. « Nonlinear control of transcription through enhancer–promoter interactions ». In : *Nature* 604.7906 (2022), p. 571-577. DOI : 10.1038/s41586-022-04570-y.
- [17] Li LIU et al. « A computational framework for identifying the transcription factors involved in enhancer-promoter loop formation ». In : *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 23 (2021), p. 347-354. DOI : 10.1016/j.omtn.2020.11.011.
- [18] Leonid MIRNY et Job DEKKER. « Mechanisms of chromosome folding and nuclear organization : their interplay and open questions ». In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 14.7 (2022), a040147. DOI : 10.1101/cshperspect.a040147.
- [19] Job DEKKER et al. « The 4D nucleome project ». In : *Nature* 549.7671 (2017), p. 219-226. DOI : 10.1038/nature23884.
- [20] Medcell YALE. *Euchromatin and heterochromatin*. URL : http://medcell.med.yale.edu/histology/cell_lab/images/euchromatin_and_heterochromatin.jpg (visité le 01/10/2022).
- [21] Wendy A BICKMORE. « The spatial organization of the human genome ». In : *Annual review of genomics and human genetics* 14 (2013), p. 67-84. DOI : 10.1146/annurev-genom-091212-153515.
- [22] Darío G LUPIÁÑEZ et al. « Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions ». In : *Cell* 161.5 (2015), p. 1012-1025. DOI : 10.1016/j.cell.2015.04.004.
- [23] Iain WILLIAMSON et al. « Developmentally regulated Shh expression is robust to TAD perturbations ». In : *Development* 146.19 (2019), dev179523. DOI : 10.1242/dev.179523.
- [24] Karsten RIPPE. « Liquid–liquid phase separation in chromatin ». In : *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 14.2 (2022), a040683. DOI : 10.1101/cshperspect.a040683.

-
- [25] Kris Noel DAHL et al. « Power-law rheology of isolated nuclei with deformation mapping of nuclear substructures ». In : *Biophysical journal* 89.4 (2005), p. 2855-2864. DOI : 10.1529/biophysj.105.062554.
- [26] Arash TAJIK et al. « Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin ». In : *Nature materials* 15.12 (2016), p. 1287-1296. DOI : 10.1038/nmat4729.
- [27] Chad M HOBSON et al. « Correlating nuclear morphology and external force with combined atomic force microscopy and light sheet imaging separates roles of chromatin and lamin A/C in nuclear mechanics ». In : *Molecular biology of the cell* 31.16 (2020), p. 1788-1801. DOI : 10.1091/mbc.E20-01-0073.
- [28] Yuta SHIMAMOTO et al. « Nucleosome–nucleosome interactions via histone tails and linker DNA regulate nuclear rigidity ». In : *Molecular biology of the cell* 28.11 (2017), p. 1580-1589. DOI : 10.1091/mbc.e16-11-0783.
- [29] Andrew D STEPHENS et al. « Chromatin and lamin A determine two different mechanical response regimes of the cell nucleus ». In : *Molecular biology of the cell* 28.14 (2017), p. 1984-1996. DOI : 10.1091/mbc.e16-09-0653.
- [30] Feroz M HAMEED, Madan RAO et GV SHIVASHANKAR. « Dynamics of passive and active particles in the cell nucleus ». In : (2012). DOI : 10.1371/journal.pone.0045843.
- [31] Anthony HB DE VRIES et al. « Direct observation of nanomechanical properties of chromatin in living cells ». In : *Nano letters* 7.5 (2007), p. 1424-1427. DOI : 10.1021/nl1070603+.
- [32] Mahipal GANJI et al. « Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin ». In : *Science* 360.6384 (2018), p. 102-105. DOI : 10.1126/science.aar7831.
- [33] Stéphane MORNET. « Synthèse et Modification Chimique de la Surface de Nanoparticules de Maghémite à des Fins D'applications Biomédicales ». Thèse de doct. Université Sciences et Technologies-Bordeaux I, 2002.
- [34] Aurélie WALTER. « Élaboration de nano-objets magnétiques dendronisés à vocation théranostic ». Thèse de doct. Université de Strasbourg, 2014.
- [35] Unyong JEONG et al. « Superparamagnetic colloids : controlled synthesis and niche applications ». In : *Advanced Materials* 19.1 (2007), p. 33-60. DOI : 10.1002/adma.200600674.
- [36] R EPHERRE et al. « 4.39 Hybrid Magnetic Nanoparticles for Targeted Delivery ». In : (2017). DOI : 10.1016/B978-0-08-100691-7.00236-6.
- [37] Kai WU et al. « Magnetic nanoparticles in nanomedicine : A review of recent advances ». In : *Nanotechnology* 30.50 (2019), p. 502003. DOI : 10.1088/1361-6528/ab4241.

