

UBFC

UNIVERSITÉ
BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE
BOURGOGNE FRANCHE-COMTE**
**PREPAREE AU LABORATOIRE INTERDISCIPLINAIRE CARNOT DE
BOURGOGNE**

Ecole doctorale n°553

Ecole Doctorale Carnot Pasteur

Doctorat de Chimie Physique

Par

Mme. Marets Célia

Elaboration de nanoparticules inorganiques pour l'étude des interactions
nanoparticules-protéines

Thèse soutenue le 18 octobre 2023 :

Composition du Jury :

Mme.	MEIRELES Martine	Directrice de recherche CNRS, Université de Toulouse 3	Rapporteuse
M.	MERTZ Damien	Chargé de recherche CNRS HDR, Université de Strasbourg	Rapporteur
Mme.	FOREST Valérie	Professeure, Ecole des Mines de Saint-Etienne	Examinatrice
M.	JORDAN Olivier	Maître de recherche HDR, Université de Genève	Examineur
Mme.	MILLOT Nadine	Professeure, Université de Bourgogne	Présidente du jury
M.	MAURIZI Lionel	Chargé de recherche CNRS HDR, Université de Bourgogne	Directeur de thèse
M.	SAVIOT Lucien	Directeur de recherche CNRS, Université de Bourgogne	Directeur de thèse

Table des matières

TABLE DES MATIERES	I
LISTE DES ABREVIATIONS	III
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : CONTEXTE ET METHODOLOGIE	3
I. LES MATERIAUX NANOSTRUCTURES POUR LES APPLICATIONS BIOMEDICALES	3
I.A. LA DIVERSITE DES NANOPARTICULES	3
I.A.1. <i>Nanoparticules inorganiques et organiques</i>	3
I.A.2. <i>Structure des nanoparticules et impact sur les propriétés biologiques</i>	5
I.A.3. <i>Chimie de surface</i>	9
I.A.4. <i>Conclusion sur les nanoparticules développées à des fins biomédicales</i>	11
I.B. POSITIONS DE L'ETUDE : CHOIX DES MODELES	12
I.B.1. <i>Nanoparticules d'oxyde de fer</i>	12
I.B.2. <i>Nanoparticules d'or</i>	15
I.B.3. <i>Fonctionnalisations de surface</i>	18
I.C. CONCLUSION PARTIELLE	19
II. LA COURONNE PROTEIQUE (PC) : UN DEFI POUR LES NANOPARTICULES A VISEES BIOMEDICALES	20
II.A. MECANISMES EN JEU A L'INTERFACE NPS – MILIEU BIOLOGIQUE	20
II.A.1. <i>Formation et évolution</i>	20
II.A.2. <i>Interactions entre nanoparticules et protéines : impacts sur la structure des protéines et conséquences</i>	22
II.B. IMPACT DE LA COURONNE PROTEIQUE SUR LES COMPORTEMENTS BIOLOGIQUES DES NPS	23
CONCLUSION CHAPITRE 1	52
CHAPITRE 2 : SYNTHESE ET CARACTERISATION DE NANOPARTICULES INORGANIQUES	54
I. NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER	54
I.A. SYNTHESE ET FONCTIONNALISATION DE NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER	54
I.A.1. <i>Procédé de synthèse et purification</i>	54
I.A.2. <i>Fonctionnalisations de surface</i>	58
I.B. CARACTERISATION DES NANOPARTICULES ET DE LEURS FONCTIONNALISATIONS	60
I.B.1. <i>Caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer</i>	60
I.B.2. <i>Caractérisation des fonctionnalisations</i>	64
I.C. CONCLUSION SUR LES NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER	70
II. NANOPARTICULES D'OR	71
II.A. LITTERATURE	71
II.A.1. <i>Généralités</i>	71
II.A.2. <i>Synthèses par réduction d'un sel d'or : mécanismes</i>	72
II.B. SYNTHESE : METHODOLOGIE & CARACTERISATION	75
II.B.1. <i>Avec NaBH₄</i>	75
II.B.2. <i>Variantes sans NaBH₄ : [V1] et [V2]</i>	79
II.B.3. <i>Variante avec du glutathion (GSH) [V3]</i>	83
II.B.4. <i>Conclusion des synthèses de nanoparticules d'or</i>	85

II.C.	FONCTIONNALISATIONS DES NANOPARTICULES D'OR PAR DU PEG	86
II.C.1.	<i>Manipulation</i>	86
II.C.2.	<i>Caractérisation</i>	87
II.C.3.	<i>Stabilité des suspensions</i>	92
II.D.	CONCLUSION NANOPARTICULES D'OR	93
III.	NANOPARTICULES DE SILICE	94
III.A.	SYNTHESE	94
III.B.	CARACTERISATION DES NANOPARTICULES DE SILICE.....	95
III.C.	CONCLUSION	96
	CONCLUSION CHAPITRE 2	97
	CHAPITRE 3 : INTERACTIONS NANOPARTICULES INORGANIQUES – PROTEINES : ETUDE CIBLEE	99
I.	CARACTERISATION DES INTERACTIONS NANOPARTICULES – PROTEINES.....	99
II.	ETUDE <i>IN VIVO</i> : IDENTIFICATION DES PROTEINES COMPOSANT LA COURONNE PROTEIQUE DES SPIONS EN FONCTION DE LEUR CHIMIE DE SURFACE	101
II.A.	MANIPULATION.....	101
II.A.1.	<i>Présentation de la manipulation</i>	101
II.A.2.	<i>Analyse de la couronne protéique : principe et méthodologie</i>	102
II.A.3.	<i>Traitement des données de la spectrométrie de masse : nombre de protéines identifiées et reproductibilité</i>	103
II.B.	TRAITEMENTS STATISTIQUES DES DONNEES DE PROTEOMIQUE	106
II.B.1.	<i>Clustering</i>	108
II.B.2.	<i>Réduction de dimension</i>	114
II.B.3.	<i>Bilan</i>	115
III.	ETUDE DE L'IMPACT <i>IN VIVO</i> DE LA COURONNE PROTEIQUE DE SPIONS SUR LEUR BIOCIRCULATION : ARTICLE	116
	CONCLUSION CHAPITRE 3	126
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	127
	BIBLIOGRAPHIE	131
	BIBLIOGRAPHIE DE LA PUBLICATION NANOSCALE ADVANCES (CHAPITRE 1)	142
	BIBLIOGRAPHIE DE LA PUBLICATION ACS NANO (CHAPITRE 3)	149
	ANNEXES.....	155
I.	CODES R.....	155
	K-MEANS	155
	MDS	155
	WARD	156
II.	VALORISATION DES TRAVAUX	158
	PUBLICATIONS DANS DES JOURNAUX A COMITE DE LECTURE.....	158
	ENSEIGNEMENT - ENCADREMENT	158
	PRESENTATIONS DANS LE CADRE DE CONGRES NATIONAUX OU INTERNATIONAUX	158

Liste des abréviations

AuNPs	NanoParticules d'or
CAH	Classification Ascendante Hiérarchique
DLS	Dynamic Light Scattering
GRAVY	GRand AVerage of Hydropathy
GSH	Glutathion
HC	Hard Corona
ICP	Inductively Coupled Plasma Spectroscopy
LC-MSMS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
MDS	MultiDimensional Scaling
NP	NanoParticule
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	Protein Corona
PCA	Principal Component Analysis
PDI	PolyDiversity Index
PEG	PolyEthylène Glycol
pI	Point Isoélectrique
PVA	Polyvinyl Alcohol
SPIONs	SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticle
TEM	Transmission Electron Microscopy
TSCD	Tri Sodium Citrate Dihydrate
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy
XRD	X-Ray Diffraction

Introduction

Les nanoparticules (NPs) sont des objets dont les trois dimensions sont de l'ordre du nanomètre (10^{-9} m). Elles représentent une révolution scientifique et technologique dans le domaine de la recherche et de l'industrie depuis les années 90 : à cette échelle, ces objets possèdent des propriétés uniques qui diffèrent souvent de celles du matériau massif. Ces propriétés suscitent un intérêt croissant dans le domaine biomédical et les NPs font donc l'objet de nombreuses recherches que ce soit en thérapie ou en diagnostique. Les applications sont multiples : thérapie anticancéreuse par hyperthermie, délivrance de médicaments, imagerie optique et/ou par résonance magnétique, etc.

Ces NPs sont, dans la plupart des cas, injectées directement dans le sang. Un problème se pose : avant d'atteindre leur site cible, les NPs interagissent tout d'abord avec les molécules de l'environnement dans lesquelles elles sont injectées, en particulier les protéines. Il se forme ce qu'on nomme une « couronne protéique » ou *protein corona*, (PC). Celle-ci influence les comportements biologiques des NPs tels que leurs cytotoxicités (toxicité pour les cellules), leurs biodistributions (répartitions dans les organes) ou encore leurs internalisations (capacité à s'introduire dans les cellules), et va donc avoir un impact sur l'efficacité de ces NPs et leur sûreté.

La PC est donc à prendre en compte dans l'élaboration des nanoparticules à visée biomédicale. La formation et la composition de cette couronne sont elles-mêmes influencées par les paramètres intrinsèques aux nanoparticules comme leur taille, leur forme ou leur chimie de surface. Il est important de :

- caractériser et comprendre les interactions des différentes NPs avec les protéines
- d'étudier l'influence des protéines sur les comportements biologiques (biodistribution, internalisation, toxicité...)
- de contrôler ces couronnes protéiques pour optimiser l'efficacité des nano-systèmes.

L'équipe BH2N (Bio-Hybrid Nanoparticles & Nanostructures) de l'Université de Bourgogne développe des nanoparticules à des fins biomédicales, notamment pour l'imagerie médicale (magnétique (IRM), nucléaire (SPECT, TEP) et pour la thérapie (comme la radiosensibilisation de tumeurs ou la thérapie photodynamique). Ce travail de thèse est le premier à être réalisé au laboratoire sur la thématique de la couronne protéique. Ce domaine de recherche est particulièrement vaste du fait de la variété des nanoparticules existantes et des protéines susceptibles d'être impliquées dans la formation de la PC. Cette thèse ne prétend donc pas étudier la PC dans toute sa généralité. Nous nous sommes fixés comme objectif de poser des jalons pour la poursuite de cette thématique au laboratoire en faisant un état des lieux des besoins qui transparaissent dans la littérature, en identifiant et en synthétisant des nanoparticules d'intérêt pour l'étude de la PC et finalement en étudiant des résultats d'analyse de la PC afin de vérifier la cohérence de l'ensemble. Ce travail se situe donc à la frontière entre la synthèse de nanoparticules à des fins biomédicales et l'étude de cette couronne protéique.

Les objectifs de ce travail sont donc :

1. D'étudier les différents aspects impactant la PC, de faire un point sur la recherche à ce sujet et définir les challenges rencontrés.
2. De constituer une bibliothèque de NPs comportant, entre deux échantillons, un seul paramètre variable. Ceci comprend la synthèse de nanoparticules inorganiques, la fonctionnalisation de leurs surfaces (adsorption ou greffage de molécules spécifiques), la caractérisation de ces systèmes et la vérification de leur stabilité en milieu biologique.
3. De caractériser, *in vivo*, la couronne protéique et d'étudier l'impact de différents paramètres sur sa formation et sa composition.

Le premier chapitre de ce manuscrit est une étude bibliographique du contexte. Il commence par une première partie présentant la diversité des nanoparticules utilisées dans le domaine biomédical et souligne l'impact des différents paramètres intrinsèques aux nanoparticules sur les propriétés biologiques des NPs. Les NPs sont variées, et les choix des systèmes étudiés sont donc justifiés. Les travaux porteront sur les nanoparticules d'oxyde de fer (SPIONs), d'or (AuNPs), et les fonctionnalisations de surface sont les polymères (PEG Polyéthylène Glycol et PVA Polyvinyle Alcool), le glutathion et le citrate. Les propriétés et applications des nanoparticules d'oxyde de fer et d'or sont donc détaillées. La deuxième partie de ce chapitre aborde le sujet de la couronne protéique. Les interactions mises en jeu à l'interface nanoparticule-milieu biologique sont explorées et la complexité des systèmes est une fois de plus mise en valeur en étudiant l'impact de la PC sur les propriétés biologiques des NPs. Le choix de travailler *in vivo* est explicité et justifié dans la revue insérée en fin de ce chapitre.

Le deuxième chapitre porte sur la synthèse et la caractérisation des nanoparticules inorganiques. Il se décompose en deux parties principales, l'une portant sur les SPIONs et l'autre sur les AuNPs. Dans chaque partie, un résumé succinct des différentes méthodes de synthèse existantes est conduit, puis les choix des protocoles de synthèses sont explicités. Les analyses des nanoparticules synthétisées, avec et sans fonctionnalisation, ainsi que leurs stabilités colloïdales sont ensuite présentées. Une troisième brève partie aborde les nanoparticules de silice, issues de courtes expérimentations mais venant compléter la banque de NPs synthétisées.

Dans le troisième chapitre, un point est fait sur les techniques de caractérisation de la couronne protéique et des interactions nanoparticules-protéines. Puis les paramètres de la chimie de surface de SPIONs (taille / charge des polymères en surface) sont étudiés dans une manipulation *in vivo* : les couronnes protéiques des nanoparticules sont caractérisées par spectrométrie de masse. Les données de protéomiques qui en résultent impliquent une exploration de différentes approches statistiques. Le chapitre conclut par l'article découlant de cette expérience *in vivo*.

Chapitre 1 : Contexte et méthodologie

Le domaine de la couronne protéique connaît un essor depuis une vingtaine d'année comme le montre l'évolution du nombre d'article de revue traitant de ce sujet en Figure 1.

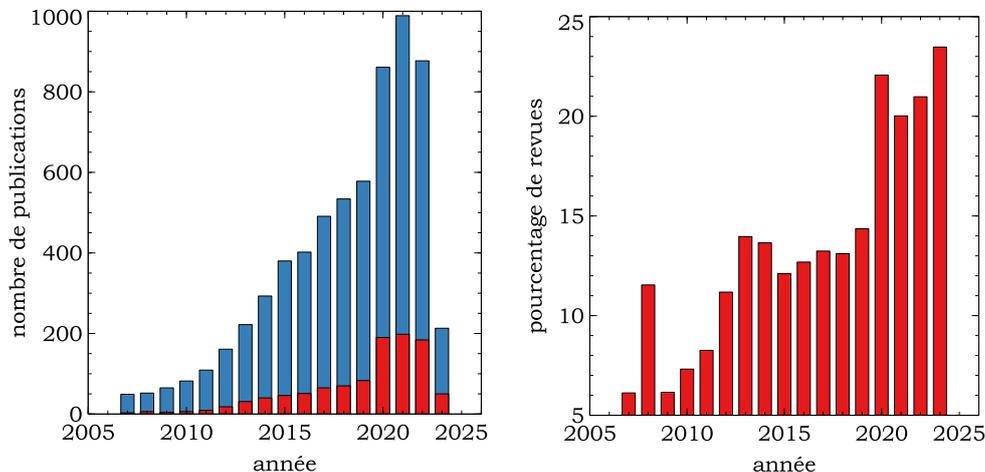


Figure 1 : nombre de publications (bleu) et de revues (rouge) par année pour le terme « protein corona ». Source : Web of Science, janvier 2023.

Ce terme spécifique a été introduit en 2007 par le groupe de Dawson et al. bien que l'importance des interactions nano-objets-protéines soit identifiée depuis 1960 [1], [2]. Les investigations et notre représentation de cette couronne ont fortement progressé grâce à l'amélioration des techniques de caractérisation, au passage de l'*ex vivo* à l'*in vivo* ou encore à la prise en compte de cette couronne dans la conception des nano-systèmes. L'expression couronne biomoléculaire est également utilisée de nos jours. Cette partie définit le cadre de ce travail en mettant en avant la complexité et la disparité à la fois des systèmes mais aussi des méthodes d'étude.

Dans un premier temps, les différentes variétés de nanoparticules utilisées dans le domaine biomédical sont présentées. Puis le choix des systèmes retenus pour cette thèse - nanoparticules d'oxyde de fer, nanoparticules d'or et leurs fonctionnalisations - est justifié puis détaillé. Dans un second temps, la problématique de la couronne protéique est abordée en commençant par sa définition puis en présentant les mécanismes à l'interface nano-bio. L'accent est finalement mis sur la couronne protéique *in vivo* et sur le choix des méthodes appropriées pour son étude.

I. Les matériaux nanostructurés pour les applications biomédicales

I.A. La diversité des nanoparticules

I.A.1. Nanoparticules inorganiques et organiques

Il existe une multitude de nanoparticules différentes qui est illustrée sommairement en Figure 2. Le premier paramètre qui distingue une nanoparticule

d'une autre est sa composition. On distingue deux types de nanoparticules : inorganiques et organiques.

Les nanoparticules organiques sont des systèmes synthétiques ou naturels constitués de molécules organiques tels que les micelles, les dendrimères, les liposomes, les nanoparticules polymériques, la ferritine, les nanosystèmes à base d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique), etc [3].

Les nanoparticules inorganiques peuvent être constituées de matériaux très divers : or, argent, oxydes de fer ou d'autres métaux, lanthanides, silice, quantum dots (chalcogénures de métaux, avec ou sans coquille), bismuth, lanthanides, carbone, bimétalliques, etc [4][5].

D'une manière générale, les NPs organiques ont une meilleure biocompatibilité que les NPs inorganiques [3]. Mais ces dernières présentent les intérêts d'être plus facilement fonctionnalisables, modulables en taille et en forme [6], d'augmenter l'efficacité de certains traitement grâce à un temps de circulation plus élevé et une meilleure pénétration dans les tissus [7]. Elles peuvent également être exploitées pour leurs propriétés physiques uniques : électroniques, catalytiques, magnétiques, optiques, thermiques ou encore radiosensibilisantes. L'un des avantages à utiliser des nanoparticules inorganiques est le couplage possible avec d'autres fonctionnalités, tandis que nombre de NPs organiques délivrent passivement le médicament [8]. Ces spécificités vont guider le choix des nanoparticules en fonction de l'application visée.

Le développement de nanoparticules multifonctionnelles peut conduire à l'élaboration de nanosystèmes dits hybrides, composés de différents matériaux ou à la fois de matériaux inorganiques et organiques, pour bénéficier des avantages de chacun : coating de lipides sur une nanoparticule inorganique, quantum dots adsorbés à la surface d'une nanoparticule polymérique, etc [9].

Dans la suite de ce chapitre et dans cette thèse, nous nous focalisons sur les nanoparticules inorganiques. La justification du choix des nanoparticules de cette

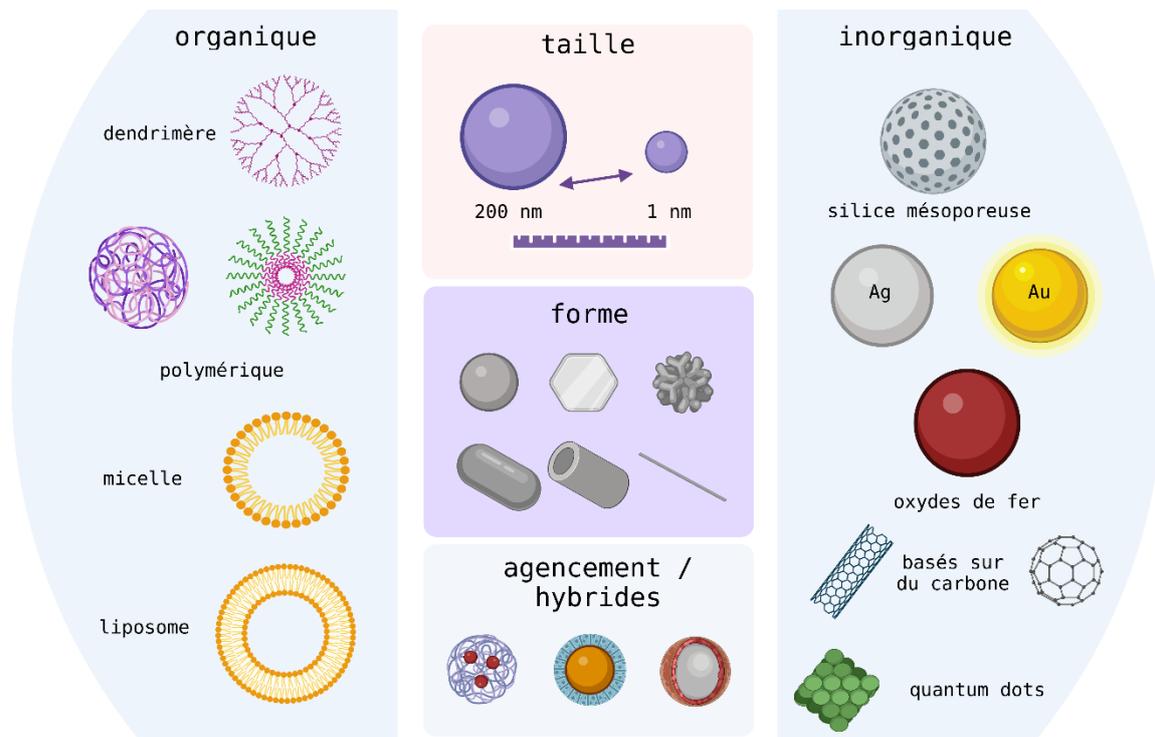


Figure 2 : illustration de la diversité des nanoparticules.

étude et la description de leurs propriétés font l'objet d'un paragraphe particulier (I.B).

I.A.2. Structure des nanoparticules et impact sur les propriétés biologiques

I.A.2.a) Taille

Les nanoparticules possèdent, comme mentionné plus haut, des propriétés remarquables et propres à leur taille. Celle-ci peut varier de quelque nm à plusieurs centaines de nm. Cette sensibilité à la taille est parfaitement illustrée avec les propriétés optiques des quantum dots [10]. De nombreuses publications ont démontré l'influence de la taille des nanoparticules sur leurs propriétés biologiques telles que leur temps de circulation, leur efficacité de ciblage, leur internalisation ou encore sur leur profondeur de pénétration [11].

Il est à noter que la « taille » peut désigner deux valeurs : la taille « morphologique » de l'objet en lui-même déterminée par exemple à partir d'images TEM (Transmission Electron Microscopy), et la taille hydrodynamique qui inclut la double couche d'ions se formant autour d'une particule au sein d'un fluide et qui est déterminée par DLS (Dynamic Light Scattering). Cette valeur dépend donc du milieu et reflète l'identité et le mouvement des particules au sein du fluide. Pour cette raison, et parce que la taille hydrodynamique tient compte de la fonctionnalisation de surface, cette valeur sera celle de référence dans les chapitres suivants.

Les publications citées dans cette section indiquent souvent les deux tailles mais certaines mentionnent uniquement le diamètre morphologique ou le diamètre hydrodynamique.

Même si leurs comportements biologiques doivent être étudiés au cas par cas, certaines tendances générales se dégagent : une taille comprise entre 10 et 200 nm serait préférable afin d'éviter une clairance trop rapide [12] car le mode d'élimination des nanoparticules dépend de leur taille. Poon *et al.* [13] propose un schéma récapitulatif du devenir des nanoparticules dans le corps qui est repris sur la Figure 3 : celles d'une taille morphologique inférieure à 5,5 nm sont soumises à la filtration glomérulaire et évacuées via l'urine. Les plus grosses sont dégradées ; si cela n'est pas possible elles sont captées par les cellules de Kupffer (macrophages du foie) ou éliminées via les hépatocytes. [13]

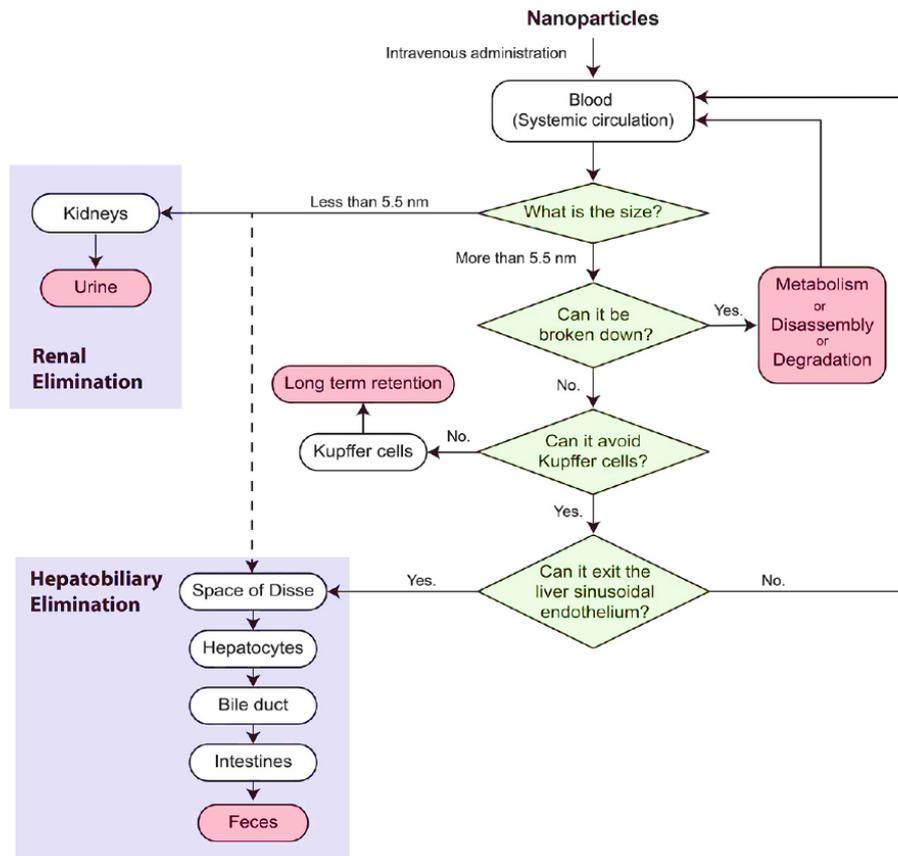


Figure 3 : les différentes voix d'élimination des nanoparticules dépendant de leur taille. Extrait de [12].

L'efficacité des traitements est directement liée au temps de circulation qui est lui-même impacté par la taille des nanosystèmes. Dans la majorité des cas, plus la nanoparticule est petite, plus sa demi-vie est longue (Figure 4). Cependant cette tendance n'est pas toujours respectée car d'autres paramètres peuvent aussi jouer un rôle, comme la charge, la chimie de surface, la flexibilité, la forme ou encore la composition du cœur des particules. Sun *et al.* [14] expliquent que les particules sortent de la circulation sanguine par les capillaires sinusoides (comme l'endothélium du foie, de la rate ou des ganglions lymphatiques) via les parois paracellulaires, ou dans les tissus lorsque la barrière endothéliale est abîmée (comme pour les tumeurs), si leur taille et leur rigidité leur permettent de s'adapter à la taille et à la forme du substrat.

La taille influence également la biodistribution et la capacité à pénétrer les tissus. Cependant, comme mentionné ci-dessus, ce paramètre est en synergie avec d'autres et on ne peut avancer là encore que des tendances [14]. Des résultats contradictoires ont également été rapportés dans la littérature : par exemple, des publications démontrent qu'une plus petite taille permet une meilleure accumulation dans les tumeurs, tandis que d'autres attestent de l'exact opposé [15], [16].

Au niveau cellulaire, la taille détermine partiellement les mécanismes d'internalisation. Les nanoparticules sphériques les plus grosses sont phagocytées et les plus petites sont endocytées par différentes voies qui dépendent ou non de la clathrine ou de la cavéoline, ou par macropinocytose [12],[11]. On retrouve aussi l'influence de ce paramètre sur l'accumulation cellulaire [13], ainsi que sur la localisation sub-cellulaire [17]. De plus, ces différences dans les mécanismes d'internalisation et la capacité d'internalisation jouent un rôle dans la cytotoxicité [18], [19]. [12]

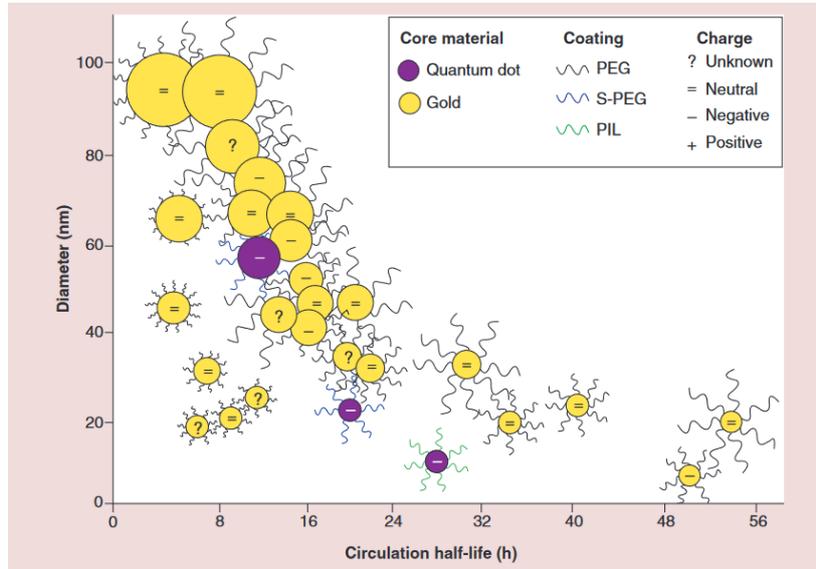


Figure 4 : Relation entre la taille de nanoparticules (or et quantum dots) et le temps de circulation. La longueur des lignes représentant le coating de PEG est proportionnelle à la taille du PEG. D'une manière générale, les plus grosses particules ont un temps de circulation plus court, indépendamment de la taille du PEG. Extrait de [11].

I.A.2.b) Morphologie / Rapport d'aspect

Nous venons de voir que la taille impacte de nombreux aspects des comportements biologiques en synergie avec d'autres paramètres. Le second paramètre majeur considéré ici est la forme.

Les nanoparticules peuvent avoir des morphologies variées (Figure 5) : sphère, triangle, cube, polyédre avec des facettes, cylindre plein (bâton) ou creux (tube), aiguille, bipyramide, étoile, disque... [20]. Toutes ces formes sont développées pour

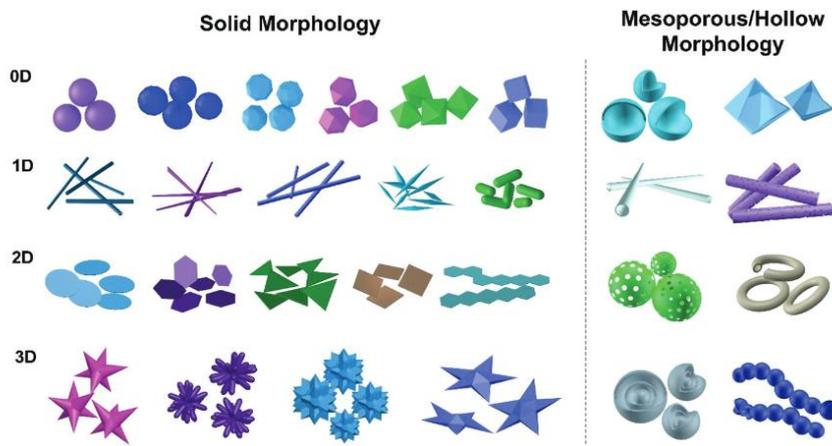


Figure 5 : variété en forme des nanoparticules. 0D : isotrope. Extrait de Wu *et al.* 2016

optimiser les propriétés et envisager des applications nouvelles impliquant par exemple des auto-assemblages et des couplages de fonctionnalités [11], [21].

Ces formes résultent en général des différences d'énergie de surface et des différences de réactivité (Figure 6, extraite de [22]). Ces dernières sont dues principalement au nombre et au type de sites de basse coordination (arêtes, coins, terrasses, défauts).

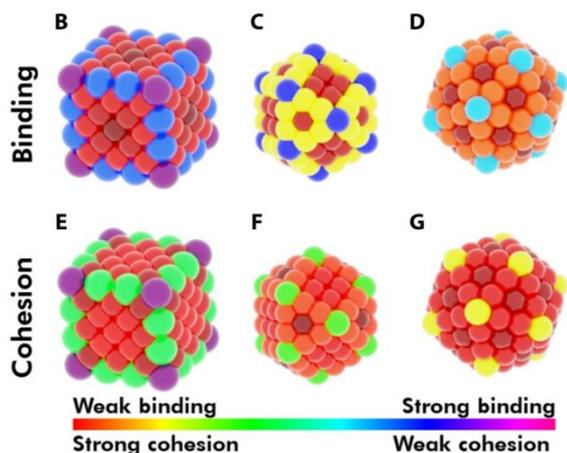


Figure 6 : Illustration des variations d'énergies sur les sites de basses coordinations : exemples des énergies de liaison et de cohésion du CO sur des nanoparticules d'Or cubique (A-E), icosaédrique (C-F) et cuboctaédrique (D-G), calculées par DFT. Extrait de [20].

Les propriétés physiques et chimiques dépendent de la forme des nanoparticules. C'est par exemple le cas pour les propriétés optiques (résonance plasmon de surface) des nanoparticules métalliques [23] mais également pour les propriétés thermiques. L'hyperthermie est doublement impactée par la forme car après internalisation, l'arrangement inter nanoparticulaire affecte lui aussi la réponse thermique [24].

La forme influence de même les interactions nanoparticules – media biologiques et donc leur mobilité.

Il est donc établi que certaines propriétés biologiques sont impactées.

Selon les cas, la forme accroît ou non la toxicité des nanoparticules, le temps de circulation, la biodistribution, l'internalisation cellulaire et le temps de rétention dans les cellules, ou encore la capacité de pénétration dans les tissus [25]. Par exemple, la capacité de pénétration de la membrane cellulaire par une particule peut être liée à la courbure locale de la particule au point de contact [11].

Tirer des tendances générales sur la forme est hasardeux dans la mesure où actuellement des contradictions sont observées selon les cas [25.]

En plus des paramètres précédents, les nanosystèmes sont fréquemment composés de plusieurs matériaux afin d'améliorer leurs propriétés ou de combiner plusieurs propriétés. C'est le cas par exemple des structures cœur-coquille qui permettent entre autre, d'outrepasser les problèmes de cytotoxicité de certaines NPs métalliques en les encapsulant dans des structures mésoporeuses. Des nanoparticules de type « Janus » composées de plusieurs phases de différents matériaux peuvent également être synthétisées (Figure 7) [26].

Pour cette étude, située dans un contexte fondamental, nous travaillerons sur le modèle le plus simple : la sphère.

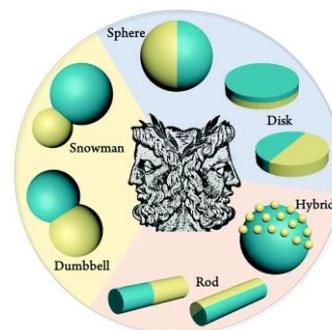


Figure 7 : diversité des nanoparticules Janus, extrait de [24].

I.A.3. Chimie de surface

Le dernier point principal de l'identité d'une nanoparticule est sa chimie de surface. Lorsque les nanoparticules concernées sont dispersées en suspension, on parle de colloïdes.

I.A.3.a) Stabilité colloïdale

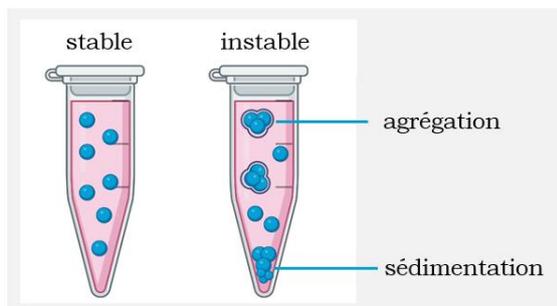


Figure 8 : illustration de l'instabilité d'une suspension

La stabilité colloïdale des nanoparticules est un aspect majeur qui conditionne leur utilisation dans des milieux biologiques. Leur surface étant très réactive, les nanoparticules tendent à diminuer leur énergie de surface en se liant de manière covalente les unes aux autres pour former des agrégats (Figure 8). En plus de potentiel impacts toxicologiques, cette agrégation détériore les propriétés physico-chimiques des suspensions et par conséquent leur efficacité biologique. Elle n'est donc pas souhaitée. Les principales forces mises en jeu sont les forces électrostatiques, de Van der Waals, de répulsion stérique et de déplétion. Par ailleurs la sédimentation, équilibre entre la force de la gravité, du mouvement brownien et des interactions hydrodynamiques [27], est directement liée à cette agrégation.

Nombres de paramètres comme la taille, la morphologie ou la composition chimique du cœur de la nanoparticule influent sur cette stabilité [28]. Cependant, la chimie de surface en est le principal acteur et intervient pour parer, corriger et optimiser un manque de stabilité. C'est la raison pour laquelle ce point est abordé dans cette sous-section chimie de surface. Le premier critère que doit remplir une fonctionnalisation correcte est de résulter en une suspension stable. La stabilité nécessite d'être à la fois temporelle et résistante même après changement d'environnement notamment après introduction dans des milieux biologiques plus ou moins complexes, à pH 7,3 - 7,4 et avec une force ionique de 150 mM, à 37°C.

I.A.3.b) Fonctionnalisations

i. Stabilisation

L'origine de la stabilisation peut être électrostatique ou stérique. Une stabilisation électrostatique s'effectue à l'aide de l'adsorption ou du greffage de molécules chargées sur la surface en augmentant l'efficacité de la répulsion électrostatique de la double couche d'ions [29]. Une stabilisation par répulsion stérique implique des polymères ou autres grosses molécules organiques en empêchant les particules d'interagir entre elles. Certaines fonctionnalisations exploitent ces deux aspects. Dans ce cas, on parle parfois de répulsion électrostérique [30].

ii. Biocompatibilité

En plus de cette fonction de stabilisation, les fonctionnalisations ont pour objectifs d'améliorer la biocompatibilité des nanoparticules en masquant leur surface inorganique, très réactive notamment pour les nanoparticules métalliques, au milieu biologique [31]. Elles permettent par ailleurs d'ajuster en particulier la charge de surface, qui influence la compatibilité via par exemple son impact sur l'adsorption de

protéines plasmatiques, les interactions cellulaires et la stabilité, ou encore la stimulation des cellules immunitaires [32]. Le caractère hydrophobe a lui aussi son importance : une surface hydrophile serait moins toxique [33]. Ce point de biocompatibilité est repris dans la partie II.B, il dépend grandement des séquences biologiques déclenchées par les interactions avec l'environnement, notamment des interactions particules-protéines.

iii. Théranostique

Les molécules greffées peuvent avoir une fonctionnalité spécifique. La première est d'augmenter le temps de circulation. On parle alors de capacité de furtivité (*stealth capacity* en anglais). C'est le cas des coatings polymériques [comme le PEG : Polyéthylène Glycol, POx : Poly(2-Oxazoline), ou les poly-zwitterioniques] ou de certaines molécules biologiques comme le CD47 (Cluster de Différentiation 47, protéine transmembranaire aux propriétés anti-phagocytaire) [34]. Une seconde fonctionnalité possible est la thérapie immédiate. Certaines nanoparticules sont synthétisées uniquement dans le but de délivrer un médicament. Celui-ci est directement adsorbé de manière non covalente à la surface ou réticulé via une autre molécule. C'est par exemple le cas du dextran [35]. D'autres fonctionnalités peuvent être mises en place comme l'imagerie, le ciblage actif, la biocatalyse, le suivi cellulaire etc, *via* le greffage de ligands spécifiques : molécules fluorescentes, oligonucléotides, anticorps, peptides, marqueurs tumoraux, enzymes... [36], [37].

Enfin, on peut souligner que certaines fonctionnalisations sont spécifiquement élaborées pour leurs propriétés réactives à l'environnement (« environnement-responsive »). Cela signifie que leurs propriétés physico-chimiques évoluent suite à l'exposition à un stimuli externe (température, pH, force ionique, etc) favorisant par exemple la délivrance d'un traitement [38].

L'ingénierie de cette surface aboutit souvent au greffage ou à l'adsorption de différentes molécules/agents résultant en une nanoparticule dite multifonctionnelle [39].

iv. Stratégies

Les fonctionnalisations s'effectuent par différentes conjugaisons.

Les liaisons covalentes particule-molécule, ou greffages, sont les plus stables et constituent donc l'outil le plus exploité pour les nanoparticules de certains matériaux. C'est le cas de la liaison Au-S utilisée pour la fonctionnalisation de nanoparticules d'or par des molécules portant des groupements thiols [40]. Dans le cas de molécules biologiques, un agent de couplage peut être nécessaire afin d'éviter l'altération des fonctions des molécules en question qui ne présentent pas de fonctions directement liantes aux particules [36].

Les conjugaisons peuvent aussi être de nature non covalentes : interactions électrostatiques, interactions π - π ou encore liaisons hydrogènes [41].

Un coating amorphe peut aussi être ajouté : c'est le cas classique de la synthèse d'une couche de silice directement sur la surface des nanoparticules, par exemple sur nanoparticules magnétiques [42]. Dans le même esprit de synthèse directe en surface, une croissance épitaxiale peut être effectuée. Cette étape résulte en des systèmes hybrides et rejoint finalement la partie I.A.2.b).

I.A.3.c) Conclusion sur la chimie de surface

Les molécules greffées ou adhérentes à la surface des nanoparticules sont variées (Figure 9). La chimie de surface impacte les nanoparticules à travers la modification de leurs charge, taille hydrodynamique, hydrophobicité, réactivité avec la présence ou non de groupements particuliers. C'est donc l'un des acteurs principaux des phénomènes se produisant à l'interface nanoparticule-milieu biologique. Elle impacte aussi significativement les comportements biologiques, notamment la toxicité, la quantité absorbée par les cellules et la voie d'internalisation (et donc aussi la cinétique) [43], [44]. Elle doit donc être maîtrisée et caractérisée, la réponse biologique

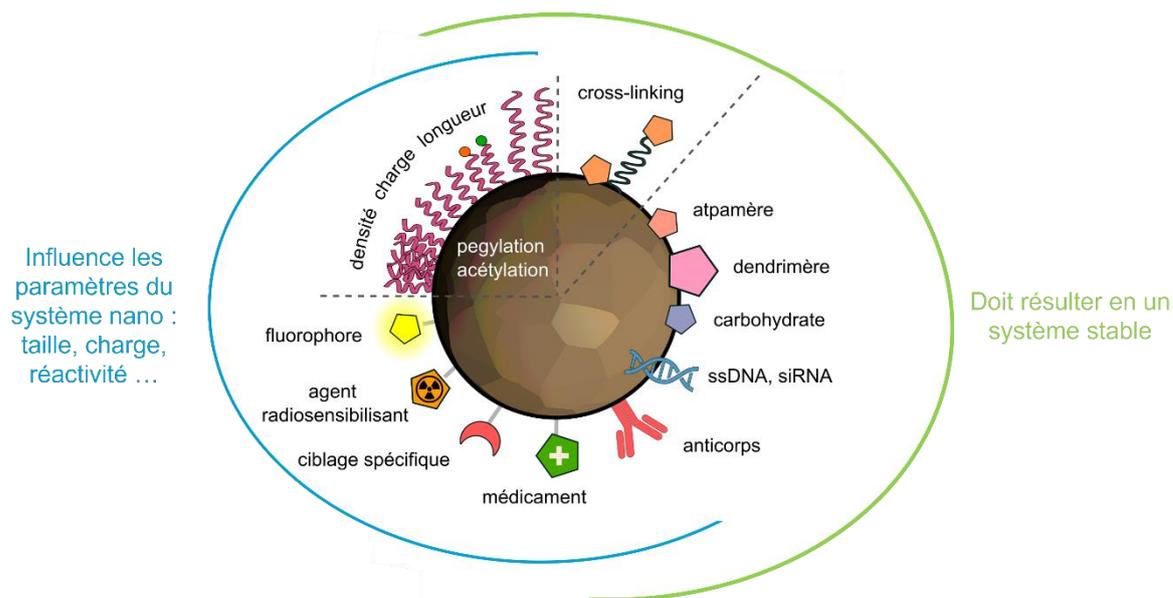


Figure 9 : différents type de fonctionnalisations de nanoparticules.

étant impactée par chaque paramètre de ce coating, jusqu'à la densité du ligand choisi [45].

I.A.4. Conclusion sur les nanoparticules développées à des fins biomédicales

L'élaboration de nanoparticules destinées à une application biomédicale comprend la synthèse des particules, le passage en milieu aqueux si besoin, et la (ou les) fonctionnalisations. Ce premier point illustre la multiformité des nanoparticules et la richesse des possibilités de chimie de surface. Il en résulte que le nombre de systèmes différents est très important. Ainsi, pour l'étude des interactions nanoparticules-protéines, un premier choix doit être fait au niveau des objets étudiés. C'est pourquoi, avant d'aborder l'aspect biologique, la prochaine section justifie et approfondie les systèmes choisis

I.B. Positions de l'étude : choix des modèles

La Figure 10 présente les pourcentages de publications, articles de revue compris, s'intéressant à un type de nanoparticules donné en fonction du ou des matériaux inorganiques composant les nanoparticules. Ils ont été obtenus en recherchant « *nanoparticles bioapplication* » dans la base de données de Google Scholar. Il est à noter que dans nombre de nanosystèmes, les matériaux sont couplés (structures core-shell, NPs de Janus, bimétallique). L'étude est faite sur les 300 premières publications du moteur de recherche correspondant, datant des années >2000.

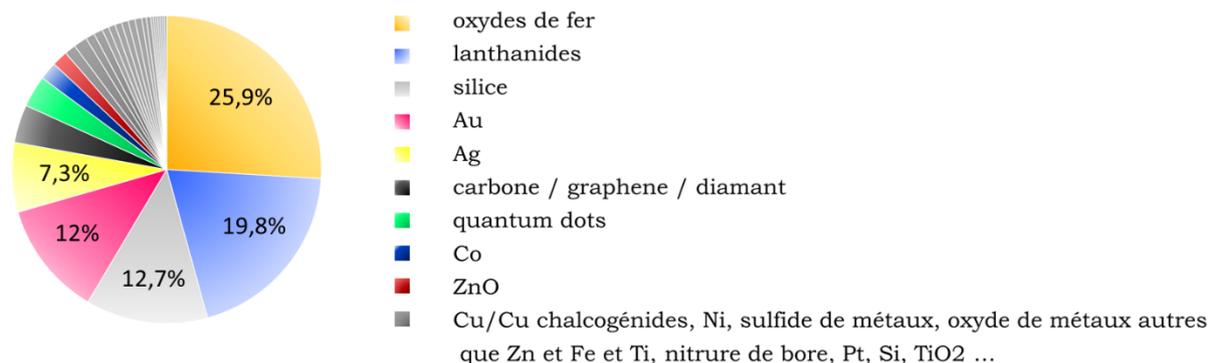


Figure 10 : pourcentages de publications en fonction du type du(des) matériau(x) étudié(s) (mai 2023).

Elle illustre de manière éloquent la prédominance des nanoparticules d'oxydes de fer, des lanthanides, de la silice et des métaux or et argent représentant les trois quarts des publications.

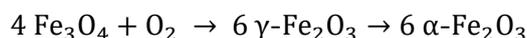
Dans notre étude, nous avons souhaité nous intéresser à des nanoparticules communément utilisées. Nous avons écarté les lanthanides qui n'ont pas été jusqu'à présent beaucoup étudié dans l'équipe ou au laboratoire. La mise au point de leur synthèse présentait un risque un peu plus grand et qui n'était pas justifié par les objectifs de cette thèse. Notre choix de nanoparticules s'est donc finalement porté sur l'oxyde de fer, l'or et, dans une moindre mesure, la silice (séparément).

I.B.1. Nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont les plus étudiées des nanoparticules destinées à des fins biomédicales. L'engouement est dû à leurs propriétés chimiques et physiques particulières qui seront décrites dans la suite, leur faible coût de synthèse et leur compatibilité biologique aisément accessible via des fonctionnalisations [46], [47].

I.B.1.a) Structure :

Les propriétés des oxydes de fer sont les conséquences directes de l'agencement particulier des atomes et de la composition chimique [48]. Ces oxydes existent avec différents niveaux d'oxydation : II (FeO), III (α -Fe₂O₃, γ -Fe₂O₃), II et III (Fe₃O₄). Les nanoparticules superparamagnétiques utilisées dans le cadre biomédical concernent en particulier la magnétite Fe₃O₄, la maghémite γ -Fe₂O₃ et l'hématite α -Fe₂O₃, formes oxydées de la magnétite (équation ci-dessous).



i. Magnétite :

La magnétite possède une structure spinelle inverse.

La structure spinelle, AB_2O_4 , est constituée d'un empilement de 8 sous-unités cubique face centré (cfc) d'ions O^{2-} (= 32 O) dont les sites interstitiels, reliés entre eux par leurs arêtes, sont occupés partiellement par des cations A^{2+} et B^{3+} . La structure cfc présente 4 sites octaédriques et 8 sites tétraédriques. Dans la spinelle, 1/2 des 32 sites octaédriques sont occupés par des cations B^{3+} , et 1/8 des 64 sites tétraédriques sont occupés par des cations A^{2+} . On a donc 32 O, 8 A et 16 B. Dans le cas d'un spinelle dite inverse comme la magnétite, les cations A^{2+} occupent les sites octaédriques et non tétraédriques : 1/4 des sites octaédriques sont occupés par B^{3+} , 1/4 des sites octaédriques sont occupés par A^{2+} , et 1/8 des sites tétraédriques sont occupés par B^{3+} .

La spinelle inverse Fe_3O_4 s'écrit donc :

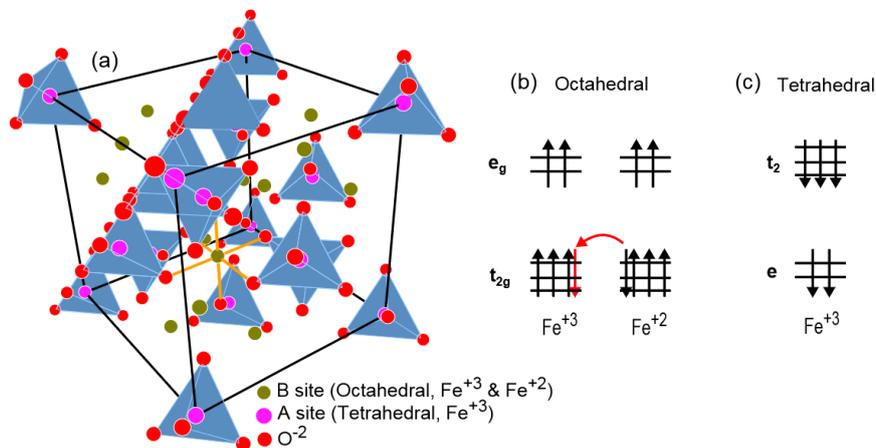
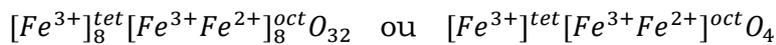


Figure 11 : structure de la magnétite (a), extrait de la thèse d'A. Lak [48] (b)(c) répartition des électrons des orbitales 3d dans les différents sites. Les spins globaux des Fe^{3+} des sites octaédriques et tétraédriques s'annulent. L'électron en rouge, dont la direction du spin est opposée à celle des autres, peut passer de site octaédrique en site octaédrique.

Les propriétés ferrimagnétiques s'expliquent par l'orientation des spins. Les orbitales 3d sont partiellement remplies avec 4 et 5 électrons célibataires pour Fe^{2+} et Fe^{3+} . Seuls les électrons non appariés des ions Fe^{2+} sont responsables du magnétisme du matériau (Figure 11).[49]

v. Maghémite

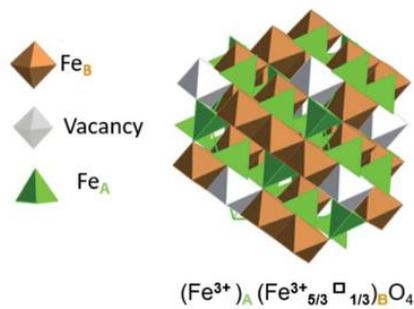
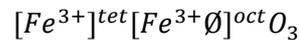


Figure 12 : Structure de la maghémite.

Sa structure provient de l'oxydation de la spinelle inverse de la magnétite. Sa particularité est que Fe n'existe que sous la forme du cation Fe^{3+} , les Fe^{2+} ayant été oxydés. Elle se caractérise par l'existence de lacunes réparties dans les sites octaédriques (Figure 12, extraite de [50]) :



La répartition de ces cations varie. Ainsi, la maghémite, notée $\gamma-Fe_2O_3$, existe sous plusieurs formes en fonction de la répartition des lacunes, aléatoire ou non [50]. Enfin, il est à noter que l'oxydation peut être partielle.

vi. Conclusion

Cette différence de structure cristalline impacte notamment les propriétés magnétiques des nanoparticules. La magnétite possède une magnétisation de saturation à température ambiante et une susceptibilité magnétique plus haute ce qui la rend plus appropriée pour les applications biologiques [51]. Cependant la magnétite s'oxyde facilement [4]. Un coating adéquat permet de limiter cette oxydation [52].

Afin de s'affranchir de ces problèmes d'oxydation partielle, nous avons choisi pour notre étude la maghémite.

I.B.1.b) Propriétés

i. Superparamagnétisme

La taille des cristallites des oxydes de fer nanométriques (< 20 nm) induit un changement des propriétés magnétiques par rapport au matériau massif ferrimagnétique ou ferromagnétique. Chaque particule contient un seul domaine de Weiss dans lequel tous les moments magnétiques sont alignés car la création d'une paroi est trop coûteuse en énergie [53]. Ceci induit le superparamagnétisme : l'aimantation peut se renverser spontanément sous l'effet de la température. Le temps moyen entre deux renversements se nomme le temps de relaxation de Néel T_N . En l'absence de champ magnétique extérieur, et au temps $t > T_N$, l'aimantation apparaît nulle : c'est l'état superparamagnétique. A la différence d'un matériau paramagnétique, il n'existe pas de température de Curie, température à laquelle l'aimantation permanente disparaît. L'application d'un champ extérieur peut orienter l'aimantation des nano-objets superparamagnétiques présentant l'avantage d'être dépourvu d'aimantation rémanente en l'absence de champ extérieur, d'avoir une plus basse saturation magnétique et une plus grande susceptibilité magnétique comparé au matériau massif paramagnétique [54]. On parlera donc dans la suite de SPIONs pour SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles.

ii. Propriétés biologiques

Les propriétés biologiques telles la toxicité, la clearance (la vitesse et la voie d'élimination des nanoparticules), la biodistribution ou l'internalisation cellulaire dépendent notamment, comme nous l'avons vu plus haut, de la taille des

nanoparticules et de leur chimie de surface. La fonctionnalisation de surface permet d'obtenir des SPIONs biocompatibles et une stabilité colloïdale satisfaisante [55], [56]. Certains médicaments sont plus performants lorsqu'ils sont conjugués à ces particules, qui augmentent par exemple leur solubilité ou leur temps de circulation, ou impactent leur toxicité [57].

I.B.1.c) Applications biomédicales des SPIONs

Les SPIONs sont des systèmes développés à des fins théranostiques. Ils sont parmi les rares nanomédicaments circulant sur le marché européen avec un coating de dextrane (CosmoFer, INFeD, Ferrisat) et sont prescrits pour le traitement de l'anémie [58]. Ces nanoparticules trouvent d'autres applications cliniques hormis la forme médicamenteuse, comme agent de contraste en IRM par exemple (Resovist®, Endorem®...)[59].

Les propriétés magnétiques des SPIONs sont utilisées en IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) pour le diagnostic, et dans les traitements anti-cancéreux par hyperthermie [60], [61]. Les travaux d'Espinosa et al [62] mettent en valeur les atouts de ces NPs en couplant leurs capacités photothermiques et magnétiques : en envoyant à la fois un champ magnétique et un laser IR sur les NPs, les résultats de thérapies anti-cancéreuses *in vivo* sont indéniablement améliorés, et ce à faible dose de NPs.

Ce sont également des agents de délivrance de médicaments via leurs propriétés magnétiques avec l'application d'un champ externe ou à l'aide d'un greffage spécifique qui guide les NPs vers un site cible afin d'optimiser la délivrance d'un traitement. Un tel ciblage est appelé « actif ». Le ciblage dit « passif » est aussi possible : il s'agit de l'accumulation dans les tumeurs de nanoparticules due à l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention effect) [59]. Un autre type de délivrance est la magnétofection (= transfection magnétique ; délivrance d'acides nucléiques) [63].

Les SPIONs sont aussi utilisés pour la réparation tissulaire, la thérapie par ablation thermique, la séparation magnétique (de cellules ou molécules), ou encore la thérapie par chélation [36], [61].

Leur taille peut varier de quelques nm à plusieurs dizaines de nm en fonction des applications souhaitées. La gamme des nanoparticules développées pour les traitements anticancéreux va de 5 à 100 nm. C'est celle que nous visons.

I.B.2. Nanoparticules d'or

I.B.2.a) Généralités

Les nanoparticules d'or sont des objets à intérêt multidisciplinaires : leurs applications se retrouvent dans les domaines de l'optique, des capteurs, de l'énergie, en catalyse, en électronique ou encore en médecine [64][65].

L'or cristallise selon une structure cubique face centrée. Les nanoparticules d'or ont la particularité de pouvoir être facilement synthétisées sous diverses formes, tailles et structures (Figure 13), allant jusqu'à la maîtrise de particules possédant un nombre déterminé d'atomes d'or dans le cas des clusters (agrégats) Au_{20} , Au_{55} , etc [66].

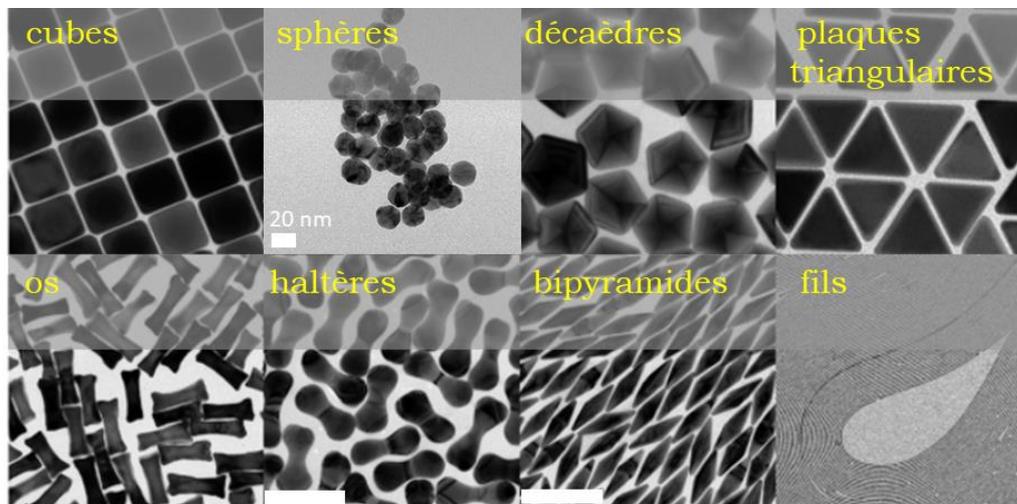


Figure 13 : diversité des morphologies des nanoparticules d'or : clichés TEM. Echelles de 100 nm. Extrait de [67].

L'or ne s'oxyde pas [67] et présente l'avantage d'être biocompatible et stable chimiquement excepté dans le cas des très petites NPs (<5 nm [68]).[69]

Enfin, les nanoparticules d'or sont aussi facilement fonctionnalisables, en particulier avec des molécules thiolées, en raison de l'affinité et de la robustesse de la liaison Au-S [70].

I.B.2.b) Résonance plasmon de surface localisée

La principale caractéristique des nanoparticules d'or est l'existence de la résonance plasmon de surface localisée (LSPR) : lorsqu'un champ électromagnétique illumine une nanoparticule métallique dont les dimensions sont inférieures à la longueur d'onde de la lumière incidente, les électrons libres oscillent collectivement. Lorsque cette oscillation collective est en résonance avec la fréquence de l'onde incidente, une forte extinction se produit due à l'absorption et la diffusion de l'onde

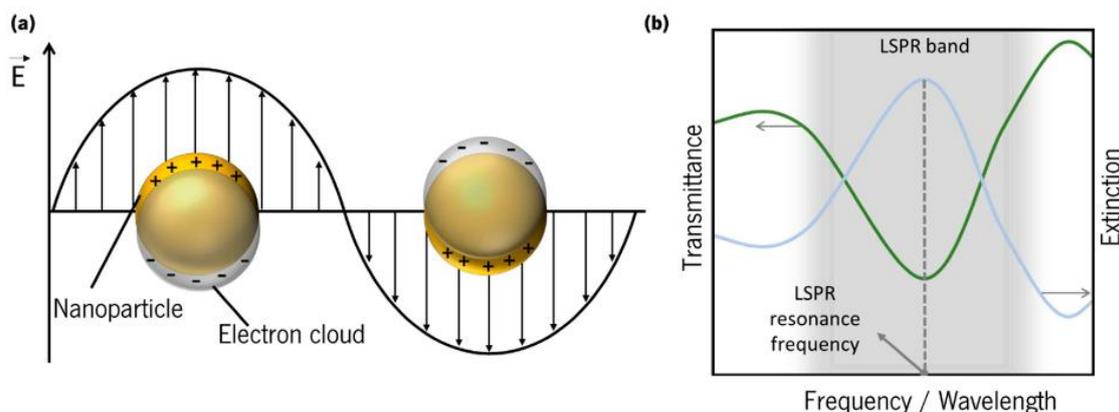


Figure 14 : schéma de la résonance plasmon de surface.

incidente. Ceci correspond à la résonance plasmon de surface localisée (LSPR), illustrée Figure 14 [71].

La position et la largeur de cette bande de résonance sur le spectre d'extinction sont déterminées par la taille et la forme des nanoparticules (exemples en Figure 15), l'environnement dans lequel elles se trouvent, ainsi que leur état d'agrégation. Le spectre d'extinction permet de revenir à la taille et à la concentration des NPs, nous le verrons au chapitre 2. La fenêtre biologique qui correspond au domaine de longueur d'onde pour lequel la longueur de pénétration de la lumière dans les tissus est maximale est comprise entre 650 et 900 nm. Il est utile de placer la LSPR dans cette fenêtre en adaptant la morphologie des particules ou en élaborant des structures cœur-coquille [72], [73].

La résonance plasmon de surface localisée donne aux nanoparticules d'or des propriétés thermiques. Après l'absorption optique correspondante, les électrons oscillants transfèrent leur énergie cinétique au réseau cristallin de la particule via des interactions électron-phonon. Ensuite la chaleur emmagasinée est transmise à l'environnement via des interactions phonons-phonon.

Par ailleurs, les nanoparticules d'or de quelques nanomètres voient une nouvelle propriété apparaître. Le mécanisme sous-jacent est celui du confinement quantique et se manifeste essentiellement dans des clusters de moins de 1000

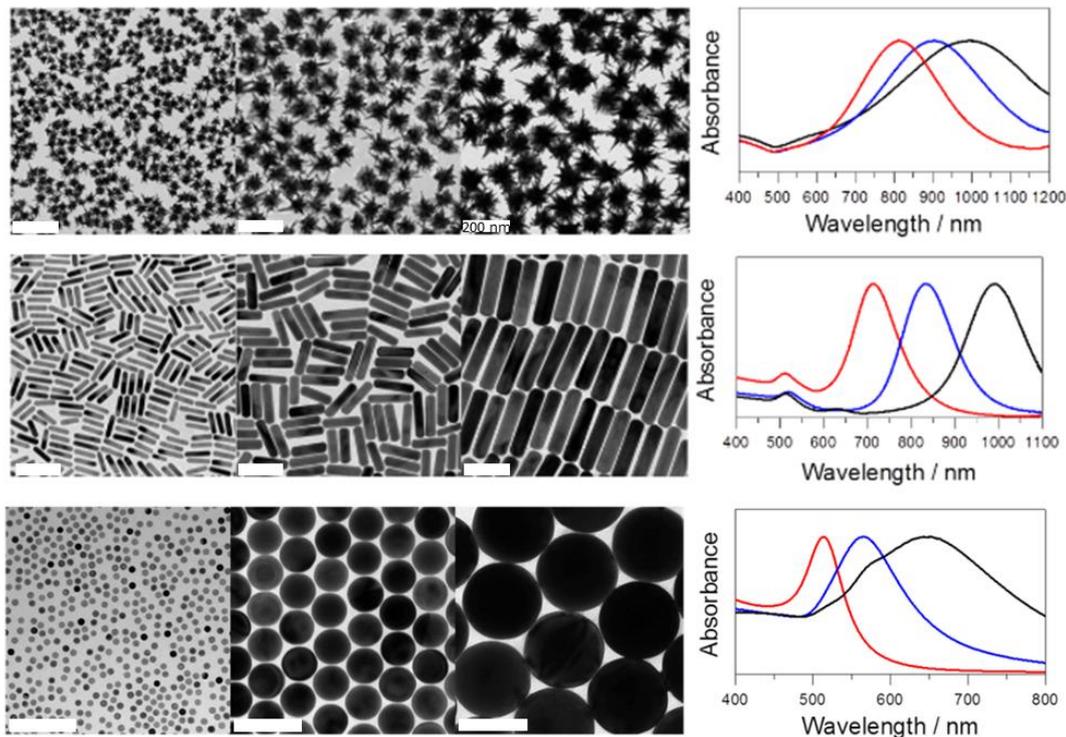


Figure 15 : Impact de la taille et de la forme des nanoparticules d'or sur la position de la résonance plasmon : clichés TEM des NPs et spectres UV-visibles correspondants. Echelles de 100 nm. Extrait de [67].

atomes environ : le nombre d'électrons libres étant largement réduit, la bande continue classique des métaux est rompue et les électrons se retrouvent sur des états d'énergies discrets quantifiés. Suite à une exposition lumineuse, les électrons s'excitent vers des états d'énergies plus élevés, puis se dés excitent en émettant de la lumière. Les nanoparticules d'or sont donc luminescentes. Cette luminescence

concerne les objets d'une taille inférieure à 2.2 nm qui est d'un ordre de grandeur inférieur à ceux qui vont être synthétisés dans cette thèse [74].

I.B.2.c) Applications biomédicales des AuNPs

Les propriétés mentionnées ci-dessus permettent l'utilisation des nanoparticules dans divers domaines biomédicaux. Elles sont souvent des agents doubles, couplant imagerie et thérapie [73].

Tout d'abord, elles sont utilisées en imagerie i) après greffage de molécules fluorophores, ii) en utilisant leur résonance plasmon ou encore iii) par leur luminescence intrinsèque. La publication de Wu et al [75] revoit en détail les différents modes d'exploitation des NPs d'or en imagerie et l'avantage de la LSPR : l'imagerie « directe » (microscopie à contraste interférentiel différentiel, microscopie en champ sombre...), le monitoring via l'effet SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy) et l'imagerie de fluorescence. On retrouve aussi des greffages d'agent de contraste comme le gadolinium permettant des applications en IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) [76]. Dans certains cas, les nanoparticules d'or sont utilisées en imagerie dite multimodale, où différentes propriétés sont exploitées et les techniques croisées.

Les applications en thérapie concernent notamment les propriétés anticancéreuses. Les propriétés thermiques dues à la LSPR permettent des applications utilisant l'hyperthermie [77]. Le numéro atomique de l'or (79) et sa forte absorption des rayons X sont d'intérêt pour des applications en radiothérapie [78]. Les nanoparticules d'or sont aussi utilisées en thérapie photodynamique [79].

Enfin, la délivrance de médicament est aussi possible. Leurs propriétés optiques permettent une libération photo-réglée des substances actives [80].

I.B.3. Fonctionnalisations de surface

Le choix des molécules a été guidé par la possibilité de fonctionnaliser toutes les différentes nanoparticules choisies précédemment afin de permettre des comparaisons et de pouvoir distinguer l'influence des coeurs et celle des fonctionnalisations. La Figure 16, extraite de la publication d'Hajipour *et al.* [81], illustre les différents coatings utilisés dans les publications étudiant la couronne protéique. La grande majorité concerne des NPs qui n'ont pas de coating ou celui-ci n'est pas déclaré. Les polymères (PEG PolyEthylèneGlycol, PVA PolyVinyl Alcoool, PVP PolyVinylPyrrolidone) sont les coatings les plus étudiés.