- [38] SF HASANY et al. « Systematic review of the preparation techniques of iron oxide magnetic nanoparticles ». In : *Nanosci. Nanotechnol* 2.6 (2012), p. 148-158. DOI : 10.5923/j.nn.20120206.01.
- [39] Rene MASSART. « Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media ». In : *IEEE transactions on magnetics* 17.2 (1981), p. 1247-1248. DOI : 10.1109/TMAG.1981.1061188.
- [40] Gauvin HEMERY. « Synthesis of magnetic and thermosensitive iron oxide based nanoparticles for biomedical applications ». Thèse de doct. Université de Bordeaux, 2017.
- [41] Victor K LAMER et Robert H DINEGAR. « Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols ». In : *Journal of the american chemical society* 72.11 (1950), p. 4847-4854. DOI : 10.1021/ja01167a001.
- [42] EVA IZQUIERDO. « Synthèse et caractérisation d'homosstructures et d'hétérostructures de nanoplaquettes de chalcogénures de mercure ». Thèse de doct. Université Paris sciences et lettres, 2018.
- [43] Geoffrey COTIN. « Nouvelles stratégies vers la synthèse de nanoparticules magnétiques multifonctionnelles innovantes combinant imagerie par IRM et/ou thérapie par hyperthermie magnétique ». Thèse de doct. Université de Strasbourg, 2017.
- [44] Alejandro G ROCA et al. « Design strategies for shape-controlled magnetic iron oxide nanoparticles ». In : *Advanced drug delivery reviews* 138 (2019), p. 68-104. DOI : 10.3390/ijms21072455.
- [45] Seyed Mohammadali DADFAR et al. « Iron oxide nanoparticles : Diagnostic, therapeutic and theranostic applications ». In : *Advanced drug delivery reviews* 138 (2019), p. 302-325. DOI : 10.1016/j.addr.2019.01.005.
- [46] « Guerbet retire sa demande d'AMM européenne du Sinerem ». In : *Les Echos* (2007).
- [47] Irene RUBIA-RODRÍGUEZ et al. « Whither magnetic hyperthermia? A tentative roadmap ». In : *Materials* 14.4 (2021), p. 706. DOI : 10.3390/ma14040706.
- [48] Irene FERNÁNDEZ-BARAHONA et al. « Iron oxide nanoparticles : An alternative for positive contrast in magnetic resonance imaging ». In : *Inorganics* 8.4 (2020), p. 28. DOI : doi.org/10.3390/inorganics8040028.
- [49] Klaus MAIER-HAUFF et al. « Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme ». In : *Journal of neuro-oncology* 103.2 (2011), p. 317-324. DOI : 10.1007/s11060-010-0389-0.
- [50] Cornelia MONZEL et al. « Magnetic control of cellular processes using biofunctional nanoparticles ». In : *Chemical science* 8.11 (2017), p. 7330-7338. DOI : 10.1039/c7sc01462g.

-
- [51] Daeha SEO et al. « A mechanogenetic toolkit for interrogating cell signaling in space and time ». In : *Cell* 165.6 (2016), p. 1507-1518. DOI : 10.1016/j.cell.2016.04.045.
- [52] Fred ETOC et al. « Magnetogenetic control of protein gradients inside living cells with high spatial and temporal resolution ». In : *Nano letters* 15.5 (2015), p. 3487-3494. DOI : 10.1021/acs.nanolett.5b00851.
- [53] Domenik LISSE et al. « Engineered ferritin for magnetogenetic manipulation of proteins and organelles inside living cells ». In : *Advanced Materials* 29.42 (2017), p. 1700189. DOI : 10.1002/adma.201700189.
- [54] Veer I. P. KEIZER et al. « Live-cell micromanipulation of a genomic locus reveals interphase chromatin mechanics ». In : *Science* 377.6605 (2022), p. 489-495. DOI : 10.1126/science.abi9810.
- [55] F ETOC et al. « Subcellular control of Rac-GTPase signalling by magnetogenetic manipulation inside living cells ». In : *Nature nanotechnology* 8.3 (2013), p. 193-198. DOI : 10.1038/nnano.2013.23.
- [56] Elie BALLOUL. « Magnetic manipulation of intracellular signals ». Thèse de doct. Université Paris Cité, 2019.
- [57] Fanny DELILLE et al. « Designing the Surface Chemistry of Inorganic Nanocrystals for Cancer Imaging and Therapy ». In : *Cancers* 14.10 (2022), p. 2456. DOI : 10.3390/cancers14102456.
- [58] Martin LUNDQVIST et Tommy CEDERVALL. « Three decades of research about the corona around nanoparticles : lessons learned and where to go now ». In : *Small* 16.46 (2020), p. 2000892. DOI : 10.1002/smll.202000892.
- [59] Stacey L HIRSH et al. « The Vroman effect : competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates ». In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 103 (2013), p. 395-404. DOI : 10.1016/j.colsurfb.2012.10.039.
- [60] Carolina CARRILLO-CARRION, Monica CARRIL et Wolfgang J PARAK. « Techniques for the experimental investigation of the protein corona ». In : *Current Opinion in Biotechnology* 46 (2017), p. 106-113. DOI : 10.1016/j.copbio.2017.02.009.
- [61] Albert P PHILIPSE, Michel PB VAN BRUGGEN et Chellapah PATHMAMANO HARAN. « Magnetic silica dispersions : preparation and stability of surface-modified silica particles with a magnetic core ». In : *Langmuir* 10.1 (1994), p. 92-99. DOI : 10.1021/1a00013a014.
- [62] Benoit DUBERTRET et al. « In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles ». In : *Science* 298.5599 (2002), p. 1759-1762. DOI : 10.1126/science.1077194.

- [63] G COTIN et al. « Iron oxide nanoparticles for biomedical applications : Synthesis, functionalization, and application ». In : *Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications*. Elsevier, 2018, p. 43-88. DOI : 10.1016/B978-0-08-101925-2.00002-4.
- [64] Randy DE PALMA et al. « Silane ligand exchange to make hydrophobic superparamagnetic nanoparticles water-dispersible ». In : *Chemistry of Materials* 19.7 (2007), p. 1821-1831. DOI : doi/10.1021/cm0628000.
- [65] Kostiantyn TURCHENIUK et al. « Recent advances in surface chemistry strategies for the fabrication of functional iron oxide based magnetic nanoparticles ». In : *Nanoscale* 5.22 (2013), p. 10729-10752. DOI : 10.1039/c3nr04131.
- [66] Esther AMSTAD et al. « Influence of electronegative substituents on the binding affinity of catechol-derived anchors to Fe₃O₄ nanoparticles ». In : *The Journal of Physical Chemistry C* 115.3 (2011), p. 683-691. DOI : 10.1021/jp1109306.
- [67] TJ DAOU et al. « Water soluble dendronized iron oxide nanoparticles ». In : *Dalton Transactions* 23 (2009), p. 4442-4449. DOI : 10.1039/B823187G.
- [68] Brice BASLY et al. « Dendronized iron oxide nanoparticles as contrast agents for MRI ». In : *Chemical Communications* 46.6 (2010), p. 985-987. DOI : 10.1039/B920348F.
- [69] Yoann LALATONNE et al. « Bis-phosphonates-ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles : a platform towards diagnosis and therapy ». In : *Chemical Communications* 22 (2008), p. 2553-2555. DOI : 10.1039/b801911h.
- [70] Lydia SANDIFORD et al. « Bisphosphonate-anchored PEGylation and radiolabeling of superparamagnetic iron oxide : long-circulating nanoparticles for in vivo multimodal (T1 MRI-SPECT) imaging ». In : *Acs Nano* 7.1 (2013), p. 500-512. DOI : 10.1021/nn3046055.
- [71] Aurélie WALTER et al. « Modulation of relaxivity, suspension stability, and biodistribution of dendronized iron oxide nanoparticles as a function of the organic shell design ». In : *Particle & Particle Systems Characterization* 32.5 (2015), p. 552-560. DOI : 10.1002/ppsc.201400217.
- [72] Brice BASLY et al. « Effect of the nanoparticle synthesis method on dendronized iron oxides as MRI contrast agents ». In : *Dalton transactions* 42.6 (2013), p. 2146-2157. DOI : 10.1039/c2dt31788e.
- [73] Hyon Bin NA et al. « Multidentate catechol-based polyethylene glycol oligomers provide enhanced stability and biocompatibility to iron oxide nanoparticles ». In : *ACS nano* 6.1 (2012), p. 389-399. DOI : 10.1021/nn203735b.