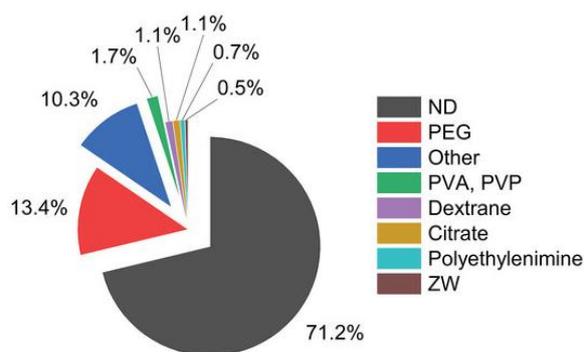


Figure 16 : fonctionnalisation de surface : pourcentage des publications de nanoparticules traitant directement ou indirectement de la couronne protéique. ND = non informé. Etude extraite de [78], sur 1700 publications.

Les molécules de fonctionnalisations retenues sont le PEG, le PVA, le citrate et le glutathion pour les raisons précisées ci-dessous.

Le polyéthylène glycol (PEG) est la molécule standard de fonctionnalisation de nanoparticules (Figure 16). Soluble dans l'eau, flexible, de longueur de chaîne

variable et avec des groupements fonctionnels variés en terminaison de chaîne (Figure 17), elle permet une stabilisation stérique et/ou électrostatique selon le choix des groupements terminaux de la molécule. Les principales propriétés d'un coating de PEG sont la stabilité colloïdale qu'il apporte, sa biocompatibilité et la capacité à augmenter le temps de circulation des NPs [82].

Le PEG est déjà utilisé sur certains médicaments commercialisés, comme la doxorubicine, traitement anti-cancéreux (ou DOXIL aux Etats-Unis)[83] ou le macrogol comme laxatif. Des fonctionnalisations avec du PEG-SH de poids moléculaire 2000 g/mol sous forme solide (CAS 134874-49-0) et 350 g/mol (CAS 651042-82-9) ont été effectuées afin d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer avec la même molécule en surface que celle sur les nanoparticules d'or.

Le polyvinyl alcool (PVA) est un autre polymère linéaire biocompatible, inerte et stable utilisé pour le coating de nanoparticules. Contrairement au PEG, il n'existe pas l'heure actuelle pas de nano-médicament comprenant du PVA. Cependant, le nombre d'essai *in vitro* les étudiant est en augmentation [84].

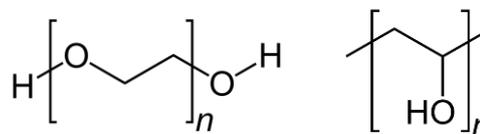


Figure 17 : formules semi-développées du PEG (gauche) et du PVA (droite).

Le citrate est de même largement utilisée dans les synthèses de NPs, occupant à la fois le rôle d'agent stabilisateur et celui de réducteur. Cette molécule est par ailleurs naturellement présente dans le corps humain (produit du cycle de Krebs).

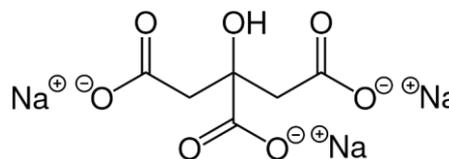


Figure 18 : formule semi-développée du citrate

Le glutathion est un tri-peptide (Glu-Cys-Gly) naturellement présent dans l'organisme, notamment au niveau intracellulaire, possédant des propriétés antioxydantes et détoxifiantes [85]. Cette molécule peut, tout comme le citrate, servir d'agent réducteur et d'agent stabilisant dans les synthèses de NPs et est soluble dans l'eau.

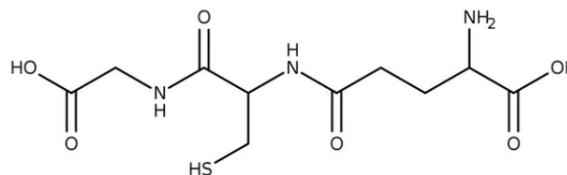


Figure 19 : formule semi-développée du GSH

I.C. Conclusion partielle

Dans cette première partie a été illustrée la variété des NPs. Les choix des systèmes étudiés ont été explicités à la fois pour la composition des nanoparticules et pour les coatings. Les choix que nous avons retenu sont les nanoparticules d'oxyde de fer, d'or et de silice. Les molécules de fonctionnalisations sont les polymères (PEG et PVA), le citrate et le glutathion. La synergie des différents paramètres dans l'impact sur les comportements biologiques a été soulignée. Les conclusions des études de l'impact des différents paramètres peuvent varier en fonction des méthodes de caractérisation ou des traitements utilisés. Une explication possible, et l'autre aspect majeur à prendre en compte dans de telles études, est la formation d'une couronne protéique, intermédiaire entre les nanoparticules et l'environnement biologique. [86]

II. La couronne protéique (PC) : un défi pour les nanoparticules à visées biomédicales

Les nanoparticules sont généralement injectées directement dans le sang. Un problème se pose : avant d'atteindre leur site cible, elles interagissent tout d'abord avec les molécules de l'environnement dans lequel elles sont injectées. Le sang est un milieu complexe composé de cellules (globules blancs et rouges) et de plaquettes baignant dans le plasma. Ce dernier contient divers solutés : sels, hormones, lipides, sucres, acides aminés et, en particulier, des protéines. Celles-ci, en majorité, vont interagir avec les nanoparticules pour former la couronne protéique (ou *protein corona* en anglais : PC) [1], [87]. Cette dernière fait partie intégrante de l'identité biologique du système, change les propriétés biophysiques des particules initiales, et constitue le premier élément avec lequel l'organisme et les cellules vont interagir.

II.A. Mécanismes en jeu à l'interface NPs – milieu biologique

II.A.1. Formation et évolution

II.A.1.a) Interactions nanoparticules-protéines : généralités

Les nanoparticules sont des objets réactifs qui tendent à réduire leur énergie de surface très élevée [88], [89]. A l'interface nanomatériau-milieu biologique, les interactions mises en jeu sont multiples : électrostatiques, stériques, hydrodynamiques, électrodynamiques, de solvatation, de déplétion ... [90].

Ces interactions sont déterminées par la nanoparticule et sa fonctionnalisation. Elles sont influencées par les paramètres intrinsèques aux nanoparticules (taille, forme, rugosité, charge, chimie de surface : charge, densité, groupements fonctionnels, hydrophobicité), par les paramètres de l'environnement dans lequel elles sont introduites et de leur temps d'exposition [91]. Les principaux paramètres (taille, charge, chimie de surface, rugosité) sont étudiés dans la revue insérée plus bas (II.B). La formation et la composition de la couronne protéique sont donc propres à chaque type de nanoparticule.

II.A.1.b) Un phénomène dynamique

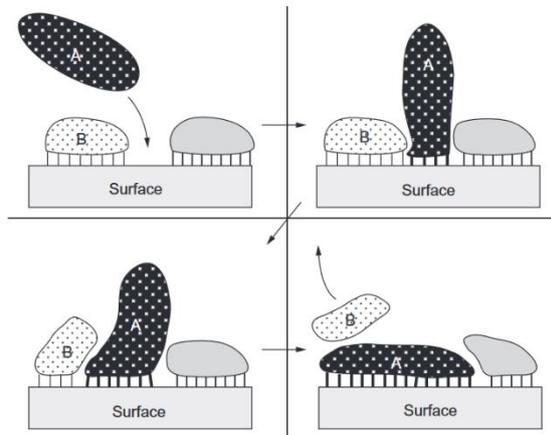


Figure 20 : représentation de l'effet Vroman : une protéine A possédant une meilleure affinité avec la surface arrive sur cette dernière, déplaçant la protéine B. La protéine A, en plus d'avoir une plus grande affinité, est généralement plus grosse et flexible : elle adhère beaucoup plus à la surface. Extrait de [82].

La formation de la couronne protéique à la surface des NPs est un phénomène dynamique. La couronne évolue dans le temps, en fonction notamment des constantes d'association et de dissociations des protéines, et du milieu dans lequel se trouve les NPs. Pour ces raisons, les protéines peuvent être présentes en proportions différentes dans la couronne protéique [1].

Cependant, ces constantes seules ne suffisent pas à prédire ces interactions. Il faut aussi prendre en compte les effets compétitifs et coopératifs entre les protéines [92]. Le comportement compétitif d'adsorption peut être nommé l'effet Vroman [93]. Il décrit la redistribution des protéines

en fonction de leurs affinités respectives avec la surface des nanoparticules. Il est illustré en Figure 20, extraite de Felgueiras *et al.* [94], et repose sur l'hypothèse que l'identité des protéines adsorbées à la surface d'un matériau peut changer avec le temps, mais que leur nombre est plus ou moins stable. Les protéines présentes dans les premiers instants sont déplacées et remplacées par des protéines moins mobiles mais présentant une plus grande affinité électrique et biochimique.

Ainsi, dans un premier temps les protéines les plus abondantes (telles que l'albumine, fibrinogène, apolipoprotéines) avec des hautes constantes d'adsorption et de diffusion s'adsorbent puis sont remplacées par des protéines moins abondantes mais possédant une plus forte affinité pour la nanoparticule en question.

II.A.1.c) « Hard » et « soft » corona

La couronne peut être constituée de plusieurs « couches » [91], [95]. La première, appelée « hard corona » (HC), est formée de protéines fortement liées possédant une haute affinité avec la surface. Elle se forme et se stabilise rapidement [96]. La seconde, plus externe, dite la « soft corona » (SC), est formée de protéines faiblement liées aux autres protéines. Les interactions protéines-protéines sont donc aussi présentes et non négligeables. De par la force de ses liaisons, des échanges dynamiques avec le milieu et donc de sa courte durée de vie [95], la SC est plus difficile à analyser. En outre, les méthodes d'isolation des couronnes (comme discutées en II.B) amène toujours des discussions sur la séparation ou non des HC et SC. Leurs différences sont résumées en Figure 21 extraite de [97].

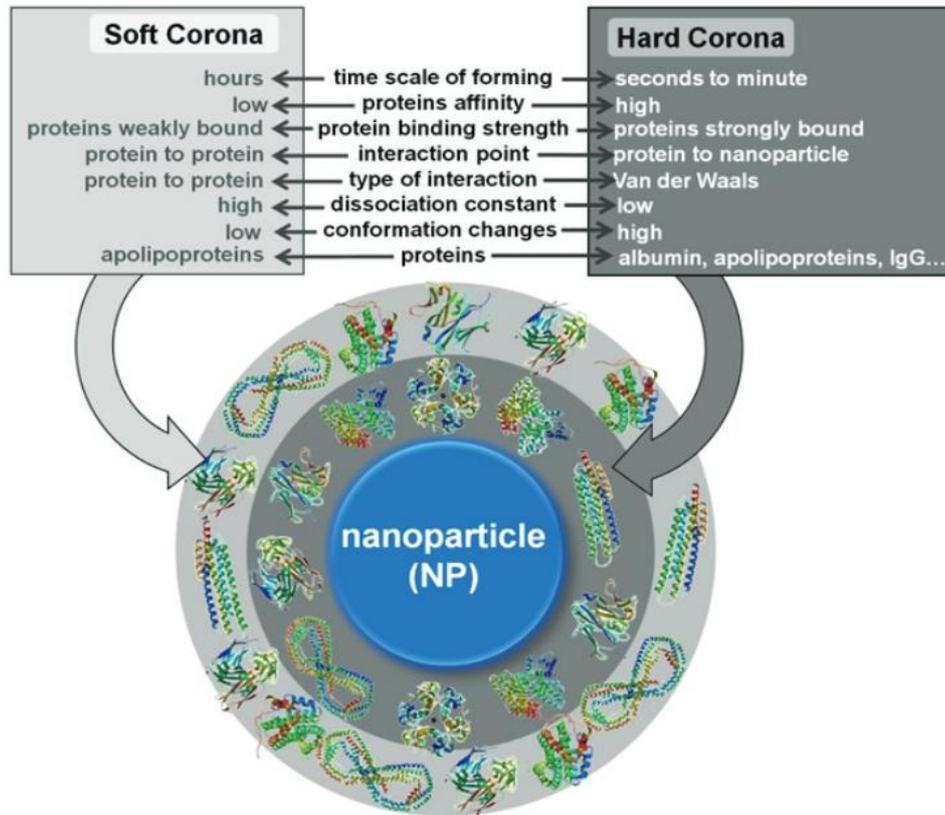


Figure 21 : Interactions nanoparticules – milieu biologique : hard & soft corona. Extrait de [84].

II.A.2. Interactions entre nanoparticules et protéines : impacts sur la structure des protéines et conséquences

Les interactions nanoparticule-protéine peuvent engendrer des changements de conformation des protéines allant parfois jusqu'à une altération de la structure secondaire [98], ce qui influence drastiquement les fonctions biologiques de ces protéines (comme la perte d'une fonction enzymatique par exemple [99]). Suite à l'adsorption, nombre de protéines sont dénaturées de manière réversible ou non. Les mécanismes à l'origine de ces changements de conformation font toujours l'objet de recherches. Ils peuvent par exemple être liés à une libération d'énergie libre via une reconstruction de surface (Figure 22)[90].

Les changements de structure des protéines peuvent aussi exposer des parties initialement masquées : les épitopes cryptiques [100]. Un épitope, aussi appelé déterminant antigénique, est le site de liaison d'un antigène avec un anticorps. Les épitopes cryptiques sont inaccessibles au système immunitaire en raison de leur localisation dans la structure native des protéines. Une révélation de ceux-ci peut engendrer des réponses immunitaires, voire des maladies auto-immunes [101].

Les nanoparticules, quant à elles, peuvent être sujettes à plusieurs phénomènes suite à ces interactions. Outre une reconstruction de surface, une dissolution accélérée peut être observée notamment dans le cas des oxydes [90], [102]. L'adsorption de protéines peut aussi impacter la stabilité colloïdale des nanoparticules et induire leur agrégation [103].

Ces mécanismes, résumés en Figure 22 extraite de [90], ont des conséquences directes sur l'état physico-chimique des nanoparticules et des protéines, et sont donc en partie responsables de la formation et de la composition de la couronne protéique.

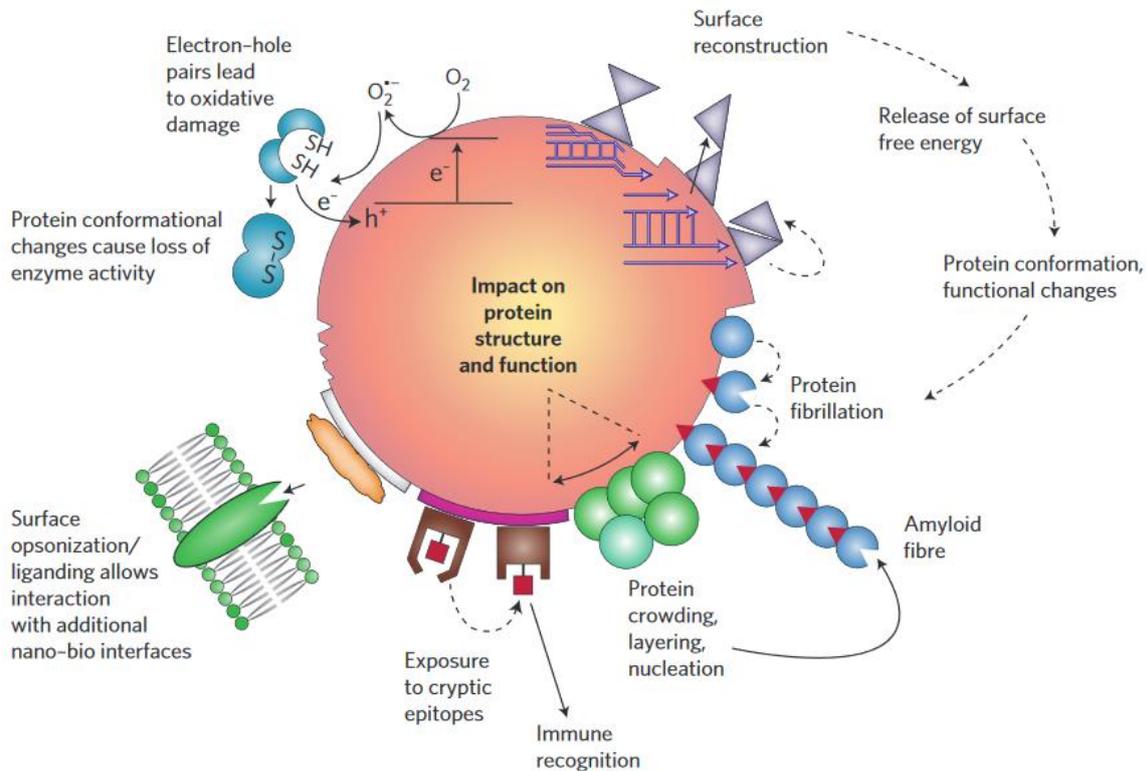


Figure 22 : Impacts potentiels des interactions NPs-protéines sur les protéines. Extrait de [87].

II.B. Impact de la couronne protéique sur les comportements biologiques des NPs

Par l'ensemble des mécanismes mentionnés précédemment et de la nouvelle identité acquise avec les protéines, la couronne protéique impacte les comportements biologiques des NPs comme leur biodistribution et leur internalisation, et influence donc leur efficacité et leur toxicité. Ces effets sont, à l'heure actuelle, plus étudiés *in vitro* qu'*in vivo*.

Cette partie de bibliographie fait l'objet d'une review publiée en 2021 dans *Nanoscale Advances*, en collaboration avec Dr. Nimisha Singh [104].

Dans un premier temps, les principaux paramètres environnementaux et relatifs aux nanoparticules (taille, charge, chimie de surface, rugosité) influençant la couronne protéine ont été étudiés.

Le contrôle de nombre de paramètres *in vivo* étant impossible, la deuxième partie analyse le possible contrôle de la couronne protéique *in vivo* via des stratégies de chimie de surface ou via une pré-fonctionnalisation de la surface par des protéines.

Dans la troisième partie, les paramètres influençant la couronne protéique *in vivo* sont revus, puis l'accent est mis sur le lien entre *in vivo* et *in vitro* en mettant en évidence son caractère non extrapolable. L'importance et l'intérêt de travailler *in vivo* est mis en avant, et on souligne que lors de la rédaction de cet article (en 2021), pas plus d'une vingtaine de publications étudiant la couronne protéique consistait en des manipulations *in vivo*.

Enfin, la dernière partie présente une analyse approfondie de l'*in vitro* versus l'*in vivo*, expose les difficultés du domaine et propose quelques pistes à exploiter pour les contourner.

***In vivo* protein corona on nanoparticles: does the control of all material parameters orient the biological behavior?**

Nimisha Singh,^{a†} Célia Marets,^{a†} Julien Boudon,^a Nadine Millot,^a Lucien Saviot^{a*} and Lionel Maurizi^{a*}

Nanomaterials have a huge potential in the research fields from nanomedicine to medical devices. However, surface modifications of nanoparticles (NPs) and thus of their physicochemical properties failed to predict their biological behavior. This requires investigating the “missing link” at the nano-bio interface. Protein corona (PC), the set of proteins binding to the NPs surface, plays a critical role in particle recognition by the innate immune system. Still, *in vitro* incubation offers a limited understanding of biological interactions and fails to explain the *in vivo* fate. To date, several reports explained the impact of PC *in vitro* but its applications in the clinical field have been very limited. Furthermore, PC is often considered as a biological barrier reducing the targeting efficiency of nano vehicles. But the protein binding can actually be controlled by altering PC both *in vitro* and *in vivo*. Analyzing PC *in vivo* could accordingly provide a deep understanding of its biological effect and speed up the transfer to clinical applications.

This review demonstrates the need for clarifications on the effect of PC *in vivo* and the control of its behavior by changing its physicochemical properties. It unfolds the recent *in vivo* developments to understand mechanisms and challenges at the nano-bio interface. Finally, it reports recent advances in the *in vivo* PC to overcome and control the limitations of the *in vitro* PC by employing PC as a boosting resource to prolong the NPs half-life, to improve their formulations and thereby to increase its use for biomedical applications.

Introduction

The idea of using nanomaterials for diagnoses and treating deadly diseases has driven biomedical research for decades. Nanoparticles (NPs) can be used in many biological and medical fields as diagnostics probes¹⁻⁴, drug delivery vectors^{5,6} or for other therapeutic purposes⁷⁻¹⁰. In all these applications, the surface of NPs have to be functionalized in order to improve stability, biocompatibility or targeting efficiency¹¹⁻¹³. Surface chemistry is an inherent parameter in the set-up of innovative nanohybrids. Small drug molecules often suffer from poor pharmacokinetics. They exhibit rapid clearance and fail to reach the targeted sites *in vivo*. Consequently, severe side effects may result from the expected therapeutic benefits. In addition, the *in vitro* efficacy of drugs often translates poorly in a clinical setting¹⁴. Using NPs can help homogenize and improve the efficacy of therapeutic molecules by increasing their retention, circulation times and targeting. Engineering NPs allow optimizing different parameters: charge, size, shape and surface chemistry including the nature of the nanoparticle itself (metallic or

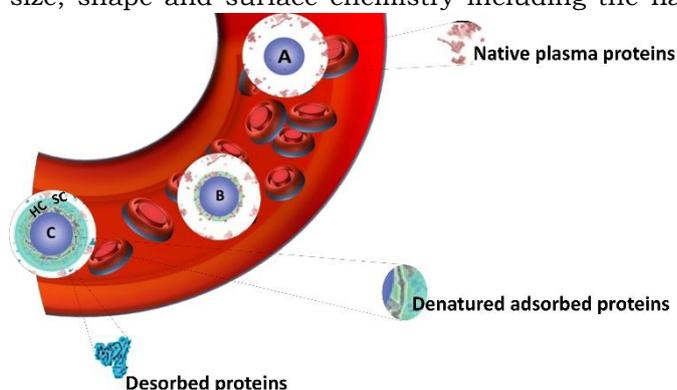


Figure 23 : Schematic view of the formation of the hard protein corona around a nanoparticle in blood plasma. Adapted from²¹ Copyright© (2016) with permission from Elsevier. A) Nanoparticle entering into the plasma, B) Smaller proteins adsorb first and some are denatured forming a soft corona (SC), and C) Larger proteins replacing the smaller ones (Vroman effect) followed by denaturation predominantly located in the liver and spleen as reported by Xu *et al.*¹⁵. An important point in designing a successful nanomedical tool is to understand the biological interactions with all these diverse engineered NPs with optimized size, shapes, charge *etc.* on the surface. NPs' charges also modify the uptake or the biodistribution of NPs¹⁶⁻¹⁹. However, such observations are not only the result of NPs charges but also of the interaction occurring at the interface between NPs and biological fluids.

organic) or the molecules used to functionalize them (polymers with different chemical groups and lengths, antibody *etc.*). These functionalizations influence the NPs' biological behaviors. For example, it was reported that the surface chemistry of NPs controls their *in vivo* biodistribution due to the type of corona formed round them as observed after tail vein injection into mice. While there are significant differences in the behavior depending on the type of NPs, all the investigated NPs, with hydrodynamic sizes higher than 30 nm, are

In fact, after introduction into a biological fluid, the surfaces of NPs are immediately surrounded by biomolecules such as proteins, lipids, sugars and nucleic acids. It is then difficult to predict the nanosystem surfaces once it is exposed to the biological medium as NPs evolve differently in biological media. Molecules interact through different forces with NPs (London dispersion forces, Coulomb forces, van der Waals forces, hydrogen bonding and hydrophobic effects) causing the formation of a corona. Among these biomolecules, proteins turn out to play a significant role in the formation of the so-called protein corona (PC) as shown by proteomics studies. This term was introduced in 2007 by Cedervall *et al.*²⁰. In this study, they also introduced the terms "hard corona" (HC) and "soft corona" (SC). SC results from proteins involved in temporary low affinity

interactions while HC largely results from permanent high affinity interactions as schematized in Figure 1²¹. Proteins having higher affinities and resulting in HC interact first with the NPs followed by the ones forming SC. In fact, when interactions are observed as a function of time, SC results from short time interactions while HC is made of proteins which bind to the NPs for several hours²². Walkey *et al.*²³ suggested that analyzing the HC proteins should be more relevant than analyzing the SC proteins to predict the biological responses of NPs. It was indeed reported for many nanomaterial systems that the HC contribution dominates the biological responses such as, for example, with CdSe/ZnS quantum dots in human blood serum²⁴ or with the analysis of hemolysis using graphene oxide functionalized with D-mannose²⁵. HC is now considered to be the most important corona to analyze²⁶. As a result, it is often confused with the classical PC. Therefore, in all the studies summarized in this review and the literature, PC refers mostly to HC. For ease of understanding, the different forms of corona mentioned in this review including bio corona, SC, HC, preformed corona, *in vitro*, *in vivo* corona, synthetic corona, polymer corona *etc.* will be referred to as PC.

The formation of PC is a spontaneous and competitive process. It is influenced by the surface properties of NPs (size²⁷, charge²⁸, shape²⁹, chemistry³⁰⁻³² *etc.*), environmental parameters such as the nature of the biological medium³³ (protein source and concentration), as well as the exposure time³⁴. It is nowadays established that PC, in turn, also control the NPs' biological identity and behavior. For instance, positively charged NPs are usually recognized by opsonins which can result in their faster elimination from the mononuclear phagocytic system (MPS)³⁰. Thus, negatively charged NPs leading to negative zeta potentials (30-50 mV) are more prone to avoid opsonization in physiological conditions³⁵. Ideally, intravenous (i.v.) administered NPs undergo MPS which recognizes the foreign substances by adsorbing specific serum proteins *via* opsonization. It is reported that the presence of opsonins (blood proteins, such as immunoglobulins (Ig) and complement factors) in the corona facilitates the NPs cellular uptake through the opsonin-cognate receptors expressed on the phagocytic surface^{36,37}. *In vitro*, adsorbed protein layers reportedly also influence the cellular uptake³⁸ and trafficking³⁹, whereas *in vivo* preferential binding of proteins may affect the particle distribution³¹. These are some observations suggesting that several *in vitro* and *in vivo* evaluations do not correlate. However, the underlying question for understanding the influence of the NP-protein interactions on the biological response to NPs *in vitro* and *in vivo* remains unanswered.

Several parameters influence the *in vitro* incubation of NPs. They provide an insight on the biological interaction with NPs. But up to now they have failed to explain the fate^{40,41} of NPs *in vivo*. Not enough publications highlight the impact of PC on the *in vivo* behavior of NPs even if this limits their potential application in biomedicine. The main reason for this situation is that *in vivo* evaluations are technically very complicated and expensive. In this review, we will be exploring various aspects of PC *in vivo* and we will present and discuss the last advances in this field. After a short summary of the key parameters responsible for the formation of the PC obtained in *in vitro* studies, we will unravel the PC formation and how it can be controlled in designing nanomaterials for targeted *in vivo* applications. Then, we will focus on studies that actually investigated *in vivo* the PC formation on NPs. We will discuss the key parameters influencing PC *in vivo* and the differences observed between *in vitro* and *in vivo* analyses. We will

finally discuss some open questions and inherent problems of this recent research field, the limitation of which is crucial to overcome in designing nanotools for biomedical applications.

Parameters influencing the Protein Corona

Before focusing on the studies dedicated to the control and the understanding of PC *in vivo*, it is important to present succinctly the main advances obtained with *in vitro* measurements and studies. The PC formation on NPs' surfaces has been found to be highly dependent on experimental parameters (NPs composition, shape, size, surface charge, roughness, protein type, concentrations, pH and ionic strength of the biological media). These can be used to tune the composition or minimize the formation of PC^{42–44}. The parameters influencing PC can be divided into two categories: environmental parameters and material parameters.

Environmental parameters influencing the PC formation

The adsorbed proteins forming PC are known to play a key role during the interaction of NPs with cells. Several environmental parameters (Figure 2) affects the formation of PC *in vitro* particularly the medium surrounding the NPs and the exposure conditions. The biological fluid or the medium is composed of different proteins which are known to control the cellular uptake of NPs. This was explained by Tekie *et al.*⁴⁵ for the uptake of chitosan and carboxymethyl dextran complexes (MCF7 cell line). Fetal Bovine Serum (FBS) enhances the uptake due to the presence of proteins in the serum such as alpha-trypsin inhibitor chains and lipoproteins which increase the cell function. Similarly, proteins concentration and exposure time contribute equally to the protein adsorption on NPs. Controlling the PC formation is undoubtedly a challenging task but several results highlight that altering the biological parameters along with the physicochemical properties of NPs enable to forecast the corona formation. As analyzed by Partikel *et al.*⁴⁶, proteins adsorption on poly(lactide-*co*-glycolic acid) (PLGA) NPs depends on the serum type and concentration. In addition, human serum was shown to significantly modify the corona

composition resulting in a concentration-dependent desorption of abundant proteins along with the adsorption of high affinity proteins with lower abundance. In addition, time-dependent cell interaction both in the absence and the presence of a preformed corona showed a significant influence on a human liver cancer cell line (HepG2) in which the presence of corona increases the cell interaction compared to bare NPs which results in a higher uptake of NPs. Temperature and pH are also important factors in the interaction of NPs with proteins. Galdino *et al.*⁴⁷ explained that pH influences the protein adsorption in the Bovine Serum Albumin (BSA) and SiO₂ NPs system. They concluded that enthalpy

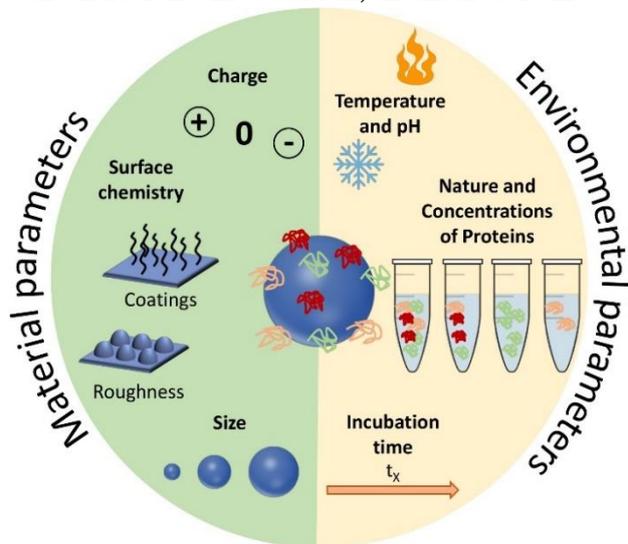


Figure 24 : Summary of the main parameters influencing the formation of protein corona (PC). These parameters are divided into two: the ones related to the environment and those related to the NPs.

controls the interaction along with an electrostatic contribution that can be altered by changing pH. Gorshkov *et al.*⁴⁸ further explained that by varying pH and temperature in the human blood plasma and a silver NPs system, different tertiary protein structures and charge localizations are observed. PC formation is a dynamic process involving complex interactions. These interactions are highly dependent on the biological environment but the NPs surface chemistry and properties must not be ignored. Thus, a careful evaluation of both the nano-bio surfaces and interactions can further help investigate the manifold behaviors of NPs.

Many external parameters influence the formation of PC on NPs. With the aim of controlling PC for *in vivo* applications, most of these parameters would be difficult to modify, because living bodies are complex organisms with varying pH, temperature, concentration and nature of proteins *etc.* Solutions to control the PC formation might therefore mainly come from the NPs' surface itself that also influences proteins' adsorption.

Material parameters influencing PC

In addition to the biological fluids' properties, the particulate nature of NPs dictates a preferential interaction on biointerfaces depending on the physiochemical properties of their surfaces as illustrated in Figure 2. Size, charge and more generally the chemistry of NPs' surfaces influence the amount and composition of adsorbed proteins.

Impact of the size of NPs.

The surface of NPs strongly attracts blood proteins. The binding constant and the number of binding sites are highly dependent on the NPs dimensions because of the surface curvature. 37% of all the proteins identified in the corona show significant variations in their binding behavior when varying the size of NPs⁴⁹. This strongly suggests that the size directly affects the nature of PC. In mouse serum not only a larger number of proteins binds bigger NPs but also a more complex PC is formed²⁷. However, in some cases, the reverse phenomenon is observed. This is the case for TiO₂ NPs with pepsin where smaller sizes result in a larger number of proteins on the surface⁵⁰. Polystyrene (PS) NPs with Human Serum Albumin (HSA) follow this trend too⁵¹. In addition, reports in the literature also show that the size of NPs affects the protein abundance in PC but also changes the PC composition affecting its biological fate⁵² as explained by Zhang *et al.*⁵³ with different sizes of silica NPs towards the protein composition of PC. The protein pattern observed for the same masse and different sizes of NPs suggests that increasing the NPs size decreases the number of adsorbed proteins of either the interfacial ones (proteins between the NPs and corona phases) or those from HC, which is consistent with the decrease of the NPs' surface area.

Ho *et al.*⁵⁴ studied the impact of PC on the cellular uptake in human umbilical vein endothelial cells (HUVAC) of PS NPs and PEG-functionalized PS NPs of different sizes. PS NPs and PS-PEG NPs of 20 nm and 40 nm showed no uptake difference. However, for larger PS NPs (100 nm and 200 nm), PC significantly increased the uptake by 10 times compared to PEGfunctionalized NPs. On the other hand, PEG-functionalized PS NPs follow the opposite trend. Although the less statistical difference was reduced, the uptake was greater for smaller NPs (20 nm and 40 nm) by 1.3 times compared to PS NPs. Less is known about the uptake behavior in the presence of PEGylated NPs of different sizes. Similar studies were performed on corona-coated Au NPs.

Larger sizes favored an higher uptake in HepG2 cells⁵⁵. This increase is possibly due to the difference in composition and conformation of the serum proteins forming PC. Proteins bound to larger NPs tend to undergo conformational changes to adjust in larger surface area and surface curvature³⁴. Similar results were obtained by Binnemars-Postma *et al.*⁵⁶ when analyzing the uptake of silica NPs by M1 and M2 macrophages in the presence of serum. Remarkably, 500-nm and 1000-nm NPs had a greater uptake in Monocytic human THP-1 cells than the 200-nm ones. This suggests that the adsorption of serum proteins on larger particles favors the uptake, that the PC which is formed is enriched with complement factors and that IgG likely governs the higher uptake of larger NPs.

Conclusively, NPs surface curvature strongly affects the protein adsorption as protein-binding affinities are different for the bulk material and NPs surface. Thus, corona formed on NPs made of the same material differ in composition⁵⁷. Undoubtedly, PC formation is a continuous process with changes in PC composition with time due to the motion of already adsorbed proteins which may be replaced by other proteins having stronger binding affinities until the process reaches an equilibrium which is known as the "Vroman effect"⁵⁸. On the other hand, in terms of sorting preferred biological medium, it depends on the choice of molecule to be selected in order to form PC which depends on the orientation on the surface and the degree of unfolding which permits various interactions based on the charge, hydrophobicity *etc.*

Impact of the charge of NPs

Electrostatic forces play an important role in the adsorption of proteins. It was observed that low surface charges result in fewer adsorbed proteins with distinctively slower opsonization than strongly charged particle surfaces⁵⁹. This suggests that zwitterionic coatings (amino acids, sulfobetaine, phosphorylcholine, poly(acrylic acid), and poly(maleic anhydride-*alt*-1-alkene) derivatives) can lead to a greater reduction in the adsorption of proteins^{60,61}. For example, sulfobetaine headgroup can be designed with controlled hydrophobicity preventing the adsorption of proteins and the formation of PC when observed with human serum and MCF-7 (breast adenocarcinoma) cell line. Indeed, Debayle *et al.*⁶² compared sulfobetaine with other zwitterionic polymers (phosphorylcholine and carboxybetaine). A complete absence of PC was observed with sulfobetaine. Other polymers showed reversible adsorption and aggregation. Additionally, positively charged NPs form a thicker PC than negatively charged ones as exhibited by paclitaxel loaded poly(ϵ -caprolactone) on MCF-7 cell line and HSA medium^{63,64}. Liposomes, which can be considered as organic NPs, depict the same behavior with charged surfaces adsorbing more proteins than neutral ones. Additionally, liposomes made of anionic or cationic lipids preferentially adsorb plasma proteins with isoelectric point (IEP), IEP > 5.5 or IEP < 5.5 respectively⁶⁵. The chirality of the functionalized group may also be responsible for different protein binding behavior as observed by Qu *et al.*⁶⁶ with InP@ZnS quantum dots. The adsorption of proteins (HSA) differs with the chirality (D- and L- penicillamine) of the functionalized group, impacting the binding affinity and conformation states. This leads to different biological interactions and protein exchange.

Different charge modifications on the same kind of NPs often result in different structural conformations of proteins. For PS NPs, either a protein conformation change is observed or it remains unaffected, with NH₂ or COOH surface functionalization respectively²⁸. In fact, one type of proteins when adsorbed shows different secondary structure depending on the chemical group charges. Different epitopes can be exposed thus influencing the interaction of NP-PC complexes²⁸. This in turn influences the various paths for cell internalization resulting in

different uptake behavior. Indeed, particle uptake is often triggered by phagocytosis where NPs interact with the responsible receptors on the cell surface. Various functionalized PS NPs were also studied to understand the intracellular fate of PC. A larger number of proteins was carried on the aminated surface and degraded within the lysosomes⁶⁷. PS-NH₂ NPs thus showed a 5 times more internalized PC (following endocytosis, where the NPs are entrapped by the cell membrane and drawn into the cell) than their COOH counterparts as measured by flow cytometry. This consequently gives rise to a different uptake process on A549 cells (adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells) with an increased exchange rate of corona in contact with the cellular recognition machinery. Once internalized, most NPs follow the lysosomal pathways. Additionally, amino groups on the surface are a predominant factor in the formation of PC and have a subsequent impact on the cellular uptake, which is controlled by its amine type, location and density. Similar experiments were performed with two cell lines (A549 and J774A.1, mouse monocyte macrophage cell line) to see the effect of the amine bulkiness *in vitro*. It was observed that primary amino groups lead to an increased NP-cell interaction compared to secondary and tertiary amino groups followed by an enhanced uptake⁶⁸. This is due to the amine bulkiness, which promotes the formation of salt bridges and its hydrophobicity which alters the adsorbed PC.

Impact of the surface chemistry of NPs.

Surface chemistry is also an important parameter allowing to orient the affinities and type of proteins that adsorb on NPs. Chen *et al.*⁶⁹ recently found that the surface chemistry of lipid NPs (LNPs) is correlated to the PC composition and suggested a potential application to targeted delivery. LNPs with different polyethylene glycol (PEG) chain length showed significant differences in cellular delivery and transfection in HepG2 cells in the presence and absence of FBS. Cai *et al.*⁷⁰ further found out that surface chemistry has a more pronounced effect on the PC composition than the surface charge. Their study concerned gold nanorods functionalized with different ligands to analyze the cellular pathways (human leukemia cell line, THP-1) followed by subsequent mononuclear phagocytic system recognition behavior. These studies further help in determining the long-term stability of the NPs, their biological transport and fate when using selective surface ligand. In another study, Sakulkhu *et al.*⁷¹ investigated the role of the chemical coatings on the surface of iron oxide and silica NPs. They demonstrated that superparamagnetic iron oxide NPs (SPIONs) coated with polyvinyl alcohol (PVA) polymers with different lengths and chemical groups drastically change their PC composition after incubation in FBS. For instance, only five proteins were found on the surface of SPIONs coated with carboxy-PVA (with COOH groups) when 54 different proteins were found for amino-PVA coated SPIONs (with NH₂ groups). However, interactions can also originate from the charges of SPIONs (negative for PVA-COOH and positive for PVA-NH₂). The chemistry of polymers was also a parameter in the proteins' adsorption. In a different approach, P. Chandran *et al.*⁷² explained that larger charged Au NPs possess a greater protein binding when functionalized with lipoic acid (LA) compared to NPs functionalized with branched polyethyleneimine (BPEI) despite being strongly cationic. It further confirms the size- and surface chemistry-dependent uptake in HUVAC of corona-bound Au NPs.

Impact of the surface roughness of NPs.

Surface chemistry modifies various properties (hydrophobicity and charge) that consequently changes the PC composition. However, surface roughness cannot be neglected when analyzing the PC formation around NPs. Since higher surface roughness causes greater protein adsorption⁷³, it results in lower uptake as observed for polymer-coated silica NPs on HeLa cells⁷⁴. On the contrary, Piloni *et al.*⁷⁵ analyzed the surface roughness on three cell lines namely macrophages (RAW264.7), breast cancer cells (MDA-MB-231) and fibroblasts (Hs27). They observed that rough surfaces reduce the PC formation supporting non-specific binding compared to protein-coated smooth surface particles with a thick PC layer. The latter show a higher uptake on all the observed cell lines.

Different formulations of liposomes were recently studied by Foteini *et al.*⁷⁶ in FBS medium. They observed packing defects due to the presence of long phospholipid chains. This results in exposing hydrophobic domains on the surface of the bilayer thereby enhancing the interaction between proteins and fatty acyl chains. However, stability in the medium and uptake were found to be concentration-dependent.

Controlling PC *in vitro* for *in vivo* applications

Many studies try to tune the PC *in vitro* in order to control the *in vivo* behaviors of NPs. The environmental parameters presented in the previous part are difficult or even impossible to control *in vivo* except perhaps for the incubation time (more explanation in the next part). Thus, it is more interesting to focus on engineering the NPs surface in order to tailor the formation of PC *via* different approaches: i) Controlling the surface chemistry of NPs or ii) precoating NPs *in vitro* with proteins to have a controlled PC for optimized biological interactions.

Control of the surface chemistry to tune PC for *in vivo* applications

Surface chemistry plays a very important role as discussed in the previous part in orienting the PC composition on NPs. Various physiochemical parameters control PC inside the body. For example, on studying various NP sizes, it stands out that highly negative charges increase the circulation time. This is in turn directly influenced by the extent of the PC formed around NPs. PC thus shows the potential to alter the synthetic identities of NPs and affect their interaction on different encounters with *in vivo* biological entities followed by their body retention and excretion time. As also explained by Kenry *et al.*⁷⁷, the surface charge controls the biodistribution of polymeric NPs and negatively charged NPs show a longer circulation time with minimal macrophage uptake compared to positively charged ones. This further enables lesion penetration and the accumulation of NPs at the targeted sites for theranostic application. The concept was further confirmed by Landgraf *et al.*⁷⁸, when Au-Fe₃O₄-SiO₂-PEG janus particles were shown to have more PC around them after incubation when compared to Fe₃O₄-SiO₂-PEG NPs. Additionally, several attempts were made for which various functional groups like phycocyanin⁷⁹, methyl phosphonate, PEG⁸⁰ *etc.*, are functionalized and adjusted on the NPs with the potential to preform a PC structure through non-covalent interface interactions. This preformed PC improves dispersion in water and inhibits the plasma protein adsorption thereby improving biocompatibility *in vivo*. This in turn influences the phototherapeutic efficacy as observed in tumor bearing mice suggesting feasible synergistic photodynamic therapy (PDT)/photothermal therapy (PTT) nanoplatform for the treatment of cancer⁷⁹. Tumor-bearing mice were prepared for the experiment by subcutaneous injection of a suspension of 51064T1 cells. Chen *et al.*⁶⁹ further

showed that the PC can be manipulated by varying the surface charges. By changing components in lipid NPs, it is possible to tune the surface charge. The authors showed that introducing positively charge lipids results in shifting the PC pattern from apolipoprotein (Apo)-rich to

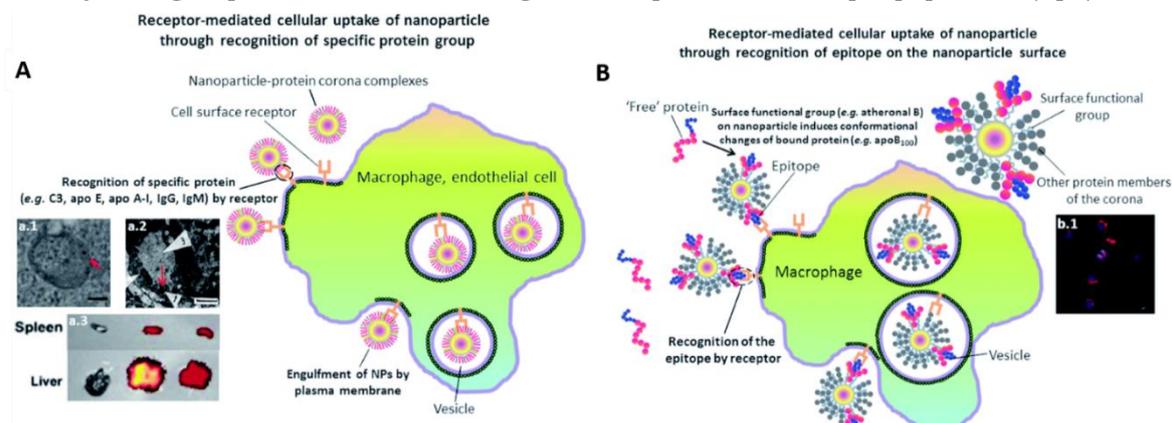


Figure 25 : The presence of PC induces receptor-mediated cellular uptake of NPs. A) Recognition of specific bound protein groups by the cell surface receptors results in a receptor-mediated cellular uptake of NPs: (a.1) receptor-mediated uptake of C3-opsonised NPs by macrophage (scale bar = 100 nm). Reprinted with permission from⁸⁵ Copyright© 2012, (a.2) interaction of bound Apo E with cell surface receptors such as LDLR, VLDLR and apo ER-2 facilitates the uptake of NPs into blood endothelial cells of the brain (scale bar = 1 µm). Reprinted from⁸⁷, Copyright© (1995) with permission from Elsevier, (a.3) a higher extent of opsonization of NPs by IgM relative to IgG results in a higher liver to spleen particle accumulation ratio. Reprinted with permission from⁸⁶ Copyright© 2013 B) Conformational changes of bound protein may result in presentation of a new epitope (antigenic determinant) on the NP's surface. Recognition of the epitope by cell surface receptor facilitates the cellular uptake of NPs: (b.1) uptake of quantum dots by macrophage via epitope recognition by the cell surface receptor (scale bar = 10 µm). The epitope originates from conformational changes of apo B100 upon binding to atheronal B-modified quantum dots. Reprinted with permission from⁸⁸ Copyright© 2012 Figures A and B are reproduced from⁸⁴ published by The Royal Society of Chemistry.

vitronectin-rich. It results in less tumor accumulation in HepG2 tumor bearing mice, while neutral charged NPs have the best tumor accumulation. These changes had a great impact on cell transfection, *in vivo* biodistribution and tumor specific delivery efficiency.

Another interesting approach⁸¹ showed the successful demonstration of ganglioside GM3-mediated antigen presenting cells (APC) targeting *in vivo*. Enveloped virus inspired artificial virus NPs (AVN) were prepared offering a dual mode treatment combining the self-assembled membrane as a matrix for bioactive lipids and a protein-repellent coating with the unique properties of the NP core. Despite the formation of the PC, GM3 embedded in the AVN membrane remained accessible to CD169 receptor binding and achieved a selective homing to the peripheral regions of lymph nodes that are enriched in CD169+ APCs *in vivo*. Similar studies reported that forming a PC can alter the physiochemical properties thereby affecting the specific functionality. For *e.g.*, legumain-responsive Au NPs after incubation in mouse plasma proteins kept the legumain-responsiveness *in vitro*. Ruan *et al.*⁸² studied a drug delivery system, composed of two types of NPs. One was Ala-Ala-Asn-Cys-Lys-polyethylene glycol-thiol (AK-PEG-SH) modified citrate-stable AuNPs coloaded with pH-sensitive DOX and pH-sensitive hydroxychloroquine (HCQ) prodrug (D&H-A-AK) through the "SH-Au" chelation. The other was 2-cyano-6-amino-benzothiazole-polyethyleneglycol-thiol (CABT-PEG-SH) modified AuNPs coloaded with DOX and HCQ (D&H-A-CABT). The system of those two NPs was named "D&H-A-A&C". The combined therapy on Au NPs were shown to target the glioma sites *in vivo* which even on forming PC still possessed the legumain responsiveness. These approaches are very effective in designing the

personalized combination therapeutic regimen for glioma patients, who are patients affected by a type of tumor in the brain and spinal cord. PC formation further helps in developing astherosclerotic vaccines as studied on mice by Benne *et al*⁸³. Liposomes containing the anionic phospholipid 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DSPG) facilitate the PC formation *via* scavenger receptors (SR). This results in higher uptake and induces a high number of antigen specific Treg responses (regulatory T cells) compared to the serum free condition after a single injection of DSPG liposomes. Similarly, PC also induces receptor-mediated cellular uptake controlled by surface functional groups as also explained in Figure 3⁸⁴. PEG grafting on Au NPs decreases the adsorption of complement protein resulting in lowering of the macrophage uptake (Figure 3a1)⁸⁵. On the contrary, PEG on carbon nanotubes supports higher adsorption of IgM which results in lower ratio of spleen *versus* liver accumulation of NPs (Figure 3a3)⁸⁶. Additionally, to promote preferential binding of selective protein like Apo E, surfactant was grafted on the NPs acting as anchor for Apo E thereby promoting endocytosis⁸⁷ (Figure 3a2). Another example of preferential binding of Apo B to CdSe/ZnS quantum dots resulted in presenting a new epitope (antigenic determinant) giving receptor-mediated uptake of NPs by macrophages (Figure 3b1)⁸⁸.

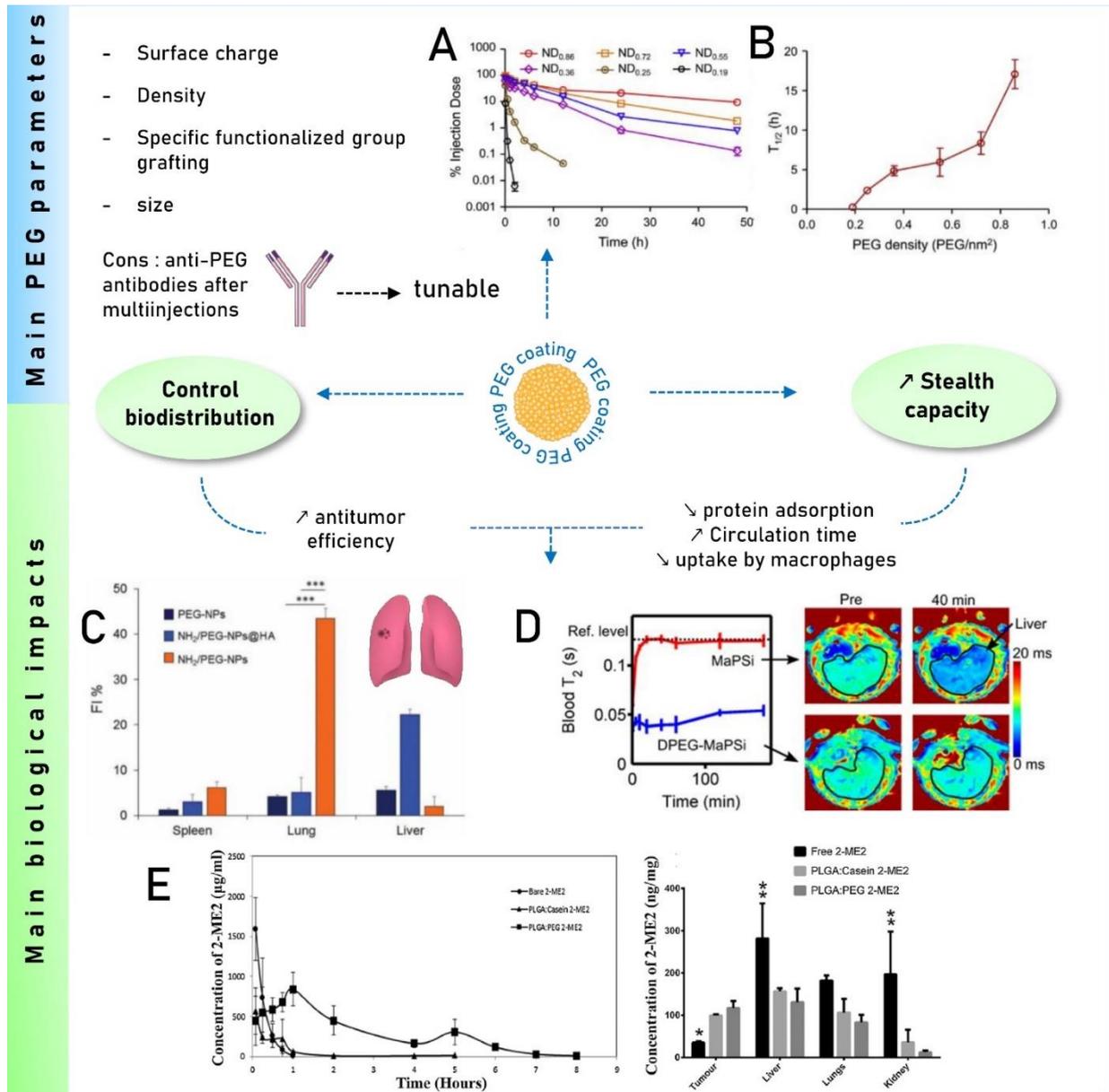


Figure 26 : Main impacts on biological behaviors of PEG coatings. Influence of surface PEG densities on the pharmacokinetics parameters Reprinted from⁹³, Copyright© (2015) with permission from Elsevier: A) Concentration as a function of time for NPs with varying PEG densities in mice plasma after i.v. administration and B) their terminal half-time ($t_{1/2}$). C) Quantitative *in vivo* organ distribution of intravenously-injected NPs. Mice were i.v. injected with 3×10^5 B16F10 murine melanoma cells *via* the tail vein, treated with NPs in saline after 1 week (lung colonization model), Reprinted from¹⁰⁰, Copyright© (2018) with permission from Elsevier. D) Relaxation rates of MRI-traceable superparamagnetic mesoporous silica NPs (MaPSi) and DualPEG (DPEG-MaPSi). Map of a rat liver before and 40 min after the 2 mL, 0.5 mg/mL injections of MaPSi or DPEG-MaPSi NPs. The black line delimits the liver. Reprinted (adapted) with permission from⁹². Copyright© 2020 American Chemical Society. E) *In vivo* pharmacokinetics of bare 2-ME2 and nano formulations and their *in vivo* tumor accumulation and biodistribution. Reprinted from⁹¹, Copyright© (2017) with permission from Elsevier.

In a recent study, Wu *et al.*⁸⁹ reported that polyphenylene dendrimers (PPD)-controlled amphiphilic surfaces patches showed the potential for forming PC that enabled their interaction with human adenovirus 5 (Ad5) *in vivo* distribution. Ad5 results in the accumulation of viral particles in the liver after intravenous (i.v.) administration and then transduction takes place. *In vivo* studies showed that PC had reduced by about 40% the Ad5-mediated transduction marked by EGFP expression in the liver. Surprisingly, it also increased the transduction in the heart by

more than 40% when compared to naked Ad5. These approaches in which PC can manipulate and reengineer the Ad5 biodistribution, prove their potential in regulating the trafficking and cell uptake of viruses *in vivo*, stated as the holy grail of gene therapy.

One recurring goal is to gain stealth capacity in order to allow NPs to reach their respective medical target by increasing the circulating time in blood. Macrophages (kupffer cells, or macrophages of the liver) potentially remove unprotected NPs from the bloodstream within seconds after i.v. administration, inhibiting targeted drug delivery. These macrophages on the other hand recognize specific opsonin proteins instead of directly identifying the NPs. Thus, several methods have been employed to camouflage the NPs allowing them to bypass MPS recognition thereby increasing their blood circulation life⁹⁰. PEG is thus one of the most common coatings that can be recognized by the opsonins, which has been broadly explored. It is still investigated owing to its advantageous pharmacokinetic properties, which could be due to its influence on protein adsorption. It has been shown several times that a PEG coating reduces protein adsorption compared to other coatings⁹¹ or bare NPs. For instance, Nissinen *et al.*⁹² added a DPEG (DualPEG) coating using two kind of PEG simultaneously on mesoporous silicon NPs (PSi-NPs). Such coatings affect the PC composition. Indeed, a smaller number of proteins were adsorbed on DPEG-NPs compared to bare-NPs, especially less liver and immune response associated ones but more phagocytosis inhibitions proteins. Thus, DPEG-coated NPs resulted in a significantly increased circulating time. Tuning the PEG density also controls the protein adsorption as demonstrated by Du *et al.*⁹³ and illustrated in Figure 4. A high surface density reduces the protein adsorption significantly and the uptakes by macrophages, enhancing the antitumor efficiency of the NPs carrying docetaxel *in vivo*. In addition, modified PEG helped obtain a selective corona on NPs. Li *et al.*⁹⁴ showed the interest of selective adsorption of apolipoprotein E (Apo-E), known as endogenous lipid-based transporting protein, for tumor-homing chemotherapy. Dihydroartemisinin (DHA)-decorated NP surfaces were engineered to anchor Apo-E. Then PLGA-PEG₂₀₀₀-DHA (PPD) NPs have an Apo-E-enriched corona prolonging the NPs blood circulation thereby facilitating their accumulation in tumor cells by the passive enhanced permeability and retention (EPR) effect. On observing the anti-tumor activity on 4T1 tumor harboring Balb/c mice, it proved a delayed tumor growth performance and triggered significant tumor cell apoptosis with no change in body weight, organ index or haematological parameters. Similarly, *in situ* albumin-enriched corona was explored by the same group⁹⁵. Maleimide-coated NPs were prepared that preferentially bind endogenous albumin in the corona allowing NPs to stealth and tumor homing ability. These *in situ* approaches have improved delivering efficient chemotherapy with minimum off target toxicities.

Remarkably, for iron oxide nanoparticles (IONPs) coated with glucose or PEG, it was observed⁹⁶ that both surface coatings adsorbed a similar number of proteins *in vitro* but there was a clear difference in the PC composition which was correlated to the NP biodistribution *in vivo*. This results in slower degradation of the glucose coating *in vitro* than *in vivo* where an accelerated biodegradation and clearance were observed for PEG coating in both liver and spleen. The reason for faster *in vivo* degradation lies in the composition of the PC. Glucose-functionalized IONPs had opsonins while PEG was enriched with albumin that degrades faster PEG is known to inhibit the formation of PC. However, it further raised a concern over using PEG for prolonged circulation time due to the finding of anti-PEG antibodies⁹⁷. As analyzed *in vivo* by Grenier *et al.*⁹⁸ on

PEGylated liposomes and polymeric NPs, using anti-PEG antibodies can have a significant neutralizing effect. On comparing the corona formed in naive mice, the exact impact of these antibodies on PC was found. The changes were analyzed according to the Ig deposited on the surface of NPs from the serum of PLGA-PEG NPs (poly(lactic-co-glycolic acid))-sensitized animals. This also alters the deposition of PC as apolipoproteins were found to be deposited on the surface of PLGA-PEG NPs compared to free methoxy-PEG chains and poly(lactic-co-glycolic acid) (PEG5k-PLGA). This might be relevant for nanomedicine given the implication of these proteins on the clearance of NPs in the bloodstream.

A solution was proposed by Wang *et al.*⁹⁹. They suggested that adding α -glutamyl at the end of PEG should increase the circulating time of the polymeric micelles compared to bare PEG. Another challenge is the clearance of PEG-NPs as their accumulation in the spleen and the liver is significant. The work of Esposito *et al.*¹⁰⁰ shows a method to overcome this issue. The *in vivo* biodistribution in mice was regulated by mixing amino-groups and PEG on the surface of polycaprolactone NPs. The accumulation of NPs in lungs, spleen and liver was investigated, lungs being the targeted organ containing cancer cells (B16F10 cells). This NH₂/PEG coating was compared with PEG-coated NPs and with an albumin (HA) layer (NH₂/PEG-NPs@HA). The results indicate that NH₂-NPs accumulate more in the lungs, than other NPs, as shown in Figure 4. Additionally hemolysis calculated for all the NPs were less than 20 % and showed no effect in *in vivo* studies.

Precoating with proteins for *in vivo* controlled behaviors

Clinical applications of NPs would be limited if their surfaces would adsorb proteins in an uncontrollable and non-reproducible manner. Researchers came up with a promising pathway to prevent these non-specific approaches by developing a biohybrid precoating with a PC around the nanomaterials. Adding peptides or a protein coating, grafting aptamers, antibody and other molecules as already discussed in the previous section and summarized in Figure 5 could further help in improving the efficacy of NPs in biomedical applications¹⁰¹. For instance, crossing the blood brain barrier (BBB) is possible by binding Apo-E to the surface of polysorbate-coated NPs *in vivo* thereby facilitating the transport of bound dalargin or loperamide to the brain^{102,103}. Mahmoudi *et al.*¹⁰⁴ also considered *in vivo* 3.5 nm SPIONs with different surface charges on dextran (NH₂, COOH and unmodified) in a BBB mouse model. MRI observations on mice showed that unmodified and negatively charged NPs were present in the brain vessels 5 min after administration. They assigned this behavior to the presence of Apo-A1 protein in the corona of negatively charged NPs.

On the other hand, non-specific binding of proteins to NPs can lead to the cell clearance by macrophages through the MPS of the liver and spleen⁵⁹. Opsonins adsorption (fibrinogen, Immunoglobulin G (IgG), complement factor) were used to facilitate phagocytosis along with the elimination of NPs from the bloodstream¹⁰⁵. Conversely, on dysopsonin binding Human Serum Albumin (HSA), Apo facilitates prolonged circulation time in blood¹⁰⁶. Park *et al.*¹⁰⁷ also demonstrated that their silica NPs show less macrophages uptakes and a reduced complement activation when coated with BSA, HSA, fibrinogen and complement factor H. IgG, on the other hand, was confirmed to increase macrophage uptakes.

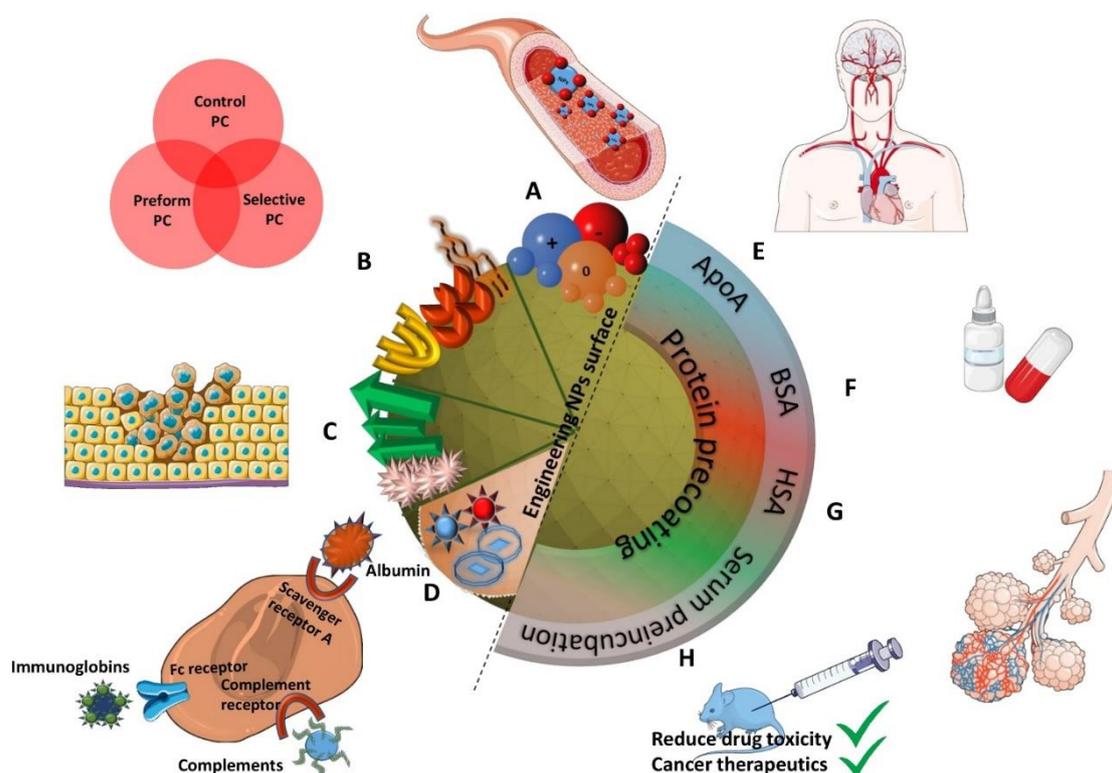


Figure 27 : Summarized results of different controlled methods of PC formation; A) Negatively charge NPs result in longer circulation time causing greater accumulation, B) Different surface functionalizations improve biocompatibility, C) Protein Specific functionalized groups result in tumor targeted drug delivery, D) Different types of NPs (Liposomes, Enveloped Virus NPs) explore different binding receptors; Protein precoating particularly with E) (Apo-A) enables crossing the BBB, F) BSA results in improving the oral bioavailability of drug, G) HSA proteins help improving the air blood barrier as observed in *in vivo* lung lining, and H) Pre-incubating NPs with serum results in adsorbing more proteins that reduce the drug toxicity and help in cancer therapeutics.

Several studies also report that the formation of PC around NPs contributes to the loss of drug targeting. However, having a protein coating/PC evaluation prevents a non-essential binding of proteins as explored recently by Chung *et al.*¹⁰⁸ who developed targeting-enhancing paclitaxel (TENPA) NPs where paclitaxel was encapsulated with a human serum albumin-haemin complex. They successfully showed that this hinders the formation of PC *in vivo* and that the structural stability was maintained enhancing the cancer targeting efficiency. These properties of TENPA lead to the accumulation of paclitaxel that was 4.1 times higher than that of nanoparticle albumin-bound paclitaxel (Abraxane®). This turns out to be an ideal drug in cancer therapeutics since the toxicity observed *in vitro* and *in vivo* was less than that of Abraxane and another formulation of free paclitaxel (Taxol®) in cancer bearing mice

Another interesting approach was used to understand the mechanism of PC in lung lining fluid with its impact on the lung clearance in rats. As shown by Konduru *et al.*¹⁰⁹, coating albumin on gold NPs increases their uptake in macrophages suggesting that PC enables particle recognition, phagocytosis, and processing by alveolar macrophages as well as their translocation across the air blood barrier *in vivo* in lung lining fluid. Additional studies further supported the hypothesis that the formation of PC around NPs promotes its biological impact. Au-thiol-Fe₃O₄-SiO₂-PEG⁷⁸ showed more PC around them after incubation and after coating a PC (human plasma) resulting in increased cellular ATP levels and produced T₂* contrast agents *in vivo*.

However, these artificial precoatings are not restricted to NPs to be injected *via* an i.v. route. Wang *et al.*¹¹⁰ worked on liposomes containing insulin for oral administration. They coated BSA (Bovine Serum Albumin) onto these liposomes to improve the oral bioavailability of insulin. More precisely, this coating enhances the ability of these NPs to penetrate the mucus faster and deeper. They observed after intrajejunal injections in diabetic rats (type 1) a better intestinal absorption and a significant hypoglycemic effect.

Gonzalez-Moragas *et al.*¹¹¹ used a simple *in vivo* model (*Caenorhabditis elegans*) to analyze protein (BSA)-coated SPIONs. They reported changes in the toxicological and biodistribution profiles compared to citrate-modified SPIONs. BSA-SPIONs showed lower mortality than citrated SPIONs in a broader range of concentration proving that BSA has a protective role for nematodes as well. In another study¹¹², BSA-SPIONs were orally administered in the same model. The NPs were protected from acid degradation. They remained monodispersed in the lumen microenvironment and also prevented the direct contact of the inorganic core with the worm's body leading to a higher biocompatibility which was not present in the case of citrated SPIONs. This also helped explore a different pathway for some NPs entering in the nematode's enterocytes through endocytosis. Similarly, Peng *et al.*¹¹³ evaluated the NPs biostability *via* preformed PC using BSA. The drug release (coumarin 6) was found to be slower and the stability was enhanced in other organs and liver homogenate. On careful evaluation of NPs biodistribution on mice blood, it was observed that BSAcoated NPs were more stable in tissues, as the concentration of BSA-coated NPs was higher than for unmodified NPs in all the tissues at 15 min post-injection. Unmodified NPs were also metabolized or eliminated faster. As a result, performing a PC (BSA) is beneficial in developing nanoformulations with stable drugs.