-
- [74] Victor BALDIM et al. « Monophosphonic versus multiphosphonic acid based PEGylated polymers for functionalization and stabilization of metal (Ce, Fe, Ti, Al) oxide nanoparticles in biological media ». In : *Advanced Materials Interfaces* 6.7 (2019), p. 1801814. DOI : 10.1002/admi.201801814.
- [75] John H DUNLAP et al. « Multiply-binding polymeric imidazole ligands : Influence of molecular weight and monomer sequence on colloidal quantum dot stability ». In : *The Journal of Physical Chemistry C* 122.46 (2018), p. 26756-26763. DOI : 10.1021/acs.jpcc.8b08984.
- [76] Carlos TASSA, Stanley Y SHAW et Ralph WEISSLEDER. « Dextran-coated iron oxide nanoparticles : a versatile platform for targeted molecular imaging, molecular diagnostics, and therapy ». In : *Accounts of chemical research* 44.10 (2011), p. 842-852. DOI : 10.1021/ar200084x.
- [77] Lamiaa MA ALI et al. « Polymer-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as T2 contrast agent for MRI and their uptake in liver ». In : *Future Science OA* 0 (2019), FSO235. DOI : 10.4155/fsoa-2017-0054.
- [78] Melissa D HOWARD et al. « PEGylation of nanocarrier drug delivery systems : state of the art ». In : *Journal of Biomedical Nanotechnology* 4.2 (2008), p. 133-148. DOI : 10.1166/jbn.2008.021.
- [79] Radwa H. ABOU-SALEH et al. « Poly(ethylene glycol) lipid-shelled microbubbles : abundance, stability, and mechanical properties. » In : *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 30 19 (2014), p. 5557-63. DOI : 10.1021/la404804u.
- [80] Manon DEBAYLE. « Chimie de surface de nanocristaux fluorescents pour l'imagerie biologique ». Thèse de doct. Sorbonne Université, 2019.
- [81] Amir ERFANI et al. « Interactions between biomolecules and zwitterionic moieties : a review ». In : *Biomacromolecules* 21.7 (2020), p. 2557-2573. DOI : 10.1021/acs.biomac.0c00497.
- [82] Hana VAISOCHEROVÁ et al. « Functionalizable surface platform with reduced nonspecific protein adsorption from full blood plasma—Material selection and protein immobilization optimization ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 24.7 (2009), p. 1924-1930. DOI : 10.1016/j.bios.2008.09.035.
- [83] Karina Pombo GARCÍA et al. « Zwitterionic-coated “stealth” nanoparticles for biomedical applications : recent advances in countering biomolecular corona formation and uptake by the mononuclear phagocyte system ». In : *Small* 10.13 (2014), p. 2516-2529. DOI : 10.1002/smll.201303540.
- [84] Sumaira ASHRAF et al. « Zwitterionic surface coating of quantum dots reduces protein adsorption and cellular uptake ». In : *Nanoscale* 8.41 (2016), p. 17794-17800. DOI : 10.1039/c6nr05805a.

- [85] Wei YANG et al. « Functionalizable and ultra stable nanoparticles coated with zwitterionic poly (carboxybetaine) in undiluted blood serum ». In : *Biomaterials* 30.29 (2009), p. 5617-5621. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2009.06.036.
- [86] He WEI et al. « Exceedingly small iron oxide nanoparticles as positive MRI contrast agents ». In : *Proceedings of the national academy of sciences* 114.9 (2017), p. 2325-2330. DOI : 10.1073/pnas.1620145114.
- [87] Manon DEBAYLE et al. « Zwitterionic polymer ligands : an ideal surface coating to totally suppress protein-nanoparticle corona formation? » In : *Biomaterials* 219.July (2019), p. 119357. ISSN : 01429612. DOI : 10.1016/j.biomaterials.2019.119357.
- [88] Meng SUN et al. « The application of inorganic nanoparticles in molecular targeted cancer therapy : EGFR targeting ». In : *Frontiers in Pharmacology* 12 (2021). DOI : 10.3389/fphar.2021.702445.
- [89] Joshua E ROSEN et al. « Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics ». In : *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine* 8.3 (2012), p. 275-290. DOI : 10.1016/j.nano.2011.08.017.
- [90] Mariana TASSO et al. « Sulfobetaine-Vinylimidazole Block Copolymers : A Robust Quantum Dot Surface Chemistry Expanding Bioimaging's Horizons ». In : *ACS Nano* 9.11 (2015), p. 11479-11489. ISSN : 1936086X. DOI : 10.1021/acsnano.5b05705.
- [91] Jongnam PARK et al. « Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals ». In : *Nature Materials* 3.12 (2004), p. 891-895. ISSN : 14761122. DOI : 10.1038/nmat1251.
- [92] Walid BAAZIZ et al. « Effect of reaction environment and in situ formation of the precursor on the composition and shape of iron oxide nanoparticles synthesized by the thermal decomposition method ». In : *CrystEngComm* 20.44 (2018), p. 7206-7220. DOI : 10.1039/C8CE00875B.
- [93] Shouheng SUN et al. « Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles ». In : *Journal of the American Chemical Society* 126.1 (2004), p. 273-279. ISSN : 00027863. DOI : 10.1021/ja0380852.
- [94] Shouheng SUN et Hao ZENG. « Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles ». In : *Journal of the American Chemical Society* 124.28 (2002), p. 8204-8205. ISSN : 00027863. DOI : 10.1021/ja026501x.
- [95] Zhongping CHEN. « Size and shape controllable synthesis of monodisperse iron oxide nanoparticles by thermal decomposition of iron oleate complex ». In : *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry* 42.7 (2012), p. 1040-1046. DOI : 0.1080/15533174.2012.680126.