In all the preceding works, the pre-coating consists in putting specific chosen proteins, albumin in most cases. Yet a more complex but harder to control coating can be achieved by pre-incubating the NPs into a biologically comparable media: serum or plasma.

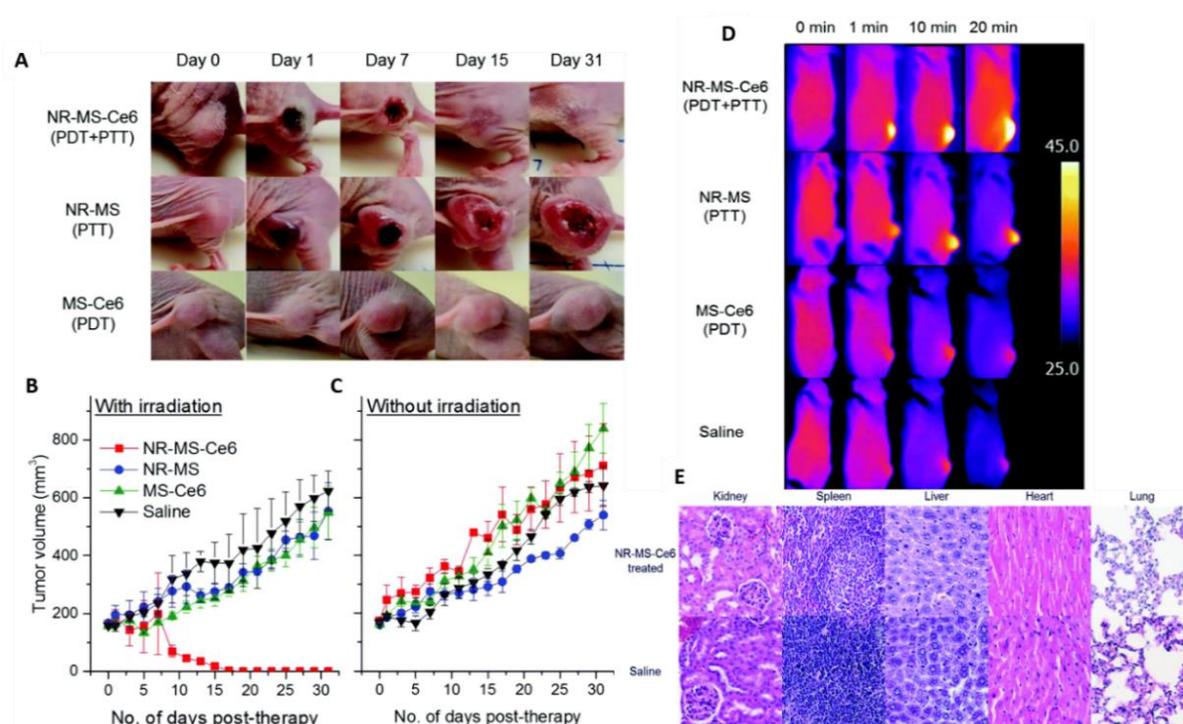


Figure 28 : A) Mice tumors observed when treated with NR-MS-Ce6 (10 mg kg^{-1} Au loaded with $9.63 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ Ce6) (PDT + PTT), and an equivalent concentration of its control NR-MS (10 mg kg^{-1} Au) (PTT) and MS-Ce6 ($9.63 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ Ce6) (PDT). B) Tumor volumes as a function of time following the i.v. delivery of NR-MS-Ce6 and related controls, and laser irradiation ($n = 5$). C) Without laser irradiation, the localization of NR-MS-Ce6 did not cause any inflammatory response and a continuous tumor growth was observed over time, similar to the controls ($n = 3$). D) Near infrared (NIR) thermal images showing tumor-localized irradiation of tumor-bearing nude mice and a rapid and localized PTT heating of the tumor within 1 min of irradiation. E) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of tissue sections from the major organs showing that the histological features between NR-MS-Ce6 (10 mg kg^{-1} Au loaded with $9.63 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ Ce6) treated mice for PDT + PTT and saline-treated control mice were similar, with no abnormal phenotypic features observed. Figures reproduced from¹¹⁵ published by The Royal Society of Chemistry.

Lin *et al.*¹¹⁴ studied PC on NPs incubated in different serum concentrations. They monitored the amount of Apo bound to NPs. Despite surface chemistry or morphological differences, preincubation at higher serum concentration leads, as might be expected, to a higher amount of proteins bond to NPs. It also confirmed that the functionalization by carboxylic acid resulted in a reduced protein adsorption.

The advantage of performing a PC was also successfully demonstrated prior to i.v. delivery. The time for Apo to bind a Au nanorod (NR) surface to form a PC was increased¹¹⁵. These bound Apo in NR-MS-Ce6 (PC from Mouse Serum, MS and photosensitizer Chlorin e6, Ce6) act as endogenous targeting ligands to promote localization. This localization was observed 6 h post injection followed by a rapid rise in temperature localized in tumors. within 3 min of irradiation and compared to bare NRs. This showed a great potential for drug delivery (passive release of Ce6) and cancer treatment using PDT and PTT as can be seen in Figure 6. Another surface coating was studied by Cai *et al.*¹¹⁶ using mouse serum albumin proteins prior to i.v. injection studied to analyze if preformed PC influence the *in vivo* NPs metabolic pattern and its toxicity.

MS-Au NRs adsorbed more opsonin proteins resulting in an efficient liver-targeting. An increase by more than 80% of injected MS-Au NRs was observed in the liver within 24h compared to unmodified NRs. The study also reveals that opsonin mediates the hepatic uptake of Au NRs. The resulting NPs were heat stable and due to the preincubation, they managed to escape phagocytosis by Kupfer cells and were found in hepatocytes.

Pre-adsorbed proteins control PC and also help in reducing the toxicity of the developed NPs. Recent works with both pyrogenic and colloidal silica NPs having a pre-adsorbed PC resulted in the suppression of the cytotoxicity and a greater cellular uptake inside A549 cells. Interestingly, RAW264.7 macrophages show a response similar to A549 cells, where precoated particles with PC induce the uptake and pro-inflammatory responses¹¹⁷. Since NPs in the lungs do not limit themselves to epithelial cells but also encounter macrophages, it is essential to study the response of PC in macrophages as well. Therefore, PC turns out to be an effective tool in the lung tissue to control the toxicity of nanosilica particularly in pulmonary drug delivery. With a similar approach, pre-adsorbed PC not only facilitates the NPs behavior but can also help in reducing the drug toxicity by preincubating silica NPs in bovine serum. Giri *et al.*¹¹⁸ suggested it in a preliminary work to control the solubility and toxicity of testosterone, which engenders unwanted side effects if administrated alone. Indeed, it causes liver tumors when orally administrated, skin reactions when administrated *via* patches, or needs repeated and painful intramuscular injections.

For a better understanding and control of the *in vivo* biological behaviors of NPs, it is possible to tailor the PC either *via* an accurate surface functionalization or *via* precoatings before further use. Many studies demonstrated strong results in this way. They achieved improved blood circulation or targeting efficacy. However, questions remain regarding the PC formation directly *in vivo*.

Studying PC *in vivo*: the way to improve nanomedicine?

In comparison to *in vitro* and fundamental studies, characterizations of the PC recovered after *in vivo* injections are still scarce. The first study focusing on *in vivo* analyses of PC was published in 2014¹¹⁹. In this study, polymer-coated SPIONs with different charges were injected in rats' bloodstream and recovered a few minutes after injection to separate and analyze their PCs. The biological behaviors of SPIONs were compared to the proteins found. Negative and neutral NPs showed the same liver uptake delayed compared to positive NPs. This is explained by the lower proteins adsorption of positive coatings compared to neutral and negative ones during the *in vivo* evaluation. This behavior is quite different from what was observed *in vitro* and is strongly dependent on the composition of PC. The authors also compared PC *in vivo* to *in vitro* experiments on rat's plasma. Very different proteins were adsorbed on the surface of SPIONs. They concluded on the difficulty to compare *in vitro* and *in vivo* analyses and the unpredictability of PC *in vivo* because it results from a dynamic process. Since then, therapeutic NPs have been extensively explored¹²⁰ but few papers are focusing on the studies of the *in vivo* interactions of nanohybrids with proteins (less than 20 at the date of the writing).

Parameters influencing the PC *in vivo*

Some studies report the influence of environment and the characteristics of NPs on the adsorption of proteins. As shown above with different surface charges¹¹⁹, the chemistry of the surface coatings leads to different proteins adsorption. Varying the peptides on the surface of polystyrene NPs¹²¹ and the liposomes or leukosomes (biomimetic liposomes) chemistry^{122,123} was shown to influence the nature of the adsorbed proteins. For PEGylated stealth liposomes¹²⁴, it was also demonstrated that 1 h after tail vein injection in mice PC did not cover the whole surface of NPs. In fact, 0.5 to 1.9% of surface covering was observed for non-targeted liposomes (without antibody) and 0.6 to 2.7% for targeted liposomes (with antibody). Serum albumin came out to be dominant proteins in the corona of the liposomes, which probably prevented it from compromising the functionalization with antibody trastuzumab. The density of polymers also affects PC. For example, increasing the PEG density decreased the adsorption of Apo leading to a longer residential time¹²⁵. The size and shape of NPs are also crucial parameters influencing PC *in vivo*. For example, gold NPs and nanostars¹²⁶ size and shape modified the amount of adsorbed proteins (Figure 7a). The NPs with the highest specific surface area (the biggest gold nanostars) adsorbed more proteins than the other NPs. However, the complexity of the protein layer found on the surface of these NPs was not related to these characteristics. The bio-circulation and the spleen and hepatic uptakes were inversely proportional to the size of NPs. A kinetic study with different sizes of Au NPs of the *in vivo* PC formation and their biodistributions was coupled to computer models helping to predict the biological fate of NPs¹²⁷. *In vivo* studies generate a lot of data and using predictive systems seems to be one of the solutions to better anticipate the potential *in vivo* behavior of NPs.

External parameters also influence the *in vivo* PC. Liu *et al.*¹²⁸ studied the influence of static magnetic fields and demonstrated that this external force modifies the nature and quantity of adsorbed proteins on magnetic NPs. Adding a magnetic field during incubation in serum *in vitro* did not modify PC significantly. However, *in vivo* the number and nature of the adsorbed proteins was increased by 25% when a magnetic field was applied. Further exploration of the effect of the magnetic field on magnetic NPs in order to control PC would be of great interest particularly in nanomedicine. In the presence of a magnetic field, the amount of adsorbed protein increases in particular in the HC layer. It is therefore an effective way to reduce the unexpected adsorption of protein by analyzing the time of interaction.

Temperature can also be an important parameter influencing the PC formation *in vivo*¹²³. Two different thermosensitive phospholipids were injected in mice and then recovered from the mice blood stream. The adsorption of proteins was modified by changing the temperature of *ex vivo* incubation from 37°C to 42°C. While this study did not investigate the *in vivo* influence of temperature, this approach suggests that even a slight change of temperature can affect PC as well as the associated nano-thermotherapy (Figure 7b).

In other studies, Hadjidemetriou *et al.*¹²⁹ and Corbo *et al.*¹²² studied composition evolution of PC *in vivo* around liposomes injected in mice as a function of time (Figure 7c). In the first study, the authors demonstrated that the amount of adsorbed proteins on liposomes did not change significantly with the time of sampling. However, the nature of proteins was drastically different demonstrating a dynamic process of protein adsorption due to the flow of the bloodstream. The nature of proteins did not really influence the physicochemical characteristics of NPs (hydrodynamic sizes and zeta potentials). In the other study¹²², the *in vivo* PC composition

changed drastically between 10 min and 1 h post injection. The number of different proteins increased by 33% after 1 h of *in vivo* incubation compared to 10 min. The nature of proteins found on the NPs' surface changed too. Most of the proteins found 1 h after incubation have a coagulation function demonstrating the dynamic evolution of the *in vivo* PC which could lead to a total change of the behavior of NPs. Chen *et al.*¹³⁰ studied how fast PC can change after injection of magnetic nanoworms. The authors studied the dynamic behaviors of the PC formation on different protein-precoated dextran-stabilized nanohybrids 5 min after injection. They focused their study on the complement component 3 (C3) which is one of the most abundant proteins *in vivo*. They demonstrated that a competition exists in proteins adsorption even for proteins known to bind specifically and easily on NPs once injected.

Another external factor influencing the *in vivo* PC is the health of the injected patient. In another study¹³¹ from Hadjidemetriou *et al.*, liposomes were injected in healthy and tumor-grafted mice. The health of animals influenced the amount of PC and the proteins found in the bloodstream and on the NPs. The concentration of recovered liposomes, as calculated by Stewart assay, was found to be ~30% of the injected dose. The authors demonstrated that their NPs were able to target proteins excreted by tumors and used them as tumor's biomarkers trackers. This assumption was also tested *in vivo* on human ovarian carcinoma patients¹³². For the first time, the PC of liposomes injected in human was analyzed after blood collection. This preliminary promising study characterized the physicochemical evolutions of liposomes after injection and their ability to adsorb proteins from the human blood stream. As observed in previous studies, the hydrodynamic sizes and zeta potential of liposomes did not change. NPs were able to adsorb proteins overexpressed in this cancer helping their *ex vivo* detection and proving the potential of these liposomes as cancer biomarkers tracers. Such a study demonstrates the interest of studying PC interactions on NPs after injection. It is to note that lipoproteins and liposomes might have similar lipid compositions. Liposomes are typically separated from other biological compounds with techniques varying from one team to another, such as ultracentrifugation coupled with membrane ultrafiltration¹³³. Another example is the chromatographic separation, specifically fast protein liquid chromatography, which enables the separation of liposomes from lipoproteins and plasma components¹³⁴.

Several studies analyzing the formation of the *in vivo* PC led to the same conclusion as *in vitro*. Interactions between NPs and proteins are influenced by external (environmental) factors which are difficult to control and also by the NPs' surface chemistry that can be engineered.

***In vivo* analysis of PC: *in vitro* and *in vivo* measurements are not related**

The key factor for the failure of clinical translation of nanotherapeutics in nanomedicine is the poor link between the *in vitro* "assessments" and the *in vivo* "outcomes". Some studies illustrate the strong differences between the *in vitro* and *in vivo* results. Among them, one recurring issue is PC, in particular its screening effect hindering the interactions between NPs and their targets^{135,136}. Hadjidemetriou and co-workers studied the *in vivo* behavior of PC on liposomal NPs. They demonstrated that *in vitro* and *in vivo* incubations of their liposomes led to different PCs (Figure 7d) which were also influenced by their coatings (PEG) and functionalization with antibodies¹³⁷. The formation of a PC was evaluated on liposomes *in vivo* after tail vein injection into CD-1 mice. Liposomes were recovered 10 min post injection. Plasma from CD-1 mice was

used *in vitro* to mimic the *in vivo* condition. The mass of the proteins adsorbed on pegylated-liposomes was lower than that for bare liposomes after *in vitro* or *in vivo* incubations leading to a lower cell internalization (MCF7 and C33a cells). The antibody-functionalized NPs adsorbed less proteins after *in vitro* incubation compared to *in vivo* incubation. These nanohybrids kept their targeting capabilities for cells after incubation. Additionally, lipid composition of liposomes is also a key factor in shaping the PC *in vivo* once introduced in the medium as explained by Storm *et al.*¹³⁸ where they compared the liposomes degradation dependent on the lipid composition when taken up by liver and spleen on intravenously administered of (3H|inulin-labeled vesicles to tumor-bearing animal.

Other studies have also concluded on the importance of focusing on *in vivo* characterizations of PC as *in vitro* measurements have usually given different results whatever the nature of particles. As an example, the PC of polystyrene NPs¹²¹ with different coatings were analyzed 10 min after injection in mice and compared to the PCs found after incubation in mice serum. The authors found significantly more albumin but also clusterin capable to reduce the nonspecific uptake more on the *in vivo* PC than on the *in vitro* PC. Fibrinogens, which are responsible for PC aggregation, were more abundant *in vitro* than *in vivo*. Possible reasons for different concentrations of fibrinogen in various biological medium might lie in the preparation step which depletes the serum of coagulating factors such as fibrinogen and lowers the protein concentration¹²¹. Furthermore, in another study¹³⁹ from Kottana *et al.*, effects in the change of conformation of fibrinogen instead of abundance were investigated. It was demonstrated that *ex vivo* adsorption of fibrinogen on positively charged PVA coated SPIONs' affected the conformation of this protein itself resulting in platelets activation but not aggregation. The effect of protein conformation in PC is an interesting point to focus on to understand the impact of PC in the potential change of activities of the adsorbed proteins. Back to the abundance of proteins, Amici *et al.*¹⁴⁰ also showed that the abundance and composition of PC is different *in vitro* (FVB/N mouse plasma, Friend Virus B NIH Jackson, inbred mouse strain) and *in vivo* (FVB/N mice) in the case of liposomes. A larger variety of proteins was found *in vivo* (500) compared to *in vitro* (267). The same conclusions were obtained for inorganic NPs such as SPIONs¹²⁸. For SPIONs functionalized with glutamine, the mass and nature of the proteins found on the SPIONs' surface were totally

different. 669 proteins were found *in vivo* after injection in mouse when only 100 different proteins were found *in vitro* after serum incubation. Furthermore, only 56 proteins were common to both cases. Such results demonstrate that understanding PC for *in vivo* applications is difficult and maybe even impossible when using *in vitro* experiments. In addition to the differences observed in the number or amount of proteins adsorbed *in vitro* and *in vivo*, thermal-triggered drug release too cannot be simply analyzed by *in vitro* incubation. When temperature sensitive liposomes (TSL) were studied, slight variations were observed for their drug release profile *in vitro* and *in vivo*. The performance of TSL *in vitro* fails to predict the *in vivo* behavior directly¹²³. The differences in the structural configuration and composition of the formed PC in both conditions mainly results in a faster release profile *in vitro* than *in vivo*. For example, incubation of

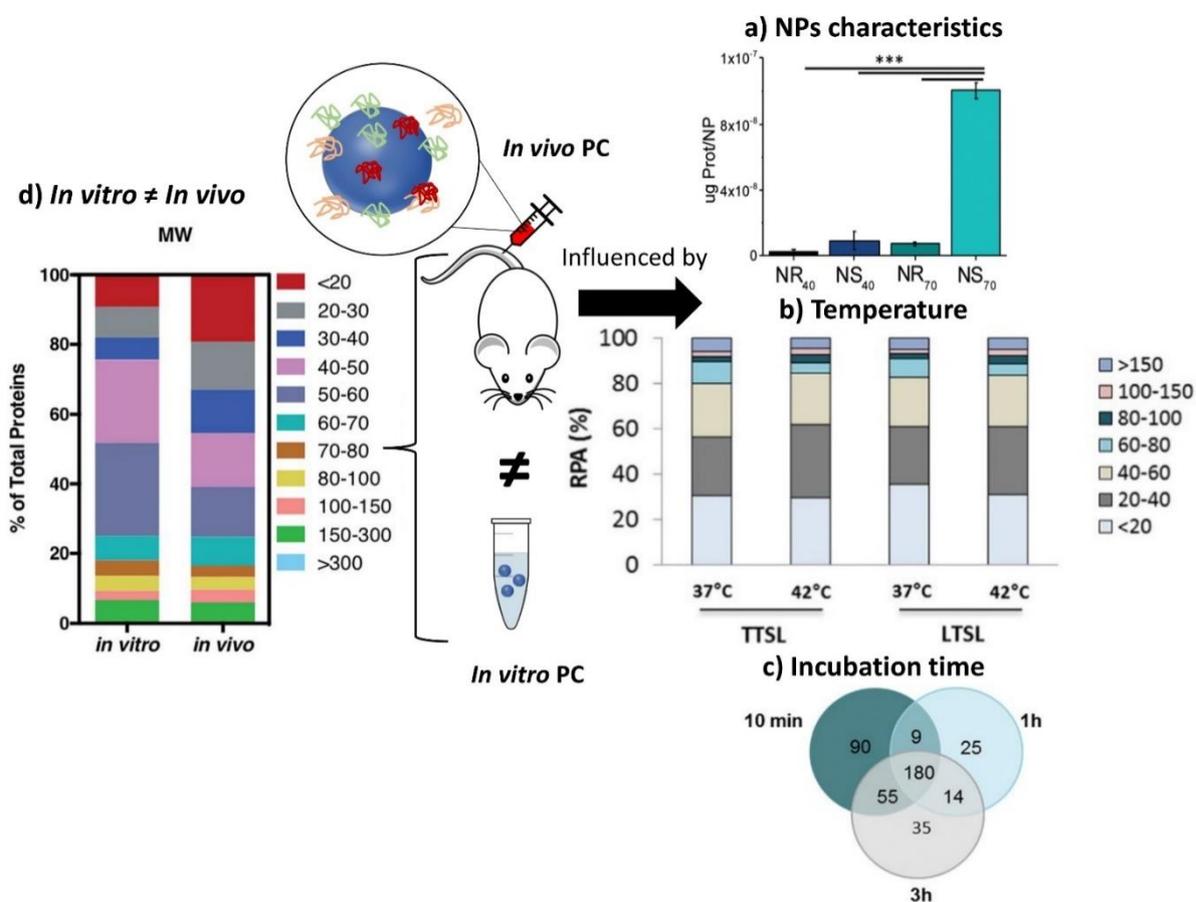


Figure 29 : *In vivo* PC is influenced by NPs characteristics such as A) sizes and morphologies. Concentrations of proteins found *in vivo* on gold nanorods (NR) and nanostars (NS) of 40 and 70 nm reproduced from¹²⁶ with permission from The Royal Society of Chemistry; external factors such as B) temperature influencing the formation of *ex vivo* PC (ordered in molecular weights) on temperature-sensitive liposomes encapsulated with traditional (TTSL) or lysolipid- doxorubicin (LTSL) reproduced from the work published in ¹²³ Copyright© (2018) with permission from Elsevier and C) Venn diagrams report the number of unique proteins identified in the *in vivo* corona formed on liposomes 10 min, 1 h and 3 h post-injection and their respective overlap. Reproduced from¹²⁹ - Published by The Royal Society of Chemistry. *In vivo* protein corona (PC) is always different than *in vitro* protein corona D) Percentage of proteins found *in vitro* and *in vivo* on lipidic NPs classified according to their molecular mass reproduced from¹⁴⁰ Published by The Royal Society of Chemistry.

superparamagnetic NPs *in vitro* with different protein solutions at various temperatures provides several degrees of protein coverage and therefore numerous PC compositions which thus define drug release¹⁴¹.

Discussion

Authors observe and try to understand the influence of the NPs' surface chemistry (coating, size, shape, charge, precoating) as well as external parameters on *in vivo* proteins adsorptions in order to control their biological behaviors. A deep reflection on PC *in vitro* seems to be one of the key factors for the further development and comprehension of the *in vivo* nanomedicine¹⁴². Some papers agree with this postulate and to study in details the formation of PC *in vivo*. Recent analyses on this *in vivo* PC have brought interesting results but have also raised many discussions and open questions. This is mainly due to the complexity of the studied models as shown by the main results that pointed out important differences between *in vitro* and *in vivo* observations.

First, it was shown that surface engineering and in-depth analyses bring interesting results on PC's understanding. Studies also clearly demonstrated that classic *in vitro* analyses or modifications will not help to fully understand, predict, and simplify a complex system such as the *in vivo* one. However, *in vitro* still should not be put aside but could be used as a tool for the understanding: besides an *in vitro* followed by an *in vivo* analysis and a comparison between those two, one can also deeply study *in vitro* a specific protein found *in vivo* in order to gain more insight into its molecular mechanisms. In this case, *in vitro* offers a fully easy controllable environment for NPs-specific protein interactions. Thus, *in vitro* and *in vivo* are equally important to understand the interactions.

Furthermore, many parameters from the system itself are still very hard to simulate¹⁴³ even if they influence the amount and the concentration of proteins in biological fluids. For example, *in vitro* analyses are usually performed in serum when the same *in vivo* experiments are performed in plasma. Differences of biological behaviors were observed on silica NPs after incubation in human serum and plasma¹⁴⁴: NPs were more internalized by macrophages in plasma than in serum. The authors concluded that the higher amount of fibrinogens and opsonins in plasma compared to serum affect the phagocytosis of NPs. Working on plasma instead of serum might be a first step to help predict the *in vivo* behavior from *in vitro* experiments. It is also interesting to keep in mind that in the case of blood circulation, clearance of NPs can change the population of NPs and select artificially the PC of more circulating NPs. Then the average quantification of *in vitro* PC on a complete population of NPs compared to *in vivo* PC on a sub-population of NPs may differ drastically. Another reason for differing results between *in vitro* and *in vivo* PC may also come from the design of the experiments and the choice of the *in vitro* serum. Most studies usually analyze the *in vivo* PC on each animal^{119,140} but compare it to a serum pooled from many animals. The concentrations, amounts and nature of the proteins may statistically differ and lead to significant altered results. Correctly designing the experiments with enough data might be a solution to improve the comparison (see below in this discussion).

The health of the patients also strongly influences the proteins composition in the PC. Hajipour *et al.*¹⁴⁵ studied the incubation of graphene NPs in the blood of human patients presenting various diseases leading to different "personalized" PC exhibiting different biological behaviors (cytotoxicity, inflammation responses *etc.*). Additionally, hemolysis was observed in various diseases patient. Diabetes and thalassemia showed an hemolytic activity higher than blood cancer patients. This difference affects PC formation due to plasma alteration. This can be due

to the autoimmune hemolytic anemia, which occurred during the different diseases and influences the competitive binding of proteins on the NPs surface.

The concentrations and types of plasma proteins also differ from the animal model used. Intuitively, the PC formed is different from one to another¹⁴⁶, thereby resulting in different biological behaviors. This implies a complex extrapolation from animal to human¹⁴⁷ (Figure 8a). It raises another issue as most *in vivo* reports deal with the mice model, and only very few analyze both simultaneously. Solorio-Rodríguez *et al.* explained the clear difference between human and mouse plasma PC profiles in an active therapy model using SiO₂¹⁴⁸. This explained very well the limitation of *in vivo* models translated to clinical use. Thus, the PC profile must be considered in the interpretation of preclinical trials when developing efficient and safe nanomedicines. Biological fluids are also regulated systems with many varying physical parameters such as temperature, pH as well as the composition and concentration of proteins. Other differences were also observed depending on the studied biological fluids. However, all of the publications studying PC *in vivo* rely on i.v. administration. Some authors discussed the importance of the fluids in which NPs are injected. It was demonstrated that the PC of NPs differs when incubated in blood or lymph¹⁴⁹. Future *in vivo* experiments will have to study the PC formation using other injection routes (intramuscular, inhalation, ingestion *etc.*). Additionally, the preparation of blood samples may also interfere with PC selection and analysis. In the studies described above, different anticoagulant agents which were used to collect blood (EDTA¹²⁴, heparin¹²¹ ...) may also affect protein interaction. Heparin, for example, will neutralize thrombin, the protease responsible of the formation of fibrin from fibrinogen. EDTA, on the other hand, is a chelating agent which will form a complex with the Calcium ions. Such differences in the anticoagulation mechanisms has to be kept in mind since they are likely to induce slight changes in the composition of plasma samples, possibly resulting in a different PC formed on the NPs. Planning correctly *in vivo* experiments, especially while analyzing PC, remains a challenge. It would be important to set up some standardized procedures such as: i) using the same anticoagulant; ii) enough animals for statistics or iii) using “our own *in vitro* serum” from the animals studied. And even if it might prove very complicated, it would also be useful to control some biological parameters such as the health or alimentation of the animals. A possible solution to optimize the understanding of *in vivo* PC might come from the use of genetically modified animal with under-expression of some proteins to study, for example, their potential influence on NPs biocirculation.

In addition to experimental set-up, PC characterizations are still complicated to perform and hardly reliable due to the many parameters depending on the isolation methods and the analyses of the results. While some protocols exist to explain how to separate and isolate the “real” PC^{150,151}, recent studies are still highlighting the lack of standardization in the PC analyses especially regarding sample preparation¹⁵² in the separation protocols¹⁵³ (Figure 8b). The most used separation technique is centrifugation which allows the characterizations of proteins at the surface on many kinds of NPs including very small ones^{153,154}. Nevertheless, when other methods are available as in the case of PC on SPIONs, Bonvin *et al.*¹⁵⁵ demonstrated that the proteins found after centrifugation and after magnetic separation are different. They concluded that only 50% of the PCs found for both isolation methods could be considered as the “real” PC. This problem of finding a proper method to characterize PC is a common problem for *in vitro* and *in*

in vivo studies. For instance, how can one be sure that the proteins analyzed are really the proteins present on NPs or the result of protein isolation failure? Moreover, analyses of PC usually focus on the effect of one parameter after another. The question arises whether such observations still hold true in general¹⁵. The dependence of biological behaviors on one particular physicochemical parameter or on a combination of them (pH, temperature, concentrations of proteins *etc.*) suggests that the limited model discoveries in literature are not enough to be extrapolated in a straightforward way to *in vivo* behaviors. Last but not least, one issue regarding PC analyses is related to the massive amount of data obtained with the dedicated characterization techniques. Even if the methods of isolation were to become standardized, the proteins/nanoparticles interactions will always need statistical analyses. Galmarini *et al.*¹⁵⁶ demonstrated the crucial importance of replicates and statistics in the analyses of proteins adsorbed *in vitro* onto silica NPs' surfaces. In this study, they discussed the fact that there are few papers running control experiments when analyzing PC. With the established conditions, they found for instance that albumin and Apo (two of the most abundant proteins in serum) were more present on the analysis device than on NPs. It is then important to avoid biased results due to the lack of a proper set up of experiments especially *in vivo* where there are already many biological parameters. They also proved, by running their experiments in triplicate, that more than 60% (out of the 250 proteins found) were not significantly present leading to a fundamental need of statistical approaches to analyze the different proteins. The absence of systematic control experiments or replicates can be explained by the amount of data coming from the experiments. It is not unusual to obtain several hundred proteins in a PC study and the classification of the data as well as the data processing can be an issue. Thus, the importance of proper set-up, repetition and reproducibility of isolation and analysis methods becomes crucial to analyze the *in vivo* protein interactions with NPs. A last issue for data analyses is that PC is a statistical phenomenon. Forest and Pourchez¹⁵⁷ already noted that since proteins and NPs have approximately similar sizes, an average approach of PC is not very reliable. Most techniques usually analyze hundreds of different proteins. It is not possible for all these proteins to stick at the surface of a single nanoparticle. Therefore, considering an average PC may not be trustworthy because no NP has this exact average composition (Figure 8c). No analytical solution currently exists as it is impossible, especially *in vivo*, to analyze the PC on single NPs.

All these unaddressed concerns are particularly challenging for the future of PC studies *in vivo*. The solution may come from new isolation and analysis techniques. As *in vivo* conditions are, for the moment, difficult to compare to those *in vitro*, mastering the analyses is required to be able to understand and control the adsorption of proteins on NPs once injected. Some experiments have highlighted that the dynamic process of the PC formation is influenced by i) the time of incubation and ii) the flow of bloodstream. Since the PC formation in blood is a dynamic process, a better *in vitro* model may come from the use of microfluidic setups¹⁵⁸. Kari *et al.*¹⁵⁹ and Palchetti *et al.*¹⁶⁰ (Figure 8d) suggest that dynamic *in vitro* analyses result in a different PC on NPs than static approaches. They claimed that the circulation of NPs *in vitro* might mimic the effect of bloodstream. Weiss *et al.*¹⁶¹ went one step further while studying the temporal evolution of PC with a dynamic setup. They found three different steps of protein interactions on silica NPs' surface. During the initial step the first proteins adsorbed in an irreversible manner directly onto the particle surface. In the second step, the corona interacts irreversibly with other proteins forming an intermediate layer where the PC does not directly

adsorbed to the surface but belongs to the inner HC. They demonstrated that HC is actually a double layer of proteins strongly interacting with the NPs' surface and with strongly adsorbed proteins. During the last step, circulating proteins form the outer SC layer by reversibly binding with proteins from the HC. An innovative magnetic separation technique (Figure 8e) developed by Ashkarran *et al.*¹⁶² seems to be a good alternative to centrifugation to isolate PC. This method relies on magnetic levitation to prevent proteins from sticking to the surface of the isolation device. This technique leads to a more accurate determination of the composition of PC by separating NPs by the quantity of proteins they have on their surface preventing in part the "average analysis" discussed above. To analyze PC *in vivo*, a prominent work from Bargheer *et al.*¹⁶³ used radiolabeling as a promising tool to probe the fate of an artificial PC. To do so, they tracked transferrin or albumin labelled with ¹²⁵I, allowing to study the uptake and degradation. Despite this solution being restricted to only a few proteins, labelling PC could clearly help understand its *in vivo* behavior. Such engineering techniques should be kept in mind to bring back together the *in vitro* and *in vivo* behaviors of PC.

Accurate and standardized procedures were and will be proposed¹⁵¹ and will help to better compare the data from PC. However, it is now accepted that the massive number of varying parameters in biology and in analytical science might be too important to be controlled. Despite the fact that modeling such complex molecules with computational simulation¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ and machine learning¹⁶⁷ is still a very laborious task, this discipline would clearly benefit in the years to come from a fundamental understanding of the parameters responsible of the PC formation at the NPs' surface. In the meantime, data management with advanced engineering approaches may help to have them sorted and to analyze the PC formation to smooth the bias due to the operator, methodology or the studied model (Figure 8f).

Conclusions

Starting from what is known of the PC formation; many studies are trying to tune *in vitro* the NP surfaces with chemical modifications or directly with protein coatings in order to improve the *in vivo* biological behaviors of their nano-tools. In such studies, controlling the NP's material parameters may help controlling their biomedical behaviors. In other studies, the NPs are put *in vivo*, their PC is characterized and it seems to obey the same rules as *in vitro* (same parameters

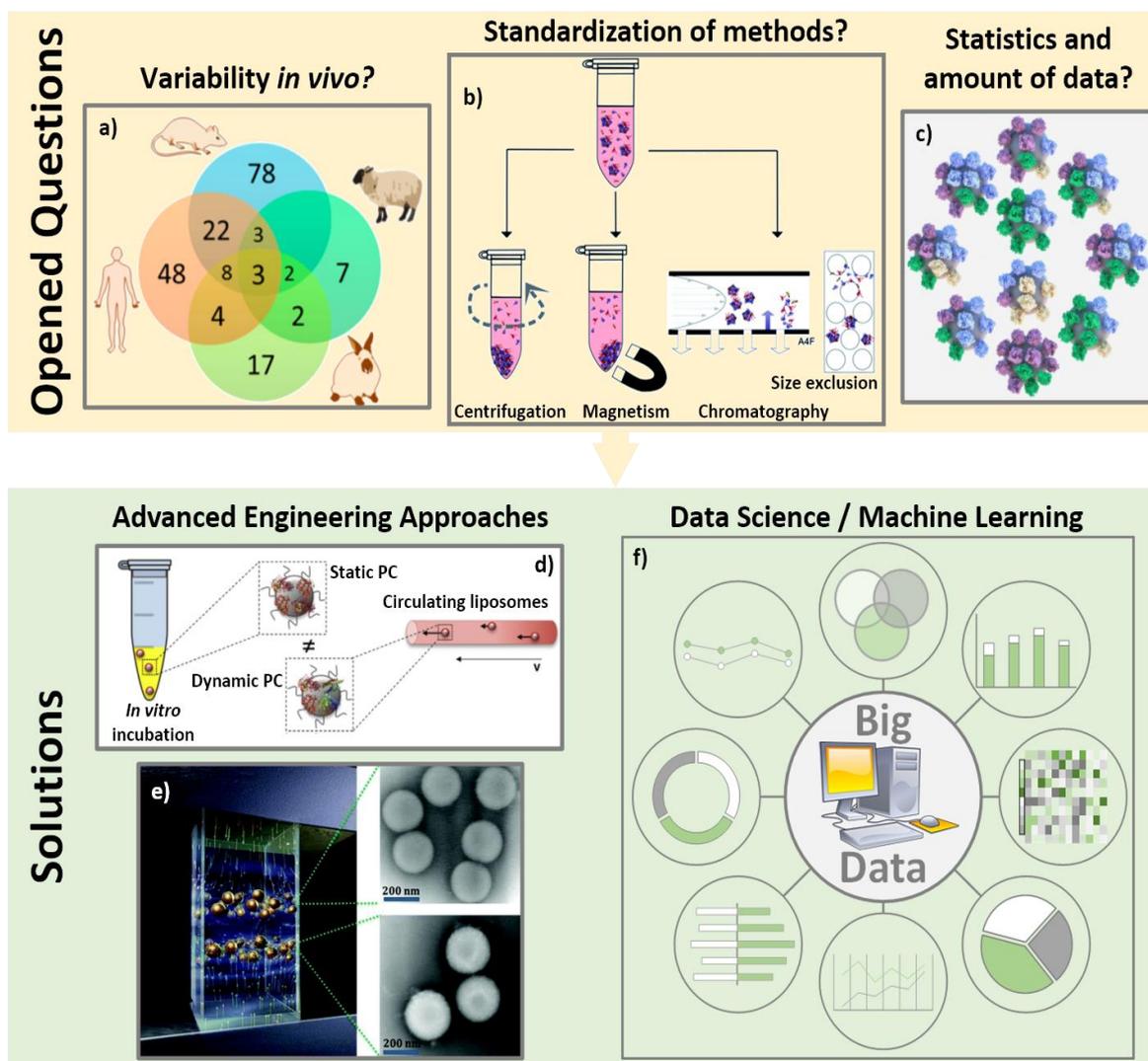


Figure 31 : Open questions about the PC analyses *in vivo*: A) There are a lot of varying biological parameters *in vivo* such as different PC coronas found on polystyrene NPs incubated in different animal serum as represented on the Venn diagram: adapted with permission from¹⁴⁷. Copyright© (2018) American Chemical Society ; B) Characterizations of PC are not yet standardized such as the separation techniques of the hard PC leading to difficult comparisons: from¹⁵³ - Published by The Royal Society of Chemistry ; C) Average analyses of PC are also not reliable. There is no average PC but a multitude of different PC around various different NPs: reproduced from the work published in ¹⁵⁷ Copyright© (2016) with permission from Elsevier. Solutions for the analyses of PC especially *in vivo* could come: from engineering development to standardize and mimic the biological environment like: D) microfluidic to incubate NPs with proteins in dynamic environment: adapted from the work published in ¹⁶⁰ Copyright© (2016) with permission from Elsevier or E) magnetic levitation method separating NPs depending on their amount of PC to get closer to the “real” PC: reproduced from¹⁶² with permission from The Royal Society of Chemistry and/or F) from data science to pool and analyze all the results leading to data smoothing and a global understanding.

influencing protein adsorption). However, comparative studies between *in vitro* and *in vivo* PC have shown very different results. These differences are linked to the various parameters whose control still need to be improved in order to better optimize the *in vivo* PC: i) set-up, reproducibility and repeatability of experimental and analyses methods; ii) accurate statistics on the obtained data; iii) reliability between *in vitro* analyses and *in vivo* “real” behavior and last but not least, iv) the control of the external physicochemical and biological parameters influencing PC *in vivo*. There is still room to analyze, compare and propose many mechanisms of protein interactions in order to control the NPs’ behavior but the complexity of the systems might slow down the full understanding of the *in vivo* PC. It is equally important to evaluate all the experimental conditions from the selection of the right *in vivo* medium to a careful choice of the analysis models in order to predict the nanosystem’s biological responses. With each altered parameters, the adsorbed proteins are different *in vitro*, *in vivo* and in human samples, which influences functionality of nanomaterials. However, some promising studies are proposing another approach, *in vivo* protein fishing, to be used as a diagnostic tool. Instead of trying to fully understand the *in vivo* behaviors, NPs are used to interact with specific proteins and then they are removed from the organism for early diagnosis^{132,168}. With all the knowledge already acquired, it is clear that the control of the materials parameters will not allow for a full optimization of *in vivo* PC and therefore of the NP biological behavior without a full understanding of this topic that could be the next step in the development of PC-based personalized nanomedicine.

Conclusion chapitre 1

Ce premier chapitre met en évidence la diversité des nanoparticules étudiées à des fins biomédicales. Les paramètres influençant les comportements biologiques sont nombreux (Figure 32, dont la partie supérieure est extraite de [86]). Ici, la taille, la forme et la chimie de surface et leurs influences sont détaillées. Ces paramètres, intrinsèques aux nanoparticules, ne représentent qu'un aspect des facteurs à prendre en compte. L'interface NPs-milieu biologique et la formation d'une couronne protéique (PC, *Protein Corona*), notamment, joue un rôle crucial. Cette couronne protéique est elle-même impactée par les paramètres intrinsèques aux NPs susmentionnés.

Les objectifs de ce travail sont donc tout d'abord de constituer une bibliothèque de NPs comportant entre deux échantillons au moins un paramètre commun, afin de pouvoir étudier l'influence de celui-ci. Les paramètres choisis sont la taille et la chimie de surface. Les NPs doivent être synthétisables de manière reproductible, contrôlée et à grande échelle. Les choix des systèmes retenus sont justifiés et développés. Les nanoparticules choisies sont les nanoparticules d'oxyde de fer, d'or et de façon plus sommaire, de silice. Leurs structures, leurs propriétés fondamentales principales et des exemples de leurs potentielles applications médicales sont présentés. Les molécules choisies comme fonctionnalisation de surface sont les polymères (PEG et PVA), le citrate et le glutathion. Les synthèses et fonctionnalisations de surface de ces systèmes font l'objet du deuxième chapitre.

L'accent est mis ici sur l'aspect *in vivo* de la couronne protéique, dont les résultats différents de ceux *in vitro* soulignent l'importance de privilégier les études dans ces conditions. Le troisième chapitre est donc dédié à l'étude de la PC elle-même et aux études *in vivo* sur certaines NPs synthétisées.

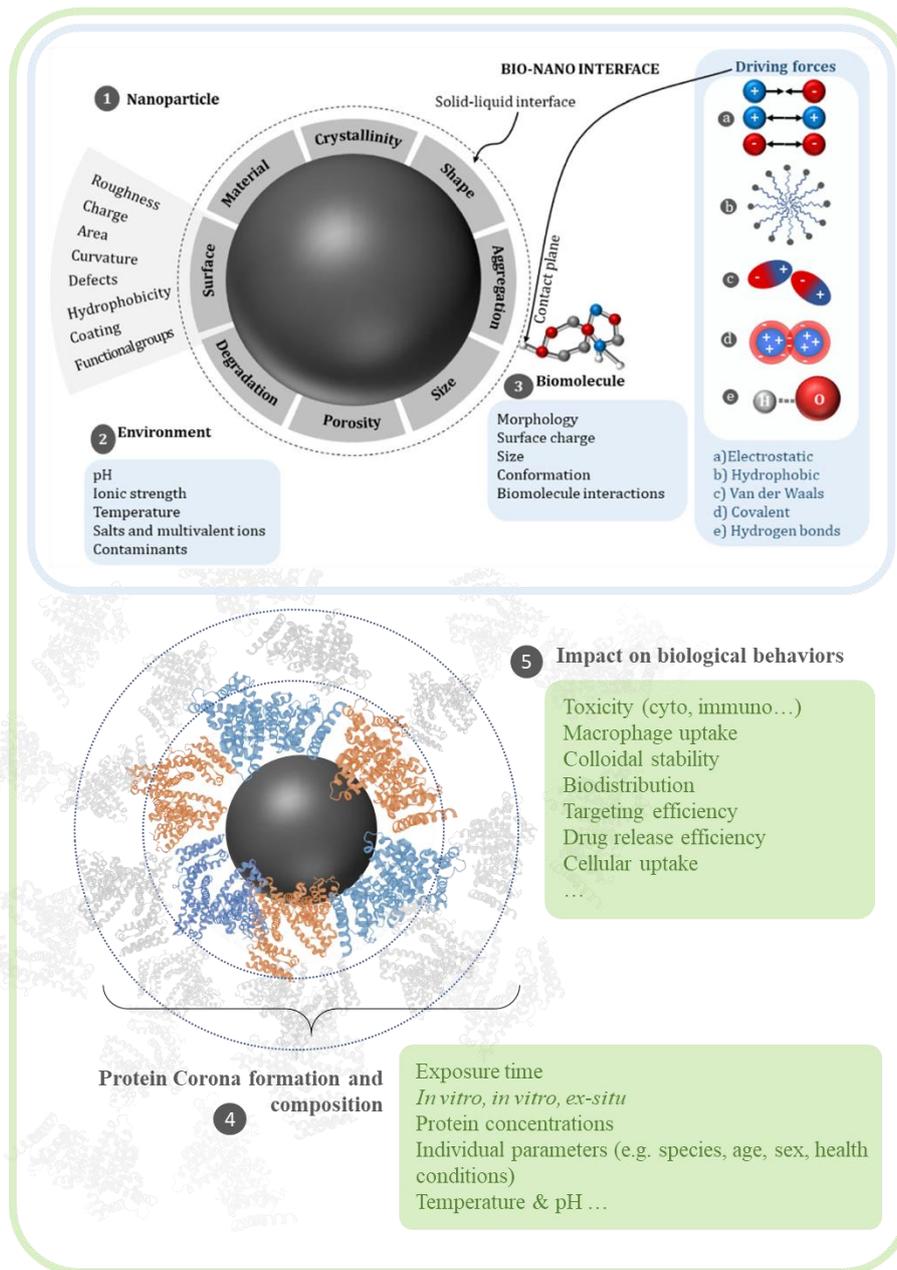


Figure 32 : récapitulatif des aspects à prendre en compte dans l'étude des NPs développées à des fins biomédicales : des paramètres de la suspension de nanoparticule aux impacts de la couronne protéique. Partie supérieure extraite de [86].

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation de nanoparticules inorganiques

Le but de ce chapitre est de présenter la bibliothèque de nanoparticules développées durant ce travail de thèse et destinées à l'étude des interactions nanoparticules-protéines. Le but de cette bibliothèque est d'avoir accès à des particules ayant des paramètres variables (composition de la nanoparticule ou du coating, taille, ...) tout en conservant la possibilité d'étudier l'influence de chacun d'entre eux sur les propriétés biologiques. Pour cette raison, nous avons veillé à ne pas faire varier trop de paramètres en même temps en élaborant des lots « associés » pour lesquels un seul paramètre change.

Le chapitre est divisé en trois parties, correspondant aux trois matériaux sélectionnés dans la partie précédente : oxyde de fer, or et silice. Une brève bibliographie des types de synthèse est abordée pour chaque matériau. La synthèse, les différents types de fonctionnalisation et leurs caractérisations sont ensuite traités.

I. Nanoparticules d'oxyde de fer

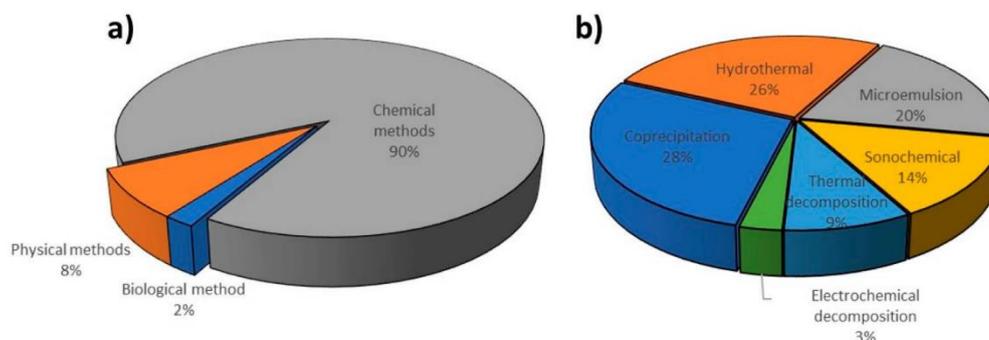
I.A. Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules d'oxyde de fer

I.A.1. Procédé de synthèse et purification

I.A.1.a) Synthèse des nanoparticules d'oxydes de fer dans la littérature

Comme discuté dans le premier chapitre de cette thèse (I.B.1), les propriétés chimiques et physiques particulières des nanoparticules d'oxyde de fer et leur compatibilité biologique aisément accessible via des fonctionnalisations en font de bonnes candidates pour les applications biologiques.

Les méthodes de synthèses peuvent être physiques, chimiques, ou biologiques. [56]. D'après Ali *et al*, les plus courantes sont la co-précipitation, la décomposition thermique et les micro-émulsions (Figure 33). Depuis quelques années, la recherche s'oriente notamment vers des méthodes plus respectueuses de l'environnement, c'est



à dire sans produits ni sous-produits toxiques, utilisant comme réactifs des produits végétaux (tomates, extraits de feuilles, etc [105]). [106]

Le tableau ci-dessous, tiré de la publication de N. Ajinkya [107] et complété par le principe des méthodes, a pour but de donner un aperçu des différentes voies de synthèse ainsi que leurs avantages et inconvénients. Dans la plupart des cas, un compromis qualité vs quantité est à faire en fonction de l'utilisation des NPs visée.

La méthode choisie dans ce travail est la co-précipitation car elle permet de travailler directement en milieu aqueux et de synthétiser de lots importants (typiquement, 0,5 L à 10mg/mL).

Tableau 1 : méthodes de synthèses des SPIONs et leurs atouts et inconvénients, extrait et traduit de [107], mis à jour et enrichi des principes des méthodes.

méthode	principe	avantages	inconvénients
co-précipitation	précipitation d'ions Fe ²⁺ et Fe ³⁺ par l'addition d'une base	peu coûteux, simple et contrôle aisé de la taille moyenne et de la composition, respectueux de l'environnement	agglomérations, sphéricité discutable, large distribution en taille, basse magnétisation
micro-ondes	condensation thermique de cations Fe ²⁺ et Fe ³⁺ en solution, chauffage par micro-onde : beaucoup plus homogène qu'un chauffage standard	temps de réaction courts, plus hauts rendements, reproductibilité, manipulation simple, chauffage homogène du précurseur	coûteux, inadapté pour le suivi de réaction, recherche pour le scale-up en cours
pulvérisation pyrolytique	pulvérise une solution contenant les précurseurs métalliques sur, typiquement, une flamme (FSP, <i>Flame Spray Pyrolysis</i>). Formation de gouttelettes avec la combustion du solvant, les sels de métaux sont pyrolysés en oxyde de métaux puis s'agrègent pour former les NPs.	suspensions avec dispersion fine ; taille, forme et composition contrôlées	agrégats, coûteux
pyrolyse laser	même concept que ci-dessus avec un laser	petites particules, distribution fine, très peu d'agrégation	complexe, très coûteux
décharge par impulsions	un courant pulsé passe dans un fil métallique en milieu gazeux contrôlé, l'énergie ainsi déposée crée un plasma du matériau en question qui, en refroidissant en interagissant avec le gaz, se condense uniformément	processus rapide, haute pureté	production limitée, nécessité de système de vide poussés, coûteux, contaminations

vapeur chimique condensation	précurseurs sous forme de gaz décomposés par chauffage et condensation	adéquat pour études fines de propriétés, haute pureté	peu de produits, contrôle de taille et de distribution compliquées
décomposition thermique	décomposition des précurseurs à haute température en présence de solvants organiques + surfactants	suspensions à hautes monodispersités, adapté pour l'étude de réactions	très couteux, temps de réaction long, hautes températures requises
microémulsion	précipitation de la phase dispersée dans deux phases non miscibles (w/o : water in oil ou o/w : oil in water)	suspensions monodisperses, possibilité d'obtenir différentes morphologies	scale-up difficile
polyol (alcools multivalents)	suspension d'un précurseur métallique dans un solvant type glycol puis chauffage de la solution à une température de reflux	suspensions monodisperses, scale-up simple	hautes températures requises, long
sol-gel (solution-gélification)	hydrolyse + condensation, puis séchage & calcination : solution homogène du précurseur gélifiée, solvant retiré et séchage du gel restant	peu coûteux, rapide, bon contrôle sur la composition chimique du produit	balance : peu couteux et peu monodisperse, ou très couteux et finement monodisperse
sono-chimique	introduction d'ultrasons dans le milieu réactionnel : phénomène de cavitation acoustique	simple, peu coûteux, safe, respectueux de l'environnement, nombre de réactants limités	suspensions à faibles concentration, agglomération
synthèses dites "vertes" (plantes, bactéries)	réduction et stabilisation de précurseurs métalliques (comme le nitrate de fer) par extraits végétaux	respectueux de l'environnement, peu coûteux, inoffensif	méthode récente, donc mécanismes mal connus : contrôle difficile des tailles et des propriétés

I.A.1.b) Protocole de synthèse par co-précipitation

Le protocole utilisé dans cette thèse est adapté de celui du groupe du Pr. Hofmann [108], développé à partir des travaux de Massart [109].

Les produits utilisés dans cette synthèse sont : $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (CAS 10025-77-1), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (CAS 13478-10-9), ammoniacque 28% (CAS 1336-21-6), acide nitrique 65% (7697-37-2), $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (CAS 7782-61-8).

La co-précipitation des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} en milieu basique se fait selon la réaction suivante :

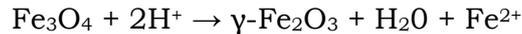


Les poudres de FeCl_2 et FeCl_3 sont au préalable broyées au mortier pour faciliter leur dissolution. Elles sont introduites avec un rapport molaire $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ de 2 (12,72 g FeCl_2 + 34,58 g FeCl_3) dans un bécher de 1500 mL d'eau déionisée (DI)

(concentrations de : 8,48 g/L FeCl₂ et 23,05 g/L de FeCl₃) et mélangées jusqu'à leur dissolution complète. 120 mL d'ammoniaque 28 % sont ajoutés afin de se placer en milieu basique. La suspension devient rapidement noire ce qui indique la formation de l'oxyde de fer.

Les nanoparticules sont purifiées afin d'éliminer les ions OH⁻, Cl⁻, NH₄⁺ et les ions Fe³⁺ dont la présence est visible à l'œil nu car ils donnent une couleur orangée à la solution. Le surnageant est prélevé à chaque lavage pour contrôler le pH qui doit diminuer car la réaction consomme des ions hydroxides. Les SPIONs sont retirées en utilisant l'attraction magnétique. La suspension est placée sur un aimant puissant. Les SPIONs sédimentent pendant 5 minutes. Le pH du surnageant est contrôlé et les SPIONs sont redispersés dans l'eau DI. Le procédé est répété jusqu'à atteindre pH=7. Suite au dernier lavage, 400 mL d'eau DI sont introduits pour redisperser. La suspension est ensuite centrifugée 5 min à 5k g. Le surnageant est éliminé rapidement pour éviter une redispersion des particules dans l'eau.

A ce stade, les nanoparticules formées ont la structure de la magnétite. Pour les raisons évoquées dans le premier chapitre (I.B.1.a), elles doivent être oxydées en maghémite en les introduisant en milieu acide :



Pour ce faire, les particules sont redispersées dans 120 mL HNO₃ à 2 M et passées dans un bain à ultrasons pour optimiser la redispersion. Dans un ballon de 500 mL, 240 mL de Fe(NO₃)₃ 0,35 M sont introduits dans la solution. Le ballon est chauffé dans un bain d'huile à 120 °C avec un système de reflux pendant 1h30. Une fois la suspension refroidie, elle est transférée dans un bécher d'1 L et une dernière décantation magnétique est conduite pendant 10 min. Les particules sont redispersées dans 400 mL d'eau DI.

Les particules sont finalement purifiées et stabilisées par dialyse. 2L d'eau DI sont ajustés à pH compris entre 2 et 3 à l'aide d'acide HNO₃ pendant 3 jours. Le pH de l'eau de dialyse est contrôlé 2 fois par jour et cette eau est changée, en ajustant son pH entre 2 et 3. Les SPIONs « nus » sont stables en milieu acide en raison des groupements -OH présents sur leur surface. Enfin, la suspension est centrifugée 15 min à 25k g afin d'éliminer les plus gros agrégats. La suspension de nanoparticules est donc dans le surnageant, à un pH de 3 et à une concentration attendue de l'ordre de 10 mg/mL.

I.A.2. Fonctionnalisations de surface

I.A.2.a) Citrate

Le greffage de molécules de citrates à la surface des SPIONs s'effectue par les groupements carboxyles déprotonés (Figure 34), chimisorbés à la surface des particules au niveau des sites Fe-OH, menant à des liaisons Fe-O-C et à l'élimination d'eau [110]. Le citrate utilisé est une poudre de citrate trisodique dihydraté (TSCD, *tri sodium citrate dihydrate*, CAS 6132-04-3). Le protocole de référence est celui de R. Vinluan [111]. [110]

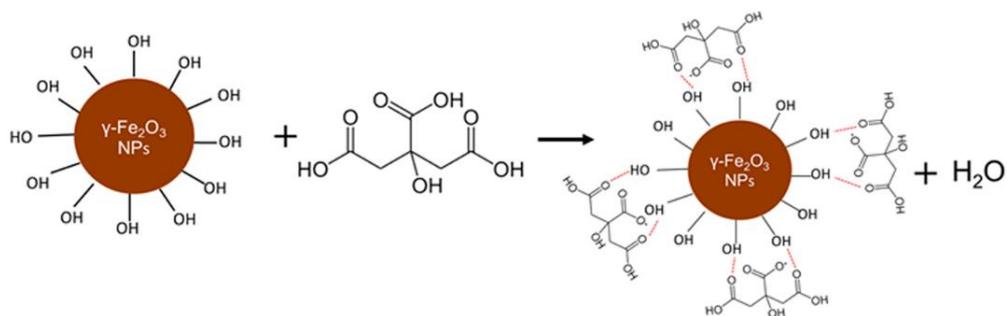


Figure 34 : schéma du greffage de citrate à la surface de maghémite, extrait de [6].

En pratique, le citrate est directement introduit dans la suspension d'oxyde de fer afin d'obtenir une concentration de 0,5 M. Après la dissolution complète de la poudre en mélangeant vigoureusement, la suspension est insérée dans un ballon puis chauffée au bain-marie à 37°C pendant 2h avec agitation (400rpm). A cette température, aucune différence n'a été observée pour des fonctionnalisations avec ou sans système à reflux. Différentes méthodes de purification ont ensuite été testées afin d'éliminer le surplus de citrate et les ions Na⁺ :

- La centrifugation (3k g, 3 min)
- La décantation magnétique
- La chromatographie d'exclusion stérique (SEC *Size Exclusion Chromatography*) (colonne GE Healthcare PD-10)
- La dialyse

L'efficacité de ces méthodes sur la dispersion des SPIONs@citrate seront évaluées plus bas dans la partie caractérisation.

I.A.2.b) Glutathion

Le coating de glutathion sur les SPIONs fait directement suite au coating de citrate, en suivant le protocole de Vinluan *et al.* [111]. Les molécules de GSH substituent celles de citrate via leurs groupements carboxyles. Cette substitution peut s'expliquer par la différence de leur pKa qui indique le caractère plus acide des groupements carboxyles du GSH par rapport à ceux du citrate : $pK_{a_{citrate}^{COOH}}(1) = 3,13$, $pK_{a_{citrate}^{COOH}}(2) = 4,76$; $pK_{a_{GSH}^{COOH}}(1) = 2,05$, $pK_{a_{GSH}^{COOH}}(2) = 3,40$. La poudre utilisée est du L-glutathion réduit (CAS 70-18-8).

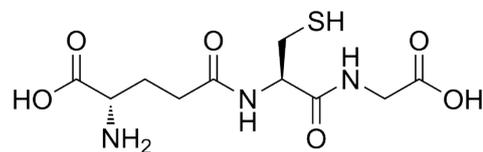


Figure 35 : formule du L-glutathion

Le glutathion est ajouté à la suspension afin d'obtenir une concentration de 0,14 M. La suspension est laissée sous agitation magnétique pendant 24h à température ambiante.

Les particules sont ensuite précipitées par aimantation (le contenant est posé sur un aimant puissant) et redispersées en ajoutant de l'eau puis de l'éthanol avec un ratio eau/éthanol 2:1. Le pH est ajusté à 2 à l'aide d'HCl 1M et la suspension est vigoureusement mélangée. Les particules sont de nouveau précipitées par aimantation et redispersées dans l'eau. Le pH est ajusté à 7 à l'aide de NaOH 1 M.

Différentes méthodes de purifications ont également été testées :

- La centrifugation, identique à celle des SPIONs@citrate (3k g, 3 min), qui n'a aucun effet sur la suspension
- La décantation magnétique qui, de même, n'a aucun effet sur la suspension, ce qui peut démontrer une stabilité accrue des SPIONs@GSH par rapport aux SPIONs@citrate
- La SEC (*Size Exclusion Chromatography*, Chromatographie d'exclusion de taille)
- La dialyse
- La spin filtration (5k g 15 min 30 kDa) (Figure 36) entraîne une fixation des SPIONs sur la membrane

L'efficacité de ces méthodes sur la dispersion des SPIONs@GSH seront évaluées plus bas dans la partie caractérisation.

I.A.2.c) Polymères biocompatibles

i. PEG

La poudre est directement introduite dans la suspension de SPIONs avec un rapport final massique SPIONs:PEG de 1:3,5. Le pH est ajusté à 11 afin de déprotoner le groupement -SH. L'ensemble est vigoureusement mélangé pendant 24h à température ambiante. La suspension est ensuite centrifugée 15 min à 5k g avec un filtre 50 kDa - ce qu'on appelle spin-filtration, illustrée en Figure 36 - puis redispersée dans de l'eau DI.

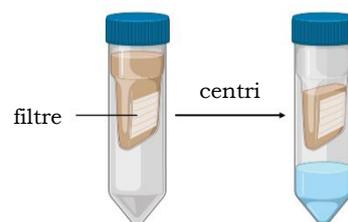


Figure 36 : illustration de la spin-filtration

ii. PVA

Des PVA de deux masses moléculaires, 12kDa et 31 kDa, et avec trois différents groupements fonctionnels (COOH, OH et NH₂) ont été utilisés. Les PVA utilisés sont les suivants : PVA Mowiol 3-85 (12 kDa) M12 (NH₂ functionalized: 80-140 kDa); KL506 (COOH functionalized: 30-50 kDa) from Kuraray. PVA Mowiol 4-88 (31 kDa) from Merck.

Les SPIONs@PVA sont les particules utilisées dans une manipulation biologique résultant en une publication introduite dans le chapitre 3. Les détails du protocole et les caractérisations de ces particules sont donc présentés dans cette publication et ne seront donc pas abordées dans ce chapitre 2.

I.B. Caractérisation des nanoparticules et de leurs fonctionnalisations

I.B.1. Caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer

Le protocole de synthèse choisi possède l'avantage de produire des lots importants. Ainsi, les SPIONs utilisés tout au long de la thèse proviennent de la même synthèse. Pour cette raison, une attention particulière a été portée à la caractérisation des nanoparticules nues.

I.B.1.a) Structure

i. Taille hydrodynamique et dispersité

La DLS mesure les variations d'intensité d'un rayonnement laser passant au travers d'un échantillon, et utilise un corrélateur pour comparer cette intensité à t et $t+\delta$. C'est à partir de cette corrélation qu'est déterminé le coefficient de diffusion via l'algorithme de l'analyse des cumulants dans notre cas. Le corrélogramme correspond aux résultats « bruts » et permet d'avoir des indications sur la taille et la monodispersité des échantillons. Il est surtout examiné lorsque la distribution en intensité est estimée ambiguë. Avec la distribution en intensité, la DLS indique le diamètre hydrodynamique moyen des particules. En prenant en compte l'absorption et l'indice de réfraction du matériau, respectivement de 0,1 et 2,24 pour les SPIONs, une estimation de la taille des cristallites est donnée.

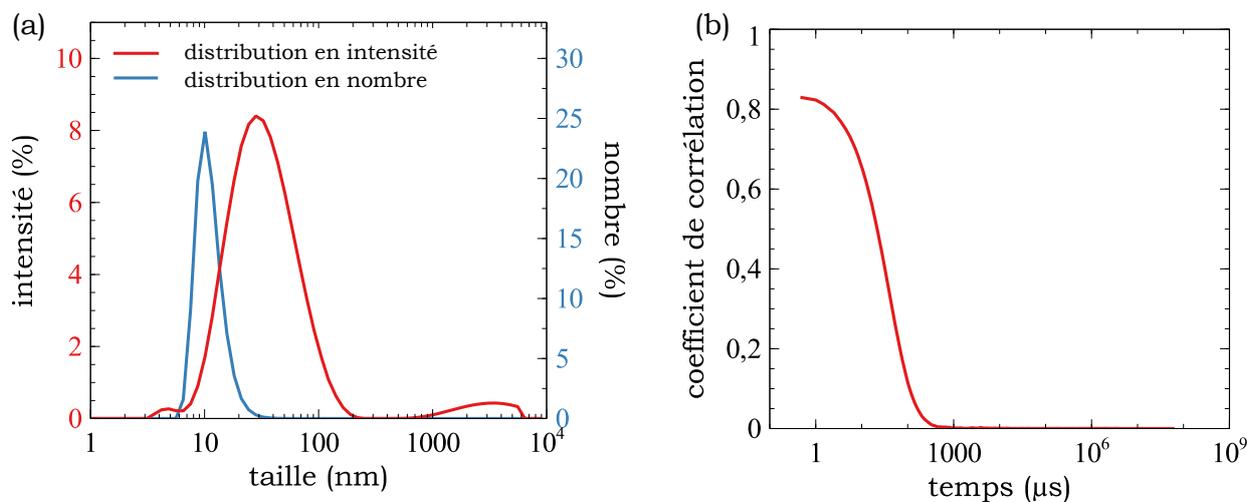


Figure 37 : (a) distribution en intensité et en nombre des SPIONs (b) corrélogramme.

Les SPIONs synthétisés ont un diamètre hydrodynamique de 27 nm, avec un PDI (indice de polydispersité) de 0,3 (Figure 37). Le PDI est le carré du rapport de l'écart-type et du diamètre hydrodynamique moyen. Sans dimension et compris entre 0 et 1, il donne une indication sur le caractère mono-disperse ou non de la suspension. D'après les normes ISO 22412, un échantillon mono-disperse de particules sphérique possède un PDI $< 0,07$. Cependant d'après Malvern [112], de tels échantillons correspondent notamment aux standards de latex et aux nanoparticules synthétisées expressément pour avoir une distribution mono-disperse. En pratique, les algorithmes de calculs de distributions de la DLS conviennent pour des mesures ayant des PDI jusqu'à 0,7. Dans nos applications, la mono-dispersité est considérée comme satisfaisante lorsque le PDI est inférieur à 0,25.

En plus de ce PDI élevé et malgré une fonction de corrélation satisfaisante visible en Figure 37b (interception supérieure 0,8 et pente abrupte avec une valeur de 0 atteinte pour un temps $t < 1000\mu s$), des objets d'une taille supérieure à 1000 nm en intensité sont observés, probablement dû à la présence d'agrégats. On l'explique par la dilution $\times 10$ dans l'eau DI : les SPIONs dits « nus » sont stables dans leur milieu post-synthèse, c'est-à-dire en milieu aqueux à pH acide (entre 2 et 3), et instable à pH plus élevé (ici, pH 6). Ceci explique en partie la nécessité d'une fonctionnalisation.

Bien que la valeur du diamètre moyen en intensité soit celles les plus fréquemment utilisées, d'autres données peuvent nous donner plus d'informations. La distribution en nombre présente un pic étroit avec un maximum à 11 nm. Des précautions sont à prendre : la distribution en nombre favorise les plus petites particules et une différence entre la valeur donnée en intensité et celle donnée en nombre peut souligner un état d'agrégation.

Les résultats des analyses DLS sont stables au cours du temps. Sur la Figure 38 sont présentés les distributions de taille en intensité DLS des SPIONs nus fraîchement dilués 10x dans de l'eau DI. Aucune variation de taille hydrodynamique n'est observée après trois ans, démontrant que les SPIONs restent inchangées dans leur milieu d'origine pendant au moins cette durée. C'est un atout majeur pour des synthèses produisant des lots importants. Ceci a permis l'utilisation du même batch tout au long de cette thèse.

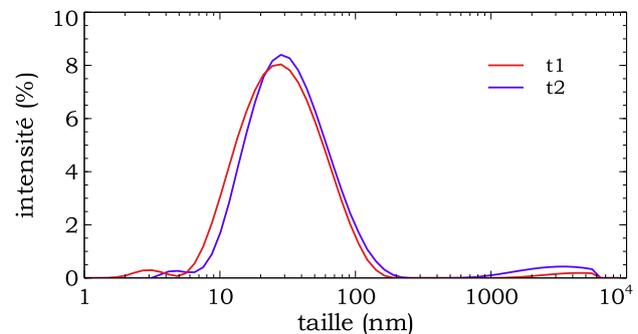


Figure 38 : Analyse DLS des SPION fraîchement dilués 10x dans l'eau DI s nus post synthèse (t1) et après 3 ans (t2)

ii. Morphologie

La diffraction des rayons-X (DRX) permet d'analyser la structure cristalline des particules. Le diffractogramme correspond à celui de la structure magnétite (Figure 39). Cependant, la maghémite et la magnétite sont difficilement différenciables par cette technique [113].

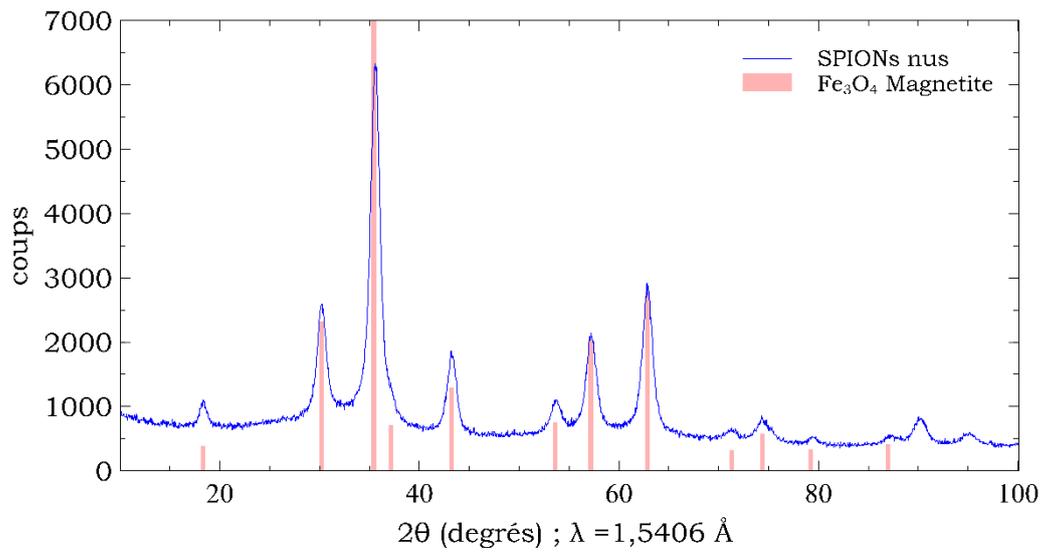


Figure 39 : Diffractogramme des SPIONs nus et pics de la fiche PDF (Fichier de Diffraction de Poudre) n°00-065-0731.

Le paramètre de maille est déterminé par le logiciel Topas et est de $a = 8,358$ Å. Avec $a(\text{magnétite}) = 8,391$ Å et $a(\text{maghémite}) = 8,345$ Å, les SPIONs sont donc constitués de magnétite partiellement oxydée. L'analyse du diffractogramme permet par ailleurs de déterminer la taille de cristallite qui est de 8,7 nm. Cette valeur reste à confirmer par microscopie électronique en transmission (MET).

L'analyse par MET des particules (Figure 40) montre qu'elles possèdent un diamètre moyen de $8,1 \pm 1,6$ nm. Cette taille est en accord avec la moyenne de la distribution en nombre trouvée en DLS et avec la taille moyenne déduite des diffractogrammes. Leur morphologie est globalement sphérique, ce qui confirme que l'approximation sphérique utilisée pour les analyses BET (plus bas), DRX et DLS est valide.

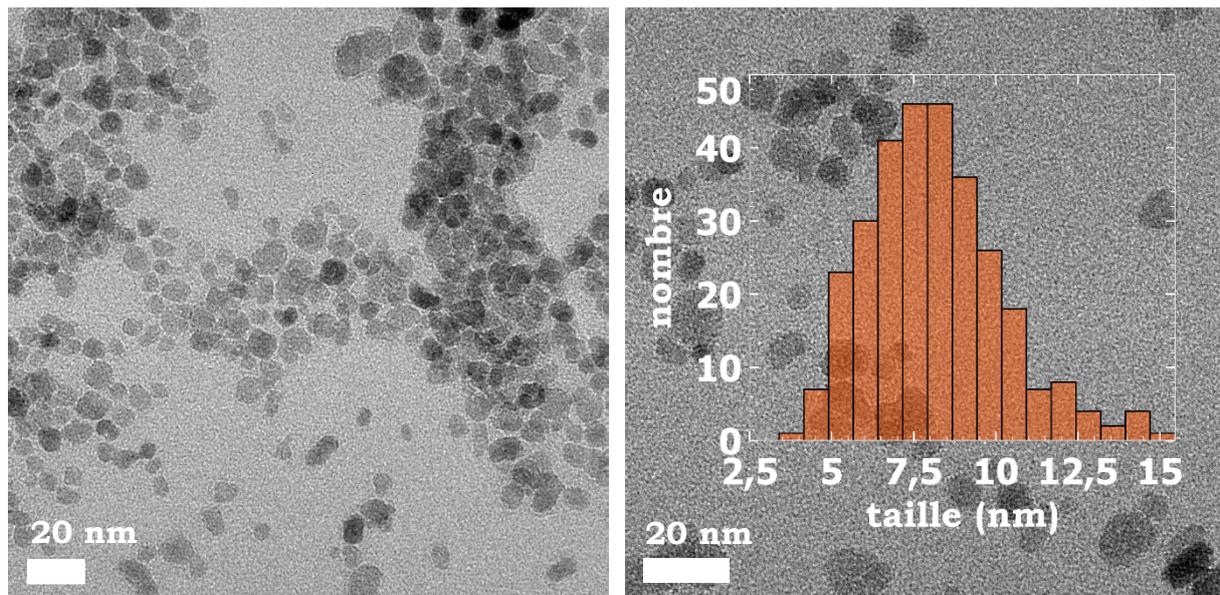


Figure 40 : Clichés TEM des SPIONs synthétisés et histogramme de leur diamètre, mesurés via le logiciel ImageJ. Comptage sur 300 particules.

Les SPIONs sont synthétisés en grand volume à concentration suffisamment élevée pour être lyophilisés ce qui permet de les caractériser via des méthodes nécessitant de travailler avec des poudres.

L'analyse par BET (Brunauer, Emmett, Teller) permet d'obtenir la surface spécifique des nanoparticules. Pour les particules d'oxyde de fer, un dégazage de 4h à 100°C sous vide est effectué. Une surface de $165,25 \pm 0,5 \text{ m}^2/\text{g}$ est déterminée. Le diamètre, calculé en supposant que les nanoparticules sont non poreuses et sphériques, est obtenu à l'aide de la formule suivante [114] :

$$\varnothing_{BET} = \frac{6000}{\rho \cdot S_{BET}}$$

Avec S_{BET} la surface spécifique (m^2/g), \varnothing_{BET} le diamètre (nm) et ρ la masse volumique (g/cm^3). En considérant des nanoparticules de structure magnétite ($\rho = 5,2 \text{ g}/\text{cm}^3$), $\varnothing_{BET} = 7,0 \pm 0,02 \text{ nm}$. En les considérant de structure maghémite ($\rho = 4,86 \text{ g}/\text{cm}^3$), $\varnothing_{BET} = 7,5 \pm 0,02 \text{ nm}$. Le diamètre obtenu par mesure BET est donc compris entre 7 et 7,5 nm. Il est très proche du diamètre obtenu par TEM.

iii. Concentration

La lyophilisation qui est utilisée pour obtenir la poudre nécessaire à certaines des méthodes de caractérisation permet d'estimer la concentration en nanoparticules, qui est ici de $8,4 \text{ mg}_{\text{NPs}}/\text{mL}$.

La concentration en fer obtenue par ICP/AES (Spectroscopie d'Emission Atomique à Plasma à Couplage Inductif) est de $6,3 \text{ mg}/\text{mL}$, soit une concentration en Fe_2O_3 de $8,9 \text{ mg}/\text{mL}$.

Le rendement calculé à partir de la concentration en fer est de l'ordre de 20%. Cette faible valeur n'est pas surprenante : au cours de la synthèse, les surnageants éliminés étaient d'une couleur jaune orangée indiquant la présence d'ions Fe^{3+} . De plus, les pertes sont importantes lors de la récupération des particules après les étapes de centrifugation.

La susceptibilité magnétique (SM) d'une suspension de nanoparticules d'oxyde de fer permet également de déterminer leur concentration. Cette propriété, intrinsèque au matériau, peut être mesurée à l'aide d'un instrument de mesure de susceptibilité magnétique, à l'aide d'une courbe de calibration reliant susceptibilité magnétique et concentration en particule [115] (Figure 41). Cette méthode présente l'avantage d'être rapide (analyses de 3 secondes), simple (ne nécessite pas de préparation d'échantillon particulière) et non destructive comparée aux autres méthodes de détermination de concentration telles que l'ICP. De plus, la SM ne prend en compte que le fer des nanoparticules magnétiques, ce qui est d'autant plus avantageux pour les applications biologiques où les ions endogènes sont parfois pris en compte par d'autres techniques. La limite de détection est de $2 \mu\text{gFe}/\text{mL}$ [115]. La valeur de la

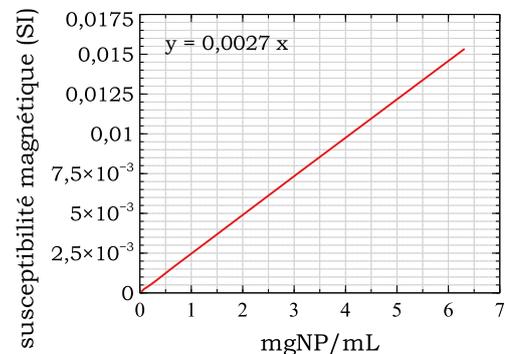


Figure 41 : courbe de calibration reliant la susceptibilité magnétique à la concentration en NPs.

suspension stock est déterminée à 5,6 mg_{NPs}/mL.

Dans la suite des manipulations, la concentration déterminée par susceptibilité magnétique sera utilisée, compte tenu de la vitesse d'analyse et de son caractère non destructif.

Tableau 2 : récapitulatif des tailles et concentrations des SPIONs nus

hydrodynamique	tailles (nm)			concentrations (mgNP/mL)		
	MET	BET	DRX	lyoph	ICP	MS
27 ; PDI : 0,3	8,1 ± 1,6	7,5	9	8,37	9	5,6

I.B.2. Caractérisation des fonctionnalisations

I.B.2.a) GSH et citrate

Dans cette partie les coatings de citrate et de GSH sont abordés simultanément dans la mesure où lors des manipulations le coating de GSH succède directement au citrate, et où les méthodes de caractérisation sont strictement identiques.

i. Comparaison des méthodes de purifications

Tout d'abord, une comparaison de différentes méthodes de purification est conduite. Les méthodes testées sont les suivantes : la spin-filtration, la centrifugation, la dialyse (filtre de 15 kDa), la décantation magnétique, et la chromatographie d'exclusion stérique (SEC *Size Exclusion Chromatography*) (colonne GE Healthcare PD-10). Des analyses DLS sont présentées en Figure 42, et les valeurs associées dans le Tableau 3. Pour la spin-filtration et la centrifugation, techniques apparentées car elles diffèrent seulement par le tube utilisé, les paramètres déterminés les plus adéquats sont une centrifugation de 5kg pendant 15 min pour les SPIONs@citrate et une spin-filtration de 5kg pendant 15 min 30 kDa pour les SPIONs@GSH.

Pour les SPIONs@citrate, la dialyse provoque une forte sédimentation des nanoparticules et l'utilisation d'une colonne SEC produit une agrégation des nanoparticules en haut de la colonne. Elles ne sont donc pas considérées dans la suite de cette étude.

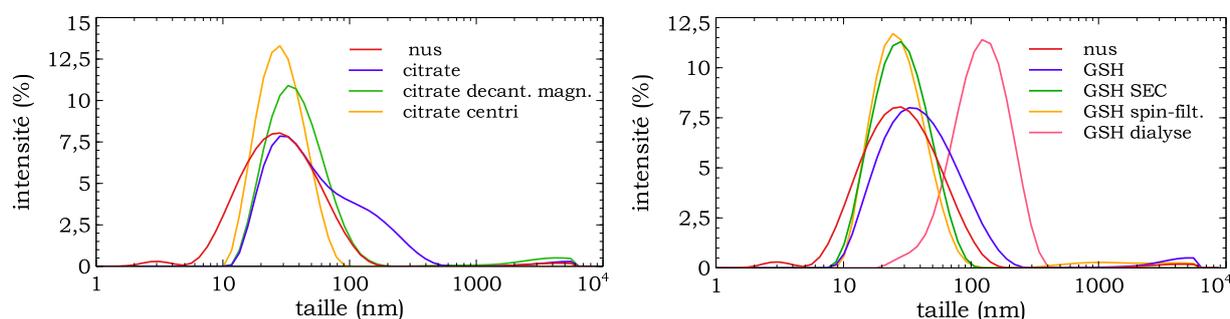


Figure 42 : analyse DLS en intensité des SPIONs avec un coating de a) citrate et b) GSH, avec différentes purifications.

Pour les SPIONs@GSH, la décantation magnétique n'a aucun effet, ce qui peut être expliqué par la stabilité de la suspension avec ce ligand. Il a été montré que le greffage de ce ligand n'affecte en rien la phase cristalline des SPIONs [116].

Par ailleurs, la purification entraîne une baisse du diamètre moyen (26 nm contre 42 nm pour le citrate, 26 nm contre 34 nm pour le GSH), et une baisse du PDI (0,15 nm contre 0,35 pour le citrate, 0,22 contre 0,31 pour le GSH) qui confirme une purification efficace des suspensions.

De plus, les SPIONs@citrate et SPIONs@GSH purifiés présentent des tailles similaires à celle des SPIONs nus (Figure 42 et les valeurs associées à ces courbes en Tableau 3). Ceci était attendu dans la mesure où les molécules sont petites (I.A.2). Cependant, la fonctionnalisation des SPIONs avec ces molécules entraînent souvent une agglomération et peu d'informations sur la purification sont apportées [111]. Avec l'optimisation de cette étape, l'allure plus fine des courbes et surtout leur PDI plus faibles suggèrent que le greffage du citrate et du GSH a bien eu lieu (le pH des SPIONs@GSH et des SPIONs@citrate étant proche de 6,5). Afin de confirmer ces greffages, des analyses via d'autres méthodes ont été conduites (ATG, XPS).

Dans la suite, seules les SPIONs@citrate centrifugées et les SPIONs@GSH SEC seront étudiées car elles possèdent les meilleures valeurs de PDI.

Le cas des SPIONs@GSH dialysés est à part : une augmentation de 80 nm du diamètre moyen est observé, mais avec un PDI correct. Ceci suppose que les nanoparticules forment de plus gros agglomérats. Pour éclaircir ce point, les SPIONs@GSH dialysées seront aussi analysées.

ii. Caractérisation des fonctionnalisations

Les concentrations en SPIONs déterminées par MS sont en moyenne de 5,5 mg/mL pour les SPIONs@citrate et de 4 mg/mL pour les SPIONs@GSH, soit des rendements de 98% pour les SPIONs@citrate et de 71% pour les SPIONs@GSH.

Les résultats précédents obtenus par DLS indiquent le greffage plausible des molécules à la surface des nanoparticules. Le potentiel zêta (Tableau 4), à pH 6, évolue de 30 mV pour les SPIONs nus à -40 mV pour les SPIONs@citrate et -35 mV pour les SPIONs@GSH après purification, ce qui confirme la présence des molécules à la surface des nanoparticules.

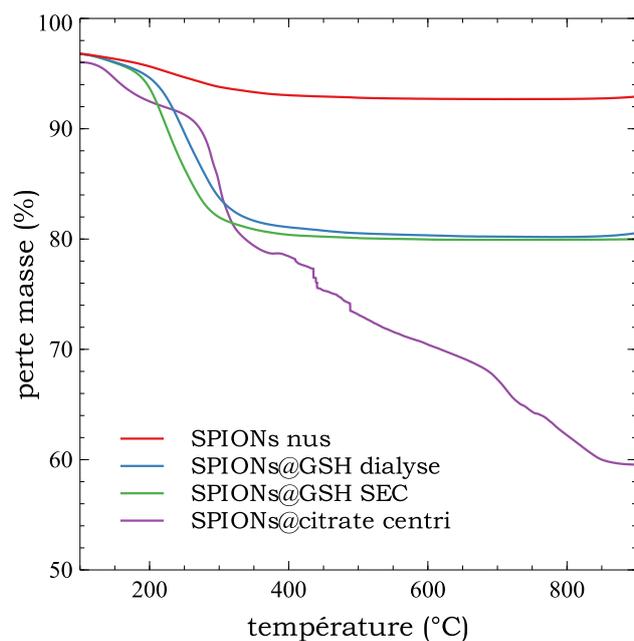
De plus, l'analyse thermogravimétrique (ATG) indique une perte de masse plus importante pour les SPION@citrate centrifugées (36%) que pour les SPIONs@GSH dialysés et SEC (17%). Ces pertes de masse sont plus élevées que celle obtenue pour les SPIONs nus (3%), mettant en évidence la présence de molécules à la surface des nanoparticules. Aucune différence n'est observée entre les SPIONs@GSH dialysées et SEC. La valeur élevée de perte de masse pour les SPIONs@citrate démontre une purification inefficace.

échantillon	Ø (nm)	PDI
nus	23	0,3
citrate	42	0,35
citrate decant.	35	0,24
citrate centri	26	0,15
GSH	34	0,31
GSH dialyse	104	0,21
GSH SEC	25	0,2
GSH centri	26	0,22

Tableau 3 : diamètre hydrodynamique moyen et PDI des purifications de SPIONs@citrate et SPIONs@GSH

échantillon	purification	ZP (mV)
nus	0	30
citrate centrifugation		-35
GSH	SEC	-40

Tableau 4 : potentiels zêta des coating de SPIONs à pH 6



Ces résultats ATG, couplés à la surface spécifique des SPIONs nues déterminée via BET (Tableau 2), permettent de calculer le taux de greffage des molécules (en molécules/nm²) [117].

$$n_{\text{molécules}} = \frac{\frac{\Delta}{M_{\text{molécule}}} \times N_A}{(100 - \Delta) * S_{\text{BET}} \times 10^{18}}$$

Où N_A est le nombre d'Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$), Δ la perte de masse en %, $M_{\text{molécule}}$ la masse molaire de la molécule (g/mol) et S_{BET} la surface spécifique des SPIONs ($165,25 \text{ m}^2/\text{g}$).

Nous obtenons 2-3 molécules par nm² pour le GSH et 10 molécules par nm² pour le citrate (Tableau 5).

Tableau 5 : ATG : nombres de molécules par nm²

échantillon	Δ (%)	M (g/mol)	Molécules / nm ²
SPIONs@GSH SEC	17	307,32	2,4
SPIONs@citrate centri	36	192,1	10,6

La spectrométrie de photoélectrons induits par rayon X (XPS) est une technique d'analyse de surface des nanoparticules. Elle permet tout d'abord une détermination des éléments présents dans l'échantillon et de leurs états électroniques, et la vérification de la présence ou non de contaminations. Une quantification des éléments est ensuite menée, notamment pour Fe, C et O, suivie de la décomposition des niveaux d'énergie afin de distinguer d'une part le greffage ou l'adhésion des molécules souhaitées à la surface des nanoparticules, et d'autre part l'efficacité des purifications. Le détail de la méthode de traitement est présenté en annexe.

Le tableau ci-dessous présente la quantification des éléments présents dans les SPIONs nus, les SPIONs@GSH et les SPIONs@citrates, ainsi que le rapport carbone sur fer. Des contaminations, pouvant provenir de manipulations manuelles (Na, Ca), sont observées mais restent négligeables (<1 %). Le silicium détecté dans l'échantillon SPIONs@citrates pourrait provenir des gants ou de l'équipement de mesure utilisé [118]. La quantité de carbone et d'oxygène augmente drastiquement avec le glutathion et le citrate, ce qui va dans le sens d'une validation des fonctionnalisations. Pour le citrate, le fer n'est pas détecté. La technique analysant 2-3 nm en profondeur, cette absence de détection peut s'expliquer par l'épaisseur conséquente de citrate, dû à une purification peu efficace par la centrifugation. La

Tableau 6 : Analyse XPS des SPIONs nus et fonctionnalisés : éléments présents et leur quantifications.

surface	élément							C/Fe
	C	O	Fe	Na	Ca	N	Si	
SPIONs nus	3,98%	20,72%	75,30%					5,29
SPIONs GSH (SEC)	13,18%	22,18%	63,37%	0,38%	0,59%	0,31%		20,8
SPIONs GSH (dialyse)	14,53%	22,51%	62,22%	0,74%				23,35
SPIONs citrate	49,14%	42,55%		7,12%			1,19%	

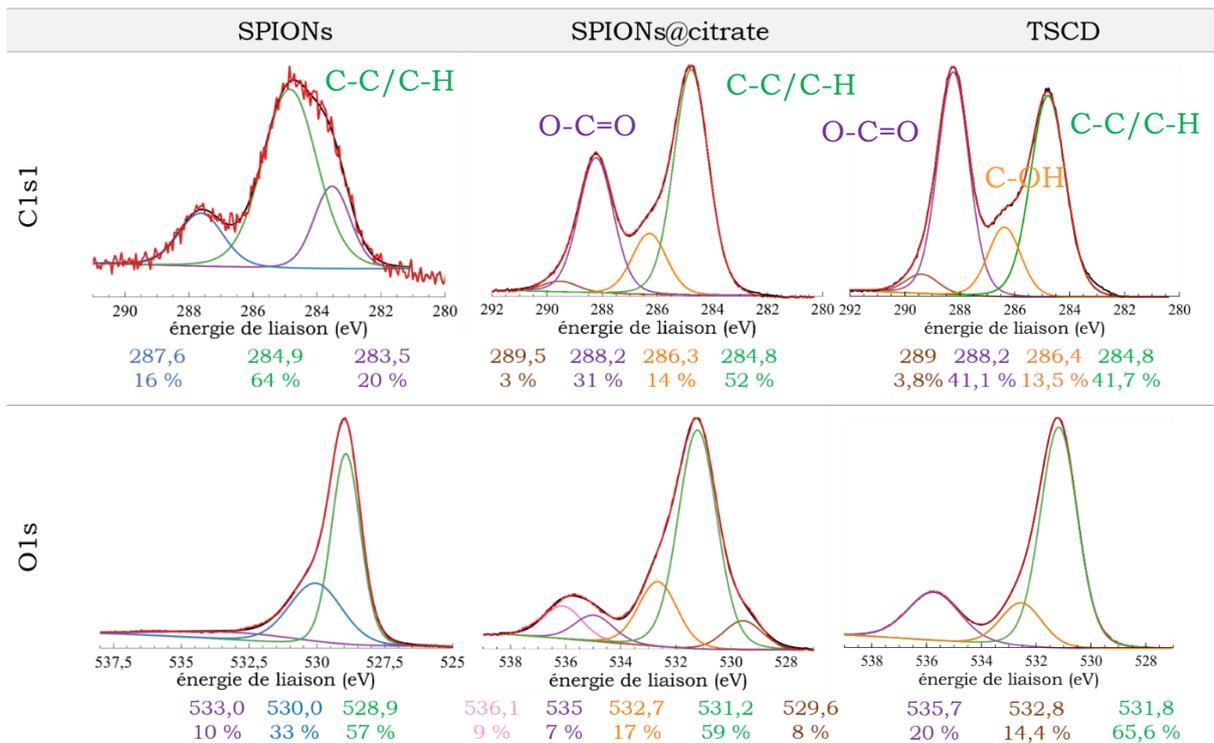


Figure 43 : Analyses XPS : décompositions des niveaux d'énergies C1s et O1s des SPIONs nues, SPIONs@citrates et du tri sodium citrate dihydrate (TSCD).

présence de sodium à 7% provient de la poudre utilisée (tri-sodium citrate dihydrate) et indique également une purification incomplète.

La décomposition des bandes d'énergie est illustrée en Figure 43 pour le citrate et Figure 44 pour le GSH. Les composantes principales sont attribuées à partir des énergies de liaisons à l'aide de tables [119], [120], de références [117] et des analyses des molécules brutes.

- **SPIONs citrate** : L'apparition d'une composante à 288 eV pour les SPIONs fonctionnalisés qui correspond à la liaison O-C=O du citrate, couplée à la

diminution de la contribution O-C=O pour les SPIONs citrate comparés au TSCD pur peut s'expliquer par le greffage des molécules via la fonction carboxyle. Le niveau O1s met lui aussi en évidence l'apparition des composantes du citrate à 535 et 532 eV.

- **SPIONs GSH** : l'apparition d'une composante à 287 eV qui est attribuée aux liaisons C-N ainsi que l'augmentation de la composante O-H de l'oxygène à 531 eV (48%) révèle la présence de la molécule.

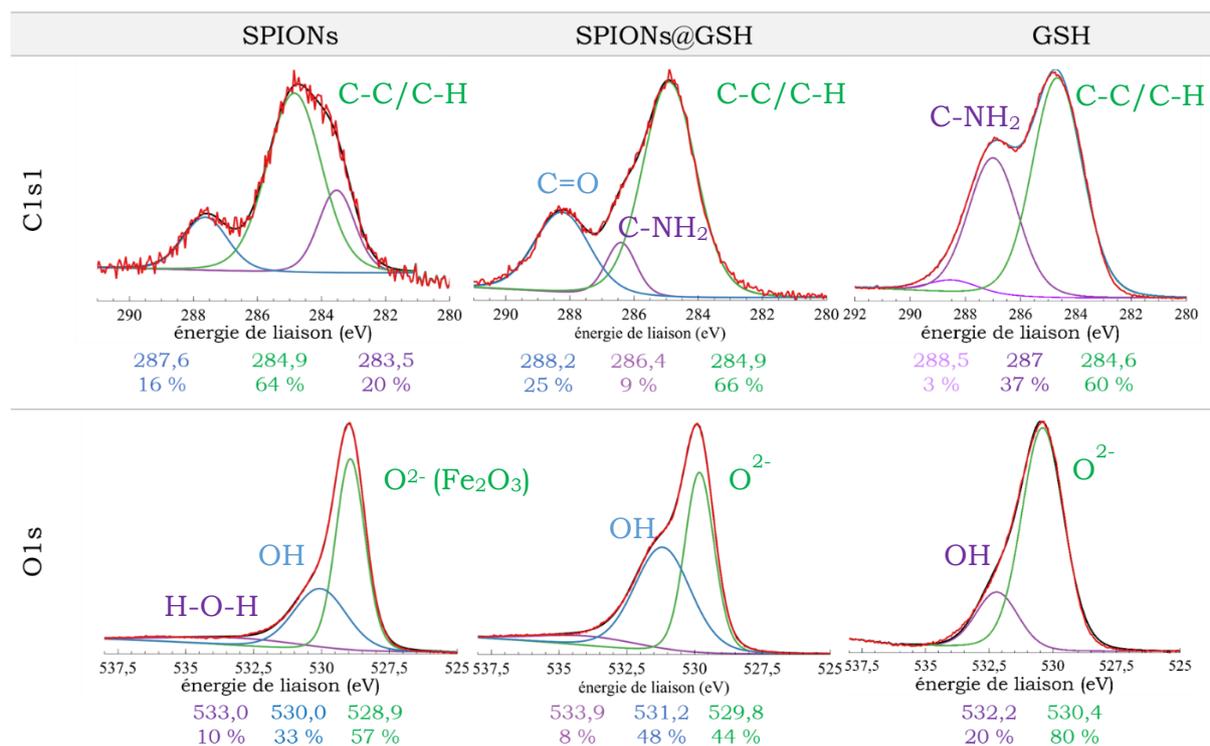


Figure 44 : Analyses XPS : décompositions des niveaux d'énergies C1s et O1s des SPIONs nues, SPIONs@GSH et du glutathion.

Par ailleurs, en comparant la dialyse et le SEC (Tableau 7), les résultats XPS confirment ceux obtenus par ATG, c'est-à-dire qu'il n'y a pas plus de GSH sur les SPIONs@GSH SEC que sur celles dialysées. Le diamètre hydrodynamique plus élevé pour les SPIONs@GSH dialysées que pour les SPIONs@GSH SEC peut donc s'expliquer par une agglomération des particules. Par ailleurs, la purification par dialyse est la plus intéressante car elle permet de purifier en plus grande quantité et est moins coûteuse que l'utilisation de colonne SEC (plusieurs dizaines de mL contre 1 mL).

La stabilité des différents systèmes est vérifiée par analyse DLS 1h après introduction des nanoparticules dans le PBS (Phosphate Buffered Saline). Les résultats sont présentés dans la Figure 45 pour les SPIONs à 0,5 mgNPs/mL avant et après 1h (volumes 50:50).

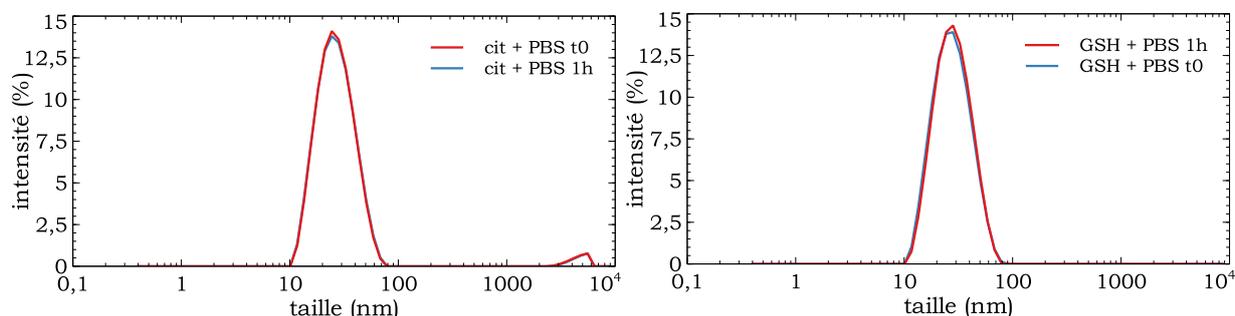


Figure 45 : Analyses DLS des SPIONs citrate et GSH dans le PBS.

Ces données nous confirment que ces SPIONs peuvent être utilisées pour des manipulations biologiques. De plus, elles valident la fonctionnalisation car les SPIONs nus sédimentent instantanément en étant dilués dans un autre milieu que celui post-synthèse (aqueux à pH acide) (Figure 46).

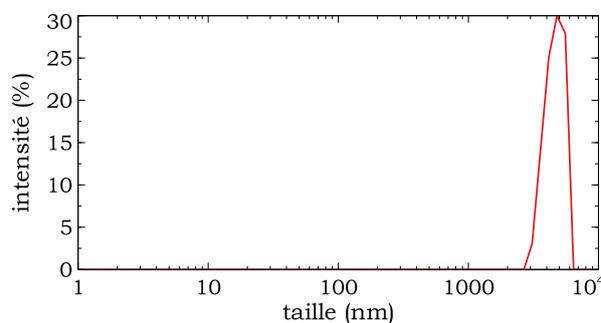


Figure 46 : Analyse DLS des SPIONs nus dans le PBS

I.B.2.b) PEG

L'analyse par DLS des SPIONs PEG-SH et celle des SPIONs nus en Figure 47 montrent une augmentation de taille d'une vingtaine de nm pour les SPIONs@PEG-SH(350) (de 27 nm de diamètre moyen à 47 nm avec un PDI de 0,25) et de 66 nm pour les SPIONs@PEG-SH(2k) (de 27 nm à 93 nm avec un PDI de 0,24) qui pourrait correspondre au greffage du PEG à la surface des nanoparticules. Les courbes après et avant centrifugation sont ajoutées pour PEG-SH(350) et démontrent que la centrifugation n'impacte pas la taille des nanoparticules.

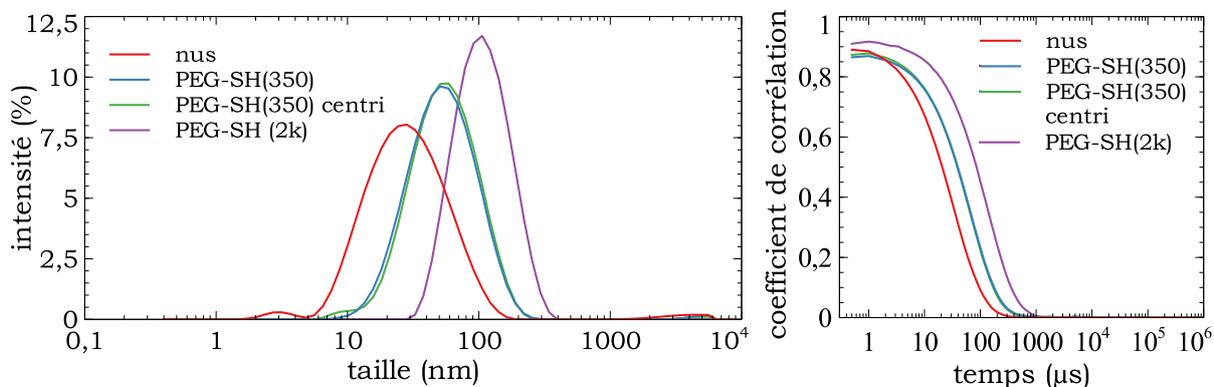


Figure 47 : analyse DLS des SPIONs PEG-SH (en intensité) et fonctions de corrélation correspondantes.

Afin de valider la présence du PEG à la surface des SPIONs, une analyse XPS a été conduite. Une augmentation drastique du pourcentage en carbone (de 4 à 20%)

est observé, correspondant au carbone des chaînes des polymères (Tableau 7). La présence de Ca, Na et Si correspond à des contaminations lors des manipulations manuelles.

Tableau 7 : analyse XPS : éléments présents et pourcentages atomiques des SPIONs nus et SPIONs PEG-SH(2k).

surface	élément							C/Fe
	C	O	Fe	Na	Ca	N	Si	
SPIONs nus	3,98%	20,72%	75,30%					5,29
PEG-SH(2k)	19,89%	26,54%	50,89%	1,40%	0,07%	0,20%	1,01%	39,08

La Figure 48 présente les décompositions d'énergies des niveaux C1s et O1s des SPIONs nus et SPIONs PEG-SG(2000). La présence de polymère se traduit par l'apparition de la composante à 531 eV correspondant aux liaisons O-C des chaînes. Ces chaînes sont également visibles au niveau du carbone à 286 eV.

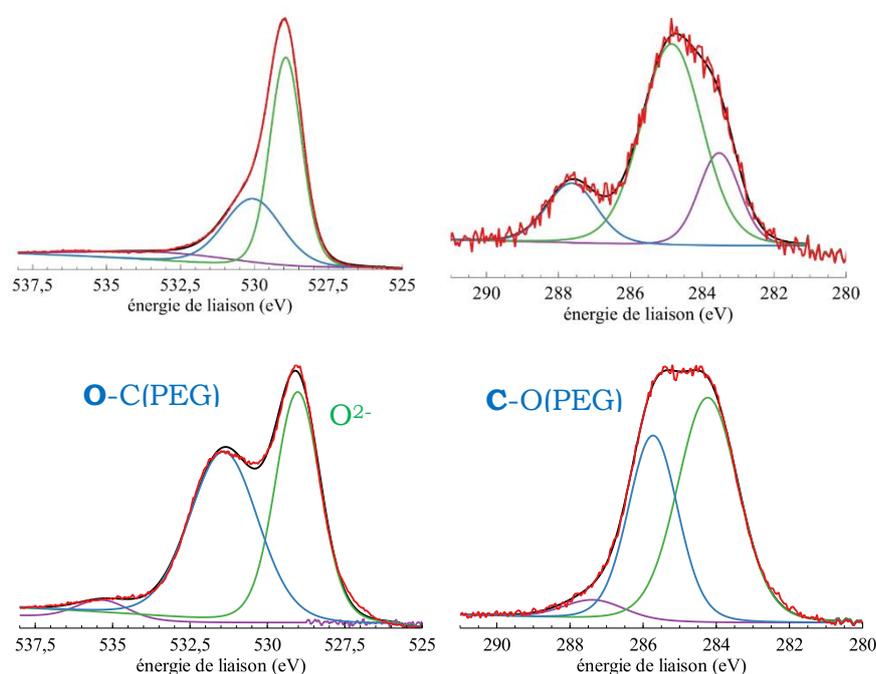


Figure 48 : Analyses XPS : décompositions des niveaux d'énergies C1s (droite) et O1s (gauche) des SPIONs nues (haut) et SPIONs@PEG-SH(2000) (bas).

Des problèmes de reproductibilité ont été rencontrés lors des essais de greffage du PEG-SH sur les SPIONs. La fonctionnalisation conduisait à une suspension stable 1 fois sur 3 après purifications (sédimentation instantanée.) Ces essais ne sont donc pas concluants. Il a été de nombreuses fois démontré qu'un PEG avec un groupement catéchol, phosphonate ou carboxyle est aisément greffable à la surface des SPIONs [18]. Par la suite, il est donc préférable d'utiliser ce type de PEG pour des fonctionnalisations SPIONs@PEG.

I.C. Conclusion sur les nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules d'oxyde de fer ont été synthétisées en quantité importante (e. g. 500 mL à 5 mgNPs/mL) et caractérisés par différentes techniques : DLS, DRX, TEM, ATG, zétamétrie, XPS, SM. Leur taille hydrodynamique dans leur milieu original est de 27 nm et leur taille morphologique de $8,1 \pm 1,6$ nm. Les suspensions sont instables après introduction en milieu aqueux mais stables dans leur milieu d'origine

pendant au moins 3 ans ce qui permet de faire des études sur des particules identiques tout au long d'un projet.

Un coating de citrate puis de GSH a été ajouté puis caractérisé. Des essais avec du PEG-SH ont été conduits, mais même si les molécules se greffent probablement à la surface des nanoparticules, des problèmes de reproductibilité ont été rencontrés. Il est donc préférable d'utiliser un PEG avec une fonction carboxyle possédant plus d'affinité pour la surface dans de futurs travaux.

Les coatings de SPIONs sont purifiables par différentes techniques. Les méthodes retenues sont la centrifugation pour les SPIONs@citrate et la SEC pour les SPIONs@GSH (Tableau 8). La dialyse est prometteuse dans la mesure où elle permet de purifier de plus grandes quantités sans déstabiliser les suspensions, cependant l'augmentation du diamètre hydrodynamique indique un état d'agglomération différent, plus important, des nanoparticules.

	nus	citrate _{centri}	GSH _{SEC}
$\varnothing_{\text{hydro}}$ (nm)	27	26	25
PDI	0,3	0,15	0,2

Tableau 8 : récapitulatif des tailles finales des suspensions de SPIONs.

II. Nanoparticules d'or

II.A. Littérature

II.A.1. Généralités

Tout comme les SPIONs, il existe de nombreuses méthodes de synthèse de nanoparticules d'or. Ces méthodes sont d'autant plus variées que les morphologies sont multiples (I.B.2). Les revues publiées sur ce sujet sont nombreuses (508 ces cinq dernières années selon Web Of Science avec le critère de recherche « gold nanoparticle synthesis »). Le but ici est donc de donner un aperçu sommaire des différentes méthodes chimiques utilisées, en considérant seulement les nanoparticules sphériques. Le tableau ci-dessous, inspiré de O. Pluchery [65], indique les avantages et inconvénients de chacune avec les gammes de tailles possiblement synthétisables.

Tableau 9 : méthodes de synthèses chimiques des nanoparticules d'or et leurs atouts et inconvénients, inspiré de [65], mis à jour et enrichi des principes des méthodes. Les tailles font référence aux diamètres morphologique (TEM).

méthode	principe	taille (nm)	stabilisant	milieu	avantages	inconvénients	réf / extrait de
réduction de Turkevich-Frens	réduction d'un sel d'or par un réducteur	10-80	tri sodium citrate dihydrate	aqueux	peu coûteux, simple, variation possible de la taille	mécanismes toujours en étude, distribution en taille	[65]
synthèse de Brust	transfert de phase puis polymérisation par l'introduction d'un thiol + ajout d'un réducteur pour la formation du cœur métallique	1-3	thiol	toluène	NPs plus concentrées	tri post synthèse parfois nécessaire	[65]

croissance de germes	diagramme Lamer + croissance via nucléation hétérogène	2-290	variable	aqueux / toluène	bon contrôle de taille, distribution fine	selon les cas : toxicité des produits, difficulté d'échange de ligand, simplicité de la synthèse	[17][18]
micro-émulsion	micelles inverses utilisées comme micro-réacteurs	1-50	variable	Aqueux vs orga	distribution fine		[123][125]
synthèses vertes	réduction par extrait de plantes	10-140		aqueux	respectueux de l'environnement (double : moindre coût énergétique, pas d'utilisation de produits toxique), manipulation simple, larges lots possibles, peu coûteux	homogénéité, rendement, pureté selon les cas	[123][126][21][22]
Au ₅₅	réduction de Ph ₃ PAuCl par flux gazeux de B ₂ H ₆ à 60°C + stabilisation par un ligand	1,4	PPh ₃ (échangeable)	aqueux / organique	stables, homogène, propriétés électronique remarquables	haute toxicité	[65]
radiolyse par faisceau X ou γ	réduction d'un sel d'or par un rayonnement ionisant	3-100	PVA-CTAB...	aqueux	bon contrôle taille, pas d'ajout de réactif supplémentaire : formation de AuNPs possible dans des matrices ou support poreux	coûteux	[65]

La méthode choisie est la réduction d'un sel d'or, notamment celle de Turkevich, car elle s'effectue en milieu aqueux et permet l'obtention de différentes tailles. Les méthodes dites « vertes », où le réducteur est un extrait de plante, sont récentes et estimées très prometteuses notamment par leur caractère safer-by-design, et mériteraient d'être prises en compte pour les prochains travaux.

II.A.2. Synthèses par réduction d'un sel d'or : mécanismes

La synthèse repose sur la réduction du sel d'or HAuCl₄*3H₂O en solution. Le réducteur peut être le citrate, un rayonnement ultra-violet, ou encore l'acide ascorbique. Cette réduction est impactée par différents paramètres comme le pH, le ratio molaire, la force ionique ou encore l'ordre d'introduction des réactifs [129].

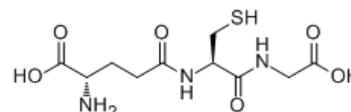
La méthode la plus courante est la méthode de Turkevich [130]. Ici, le réducteur est le citrate, provenant de la poudre TSCD (tri sodium citrate dihydrate) dissoute dans de l'eau DI. Lors de la synthèse, le citrate joue à la fois le rôle du réducteur et du stabilisant.

Plusieurs variations de la synthèse de Turkevich ont été testées :

1. La variante V0, avec ajout du borohydrure de sodium (NaBH₄) en plus du citrate, à température ambiante
2. La V1, sans NaBH₄, à des températures supérieures à 80°C, avec ajustement de pH
3. La V2, sans NaBH₄, à des températures supérieures à 100°C, sans ajustement de pH
4. La V3 avec du glutathion

Les différences de procédé soulèvent des questions quant au mécanisme sous-jacent.

On explique la réduction du sel d'or dans le cas de V0 par le caractère réducteur du NaBH_4 , supérieur par rapport au citrate avec $E^\circ_{\text{citrate}} = -0,180 \text{ V}$ et $E^\circ_{\text{borohydride}} = -0,481 \text{ V}$. NaBH_4 est aussi utilisé lorsque des stabilisants thiolés comme le glutathion sont déjà présents dans la solution, les complexes Au-Thiol étant trop stables pour être réduits par du citrate. Dans le cas de V1 et V2, de manière générale, chauffer une réaction permet de l'accélérer. Cependant, il a été démontré que le chauffage entraîne la dégradation thermique du citrate, formant du dicarboxyacetone (DCA ou DC^{2-}) et que cette molécule et sa réactivité jouent un rôle dans la réduction de Au^{III} en Au^{I} avec la formation plausible de DCA-Au^{I} [131]. On aurait donc ici $\text{Au}^{\text{III}} \rightarrow \text{Au}^{\text{I}} \rightarrow \text{Au}^0$. Le mécanisme proposé est illustré en Figure 49, extrait de [132].



Glutathion (GSH)

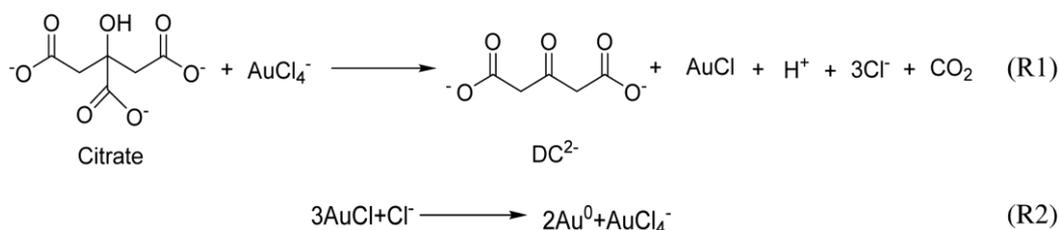


Figure 49 : mécanismes de Turkevich en deux étapes : réaction oxydo-réduction initiale (R1) suivie d'une dismutation (R2), extrait de [30].

La méthode de Turkevich date de 1951, et il est intéressant de noter que les mécanismes sous-jacents de cette synthèse ainsi que l'étude de l'impact des différents paramètres font toujours l'objet de recherches, avec des publications traitant de ce sujet datant de moins de dix ans [133]–[136].

Les mécanismes de cette synthèse sont initialement et parfois encore expliqués via la théorie de LaMer. Le précurseur est réduit en solution, formant des monomères jusqu'à atteindre une concentration critique, on parle de sursaturation. A partir de cette concentration les monomères vont former des agrégats – appelés nuclei. S'ensuit une étape de croissance où les monomères restants en solution vont venir grossir les nucléis, formant ainsi les nanoparticules. Cela suppose une réduction de l'or telle que [137] :

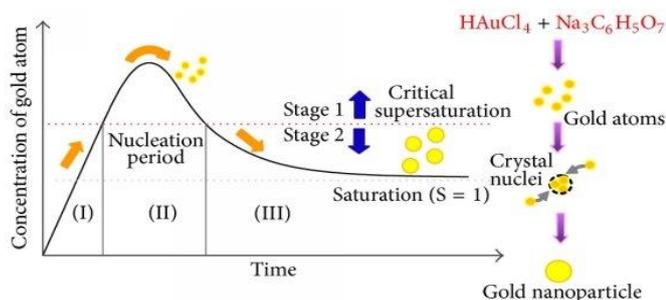
$$\text{Au}^{\text{III}} \rightarrow \text{Au}^0$$


Figure 50 : illustration du diagramme de LaMer pour les nanoparticules d'or. Extrait de [32].

D'autres études réexaminent les mécanismes sous-jacents et remettent en question le diagramme de LaMer, à cause notamment de l'incapacité du peu de modèles existants à expliquer l'influence des différents paramètres. Ceci s'explique par les difficultés à analyser le système en cours de réaction [138].

Un exemple est celui de l'étude de Méndez *et al.* [134], qui met en évidence un état d'agglomération supérieur via l'UV et le TEM au début de la synthèse, propose une étape d'agglomération et de désagrégation. De petites particules forment des agglomérats, ceux-ci grossissant les forces de répulsion augmente et les petites particules se séparent (Figure 51). Certains articles réfutent cette théorie de formation d'agrégats, [139], [140], le nombre de nanoparticules étant fixé dès le début de la synthèse. Comme le souligne Wuithschick [133], les travaux de Takiyama (1958) avançaient déjà que le nombre de NPs était déterminé en début de réaction.

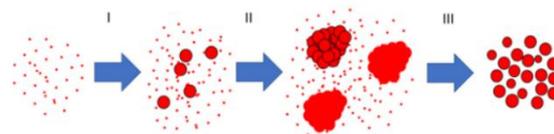


Figure 51 : les différentes étapes de formation des nanoparticules d'or par réduction d'un sel d'or selon Méndez *et al.* [28].

Après une étude bibliographique, il ressort que le mécanisme de formation des nanoparticules le plus accepté et valide pour une large gamme de variations paramétriques est celui de la croissance par graines, ou « seed-mediated growth ». Ce mécanisme est mis en évidence par les travaux pionniers de Polte *et al.* qui ont analysé in situ la réaction par SAXS/XANES (Small Angle X-ray Spectroscopy / X-ray Absorption Near Edge Structure) [138]. Du même groupe, les publications de Ketteman [135] et Wuithschick [133] complètent la compréhension de la synthèse.

Une partie du précurseur est réduite résultant en la formation de clusters, formant ensuite des germes (1,5 nm de diamètre). Expliqué par un changement de réactivité des réactants, la réduction des ions Au^{3+} n'a plus lieu, le précurseur restant étant réduit dans la double couche électrique (EDL : Electrical Double Layer) (Figure 52).

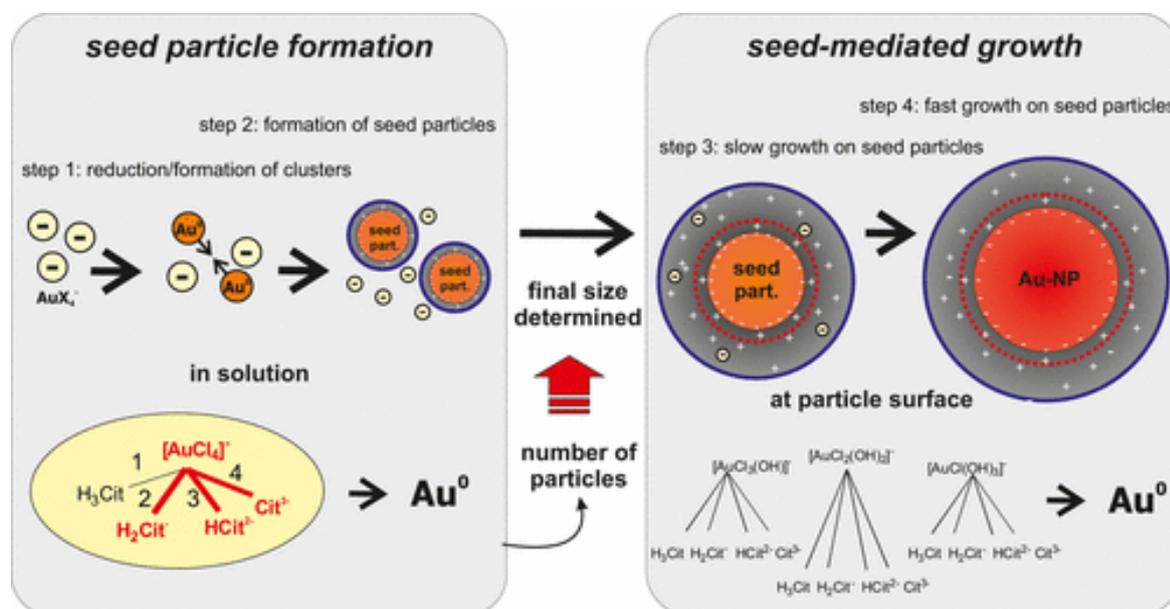


Figure 52 : mécanismes de formation des nanoparticules d'or dans la synthèse de Turkevich, extrait de [32]. Lors de la formation des germes, AuCl_4^- est réduit en Au^0 par les espèces plus ou moins réduites du citrate (chemin 2-4). Puis les AuCl_4^- ne sont plus présents dans la solution : attirés par l'EDL, ils ont formé des complexes $[\text{AuCl}_4-x(\text{OH})_x]^-$ avec les espèces du citrate, puis sont réduits par l'EDL.

II.B. Synthèse : méthodologie & caractérisation

II.B.1. Avec NaBH₄

II.B.1.a) Manipulations

Le premier protocole testé est celui utilisant NaBH₄, s'effectuant à température ambiante. Les produits utilisés sont les suivants : trihydrate d'acide tétrachloroaurique(III) [HAuCl₄*3H₂O] (CAS 16961-25-4), Tri Sodium Citrate Dihydrate ou TSCD (CAS 6132-04-3), Sodium Borohydrure [NaBH₄] (CAS 16940-66-2).

Sous agitation magnétique à température ambiante, sont rajoutés dans de l'eau DI respectivement : un volume de HAuCl₄ * 3H₂O préalablement dissout dans l'eau DI à une concentration de solution stock à 10 mg/mL, un volume de TSCD à 250 mg/mL puis un volume de NaBH₄ à 0,1 mg/mL. Les solutions sont préparées le jour même. Les synthèses sont effectuées en faisant varier plusieurs paramètres alternativement : le volume d'H₂O, la concentration en citrate, la concentration en sel d'or ou la concentration en NaBH₄, afin d'observer leur potentiel impact sur la taille des nanoparticules formées. Une coloration pourpre, témoin de la formation de nanoparticules d'or, est observée dès l'injection du NaBH₄. La suspension est agitée 5 min.

II.B.1.b) Caractérisation

i. Analyses DLS

L'analyse DLS, rapide et non destructive, permet d'avoir une estimation de la taille moyenne des particules, de la dispersité et de la stabilité de la suspension. Elle est donc l'outil de routine dans les manipulations de ce chapitre.

(a) Tailles hydrodynamiques et dispersité

Le premier constat des synthèses V0 - Turkevich avec NaBH₄ - est la polydispersité de la plupart des suspensions avec des PDI supérieurs à 0,25, parfois supérieurs à 0,4 (Figure 53b). Sur les courbes en intensité, la polydispersité se traduit par la présence de multiples pics, le corrélogramme possédant une allure bi ou

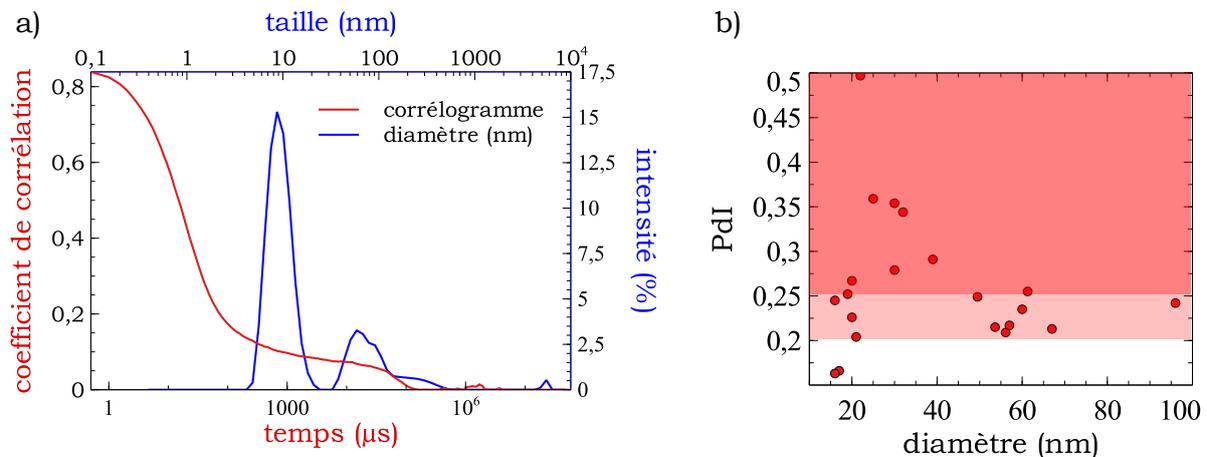


Figure 53 : a) exemple d'analyse DLS d'une suspension d'AuNPs synthétisées avec NaBH₄, b) PDI de 21 échantillons synthétisés via la méthode de Turkevich avec NaBH₄ en fonction des tailles hydrodynamiques moyennes des échantillons correspondants

multimodale. Un exemple se trouve en Figure 53a : le diamètre moyen est de 9 nm avec un PDI de 0,257, la présence de trois pics est observé, à 9, 104 et 5000+ nm, ce dernier marquant la présence d'agrégats. La séparation des différentes populations peut s'effectuer à l'aide de la centrifugation, mais celle-ci résulte en une sédimentation instantanée des particules ainsi qu'une adhésion des particules à la paroi des tubes. Elle est donc écartée. En Figure 53b) est indiqué le PDI d'une vingtaine d'échantillon synthétisés avec différents paramètres en fonction de leur taille hydrodynamique. Le PDI est inférieur à 0,25, donc considéré comme acceptable, pour les tailles comprises entre 15 et 25 nm et celles supérieures à 50 nm.

Sont présentés ci-dessous des diamètres hydrodynamiques moyens mesurés en DLS (en intensité) en fonction de variations expérimentales. Seul le paramètre en question varie, les autres concentrations sont fixes.

- **Variation de la concentration en sel d'or** : des PDI aberrants (>1) ont été observés pour la plupart des échantillons synthétisés avec des concentrations en sel d'or inférieur à 10^{-3} M (soit 0,4 mg/mL), avec en paramètres fixes des concentrations en [TSCD] inférieures à 10^{-3} M (soit 0,29 mg/mL) et $[\text{NaBH}_4] = 10^{-4}$ M (soit $3,73 \cdot 10^{-3}$ mg/mL). Des problèmes de reproductibilité (différences de 30 nm entre deux échantillons aux paramètres de synthèse identiques) ont été rencontrés et résultent en un nombre insuffisant de points pour évaluer une tendance. Néanmoins, le paramètre $[\text{Au}]/[\text{citrate}]$ est largement étudié dans la littérature, et une augmentation de la concentration en or entraîne une augmentation de la force ionique influençant à la fois la taille et la dispersité [141]. Par la suite, la concentration en sel d'or sera donc fixée à 0,4 mg/mL.

- **Variation de la concentration en NaBH_4** (Figure 54): le diamètre varie de 40 à 20 nm pour des concentrations variant de $5 \cdot 10^{-3}$ à 0,02 mg/mL. Les PDI sont trop élevés dans cet intervalle de concentrations pour parvenir à des conclusions. On peut supposer que la diminution en taille quand la concentration en réducteur augmente s'explique par un taux de réduction, et donc de nucléation, plus élevé.

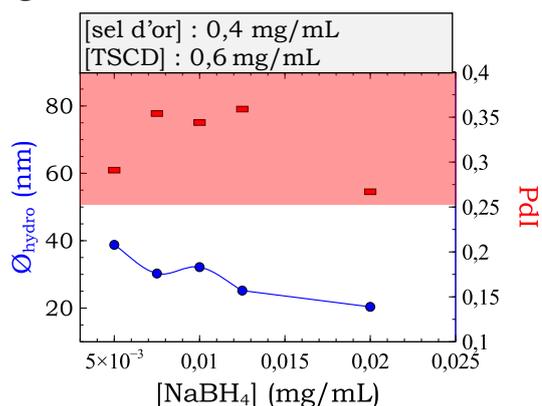


Figure 54 : Diamètres hydrodynamiques et PDI de suspensions de nanoparticules d'or en fonction de la concentration en NaBH_4 .

- **Variation de la concentration en citrate** (Figure 55): une augmentation de la concentration en citrate implique une diminution de la taille des particules, avec une différence drastique entre 0,2 et 0,4 mg/mL. Les PDI pour cette gamme de concentration en citrate (de $9,3 \cdot 10^{-2}$ à $9,3 \cdot 10^{-1}$ mg/mL) sont corrects.

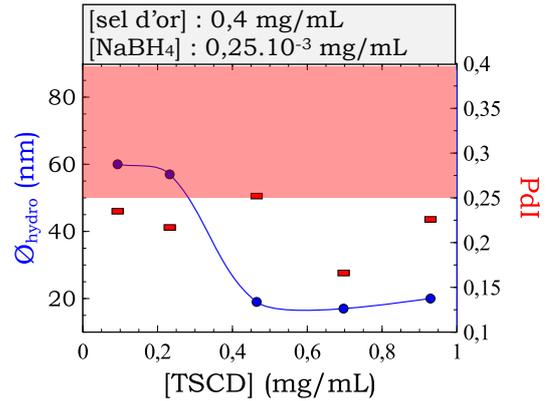


Figure 55 : Diamètres hydrodynamiques et PDI de suspensions de nanoparticules d'or en fonction de la concentration en citrate.

- **Variation du volume d'eau** (Figure 56) : une variation significative du volume d'eau initial (de 5 à 30 mL) qui modifie surtout les concentrations des différents réactifs n'a qu'une faible influence sur la taille : une légère augmentation de 40 à 50 nm. Ceci peut s'expliquer par la faible augmentation du pH (plus d'eau DI impliquant un pH tendant vers celui de l'eau DI, pH 6,8). D'après les travaux de Ji *et al.*, une augmentation du pH diminue la réactivité des ions Au³⁺ [142]. L'influence du pH est double, car il impacte de même la protonation du citrate donc la stabilisation électrostatique des AuNPs.

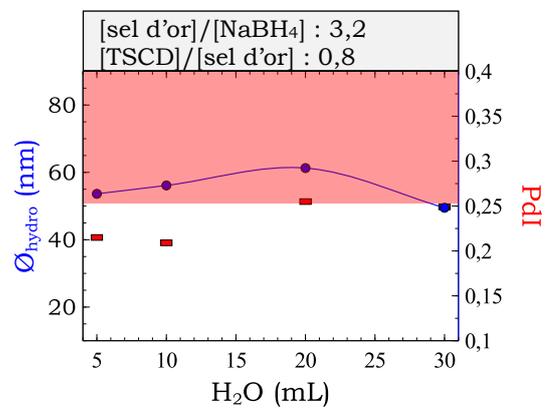


Figure 56 : Diamètres hydrodynamiques et PDI de suspensions de nanoparticules d'or en fonction de la dilution des réactifs.

(b) Stabilité

Les analyses DLS démontrent également l'instabilité des échantillons, observable à l'œil nu par une sédimentation et un changement de couleur de la suspension. Elle met en évidence une augmentation de la taille et la présence d'agrégats de tailles supérieures à 300 nm, deux semaines après la synthèse. Un exemple est donné en Figure 57.

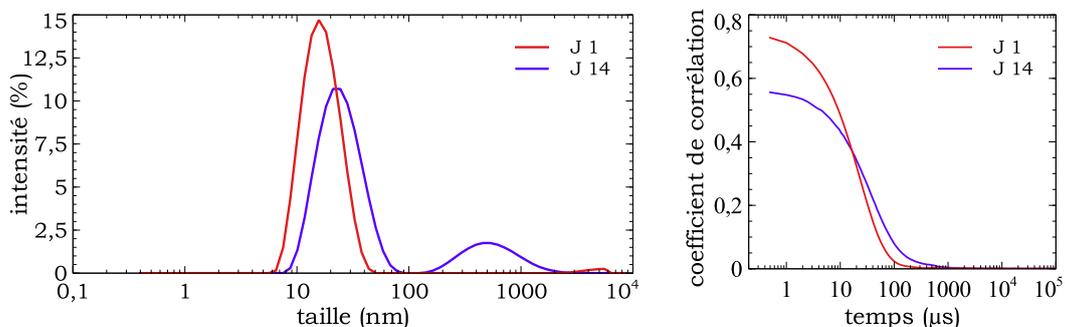


Figure 57 : analyses DLS d'une suspension d'AuNPs synthétisée avec NaBH₄ (ici, échantillon synthétisé avec les paramètres suivants : [sel d'or] = 0,25 mg/mL, [TSCD] : 0,6 mg/mL, NaBH₄ = $5,10^{-3}$ mg/mL) à jour 1 et jour 14 : mise en évidence de l'instabilité dans le temps.

Les suspensions stables dans le temps correspondent aux échantillons possédant une concentration en citrate dans le milieu réactionnel supérieure à 0,45 mg/mL (soit 1,5 mM).

Une solution à cette instabilité serait de fonctionnaliser les nanoparticules directement après leur synthèse.

ii. Morphologie

La morphologie d'un de ces échantillons (diamètre hydrodynamique de 36 nm, PDI 0,25, conditions de synthèse : [sel d'or] = 0,4 mg/mL, [TSCD] = 0,9 mg/mL, [NaBH₄] = 9,5.10⁻³ mg/mL) est présentée en Figure 58. La taille moyenne, mesurée selon une unique direction (la diagonale) sur 150 nanoparticules, est de 40 ± 13 nm. Le large écart-type souligne la polydispersité. Les clichés TEM mettent de plus en évidence la non sphéricité des échantillons, avec des nanoparticules polyédriques, parfois cylindriques.

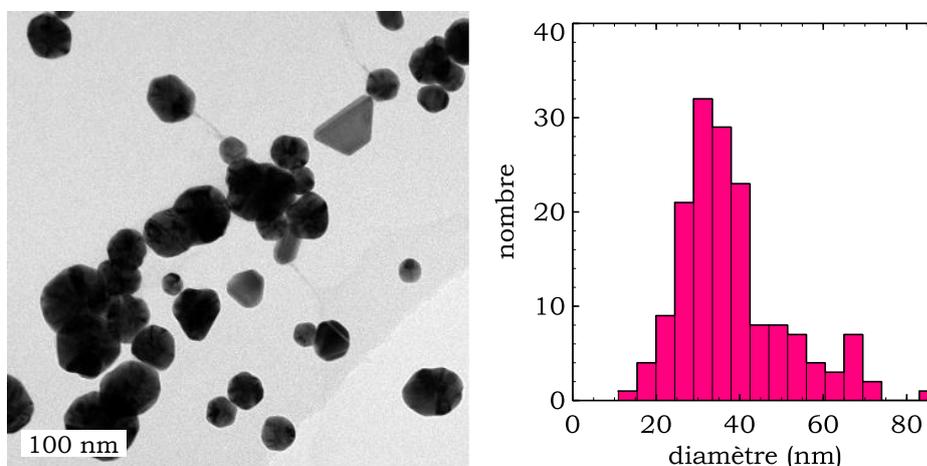


Figure 58 : Cliché TEM des AuNPs synthétisés avec NaBH₄ et histogramme de leur diamètre, mesurés via le logiciel ImageJ. Comptage sur 150 particules.

Les analyses UV-visible conduites de 350 à 800 nm montrent des spectres possédant un seul pic (Figure 59), correspondant à la longueur d'onde de la résonance plasmon de surface λ_{spr} (I.B.2.b). Les spectres, avec la présence d'un seul et unique pic, sont similaires à ceux de NPs sphériques. Les NPs seront donc considérées comme des sphères par la suite. La position de la longueur d'onde λ_{spr} varie en fonction de la taille des particules : plus elles sont petites, plus λ_{spr} sera décalée vers les courtes longueurs d'onde. Les valeurs des échantillons présentés, se trouvant en Tableau 10, correspondent à cette tendance. Dans ces synthèses, λ_{spr} varie de 517 à 542 nm.

λ_{spr} (nm)	\varnothing_{Haiss1} (nm)	A(450)	A(spr)	$\frac{A(spr)}{A(450)}$	\varnothing_{Haiss2} (nm)	DLS \varnothing (nm)	c =		
							$\varepsilon(450)$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	A(450)/ $\varepsilon(450)$ (mol/L)	c(NPs/mL)
1	63	0,50072	1,0086	2,01429941	47	53,63	8,18E+09	6,12E-11	1,49E+05
2	71	0,3614	0,73077	2,02205313	48	56,12	8,74E+09	4,14E-11	1,01E+05
3	48	0,1283	0,26033	2,02907249	50	49,49	9,92E+09	1,29E-11	3,15E+04
4	34	0,42145	0,73453	1,74286392	21	19,29	6,31E+08	6,68E-10	1,63E+06
5	x	0,44252	0,72472	1,63771129	15	17,08	2,18E+08	2,03E-09	4,95E+06
6	x	0,41629	0,61023	1,46587715	9	16,39	4,43E+07	9,40E-09	2,29E+07

Tableau 10 : d'après les tables de référence de Haiss2007 : détermination de la taille des nanoparticules en fonction de a) la position de la longueur d'onde λ_{spr} et b) du rapport de l'absorbance à 450 nm et à λ_{spr} , c) estimation de la concentration des suspensions.