-
- [96] Ryan HUFSCHEID et al. « Synthesis of phase-pure and monodisperse iron oxide nanoparticles by thermal decomposition ». In : *Nanoscale* 7.25 (2015), p. 11142-11154. DOI : 10.1039/C5NR01651G.
- [97] Gorka SALAS et al. « Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications ». In : *Journal of Materials Chemistry* 22.39 (2012), p. 21065-21075. DOI : 10.1039/C2JM34402E.
- [98] Lyudmila M BRONSTEIN et al. « Influence of iron oleate complex structure on iron oxide nanoparticle formation ». In : *Chemistry of materials* 19.15 (2007), p. 3624-3632. DOI : 10.1021/cm062948j.
- [99] Geoffrey COTIN et al. « Harnessing Composition of Iron Oxide Nanoparticle : Impact of Solvent-Mediated Ligand-Ligand Interaction and Competition between Oxidation and Growth Kinetics ». In : *Chemistry of Materials* 32.21 (2020), p. 9245-9259. DOI : 10.1021/acs.chemmater.0c03041.
- [100] Evert DHAENE et al. « The trouble with ODE : Polymerization during nanocrystal synthesis ». In : *Nano Letters* 19.10 (2019), p. 7411-7417. DOI : 10.1021/acs.nanolett.9b03088.
- [101] Walid BAAZIZ et al. « Magnetic iron oxide nanoparticles : reproducible tuning of the size and nanosized-dependent composition, defects, and spin canting ». In : *The Journal of Physical Chemistry C* 118.7 (2014), p. 3795-3810. DOI : 10.1021/jp411481p.
- [102] Jeremy WINSETT et al. « Quantitative determination of magnetite and maghemite in iron oxide nanoparticles using Mössbauer spectroscopy ». In : *SN Applied Sciences* 1.12 (2019), p. 1-8. DOI : 10.1007/s42452-019-1699-2.
- [103] G RAMNICEANU et al. « Delayed hepatic uptake of multi-phosphonic acid poly(ethylene glycol) coated iron oxide measured by real-time magnetic resonance imaging ». In : *Rsc Advances* 6.68 (2016), p. 63788-63800. DOI : 10.1039/C6RA09896G.
- [104] TJ DAOU et al. « Phosphate adsorption properties of magnetite-based nanoparticles ». In : *Chemistry of Materials* 19.18 (2007), p. 4494-4505. DOI : 10.1021/cm071046v.
- [105] Mariana TASSO et al. « Oriented Bioconjugation of Unmodified Antibodies to Quantum Dots Capped with Copolymeric Ligands as Versatile Cellular Imaging Tools ». In : *ACS Applied Materials and Interfaces* 7.48 (2015), p. 26904-26913. ISSN : 19448252. DOI : 10.1021/acsami.5b09777.
- [106] Isabelle CHADUC. « Synthèse d'agents RAFT macromoléculaires hydrophiles à base d'acide (méth)acrylique ou d'alginate pour l'élaboration de nanoparticules par polymérisation en émulsion ». Thèse de doct. Université Claude Bernard Lyon 1, 2013.

- [107] John CHIEFARI et al. « Living free-radical polymerization by reversible addition - Fragmentation chain transfer : The RAFT process ». English. In : *Macromolecules* 31.16 (août 1998), p. 5559-5562. ISSN : 0024-9297. DOI : 10.1021/ma9804951.
- [108] Graeme MOAD, Ezio RIZZARDO et San H THANG. « Living radical polymerization by the RAFT process ». In : *Australian journal of chemistry* 58.6 (2005), p. 379-410. DOI : 10.1071/CH09311.
- [109] Angang DONG et al. « A Generalized Ligand-Exchange Strategy Enabling Sequential Surface Functionalization of Colloidal Nanocrystals ». In : *Journal of the American Chemical Society* 133.4 (2011), p. 998-1006. ISSN : 0002-7863. DOI : 10.1021/ja108948z.
- [110] Charles TANFORD et John G BUZZELL. « The viscosity of aqueous solutions of bovine serum albumin between pH 4.3 and 10.5. » In : *The Journal of Physical Chemistry* 60.2 (1956), p. 225-231. DOI : 10.1021/j150536a020.
- [111] Ursula WINDBERGER et al. « Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species : reference values and comparison of data ». In : *Experimental physiology* 88.3 (2003), p. 431-440. DOI : 10.1113/eph8802496Freearticle.
- [112] Fred ETOC et al. « Non-specific interactions govern cytosolic diffusion of nanosized objects in mammalian cells ». In : *Nature materials* 17.8 (2018), p. 740-746. DOI : 10.1038/s41563-018-0120-7.
- [113] Karina KWAPISZEWSKA et al. « Nanoscale viscosity of cytoplasm is conserved in human cell lines ». In : *The Journal of Physical Chemistry Letters* 11.16 (2020), p. 6914-6920. DOI : doi.org/10.1021/acs.jpcllett.0c01748.
- [114] Anne RUNSER et al. « Zwitterionic stealth dye-loaded polymer nanoparticles for intracellular imaging ». In : *ACS applied materials & interfaces* 12.1 (2019), p. 117-125. DOI : doi.org/10.1021/acsami.9b15396..
- [115] Grzegorz BUBAK et al. « Quantifying nanoscale viscosity and structures of living cells nucleus from mobility measurements ». In : *The Journal of Physical Chemistry Letters* 12.1 (2020), p. 294-301. DOI : 10.1021/acs.jpcllett.0c03052.
- [116] Zijun WANG et al. « Zwitterionic Polymers toward the Development of Orientation-Sensitive Bioprobes ». In : *Langmuir* 38.34 (2022), p. 10512-10519. DOI : 10.1021/acs.langmuir.2c01286.
- [117] Dan S BOLINTINEANU et al. « Investigation of changes in tetracycline repressor binding upon mutations in the tetracycline operator ». In : *Journal of Chemical & Engineering Data* 59.10 (2014), p. 3167-3176. DOI : 10.1021/je500225x.
- [118] Peter ORTH et al. « Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system ». In : *Nature structural biology* 7.3 (2000), p. 215-219. DOI : 10.1038/73324.