Les valeurs de λ_{spr} et un rapport d'absorbance permettent de remonter à la taille des nanoparticules et à leur concentration. En pratique, il suffit de relever les valeurs de la position de λ_{spr} et de l'absorbance de λ_{spr} et à 450 nm et d'utiliser les données tabulaires des travaux de Haiss *et al.* [143]. En Tableau 10 se trouve l'exemple pour les échantillons numérotés de 1 à 6 présentés en Figure 59. Les tailles retrouvées par le rapport $A(450)/A(\lambda_{\text{spr}})$ concordent avec les diamètres trouvés en DLS.

Les concentrations déterminées à l'aide des tables de Haiss résultent en des ordres de grandeur de 10^{-9} à 10^{-11} M, pour des concentrations en or attendues de l'ordre de 10^{-4} - 10^{-7} M. Une explication possible serait que tout le sel d'or n'a pas réagi et n'est donc pas sous forme de NPs. Etant donné que les purifications déstabilisent les suspensions, et que la méthode de l'ICP dose tout l'or en solution, il n'est pas possible à cette étape de déterminer la concentration en nanoparticule d'or autrement que par UV-visible. L'écart de concentration peut aussi s'expliquer par les différences entre les protocoles de synthèses, résultant en un environnement diélectrique et un coating de nanoparticules différents, ces deux paramètres influençant le coefficient d'extinction. Enfin, les échantillons présentent des dispersité et sphéricité contestables, rendant hasardeux l'utilisation de tables effectuées par et pour les nanoparticules sphériques.

II.B.1.c) Conclusions synthèse avec NaBH_4

Les synthèses avec NaBH_4 résultent en des suspensions de nanoparticules de diamètres moyens hydrodynamiques ajustables, compris entre 16 et 95 nm. La majorité des échantillons présente une distribution polydisperse, avec des PDI compris entre 0,16 et 0,49 (0,26 en moyenne sur 20 échantillons), et une sphéricité contestable. De plus, les échantillons sont instables dans le temps, sauf pour une concentration en citrate supérieur à 0,45 mg/mL. Les échantillons instables avec des tailles initialement intéressantes doivent être directement fonctionnalisés, avec du PEG par exemple. Suite à ces résultats, des synthèses optimisées ont été testées, afin d'obtenir de meilleures polydispersité et sphéricité. Le protocole avec NaBH_4 , choisi pour sa simplicité et sa possible large gamme de diamètre moyen, est tout de même retenu pour les tailles non atteignables via les méthodes qui suivent.

II.B.2. Variantes sans NaBH_4 : [V1] et [V2]

II.B.2.a) Manipulations

Le premier protocole testé sans NaBH_4 , appelé par la suite variante 1 (V1), est celui de Méndez *et al.* [134], qui est un protocole de Turkevich optimisé pour obtenir des suspensions monodisperses.

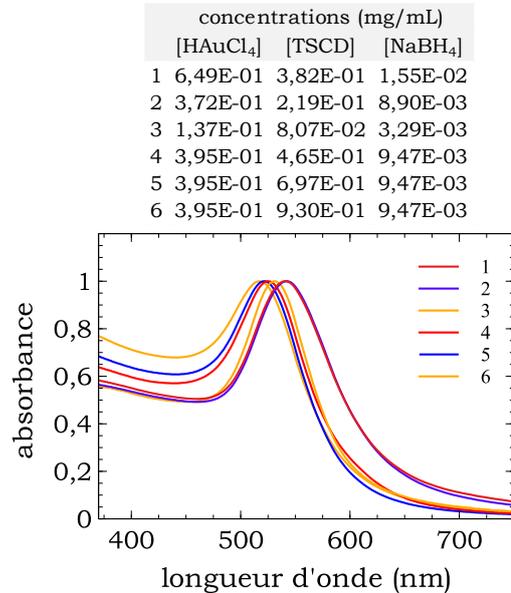


Figure 59 : analyses UV-visible normalisées de différentes suspensions d'AuNPs synthétisées via la méthode de Turkevich et paramètres de synthèses correspondants aux échantillons présentés.

Dans un ballon bicol de 250 mL sont introduits 50 mL d'H₂O DI avec un pH ajusté entre 7 et 8 à l'aide de NaOH 0,1 M. La solution est portée à ébullition (88°C) sans agitation magnétique, puis 65 µL d'HAuCl₄*3H₂O à 50mg/mL puis 86 µL de TSCD à 0,114 g/mL sont injectés (rapport massique sel d'or : TSCD de 1 : 3). Le système est chauffé à 88°C pendant 1 heure.

Illustré dans le paragraphe suivant, ce protocole résulte en des NPs de 20 nm de diamètre en moyenne. Afin d'obtenir des tailles différentes et concordantes avec celles des autres types de NPs, une autre méthode a été testée.

Le deuxième protocole, variante 2 (V2), est celui de Zhang et al [144], qui ne nécessite pas d'ajustement de pH. Leurs conditions pour obtenir des nanoparticules de 60 nm sont testées. Dans un bicol de 250 mL sont introduits 99 mL d'H₂O DI + 1mL d'HAuCl₄*3H₂O à 10 mg/mL. Le bicol est portée à 110°C avec un système de reflux sans agitation magnétique. 5 mL de TSCD 1% sont ajoutés (rapport massique sel d'or : TSCD de 2 : 1). Le système est chauffé pendant 30 min.

Tableau 11 : récapitulatif des paramètres de synthèses des différentes variantes sans NaBH₄.

	V _{total} (mL)	ajustement pH	température (°C)	agitation	[sel d'or] _{finale} (mg/mL)	[TSCD] _{finale} (mg/mL)	$\frac{m_{TSCD}}{m_{sel\ d'or}}$	temps
V1	50,151	7-8	88	X	$65 \cdot 10^{-3}$	$0,2 \cdot 10^{-3}$	3	1h
V2	100	X	110	X	0,1	0,05	0,5	30 min

Les tentatives de purifications par dialyse, SEC, centrifugation ou spin-filtrations, afin de retirer les réactifs n'ayant pas réagi et les ions présents, n'ont résulté qu'en une sédimentation des suspensions. Les échantillons sont donc stockés et caractérisés dans leur milieu d'origine.

II.B.2.b) Caractérisation

i. Variante 1

Les synthèses de [V1] résultent en des nanoparticules d'un ordre de grandeur de 20 nm de diamètre hydrodynamique (DLS). Les analyses à des temps $t = 1$ mois démontrent la stabilité des suspensions avec des distributions en intensité, des corrélogrammes et des tailles moyennes identiques (Figure 60a). Les PDI, inférieurs à 0,18, et les fonctions d'autocorrélation nous indiquent des suspensions

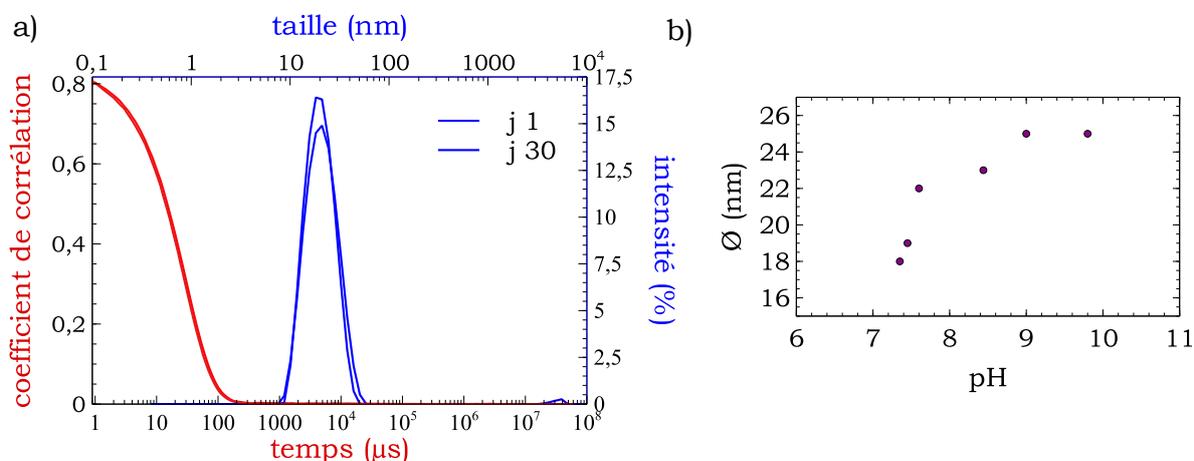


Figure 60 : a) analyse DLS d'une suspension de AuNPs synthétisées via la méthode de Méndez avec ajustement à pH 7,45. Traits pleins : jour 1, pointillés : jour 30. b) diamètres hydrodynamiques des suspensions en fonction de l'ajustement de pH.

monodisperses. Une augmentation du pH du milieu de synthèse avant introduction des réactifs produit une augmentation de taille de manière linéaire (Figure 60b).

Ceci est cohérent avec l'impact du pH mentionné plus haut (point II.B.1.b)(a): d'après les travaux de Ji *et al.*, une augmentation du pH implique une diminution de la réactivité des ions Au^{3+} [142]. Par ailleurs, le pH influe de même les mécanismes de formation. Dans nos conditions ($\text{pH} > 6,5$), le mécanisme est celui d'une nucléation suivie d'une croissance. L'augmentation de taille peut donc s'expliquer par la formation de moins de nucléis à l'étape de nucléation.

La microscopie électronique en transmission montre des nanoparticules avec une excellente sphéricité et une fine distribution en taille avec l'exemple en Figure 61 d'un diamètre moyen de $22,0 \pm 2,6$ nm.

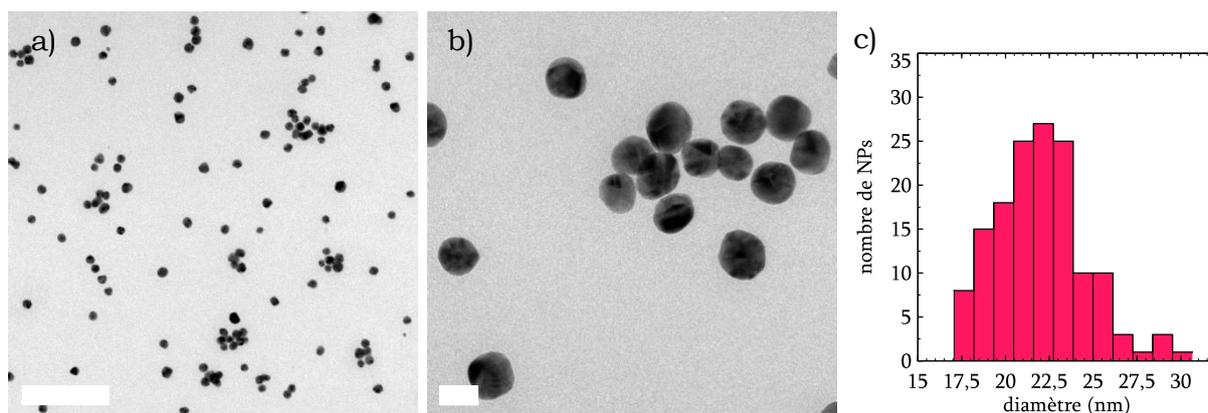


Figure 61 : Clichés TEM des AuNPs synthétisés sans NaBH_4 et avec ajustement de pH. Echelles : a) 200 nm, b) 20 nm ; c) histogramme des diamètres mesurés selon une direction via le logiciel ImageJ. Comptage sur 150 particules.

Les analyses UV-visibles (Figure 62) montrent des spectres possédant un seul pic, les nanoparticules sont donc de forme sphérique. La longueur d'onde de résonance plasmon de surface λ_{spr} est de 520 nm, qui est cohérente avec les données de la littérature pour les nanoparticules d'une vingtaine de nm de diamètre [145]. La stabilité (1 mois en Figure 62) est aussi mise en évidence par l'UV-visible.

La concentration théorique en or est de $8 \cdot 10^{-7}$ M, soit 0,016 mg/mL. Le relevé de l'absorbance à 450 nm indique une estimation de la concentration par la méthode de Haiss de l'ordre de 10^{-10} . Cette méthode semble peu adaptée pour les synthèses [V1]. La valeur de la concentration est confirmée par l'ICP-OES (Spectroscopie d'Emission Optique à Plasma à Couplage Inductif) : 15,8 ppm, soit 0,0158 mg/mL, qui cohère avec la valeur théorique. La détermination de la concentration par l'UV-visible est rediscutée au point II.C.2.

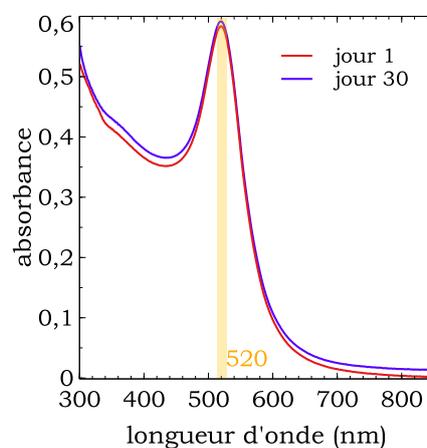


Figure 62 : Analyses UV-visibles des AuNPs synthétisées sans NaBH_4 (V1).

ii. Variante 2 : sans ajustement de pH

La DLS indique une taille hydrodynamique moyenne de 25 nm avec un PDI de 0,2. Les analyses à des temps $t = 1$ mois mettent en évidence l'instabilité des suspensions, par ailleurs visible à l'œil nu, avec une augmentation drastique de la taille et la présence d'agrégats (Figure 63a). Il est donc nécessaire de les fonctionnaliser directement après la synthèse. Les spectres UV-visible indiquent une morphologie sphérique, avec une longueur d'onde λ_{spr} de 523 nm.

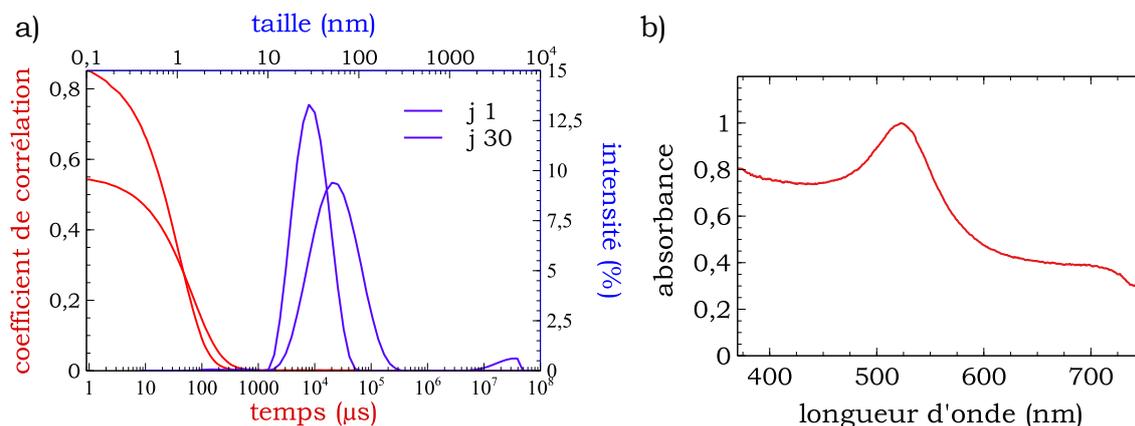


Figure 63 : a) analyses DLS d'une suspension de AuNPs synthétisées sans ajustement de pH. Traits pleins : jour 1, pointillés : jour 30. b) spectre UV correspondant à j1.

Le MET montre des particules avec une excellente sphéricité et une fine distribution en taille, avec ici un diamètre de $21,3 \pm 2,2$ nm.

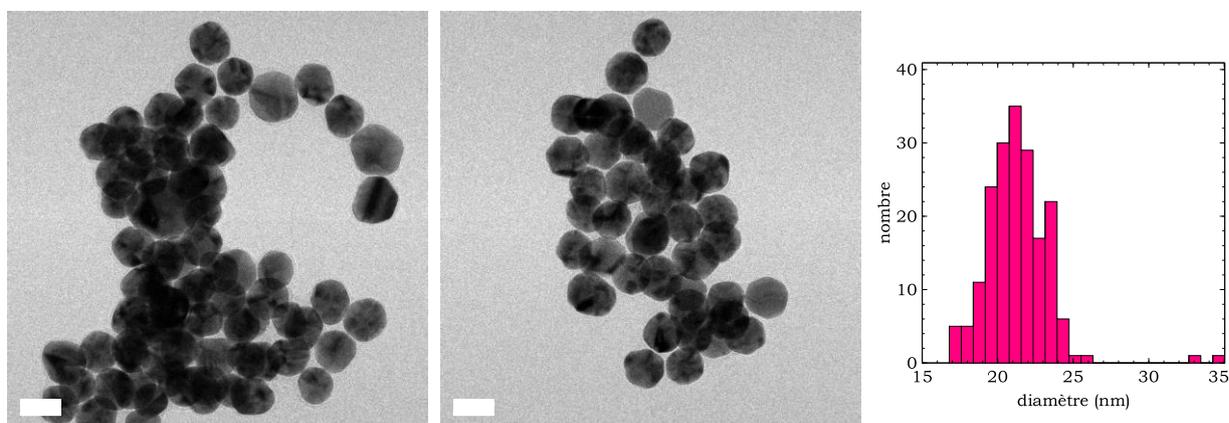


Figure 64 : Clichés TEM des AuNPs synthétisés sans NaBH_4 et sans ajustement de pH. Echelles : 20nm. Histogramme des diamètres mesurés selon une direction via le logiciel ImageJ. Comptage sur 150 particules.

II.B.2.c) Conclusion variantes [V1] et [V2] sans NaBH_4

Les méthodes sans NaBH_4 résultent en des particules d'un ordre de grandeur de 20-25 nm de diamètre hydrodynamique, y compris avec les conditions testées pour obtenir des nanoparticules de 60 nm. Les suspensions sont monodisperses, les nanoparticules sphériques. La méthode avec ajustement de pH présente l'avantage supplémentaire d'être stable plus d'un mois sans fonctionnalisation. Les suspensions ne sont pas purifiables à ce stade (sédimentation instantanée).

II.B.3. Variante avec du glutathion (GSH) [V3]

Ajouter un coating de glutathion à la surface des NPs était l'un des objectifs des synthèses. Des tests de greffage de GSH ont été menés sur les nanoparticules d'or synthétisées précédemment via la méthode de Turkevich, mais résultaient en une sédimentation instantanée. Ici, des synthèses impliquant le glutathion directement dans le milieu réactionnel ont été testées. Le protocole utilisé est celui de Brinas *et al* [146].

Le mécanisme de synthèse proposé par le même groupe se décompose en trois étapes : i) la formation de monomères Au@GSH (aussi noté Au(I)SG car la liaison se fait via le groupement thiol) avec la réduction de l' Au^{3+} en Au^+ par le GSH, ii) l'ajustement du pH impliquant la polymérisation des Au^+ avec des pontages par les atomes de soufre et iii) l'addition du réducteur NaBH_4 qui décompose la structure polymérique en nanoparticules (Figure 65).

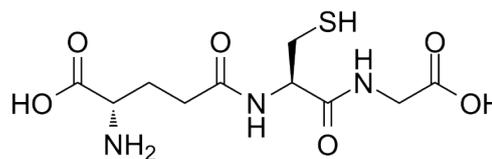


Figure 66 : formule semi-développée du L-glutathion réduit (GSH)

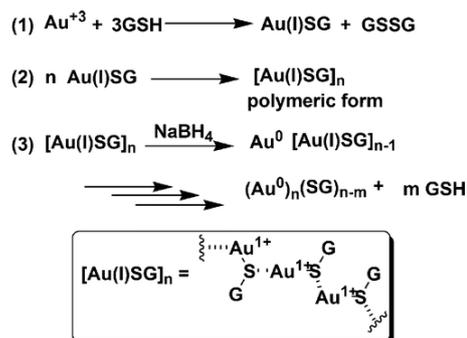


Figure 65 : mécanisme de synthèse de formation de nanoparticules d'or avec du glutathion. Extrait de [36].

II.B.3.a) Manipulations

Dans un tube de 15 mL sont introduits 1 mL d' $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ à 0,025 M et 8 mL de GSH à 0,02 M. La coloration initiale jaune clair propre au sel d'or dissout dans l'eau devient brune quelques secondes lors de l'introduction du GSH, puis redevient jaune clair mais une opacité est remarquée. En quelques minutes, un précipité blanc se forme. Le pH est ajusté entre 5 et 8 à l'aide de NaOH 1 M (le pH initial étant de 2). Différents pH ont été testés. Après ajustement du pH, la solution devient limpide, incolore. 4,7 mL de NaBH_4 à 2 mg/mL fraîchement préparé sont introduits. Le rapport massique NaBH_4 : sel d'or est donc de 36 : 1. La solution est agitée vigoureusement pendant 1 nuit à température ambiante. La suspension possède une couleur dépendante de l'ajustement de pH, telle que :

- pH = 5,10 : coloration rose clair
- pH \in [5,5 ; 7,9]: coloration violet foncé
- pH = 8,15 : sans couleur, transparent.

L'indication chromatique confirme l'intervalle de pH dans lequel travailler pour cette synthèse, une solution sans couleur indiquant l'absence de nanoparticules.

Afin de purifier les suspensions, deux méthodes ont été testées : la spin-filtration 15 min à 10k g avec un filtre 50 kDa (spin-filtration, Figure 36) et la SEC. Les suspensions sont redispersées dans de l'eau DI (aucune dilution).

Les suspensions finales ont donc de petits volumes (de l'ordre de la dizaine de mL maximum) à une concentration en or théorique de 0,35 mg/mL. Cette faible concentration explique l'absence d'analyses nécessitant de travailler sur des poudres.

II.B.3.b) Caractérisation

Les synthèses résultent en des nanoparticules de taille hydrodynamique moyenne variant de 10 à 30 nm.

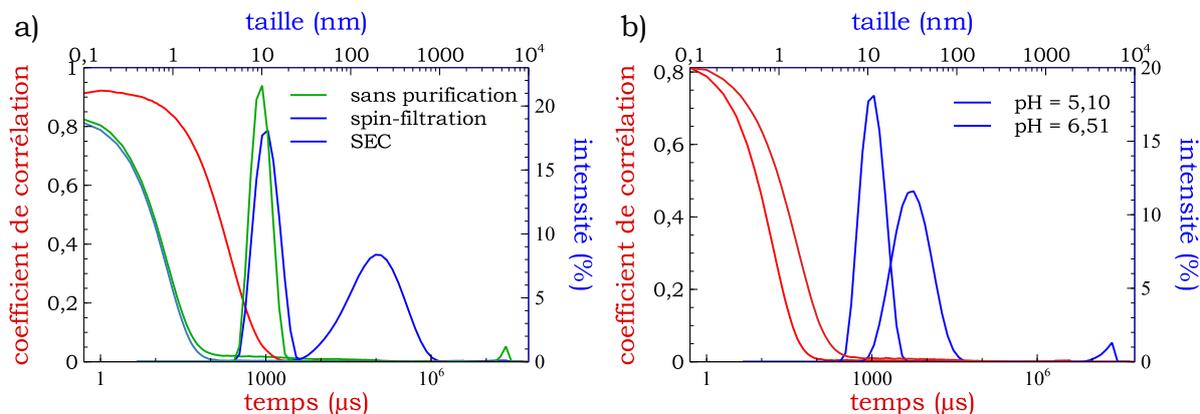


Figure 67 : a) analyses DLS de suspensions d'AuNPs synthétisées avec du glutathione. Ajustement de pH à 6,51. b) analyses DLS de suspensions d'AuNPs synthétisées avec du glutathione en fonction du pH.

En Figure 67 a) sont présentées les analyses DLS d'un échantillon purifié via la spin-filtration (traits pleins) ou la SEC (pointillés). Les valeurs de diamètre moyen et de PDI sont de 11 nm et 0,13 pour la spin-filtration, et de 149 nm et 0,3 pour la SEC (échantillon original sans purification : $\varnothing = 29$ nm, PDI = 0,17). La spin-filtration résulte en une distribution en intensité avec un seul pic fin, la disparition du pic à 10^4 nm correspondant à des agrégats. La SEC résulte de même en la disparition de ce pic mais une augmentation de taille de 130 nm est observée, le PDI est largement supérieur et souligne un état d'agglomération plus élevé. La spin-filtration est donc préférable. Elle permet par ailleurs de purifier de plus grands volumes.

Les analyses DLS montrent une variation de la taille en fonction de l'ajustement du pH : une augmentation du pH implique une diminution de la taille, sauf pour les pH inférieurs à 5,5 (Figure 67 et Figure 68). Cela s'explique par la diminution des forces électrostatiques répulsives quand le pH diminue, et donc la formation de précurseurs polymériques plus larges et plus denses. Les PDI sont corrects pour les valeurs de pH comprises entre 6 et 8, mais la distribution en intensité indique la présence d'agrégats pour les suspensions aux diamètres les plus larges (exemple en Figure 67). Des tentatives pour éliminer les agrégats ont été menées : la simple centrifugation (3k à 10k g, 1:30 à 10 min) et la filtration à l'aide d'un filtre 0,2 μ M, mais n'ont résulté qu'en une sédimentation instantanée des nanoparticules.

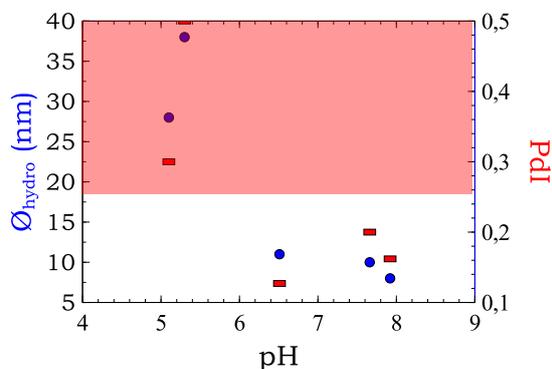


Figure 68 : Analyses DLS des AuNPs synthétisées avec du GSH : diamètres hydrodynamiques moyens et PDI en fonction du pH.

Les analyses UV-visible montrent une allure monomodale, indiquant une forme sphérique des nanoparticules (Figure 69). Elles confirment les analyses DLS, à savoir que la taille des particules diminue quand le pH augmente : un léger décalage de la résonance plasmon de surface est observé, passant de 527 nm pour le pH 5,5 à 522 nm pour le pH 7,9.

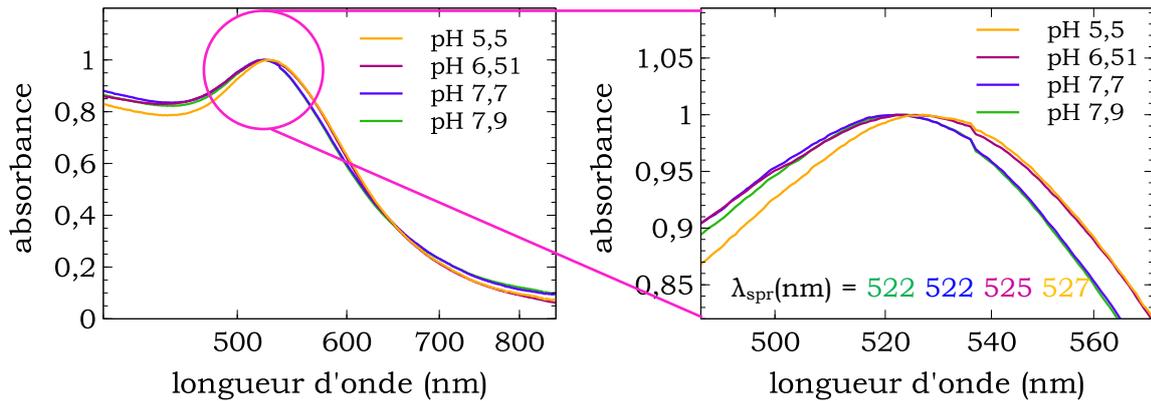


Figure 69 : Analyses UV-visible des AuNPs synthétisées avec du glutathion selon différents ajustement de pH.

Le TEM en Figure 70 présente un échantillon synthétisé avec un ajustement de pH à 7,9 et expose des nanoparticules sphériques, se présentant sous forme d'agrégats d'une centaine de nm. Cet aspect d'agrégats peut être expliqué par un effet de séchage. La taille moyenne des particules présentées est de $5,8 \text{ nm} \pm 0,6 \text{ nm}$, cohérente avec le diamètre hydrodynamique de la suspension présentée qui est de 10 nm.

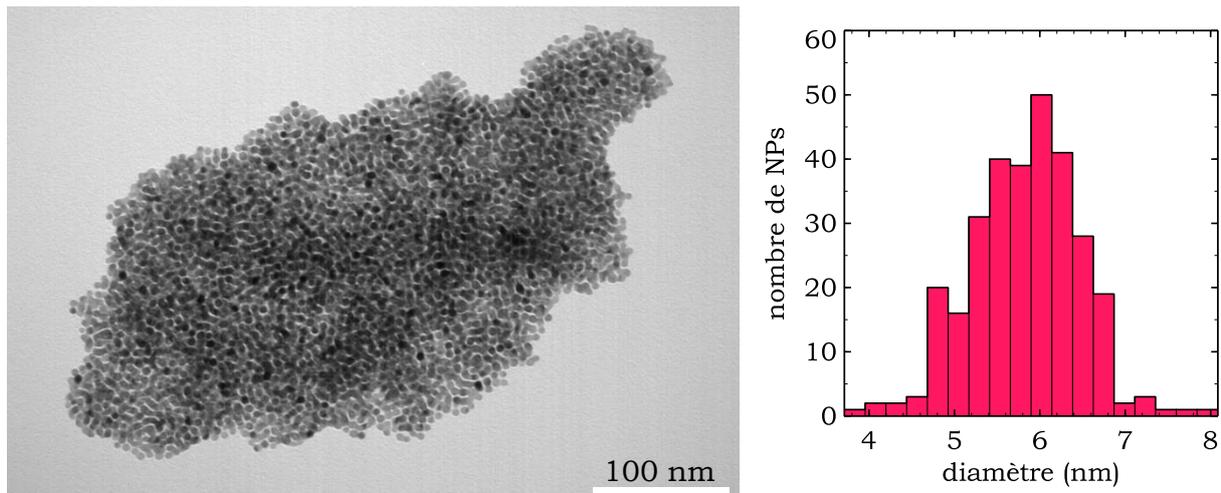


Figure 70 : Cliché TEM des AuNPs synthétisés avec du GSH (V3) et histogramme des diamètres mesurés selon une direction via le logiciel ImageJ. Comptage sur 300 particules.

II.B.4. Conclusion des synthèses de nanoparticules d'or

Différents protocoles de synthèse de nanoparticule d'or ont été testés : la méthode classique de Turkevich, des variantes avec chauffage avec (V1) ou sans (V2) ajustement de pH, et une synthèse en présence de glutathion (V3). Les nanoparticules sont caractérisées par DLS, UV-visible et TEM. Les tailles hydrodynamiques varient

de 10 à 70 nm pour toutes les synthèses confondues (Tableau 12). Les suspensions avec la mono-dispersité et la sphéricité les plus satisfaisantes sont celles synthétisées

méthode	caractéristiques des suspensions						paramètres de synthèses					
	d (nm)	PdI	dispersité	sphéricité	λ_{spr} (nm)	OG [Au]th (M)	surf. spé. (cm ² /mL)	NaBH ₄	TSCD	GSH	chauffage (°C)	ajustement pH
Turkevich	15-25	< 0,15				10 ⁻⁴	1,1.10 ⁻¹					
	25-50	0,25 <x< 0,35	~	~	517-542	à	à	✓	✓	X	X	X
	50-70	<0,25				10 ⁻⁷	2,3.10 ⁻²					
V1	20	< 0,2	✓	✓	520	8.10 ⁻⁷	1,5.10 ⁻³	X	✓	X	88	7-8
V2	20-25	< 0,2	✓	✓	522	10 ⁻⁸	1,3.10 ⁻³	X	✓	X	110	X
V3	10-30	< 0,3	✓	✓	520-525	2.10 ⁻⁶	1,1-3,2	✓	X	✓	X	6-8

Tableau 12 : Récapitulatif des synthèses de nanoparticules d'or : résumé des paramètres de synthèse et caractéristiques des suspensions et. Les concentrations en or et les surfaces spécifiques théoriques sont des ordres de grandeur ajoutés à titre indicatif, calculés à partir des masses initiales de sel d'or introduites dans le milieu de synthèse, avec l'hypothèse que la réaction est totale. Les surfaces spécifiques sont calculées à partir des diamètres du TEM quand cela est possible.

par V1, V2 et V3 et ont des tailles hydrodynamiques moyennes comprises entre 10 et 30 nm. Les concentrations sont faibles (inférieure à 10⁻⁴M) et les suspensions ne peuvent être purifiés ou reconcentrées par des centrifugations. Pour la majorité des échantillons (à l'exception de V1) il est préférable de fonctionnaliser directement après la synthèse car les suspensions ont tendance à sédimenter, excepté pour V1.

$$S_{spé} = \frac{\text{nombre de NPs}}{mL} * \text{surface d'1 NP}$$

$$S_{spé} = \frac{\text{concentration (g/L)}}{\text{masse d'1NP}} * \text{surface d'1 NP}$$

$$S_{spé} = \frac{c}{\rho * \frac{4}{3}\pi * r^3} * 4\pi r^2$$

$S_{spé}$: la surface spécifique en m²/mL
 c : la concentration [Au] en g/L
 ρ : la densité de l'or en g/m³
 r : le rayon d'une NP en m.

Figure 71 : Détail du calcul de la surface spécifique.

II.C. Fonctionnalisations des nanoparticules d'or par du PEG

II.C.1. Manipulation

Le PEG-SH est une molécule thiolée se greffant aisément à la surface des nanoparticules en raison de l'affinité du groupement thiol avec l'or. Ici, deux PEG de masses moléculaires différentes – donc de longueur de chaîne différentes – ont été utilisés afin d'obtenir des nanoparticules de tailles hydrodynamiques différentes avec le même cœur métallique.

Les PEG utilisés sont les PEG-SH de 2000 g/mol (CAS 134874-49-0) et de 350 g/mol (CAS 651042-82-9) de chez Sigma-Aldrich (Figure 72), et le HS-PEG-COOH (3 kDa) d'Iris Biotech (n° article PEG1099) afin de

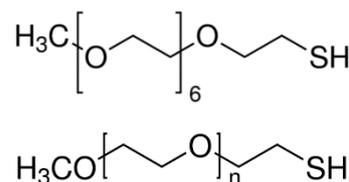


Figure 72 : formules semi-développées des PEG-SH 350 MW (haut) et 2k MW (bas).

comparer deux paramètres de chimie de surface induits par ces polymères. Les rôles, d'une part du poids moléculaire des PEG-SH et d'autre part de la charge neutre ou négative ont été comparés pour étudier l'influence de ces molécules sur les interactions entre les AuNPs et les protéines.

En pratique, le PEG est pesé puis directement introduit dans la suspension de NPs avec un ratio massique Au:PEG de 1:5, le tout est agité vigoureusement (400 rpm) à température ambiante pendant 1h.

Afin d'éliminer les réactifs en excès, le citrate qui a été substitué et les espèces présentes en solution résultant de la synthèse, les suspensions sont purifiées par centrifugation. Deux possibilités ont été testées : par simple centrifugation et par centri-filtration. La première permet de traiter de grands volumes mais des pertes sont observées, visibles par la coloration légèrement rose des surnageants. La seconde limite les pertes mais purifie de plus petits volumes, et est plus coûteuse. L'optimisation des centrifugations a déterminé, pour des tubes Falcon 50 mL, les paramètres de centrifugation adéquats comme étant 20k g 15 min pour la simple centrifugation (30-40 mL d'échantillon par tube), et 5k g 15 min avec un filtre 30 kDa pour la centri-filtration (15 mL d'échantillon par tube).

II.C.2. Caractérisation

○ Analyses DLS :

Les analyses DLS sont conduites sur les suspensions post-purifications avec un pH compris entre 6 et 7.

méthode	surface	Ø(nm)	PdI
V1	citrate	18	0,1
	PEG-SH(350)	20	0,15
	PEG-SH(2k)	30	0,1
	citrate	30	0,4
	PEG-SH(350)	35	0,4
	PEG-SH(2k)	39	0,28
V2	SH-PEG-COOH(3k)	55	0,27
	citrate	20	0,1
	PEG-SH(350)	25	0,24
	citrate	25	0,2
	PEG-SH(2k)	37	0,15
turkevich	SH-PEG-COOH(3k)	95	0,25
	citrate	46	0,2
	PEG-SH(2k)	60	0,25

Tableau 13 : fonctionnalisations des AuNPs par du PEG-SH : diamètres hydrodynamiques et PDI d'échantillons **purifiés** par centrifugation.

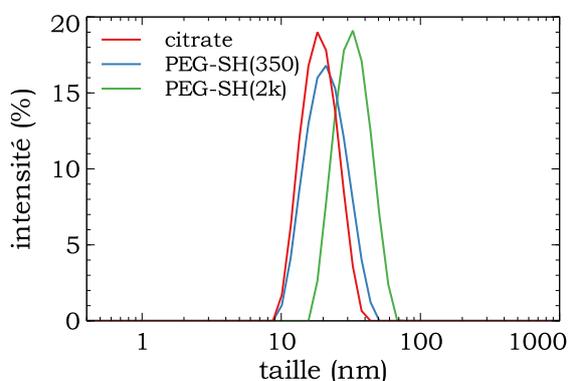


Figure 73 : Analyses DLS : exemple de distribution en intensité d'AuNPs synthétisées par V1 avant et après fonctionnalisation par différents PEG-SH.

Le Tableau 13 indique le diamètre hydrodynamique moyen et le PDI des suspensions d'AuNPs en fonction des molécules en surface. Une augmentation de taille apparaît après fonctionnalisation avec le PEG-SH. L'augmentation en taille est d'autant plus marquée que le PEG-SH est long (exemple en Figure 73), on a donc $\text{Ø}[\text{AuNPs@citrate}] < \text{Ø}[\text{AuNPs@S-PEG}(350)] < \text{Ø}[\text{AuNPs@S-PEG}(2\text{k})] < \text{Ø}[\text{AuNPs@S-PEG-COOH}(3\text{k})]$. Cette tendance s'observe pour les AuNPs synthétisées avec les différentes méthodes. Ceci est cohérent avec leur longueur de chaîne et suggère un greffage des PEG selon une conformation en brosse [147]. L'augmentation de diamètre hydrodynamique est d'autant plus marquée avec le SH-PEG-COOH, car en plus d'avoir une chaîne plus longue (3k MW), les groupements -COOH font bénéficier

aux suspensions d'une répulsion électrostatique //double couche en plus de stérique. Tous les PDI sont corrects. Tous les pH sont compris entre 6 et 7.

En Tableau 14 sont indiquées les tailles des fonctionnalisations avant et après purification. Les centrifugations ne déstabilisent pas les suspensions et n'impactent pas le PDI. Il est remarqué qu'en fonction de la méthode de synthèse, la purification entraîne une augmentation de la taille hydrodynamique (pour V1) ou une diminution (pour V2). On peut expliquer cette observation par une différence dans les forces ioniques des suspensions pré-fonctionnalisation (ajout de NaOH et excès de citrate plus important pour V1).

méthode	surface	Ø(nm)	PdI
V1	citrate	25	0,25
	PEG-SH(350)	22	0,21
	PEG-SH(350)purifié	38	0,22
	PEG-SH(2k)	32	0,2
	PEG-SH(2k) purifié	50	0,26
V2	citrate	20	0,09
	PEG-SH(350)	30	0,13
	PEG-SH(350)purifié	25	0,24
	citrate	26	0,2
	PEG-SH(2k)	38	0,17
	PEG-SH(2k) purifié	37	0,15

Tableau 14 : fonctionnalisations des AuNPs par du PEG-SH : diamètres hydrodynamiques et PDI avant et après centrifugations.

L'augmentation de la taille hydrodynamique ainsi que la stabilité des suspensions après centrifugation démontre le greffage du PEG-SH à la surface des nanoparticules pour les méthodes de synthèse de Turkevich, V1 et V2, étant donné que les AuNPs@citrate sont instables après centrifugation.

Dans le cas de V3 (synthèse avec du glutathion), une simple introduction du PEG-SH dans la suspension ne permet pas de le greffer. En effet, la surface des AuNPs est déjà occupée par des liaisons Au-S avec le groupement thiol des glutathions. Pour échanger le GSH avec le PEG-SH, il faudrait procéder à un échange de ligand. Une piste serait d'utiliser du dithiothréitol (DTT). Les suspensions de V3 ne sont donc pas traitées dans la suite de cette sous-partie.

o Analyses UV :

La spectroscopie UV-visible n'indique pas de changement de morphologie. Une différence de quelques nm dans la λ_{spr} est observée (de 519,5 nm à 521,5 nm par exemple en Figure 74), qui s'explique par un coating – et donc un environnement de la surface métallique – différent.

La Spectrométrie d'Emission Atomique à Plasma à Couplage Inductif (ICP-AES) est une technique de détection d'éléments chimiques permettant de doser l'or en solution.

Dans un premier temps, elle est utilisée afin de déterminer le rendement des fonctionnalisations. Pour un rendement théorique de 100%, la concentration en or après fonctionnalisation et purification est de 0,033 mg/mL (=33 ppm). Les valeurs d'ICP pour différents échantillons sont comprises entre 30 et 40 ppm. La concentration supérieure à celle théorique est dû à l'étape de centrifugation, plus

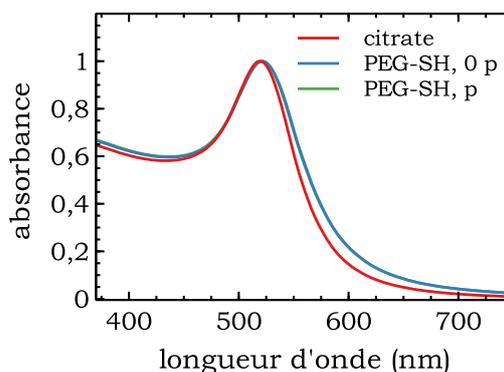


Figure 74 : Spectres UV-visible normalisés d'un échantillon d'AuNPs synthétisées par V2 (diamètre de 20 nm), fonctionnalisées par du PEG-SH(350) avant (0 p) et après (p) purification.

précisément au prélèvement du surnageant qui peut être très fluctuant. L'ordre de grandeur indique que l'intégralité du sel d'or a réagi.

Des tentatives pour doser le soufre ont été conduites mais n'ont pas abouti à cause d'interférences avec les raies d'émission du calcium.

Dans un second temps, la concentration donnée par l'ICP est reliée à l'absorbance UV-visible de la λ_{spr} afin de pouvoir estimer la concentration des autres suspensions en établissant un étalon Figure 75.

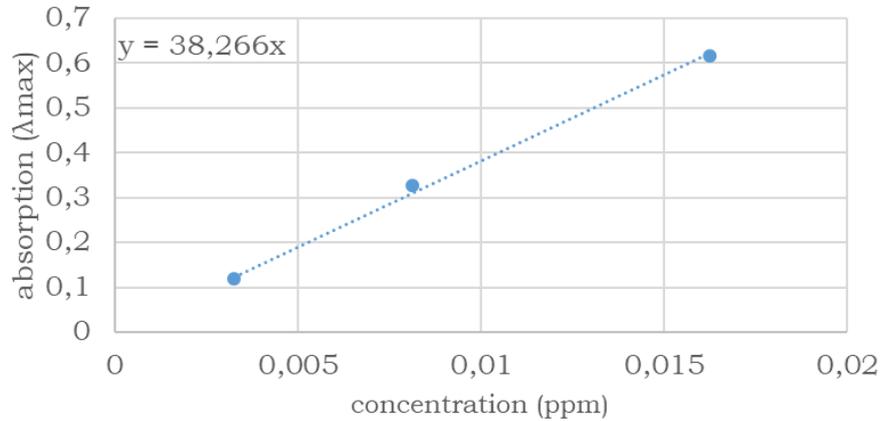


Figure 75 : étalon reliant concentration ICP (ppm) à l'absorption UV de la λ_{spr}

Bien que cet étalon ne considère pas la taille des nanoparticules et son coating, il permet d'estimer un ordre de grandeur de la concentration des suspensions. Par exemple, la lecture nous donne 18 ppm contre $[\text{Au}](\text{ICP}) = 21$ ppm pour un échantillon synthétisé par V2 fonctionnalisé par du PEG-SH(2k) de diamètre hydrodynamique moyen 37 nm, ou 13,3 ppm contre $[\text{Au}](\text{ICP}) = 15,7$ ppm pour un échantillon synthétisé par V1 sans fonctionnalisation.

Avec cette concentration et la taille TEM ou le diamètre hydrodynamique (sans fonctionnalisation), la concentration en NPs/mL est calculée avec l'approximation d'avoir des nanoparticules sphériques (Figure 76). L'ordre de grandeur des suspensions est donc de 10^{10} - 10^{11} NPs/mL.

taille DLS sans coating	20 nm
c(massique)	18 ppm
c(massique)	1,80E-02 g/L
M(Au)	197 g/mol
densité Au	19300000 g/m ³
rayon	1,00E-08 m
volume d'une particule	4,19E-24 m ³
	4,19E-10 cm ³
masse d'une particule	8,08E-17 g
c(NPs)	2,23E+14 NPs/L
	2,23E+11 NPs/mL

Figure 76 : tableau de conversion de concentrations : g/L en NPs/mL.

o Microscopie électronique en transmission :

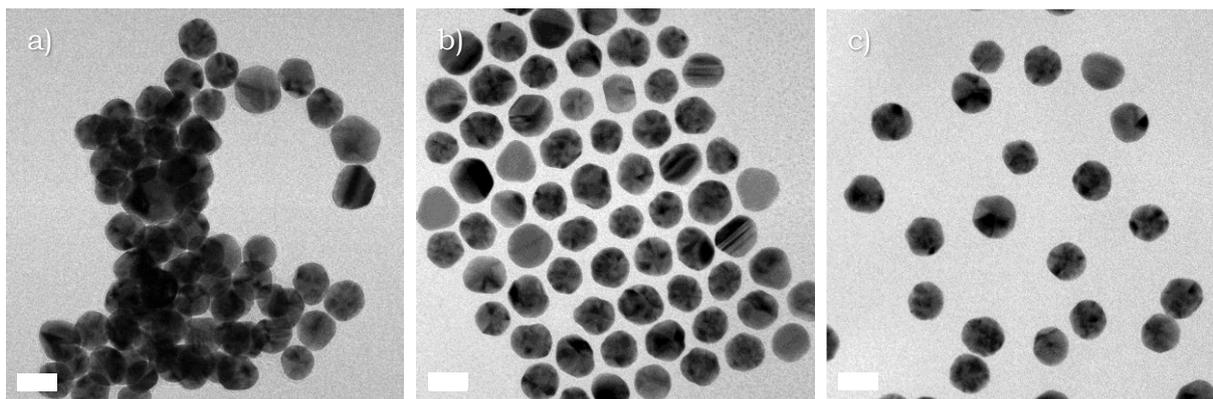


Figure 77 : clichés TEM de nanoparticules d'or synthétisées par V2 a) AuNPs@citrate, b) AuNPs@S-PEG(2k) avant purification, c) AuNPs@S-PEG(2000) après purification. Echelles de 20 nm.

Les clichés TEM ci-dessus (Figure 77) présentent les nanoparticules d'or synthétisées via la méthode sans ajustement de pH (V2), avant (a) et après (b,c) greffage de PEG, avant (b) et après (c) purification. Il s'agit de nanoparticules issues du même batch, les grilles TEM étant préparées au fur et à mesure de ces modifications. Le greffage du PEG est visible avant purification (b) avec une organisation qui évoque un auto-assemblage avec les nanoparticules équidistantes les unes des autres. Après centrifugation, les clichés TEM montrent des nanoparticules individuelles, non agrégées. On suppose donc que l'effet d'auto-assemblage observée en b) est un effet de séchage en présence d'excès de PEG. Sans surprise, les images TEM montrent que le greffage et la purification n'affectent pas la morphologie des NPs.

De plus, il est observé qu'en fonction du PEG, les distances inter-nanoparticulaires varient. En les mesurant selon une direction avec ImageJ, la distance est de 2,6 nm pour les AuNPs fonctionnalisées avec du PEG-SH(2k MW) et de 1,6 nm pour les nanoparticules fonctionnalisées avec du PEG-SH(350 MW)(Figure 78), ce qui concorde avec la taille des PEGs.

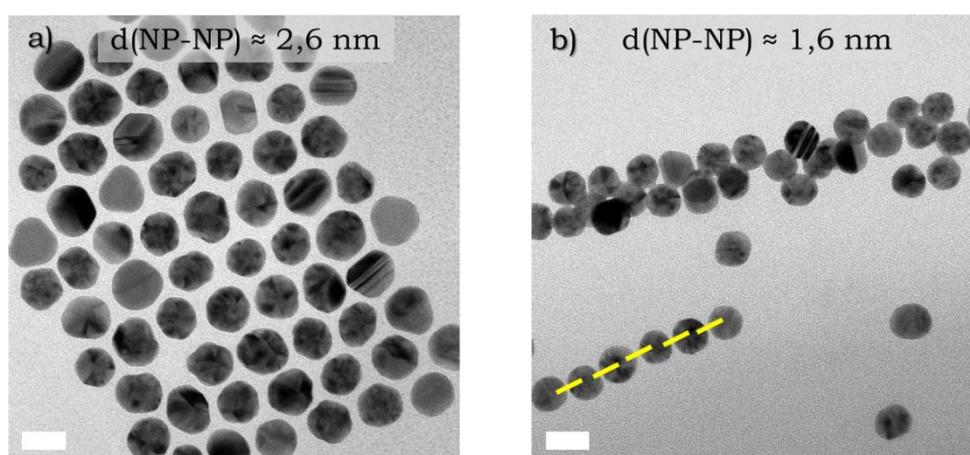


Figure 78 : Clichés TEM de nanoparticules d'or synthétisées par V2 fonctionnalisées : a) PEG-SH(2k) b) PEG-SH(350), échelle de 20nm.

o Spectrométrie photoélectronique X (XPS) :

En Figure 80 sont présentés les quantifications des AuNPs@citrate et AuNPs@S-PEG (2000 et 350 MW). Les contaminations usuelles de Si, Na et Cl dues aux manipulations manuelles sont observées. Le soufre n'a pas été détecté en raison de sa présence en trop basse quantité (à raison d'un atome de soufre par molécule de PEG). Les AuNPs@citrate sont sursaturés en C et O mettant en évidence l'excès de citrate avec le carbone quatre fois plus présent que l'or (on rappelle ici que les AuNPs@citrate ne sont pas purifiées). Ce rapport %C/%Au, de 4,7 pour les AuNPs@S-PEG(2000) et de 1,9 pour les AuNPs@S-PEG 350 est cohérent avec les longueurs des chaînes des PEG.

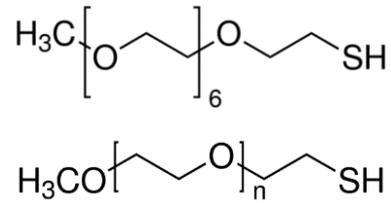


Figure 79 : rappel des formules semi-développées des PEG-SH 350 MW (haut) et 2k MW (bas).

L'apparition des composantes des liaisons C-O des chaînes polymériques est clairement visible en Figure 80. Les contributions accentuées des liaisons C-O ainsi que la contribution la plus importante des liaisons C=O pour les AuNPs@S-PEG(350) sont en accord avec la différence de longueur de chaîne (Figure 79). Ceci confirme là aussi le greffage du PEG sur les particules d'or.

surface	élément						
	C	O	Au	Na	Cl	N	Si
AuNPs PEG-SH(2k)	43,93%	25,04%	9,44%	4,06%	0,41%	0,57%	9,50%
AuNPs PEG-SH(350)	42,19%	27,50%	21,63%	5,75%	0,84%		2,10%
AuNPs citrate	58,81%	33,45%	0,44%	6,03%	1,25%		

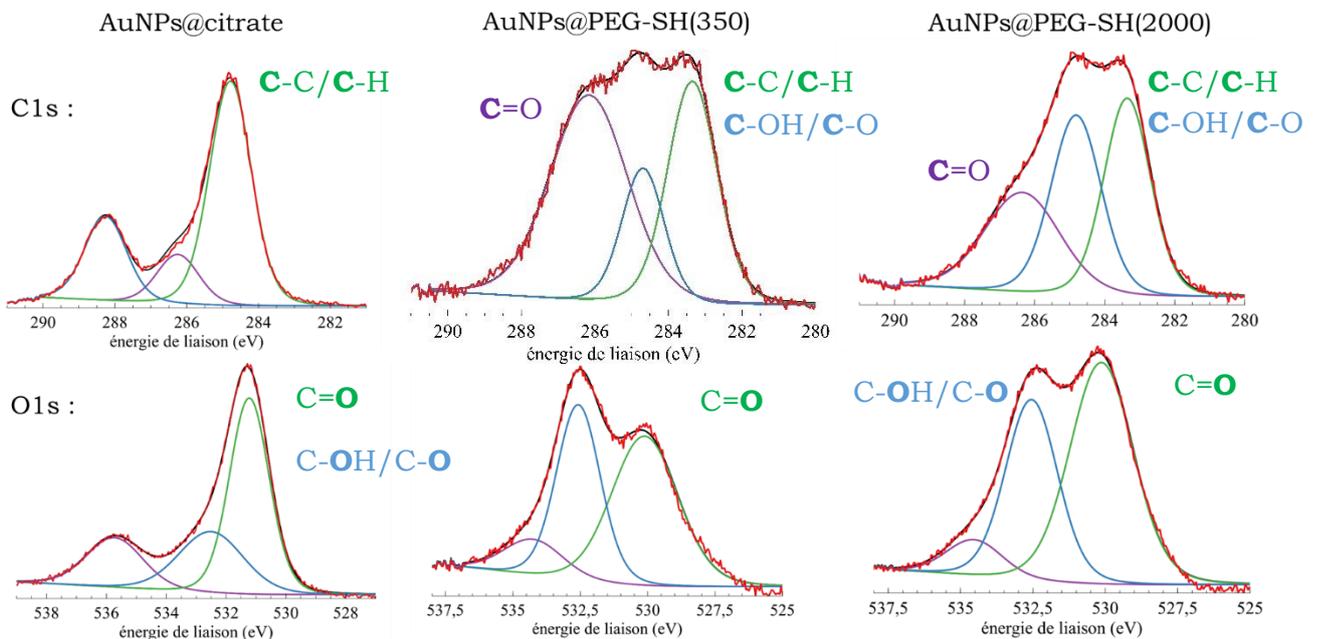


Figure 80 : Analyses XPS : quantification et décomposition des niveaux d'énergies C1s et O1s des AuNPs@citrate et AuNPs@S-PEG (2000 et 350 MW).

II.C.3. Stabilité des suspensions

Les nanoparticules fonctionnalisées doivent être stables dans le temps et après introduction dans un milieu biologique. En Figure 81 et Figure 82 sont présentées des analyses DLS d'AuNPs@S-PEG synthétisées via Turkevich (V0) (n°1, n°2), via V2 (n°3, n°4) à t1 = 1h après la synthèse et à t2 = 5 semaines pour V0 et V2 et t2 = 4 mois pour V1.

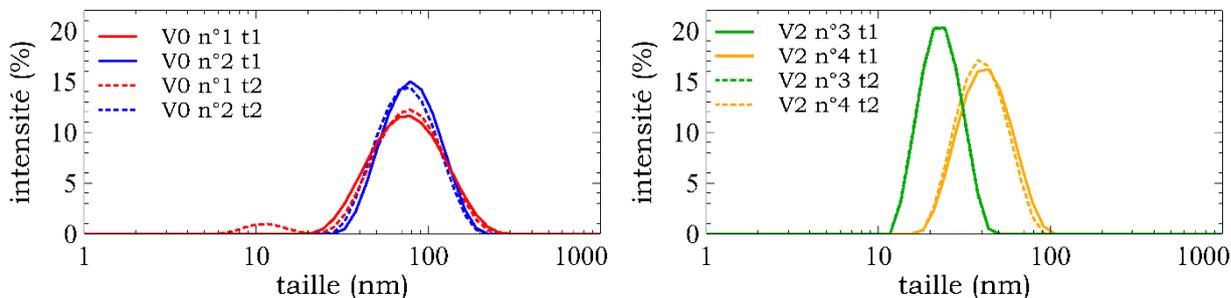


Figure 81 : stabilité colloïdale en fonction du temps : taille hydrodynamique (DLS) de différentes suspensions de AuNPs@S-PEG de V0 (n°1 et 2) et V2 (n°3 et 4) à t1 = 1h, t2 = 5 semaines.

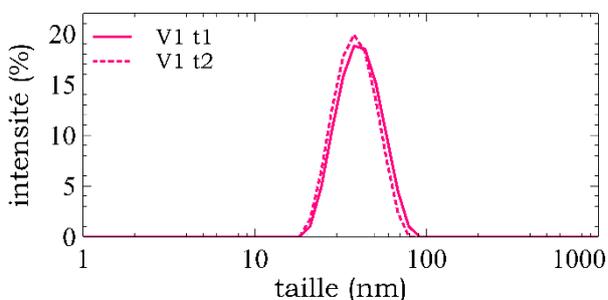


Figure 82 : stabilité colloïdale en fonction du temps : AuNPs@S-PEG de V1 à t1 = 1h, t2 = 4 mois.

Ces analyses illustrent la stabilité des systèmes avec des courbes en intensité et des PDI identiques dans le temps. Les suspensions sont stables pour des pH testés compris entre 4 et 9,5.

Les suspensions sont analysées après incubation d'une heure dans du NaCl 10⁻² M (ratio volume suspension/NaCl de 50/50)

ou dans du PBS 0,1 X (ratio volumes suspension/PBS de 1/10) (Figure 83). Les diamètres hydrodynamiques et les PDI ne varient pas pour les suspensions PEGylées, tandis que l'instabilité des AuNPs@citrate est apparente dans le PBS.

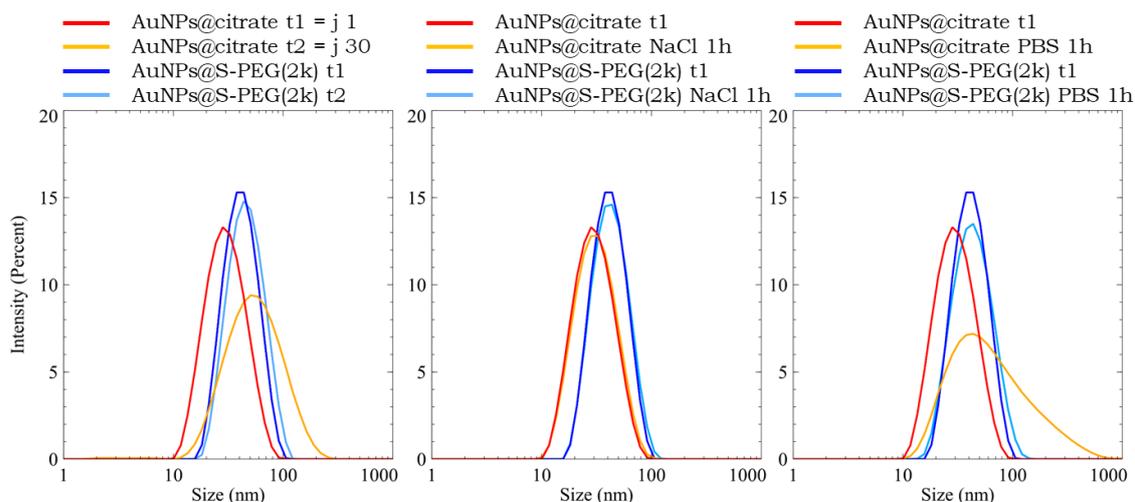


Figure 83 : Analyses DLS d'un échantillon d'AuNPs synthétisé par V2, avant et après fonctionnalisation par du PEG-SH(2000MW) en fonction du milieu dans lequel il est dilué.

Ces données prouvent aussi le greffage du PEG-SH car les AuNPs@citrate sont instables dans un environnement autre que le leur ou à un pH différent.

II.D. Conclusion nanoparticules d'or

Une brève bibliographie sur les synthèses de nanoparticules d'or et les mécanismes sous-jacents de la synthèse de Turkevich (réduction d'un sel d'or) a été conduite.

Plusieurs variations de cette synthèse ont été testées et ont résulté en des suspensions avec des diamètres hydrodynamiques compris entre 10 et 70 nm (cf conclusion sur les synthèses II.B.4)(Tableau 15). Les faibles concentrations (de l'ordre de 10^{10} - 10^{11} NPs/mL) rendent impossible la lyophilisation. Les techniques type XPS sont effectuées en procédant au séchage de gouttes de suspensions sur le support adéquat (Indium pour l'XPS).

méthode	caractéristiques des suspensions						paramètres de synthèses					
	d (nm)	PdI	dispersité	sphéricité	λ_{spr} (nm)	OG [Au]th (M)	surf. spé. (cm ² /mL)	NaBH ₄	TSCD	GSH	chauffage (°C)	ajustement pH
Turkevich	15-25	< 0,15				10^{-4}	$1,1 \cdot 10^{-1}$					
	25-50	0,25 <x< 0,35	~	~	517-542	à	à	✓	✓	X	X	X
	50-70	<0,25				10^{-7}	$2,3 \cdot 10^{-2}$					
V1	20	< 0,2	✓	✓	520	$8 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	X	✓	X	88	7-8
V2	20-25	< 0,2	✓	✓	522	10^{-8}	$1,3 \cdot 10^{-3}$	X	✓	X	110	X
V3	10-30	< 0,3	✓	✓	520-525	$2 \cdot 10^{-6}$	1,1-3,2	✓	X	✓	X	6-8

Tableau 15 : Récapitulatif des synthèses de nanoparticules d'or : caractéristiques des suspensions et résumé des paramètres de synthèse. Les concentrations en or et les surfaces spécifiques sont des ordres de grandeur ajoutés à titre indicatif. Les surfaces spécifiques sont calculées à partir des diamètres du TEM quand cela est possible.

Un coating de polymères avec différents types de PEG (PEG-SH de 2000 et 350 MW, SH-PEG-COOH de 3000 MW) s'effectue aisément sur toutes les AuNPs@citrate et se purifie correctement. Cependant, le PEG n'est pas greffable sur les AuNPs@GSH. De plus, des tests de coating de GSH sur les AuNPs@citrate ont été menés mais n'ont pas été concluants. Un récapitulatif des types de surface des AuNPs en fonction du type de synthèse se trouve en Tableau 16.

Les AuNPs@S-PEG sont stables dans le temps et après un changement de milieu notamment dans le PBS et à pH 7, et sont donc utilisables pour des manipulations biologiques.

méthode	tailles hydrodynamiques		surface		
	d (nm)	PdI	citrate	PEG-SH	GSH
Turkevich avec NaBH ₄	15-25	< 0,15	✓	✓	X
	25-50	0,25 <x< 0,35	✓	✓	X
	50-70	<0,25	✓	✓	X
V1	20	< 0,2	✓	✓	X
V2	20-25	< 0,2	✓	✓	X
V3	10-30	< 0,3	X	X	✓

Tableau 16 : Récapitulatif des synthèses de nanoparticules d'or : résumé des type de coatings effectués et fonctionnels.

III. Nanoparticules de silice

Dans une moindre mesure, un troisième type de nanoparticules a été étudié et synthétisé : les nanoparticules de silice (SiO₂). Dans le premier chapitre est soulignée leur utilisation courante en biologie (I.B). Les NPs de silice présentent les avantages d'être biocompatibles et stables et d'être synthétisables sous forme sphériques et en grande quantité [148].

De plus, un des buts aurait été de faire une coquille de silice sur les nanoparticules d'oxyde de fer et d'or décrites dans ce chapitre, mais il n'en ressortira qu'une brève bibliographie sur les protocoles : le Tableau 17 est donné à titre indicatif.

cœur@coquille	exemple de références
SPIONs@Silica	Vestal&Zhang2003 ; Ma2007 ; Stjerndahl2008 ; Zhang2013 ; Alwi2012
AuNPs@Silica	Ribeiro 2017; Liu2005

Tableau 17 : exemples de références pour les synthèses cœur-coquilles.

III.A. Synthèse

La méthode choisie est celle du procédé Stöber [149], afin d'obtenir des nanoparticules de silice sphériques non poreuses.

La synthèse est un procédé sol-gel, et le mécanisme se décompose en deux étapes : l'hydrolyse et la condensation du précurseur de silice TEOS, avec l'ammoniaque comme catalyseur. La réaction ainsi que les différents modèles de formation des NPs sont décrits et illustrés (les Figure 84 et Figure 85 en sont extraites) dans les travaux de Ghimire et Jaroniec [150].

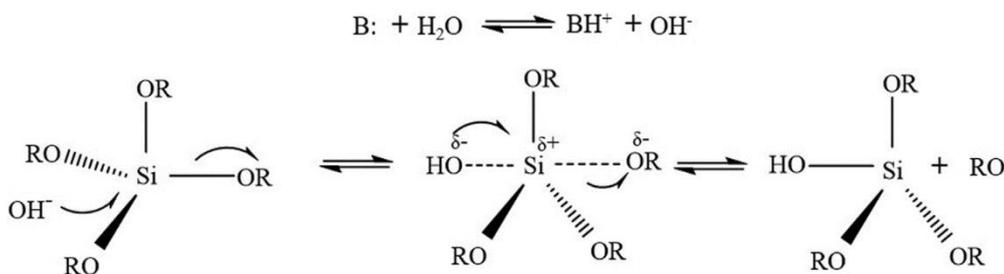


Figure 85 : hydrolyse du précurseur de silice, en présence d'ammoniaque (B:)

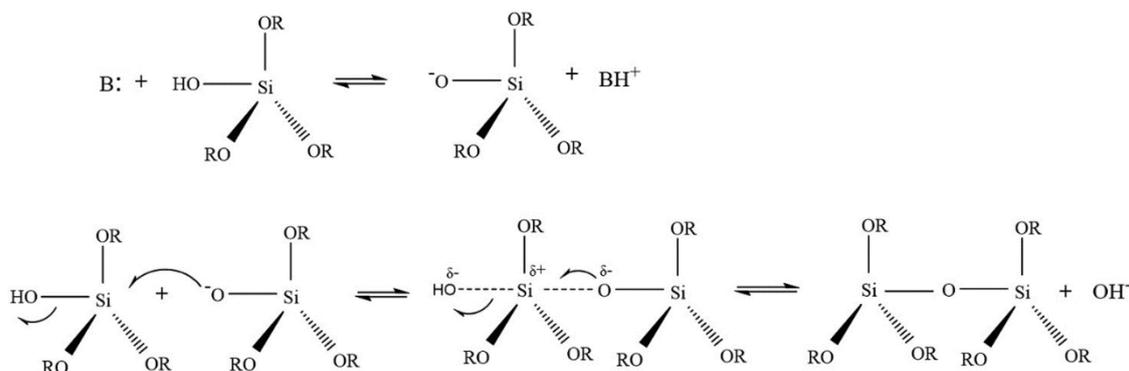


Figure 84 : condensation du TEOS

Les produits utilisés dans cette synthèse sont : de l'éthanol distillé 10 min à 175 mbar à l'évaporateur rotatif afin d'éliminer les résidus d'eau, de l'ammoniaque 28% (VWR Chemicals, n°21190 326) et du tétraéthoxysilane, le précurseur de silice (TEOS, Aldrich, CAS 78-10-4).

Dans un bicol sont introduits 0,5 L d'éthanol distillé et 37,5 mL d'ammoniaque 28%. Le bicol est porté à la température souhaitée avec un système de reflux sous agitation magnétique (400 rpm). Afin d'obtenir différentes tailles, les températures testées sont 70°C, 80°C, 90°C. Quand la température est atteinte, 15 mL de TEOS sont ajoutés. Le système est laissé à réagir 12h, toujours sous agitation magnétique. Une coloration blanche ou une translucidité bleutée est observée.

La suspension est passée à l'évaporateur rotatif afin de concentrer les particules sans atteindre le stade de poudre (175 mbar, dans un bain de 60°C, 10-30 minutes).