-
- [119] Susan M JANICKI et al. « From silencing to gene expression : real-time analysis in single cells ». In : *Cell* 116.5 (2004), p. 683-698. DOI : 10.1016/s0092-8674(04)00171-0.
- [120] Michael D BEST. « Click chemistry and bioorthogonal reactions : unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules ». In : *Biochemistry* 48.28 (2009), p. 6571-6584. DOI : 10.1021/bi9007726.
- [121] Eric DULKEITH et al. « Fluorescence quenching of dye molecules near gold nanoparticles : radiative and nonradiative effects ». In : *Physical review letters* 89.20 (2002), p. 203002. DOI : 10.1103/PhysRevLett.89.203002.
- [122] Eue Soon JANG et al. « Fluorescent dye labeled iron oxide/silica core/shell nanoparticle as a multimodal imaging probe ». In : *Pharmaceutical research* 31.12 (2014), p. 3371-3378. DOI : 10.1007/s11095-014-1426-z.
- [123] Alex BIJAMOV et al. « Quantitative modeling of forces in electromagnetic tweezers ». In : *Journal of applied physics* 108.10 (2010), p. 104701. DOI : 10.1063/1.3510481.
- [124] Murat Kaya YAPICI et Jun ZOU. « Permalloy-coated tungsten probe for magnetic manipulation of micro droplets ». In : *Microsystem technologies* 14.6 (2008), p. 881-891. DOI : 10.1007/s00542-008-0623-2.
- [125] Nimish KHANNA et al. « Chromosome dynamics near the sol-gel phase transition dictate the timing of remote genomic interactions ». In : *Nature communications* 10.1 (2019), p. 1-13. DOI : 10.1038/s41467-019-10628-9.
- [126] Hilmar STRICKFADEN et al. « Condensed chromatin behaves like a solid on the mesoscale in vitro and in living cells ». In : *Cell* 183.7 (2020), p. 1772-1784. DOI : 10.1016/j.cell.2020.11.027.
- [127] Maud BONGAERTS et al. « Parallelized manipulation of adherent living cells by magnetic nanoparticles-mediated forces ». In : *International journal of molecular sciences* 21.18 (2020), p. 6560. DOI : 10.3390/ijms21186560.
- [128] Loïc TORAILLE et al. « Optical magnetometry of single biocompatible micromagnets for quantitative magnetogenetic and magnetomechanical assays ». In : *Nano Letters* 18.12 (2018), p. 7635-7641. DOI : 10.1021/acs.nanolett.8b03222.
- [129] Terence STRICK et al. « Twisting and stretching single DNA molecules ». In : *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 74.1 (2000). Single Molecule Biochemistry and Molecular Biology, p. 115-140. ISSN : 0079-6107. DOI : 10.1016/S0079-6107(00)00018-3.
- [130] John F MARKO et Simona COCCO. « The micromechanics of DNA ». In : *Physics World* 16.3 (mars 2003), p. 37-41. DOI : 10.1088/2058-7058/16/3/40.