La synthèse via le processus Stöber s'effectue dans de l'éthanol. Pour être exploitées dans notre domaine d'intérêt, les nanoparticules doivent se trouver en milieu aqueux. Un changement de milieu peut s'effectuer de différentes manières. La première est de chauffer à l'étuve jusqu'à évaporation complète de l'éthanol et de redisperser dans de l'H₂O DI à l'aide d'une canne à ultrasons. Mais des difficultés de redispersion ont été rencontrées ainsi que des problématiques de sûreté, qui ont mené à l'abandon de cette méthode. Il a donc été testé l'association de l'utilisation de l'évaporateur-rotatif et de la dialyse.

III.B. Caractérisation des nanoparticules de silice

Les synthèses résultent en des suspensions de plusieurs dizaines de mL (30-100 mL) dépendant du volume passé à l'évaporateur rotatif et la concentration moyenne est estimée par lyophilisation à 5mg_{NPs}/mL.

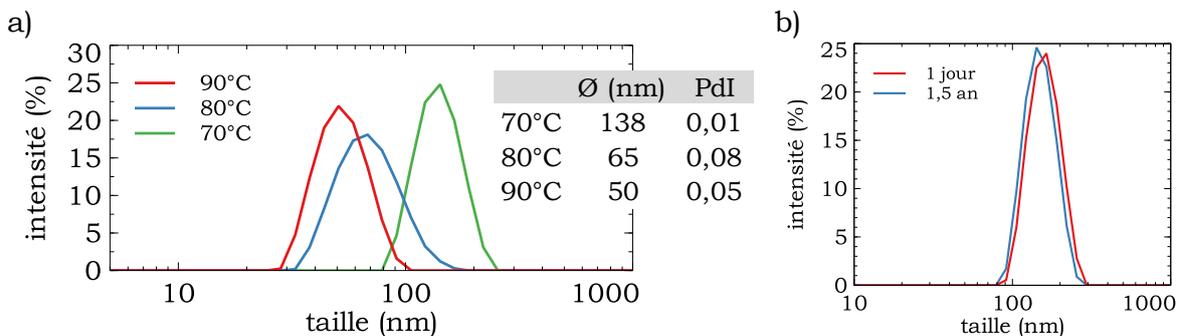


Figure 86 : a) analyses DLS de suspensions de nanoparticules de silice en fonction de la température de synthèse b) stabilité dans le temps de la synthèse effectuée à 70°C.

La DLS indique des tailles variant de 50 à 138 nm (Figure 86). Le diamètre hydrodynamique diminue avec l'augmentation de la température de synthèse, ce qui est en adéquation avec la littérature [151]. Les PDI sont remarquablement bas (inférieurs à 0,1) indiquant des suspensions monodisperses. Les DLS effectuées plus d'un an après les synthèses montrent des suspensions n'ayant pas évoluées et donc stables dans le temps (Figure 86b).

La microscopie électronique en transmission confirme ces données en mettant en évidence des nanoparticules avec une excellente sphéricité et une fine dispersité.

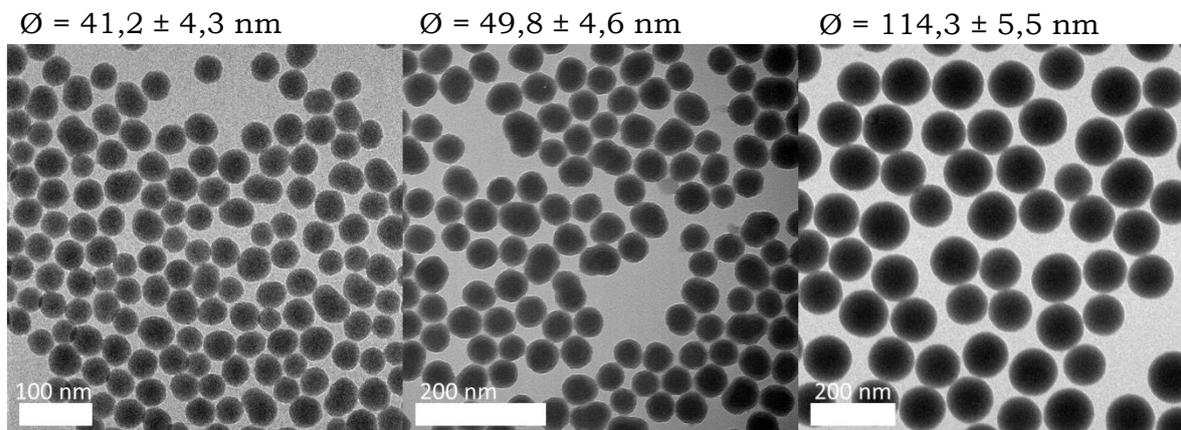


Figure 87 : Clichés TEM des nanoparticules de silice a) 90°C, b) 80°C, c) 70°C. Comptage sur 300 nanoparticules via le logiciel imageJ.

La spectroscopie Raman est ensuite utilisée afin de contrôler l'élimination d'éthanol. La Figure 88 présente les spectres Raman des suspensions de NPs en fonction des purifications. Les bandes sont attribuées à l'aide de tables et sont caractéristiques de l'éthanol [152]. La dialyse suivie de 30 minutes d'évaporateur rotatif parvient à ôter l'éthanol en solution, sans passer par le stade de poudre.

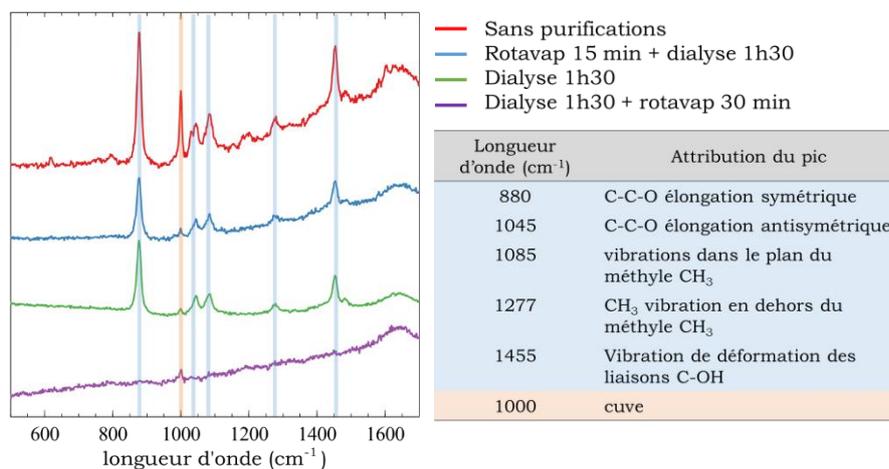


Figure 88 : Spectroscopie Raman des suspensions de nanoparticules de silice en fonction des purifications, et attribution des pics d'intensité.

III.C. Conclusion

Les nanoparticules de silice non mésoporeuses ont brièvement été étudiées. Des suspensions de différents diamètres hydrodynamiques moyens ont été synthétisées, variant de 40 à 114 nm. Les suspensions sont monodisperses. Un protocole de purification/changement de milieu a été optimisé.

Conclusion chapitre 2

Des nanoparticules de trois matériaux différents ont été développées : les particules d'oxyde de fer, d'or, et de silice. Une étude bibliographique a été conduite sur les différents types de synthèse et les mécanismes de la méthode choisie. Les SPIONs sont synthétisés par coprécipitation, les AuNPs par réduction d'un sel d'or et les Silica@NPs par le procédé Stöber.

Les synthèses résultent en des nanoparticules possédant deux paramètres majeurs variables : la taille hydrodynamique et la chimie de surface. Les tailles sont comprises entre 10 et 140 nm. Les molécules en surface étudiées sont le citrate, le glutathion (GSH), le PEG-SH et le groupement -OH. Les différents types de NPs sont résumés en Tableau 18. La variation d'un seul et unique paramètre entre deux suspensions n'est pas systématique car les chimies de surface des différentes NPs n'ont pas les mêmes réactivités. Par exemple, le PEG-SH se greffe difficilement sur les SPIONs et, afin d'obtenir des chimies de surface identiques à celle des AuNPs@S-PEG, les SPIONs pourraient être fonctionnalisés avec du PEG-COOH.

Tableau 18 : récapitulatif des nanoparticules synthétisées : diamètres hydrodynamiques, PDI et molécules en surface.

	méthode	tailles hydrodynamiques		surface					
		d (nm)	PdI	citrate	-OH	PEG-SH(2k)	PEG-SH(350)	SH-PEG-COOH(3k)	GSH
AuNPs	V0	15-25	< 0,15						X
		25-50	0,25 <d< 0,35	✓		✓ d + 15	d + 5	d + 25	X
		50-70	<0,25						X
	V1	20	< 0,2	✓		✓ 30	d + 5	d + 25	X
	V2	20-25	< 0,2	✓		✓ d + 15	d + 5	d + 25	X
	V3	10-30	< 0,3	X		X X	X	X	✓
SPIONs	Massart	25	0,3		✓	~ d + 66	d + 20		
		30	0,15	✓					
		50	0,2						✓
SilicaNPs	Stöber	50							
		65	< 0,1		✓				
		138							

Une attention particulière a été portée sur la caractérisation des suspensions. Les différentes techniques employées et présentées dans ce manuscrit sont récapitulées dans le Tableau 19.

Tableau 19 : techniques de caractérisations usuelles

Technique	Type de NPs	Type d'informations
DLS (Dynamic Light Scattering)	  	Diamètre hydrodynamique, dispersité
Zétamétrie	  	Potentiels zéta (charges surfaciques)
UV-visible	  	Longueur d'onde de la résonance plasmon de surface localisée, estimation de la taille et de la concentration
Lyophilisation	  	Estimation de la concentration, passage de suspension à poudre
XRD (X Ray Diffraction)	  	Composition, taille des cristallites
TEM (Transmission Electron Microscopy)	  	Diamètre, vérifications morphologiques : sphéricité, polydispersité

Spectroscopie Raman		■	Validation de passage en milieu aqueux, présence ou non de certaines molécules organiques
ICP (Inductively Coupled Plasma Spectroscopy)	■	■	Concentration des éléments chimiques
MS (Magnetic Susceptibility)	■		Concentration en oxyde de fer
XPS (X Ray Photoemission Spectroscopy)	■		Caractérisation des fonctionnalisations
	■ SPIONs	■ Silice	■ AuNPs

Des études de stabilité dans le temps et dans un autre milieu que celui post-synthèse (notamment dans du PBS) ont été menées. Les AuNPs@PEG, SPIONs@citrate, SPIONs@GSH et, en choisissant des suspensions fraîches, les AuNPs@citrate, peuvent être utilisées en biologie. Les synthèses présentées dans cette étude ont permis l'obtention de diverses nanoparticules en quantité suffisante pour des applications biologiques tout en veillant à la reproductibilité des protocoles mis en place. Une bibliothèque de nanoparticules a donc été constituée, utilisable pour caractériser les interactions entre les protéines et les nanoparticules (ou couronne protéique) avec l'étude possible de l'impact de la taille et de la chimie de surface sur l'adsorption de biomolécules. Dans la suite de ces travaux, ce dernier paramètre sera étudié *in vivo* sur des SPIONs.

Chapitre 3 : Interactions nanoparticules inorganiques – protéines : étude ciblée

Dans le premier chapitre a été mis en évidence la complexité de l'étude de la couronne protéique, l'une des difficultés se situant dans le manque de standardisation de sa caractérisation. Les techniques de caractérisation sont variées et un bref récapitulatif est donc ici fait.

Dans ce chapitre, une étude protéomique a été menée afin d'étudier l'impact de la charge des NPs et de la taille du polymère adhérent à leur surface sur la couronne protéique et son évolution temporelle. La manipulation *in vivo* est d'abord présentée, puis différentes approches de traitement sont proposées, notamment sur la visualisation des similitudes entre les différentes PC. Les résultats de cette étude ont conduit à la publication d'un article inséré à la fin de ce chapitre.

I. Caractérisation des interactions nanoparticules – protéines

La méthodologie de l'étude de la couronne protéique *in vivo* nécessite usuellement d'injecter les nanoparticules dans le sang, de prélever ce sang, d'isoler les complexes nanoparticules-PC, de purifier les protéines en excès (ce qui est susceptible de retirer la hard corona) puis de caractériser ces complexes NPs-protéines.

Il existe différentes méthodes d'isolation des complexes NPs-PC : la centrifugation (simple), SEC (Size Exclusion Chromatography), la séparation magnétique et fractionnement d'écoulement de champ (FFF, Field Flow Fractionation) [153]. Dans notre étude, la séparation magnétique est utilisée (détails en II.A.1). Les couronnes protéiques ici caractérisées sont donc constituées des protéines fortement liées aux NPs, il s'agit des « hard corona » (HC).

Le tableau ci-dessous récapitule les différentes techniques de caractérisation du domaine de la couronne protéique en résumant les informations des revues de Carrillo-Carrion et de Li [154][155].

Tableau 20 : techniques de caractérisation de la couronne protéique et/ou des interactions NPs-protéines. Méthode directe : analyses directement de la PC, indirectes : analyses des complexes (NPs+PC).

technique	methode	type d'information
AF4 (Asymmetric Flow Field Fractionation)	indirecte	séparation des complexes NPs-PC + taille des (NPs+PC)
AFM (Atomic Force Microscopy)	directe indirecte	structure des protéines ; taille des (NPs+PC), épaisseur PC
CD (Circular Dichroism)	directe	structure des protéines (changement de conformation, structure secondaire)
CE-UV (Capillary Electrophoresis)	indirecte	quantification : changement de charges
DCS (Differential Scanning Calorimetry)	directe	structure des protéines
DCS (Differential Centrifugal Sedimentation)	indirecte	quantification, taille des (NPs+PC)

Chapitre 3 : Interactions NPs-protéines : étude ciblée

DLS (Dynamic Light Scattering)	indirecte	taille des (NPs+PC)
dynamic surface tension and interfacial elasticity values	indirecte	quantification
FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy)	indirecte	taille des (NPs+PC), cinétique des liaisons NPs-protéines,
FQ (Fluo Quenching)	directe indirecte	taille des (NPs+PC) ; quantification
FT-IR (Fourrier Transform InfraRed Spectroscopy)	directe	structure des protéines, changement de conformation, structure secondaire
GE (Gel Electrophoresis)	indirecte	taille des (NPs+PC), séparation des complexes NPs-PC, semi-quantification
ITC (Isothermal Titration Calorimetry)	indirecte	constantes d'affinité, variation d'enthalpie, semi-quantification
LDA (Laser Doppler Anemometry)	indirecte	changement de charges
Mass Spectrometry (MS) : LC-MS (Liquid Chromatography - MS) ou ICP-MC (Inductively Coupled Plasma-MS)	directe	composition de la PC, quantification
NMR (Nuclear Magnetic Resonance)	directe indirecte	structure des protéines, monitoring de liaisons NPs-protéines, localisation des sites de liaisons
NTA (NP Tracking Analysis)	indirecte	taille des (NPs+PC), detection des potentielles agrégations de protéines
Tests colorimétriques (Bradford, BCA)	directe	quantification
QCM (Quartz Crystal Microbalancing)	indirecte	études des liaisons NPs-protéines, quantification
SAXS (Small Angle X-Ray Scattering)	indirecte	taille + forme des (NPs+PC), évolution des interactions, aperçu du thermodynamisme des dissociations NPs-protéines
SDS-PAGE (Sodium DodécylSulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)	directe	séparation des complexes NPs-PC, identification des protéines
SEC (Size Exclusion Chromatography)	indirecte	taille des (NPs+PC)
SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy)	directe	structure des protéines
simulations numériques		études des interactions NPs-protéine
TEM (Transmission Electron Microscopy) / SEM (Scanning Electron Miscoscopy)	directe indirecte	quantification ; taille des (NPs+PC), épaisseur PC
TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing)	indirecte	changement de charges, quantification
UV-visible + SPR (Surface Plasmon Resonance) selon les cas	indirecte	quantification, monitoring des interactions NPs-protéines
XRD (X-Ray Diffraction)	directe	structure 3d des complexes NPs-PC
Zetametrie	indirecte	changement de charges

La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide est à ce jour la méthode la plus employée pour quantifier et identifier les protéines de la PC [156]. C'est cette technique qui sera utilisée dans ce chapitre.

II. Etude *in vivo* : identification des protéines composant la couronne protéique des SPIONs en fonction de leur chimie de surface

II.A. Manipulation

II.A.1. Présentation de la manipulation

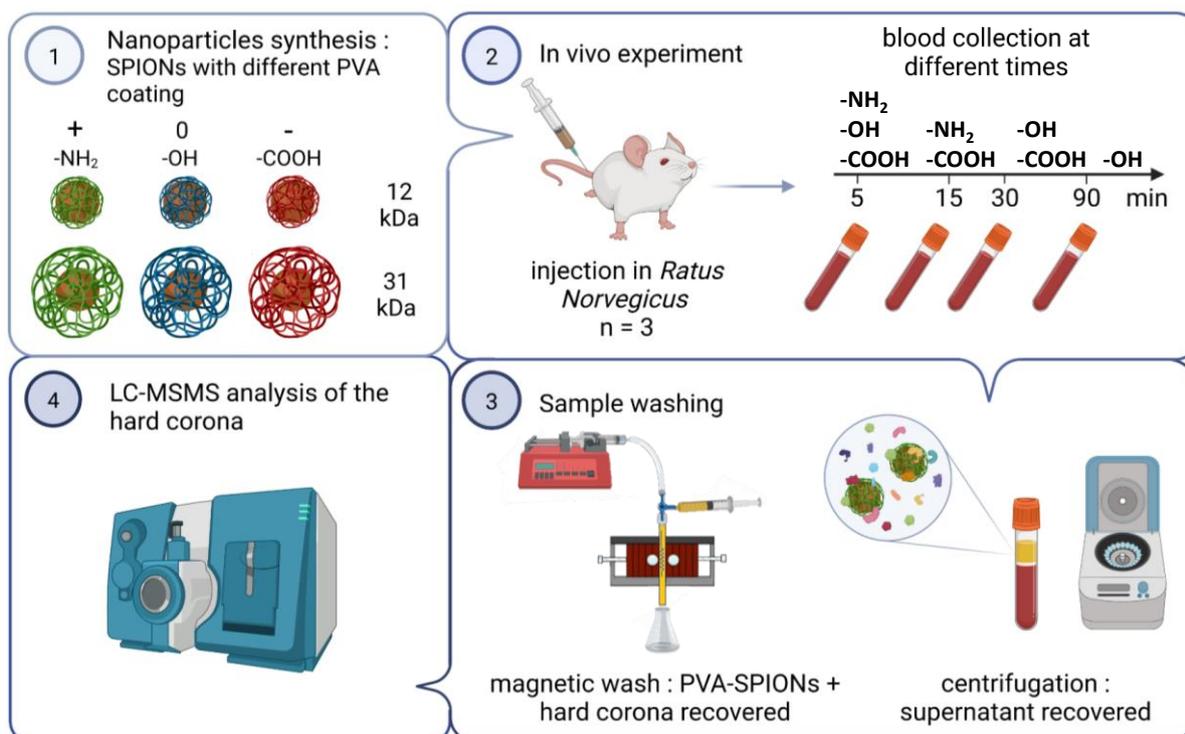


Figure 89 : illustration de la manipulation biologique.

L'expérience est illustrée en Figure 89.

Des SPIONs sont synthétisés comme décrit dans le chapitre 2 et fonctionnalisés par six différents types d'alcools polyvinylique (PVA PolyVinyl Alcohol) et ont donc deux paramètres variables : la taille du polymère en surface (12 et 31 kDa) et leur charge via des groupements fonctionnels différents (-NH₂, -OH, -COOH). Les caractérisations de ces nanoparticules sont présentées dans l'article inséré plus bas : tailles morphologiques et hydrodynamiques et PDI, potentiels zéta.

Tableau 21 : les différents SPIONs étudiés

PVA	positif	neutre	négatif
12 kDa	SPIONs-PVA (12kDa) Positive 12 [+]	SPIONs-PVA (12kDa) Neutral 12 [0]	SPIONs-PVA (12kDa) Negative 12 [-]
31 kDa	SPIONs-PVA (31kDa) Positive 31 [+]	SPIONs-PVA (31kDa) Neutral 31 [0]	SPIONs-PVA (31kDa) Negative 31 [-]

Les nanoparticules sont injectées dans des rats (femelles Wistar), $n = 3$ pour chaque type de SPIONs. Des prélèvements sanguins sont effectués à différents temps en fonction du temps de demi-vie correspondant déterminé au préalable.

Les échantillons sont ensuite centrifugés afin d'éliminer les cellules : les SPIONs sont contenus dans le plasma. Puis celui-ci est purifié au travers d'un réacteur magnétique creux afin d'éliminer les protéines en excès. Ces étapes de lavage sont effectuées à l'aide d'une pompe (1mL/min) avec deux éluants : le PBS puis un mélange PBS / NaCl 2M. Cette étape sépare les protéines faiblement liées (soft corona) des plus fortement liées (hard corona : HC). Ces étapes de lavages découlent d'optimisations menées dans des études antérieures [157], [158].

C'est donc la HC qui est ici analysée, par LC-MSMS (Chromatographie en phase liquide, Spectrométrie de masse).

II.A.2. Analyse de la couronne protéique : principe et méthodologie

Lors de la LC-MSMS, les protéines sont partiellement digérées par une enzyme (généralement la trypsine) puis séparées par chromatographie liquide (LC). Les peptides arrivent donc de manière successive dans le spectromètre (MS), où ils sont ionisés. Le spectromètre de masse mesure le ratio masse/charge de ces peptides et les fragmente en phase gazeuse (MS/MS), permettant d'obtenir leur séquence. A l'aide d'un logiciel, les spectres de masses ainsi obtenus des peptides sont comparés à des bases de données et attribués aux protéines.

Les résultats sont traités à l'aide du logiciel Scaffold5 (Scaffold_5.1.2 ©Proteome Software), basé sur le moteur de recherche MASCOT comme identificateur de protéine.

Les paramètres de filtre d'affichage des protéines sont choisis comme étant : *Protein Threshold* : 1% FDR (False Discovery Rate), *Min Peptide* : 2 et *Peptide Threshold* : 0,1% FDR. C'est-à-dire que le logiciel affiche, avec un taux 1% de fausses découvertes, les protéines identifiées par deux peptides au minimum, avec un taux de fausses découvertes à 0,1%.

Sont ensuite retirées toutes les protéines n'étant pas attribuées à *Rattus Norvegicus* (contaminations humaine par exemple), la kératine (contamination durant le prélèvement) et la trypsine (utilisée pour la digestion des protéines).

Scaffold possède plusieurs options d'affichage (Figure 90). Le choix est de travailler avec les TSC (Total Spectrum Count), l'une des deux options les plus courantes permettant des comparaisons semi-quantitatives entre les différents échantillons (l'autre étant Exclusive Spectrum Count) [159].

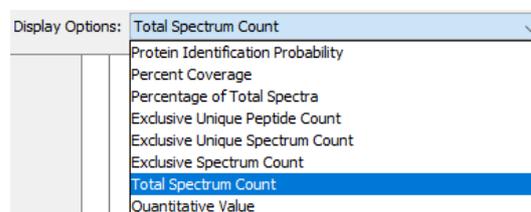


Figure 90 : Options d'affichage de Scaffold5

Le TSC correspond au nombre total de spectres détectés et associés à cette protéine, y compris les spectres des peptides appartenant à un groupe de protéine (*Protein Group*). En effet, certaines protéines ont des séquences peptidiques identiques. Les spectres de ces peptides ne sont donc pas attribués à une protéine

spécifique mais au groupe de protéine partageant cette séquence. Plus le TSC est élevé, plus la protéine est considérée comme abondante.

Le choix a été de normaliser les TSC au poids moléculaire de chaque protéine, afin de tenir compte de leur disparité de poids moléculaires.

Il faut noter que les TSC ne sont pas des valeurs absolues. Ils sont impactés par exemple par l'efficacité de l'ionisation, et possède des limites, comme la variabilité dans la détection des protéines à faibles abondance [160].

II.A.3. Traitement des données de la spectrométrie de masse : nombre de protéines identifiées et reproductibilité

Les données de la LS-MSMS sont tabulaires : pour chaque échantillon, un certain grand nombre de peptides sont identifiés et attribués à un certain grand nombre de protéines.

Le premier critère considéré est le nombre de protéines différentes identifiées sur chaque échantillon. Rapporté à la concentration en SPIONs correspondantes, ce nombre ne varie que très peu en moyenne, la PC isolée ne dépend donc pas de la concentration en SPIONs dans le sérum (Figure 91).

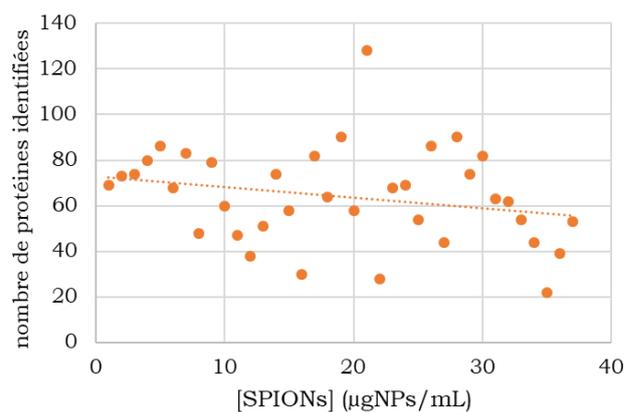


Figure 91 : nombre de protéines identifiées en fonction de la concentration en SPIONs (avant moyennage des triplicatas).

La Figure 92 présente le nombre de protéines différentes moyen en fonction du type de nanoparticules (■). On remarque qu'il est plus élevé pour les particules recouvertes de PVA 31 kDa que de PVA 12kDa. La charge ne semble pas impacter ce nombre, observation qui diffère de celle reportée précédemment [161].

La variation notable en fonction du temps concerne les SPIONs@PVA 31k chargés, dont le nombre de protéines identifiées augmente pour le cas des particules positives et diminue pour le cas des particules négatives.

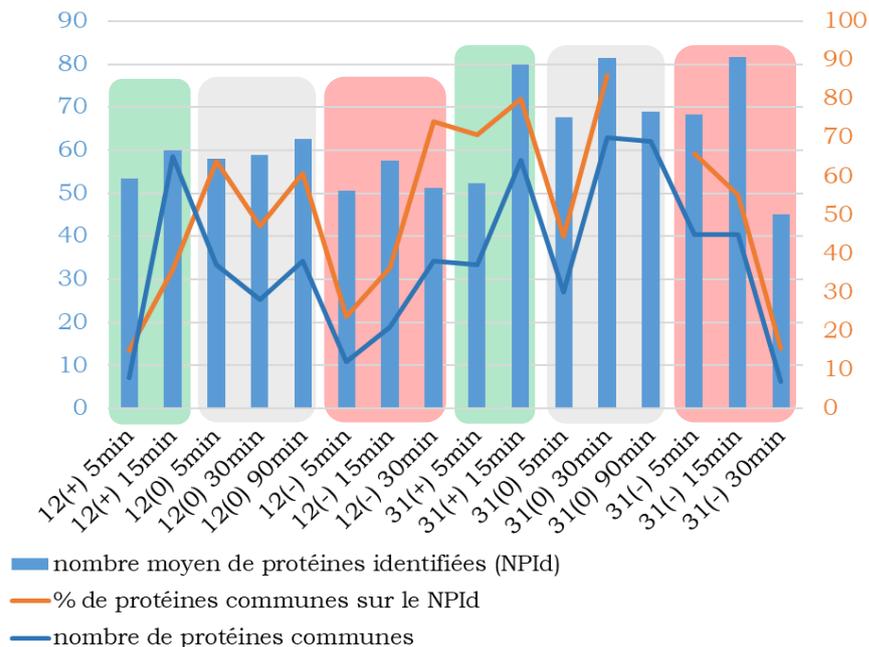


Figure 92 : nombre moyen de protéines identifiées par type d'échantillon, nombre de protéines communes au sein d'un triplicat et pourcentage correspondants.

La reproductibilité est ensuite étudiée à l'aide des diagrammes de Venn fournis par Scaffold5. Sur la Figure 92 est indiqué le nombre de protéines communes aux triplicats (—), et le pourcentage que celui-ci représente sur le nombre de protéine communes (—). Ceci met en valeur des problèmes de reproductibilité, notamment avec les cas extrêmes des SPIONs@PVA 12[+] 5 min et 31[-] 30 min, pour lesquels moins de 10 protéines communes sont retrouvées, soit respectivement 20 et 15 % du nombre de protéines moyen. Ce problème de reproductibilité peut s'expliquer la complexité du vivant, et peut remettre en question les conclusions des études ne travaillant pas avec, au minimum, des triplicatas. Les triplicatas peuvent eux-mêmes être considérés comme insuffisants : comment interpréter les données sur les SPIONs 12[+] 5min en Figure 93 qui ne laisse apparaitre que 8 protéines communes aux trois échantillons ? Une solution serait de ne considérer que le duplicata partageant 67 protéines (Figure 93), soit 94% du nombre moyen de protéine, mais un tel choix pourrait être considéré comme biaisé car un réplica serait éliminé arbitrairement.

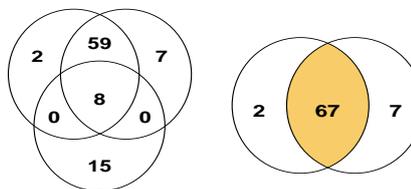


Figure 93 : diagrammes de Venn des SPIONs@PVA 12kDa(+) 5 min : triplicata et duplicata.

Le mieux serait de travailler avec des octoplicatas, une méthodologie courante chez les biologistes compte tenu de cette variabilité du vivant, mais qui serait très onéreuse dans le cas de la protéomique.

Par la suite, les valeurs de TSC des triplicats sont moyennés. En moyenne, 62 protéines sont identifiées par échantillon.

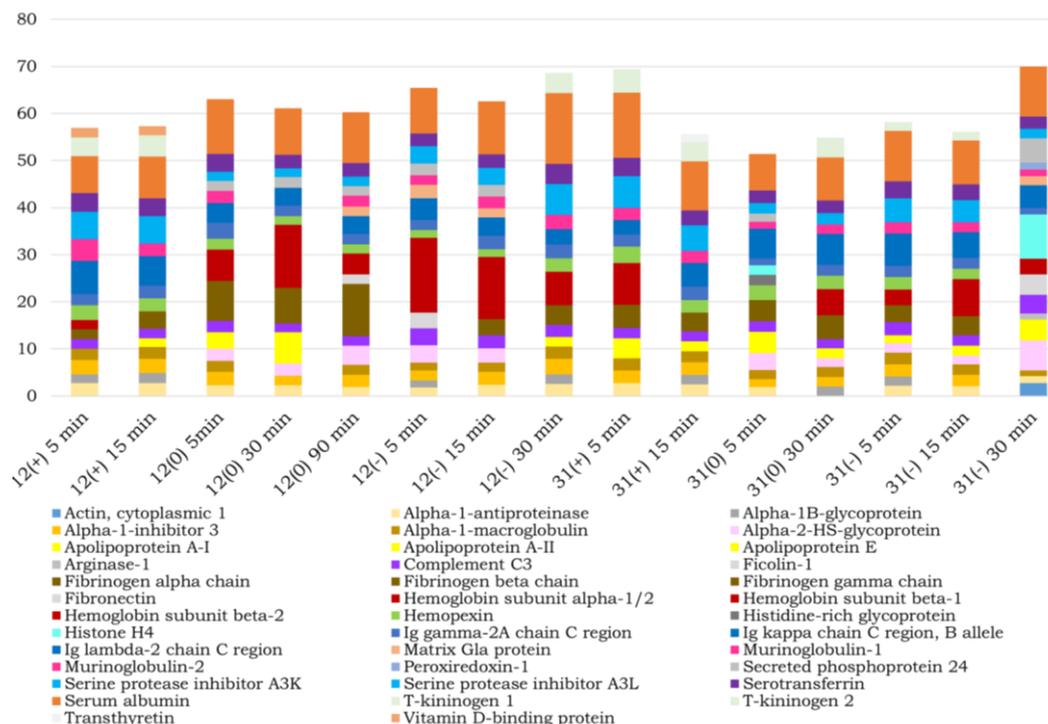


Figure 94 : les 20 protéines les plus identifiées par échantillon et leur pourcentage correspondants.

Les 20 protéines les plus présentes représentent 50 à 70 % des TSC (Figure 94).

L'albumine (■) reste la protéine la plus détectée, mais son pourcentage n'est pas égal à celui de sa présence dans le plasma (~10% contre >50% dans le plasma). Il a plusieurs fois été démontré que l'abondance d'une protéine dans la PC n'est pas en lien avec sa concentration dans le plasma [162]. Les sous unités de l'hémoglobine (■), les immunoglobulines (■), les apolipoprotéines (■) et fibrinogène (■) sont aussi très présentes.

Le pI (Point Isoélectrique, pH auquel la charge de la protéine est nulle) et le GRAVY (GRand AVerage of Hydrophathy, valeur de l'hydrophobie/philie de la protéine) de ces protéines sont étudiées et discutés dans la publication.

L'histogramme en Figure 94 fait ressortir le manque de visibilité pour comparer la distribution protéomique entre les échantillons. Afin de mieux visualiser les quantifications, une heatmap a été dressée (Figure 95). La carte thermique permet de visualiser rapidement la présence plus ou moins marquée de telle ou telle protéine sur les différents échantillons. Sur cette figure, l'échantillon 31(-) 30 min se distingue nettement dans la répartition de ses protéines.

Pour mieux visualiser les similitudes entre les échantillons, il faut se tourner vers les traitements statistiques. C'est ce qui est abordé au point suivant.

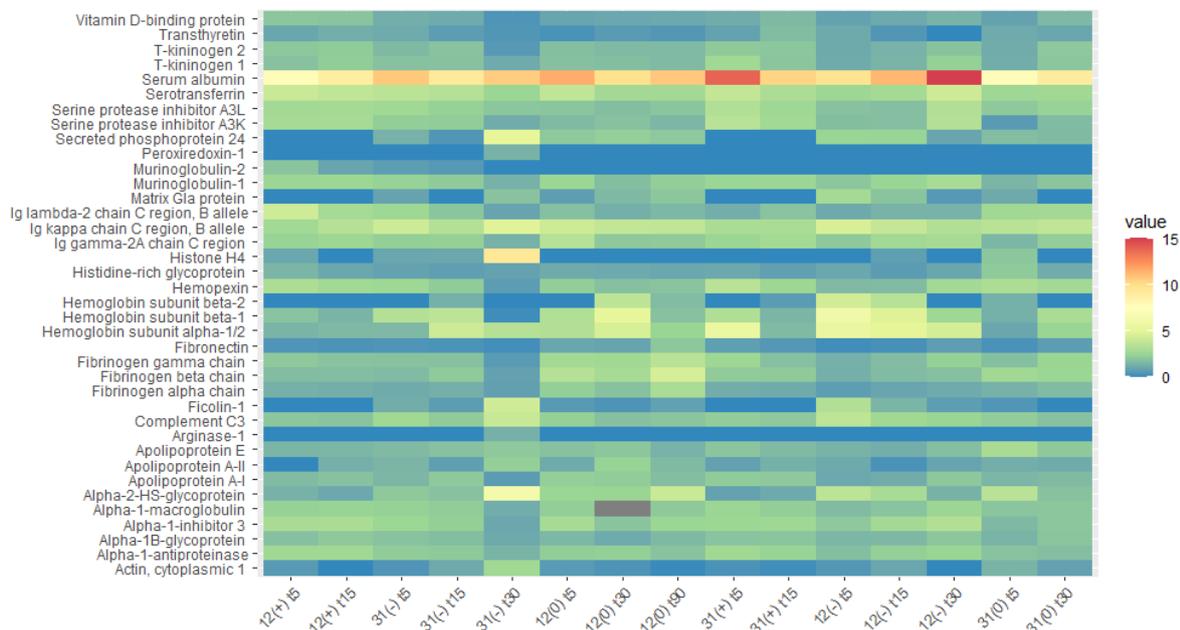


Figure 95 : Visualisation en carte thermique des TSC des 20 protéines les plus présentes.

II.B. Traitements statistiques des données de protéomique

Avec un grand nombre de données comme cela est le cas avec les dizaines de protéines trouvées pour les seize conditions étudiées, un traitement statistique a été nécessaire et le logiciel R a été utilisé afin d'identifier, de quantifier et de mieux visualiser les similarités (ou les différences) entre les compositions des HCs des différents échantillons. Nous remercions Hervé Cardot de l'Institut de Mathématiques de Bourgogne pour les clarifications et les suggestions qu'il a apporté par rapports aux approches statistiques.

Ces approches se divisent en deux catégories (Figure 96): les statistiques inférentielles, et les méthodes appartenant aux analyses multivariées (statistiques descriptives). Les statistiques descriptives visent à décrire les échantillons et à récapituler les données, sous forme graphique notamment. Les statistiques inférentielles ont pour but de tirer des conclusions sur une population à partir de données d'un échantillon de cette population. Elles regroupent aussi les tests statistiques.

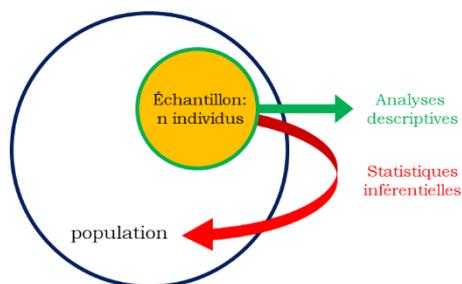


Figure 96 : différentes statistiques.

Les tests statistiques sont nombreux. Ils ont pour principe de tester une hypothèse nulle appelée H_0 .

Donnons comme exemple le test de Wilcoxon-Mann-Whitney, ou test des rangs de Wilcoxon. Ce test est dit non-paramétrique, ce qui signifie que la distribution de ses données ne suit pas une loi normale. Il permet l'étude d'une variable sur deux échantillons. L'hypothèse nulle H_0 stipule que les distributions des protéines sont

proches. Le résultat est sous forme d'une valeur, la « p-value » (valeur de probabilité). Si cette p-value est inférieure à un certain seuil fixé arbitrairement, en général $p =$

	12(+) 5 min	12(+) 15 min	31(-) 5 min	31(-) 15 min	31(-) 30 min	12(0) 5 min	12(0) 30 min	12(0) 90 min	31(+) 5 min	31(+) 5 min	12(-) 5 min	12(-) 15 min	12(-) 30 min	31(0) 5 min	31(0) 30 min	31(0) 90 min
12(+) 5 min		0,5528	0,2758			0,5367			0,4004		0,8871			0,005		
12(+) 15 min										0,4292		0,6338				
31(-) 5 min				0,017	0,9516	0,5357			0,0403		0,3128			0,0707		
31(-) 15 min					0,0132					0,0393		0,0189				
31(-) 30 min												0,017			0,725	
12(0) 5 min							0,9113	0,8337	0,128		0,7038			0,0108		
12(0) 30 min								0,7542							0,362	
12(0) 90 min															0,663	
31(+) 5 min										0,0172	0,2722			0,00008		
31(+) 15 min																
12(-) 5 min												0,3136	0,2145	0,0045		
12(-) 15 min													0,0228			
12(-) 30 min																
31(0) 5 min															0,1312	
31(0) 30 min															0,11	
																0,863

Figure 97 : p-values des tests de Wilcoxon sur quelques distributions de protéines (Hard Corona : HC) à différentes conditions.

0,05, soit 5% d'erreur que l'on admet, on réfute l'hypothèse H_0 .

Nous obtenons ainsi des comparaisons deux à deux, regroupées dans notre cas en Figure 97. Les cases vides correspondent à une comparaison où tous les paramètres varient et qui n'a donc pas de sens. Si l'on considère l'échantillon 31(+)
5 min (au niveau du cadre jaune), H_0 n'est pas rejetée pour sa comparaison avec 12(+)
5min et est rejetée pour sa comparaison avec 31(-)
5min : la distribution de protéines de 31(+)
5min n'a pas de différence significative avec celle de 12(+)
5min, tandis que celles de 31(+)
5min et 31(-)
5min sont différentes. Cela suggère que, dans ce cas, la charge impacte plus la composition de la HC que la taille du polymère.

Cependant, des précautions sont à prendre. Ce test est pour l'étude d'une variable dans deux expériences différentes. Dans notre cas, une « expérience » correspondrait à une protéine, et ce test pourrait donc être utilisé pour l'étude d'une protéine spécifique. L'exemple en Figure 97 est donc incorrect. Il est présenté ici pour avertir de la complexité du choix du test statistique.

On pourrait retenir, pour notre jeu de données, les tests suivants :

- Test du χ^2 : comparaison d'une seule variable sur deux échantillons, dont l'hypothèse H_0 est que la différence entre deux séries de données est dû au hasard.
- Test de Fisher : comparaison de deux variables qualitatives, H_0 étant que ces deux variables sont indépendantes.
- Test d'ANOVA : analyse de la variance, qui analyse une seule variable pour trois échantillons ou plus. On y étudie une variable quantitative à laquelle on attribue une ou deux variables qualitatives appelés facteurs. Le test met en évidence l'existence ou non d'une interaction entre ces facteurs et la variable quantitative étudiée. (note : on parle de test, mais celui-ci appartient aux statistiques descriptives)

Cependant, l'approche choisie et utilisée dans la suite de ce chapitre est celle des analyses de données relevant des statistiques descriptives qui permettent d'identifier des groupes d'individus à partir d'un jeu de données et/ou de mettre en évidence des liens hiérarchique entre eux. Deux aspects de ces statistiques seront ici étudiées : le partitionnement de données (clustering) et la réduction de dimension.

II.B.1. Clustering

II.B.1.a) K-means

La méthode des k-means a pour but de répartir les données en k nombres de groupes (ou « clusters ») et cherche à minimiser l'inertie intra-classe. On définit l'inertie d'un nuage de points comme étant la somme des carrés des distances point-centroïde (ou centre de gravité). Elle est donc une mesure de la dispersion de ce nuage de points.

Le principe de l'algorithme se base sur les centres de gravités des clusters (ou « centroïdes »).

Initialement, k centres sont placés de manière aléatoire. Les distances points-centroïdes sont calculées (les distances euclidiennes sont utilisées) et chaque point est associé au centre le plus proche. Le centre de gravité de chaque groupe ainsi constitué est ensuite calculé. Ils diffèrent généralement de l'emplacement choisi aléatoirement initialement. Les centroïdes sont déplacés vers ces centres de gravité. Alors les distances points-centroïdes sont recalculées. L'itération se répète jusqu'à ce que les centroïdes ne bougent plus.

Afin de déterminer le nombre adéquat de clusters, nous avons utilisé la méthode du coude. Celle-ci calcule la somme des distances au carré entre les centroïdes et chaque point (= l'inertie intra-classe) pour les différentes valeurs de k. En Figure 98a est présenté le graphique de la méthode du coude appliqué à nos données protéomique. Il représente l'inertie intra-classe en fonction du nombre de clusters. Plus cette inertie elle est basse, plus les points sont proches de leur centroïdes, plus le cluster est compact. Pour déterminer le k optimal, il faut se placer au point de retournement, au « pli du coude » de la courbe, qui correspond à une variation minimisée de l'inertie. On détermine ici k = 5.

Cet algorithme est non-déterministe : son résultat varie en fonction de l'initialisation, car celle-ci est aléatoire. Le code est donc relancé plusieurs fois (n=5).

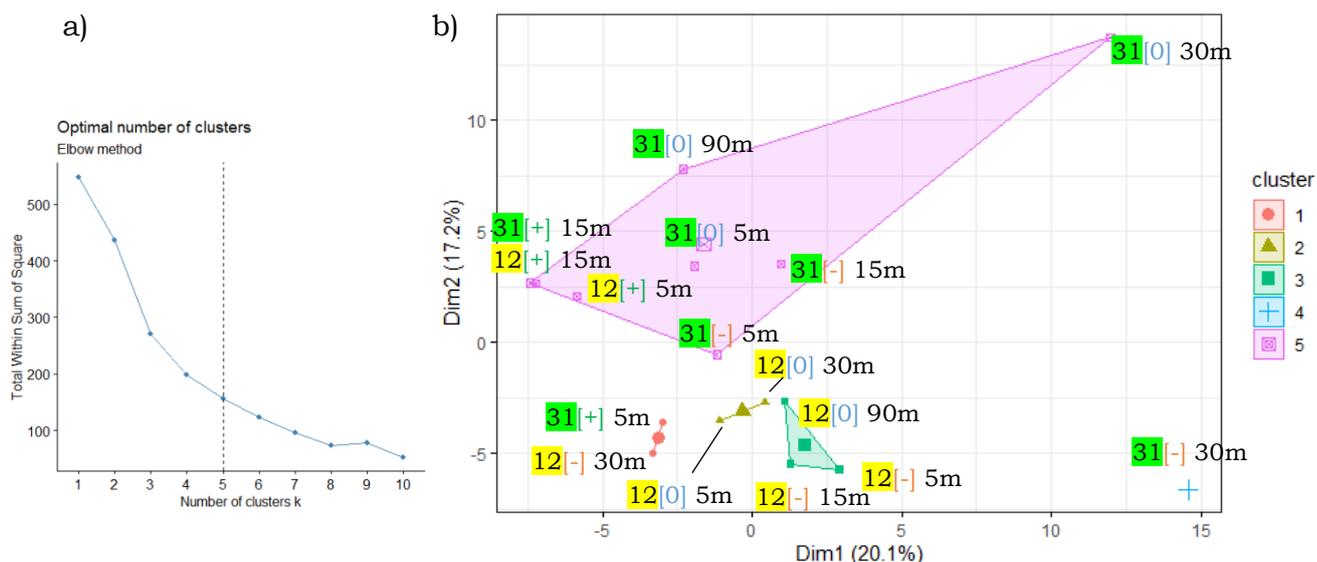


Figure 98 : a) méthode du coude , b) visualisation des clusters par la méthode des k-means, k = 5

Le résultat obtenu est représenté sur la Figure 98b. Nos échantillons (les différentes couronnes protéiques pour chaque type de SPIONs) ayant n variables (les

protéines), le k-means les représente sur un espace « tassé ». Nous verrons plus bas qu'il existe plusieurs techniques de réduction de dimensions. Le code utilisé dans ce paragraphe est trouvable en annexe : sont utilisés les fonctions `kmeans()` et `fviz_cluster()`. C'est `fviz_cluster()` qui permet d'obtenir les graphiques, en opérant une analyse en composante principale si le nombre de variable est supérieur à 2. Ce qui est ici le cas.

Nous avons choisi $k = 5$, sur la Figure 98b sont donc visibles les cinq clusters, avec chacun leur couleur. Ils sont de tailles inhomogènes, allant de l'échantillon seul (31(-) 30m), à un groupement de 8 échantillons (le cluster n°5 en rose). L'isolation de l'échantillon 31(-)30m n'est pas surprenante : il a été remarqué précédemment que sa reproductibilité était questionnable.

On remarque que ce code tend à illustrer un regroupement des échantillons en fonction de la taille du polymère pour les échantillons neutres et négatifs. Les clusters qui sont plus compacts et bien séparés indiquent généralement une meilleure structure de regroupement. On peut donc supposer avec ce graphique que la taille et la charge, quand elle est neutre ou négative, des polymères ont un impact sur la couronne protéique.

Le choix parfois difficile de k est une limite de cette méthode. La Figure 99, extraite d'un cours, est donnée à titre d'exemple et de comparaison. Elle illustre la courbe obtenue par la méthode du coude où le choix adéquat de k est clair : $k = 4$. A partir de $k = 4$, la variation d'inertie est linéaire. Dans notre cas (Figure 98a), la variation linéaire correspond à $k = 7$ ou $k = 8$. Mais alors, on décomposerait nos 16 échantillons en 8 groupes, ce qui peut être questionnable.

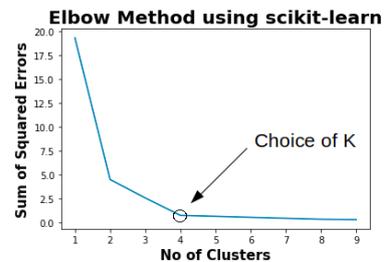


Figure 99 : méthode du coude, choix de k

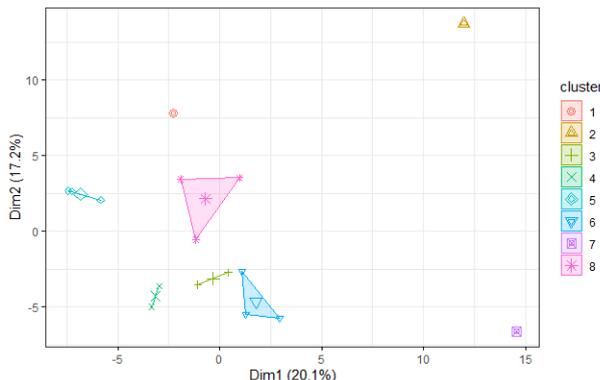


Figure 100 : visualisation des clusters par la méthode des k-means, $k = 8$

Le résultat pour $k = 8$ se trouve en Figure 100. Le placement des échantillons est identique à celui en Figure 98b). Les clusters retrouvés sont globalement les mêmes que dans le cas $k = 5$. Les échantillons 31(0) se retrouvent seuls, et les échantillons positifs ont tendance à se grouper, ignorant la taille du polymère (cluster n°5).

En plus de cette difficulté du choix de k , l'algorithme est très sensible aux points extrêmes (points qui sont loin de tous les autres) et aux groupes de tailles inhomogènes, et semble donc inapproprié pour nos échantillons. La classification Ascendante Hiérarchique (CAH) est une autre méthode de partitionnement de données qui est moins sensible aux valeurs aberrantes.

II.B.1.b) Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

La CAH (classification ascendante hiérarchique) est un autre type d'algorithme de clustering. Cette méthode est plus fine que les k-means car elle regroupe les objets

selon les distances les séparant entre eux alors que k-means utilise des distances point-centres ce qui nécessite de commencer par des centres choisis aléatoirement. L'avantage des k-means par rapport à la CAH est qu'il nécessite beaucoup moins de temps de calcul et d'espace mémoire. Il est donc préféré à la CAH pour de très grands jeux de données. Mais ce critère n'a aucun impact dans notre cas. Par ailleurs, à la différence des k-means, l'algorithme ne nécessite pas de fixer le nombre de clusters au préalable et ne dépend pas d'une initialisation aléatoire : les CAH sont des algorithmes déterministes.

La CAH procède ainsi :

- Initialisation : tous les individus constituent chacun un groupe.
- Itération : la distance entre chaque groupe est calculée. Les deux groupes les plus proches sont fusionnés et reliés, formant un nuage de point. L'itération se répète jusqu'à ce qu'il n'y ait plus qu'un groupe.

Il existe plusieurs CAH qui diffèrent par la méthode de calcul des distances (distance entre deux individus et distance/proximité entre deux nuages de points).

i. Ward

La méthode de Ward est la plus utilisée. Elle pondère la distance en fonction du nombre d'individus d'un groupe (= cluster). La distance de Ward entre deux clusters est égale au carré de la distance entre les barycentre (G) pondéré par le nombre d'individus (n) de chaque cluster :

$$D(Ward)_{cluster1, cluster2} = \frac{\|G_{cluster1} - G_{cluster2}\|^2}{\frac{1}{n_{cluster1}} + \frac{1}{n_{cluster2}}}$$

La CAH résulte en une arborescence appelée dendrogramme qui forme des groupes d'échantillons en fonction de leur similarité (qu'on appelle parfois « clade »). L'axe des ordonnées correspond à la mesure de la similarité. En abscisse se retrouvent les échantillons. Pour lire un dendrogramme, il faut se placer selon une ligne coupant l'axe y horizontalement. Plus on « coupe » bas plus les groupes sont similaires (mais plus nombreux). Quant à la hauteur des branches, plus elle est élevée, plus la différence est élevée. Le choix du nombre de clusters est subjectif.

En Figure 101 est présentée la classification hiérarchique obtenue avec l'algorithme de Ward pour les échantillons en fonction de la taille du polymère et Figure 102 tous les échantillons. (= nos individus).

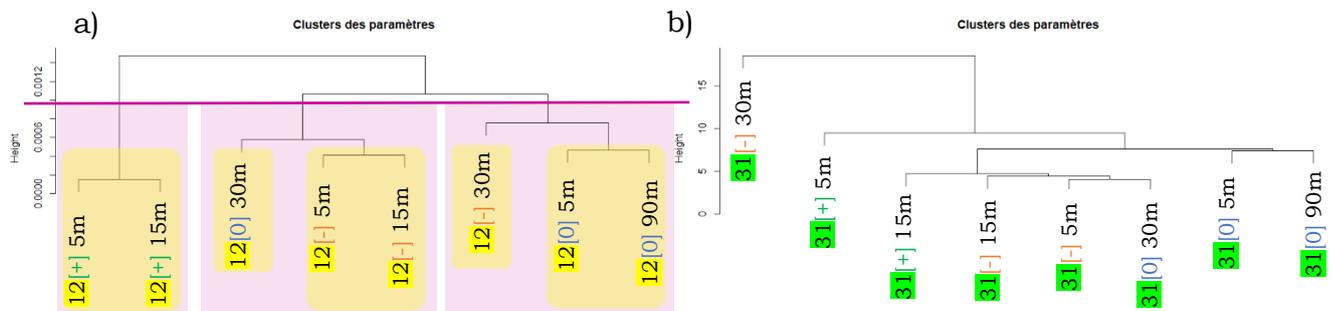


Figure 101 : classification hiérarchique selon la méthode de Ward des a) SPIONs 12kDa et b) SPIONs 31 kDa.

En prenant l'exemple de la Figure 101a sur les échantillons 12, la ligne violette coupe la partition en trois clusters (■). Dans ces conditions, le cluster des échantillons positifs se distingue des deux autres comprenant des échantillons neutres et négatifs. En coupant plus bas pour obtenir cinq clusters (■), les échantillons neutres se dégroupent des échantillons négatifs. Ces regroupements suggèrent que la charge du polymère a un impact sur la répartition des protéines de la HC, comme il l'a été démontré dans la littérature [163].

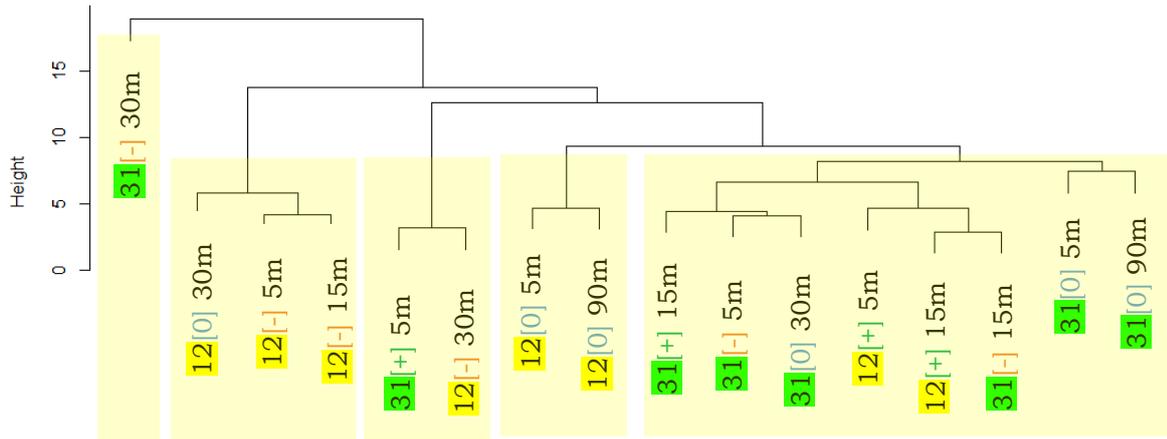


Figure 102 : classification hiérarchique selon la méthode de Ward des 16 échantillons.

En considérant tous les échantillons (Figure 102), il est observé que l'échantillon 31(-)30minutes peut être considéré comme aberrant, comme le supposait la méthode des k-means. En décomposant la partition en cinq clusters (■), les mêmes tendances que celles mises en avant par la méthode des k-means sont observées. La seule différence étant le cluster des 12(-) 5 et 15 minutes, groupé avec 12(0) 90m dans la méthode des k-means et avec 12(0) 30 min pour la CAH.

ii. Carte thermique (Heatmap)

La heatmap présentée précédemment (Figure 95) est une simple représentation graphique des valeurs des protéines, sans aucun traitement. La fonction heatmap() de R possède l'intérêt de pouvoir clustériser les données à la fois via les colonnes et via les lignes (paramètres et individus). En retraçant la heatmap avec les dendrogrammes, nous obtenons la Figure 103.

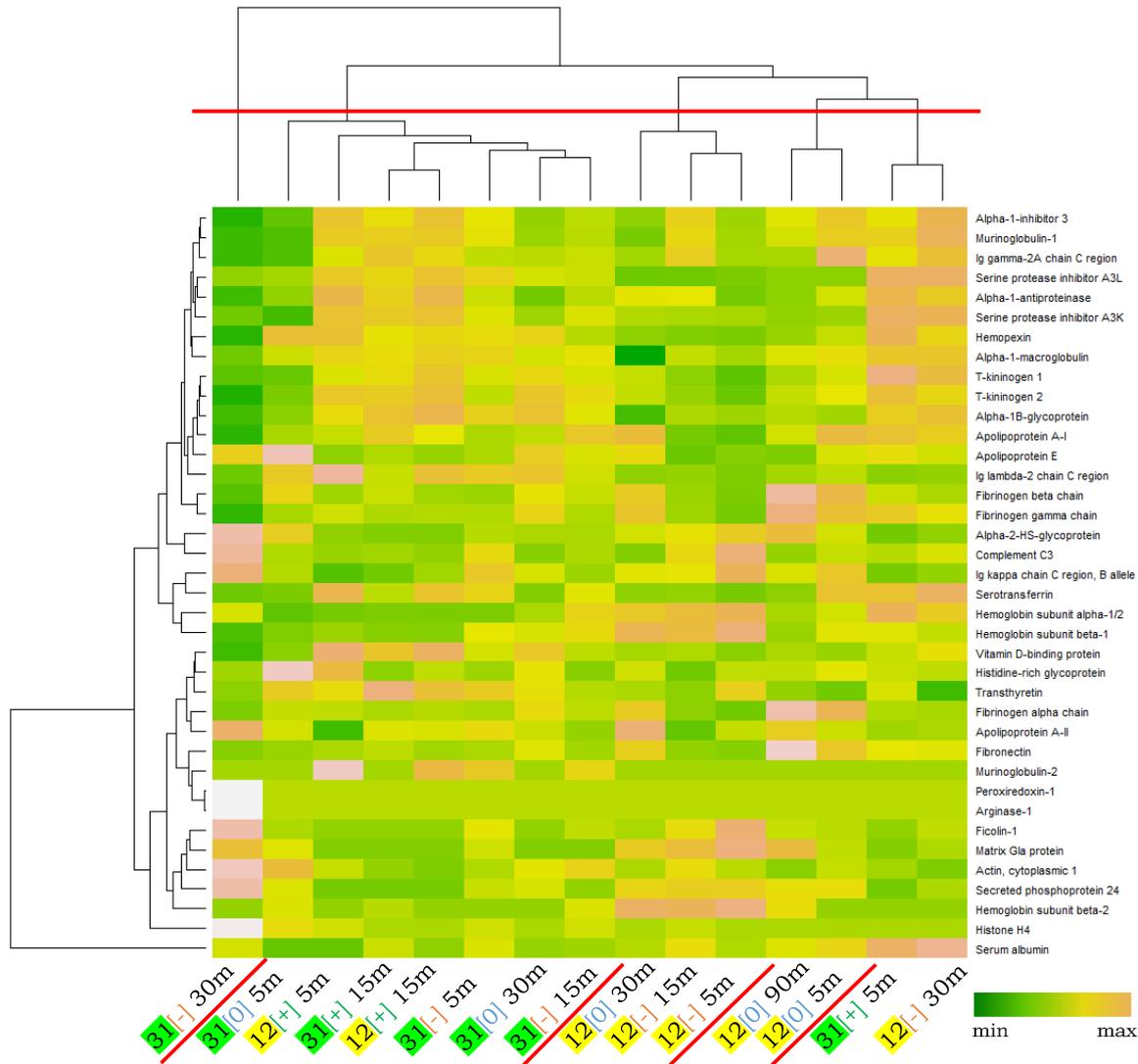


Figure 103 : Visualisation en carte thermique / dendrogrammes des TSC des 20 protéines les plus présentes.

La fonction heatmap() regroupe trois étapes :

1. Le calcul d'une matrice de similarité entre les lignes ou les colonnes. La distance euclidienne est ici utilisée. Dans un espace à n dimensions, on définit cette distance comme étant la racine carrée des carrés des différences de leur coordonnées.
2. La réorganisation des données via l'algorithme de classification ascendante hiérarchique (CAH).
3. La construction de la heatmap en elle-même avec l'attribution à chaque valeur d'une couleur appartenant à un nuancier.

La Figure 103 est la carte thermique dressée à partir des données des 20 protéines les plus présentes. La Figure 104 présente la carte thermique avec l'intégralité des protéines. Les dendrogrammes des deux figures varient très peu : si l'on regarde au niveau de la répartition en cinq clusters (lignes rouges), la prise en compte de toutes les protéines met seulement en évidence une différence pour les 12(0) et 12(+).

La heatmap est donc un outil possédant l'avantage de regrouper à la fois les CAH réalisées selon les individus et les observations et d'en identifier les clusters. Elle permet par ailleurs de visualiser intuitivement les grands jeux de données, avec l'utilisation d'un nuancier qui permet de repérer rapidement les tendances et les variations dans les données.

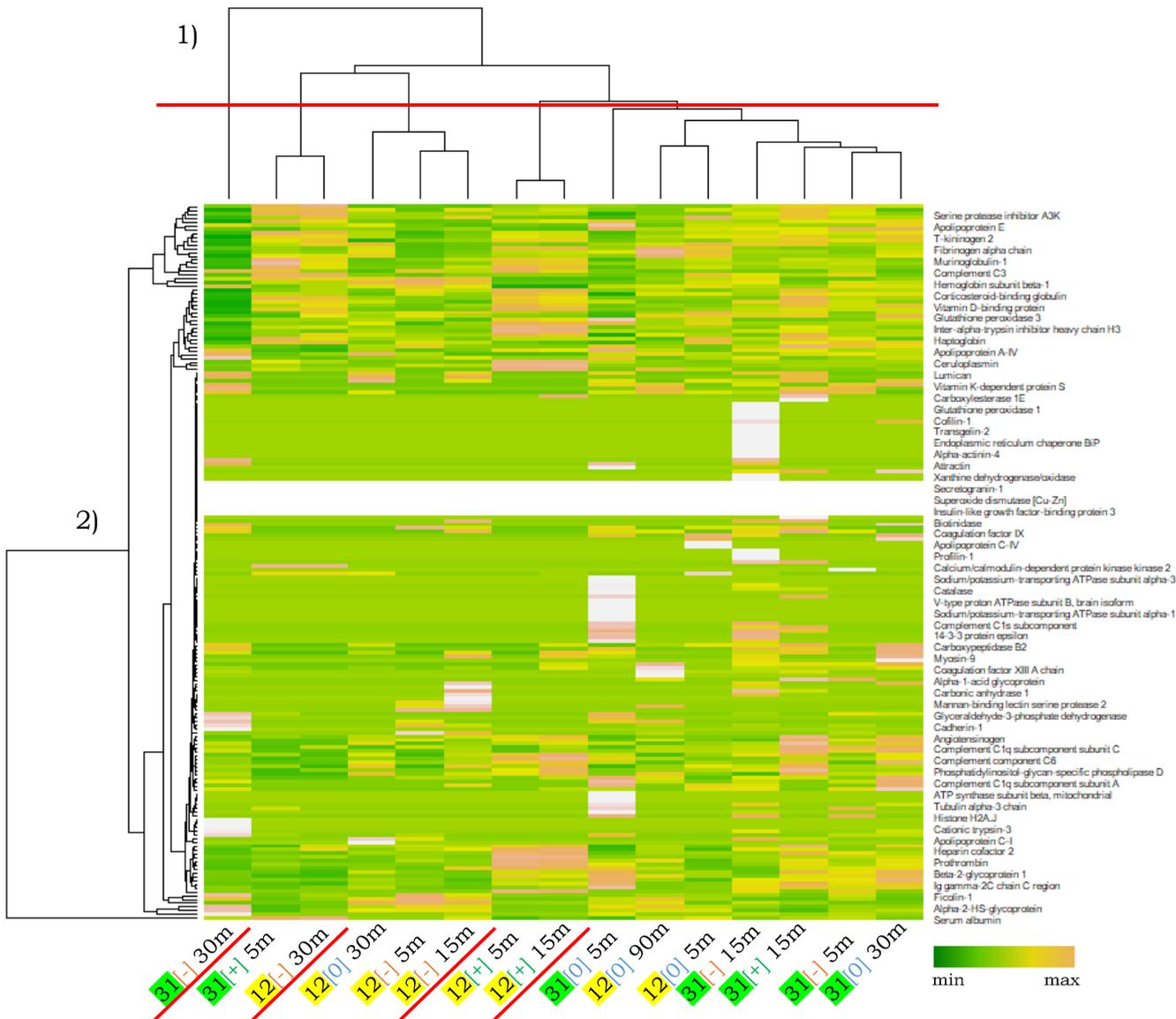


Figure 104 : Visualisation en carte thermique / dendrogrammes des TSC avec 1) clustering des données protéomiques basés sur le type de chimie de surface, 2) clustering des données protéomiques basés sur les protéines.

II.B.2. Réduction de dimension

On peut mentionner deux techniques de réduction de dimensions : le positionnement multidimensionnel (MDS) et l'analyse en composantes principales (PCA).

Le but d'une MDS est d'établir une représentation 2d ou 3d des individus afin de visualiser les similitudes entre eux. Avec n variables, la carte tracée a n dimensions. Le but d'une MDS est de réduire ce nombre de dimensions pour arriver à une représentation 2d (d'où le l'expression « réduction de dimensions »). Pour ce faire, l'algorithme part d'une matrice de similarité (ou de distance) et place les points successivement et les réajuste afin de minimiser la « fonction de coût », où fonction de stress. Il existe différentes fonctions de stress résultant en différents type de MDS. Ici, le type « classique » est choisi. La fonction de stress est donc [164], [165] :

$$\delta_{ij} = d_{ij} = \left[\sum_{k=1}^r (x_{ik} - x_{jk})^2 \right]^{1/2}$$

$$Stress = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N (d_{ij} - \delta_{ij})^2}{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \delta_{ij}^2}}$$

Où δ_{ij} est la dissimilarité entre deux points i et j dans l'espace original à n dimension, d_{ij} la distance euclidienne entre deux points i et j dans l'espace réduit, x_{ik} et x_{jk} sont les coordonnées des points i et j selon les k dimensions de l'espace original, r le nombre de dimensions, i et j variant de 1 à N, N le nombre de points du jeu de données.

En Figure 105 et en Figure 106 sont illustrées les MDS effectuées sur nos données. Les échantillons sont regroupés par la taille du polymère, supposant que ce paramètre prévaut sur sa charge (Figure 105). En Figure 106, pour une même taille de polymère, les échantillons positifs tendent à se grouper, et les neutres et négatifs à former des groupes ne tenant pas compte des charges. La MDS des 31kDa reste biaisée par les 31(-) 30 minutes.

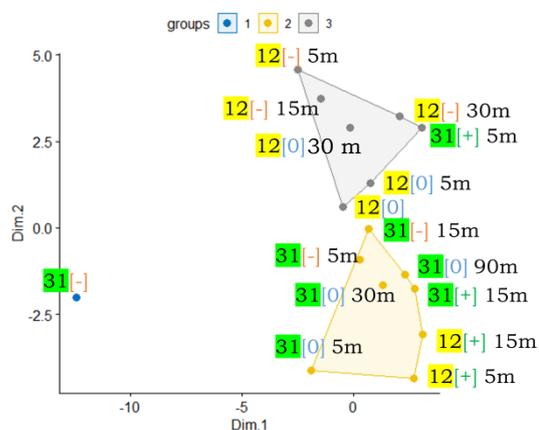


Figure 105 : Positionnement MDS classique et application de la méthode des k-means (k = 3)

Le résultat est similaire aux graphiques présentés dans le paragraphe de la méthode des k-means (Figure 98) : le but de la MDS est de mesurer et visualiser les similitudes, tandis que la méthode des k-means cherche à regrouper les sujets. Les deux méthodes sont donc complémentaires et la fonction k-means est effectuée à la suite de la MDS.

On rappelle ici que dans le paragraphe des k-means, la méthode de réduction de dimensions intégré à la fonction de traçage du graphique en est une autre, la PCA (Analyse en Composantes Principales).

L'objectif de la PCA est d'afficher les positions relatives des points de données dans un espace de dimensions réduit tout en conservant autant d'informations que

possible, *et* d'explorer les relations entre les variables dépendantes (= déterminer quelles variables sont liées). C'est cette méthode qui a été conduite par R. Safavi-Sohi et qui est utilisée dans l'article insérée plus bas. La principale différence fondamentale entre la MDS et la PCA est qu'une MDS commence par une mesure des similarités (ou des distances) résultant en une matrice de laquelle on va tirer une représentation alors que la PCA part d'une représentation spatiale que l'on vient « écraser ».

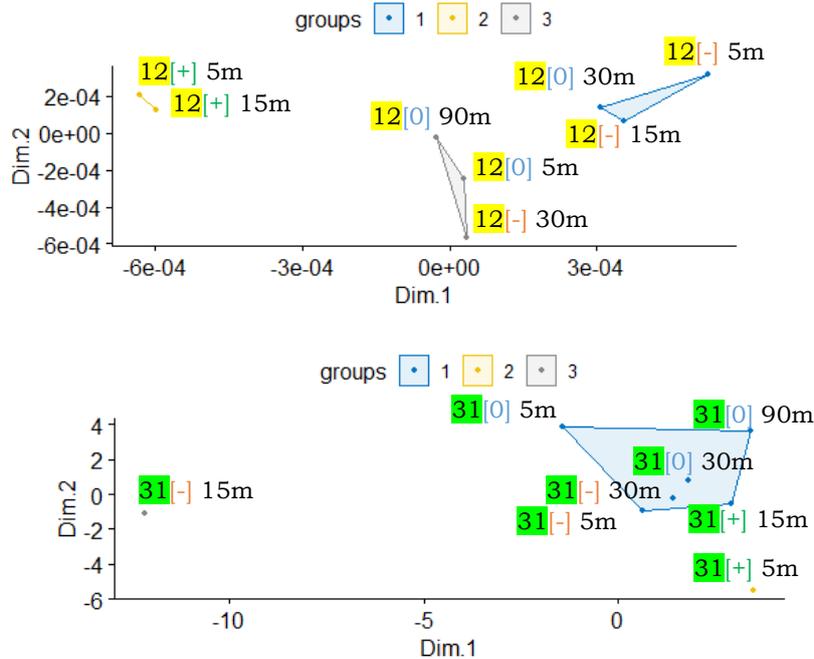


Figure 106 : MDS des échantillons conduite selon la taille des polymères

II.B.3. Bilan

Sans entrer dans les calculs mathématiques, plusieurs outils statistiques ont donc été présentés : les méthodes de l'algorithme de Ward et les k-means relevant du partitionnement de données, et la réduction de dimensions (Figure 107). Les techniques de partitionnements de données permettent de regrouper les échantillons selon leurs similarités. Les réductions de dimensions sont des techniques dites d'ordination : elles permettent de représenter graphiquement les relations et les structures entre les observations ou les variables (trop nombreuses) afin de mieux comprendre la variabilité des données. Ces méthodes sont donc souvent complémentaires, et il est intéressant par exemple d'effectuer une PCA sur les données avant de procéder à une CAH.

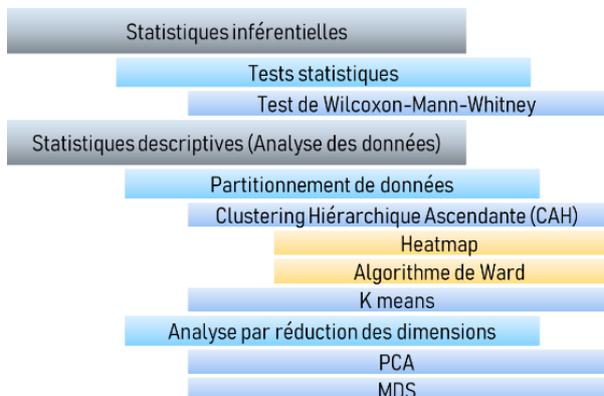


Figure 107 : différentes approches de traitements de données abordées dans ce chapitre

III. Etude de l'impact *in vivo* de la couronne protéique de SPIONs sur leur biocirculation : article

ACS NANO

www.acsnano.org

Identification of the Proteins Determining the Blood Circulation Time of Nanoparticles

Cintia Marques,^{*,†} Mohammad Javad Hajipour,^{*,†} Célia Marets, Alexandra Oudot, Reihaneh Safavi-sohi, Mélanie Guillemain, Gerrit Borchard, Olivier Jordan, Lucien Saviot, and Lionel Maurizi^{*}

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c02041>

Read Online

ACCESS

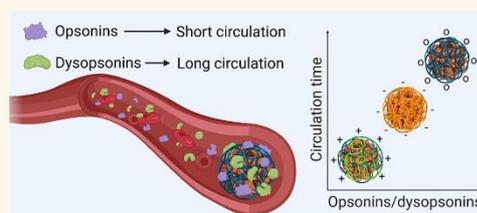
Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: The therapeutic efficacy and adverse impacts of nanoparticles (NPs) are strongly dependent on their systemic circulation time. The corona proteins adsorbed on the NPs determine their plasma half-lives, and hence, it is crucial to identify the proteins shortening or extending their circulation time. In this work, the *in vivo* circulation time and corona composition of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) with different surface charges/chemistries were analyzed over time. SPIONs with neutral and positive charges showed the longest and shortest circulation times, respectively. The most striking observation was that corona-coated NPs with similar opsonin/dysopsonin content showed different circulation times, implying these biomolecules are not the only contributing factors. Long-circulating NPs adsorb higher concentrations of osteopontin, lipoprotein lipase, coagulation factor VII, matrix Gla protein, secreted phosphoprotein 24, alpha-2-HS-glycoprotein, and apolipoprotein C-I, while short-circulating NPs adsorb higher amounts of hemoglobin. Therefore, these proteins may be considered to be determining factors governing the NP systemic circulation time.

KEYWORDS: nanoparticle, protein corona, blood circulation time, opsonin, dysopsonin



INTRODUCTION

Nanotechnology has the potential to revolutionize medicine and overcome the challenges associated with the current therapeutic and diagnostic approaches.^{1–5} Thanks to their small size, high surface-to-volume ratio, ease of synthesis and modification, and capability to pass through biological barriers, nanoparticles (NPs) are considered candidates for the delivery of drugs or contrast agents to cells/tissues of interest in the animal/human body.⁴ However, the application of NPs in medicine is often challenged by the biomolecular corona.⁶ NP surfaces are immediately covered by layers of biomolecules called the biomolecular/protein corona when they enter the human/animal body and are exposed to biological media (e.g., blood, lymphatic fluid).^{7–10} The biomolecules adsorbed onto the NPs change their physicochemical properties and give them a new biological identity that is different from their synthetic identity.^{11–13} Depending on the individual corona composition and its composition, the corona-coated NPs show different behaviors.^{14–17} For example, the biomolecular corona may affect the pharmacokinetics of NPs such as plasma half-life and distribution.¹⁸ Among the biomolecules adsorbed on NPs, opsonins, such as complement factors and/or immunoglobulins (IgG), mediate NP binding to macrophages and phagocytes, and therefore, NP clearance is increased. Albumin, histidine rich

glycoprotein, clusterin, Apo J, Apo A4, and Apo C3, on the contrary, prolong the blood circulation time of NPs, acting as a dysopsonin.^{19–21} Therefore, the retention time of NPs in blood circulation is dependent on the proteins adsorbed onto their surfaces.²² To improve the diagnostic and therapeutic efficacy of NPs, their retention time in blood circulation is of great importance. NPs with longer blood circulation times have a higher probability of being accumulated in cells/tissues of interest, but to do so, NPs must escape from phagocytes of the reticuloendothelial system (RES). Strategies to escape immune recognition and prolong NP circulation time include allowing NPs to hitchhike on cell membranes, the NP to be coated with a cell membrane cloak, and the NP to be coated with poly(ethylene glycol) (PEG), polysaccharides, zwitterionic structures, or other hydrophilic polymers.^{23–26} NPs coated with the mentioned polymers successfully reduce protein

Received: March 3, 2023

Accepted: June 21, 2023

ACS Publications

© XXXX American Chemical Society

A

<https://doi.org/10.1021/acsnano.3c02041>
ACS Nano XXXX, XXX, XXX–XXX

adsorption; however, the biomolecular corona can still be detected.²⁷ Since corona decoration determines NP blood circulation half-life,²² it is crucial to better understand which proteins could bind NPs to modulate clearance/retention time under *in vivo* conditions. The opsonins and dysopsonins, which have been introduced as key determinants of NP circulation time, are dominantly adsorbed onto the surface of NPs. However, NPs show different circulation times in the animal body. Based on this evidence, we hypothesized that there should be some proteins that could strongly govern the NP retention time and have not yet been recognized. To check this hypothesis, superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) were coated with polyvinyl alcohol (PVA) of different molecular weights (12 and 31 kDa) exhibiting different terminal groups at their surface: hydroxyl (OH), carboxyl (COOH), or amino (NH₂) end groups. The different functional groups yielded NPs with, respectively, neutral ([0]), negative (−), and positive (+) charges. We tracked the NP circulation times and their corona compositions over time upon intravenous (iv) injection in rats. Reproducibility and repeatability of the experiments were assessed, and using this strategy, we identified proteins that may be involved in the modulation of blood circulation time of NPs.

RESULTS AND DISCUSSION

NP Synthesis and Characterization. SPIONs with an average diameter of 8 nm were synthesized by coprecipitation (Table 1 and Figure S1a). The hydrodynamic diameter of naked

Table 1. Physicochemical Properties of SPIONs Coated with PVA of Different Molecular Weights and Functional Groups in 0.15 M NaCl at pH 7.4 (pH 3 for Naked SPIONs)^a

naked SPIONs physicochemical characterizations					
NP name	pH	dTEM (nm)	dH intensity (nm)	zeta potential at pH 7.4 (mV)	PDI
naked	3	8	71	+2 ± 2	0.142 ± 0.007
SPIONs–PVA physicochemical properties					
NP name	functional group	molecular weight (kDa)	dH intensity (nm)	zeta potential (mv)	PDI
12+	NH ₂	12	156	+5 ± 1	0.191 ± 0.017
12 [0]	OH		124	0 ± 1	0.171 ± 0.053
12−	COOH		144	−4 ± 1	0.156 ± 0.024
31+	NH ₂	31	147	+6 ± 1	0.159 ± 0.018
31 [0]	OH		126	0 ± 1	0.134 ± 0.007
31−	COOH		146	−3 ± 1	0.142 ± 0.015

^aDiameter obtained by TEM (dTEM); hydrodynamic diameter (dH).

SPIONs was around 70 nm in intensity, proving that the elemental crystallites aggregated during the synthesis process into small packed NPs as seen in Table 1 and Figure S1a. Naked SPIONs are also neutral in physiological conditions.

SPIONs were coated with 12 and 31 kDa PVA to prepare SPIONs–PVA with different polymer packings and charges due to the different molecular weights of PVA (Table S1). After coating with PVA, the NP hydrodynamic size increased to more than 100 nm, and SPIONs are still a little bit aggregated into small NP packs as seen on the TEM picture in Figure S1b,c. PVA, which is commonly applied as a surfactant, is known to adsorb nonspecifically onto SPIONs through hydrogen

interactions. Thus, polymer adsorption onto the SPION core is a result of not only SPIONs–PVA interaction but also PVA–PVA interaction, leading to similar sizes of PVA coated-SPIONs (12 kDa vs 31 kDa). This behavior differs from other polymers, such as PEG, which tends to form brush-like structures, resulting in a more direct MW-size dependency. Thus, despite the SPIONs–PVA charges being tuned with the different PVAs, their hydrodynamic diameters were not influenced by the molecular weights of the PVAs. Size is an essential factor in the development of long-circulating NPs. NPs with a size of less than 10 nm are rapidly cleared from blood circulation by renal excretion. Larger NPs, which avoid renal excretion, are mainly removed by opsonization. For example, NPs with a size of 240 nm are cleared faster than those with a size of 60 or 80 nm.^{28,29} Therefore, the size of long-circulating NPs should be between 10 and 200 nm to be small enough to escape from opsonization and RES uptake and large enough to not be removed by renal filtration. Based on this assumption, the synthesized SPIONs–PVA appear to fit for the purpose of studying NP circulation time.

NP surface modification with different types of polymers (polysaccharides and PEG) is an efficient strategy to reduce the NP hydrophobicity and charge density, both of which are triggers of opsonization.²⁹ In some cases, however, the polymers prevent opsonization while activating the complement system. Therefore, the type of polymer used for surface coating and the surface charge should be carefully considered. The physicochemical properties (size, charge, and polydispersity index (PDI)) of NPs used in this study are listed in Tables 1 and S2). The adsorption of proteins on the NP surfaces increased their size and PDI. As shown in Table S2, FBS has a high PDI of around 0.447, due to the different proteins that can be found and potential protein aggregation. After incubation, the FBS polydispersity contributes to the increase of the PDI compared to that of the NPs alone. Proteins also changed the zeta potentials of SPIONs–PVA to negative values. Statistically, positively charged SPIONs–PVA have a lower zeta potential than the neutral ones, which also have a lower zeta potential than the negatively charged NPs. Figure S2 shows the DLS measurements, from which we can conclude that FBS incubation did not lead to NP aggregation.

NP Circulation Time. To determine the systemic circulation time of SPIONs–PVA with different molecular weights and surface chemistry, the NPs were administered to rats by tail–vein injection, and then, blood samples were collected at different times (5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, or 120 and 120 or 240 min) depending on the SPION concentrations over time (more details of the protocols are in the SI). As different routes of injection can affect the blood circulation time, biodistribution, and corona decoration, all the NPs were injected by the tail vein and in a similar manner.

The data obtained from this analysis (Figure 1) showed that SPIONs–OH (neutral charge) had the longest circulation time with a 90 min half-life. SPIONs–NH₂ (positive charge) had the shortest circulation time and were cleared after 15 min. The SPIONs–COOH (negative charge) plasma half-life is 30 min. Studies suggest that NPs over 100 nm are mainly eliminated by the liver, spleen, and mesenteric lymph nodes.^{30,31} In accordance with this, our previous study has shown that, after 15 min, positive SPIONs–PVA are mainly found in the liver, while negative and neutral NPs are found in the serum.³² In addition, the percentage of PVA-coated SPIONs found in the spleen was low, suggesting that these NPs are mainly eliminated

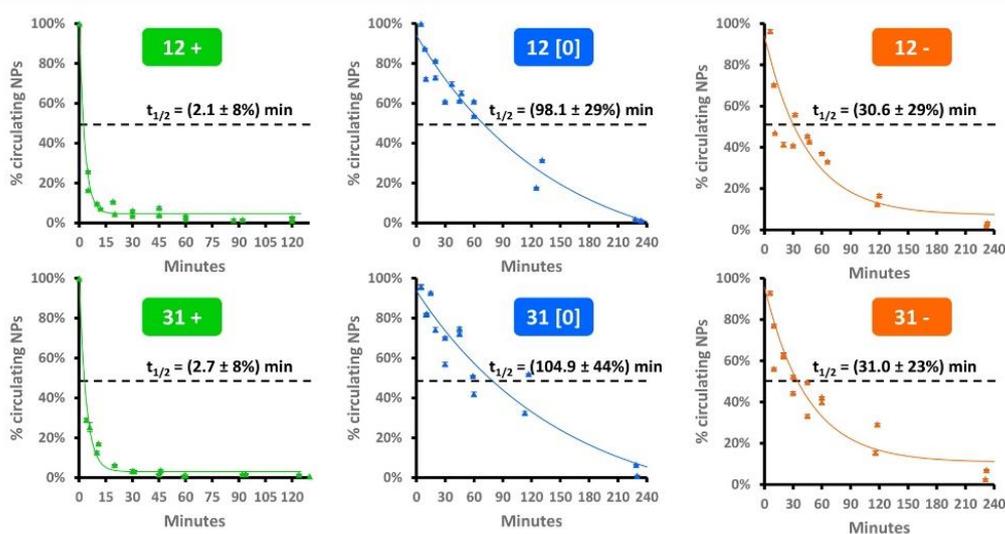


Figure 1. Systemic circulation time of the different SPIONs–PVA injected in the rat blood stream. The half-lives and their standard deviation (given as a percentage of the mean values) were obtained by fitting the points taking into account their uncertainties (duplicate experiments, triplicate analyses).

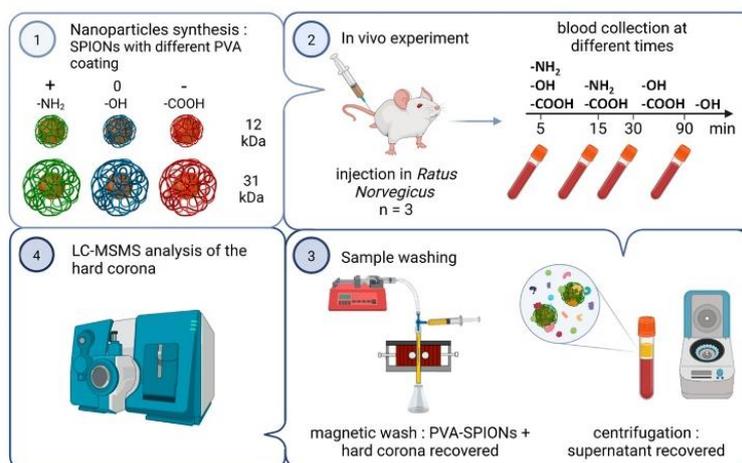


Figure 2. Schematic representation of the study workflow.

through hepatic clearance. Tsoi et al.³⁰ demonstrated that hepatic clearance of NPs over 100 nm happens due to Kupffer cell and B cell phagocytosis in the liver, which was correlated with ligand density on the NP (such as corona proteins) and not necessarily with NP surface chemistry. The desired surface chemistries and charges reported for extending the NP retention time in blood circulation and/or preventing rapid NP clearance or accumulation in off-target organs are different for various NPs. For example, neutral and negatively charged PEG–PDLLA micelles showed similar circulation times while neutral and positively charged liposomes had a longer retention time compared to negatively charged ones.^{33,34} The researchers believe that contradictions in available reports might be related to the differences in the composition, physicochemical properties, and surface chemistry of NPs. Any change in NP properties can affect the biomolecule adsorption on the NPs and the consequent corona composition and content. According to our

hypothesis, differences in NP systemic circulation times might be related to differences in corona decorations on their surfaces. SPIONs–PVAs showed different circulation times, which seem to be dependent on their surface charge/functional group (Figure 1) but not on the PVA's mV. The zeta potential values of all NPs were almost similar (−3.9 to −7.5) after the formation of protein corona on their surfaces (Tables 1 and S2). This implies that the retention time of NPs in the blood circulation system is governed by protein corona decoration dictated by the NP surface charge/functional group.

Therefore, we identified the proteins adsorbed onto the NPs at different time points. After tail vein injection of NPs, the blood samples were collected at different time points and centrifuged, and then, the obtained plasma fractions were passed through a hollow magnetic device to isolate NP/protein complexes. At the final step, the biomolecules adsorbed onto the NPs were identified by LC-ESI-MS/MS (Figures 2 and S3, $n = 3$).

C

<https://doi.org/10.1021/acsnano.3c02041>
ACS Nano XXXX, XXX, XXX–XXX

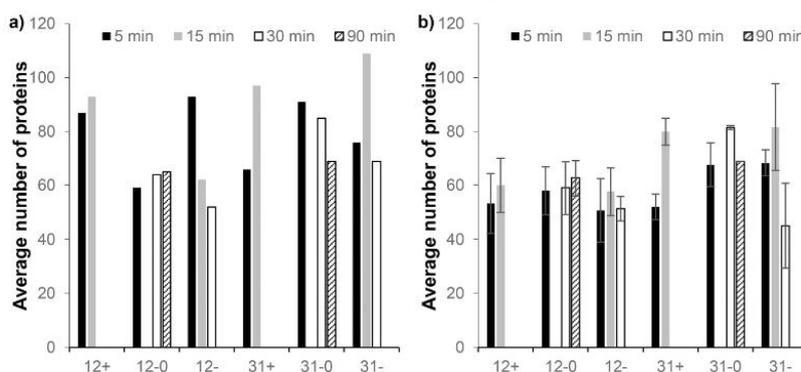


Figure 3. (a) Number of all different proteins identified by LC-ESI-MS/MS at each time point and condition and (b) average number of identified proteins at each time point and condition with error bars (duplicate experiments, triplicate analyses).

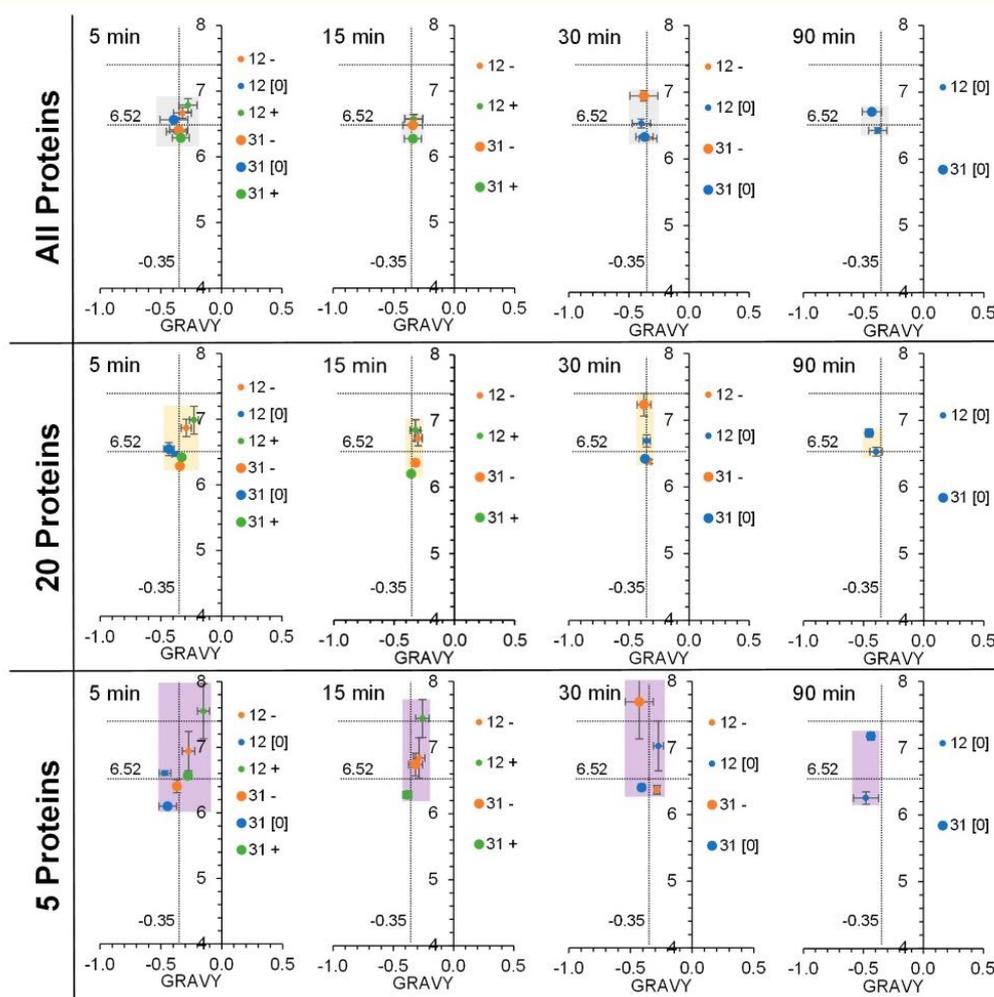


Figure 4. Comparison of the pI and GRAVY of (a) total proteins, (b) 20 most abundant proteins, and (c) 5 most abundant proteins adsorbed on the NPs over time. Squares represent the distribution of pI and GRAVY for each condition.

Identification of Proteins Adsorbed on the NPs over Time. To identify the proteins determining the NP circulation time, the corona compositions of NPs collected over different

time points (chosen on the basis of pharmacokinetic properties of each NP) were characterized using LC-ESI-MS/MS. All samples have been weighted in mass of SPIONs to be able to

D

<https://doi.org/10.1021/acsnano.3c02041>
ACS Nano XXXX, XXX, XXX–XXX

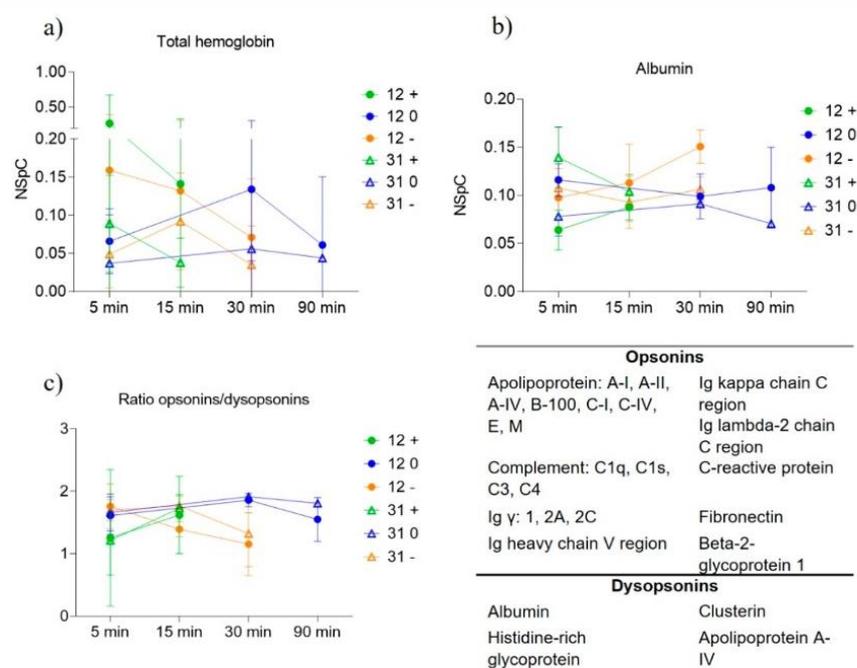


Figure 5. Concentration changes of (a) hemoglobin and (b) albumin adsorbed on the NPs over time. (c) Ratio of opsonins/dysopsonins adsorbed on the NPs over time. Total hemoglobin corresponds to the sum of NSpC of the hemoglobin subunit alpha-1/2, hemoglobin subunit beta-1, and hemoglobin subunit beta-2.

compare and quantify each condition studied. The corona compositions of negatively charged NPs collected 5, 15, and 30 min after tail vein injection were identified, and those of positively charged NPs obtained 5 and 15 min after injection were studied. In the case of neutral SPIONs, thanks to their long circulation time, the corona compositions of NPs collected 5, 30, and 90 min after injection were identified (Table S3). SPIONs–PVA protein coronas were composed of 60 to 130 proteins (Figure 3a,b), in contrast to previous studies³⁵ where negatively charged NPs adsorbed less of different types of proteins compared to neutral and positive SPIONs–PVA. It is worth noticing that the 5 and 20 most abundant proteins correspond to approximately 30% and 60% of the total mass of detected proteins, respectively (Tables S4–S11). Thus, approximately only one-fifth of the detected proteins corresponds to 60% of the total amount of the protein corona. Similar trends were identified in previous studies by Sakulku et al.^{32,35} where the 5 most abundant proteins correspond to between 20% and 60% of the total proteins detected, which emphasizes their significance to NP pharmacokinetics.

To understand how the NP surface properties (charge and PVA molecular weight) influence the overall protein corona, we considered the physicochemical properties of each adsorbed protein. Namely, the grand average of the hydrophobicity (GRAVY) score and isoelectric point (pI) of each detected protein was weighted according to their Normalized Spectral Count (NSpC), and an overall value of GRAVY and pI was calculated (Figure S4). The GRAVY and pI of all proteins present in the protein corona are almost similar. This is due to the combination of two factors: the numerous proteins detected (of around 100 proteins per NP and time point (Figure 3a,b) and the physicochemical properties of those proteins. If we consider

all time points and all NPs studied, we were able to identify 189 different proteins with an average GRAVY of -0.35 ± 0.26 and an average pI of 6.55 ± 1.47 (Figure S5). These values are very similar to those presented in Table S13. This suggests that most proteins found on the protein corona have similar physicochemical characteristics, regardless of the NP size, charge, and polymer MW.

In addition, the same rationale was applied for the 20 and 5 most abundant proteins found in the protein corona, since they corresponded to 60% and 30% of the total mass of detected proteins, respectively, as mentioned above (Figures 4 and S6). These analyses showed that the GRAVY (hydrophobicity value) score of corona proteins adsorbed on all NPs changes over time. It indicates that the hydrophobicity/hydrophilicity of corona proteins formed on the NPs is dynamic and varies with time. Similarly, the pI (the pH at which the net charge of protein molecules is zero) of coronas formed on all NPs also changes with time. Depending on their charge and polymer length, NPs showed different trends of pI and GRAVY. Any alteration in GRAVY and pI of corona proteins is related to the corona protein composition and content changes resulting from protein attachment, detachment, and replacement over time.

The changes are more evident when focusing on the 5 most abundant proteins, with 12+ NPs presenting the highest pI and GRAVY of 7.5 and -0.15 , respectively (Figure 4). Albumin is by far the most abundant protein in rodent plasma, accounting for almost 50% of plasma proteins.³⁶ It is usually the most abundant protein in the corona, as shown in Tables S4–S11, with the exception of 12+ NPs at 5 min, where hemoglobin (Hb) is the most abundant protein. We suggest the high rate of adsorption of Hb on 12+ NPs might be related to their faster clearance. Focusing on the 31+ NPs, also eliminated after 15 min, the

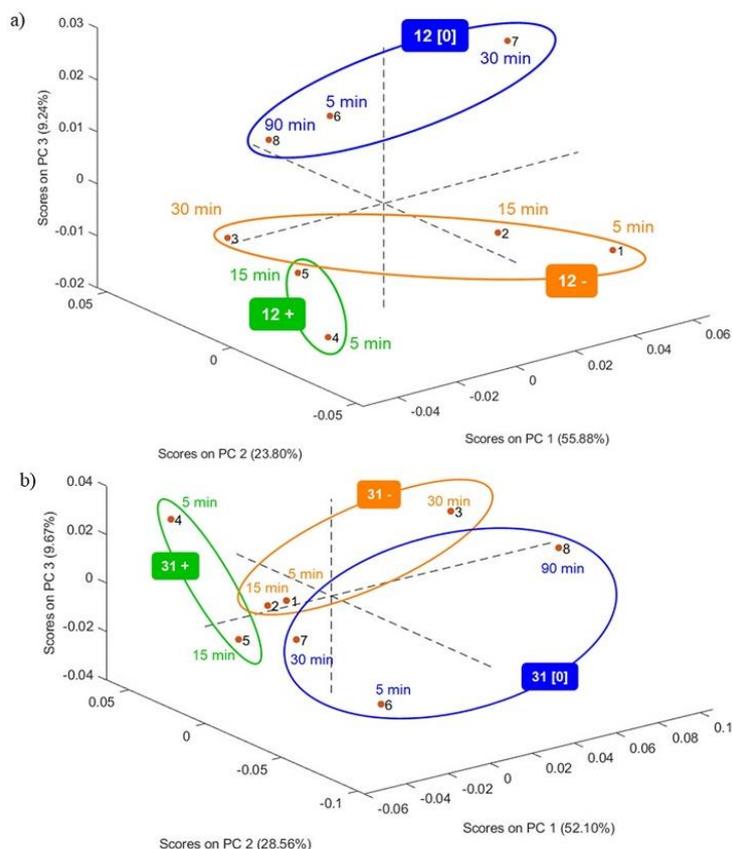


Figure 6. (a) PCA profile of different coronas formed on the SPIONs–PVA 12 kDa negative at 5 min (1), 15 min (2), and 30 min (3), SPIONs–PVA 12 kDa positive at 5 min (4) and 15 min (5), and SPIONs–PVA 12 kDa neutral at 5 min (6), 30 min (7), and 90 min (8). (b) PCA profile of different coronas formed on the SPIONs–PVA 31 kDa negative at 5 min (1), 15 min (2), and 30 min (3), SPIONs–PVA 31 kDa positive at 5 min (4) and 15 min (5), SPIONs–PVA 31 kDa neutral at 5 min (6), 30 min (7), and 90 min (8).

influence of Hb on GRAVY and pI is not so clear, but hemoglobin is the second most adsorbed protein at 5 min (Table S8). Figure 5a displays the evolution of hemoglobin over time, showing a higher adsorption of Hb onto positive SPIONs–PVA, though it also shows a high adsorption of the protein onto 12– NPs.

Hb interaction with NPs depends on H-bonding and hydrophobic and electrostatic interactions.^{37–40} Focusing on electrostatic interactions, it has been shown that negatively charged NPs interact with Hb, leading to reversible changes on its secondary structure and preserving its functionality.³⁹ However, Hb interaction with positively charged NPs leads to heme degradation and promotes NP aggregation.^{38,40} Hb-induced NP aggregation may accelerate the NP clearance from the blood circulation system. Heme degradation induces the production of reactive oxygen species and inflammatory mediators and activates innate immune cells such as macrophages and neutrophils.⁴¹ Thus, even though both negative and positive NPs have an affinity to hemoglobin (Figure 5a), positive NPs–hemoglobin complexes might stimulate the immune system following heme degradation.

In addition, haptoglobin is an acute phase protein that controls oxidative and inflammatory damages caused by free hemoglobin in the blood.^{42,43} This protein forms a complex with

hemoglobin, which is then recognized by monocytes and macrophages.^{42,43} Figure S7 illustrates the evolution of haptoglobin overtime. While 12+ NPs adsorbed the highest amount of hemoglobin overtime (Figure 5a), 31+ NPs have the most haptoglobin that may bind to hemoglobin and stimulate NP clearance by immune cells.

It is possible that the combination of Hb with other proteins affects the NP circulation time, and other corona proteins strengthen or weaken the impact of Hb on shortening the NP retention time. Therefore, different corona compositions of negatively and positively charged NPs might influence the effects of proteins governing the NP circulation time. The protein structural changes caused by NPs can also affect their impact on the NP circulation time. Further studies are required to understand the mechanism by which corona proteins extend or shorten NP retention in blood circulation.

Previous studies with similar NPs also suggested a higher absorption of Hb onto positively charged NPs (Table S12), particularly in an *in vivo* study involving Lewis rats where hemoglobin was the most abundant protein found in SPIONs–NH₂ hard corona.⁴⁴ Additionally, it showed that, after 15 min, about half of the injected NPs were found in the liver, supporting the finding that SPIONs–NH₂ have a fast clearance. Finally, Table S12 shows that hemoglobin was detected on the protein

corona of the PVA-coated SPIONs incubated with FBS.³⁵ This is particularly important since it demonstrates an affinity between hemoglobin and positively charged NPs, and this hemoglobin abundance is not related to red cell hemolysis. Hemoglobin is abundant on the PVA-coated SPIONs. Further studies are required to understand the mechanism behind their interaction.

The adsorption of proteins onto the NP surface is a dynamic and competitive process. Hence, corona decoration may change over time. Tenzer et al.⁴⁵ showed that only the content/amount of proteins adsorbed on the NP surface changes over time; thus, the composition/type of corona proteins is invariable. As mentioned before (Figure 4), the differences between physicochemical properties of NP protein corona (GRAVY and pI) are more evident for the 5 most abundant proteins. Those become less clear for the 20 most abundant proteins, while almost no differences can be found when considering all of the proteins in the corona. In fact, the total protein GRAVY and pI tends to -0.35 and 6.52 , respectively, independent of the charge, polymer MW, or time point (Figure 4a and Table S13), which is in agreement with the findings by Tenzer et al.⁴⁵ Plus, this supports that any changes in corona protein content affect the biological impacts of NPs. Therefore, it is important to evaluate the amount of protein adsorbed on the NPs over time.

Some proteins, such as albumin, fibrinogen, complement factors, immunoglobulin, apolipoproteins, and serotransferrin, are dominantly adsorbed on the surface of most NPs entering biological media. Most of these proteins are opsonins/dysopsonins, which determine the retention time of NPs in blood circulation (Figure 5c). We calculated the number of these proteins on the NP surface over time. According to the data obtained from LC-ESI-MS/MS analysis, the content of proteins (albumin, fibrinogen, complement factors, immunoglobulin, apolipoproteins, and serotransferrin) adsorbed onto the long- and short-circulating NPs was not significantly different (Figures 5 and S8). Therefore, it is required to recognize the unknown biomolecules governing the NP circulation time.

Principal Component Analysis (PCA). Although different NPs had similar opsonin/dysopsonin contents, their blood circulation times were different. Therefore, it is possible that some NP-bound proteins, which have not yet been identified as key determinants of NP circulation time, govern the retention time of NPs in the blood circulation system. This hypothesis was confirmed by calculating the ratio of opsonins/dysopsonins adsorbed onto the NPs. As can be seen in Figure 5c, the ratio of opsonins/dysopsonins adsorbed onto the neutral NPs was higher than that of negatively and positively charged NPs, and hence, it is expected that neutral NPs show the shortest blood circulation time. In contrast to what was expected, neutral NPs showed the longest blood circulation time, which suggests that unknown proteins determine the NP circulation time in the blood system. To identify these proteins, we compared the proteins adsorbed on the NP surface over time.

To investigate whether the protein corona composition of different NPs could be representative of various circulation times for each group of NPs, we applied principal component analysis (PCA) to proteomic data on protein corona compositions of SPIONs–PVA (12 and 31 kDa) (Figure 6). Details of the method are described in the Methods.

Weighted-variable importance is introduced and applied for the ranking of variables based on the variances contributed by variables in each principal component in PCA analysis and

loading plots. In this regard, the top-ranked variables were selected, and we carefully looked at the variation of each variable (protein) over different time courses. Using this analysis, we recognized 24 proteins that are responsible for different circulation times of NPs in blood (Table 2). In agreement

Table 2. List of Proteins Governing the NP Retention Time in Blood Circulation

Alpha-2-HS-glycoprotein	Ficolin-1
Apolipoprotein A-I	Hemoglobin subunit alpha-1/2
Apolipoprotein A-II	Hemoglobin subunit beta-1
Apolipoprotein C-I	Hemoglobin subunit beta-2
Apolipoprotein E	Ig kappa chain C region, B allele
Coagulation factor VII	Lipoprotein lipase
Complement C3	Matrix Gla protein
Extracellular matrix protein 1	Metalloproteinase inhibitor 3
Fibrinogen alpha chain	Murinoglobulin-1
Fibrinogen beta chain	Osteopontin
Fibrinogen gamma chain	Secreted phosphoprotein 24
Fibronectin	Serine protease inhibitor A3K

with previous reports,^{22,46–48} most of the recognized proteins are opsonins/dysopsonins such as different types of apolipoproteins, complement factors, immunoglobulins, fibrinogen, and coagulation factors, which were previously introduced as the determining factors governing the NP circulation time in animal/human bodies. This result implies that our research plan and experiments are accurate and resulted in the identification of the proteins, which are responsible for the NP circulation time.

According to the data obtained from LC-ESI-MS/MS and PCA analyses, the concentration of some proteins such as osteopontin, lipoprotein lipase, coagulation factor VII, matrix Gla protein, secreted phosphoprotein 24, alpha-2-HS-glycoprotein, and apolipoprotein C-I was considerably high in the corona of long-circulating NPs, while the concentration of hemoglobin subunit beta was high in the corona of short-circulating NPs (Figure S9). These biomolecules are mainly involved in forming connective tissues, immune response, blood clotting and platelet activation, vascular and extracellular calcification, removing cholesterol, and oxygen transport (Table S14).^{21,49–55}

Most of these proteins are positively charged at physiological pH and hence are not adsorbed on positively charged NPs due to electrostatic repulsion (Table S15). Some of proteins introduced here, such as alpha-2-HS-glycoprotein can act as an opsonin or dysopsonin, depending on the NP charge.⁵⁶ It is also possible that the combination of different types of proteins determines the blood circulation time of NPs. Therefore, these proteins should be considered as determining factors governing the retention of NPs in blood circulation. Identifying new proteins governing NP circulation time provides a promising opportunity to control the NP circulation time via tuning corona decoration on the NP surface.

Precoating NPs with suitable proteins is an effective strategy to enrich them on the NP surface even after NPs are exposed to biological media.^{57,58} It was shown that the targeting antibodies preadsorbed on the NP surface remained functional after exposure to plasma and were not completely replaced or masked by the protein corona.⁵⁸ While other plasma proteins are also adsorbed on the surface of precoated NPs, a high number of desired proteins that are precoated on the NPs can have a significant impact on NP circulation time. The precoating silica

NPs with gamma-globulins (g-globulins) produced a protein corona that was enriched with opsonins, such as immunoglobulins.⁵⁷

It is also possible to tune the NP surface chemistry to specifically recruit desired proteins or reduce the adsorption of total proteins on their surfaces.^{59,60} For example, coating NPs with a zwitterionic structure has been reported as an effective strategy to reduce protein adsorption on the NPs.⁶⁰ The surface chemistry of nanocarriers can also be specified to modulate adsorbed albumin structure and thereby tune clearance by macrophage scavenger receptors.⁶¹ Therefore, we can specify the NP surface chemistry to adsorb desired proteins or modulate their structure to tune clearance by macrophages.

It is also possible to adsorb suitable proteins to improve the NP pharmacokinetics on the NP surface by tuning the density of PEG. For example, the enrichment of apolipoprotein A1 and clusterin occurred at the NPs covered by a low concentration of PEG.⁶²

Furthermore, coating NPs with polyphosphoester (PPE)-based surfactants is an effective strategy to reduce the adsorption of IgG and albumin and increase the attraction of a high amount of ApoA1 and clusterin on the NP surface.⁶³ These evidence highlight the importance of identifying the proteins governing NP circulation time in the development of nanomedicine and showed that precoating NPs with desired proteins and/or tuning NP surface chemistry can be promising approaches to control the corona decoration on the NP surface and consequent NP half-life in the blood circulation system.

In this study, we identified the hard corona proteins that determine the NP retention time in the blood circulation system. There are some hidden factors in the nanobiointerfaces that should be considered and discussed when we study the corona protein's role in governing the plasma half-life of NPs.

Soft corona is a dynamic layer of biomolecules that have weak interaction with NPs and remain on their surfaces for a transient time.¹¹ Although this dynamic layer continuously changes over time, soft corona proteins might affect the NP–cell interaction and consequently the NP retention time in the blood circulation system. To date, there is no technique to specifically isolate the soft corona, and methods such as *in situ* click-chemistry reaction and *in situ* Fishing do not accurately isolate the whole soft corona proteins.^{64,65} Therefore, we preferred to study the hard corona proteins, which have a long-term residency on the NPs, and their role in the NP retention time in the blood circulation system.

The NP surface is immediately covered by biomolecules when they enter the biological media. The current assumption is that the protein corona fully covers the NP surface in seconds. However, it is possible that the surface charge of some parts that are not covered by biomolecules affects the NP–cell interaction and their biological fate.

Protein corona maturation and hardening refers to the process by which the corona proteins on the surface of NPs undergo structural changes or reorientation and become more stable over time.^{66,67} The proteins adsorbed on the NPs may undergo structural changes that lead to the exposure of cryptic epitopes that affect the NP–cell interaction and NP circulation time and biodistribution.⁶⁸ It is so hard to probe the conformation of a specific protein in a mixture of hundreds of proteins adsorbed on the NPs. Using fluorescence resonance energy transfer (FRET)-labeled fibronectin (FN), we tracked the conformational changes of FN located in the hard corona and soft corona.⁶⁹ We showed that the labeled FN proteins, which directly attached to the gold NP surface (hard corona), underwent more severe

conformational changes than those associated with the protein corona via protein–protein interactions (soft corona). Therefore, soft corona proteins that face the cells undergo the least structural changes, and the NP-induced protein structural change may not considerably affect the NP circulation time. Further analyses are required to determine the possible effects of corona protein structural changes on the NP retention time in the blood circulation system.

CONCLUSION

In this paper, we studied the role of surface chemistries, especially charges and polymer lengths, on the plasma half-lives of SPIONs and linked the biological results to the composition of *in vivo* protein coronas formed on the NP surfaces. As plasma half-life does not appear to be linked to the lengths of the polymers but only to their charges, the compositions of protein coronas formed on 12 and 31 kDa coated SPIONs were only slightly different. NPs with different circulation times adsorbed similar types/levels of opsonins/dysopsonins, which are usually known as crucial determining factors for NP circulation time. With accurate data analyses, we discovered a cocktail of proteins that might be responsible for the long circulation time of NPs: osteopontin, lipoprotein lipase, coagulation factor VII, matrix Gla protein, secreted phosphoprotein 24, alpha 2H glycoprotein, and apolipoprotein C-I, while hemoglobin seems to shorten blood clearance. Concentrating on these new proteins might be essential to understand and possibly tune NP surfaces to extend circulation time, by avoiding the RES uptake. Identification of the proteins directing NP circulation time is a critical step for controlling NP behavior and fate in the human body. Measuring protein adsorbed on NPs *in vivo* remains a challenge, as there are many parameters that can influence and bias results. Some solutions to improve accuracy might be to try standardizing protein corona analyses (i) by having a consensus on how to select and isolate the hard corona; (ii) by automating protein separations⁷⁰ to avoid bias due to the different methods used by operators.

METHODS

Materials. Iron(III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98–102%, CAS 10025-77-1, Sigma-Aldrich); iron(II) chloride tetrahydrate ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, >99%, CAS 13478-10-9, Sigma-Aldrich); ammonium hydroxide 28%; nitric acid 65%; NaCl; polyvinyl alcohols: PVA Mowiol 3-85 (12 kDa), M12 (NH_2 functionalized: 80140 kDa), and KL506 (COOH functionalized: 30–50 kDa) were from Kuraray. PVA Mowiol 4-88 (31 kDa) was from Merck. Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Sigma-Aldrich.

NP Synthesis and Functionalization. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPIONs) were synthesized via a coprecipitation method previously described.^{71,72} Polyvinyl alcohol (PVA) solutions were prepared in a 0.15 M NaCl solution at different concentrations: PVA 3-85 and 4-88 and KL506 at 100 mg/mL and PVA M12 at 20 mg/mL. SPIONs–PVA with different surface characteristics were obtained by mixing naked SPION suspensions and PVA solutions. For neutral SPIONs–PVA called SPIONs–PVA₁₂–OH (12[0]) and SPIONs–PVA₃₁–OH (31[0]), 5 mL of naked SPIONs was mixed with 0.5 mL of 0.15 M NaCl and 4.5 mL of solution of PVA 3-85 or PVA 4-88, respectively. For negatively charged SPIONs–PVA called SPIONs–PVA₁₂–COOH (12–) and SPIONs–PVA₃₁–COOH (31–), 5 mL of naked SPIONs was mixed with 0.5 mL of 0.15 M NaCl, 2.25 mL of KL506 solution, and 2.25 mL of a solution of PVA 3-85 or PVA 4-88, respectively. For positively charged SPIONs–PVA called SPIONs–PVA₁₂–NH₂ (12+) and SPIONs–PVA₃₁–NH₂ (31+), 5 mL of naked SPIONs was mixed with 0.5 mL of the solution of M12 and 4.5 mL of the solutions of PVA 3-85 or PVA 4-88, respectively. SPIONs–PVA

H

<https://doi.org/10.1021/acsnano.3c02041>
ACS Nano XXXX, XXX, XXX–XXX

suspensions (at 5 mg_{SPIONs}/mL) were stored at 4 °C at least one week before use, and pH was adjusted to 7.4 with NaOH prior to biological experiments.

NP Characterization. Electronic microscopy images were acquired on a TEM instrument from Hitachi (HT7800 with 120 kV LaB6 electron gun). The TEM diameter (*d*TEM) was obtained by counting the diameter of 400 crystallites. The hydrodynamic diameter (*d*H), polydispersity index (PDI), and zeta potential were measured by DLS and electrophoretic light scattering (ELS) (Zetasizer nano-ZS, Malvern Panalytical, Malvern, UK). The Zetasizer was equipped with a red 633 nm He-Ne laser, and measurements were performed at a 173° scattering angle. All measurements were performed at 25 °C. The refractive index (RI) and the value for the viscosity of iron oxide (2.420; 0.887 cP) were used. The laser power attenuator was adjusted automatically.

Size and zeta potential measurements were performed in triplicate (*n* = 3) in DTS1070 reusable cuvettes after sample dilution. SPION suspensions were diluted in 0.15 M NaCl at pH 7.4 and FBS (30 times dilution). For naked SPIONs and SPIONs–PVA, only *d*H intensity was reported to compare sizes before and after incubation in proteins. Indeed, *d*H number reflects mainly the size of the proteins in that case, because they outnumber NPs. For zeta potential, suspensions were also diluted 30 times in 10⁻² M NaCl at pH 7.4. Peak 1 mean, PDI, and zeta potential were determined, and data were analyzed by Malvern Instruments Zetasizer Software version 7.12.

NP Concentration. SPION concentrations in suspension and in plasma were determined via magnetic susceptibility measurements using a MS2G single frequency sensor magnetic susceptibility meter from Bartington Instruments.⁷³

Animals. Wistar female rats (Charles River, France, 210–230 g) were housed 7 days before the start of the experiments and were maintained in a day/night cycle of 12 h. These experiments were conducted following the legislation on the use of laboratory animals (directive 2010/63/EU) and have been approved by the accredited ethics committee (C2ea Grand Campus no. 105).

In Vivo Injection of NPs. Rats were anesthetized with isoflurane (2–2.5%) on a warm plate. They were injected in the tail vein with 1 mL of 5 mg_{NPs}/mL of the 6 different SPIONs–PVA.

Determination of SPIONs–PVA Biocirculation Half-Lives. After injection, 200 μL blood samples were taken out at different time points: 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, and 120 and/or 240 min depending on the live observations of SPION concentrations. Each 200 μL sample was diluted to 600 μL in physiological serum with heparin (50 UI/mL) and measured with magnetic susceptibility to get SPIONs' concentrations. Half-lives were obtained by plotting the evolution of SPIONs' concentrations compared to the initial concentration (in % of the injected dose) as a function of the sampling times. Experiments were conducted on biological duplicates, and measurements were performed in triplicate. The mathematical model used to fit all of the data points provided the half-lives and their absolute error.

Blood Sample Collections. After half-life times were determined, another experiment was conducted to select and analyze the protein corona adsorbed on the different SPIONs–PVA. Rats were injected with 1 mL of the 6 same SPIONs–PVA described before, and 600 μL blood samples were collected at different time points depending on the NPs' charge: 5 and 15 min for positive ones, 5, 15, and 30 min for negative ones, and 5, 30, and 90 min for neutral ones. The samples were then centrifuged (10 min, 3000g, 4 °C). Supernatants containing plasmas with NPs were delicately collected, and their SPIONs' concentrations were measured 3 times in magnetic susceptibility. NPs/proteins complexes were then isolated by passing through a hollow magnetic reactor⁴⁴ and rinsed with 5 mL of PBS, followed by a second wash with 5 mL of PBS + 2 M NaCl. The syringe pump was set up at 1 mL/min following a previously described protocol.^{44,74} This protocol was optimized to be able to remove the low adsorbed proteins called the soft corona to only focus on the strongly adsorbed proteins: the hard corona.¹¹ With 2 times column washings, only the hard corona was selected and analyzed. Samples were stored at –80 °C. Each experiment was conducted on three different rats.

ESI-LC-MSMS Sample Preparation. SPIONs with proteins were sonicated during 15 min at room temperature in an ultrasonic bath and then 30 s in an ultrasonic processor for vials (amplitude 70, cycle 0.5). For each batch of sample, the same amount of the NPs was taken from each sample and diluted to 300 μL with 2 M NaCl in PBS (see Supporting Information). 6 μL of dithioerythritol (DTE, 50 mM) in distilled water was added, and then reduction was carried out at 37 °C for 1 h. Alkylation was performed by adding 6 μL of iodoacetamide (400 mM in distilled water) during 1 h at room temperature in the dark. Overnight digestion was performed at 37 °C with 6 μL of freshly prepared trypsin (Promega) at 0.1 μg/μL in acetic acid. Samples were completely dried under speed-vacuum and then desalted with a C18 microspin column (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Samples were finally completely dried under a speed vacuum and stored at –20 °C.

ESI-LC-MSMS Experimentation. Analyses were conducted on a nanoLC-MSMS using an easynLC1000 instrument (Thermo Fisher Scientific) coupled with a Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Samples were diluted in 10 μL of loading buffer (5% CH3CN, 0.1% FA), and 5 μL was injected on the column. LC-ESI-MS/MS was performed on a Q-Exactive HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with an Easy nLC 1000 liquid chromatography system (Thermo Fisher Scientific). Peptides were trapped on an Acclaim pepmap100, C18, 3 μm, 75 μm × 20 mm nano trap-column (Thermo Fisher Scientific) and separated on a 75 μm × 250 mm, C18, 2 μm, 100 Å Easy-Spray column (Thermo Fisher Scientific). The analytical separation was run for 40 min using a gradient of H₂O/FA 99.9%/0.1% (solvent A) and CH₃CN/FA 99.9%/0.1% (solvent B). The gradient was run as follows: 0–5 min 95% A and 5% B, then 65% A and 35% B for 25 min, and 10% A and 90% B for 10 min at a flow rate of 250 nL/min. Full scan resolution was set to 60 000 at *m/z* 200 with an AGC target of 3 × 10⁶ and a maximum injection time of 60 ms. Mass range was set to 400–2000 *m/z*. For data dependent analysis, up to twenty precursor ions were isolated and fragmented by high energy collisional dissociation HCD at 27% NCE. Resolution for MS2 scans was set to 15 000 at *m/z* 200 with an AGC target of 1 × 10⁵ and a maximum injection time of 60 ms. Isolation width was set at 1.6 *m/z*. Full MS scans were acquired in profile mode, whereas MS2 scans were acquired in centroid mode. Dynamic exclusion was 20 s.

ESI-LC-MSMS Database Research. Peak lists (MGF file format) were generated from raw data using the MS Convert conversion tool from ProteoWizard. The peak list files were searched against the *Rattus norvegicus* Reference Proteome (uniprot.org, release 01_2021, 8125 entries) combined with an in-house database of common contaminants using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.5.1). Trypsin was selected as the enzyme with one potential missed cleavage. Precursor ion tolerance was set to 10 ppm, and fragment ion tolerance was set to 0.02 Da. Carbamidomethyl of cysteine was specified as a fixed modification. Deamidation of asparagine and glutamine and oxidation of methionine were specified as variable modifications. The Mascot search was validated using Scaffold 5.0.0 (Proteome Software). Peptide identifications were accepted if they could be established at a probability to achieve an FDR of less than 0.1% by the Percolator posterior error probability calculation.⁷⁵ Protein identifications were accepted if they could be established to achieve a false discovery rate less than 1.0% and contained at least 2 identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm.⁷⁶ Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony.

LC-MS Data Analysis. Normalized spectral count (NSpC) was normalized using the classical formula:
$$\text{NSpC}_k = \frac{\left(\frac{\text{TSC}}{\text{MW}}\right)_k}{\sum_{i=0}^N \text{TSC}_i / \text{MW}_i}$$
 with NSpC being the normalized TSC (total spectra count) of protein *k* and MW being the molecular weight (kDa). All LC-MS data were run in triplicate, and their standard deviations were added on the different graphs.

Principal Component Analysis (PCA). In this work, we used principal component analysis as an unsupervised method to represent a high-dimensional data structure in a smaller number of dimensions and to find the variables that have more weight for characterizing objects in a data set. In this way, we can observe groupings of objects and outliers which define the structure of the data set. Our data points for two SPION particles (12 and 31 kDa) in different charges, cationic, neutral, and anionic, were separated into two sets. PCA analysis was performed on each set, and the first three eigenvalues explained more than 85% of the total variance. Based on the weights (loadings plot) in absolute value of the variables for the first three principal components, we selected those variables that had a loading higher than 0.2 for each set as important variables (proteins) affecting blood circulation time.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.3c02041>.

Characterizations of the nanoparticles (TEM pictures of naked and PVA-coated SPIONs, DLS, and zeta potential measurements in serum); experimental procedures *in vivo* and time of collections of *in vivo* samples; list of 5 and 20 most abundant proteins at different times of collection and different surface functionalizations; example of the calculation of the overall protein corona GRAVY and pI; GRAVY and pI repartitions of the 189 proteins identified; comparison of the GRAVY and the pI of the 5 and 20 most abundant proteins and all the proteins found at different times on SPIONs–PVA with the same charges; evolution of haptoglobin on NP surface over time; hemoglobin content of the corona adsorbed in NPs over time; GRAVY and pI of the proteins of each time point and NP surfaces; evolutions of serotransferrin, complement C3, total IgG, total complement, total apolipoproteins, and total fibrinogen adsorbed on NPs at different time points and surface functionalizations; time evolution of the amount of proteins extending NPS circulation time; physiological functions of identified proteins in this study; GRAVY and pI of proteins extending the circulation time (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Cintia Marques – *Institute of Pharmaceutical Sciences of Western Switzerland and Section of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, 1211 Geneva, Switzerland*;
Email: cintia.baptistamarques@unige.ch

Mohammad Javad Hajipour – *Department of Radiology, Molecular Imaging Program at Stanford (MIPS), Stanford University, Stanford, California 94304, United States*;
● orcid.org/0000-0002-2876-5473; Email: hajipour@stanford.edu

Lionel Maurizi – *Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB), UMR 6303 CNRS – Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon Cedex F-21078, France*;
● orcid.org/0000-0002-6346-7623; Email: lionelmaurizi@gmail.com

Authors

Célia Marets – *Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB), UMR 6303 CNRS – Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon Cedex F-21078, France*;
● orcid.org/0000-0002-5670-1020

Alexandra Oudot – *Plateforme d'Imagerie Préclinique, Service de Médecine Nucléaire, Centre Georges François Leclerc, 21000 Dijon, France*

Reihaneh Safavi-sohi – *Department of Chemistry and Biochemistry, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana 46556, United States*

Mélanie Guillemin – *Plateforme d'Imagerie Préclinique, Service de Médecine Nucléaire, Centre Georges François Leclerc, 21000 Dijon, France*

Gerrit Borchard – *Institute of Pharmaceutical Sciences of Western Switzerland and Section of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, 1211 Geneva, Switzerland*

Olivier Jordan – *Institute of Pharmaceutical Sciences of Western Switzerland and Section of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, 1211 Geneva, Switzerland*; ● orcid.org/0000-0003-3752-2198

Lucien Saviot – *Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB), UMR 6303 CNRS – Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon Cedex F-21078, France*;
● orcid.org/0000-0002-1249-2730

Complete contact information is available at:
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.3c02041>

Author Contributions

[†]C. Marques and M.J.H. contributed equally to this work. Study design: L.M. (conception of study), A.O. (pharmacokinetics study), C. Marets, L.S., and L.M. (particle synthesis and characterization), C. Marques, O.J., G.B., and L.M. (proteins analyses), and C. Marques, M.J.H., R.S., and L.M. (proteomics results exploitation). SPION synthesis, functionalization, and characterization: C. Marets, L.S., and L.M. Pharmacokinetic *in vivo* studies: C. Marets, A.O., M. G., and L.M. Proteins analyses: C. Marques, G.B., and O.J. Proteins results exploitation: C. Marques, M.J.H., C. Marets, R.S., and L.M. Authors analyzed the data and prepared figures for their respective experiments. Writing – Original Draft Preparation: C. Marques, M.J.H., and L.M.; Writing – Review & Editing: all authors; Funding Acquisition: O.J. and L.M.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was performed within Pharm'Image, a regional center of excellence in Pharmacoimaging. Support was provided by the French Government through the French National Research Agency (ANR) under the program "Investissements d'Avenir" (ANR-10-EQPX-05-01/IMAPPI Equipex) and the CNRS, the "Université de Bourgogne", and the "Conseil Régional de Bourgogne". This work is also part of the project "Pharmacoimagerie et agents théranostiques", funded by the "Université de Bourgogne", and the "Conseil Régional de Bourgogne" through the "Plan d'Actions Régional pour l'Innovation (PARI)" and the European Union through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014/2020 programs. Authors also would like to acknowledge the support of EIPHI Graduate School (contract ANR-17-EURE-0002), the ANER project "Nanoprot" no. 2019-Y-10648, and the ANR Nanoblorona (contract ANR-21-CE18-0015). Authors would like to thank the France-Stanford center through the France-Stanford collaborative project for their support. The authors would like to thank A. Hainard from the Proteomics Core Facility of the University of Geneva (Switzerland) for LC-ESI-MS/MS analyses and R. Chassagnon from the department ARcen (Applications, Research and Characterization at Nanoscale) of the laboratory ICB for the TEM pictures.

Conclusion chapitre 3

Les principales techniques de caractérisation des interactions nanoparticules-protéines ont été récapitulées dans le début de chapitre

Une expérience biologique *in vivo* portant sur l'identification de la couronne protéique de SPIONs avec différents coatings et sur leur rôle sur la biocirculation sanguine a été conduite. Des prélèvements à différents temps ont été effectués afin d'étudier l'évolution temporelle de la couronne protéique. Des SPIONs recouverts de PVA de taille différentes (12 kDa et 31 kDa) et portant des groupements fonctionnels différents (-OH, -COOH, -NH₃) ont été étudiés. Les résultats protéomiques sont étudiés via le nombre de protéines et leur nature (le pI et le GRAVY). De par la complexité et le grand nombre des données récoltées (seize conditions composées, en moyenne, d'une soixantaine de protéines chacune), des approches statistiques ont été abordées. Les tests statistiques peuvent se montrer prometteurs pour l'étude d'une protéine particulière. Plusieurs méthodes de classification hiérarchiques ont été testées pour étudier les différences significatives des conditions étudiées. On peut retenir l'algorithme de Ward et la présentation sous dendrogrammes correspondante ou le positionnement multidimensionnel pour illustrer les similitudes des échantillons. Dans ces études est remarqué l'impact dominant de la taille du polymère par rapport à sa charge sur l'adsorption des protéines.

Après tests et comparaisons de différentes méthodes statistiques sur les données récoltées, il apparaît que la PCA reste, à ce jour, la méthode la plus courante et la plus puissante pour ce genre de jeu de données. Les résultats de protéomique ont fait l'objet d'un article publié dans ACS Nano permettant, à l'aide de cette méthode statistique, de sélectionner un cocktail de protéines semblant influencer la biocirculation des SPIONs fonctionnalisés.

Conclusion générale et perspectives

Le développement de nanoparticules destinées à des fins biomédicales doit prendre en compte le phénomène de couronne protéique (PC), ces couches de protéines liées plus ou moins fortement à la surface des nanoparticules se formant lorsque celles-ci sont introduites dans le sang. Le premier but de cette thèse était **d'étudier les différents aspects impactant cette couronne protéique, de faire un point sur la recherche à ce sujet et définir les challenges rencontrés**. Et le nombre de paramètres intrinsèques aux nanoparticules influençant la couronne protéique est conséquent : taille, forme, chimie de surface, rugosité, matériau, etc. Cette couronne est aussi influencée par les paramètres environnementaux, et il a été démontré que les études *in vitro* et *in vivo* sont souvent difficilement réconciliables et qu'il est préférable de se rapprocher des conditions physiologiques dans lesquelles les NPs se retrouvent lors de leur injection pour obtenir des résultats au plus proche du vivant, donc de travailler *in vivo*. Les objectifs de cette thèse étaient donc de **choisir les modèles de nanoparticules et les paramètres à étudier, de synthétiser ces particules modèles d'une manière à pouvoir étudier l'impact de ces paramètres sur la couronne protéique** (c'est-à-dire d'obtenir des échantillons ne possédant qu'un seul paramètre variable entre eux) et de **caractériser celle-ci *in vivo***.

Le **premier chapitre** fait un point bibliographique des aspects mentionnés ci-dessus : il revoit les différentes nanoparticules développées dans un contexte biomédical, pourquoi la couronne protéique est cruciale, les principaux paramètres l'influençant, les divergences *in vitro* vs *in vivo* et l'importance de standardiser les techniques de caractérisation. La bibliographie menée sur ce sujet a mené à la publication d'une revue en collaboration avec Dr. Nimisha Singh dans *Nanoscale Advances* en 2021. Dans cet article, l'influence de l'adsorption des protéines à la surface des NPs est étudiée. Les paramètres influençant la couronne protéique sont présentés ainsi que la modification de cette PC *in vitro* pour influencer les comportements *in vivo* des NPs. Enfin les quelques études s'étant concentrées sur l'analyse *in vivo* de la PC sont résumées. Enfin des améliorations sur l'analyse de la PC sont proposées. Dans la suite de ce travail de thèse, le choix est de travailler sur des nanoparticules sphériques et d'étudier les paramètres de la taille et de la chimie de surface. Ce chapitre détaille aussi les systèmes sélectionnés : les nanoparticules d'oxyde de fer et d'or, qui font partie des types de nanoparticules les plus étudiées à des fins thérapeutiques. Les molécules choisies comme fonctionnalisation de surface sont les polymères (PEG et PVA), le citrate et le glutathion.

La synthèse et la caractérisation de ces systèmes font l'objet du **deuxième chapitre**. Une brève étude des différentes méthodes de synthèse pour les deux types de particules est menée. La coprécipitation est choisie pour les SPIONs, et la réduction d'un sel d'or pour les AuNPs.

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont synthétisables en quantité importante et de manière reproductible. Leur taille hydrodynamique dans leur milieu original est de 27 nm. Les suspensions sont stables dans leur milieu d'origine pendant au moins 3 ans, ce qui permet de faire des études sur des particules identiques tout au long d'un

projet. Un coating de citrate puis de glutathion (GSH) est effectué. Différentes méthodes de purification ont été testées, et celles retenues sont la centrifugation pour les SPIONs@citrate et la SEC pour les SPIONs@GSH.

Différents protocoles de synthèse de nanoparticule d'or ont été testés : la méthode classique de Turkevich (V0), des variantes avec chauffage avec (V1) ou sans (V2) ajustement de pH, et une synthèse en présence de glutathion (V3). (V0) résulte en des suspensions de diamètres moyens hydrodynamiques ajustables, compris entre 16 et 95 nm avec des PDI compris entre 0,16 et 0,49. Des problèmes de reproductibilité et de stabilité ont été rencontrés. Ces NPs doivent être fonctionnalisées directement après leur synthèse. (V1), (V2) et (V3) résultent en des particules de 20-25 nm de diamètre hydrodynamique avec des PDI inférieurs à 0,2. Ces AuNPs sont sphériques et monodisperses. (V1) possède l'avantage d'être stable dans le temps.

Les tests de purifications des suspensions sans fonctionnalisation ont démontré une sédimentation instantanée quelle que soit la méthode. Les concentrations sont faibles (inférieure à 10^{-4} M). Un greffage de PEG-SH a été effectué et caractérisé. La molécule se greffe facilement et les suspensions sont purifiables.

Dans une moindre mesure, des nanoparticules de silice non mésoporeuses ont été synthétisées par le procédé Stöber, résultant en des NPs d'une taille comprise entre 40 et 140 nm. Leur sphéricité et monodispersité sont exemplaires. Des essais afin de passer du milieu éthanol au milieu aqueux sans passer par le stade de poudre ont été testés. Une combinaison d'évaporateur rotatif et de dialyse permet ce remplacement.

Une bibliothèque de nanoparticules a donc été constituée, avec des diamètres hydrodynamiques et des fonctionnalisations de surface différentes. Une attention particulière a été portée sur la reproductibilité des synthèses et la caractérisation des suspensions. La variation d'un seul et unique paramètre entre deux suspensions n'est pas systématique. Les études de stabilités démontrent que les AuNPs@PEG, les SPION@citrate, les SPIONs@GSH peuvent être utilisés dans des études biologiques.