- [131] John S CHOY et Tae-Hee LEE. « Structural dynamics of nucleosomes at single-molecule resolution ». In : *Trends in biochemical sciences* 37.10 (2012), p. 425-435. DOI : 10.1016/j.tibs.2012.06.006.
- [132] Woong Young SO et Kandice TANNER. « The material properties of chromatin in vivo ». In : *Science* 377.6605 (2022), p. 472-473. DOI : 10.1126/science.add5444.
- [133] Stefan WILHELM et al. « Analysis of nanoparticle delivery to tumours ». In : *Nature reviews materials* 1.5 (2016), p. 1-12. DOI : 10.1038/natrevmats.2016.14.
- [134] Kim M TSOI et al. « Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver ». In : *Nature materials* 15.11 (2016), p. 1212-1221. DOI : 10.1038/nmat4718.
- [135] Aldy ALIYANDI, Inge S ZUHORN et Anna SALVATI. « Disentangling Biomolecular Corona Interactions With Cell Receptors and Implications for Targeting of Nanomedicines ». In : *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8 (2020), p. 599454. DOI : 10.3389/fbioe.2020.599454.
- [136] Nathan D DONAHUE, Handan ACAR et Stefan WILHELM. « Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine ». In : *Advanced drug delivery reviews* 143 (2019), p. 68-96. DOI : 10.1016/j.addr.2019.04.008.
- [137] Wayne NGO et al. « Why nanoparticles prefer liver macrophage cell uptake in vivo ». In : *Advanced Drug Delivery Reviews* (2022), p. 114238. DOI : 10.1016/j.addr.2022.114238.
- [138] Anthony J TAVARES et al. « Effect of removing Kupffer cells on nanoparticle tumor delivery ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114.51 (2017), E10871-E10880. DOI : 10.1073/pnas.1713390114.
- [139] E HUSZTIK, Gy LÁZÁR et A PARDUCZ. « Electron microscopic study of Kupffer-cell phagocytosis blockade induced by gadolinium chloride. » In : *British journal of experimental pathology* 61.6 (1980), p. 624.
- [140] Parmeswaran DIAGARADJANE et al. « Gadolinium chloride augments tumor-specific imaging of targeted quantum dots in vivo ». In : *ACS nano* 4.7 (2010), p. 4131-4141. DOI : 10.1021/nn901919w.
- [141] Joy WOLFRAM et al. « A chloroquine-induced macrophage-preconditioning strategy for improved nanodelivery ». In : *Scientific reports* 7.1 (2017), p. 1-13. DOI : 10.1038/s41598-017-14221-2.
- [142] Dexi LIU, Atsuhide MORI et Leaf HUANG. « Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes ». In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1104.1 (1992), p. 95-101. DOI : 10.1016/0005-2736(92)90136-a.
- [143] Ben OUYANG et al. « The dose threshold for nanoparticle tumour delivery ». In : *Nature materials* 19.12 (2020), p. 1362-1371. DOI : 10.1038/s41563-020-0755-z.

-
- [144] Zih-An CHEN et al. « Critical features for mesoporous silica nanoparticles encapsulated into erythrocytes ». In : *ACS applied materials & interfaces* 11.5 (2019), p. 4790-4798. DOI : 10.1021/acsami.8b18434.
- [145] Che-Ming J HU et al. « Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.27 (2011), p. 10980-10985. DOI : 10.1073/pnas.110663410.
- [146] Pia L RODRIGUEZ et al. « Minimal " Self " peptides that inhibit phagocytic clearance and enhance delivery of nanoparticles ». In : *Science* 339.6122 (2013), p. 971-975. DOI : 10.1126/science.1229568.
- [147] Bowen LI et al. « Revealing the immunogenic risk of polymers ». In : *Angewandte Chemie International Edition* 57.42 (2018), p. 13873-13876. DOI : 10.1002/anie.201808615.
- [148] Peng ZHANG et al. « Zwitterionic gel encapsulation promotes protein stability, enhances pharmacokinetics, and reduces immunogenicity ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.39 (2015), p. 12046-12051. DOI : 10.1073/pnas.15124651.
- [149] Renguo XIE et al. « Synthesis and characterization of highly luminescent CdSe- core CdS/ZnO. 5CdO. 5S/ZnS multishell nanocrystals ». In : *Journal of the American Chemical Society* 127.20 (2005), p. 7480-7488. DOI : 10.1021/ja042939g.
- [150] URCACyt - Plateforme de cytométrie en FLUX. *Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux*. URL : <https://www.univ-reims.fr/cytometrie/urcacyt/urcacyt-plateforme-de-cytometrie-en-flux,17140,31442.html> (visité le 10/07/2022).
- [151] Jongwook KIM et al. « Monitoring the orientation of rare-earth-doped nanorods for flow shear tomography ». In : *Nature nanotechnology* 12.9 (2017), p. 914-919. DOI : 10.1038/nnano.2017.111.
- [152] Zijun WANG et al. « Monazite LaPO₄ : Eu³⁺ nanorods as strongly polarized nanoemitters ». In : *Nanoscale* 13.40 (2021), p. 16968-16976. DOI : 10.1039/D1NR04639J.

RÉSUMÉ

Dans le noyau des cellules, l'ADN est replié selon une architecture complexe multi échelle. Notre compréhension des principes physiques qui régissent cette organisation complexe n'est pas complète. Pour l'étudier, il serait utile de pouvoir appliquer directement une force sur les chromosomes *in vivo*. Dans cette thèse est présentée une nouvelle nanosonde magnétique qui peut s'accrocher à un locus génomique précis et y appliquer une force. Cette nanosonde est une nanoparticule d'oxyde de fer recouverte de ligands polymériques. Le premier défi est d'éviter les interactions non spécifiques entre les nanoparticules et des biomolécules dans l'environnement intranucléaire très encombré. Pour y parvenir, nous avons conçu un copolymère à bloc pour recouvrir les nanoparticules. Le premier bloc contient des zwitterions sulfobetaine qui sont très efficaces pour éliminer les interactions non spécifiques. Le second bloc contient plusieurs groupes phosphonates qui permettent l'accroche des polymères sur la surface de la nanoparticule. La stabilité de l'accroche sur le long terme et l'absence d'interactions entre des protéines et le revêtement polymérique choisi a été étudiée *in vitro* et dans des cellules vivantes. Le deuxième défi est de conjuguer des protéines spécifiques à la nanoparticule qui vont permettre de cibler les séquences d'ADN choisies. Nous avons optimisé la conception du polymère pour atteindre une conjugaison contrôlée et efficace des protéines de ciblage sur la surface des nanoparticules, par chimie click sans catalyseur cuivre. Les nanoparticules sont fonctionnalisées avec de la protéine fluorescente verte (GFP), qui se lie dans le noyau à un nanocorps anti-GFP, fusionné à une protéine qui se lie à une séquence d'ADN spécifique dans le modèle cellulaire utilisé. L'efficacité du ciblage des nanoparticules sur l'ADN a été étudiée après microinjection d'une solution de nanoparticules dans le noyau de cellules vivantes. Le ciblage est rapide, de l'ordre de plusieurs minutes, et spécifique, et les interactions non spécifiques sont évitées. Des milliers de nanoparticules se lient au locus génomique. Le locus a été manipulé avec une pointe magnétique qui produit un fort gradient de champ. Le locus est soumis à une force de l'ordre du piconewton qui peut déplacer le locus génomique sur plusieurs micromètres. Cet outil sera utile pour étudier la mécanique des chromosomes, et l'organisation et les fonctions du génome.

MOTS CLÉS

Nanoparticules d'oxyde de fer, Zwitterion, Ligands de surface polymériques, Bioconjugaison, Micromanipulation, Physique de la chromatine

ABSTRACT

In a cell nucleus, the genome is folded in a complex architecture. Our understanding of the physical principles responsible for this complex organization is still limited. It would be useful to be able to directly exert and measure forces on chromosomes *in vivo* to study these questions. In this project, we present a novel magnetic nanoprobe that can bind to a specific genomic locus and apply a force to this locus. This nanoprobe is an iron oxide nanoparticle coated with specific polymeric ligands. The first challenge lies in avoiding nonspecific interactions between the nanoprobings and biomolecules in the very crowded intranuclear environment. To achieve this, we have designed a specific diblock copolymer to coat the nanoparticles. The first block contains sulfobetaine zwitterions that are very efficient to eliminate nonspecific interactions. The second block contains multiple phosphonate anchoring groups to ensure long term anchoring stability. The anchoring stability of the polymer to the nanoparticle surface has been checked and the absence of interactions with proteins with the selected polymer coating has been assessed *in vitro* and in live cells. The second challenge is to conjugate specific proteins that will enable the targeting of selected DNA sequences. We have optimized the design of the polymer architecture to achieve controlled and efficient binding of targeting proteins to the surface of our nanoparticles, via copper-free click chemistry. Here we functionalize our nanoparticles with fluorescent dyes for visualization and with GFP, which will bind to an anti-GFP nanobody domain, fused to a fluorescent protein and a domain that binds a specific DNA sequence in our cell model. The efficiency of the targeting has been assessed after microinjection of the nanoparticle solution in the nucleus of living cells. It is quick and specific, without nonspecific interactions. Thousands of nanoparticles can bind the genomic locus. Manipulation of the genomic locus has been performed with a magnetic tip that produces a strong magnetic field gradient. In this gradient, the locus is submitted to a force on the piconewton range that can move the genomic locus over several micrometers. This tool will be helpful to study chromosome mechanics and genome functions.

KEYWORDS

Iron oxide nanoparticles, Zwitterion, Polymeric surface ligands, Bioconjugation, Micromanipulation, Physics of chromatin