Les paramètres choisis – la taille et la chimie de surface – font l'objet d'une étude ciblée de caractérisation de la couronne protéique dans le **troisième chapitre**. Des SPIONs avec différentes fonctionnalisations à base de PVA (chargés positivement, négativement ou neutres) de différentes tailles (12kDa et 31kDa) sont introduits dans des rats et le sang de ceux-ci est prélevé à différents temps. La PC est isolée par centrifugation suivie d'une séparation magnétique. Les protéines composant ces PC sont ensuite analysées par LC-MS. Devant la grande quantité et diversité des résultats obtenus, une étude de différentes méthodes statistiques d'analyse de données explore le traitement des jeux de données issus de la protéomique. La conclusion partielle est, en premier lieu, que l'adsorption des protéines semblent être plus influencée par la taille du polymère utilisé que par sa charge. De plus, le choix de l'approche statistique semble crucial pour analyser les données et la méthode PCA (Analyse en Composantes Principales) semble être la plus adaptée à notre étude. Les résultats *in vivo* des PC trouvées dans le plasma à la surface des SPIONs à différents temps post-injection ont fait l'objet d'une publication dans ACS Nano en 2023 en collaborations avec Cintia Marques de l'Université de Genève et Dr. Mohammad Hajipour de Stanford. A l'aide, entre autres, de la méthode PCA, des protéines d'intérêts influençant positivement ou négativement la biocirculation des SPIONs ont été sélectionnées.

En conclusion, ce travail offre une première amorce à l'insertion d'une nouvelle thématique de recherche dans l'équipe d'accueil. Différents aspects de la couronne protéique ont été étudiés et des outils pour son étude ont été mis au point, aussi bien en terme de regroupement de protocoles de nanoparticules modèles que d'exploration des différentes méthodes de caractérisation. Cette étude souligne l'importance de la prise en compte de l'ensemble des facteurs régissant les interactions nanoparticule-protéines pour développer des approches biomédicales sûres et efficaces basées sur les nanoparticules, l'objectif final des études portant sur la couronne protéique étant de pouvoir la contrôler et d'optimiser ces systèmes.

Les **perspectives** de ce travail se retrouvent aussi bien dans les synthèses que dans l'étude de la couronne protéique.

Les possibilités d'amélioration de la bibliothèque de nanoparticules sont multiples : les AuNPs monodisperses sont d'une taille de vingtaine de nanomètres (sans fonctionnalisation), et des optimisations dans les protocoles permettraient d'obtenir d'autres tailles. Les SPIONs sont des agrégats d'une trentaine de nm de cristallites de 8 nm, mais il existe des synthèses résultant en des SPIONs de morphologie identique à celle de nos AuNPs (elles nécessitent cependant de travailler en milieux non aqueux). Les molécules en surface ne sont pas uniformisées : le glutathion par exemple n'a pas été greffé sur les AuNPs de V0, V1 et V2, et les fonctionnalisations peuvent être effectuées sur les nanoparticules de silice. Les synthèses de celles-ci peuvent aussi être améliorées pour obtenir des tailles plus proches de celles des autres nanoparticules. La caractérisation des suspensions fonctionnalisées pourrait aussi être perfectionnée. Une quantification des PEG-SH greffés sur les AuNPs peut être notamment menée. La méthode colorimétrique avec le réactif d'Ellman peut être conduite à cette fin, en déterminant les groupements thiols en excès dans le surnageant des centrifugations.

La LC-MSMS conduite dans le troisième chapitre est l'une des techniques les plus courantes de caractérisation de la couronne protéique en terme de semi-quantitatif et d'identification. Ses inconvénients sont de masquer les protéines à faibles concentrations et de détruire les protéines. Par ailleurs, bien que l'*in vivo* soit privilégié, il reste complexe et coûteux à mettre en place. Les études *in vitro* et *ex-situ* sont donc à mener en parallèle car elles peuvent aider à la compréhension des interactions mises en jeu. Il pourrait donc être intéressant d'analyser la structure des protéines qui ont été remarquées pour avoir un impact sur le temps de circulation (les opsonines/dysopsonines identifiées dans l'article d'ACS Nano 2023) après incubation dans des conditions identiques, par dichroïsme circulaire ou spectroscopie infra-rouge par exemple. Au vu des questions de reproductibilité soulevées, il faudrait confirmer les résultats de la manipulation avec $n = 8$ individus. Par ailleurs, se tourner vers d'autres méthodes de séparation (comme l'AF4 Assymetric Flow Field Fractionation ou la SEC Size Exclusion Chromatography) est nécessaire pour l'étude des couronnes protéiques formées sur les nanoparticules non magnétiques telles que les AuNPs. Des premiers essais ont été menés en collaboration avec l'Université de Genève.

L'approche des statistiques dans le traitement des données de protéomiques est inévitable. Une formation aux sciences des données est donc vivement recommandée.

Une autre approche de la couronne protéique serait de fonctionnaliser les nanoparticules directement avec les protéines, soit en greffant une protéine particulière ou en pré-incubant les nanoparticules dans du sérum. Une expérience envisagée dans ce cadre est celle présentée en Figure 108, où l'impact des NPs avec ou sans pré-incubation dans du sérum serait étudié sur des cellules THP-1 (lignée cellulaire de monocytes humaine) en cytométrie en flux. Le but de cette étude serait de comprendre le rôle de la couronne protéique sur l'internalisation des NPs. L'influence de la température sur l'adsorption de protéines serait également étudiée.

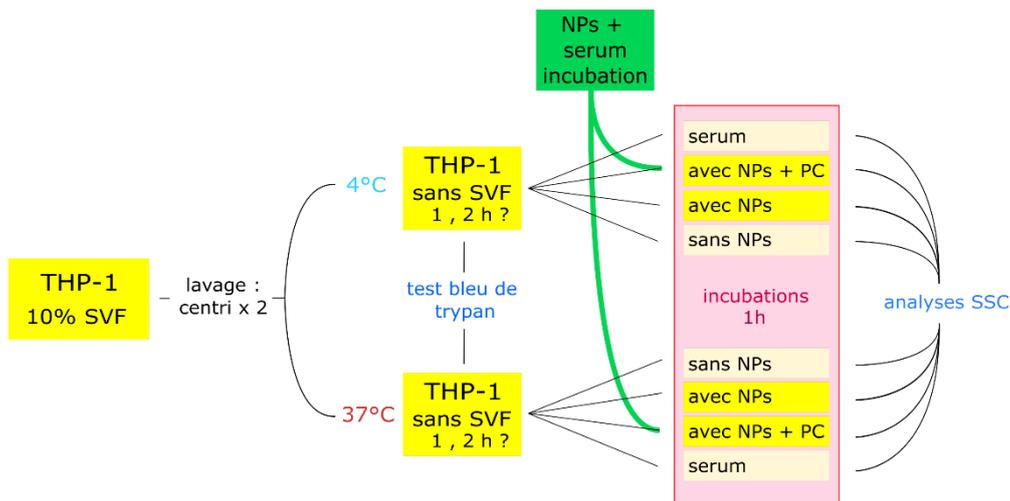


Figure 108 : schéma résumant l'étude envisagée d'une pré-incubation des NPs dans du sérum et son impact sur la viabilité des cellules. THP1 : culture cellulaire de monocytes de lignée humaine. Bleu de trypan : test colorimétrique pour déterminer la viabilité des cellules. SVF : sérum de veau fœtal. SSC : paramètre de cytométrie en flux (Side Scatter, lumière diffractée, donnant la granularité des cellules).

Il faut également souligner que d'autres paramètres, extrinsèques aux nanoparticules, impactent la couronne protéique. Cet aspect est gardé à l'esprit et une étude *ex-situ* est en cours, analysant l'impact de l'anticoagulant sur la couronne protéique des SPIONs@PVA. Les SPIONs sont incubés dans des fonds de tube (= nous travaillons ici avec des prélèvements de patients de CHU de Dijon, en collaboration avec Dr. E. De Maistre) préparés à l'aide de différents anticoagulants : héparine, EDTA (Ethylène Diamine Tétracétique), citrate et sans anticoagulant. Les couronnes protéiques sont analysées par spectrométrie de masse. Par ailleurs, la collaboration mise en place pour cette manipulation permettra par la suite d'étudier la couronne protéique selon différentes pathologies. Elle a fait l'objet du dépôt d'un essai clinique NCT05690542. Ces travaux et la suite de l'étude de la couronne protéique sont portés par la thèse de Dorra Ben-Elkadhi ayant débuté en mars dernier.

Bibliographie

- [1] T. Cedervall *et al.*, « Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, n° 7, p. 2050-2055, févr. 2007, doi: 10.1073/pnas.0608582104.
- [2] L. Treuel et G. U. Nienhaus, « Toward a molecular understanding of nanoparticle–protein interactions », *Biophys Rev*, vol. 4, n° 2, p. 137-147, juin 2012, doi: 10.1007/s12551-012-0072-0.
- [3] F. Fang, M. Li, J. Zhang, et C.-S. Lee, « Different Strategies for Organic Nanoparticle Preparation in Biomedicine », *ACS Materials Lett.*, vol. 2, n° 5, p. 531-549, mai 2020, doi: 10.1021/acsmaterialslett.0c00078.
- [4] K. McNamara et S. A. M. Tofail, « Nanoparticles in biomedical applications », *Advances in Physics: X*, vol. 2, n° 1, p. 54-88, janv. 2017, doi: 10.1080/23746149.2016.1254570.
- [5] G. Chuto et P. Chaumet-Riffaud, « Les nanoparticules », *Médecine Nucléaire*, vol. 34, n° 6, p. 370-376, juin 2010, doi: 10.1016/j.mednuc.2010.03.003.
- [6] M. J. Mitchell, M. M. Billingsley, R. M. Haley, M. E. Wechsler, N. A. Peppas, et R. Langer, « Engineering precision nanoparticles for drug delivery », *Nat Rev Drug Discov*, vol. 20, n° 2, Art. n° 2, févr. 2021, doi: 10.1038/s41573-020-0090-8.
- [7] V. A. Spirescu, C. Chircov, A. M. Grumezescu, B. Ștefan Vasile, et E. Andronescu, « Inorganic Nanoparticles and Composite Films for Antimicrobial Therapies », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, n° 9, Art. n° 9, janv. 2021, doi: 10.3390/ijms22094595.
- [8] A. S. Karakoti, S. Das, S. Thevuthasan, et S. Seal, « PEGylated Inorganic Nanoparticles », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, n° 9, p. 1980-1994, 2011, doi: 10.1002/anie.201002969.
- [9] K. M. Vargas et Y.-S. Shon, « Hybrid lipid–nanoparticle complexes for biomedical applications », *J. Mater. Chem. B*, vol. 7, n° 5, p. 695-708, janv. 2019, doi: 10.1039/C8TB03084G.
- [10] A. SalmanOgli, « Nanobio applications of quantum dots in cancer: imaging, sensing, and targeting », *Cancer Nano*, vol. 2, n° 1, Art. n° 1, déc. 2011, doi: 10.1007/s12645-011-0015-7.
- [11] Y. Liu, J. Tan, A. Thomas, D. Ou-Yang, et V. R. Muzykantov, « The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery », *Therapeutic Delivery*, vol. 3, n° 2, p. 181-194, févr. 2012, doi: 10.4155/tde.11.156.
- [12] N. Hoshyar, S. Gray, H. Han, et G. Bao, « The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction », *Nanomedicine*, vol. 11, n° 6, p. 673-692, mars 2016, doi: 10.2217/nnm.16.5.
- [13] W. Poon *et al.*, « Elimination Pathways of Nanoparticles », *ACS Nano*, vol. 13, n° 5, p. 5785-5798, mai 2019, doi: 10.1021/acsnano.9b01383.
- [14] X. Sun *et al.*, « An Assessment of the Effects of Shell Cross-Linked Nanoparticle Size, Core Composition, and Surface PEGylation on in Vivo Biodistribution », *Biomacromolecules*, vol. 6, n° 5, p. 2541-2554, sept. 2005, doi: 10.1021/bm050260e.
- [15] X. Guo *et al.*, « Appropriate Size of Magnetic Nanoparticles for Various Bioapplications in Cancer Diagnostics and Therapy », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, n° 5, p. 3092-3106, févr. 2016, doi: 10.1021/acсами.5b10352.
- [16] A. Albanese, P. S. Tang, et W. C. W. Chan, « The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems », *Annu Rev Biomed Eng*, vol. 14, p. 1-16, 2012, doi: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150124.

-
- [17] J. Lovrić, H. S. Bazzi, Y. Cuie, G. R. A. Fortin, F. M. Winnik, et D. Maysinger, « Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots », *J Mol Med*, vol. 83, n° 5, p. 377-385, mai 2005, doi: 10.1007/s00109-004-0629-x.
- [18] Y. Pan *et al.*, « Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles », *Small*, vol. 3, n° 11, p. 1941-1949, 2007, doi: 10.1002/sml.200700378.
- [19] S. W. Shin, I. H. Song, et S. H. Um, « Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity », *Nanomaterials*, vol. 5, n° 3, Art. n° 3, sept. 2015, doi: 10.3390/nano5031351.
- [20] Z. Wu, S. Yang, et W. Wu, « Shape control of inorganic nanoparticles from solution », *Nanoscale*, vol. 8, n° 3, p. 1237-1259, janv. 2016, doi: 10.1039/C5NR07681A.
- [21] N. P. Truong, M. R. Whittaker, C. W. Mak, et T. P. Davis, « The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery », *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 12, n° 1, p. 129-142, janv. 2015, doi: 10.1517/17425247.2014.950564.
- [22] J. Dean, M. G. Taylor, et G. Mpourmpakis, « Unfolding adsorption on metal nanoparticles: Connecting stability with catalysis », *Science Advances*, vol. 5, n° 9, p. eaax5101, sept. 2019, doi: 10.1126/sciadv.aax5101.
- [23] J. J. Mock, M. Barbic, D. R. Smith, D. A. Schultz, et S. Schultz, « Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles », *J. Chem. Phys.*, vol. 116, n° 15, p. 6755-6759, avr. 2002, doi: 10.1063/1.1462610.
- [24] H. Gavilán *et al.*, « How size, shape and assembly of magnetic nanoparticles give rise to different hyperthermia scenarios », *Nanoscale*, vol. 13, n° 37, p. 15631-15646, oct. 2021, doi: 10.1039/D1NR03484G.
- [25] W. Wang, K. Gaus, R. D. Tilley, et J. J. Gooding, « The impact of nanoparticle shape on cellular internalisation and transport: what do the different analysis methods tell us? », *Mater. Horiz.*, vol. 6, n° 8, p. 1538-1547, sept. 2019, doi: 10.1039/C9MH00664H.
- [26] Y. Zhang, K. Huang, J. Lin, et P. Huang, « Janus nanoparticles in cancer diagnosis, therapy and theranostics », *Biomater. Sci.*, vol. 7, n° 4, p. 1262-1275, mars 2019, doi: 10.1039/C8BM01523F.
- [27] J. Midelet, A. H. El-Sagheer, T. Brown, A. G. Kanaras, et M. H. V. Werts, « The Sedimentation of Colloidal Nanoparticles in Solution and Its Study Using Quantitative Digital Photography », *Particle & Particle Systems Characterization*, vol. 34, n° 10, p. 1700095, 2017, doi: 10.1002/ppsc.201700095.
- [28] W. Zhang, « Nanoparticle Aggregation: Principles and Modeling », in *Nanomaterial: Impacts on Cell Biology and Medicine*, D. G. Capco et Y. Chen, Éd., in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014, p. 19-43. doi: 10.1007/978-94-017-8739-0_2.
- [29] J. Hierrezuelo, A. Sadeghpour, I. Szilagyi, A. Vaccaro, et M. Borkovec, « Electrostatic Stabilization of Charged Colloidal Particles with Adsorbed Polyelectrolytes of Opposite Charge », *Langmuir*, vol. 26, n° 19, p. 15109-15111, oct. 2010, doi: 10.1021/la102912u.
- [30] J. Hang, L. Shi, X. Feng, et L. Xiao, « Electrostatic and electrosteric stabilization of aqueous suspensions of barite nanoparticles », *Powder Technology*, vol. 192, n° 2, p. 166-170, juin 2009, doi: 10.1016/j.powtec.2008.12.010.
- [31] F. Viñes, J. R. B. Gomes, et F. Illas, « Understanding the reactivity of metallic nanoparticles: beyond the extended surface model for catalysis », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, n° 14, p. 4922-4939, juin 2014, doi: 10.1039/C3CS60421G.
- [32] S. Naahidi, M. Jafari, F. Edalat, K. Raymond, A. Khademhosseini, et P. Chen, « Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery », *Journal of*

- Controlled Release*, vol. 166, n° 2, p. 182-194, mars 2013, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.12.013.
- [33] M. Adabi *et al.*, « Biocompatibility and nanostructured materials: applications in nanomedicine », *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, vol. 45, n° 4, p. 833-842, mai 2017, doi: 10.1080/21691401.2016.1178134.
- [34] S. Y. Fam, C. F. Chee, C. Y. Yong, K. L. Ho, A. R. Mariatulqabtiah, et W. S. Tan, « Stealth Coating of Nanoparticles in Drug-Delivery Systems », *Nanomaterials*, vol. 10, n° 4, Art. n° 4, avr. 2020, doi: 10.3390/nano10040787.
- [35] C. Tassa, S. Y. Shaw, et R. Weissleder, « Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles: A Versatile Platform for Targeted Molecular Imaging, Molecular Diagnostics, and Therapy », *Acc. Chem. Res.*, vol. 44, n° 10, p. 842-852, oct. 2011, doi: 10.1021/ar200084x.
- [36] J. Conde, J. T. Dias, V. Grazú, M. Moros, P. V. Baptista, et J. M. de la Fuente, « Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine », *Front Chem*, vol. 2, p. 48, 2014, doi: 10.3389/fchem.2014.00048.
- [37] H. Heinz *et al.*, « Nanoparticle decoration with surfactants: Molecular interactions, assembly, and applications », *Surface Science Reports*, vol. 72, n° 1, p. 1-58, févr. 2017, doi: 10.1016/j.surfrep.2017.02.001.
- [38] W. Gao, J. M. Chan, et O. C. Farokhzad, « pH-Responsive Nanoparticles for Drug Delivery », *Mol. Pharmaceutics*, vol. 7, n° 6, p. 1913-1920, déc. 2010, doi: 10.1021/mp100253e.
- [39] Y. Qiao *et al.*, « Magnetic resonance and photoacoustic imaging of brain tumor mediated by mesenchymal stem cell labeled with multifunctional nanoparticle introduced via carotid artery injection », *Nanotechnology*, vol. 29, n° 16, p. 165101, févr. 2018, doi: 10.1088/1361-6528/aaaf16.
- [40] J. R. Nicol, D. Dixon, et J. A. Coulter, « Gold nanoparticle surface functionalization: a necessary requirement in the development of novel nanotherapeutics », *Nanomedicine*, vol. 10, n° 8, p. 1315-1326, avr. 2015, doi: 10.2217/nnm.14.219.
- [41] R. Thirupathi, S. Mishra, M. Ganapathy, P. Padmanabhan, et B. Gulyás, « Nanoparticle Functionalization and Its Potentials for Molecular Imaging », *Advanced Science*, vol. 4, n° 3, p. 1600279, 2017, doi: 10.1002/advs.201600279.
- [42] K. Kang *et al.*, « Preparation and Characterization of Chemically Functionalized Silica-Coated Magnetic Nanoparticles as a DNA Separator », *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, n° 2, p. 536-543, janv. 2009, doi: 10.1021/jp807081b.
- [43] D. R. Hristov *et al.*, « Tuning of nanoparticle biological functionality through controlled surface chemistry and characterisation at the bioconjugated nanoparticle surface », *Sci Rep*, vol. 5, n° 1, Art. n° 1, déc. 2015, doi: 10.1038/srep17040.
- [44] J. S. Bozich, S. E. Lohse, M. D. Torelli, C. J. Murphy, R. J. Hamers, et R. D. Klaper, « Surface chemistry, charge and ligand type impact the toxicity of gold nanoparticles to *Daphnia magna* », *Environ. Sci.: Nano*, vol. 1, n° 3, p. 260-270, mai 2014, doi: 10.1039/C4EN00006D.
- [45] Q. Xu *et al.*, « Impact of Surface Polyethylene Glycol (PEG) Density on Biodegradable Nanoparticle Transport in Mucus ex Vivo and Distribution in Vivo », *ACS Nano*, vol. 9, n° 9, p. 9217-9227, sept. 2015, doi: 10.1021/acsnano.5b03876.
- [46] N. R. Nelson, J. D. Port, et M. K. Pandey, « Use of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) via Multiple Imaging Modalities and

- Modifications to Reduce Cytotoxicity: An Educational Review », *Journal of Nanotheranostics*, vol. 1, n° 1, Art. n° 1, déc. 2020, doi: 10.3390/jnt1010008.
- [47] R. Alwi *et al.*, « Silica-coated super paramagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) as biocompatible contrast agent in biomedical photoacoustics », *Biomed. Opt. Express*, BOE, vol. 3, n° 10, p. 2500-2509, oct. 2012, doi: 10.1364/BOE.3.002500.
- [48] G. Muscas *et al.*, « Evolution of the magnetic structure with chemical composition in spinel iron oxide nanoparticles », *Nanoscale*, vol. 7, n° 32, p. 13576-13585, août 2015, doi: 10.1039/C5NR02723C.
- [49] A. Lak, *Synthesis and Characterization of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles*. Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2013.
- [50] Z. Li, C. Chanéac, G. Berger, S. Delaunay, A. Graff, et G. Lefèvre, « Mechanism and kinetics of magnetite oxidation under hydrothermal conditions », *RSC Advances*, vol. 9, n° 58, p. 33633-33642, 2019, doi: 10.1039/C9RA03234G.
- [51] A. G. Roca, J. F. Marco, M. del P. Morales, et C. J. Serna, « Effect of Nature and Particle Size on Properties of Uniform Magnetite and Maghemite Nanoparticles », *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, n° 50, p. 18577-18584, déc. 2007, doi: 10.1021/jp075133m.
- [52] J. B. Mamani, A. J. Costa-Filho, D. R. Cornejo, E. D. Vieira, et L. F. Gamarra, « Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles coated with lauric acid », *Materials Characterization*, vol. 81, p. 28-36, juill. 2013, doi: 10.1016/j.matchar.2013.04.001.
- [53] D. L. Huber, « Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles », *Small*, vol. 1, n° 5, p. 482-501, 2005, doi: 10.1002/sml.200500006.
- [54] J. Wallyn, N. Anton, et T. F. Vandamme, « Synthesis, Principles, and Properties of Magnetite Nanoparticles for In Vivo Imaging Applications—A Review », *Pharmaceutics*, vol. 11, n° 11, Art. n° 11, nov. 2019, doi: 10.3390/pharmaceutics11110601.
- [55] W. Wu, Q. He, et C. Jiang, « Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies », *Nanoscale Res Lett*, vol. 3, n° 11, p. 397, oct. 2008, doi: 10.1007/s11671-008-9174-9.
- [56] A. Ali *et al.*, « Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles », *Nanotechnol Sci Appl*, vol. 9, p. 49-67, août 2016, doi: 10.2147/NSA.S99986.
- [57] S. Parveen, R. Misra, et S. K. Sahoo, « Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 8, n° 2, p. 147-166, févr. 2012, doi: 10.1016/j.nano.2011.05.016.
- [58] « Nanomédicaments sur le marché de l'UE - ECHA ». <https://web.archive.org/web/20220806194432/https://euon.echa.europa.eu/fr/nanomedicines-on-the-eu-market> (consulté le 3 mai 2023).
- [59] T. Vangijzegem, D. Stanicki, et S. Laurent, « Magnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery: applications and characteristics », *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 16, n° 1, p. 69-78, janv. 2019, doi: 10.1080/17425247.2019.1554647.
- [60] A. Neuwelt, N. Sidhu, C.-A. A. Hu, G. Mlady, S. C. Eberhardt, et L. O. Sillerud, « Iron-Based Superparamagnetic Nanoparticle Contrast Agents for MRI of Infection and Inflammation », *AJR Am J Roentgenol*, vol. 204, n° 3, p. W302-W313, mars 2015, doi: 10.2214/AJR.14.12733.
- [61] A. K. Gupta et M. Gupta, « Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications », *Biomaterials*, vol. 26, n° 18, p. 3995-4021, juin 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012.

- [62] A. Espinosa, R. Di Corato, J. Kolosnjaj-Tabi, P. Flaud, T. Pellegrino, et C. Wilhelm, « Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment », *ACS Nano*, vol. 10, n° 2, p. 2436-2446, févr. 2016, doi: 10.1021/acsnano.5b07249.
- [63] S.-J. Huang, J.-H. Ke, G.-J. Chen, et L.-F. Wang, « One-pot synthesis of PDMAEMA-bound iron oxide nanoparticles for magnetofection », *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, n° 43, p. 5916-5924, nov. 2013, doi: 10.1039/C3TB21149E.
- [64] S. Alex et A. Tiwari, « Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications—A Review », *j nanosci nanotechnol*, vol. 15, n° 3, p. 1869-1894, mars 2015, doi: 10.1166/jnn.2015.9718.
- [65] O. PLUCHERY et M. CARRIERE, « Nanoparticules d'or », *Ref: TIP155WEB - Nanosciences et nanotechnologies*, 10 janvier 2011. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/innovation-th10/nanomateriaux-proprietes-42635210/nanoparticules-d-or-nm900/> (consulté le 20 juin 2019).
- [66] G. Schmid, « The relevance of shape and size of Au55 clusters », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 37, n° 9, p. 1909-1930, août 2008, doi: 10.1039/B713631P.
- [67] O. Mbanga, E. Cukrowska, et M. Gulumian, « Dissolution of citrate-stabilized, polyethylene glycol-coated carboxyl and amine-functionalized gold nanoparticles in simulated biological fluids and environmental media », *J Nanopart Res*, vol. 23, n° 1, p. 29, janv. 2021, doi: 10.1007/s11051-020-05132-x.
- [68] G. Schmid, W. G. Kreyling, et U. Simon, « Toxic effects and biodistribution of ultrasmall gold nanoparticles », *Arch Toxicol*, vol. 91, n° 9, p. 3011-3037, sept. 2017, doi: 10.1007/s00204-017-2016-8.
- [69] « EUSMI / European Soft Matter Infrastructure ». <https://eusmi-h2020.eu/access/wp4/NSL-BIOMA> (consulté le 16 mai 2023).
- [70] E. Pensa *et al.*, « The Chemistry of the Sulfur–Gold Interface: In Search of a Unified Model », *Acc. Chem. Res.*, vol. 45, n° 8, p. 1183-1192, août 2012, doi: 10.1021/ar200260p.
- [71] M. S. Rodrigues, J. Borges, C. Lopes, R. M. S. Pereira, M. I. Vasilevskiy, et F. Vaz, « Gas Sensors Based on Localized Surface Plasmon Resonances: Synthesis of Oxide Films with Embedded Metal Nanoparticles, Theory and Simulation, and Sensitivity Enhancement Strategies », *Applied Sciences*, vol. 11, n° 12, Art. n° 12, janv. 2021, doi: 10.3390/app11125388.
- [72] L. Wang *et al.*, « Iron oxide–gold core–shell nanoparticles and thin film assembly », *J. Mater. Chem.*, vol. 15, n° 18, p. 1821-1832, mai 2005, doi: 10.1039/B501375E.
- [73] L. C. Kennedy *et al.*, « A New Era for Cancer Treatment: Gold-Nanoparticle-Mediated Thermal Therapies », *Small*, vol. 7, n° 2, p. 169-183, 2011, doi: 10.1002/smll.201000134.
- [74] O. Varnavski, G. Ramakrishna, J. Kim, D. Lee, et T. Goodson, « Critical Size for the Observation of Quantum Confinement in Optically Excited Gold Clusters », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, n° 1, p. 16-17, janv. 2010, doi: 10.1021/ja907984r.
- [75] Y. Wu, M. R. K. Ali, K. Chen, N. Fang, et M. A. El-Sayed, « Gold nanoparticles in biological optical imaging », *Nano Today*, vol. 24, p. 120-140, févr. 2019, doi: 10.1016/j.nantod.2018.12.006.
- [76] H. L. Perry, R. M. Botnar, et J. D. E. T. Wilton-Ely, « Gold nanomaterials functionalised with gadolinium chelates and their application in multimodal imaging and therapy », *Chemical Communications*, vol. 56, n° 29, p. 4037-4046, 2020, doi: 10.1039/D0CC00196A.

-
- [77] P. Cherukuri, E. S. Glazer, et S. A. Curley, « Targeted hyperthermia using metal nanoparticles », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62, n° 3, p. 339-345, mars 2010, doi: 10.1016/j.addr.2009.11.006.
- [78] S. Her, D. A. Jaffray, et C. Allen, « Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 109, p. 84-101, janv. 2017, doi: 10.1016/j.addr.2015.12.012.
- [79] P. G. Calavia, G. Bruce, L. Pérez-García, et D. A. Russell, « Photosensitiser-gold nanoparticle conjugates for photodynamic therapy of cancer », *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 17, n° 11, p. 1534-1552, nov. 2018, doi: 10.1039/C8PP00271A.
- [80] B. Duncan, C. Kim, et V. M. Rotello, « Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems », *Journal of Controlled Release*, vol. 148, n° 1, p. 122-127, nov. 2010, doi: 10.1016/j.jconrel.2010.06.004.
- [81] M. J. Hajipour *et al.*, « An Overview of Nanoparticle Protein Corona Literature », *Small*, vol. n/a, n° n/a, p. 2301838, doi: 10.1002/sml.202301838.
- [82] J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, et L. M. Ensign, « PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 99, p. 28-51, avr. 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.09.012.
- [83] Y. (Chezy) Barenholz, « Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned », *Journal of Controlled Release*, vol. 160, n° 2, p. 117-134, juin 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.020.
- [84] G. Rivera-Hernández, M. Antunes-Ricardo, P. Martínez-Morales, et M. L. Sánchez, « Polyvinyl alcohol based-drug delivery systems for cancer treatment », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 600, p. 120478, mai 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120478.
- [85] W. Li, M. Li, et J. Qi, « Nano-Drug Design Based on the Physiological Properties of Glutathione », *Molecules*, vol. 26, n° 18, Art. n° 18, janv. 2021, doi: 10.3390/molecules26185567.
- [86] L. Abarca-Cabrera, P. Fraga-García, et S. Berensmeier, « Bio-nano interactions: binding proteins, polysaccharides, lipids and nucleic acids onto magnetic nanoparticles », *Biomaterials Research*, vol. 25, n° 1, p. 12, avr. 2021, doi: 10.1186/s40824-021-00212-y.
- [87] M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, et K. A. Dawson, « Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, n° 38, Art. n° 38, 2008.
- [88] M. P. Monopoli, F. B. Bombelli, et K. A. Dawson, « Nanoparticle coronas take shape », 2011.
- [89] J. Lazarovits, Y. Yang Chen, E. A. Sykes, et W. C. W. Chan, « Nanoparticle-blood interactions: the implications on solid tumour targeting », *Chemical Communications*, vol. 51, n° 14, p. 2756-2767, 2015, doi: 10.1039/C4CC07644C.
- [90] A. E. Nel *et al.*, « Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano-Bio Interface », *Nat. Mater.*, vol. 8, p. 543, 2009.
- [91] M. Rahman, S. Laurent, N. Tawil, L. Yahia, et M. Mahmoudi, *Protein-Nanoparticle Interactions: The Bio-Nano Interface*, vol. 15. in Springer Series in Biophysics, vol. 15. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. doi: 10.1007/978-3-642-37555-2.
- [92] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, et T. Sen, « Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and

- applications in chemotherapy », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, n° 1, p. 24-46, janv. 2011, doi: 10.1016/j.addr.2010.05.006.
- [93] L. Vroman et A. L. Adams, « Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces », *Surface Science*, vol. 16, p. 438-446, août 1969, doi: 10.1016/0039-6028(69)90037-5.
- [94] H. P. Felgueiras, J. C. Antunes, M. C. L. Martins, et M. A. Barbosa, « 1 - Fundamentals of protein and cell interactions in biomaterials », in *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair*, M. A. Barbosa et M. C. L. Martins, Éd., Woodhead Publishing, 2018, p. 1-27. doi: 10.1016/B978-0-08-100803-4.00001-2.
- [95] R. García-Álvarez et M. Vallet-Regí, « Hard and Soft Protein Corona of Nanomaterials: Analysis and Relevance », *Nanomaterials*, vol. 11, n° 4, p. 888, avr. 2021, doi: 10.3390/nano11040888.
- [96] D. Walczyk, F. B. Bombelli, M. P. Monopoli, I. Lynch, et K. A. Dawson, « What the Cell “Sees” in Bionanoscience », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, n° 16, p. 5761-5768, avr. 2010, doi: 10.1021/ja910675v.
- [97] I. Capjak, S. Š. Goreta, D. D. Jurašin, et I. V. Vrčec, « How protein coronas determine the fate of engineered nanoparticles in biological environment », *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, vol. 68, n° 4, p. 245-253, déc. 2017, doi: 10.1515/aiht-2017-68-3054.
- [98] I. Lynch, K. A. Dawson, et S. Linse, « Detecting Cryptic Epitopes Created by Nanoparticles », *Sci. STKE*, vol. 2006, n° 327, p. pe14-pe14, mars 2006, doi: 10.1126/stke.3272006pe14.
- [99] A. L. Lira, R. S. Ferreira, R. J. S. Torquato, M. L. V. Oliva, P. Schuck, et A. A. Sousa, « Allosteric inhibition of α -thrombin enzymatic activity with ultrasmall gold nanoparticles », *Nanoscale Adv.*, vol. 1, n° 1, p. 378-388, janv. 2019, doi: 10.1039/C8NA00081F.
- [100] I. Lynch, K. A. Dawson, et S. Linse, « Detecting Cryptic Epitopes Created by Nanoparticles », *Science Signaling*, vol. 2006, n° 327, p. pe14-pe14, mars 2006, doi: 10.1126/stke.3272006pe14.
- [101] A. Lanzavecchia, « How can cryptic epitopes trigger autoimmunity? », *Journal of Experimental Medicine*, vol. 181, n° 6, p. 1945-1948, juin 1995, doi: 10.1084/jem.181.6.1945.
- [102] L. Treuel, S. Brandholt, P. Maffre, S. Wiegele, L. Shang, et G. U. Nienhaus, « Impact of Protein Modification on the Protein Corona on Nanoparticles and Nanoparticle–Cell Interactions », *ACS Nano*, vol. 8, n° 1, p. 503-513, janv. 2014, doi: 10.1021/nn405019v.
- [103] L. Marichal *et al.*, « Protein–Nanoparticle Interactions: What Are the Protein–Corona Thickness and Organization? », *Langmuir*, vol. 35, n° 33, p. 10831-10837, août 2019, doi: 10.1021/acs.langmuir.9b01373.
- [104] N. Singh, C. Marets, J. Boudon, N. Millot, L. Saviot, et L. Maurizi, « In vivo protein corona on nanoparticles: does the control of all material parameters orient the biological behavior? », *Nanoscale Advances*, vol. 3, n° 5, p. 1209-1229, 2021, doi: 10.1039/D0NA00863J.
- [105] Priya, Naveen, K. Kaur, et A. K. Sidhu, « Green Synthesis: An Eco-friendly Route for the Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles », *Frontiers in Nanotechnology*, vol. 3, 2021, Consulté le: 10 janvier 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnano.2021.655062>
- [106] K. Mylkie, P. Nowak, P. Rybczynski, et M. Ziegler-Borowska, « Polymer-Coated Magnetite Nanoparticles for Protein Immobilization », *Materials*, vol. 14, n° 2, Art. n° 2, janv. 2021, doi: 10.3390/ma14020248.

-
- [107] N. Ajinkya, X. Yu, P. Kaithal, H. Luo, P. Somani, et S. Ramakrishna, « Magnetic Iron Oxide Nanoparticle (IONP) Synthesis to Applications: Present and Future », *Materials*, vol. 13, n° 20, Art. n° 20, janv. 2020, doi: 10.3390/ma13204644.
- [108] A. Petri-Fink, M. Chastellain, L. Juillerat-Jeanneret, A. Ferrari, et H. Hofmann, « Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells », *Biomaterials*, vol. 26, n° 15, p. 2685-2694, mai 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.023.
- [109] R. Massart, « Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media », *IEEE Transactions on Magnetics*, vol. 17, n° 2, p. 1247-1248, mars 1981, doi: 10.1109/TMAG.1981.1061188.
- [110] N. M. Nor, K. A. Razak, et Z. Lockman, « Glucose-sensing properties of citrate-functionalized maghemite nanoparticle-modified indium tin oxide electrodes », *Journal of Materials Research*, vol. 35, n° 10, p. 1279-1289, mai 2020, doi: 10.1557/jmr.2020.104.
- [111] R. D. Vinluan *et al.*, « Glutathione-Coated Luminescent Gold Nanoparticles: A Surface Ligand for Minimizing Serum Protein Adsorption », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, n° 15, p. 11829-11833, août 2014, doi: 10.1021/am5031374.
- [112] « Dynamic Light Scattering (DLS) - Definition & Terms | Malvern Panalytical ». <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/whitepapers/wp111214dlstermsdefined> (consulté le 11 janvier 2023).
- [113] D. Maity et D. C. Agrawal, « Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media », *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 308, n° 1, p. 46-55, janv. 2007, doi: 10.1016/j.jmmm.2006.05.001.
- [114] G. Thomas, « Nanoparticules de magnétite fonctionnalisées pour l'imagerie bimodale IRM/TEP », phdthesis, Université de Bourgogne, 2015. Consulté le: 16 juillet 2020. [En ligne]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01250990>
- [115] L. Maurizi, U. Sakulkhu, A. Gramoun, J.-P. Vallee, et H. Hofmann, « A fast and reproducible method to quantify magnetic nanoparticle biodistribution », *Analyst*, vol. 139, n° 5, p. 1184-1191, 2014, doi: 10.1039/C3AN02153J.
- [116] M. C. Santos, A. B. Seabra, M. T. Pelegrino, et P. S. Haddad, « Synthesis, characterization and cytotoxicity of glutathione- and PEG-glutathione-superparamagnetic iron oxide nanoparticles for nitric oxide delivery », *Applied Surface Science*, vol. 367, p. 26-35, mars 2016, doi: 10.1016/j.apsusc.2016.01.039.
- [117] A. Loiseau, « Nanotubes de titanate comme nanovecteurs polyvalents : radiosensibilisants du cancer de la prostate et sondes pour l'imagerie nucléaire », nov. 2017, Consulté le: 3 octobre 2019. [En ligne]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01799566>
- [118] B. R. Strohmeier et T. F. Scientific, « XPS Surface Characterization of Disposable Laboratory Gloves and the Transfer of Glove Components to Other Surfaces ».
- [119] « XPS,AES,UPS and ESCA, laSurface.com ». <http://www.lasurface.com/accueil/> (consulté le 31 janvier 2023).
- [120] « X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) Reference Pages ». <http://www.xpsfitting.com/> (consulté le 31 janvier 2023).
- [121] L. Maurizi *et al.*, « Influence of Surface Charge and Polymer Coating on Internalization and Biodistribution of Polyethylene Glycol-Modified Iron Oxide Nanoparticles », *j biomed nanotechnol*, vol. 11, n° 1, p. 126-136, janv. 2015, doi: 10.1166/jbn.2015.1996.

-
- [122] G. Thomas *et al.*, « Innovative Magnetic Nanoparticles for PET/MRI Bimodal Imaging », *ACS Omega*, vol. 4, n° 2, p. 2637-2648, févr. 2019, doi: 10.1021/acsomega.8b03283.
- [123] C. Daruich De Souza, B. Ribeiro Nogueira, et M. E. C. M. Rostelato, « Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction », *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 798, p. 714-740, août 2019, doi: 10.1016/j.jallcom.2019.05.153.
- [124] C. Ziegler et A. Eychmüller, « Seeded Growth Synthesis of Uniform Gold Nanoparticles with Diameters of 15–300 nm », *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, n° 11, p. 4502-4506, mars 2011, doi: 10.1021/jp1106982.
- [125] K. Sun, J. Qiu, J. Liu, et Y. Miao, « Preparation and characterization of gold nanoparticles using ascorbic acid as reducing agent in reverse micelles », *J Mater Sci*, vol. 44, n° 3, p. 754-758, févr. 2009, doi: 10.1007/s10853-008-3162-4.
- [126] R. Teimuri-mofrad, R. Hadi, B. Tahmasebi, S. Farhoudian, M. Mehravar, et R. Nasiri, « Green synthesis of gold nanoparticles using plant extract: Mini-review », *Nanochemistry Research*, vol. 2, n° 1, p. 8-19, janv. 2017, doi: 10.22036/ncr.2017.01.002.
- [127] A. Si, K. Pal, S. Kralj, G. S. El-Sayyad, F. G. de Souza, et T. Narayanan, « Sustainable preparation of gold nanoparticles via green chemistry approach for biogenic applications », *Materials Today Chemistry*, vol. 17, p. 100327, sept. 2020, doi: 10.1016/j.mtchem.2020.100327.
- [128] S. Ying *et al.*, « Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations », *Environmental Technology & Innovation*, vol. 26, p. 102336, mai 2022, doi: 10.1016/j.eti.2022.102336.
- [129] L. Shi, E. Buhler, F. Boué, et F. Carn, « How does the size of gold nanoparticles depend on citrate to gold ratio in Turkevich synthesis? Final answer to a debated question », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 492, p. 191-198, avr. 2017, doi: 10.1016/j.jcis.2016.10.065.
- [130] J. Turkevich, P. C. Stevenson, et J. Hillier, « A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold », *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 11, p. 55, 1951, doi: 10.1039/df9511100055.
- [131] I. Ojea-Jiménez, N. G. Bastús, et V. Puntes, « Influence of the Sequence of the Reagents Addition in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles », *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, n° 32, p. 15752-15757, août 2011, doi: 10.1021/jp2017242.
- [132] Y. Gao et L. Torrente-Murciano, « Mechanistic insights of the reduction of gold salts in the Turkevich protocol », *Nanoscale*, vol. 12, n° 4, p. 2740-2751, 2020, doi: 10.1039/C9NR08877F.
- [133] M. Wuthschick *et al.*, « Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis », *ACS Nano*, vol. 9, n° 7, p. 7052-7071, juill. 2015, doi: 10.1021/acsnano.5b01579.
- [134] E. Méndez, P. Fagúndez, P. Sosa, M. V. Gutiérrez, et S. Botasini, « Experimental evidences support the existence of an aggregation/disaggregation step in the Turkevich synthesis of gold nanoparticles », *Nanotechnology*, vol. 32, n° 4, p. 045603, janv. 2021, doi: 10.1088/1361-6528/abfd5.
- [135] F. Kettemann *et al.*, « Missing Piece of the Mechanism of the Turkevich Method: The Critical Role of Citrate Protonation », *Chem. Mater.*, vol. 28, n° 11, p. 4072-4081, juin 2016, doi: 10.1021/acs.chemmater.6b01796.
- [136] D. Grasseschi, R. A. Ando, H. E. Toma, et V. M. Zamarion, « Unraveling the nature of Turkevich gold nanoparticles: the unexpected role of the dicarboxyketone species », *RSC Advances*, vol. 5, n° 8, p. 5716-5724, 2015, doi: 10.1039/C4RA12161A.

- [137] G. Liu, X. Yang, Y. Li, Z. Yang, W. Hong, et J. Liu, « Continuous Flow Controlled Synthesis of Gold Nanoparticles Using Pulsed Mixing Microfluidic System », *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2015, p. e160819, nov. 2015, doi: 10.1155/2015/160819.
- [138] J. Polte, « Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective », *CrystEngComm*, vol. 17, n° 36, p. 6809-6830, 2015, doi: 10.1039/C5CE01014D.
- [139] C. Daruich De Souza, B. Ribeiro Nogueira, et M. E. C. M. Rostelato, « Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction », *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 798, p. 714-740, août 2019, doi: 10.1016/j.jallcom.2019.05.153.
- [140] L. Panariello *et al.*, « Highly reproducible, high-yield flow synthesis of gold nanoparticles based on a rational reactor design exploiting the reduction of passivated Au(III) », *React. Chem. Eng.*, vol. 5, n° 4, p. 663-676, 2020, doi: 10.1039/C9RE00469F.
- [141] K. Zabetakis, W. E. Ghann, S. Kumar, et M.-C. Daniel, « Effect of high gold salt concentrations on the size and polydispersity of gold nanoparticles prepared by an extended Turkevich–Frens method », *Gold Bull*, vol. 45, n° 4, p. 203-211, déc. 2012, doi: 10.1007/s13404-012-0069-2.
- [142] X. Ji, X. Song, J. Li, Y. Bai, W. Yang, et X. Peng, « Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, n° 45, p. 13939-13948, nov. 2007, doi: 10.1021/ja074447k.
- [143] W. Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, et D. G. Fernig, « Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra », *Anal. Chem.*, vol. 79, n° 11, p. 4215-4221, juin 2007, doi: 10.1021/ac0702084.
- [144] X.-D. Zhang *et al.*, « Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles », *Int J Nanomedicine*, vol. 6, p. 2071-2081, 2011, doi: 10.2147/IJN.S21657.
- [145] Y. Q. He, S. P. Liu, L. Kong, et Z. F. Liu, « A study on the sizes and concentrations of gold nanoparticles by spectra of absorption, resonance Rayleigh scattering and resonance non-linear scattering », *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 61, n° 13, p. 2861-2866, oct. 2005, doi: 10.1016/j.saa.2004.10.035.
- [146] R. P. Briñas, M. Hu, L. Qian, E. S. Lyman, et J. F. Hainfeld, « Gold Nanoparticle Size Controlled by Polymeric Au(I) Thiolate Precursor Size », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, n° 3, p. 975-982, janv. 2008, doi: 10.1021/ja076333e.
- [147] N. Verimli, A. Demiral, H. Yilmaz, M. Çulha, et S. S. Erdem, « Design of Dense Brush Conformation Bearing Gold Nanoparticles as Theranostic Agent for Cancer », *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 189, n° 3, p. 709-728, nov. 2019, doi: 10.1007/s12010-019-03151-6.
- [148] H. Chang *et al.*, « Silica Nanoparticles », in *Nanotechnology for Bioapplications*, B.-H. Jun, Éd., in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Singapore: Springer, 2021, p. 41-65. doi: 10.1007/978-981-33-6158-4_3.
- [149] W. Stöber, A. Fink, et E. Bohn, « Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 26, n° 1, p. 62-69, janv. 1968, doi: 10.1016/0021-9797(68)90272-5.
- [150] P. P. Ghimire et M. Jaroniec, « Renaissance of Stöber method for synthesis of colloidal particles: New developments and opportunities », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 584, p. 838-865, févr. 2021, doi: 10.1016/j.jcis.2020.10.014.
- [151] C. G. Tan, B. D. Bowen, et N. Epstein, « Production of monodisperse colloidal silica spheres: Effect of temperature », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 118, n° 1, p. 290-293, juill. 1987, doi: 10.1016/0021-9797(87)90458-9.

-
- [152] « Raman spectrum of Ethanol | PublicSpectra ». <https://publicspectra.com/Raman/Ethanol> (consulté le 27 avril 2023).
- [153] M. Mahmoudi, « The need for improved methodology in protein corona analysis », *Nat Commun*, vol. 13, n° 1, Art. n° 1, janv. 2022, doi: 10.1038/s41467-021-27643-4.
- [154] C. Carrillo-Carrion, M. Carril, et W. J. Parak, « Techniques for the experimental investigation of the protein corona », *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 46, p. 106-113, août 2017, doi: 10.1016/j.copbio.2017.02.009.
- [155] Y. Li et J.-S. Lee, « Insights into Characterization Methods and Biomedical Applications of Nanoparticle-Protein Corona », *Materials*, vol. 13, n° 14, Art. n° 14, janv. 2020, doi: 10.3390/ma13143093.
- [156] A. A. Ashkarran, H. Gharibi, E. Voke, M. P. Landry, A. A. Saei, et M. Mahmoudi, « Measurements of heterogeneity in proteomics analysis of the nanoparticle protein corona across core facilities », *Nat Commun*, vol. 13, n° 1, Art. n° 1, nov. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-34438-8.
- [157] U. Sakulkhu, M. Mahmoudi, L. Maurizi, J. Salaklang, et H. Hofmann, « Protein Corona Composition of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Various Physico-Chemical Properties and Coatings », *Sci Rep*, vol. 4, n° 1, p. 5020, mai 2015, doi: 10.1038/srep05020.
- [158] S. Galmarini *et al.*, « Beyond Unpredictability: The Importance of Reproducibility in Understanding the Protein Corona of Nanoparticles », *Bioconjugate Chem.*, vol. 29, n° 10, p. 3385-3393, oct. 2018, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00554.
- [159] D. H. Lundgren, S.-I. Hwang, L. Wu, et D. K. Han, « Role of spectral counting in quantitative proteomics », *Expert Review of Proteomics*, vol. 7, n° 1, p. 39-53, févr. 2010, doi: 10.1586/epr.09.69.
- [160] H. Y. Lee *et al.*, « Refinements of LC-MS/MS Spectral Counting Statistics Improve Quantification of Low Abundance Proteins », *Sci Rep*, vol. 9, n° 1, Art. n° 1, sept. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-49665-1.
- [161] U. Sakulkhu *et al.*, « Significance of surface charge and shell material of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) based core/shell nanoparticles on the composition of the protein corona », *Biomater. Sci.*, vol. 3, n° 2, p. 265-278, 2015, doi: 10.1039/C4BM00264D.
- [162] N. Liu, M. Tang, et J. Ding, « The interaction between nanoparticles-protein corona complex and cells and its toxic effect on cells », *Chemosphere*, vol. 245, p. 125624, avr. 2020, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125624.
- [163] M. H. Akhter *et al.*, « Impact of Protein Corona on the Biological Identity of Nanomedicine: Understanding the Fate of Nanomaterials in the Biological Milieu », *Biomedicines*, vol. 9, n° 10, Art. n° 10, oct. 2021, doi: 10.3390/biomedicines9101496.
- [164] N. Ye, « The MDS-ANAVA technique for assessing knowledge representation differences between skill groups », *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics - Part A: Systems and Humans*, vol. 28, n° 5, p. 586-600, sept. 1998, doi: 10.1109/3468.709603.
- [165] I. Borg et P. J. F. Goenen, *Modern Multidimensional Scaling*. in Springer Series in Statistics. New York, NY: Springer, 2005. doi: 10.1007/0-387-28981-X.

Bibliographie de la publication *Nanoscale Advances* (chapitre 1)

- 1 Y. C. Dong, M. Hajfathalian, P. S. N. Maidment, J. C. Hsu, P. C. Naha, S. Si-Mohamed, M. Breuilly, J. Kim, P. Chhour, P. Douek, H. I. Litt and D. P. Cormode, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 14912.
- 2 S. M. Dadfar, K. Roemhild, N. I. Drude, S. von Stillfried, R. Knuechel, F. Kiessling and T. Lammers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2019, **138**, 302–325.
- 3 G. Thomas, J. Boudon, L. Maurizi, M. Moreau, P. Walker, I. Severin, A. Oudot, C. Goze, S. Poty, J.-M. Vrigneaud, F. Demoisson, F. Denat, F. Brunotte and N. Millot, *ACS Omega*, 2019, **4**, 2637–2648.
- 4 A. N. Pande, R. H. Kohler, E. Aikawa, R. Weissleder and F. A. Jaffer, *J. Biomed. Opt.*, , DOI:10.1117/1.2186337.
- 5 Y. Qiao, J. Wan, L. Zhou, W. Ma, Y. Yang, W. Luo, Z. Yu and H. Wang, *Wiley Interdiscip. Rev.-Nanomedicine Nanobiotechnology*, 2019, **11**, e1527.
- 6 A. T. Haine and T. Niidome, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 2017, **65**, 625–628.
- 7 D. Kalyane, N. Raval, R. Maheshwari, V. Tambe, K. Kalia and R. K. Tekade, *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.*, 2019, **98**, 1252–1276.
- 8 A. Loiseau, J. Boudon, C. Mirjolet, G. Créhange and N. Millot, *Adv. Healthc. Mater.*, , DOI:10.1002/adhm.201700245.
- 9 K. H. Bae, M. Park, M. J. Do, N. Lee, J. H. Ryu, G. W. Kim, C. Kim, T. G. Park and T. Hyeon, *ACS Nano*, 2012, **6**, 5266–5273.
- 10 F. Perton, M. Tasso, G. A. Munoz Medina, M. Menard, C. Blanco-Andujar, E. Portiansky, M. B. Fernandez van Raap, D. Begin, F. Meyer, S. Begin-Colin and D. Mertz, *Appl. Mater. Today*, 2019, **16**, 301–314.
- 11 S. Akbarzadeh, R. Naderi and M. Mahdavian, *Compos. Part B Eng.*, 2019, **175**, 107109.
- 12 S. Grafmueller, P. Manser, L. Diener, L. Maurizi, P.-A. Diener, H. Hofmann, W. Jochum, H. F. Krug, T. Buerki-Thurnherr, U. von Mandach and P. Wick, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 2015, **16**, 044602.
- 13 R. Hachani, M. Lowdell, M. Birchall, A. Hervault, D. Mertz, S. Begin-Coline and N. T. K. Thanh, *Nanoscale*, 2016, **8**, 3278–3287.
- 14 M. J. Waring, J. Arrowsmith, A. R. Leach, P. D. Leeson, S. Mandrell, R. M. Owen, G. Pairaudeau, W. D. Pennie, S. D. Pickett and J. Wang, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2015, **14**, 475–486.
- 15 M. Xu, M. G. Soliman, X. Sun, B. Pelaz, N. Feliu, W. J. Parak and S. Liu, *ACS Nano*, 2018, **12**, 10104–10113.
- 16 X. Xue, Y. Huang, R. Bo, B. Jia, H. Wu, Y. Yuan, Z. Wang, Z. Ma, D. Jing, X. Xu, W. Yu, T.-Y. Lin and Y. Li, *Nat. Commun.*, 2018, **9**, 3653.
- 17 L. Maurizi, A.-L. Papa, L. Dumont, F. Bouyer, P. Walker, D. Vandroux and N. Millot, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2015, **11**, 126–136.
- 18 M. Roser, D. Fischer and T. Kissel, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1998, **46**, 255–263.
- 19 I. Zelepukin, A. Yaremenko, M. Yuryev, A. B. Mirkasymov, I. L. Sokolov, S. M. Deyev, P. Nikitin and M. P. Nikitin, *J. Controlled Release*, 2020, **326**, 181–191.
- 20 T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson and S. Linse, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 2050–2055.
- 21 V. P. Zhdanov and N.-J. Cho, *Math. Biosci.*, 2016, **282**, 82–90.
- 22 D. Nierenberg, A. R. Khaled and O. Flores, *Rep. Pract. Oncol. Radiother.*, 2018, **23**, 300–308.
- 23 C. D. Walkey and W. C. W. Chan, *Chem Soc Rev*, 2012, **41**, 2780–2799.
- 24 H. Wang, L. Shang, P. Maffre, S. Hohmann, F. Kirschhöfer, G. Brenner-Weiß and G. U. Nienhaus, *Small*, 2016, **12**, 5836–5844.

- 25 M. de Sousa, C. H. Z. Martins, L. S. Franqui, L. C. Fonseca, F. S. Delite, E. M. Lanzoni, D. S. T. Martinez and O. L. Alves, *J. Mater. Chem. B*, 2018, **6**, 2803–2812.
- 26 M. Lundqvist, J. Stigler, T. Cedervall, T. Berggård, M. B. Flanagan, I. Lynch, G. Elia and K. Dawson, *ACS Nano*, 2011, **5**, 7503–7509.
- 27 T. Lima, K. Bernfur, M. Vilanova and T. Cedervall, *Sci. Rep.*, 2020, **10**, 1–9.
- 28 G. Grassi, C. Landi, C. Della Torre, E. Bergami, L. Bini and I. Corsi, *Environ. Sci. Nano*, 2019, **6**, 2937–2947.
- 29 R. M. Visalakshan, L. E. G. García, M. R. Benzigar, A. Ghazaryan, J. Simon, A. Mierczynska-Vasilev, T. D. Michl, A. Vinu, V. Mailänder, S. Morsbach, K. Landfester and K. Vasilev, *Small*, 2020, **16**, 2000285.
- 30 M. Mahmoudi, M. A. Sahraian, M. A. Shokrgozar and S. Laurent, *ACS Chem. Neurosci.*, 2011, **2**, 118–140.
- 31 U. Sakulkhu, M. Mahmoudi, L. Maurizi, J. Salaklang and H. Hofmann, *Sci. Rep.*, 2014, **4**, 5020.
- 32 S. Reymond-Laruinaz, L. Saviot, V. Potin and M. del C. Marco de Lucas, *Appl. Surf. Sci.*, 2016, **389**, 17–24.
- 33 W. Xiao and H. Gao, *Int. J. Pharm.*, 2018, **552**, 328–339.
- 34 B.-J. L. Van Hong Nguyen, *Int. J. Nanomedicine*, 2017, **12**, 3137.
- 35 P. Foroozandeh and A. A. Aziz, *Nanoscale Res. Lett.*, 2015, **10**, 221.
- 36 M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall and K. A. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2008, **105**, 14265–14270.
- 37 H. Ruh, B. Köhl, G. Brenner-Weiss, C. Hopf, S. Diabaté and C. Weiss, *Toxicol. Lett.*, 2012, **208**, 41–50.
- 38 X. Cheng, X. Tian, A. Wu, J. Li, J. Tian, Y. Chong, Z. Chai, Y. Zhao, C. Chen and C. Ge, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, **7**, 20568–20575.
- 39 S. Schöttler, K. Landfester and V. Mailänder, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, **55**, 8806–8815.
- 40 N. Bertrand, P. Grenier, M. Mahmoudi, E. M. Lima, E. A. Appel, F. Dormont, J.-M. Lim, R. Karnik, R. Langer and O. C. Farokhzad, *Nat. Commun.*, 2017, **8**, 1–8.
- 41 X. Lu, P. Xu, H.-M. Ding, Y.-S. Yu, D. Huo and Y.-Q. Ma, *Nat. Commun.*, 2019, **10**, 1–14.
- 42 F. Barbero, L. Russo, M. Vitali, J. Piella, I. Salvo, M. L. Borrajo, M. Busquets-Fité, R. Grandori, N. G. Bastús and E. Casals, Elsevier, 2017, vol. 34, pp. 52–60.
- 43 G. Berrecoso, J. Crecente-Campo and M. J. Alonso, *Drug Deliv. Transl. Res.*, 2020, 1–21.
- 44 D. Docter, S. Strieth, D. Westmeier, O. Hayden, M. Gao, S. K. Knauer and R. H. Stauber, *Nanomed.*, 2015, **10**, 503–519.
- 45 F. S. M. Tekie, M. Hajiramezanali, P. Geramifar, M. Raoufi, R. Dinarvand, M. Soleimani and F. Atyabi, *Sci. Rep.*, 2020, **10**, 9664.
- 46 K. Partikel, R. Korte, D. Mulac, H.-U. Humpf and K. Langer, *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2019, **10**, 1002–1015.
- 47 F. E. Galdino, A. S. Picco, M. L. Sforca, M. B. Cardoso and W. Loh, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2020, **186**, 110677.
- 48 V. Gorshkov, J. A. Bubis, E. M. Solovyeva, M. V. Gorshkov and F. Kjeldsen, *Environ. Sci. Nano*, 2019, **6**, 1089–1098.
- 49 L. Treuel, D. Docter, M. Maskos and R. H. Stauber, *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2015, **6**, 857–873.
- 50 Z. E. Allouni, N. R. Gjerdet, M. R. Cimpan and P. J. Høl, *Int. J. Nanomedicine*, 2015, **10**, 687.
- 51 S. Kihara, N. J. van der Heijden, C. K. Seal, J. P. Mata, A. E. Whitten, I. Köper and D. J. McGilivray, *Bioconjug. Chem.*, 2019, **30**, 1067–1076.
- 52 Z. Hu, H. Zhang, Y. Zhang, R. Wu and H. Zou, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2014, **121**, 354–361.

-
- 53 H. Zhang, J. Peng, X. Li, S. Liu, Z. Hu, G. Xu and R. Wu, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2018, **167**, 220–228.
- 54 Y. T. Ho, R. D. Kamm and J. C. Y. Kah, *Nanoscale*, 2018, **10**, 12386–12397.
- 55 Y. Li and N. A. Monteiro-Riviere, *Nanomed.*, 2016, **11**, 3185–3203.
- 56 K. A. Binnemars-Postma, H. W. ten Hoopen, G. Storm and J. Prakash, *Nanomed.*, 2016, **11**, 2889–2902.
- 57 L. Marichal, G. Klein, J. Armengaud, Y. Boulard, S. Chédin, J. Labarre, S. Pin, J.-P. Renault and J.-C. Aude, *Nanomaterials*, 2020, **10**, 240.
- 58 S. Angioletti-Uberti, M. Ballauff and J. Dzubiella, *Mol. Phys.*, 2018, **116**, 3154–3163.
- 59 P. Aggarwal, J. B. Hall, C. B. McLeland, M. A. Dobrovolskaia and S. E. McNeil, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, **61**, 428–437.
- 60 K. P. García, K. Zarschler, L. Barbaro, J. A. Barreto, W. O'Malley, L. Spiccia, H. Stephan and B. Graham, *Small*, 2014, **10**, 2516–2529.
- 61 D. F. Moyano, K. Saha, G. Prakash, B. Yan, H. Kong, M. Yazdani and V. M. Rotello, *ACS Nano*, 2014, **8**, 6748–6755.
- 62 M. Debayle, E. Balloul, F. Dembele, X. Xu, M. Hanafi, F. Ribot, C. Monzel, M. Coppey, A. Fragola and M. Dahan, *Biomaterials*, 2019, **219**, 119357.
- 63 A. Almalik, H. Benabdelkamel, A. Masood, I. O. Alanazi, I. Alradwan, M. A. Majrashi, A. A. Alfadda, W. M. Alghamdi, H. Alrabiah, N. Tirelli and A. H. Alhasan, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 10542.
- 64 C.-F. Wang, E. M. Mäkilä, C. Bonduelle, J. Rytönen, J. Raula, S. Almeida, A. Närvänen, J. J. Salonen, S. Lecommandoux, J. T. Hirvonen and H. A. Santos, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, **7**, 2006–2015.
- 65 G. Caracciolo, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, 2015, **11**, 543–557.
- 66 S. Qu, F. Sun, Z. Qiao, J. Li and L. Shang, *Small*, 2020, **16**, 1907633.
- 67 F. Bertoli, D. Garry, M. P. Monopoli, A. Salvati and K. A. Dawson, *ACS Nano*, 2016, **10**, 10471–10479.
- 68 D. Burnand, A. Milosevic, S. Balog, M. Spuch-Calvar, B. Rothen-Rutishauser, J. Dengjel, C. Kinnear, T. L. Moore and A. Petri-Fink, *Small*, 2018, **14**, 1802088.
- 69 D. Chen, S. Ganesh, W. Wang and M. Amiji, *Nanoscale*, 2019, **11**, 8760–8775.
- 70 R. Cai, J. Ren, Y. Ji, Y. Wang, Y. Liu, Z. Chen, Z. Farhadi Sabet, X. Wu, I. Lynch and C. Chen, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, **12**, 1997–2008.
- 71 U. Sakulphu, M. Mahmoudi, L. Maurizi, G. Coullerez, M. Hofmann-Amttenbrink, M. Vries, M. Motazacker, F. Rezaee and H. Hofmann, *Biomater. Sci.*, 2015, **3**, 265–278.
- 72 P. Chandran, J. E. Riviere and N. A. Monteiro-Riviere, *Nanotoxicology*, 2017, **11**, 507–519.
- 73 N. Singh, J. Nayak, K. Patel, S. K. Sahoo and R. Kumar, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, **20**, 25812–25821.
- 74 A. Schrade, V. Mailänder, S. Ritz, K. Landfester and U. Ziener, *Macromol. Biosci.*, 2012, **12**, 1459–1471.
- 75 A. Piloni, C. K. Wong, F. Chen, M. Lord, A. Walther and M. H. Stenzel, *Nanoscale*, 2019, **11**, 23259–23267.
- 76 P. Foteini, N. Pippa, N. Naziris and C. Demetzos, *J. Liposome Res.*, 2019, **29**, 313–321.
- 77 Kenry, T. Yeo, P. N. Manghnani, E. Middha, Y. Pan, H. Chen, C. T. Lim and B. Liu, *ACS Nano*, 2020, **14**, 4509–4522.
- 78 L. Landgraf, C. Christner, W. Storck, I. Schick, I. Krumbein, H. Dähring, K. Haedicke, K. Heinz-Herrmann, U. Teichgräber and J. R. Reichenbach, *Biomaterials*, 2015, **68**, 77–88.
- 79 Z. Lin, B.-P. Jiang, J. Liang, C. Wen and X.-C. Shen, *Carbon*, 2019, **143**, 814–827.
- 80 T.-P. Liu, S.-H. Wu, Y.-P. Chen, C.-M. Chou and C.-T. Chen, *Nanoscale*, 2015, **7**, 6471–6480.

- 81 F. Xu, M. Reiser, X. Yu, S. Gummuluru, L. Wetzler and B. M. Reinhard, *ACS Nano*, 2016, **10**, 1189–1200.
- 82 S. Ruan, R. Xie, L. Qin, M. Yu, W. Xiao, C. Hu, W. Yu, Z. Qian, L. Ouyang and Q. He, *Nano Lett.*, 2019, **19**, 8318–8332.
- 83 N. Benne, J. van Duijn, F. L. Vigarito, R. J. Lebourg, P. van Veelen, J. Kuiper, W. Jiskoot and B. Slütter, *J. Controlled Release*, 2018, **291**, 135–146.
- 84 C. Gunawan, M. Lim, C. P. Marquis and R. Amal, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 2060–2083.
- 85 C. D. Walkey, J. B. Olsen, H. Guo, A. Emili and W. C. Chan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 2139–2147.
- 86 C. Sacchetti, K. Motamedchaboki, A. Magrini, G. Palmieri, M. Mattei, S. Bernardini, N. Rosato, N. Bottini and M. Bottini, *ACS Nano*, 2013, **7**, 1974–1989.
- 87 J. Kreuter, R. N. Alyautdin, D. A. Kharkevich and A. A. Ivanov, *Brain Res.*, 1995, **674**, 171–174.
- 88 K. Prapainop, D. P. Witter and P. Wentworth Jr, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 4100–4103.
- 89 Y. Wu, L. Li, L. Frank, J. Wagner, P. Andreozzi, B. Hammer, M. D’Alicarnasso, M. Pelliccia, W. Liu and S. Chakraborty, *ACS Nano*, 2019, **13**, 8749–8759.
- 90 D. E. Owens III and N. A. Peppas, *Int. J. Pharm.*, 2006, **307**, 93–102.
- 91 G. J. Pillai, B. Paul-Prasanth, S. V. Nair and D. Menon, *Colloids Surf. B-Biointerfaces*, 2017, **150**, 242–249.
- 92 T. Nissinen, S. Näkki, H. Laakso, D. Kučiauskas, A. Kaupinis, M. I. Kettunen, T. Liimatainen, M. Hyvönen, M. Valius, O. Gröhn and V.-P. Lehto, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, **8**, 32723–32731.
- 93 X.-J. Du, J.-L. Wang, W.-W. Liu, J.-X. Yang, C.-Y. Sun, R. Sun, H.-J. Li, S. Shen, Y.-L. Luo, X.-D. Ye, Y.-H. Zhu, X.-Z. Yang and J. Wang, *Biomaterials*, 2015, **69**, 1–11.
- 94 Z. Li, J. Zhu, Y. Wang, M. Zhou, D. Li, S. Zheng, C. Luo, H. Zhang, L. Zhong, W. Li, J. Wang, S. Gui, B. Cai, Y. Wang and J. Sun, *Asian J. Pharm. Sci.*, , DOI:10.1016/j.ajps.2019.05.002.
- 95 Z. Li, D. Li, Q. Li, C. Luo, J. Li, L. Kou, D. Zhang, H. Zhang, S. Zhao and Q. Kan, *Biomater. Sci.*, 2018, **6**, 2681–2693.
- 96 G. Stepien, M. Moros, M. Pérez-Hernández, M. Monge, L. Gutiérrez, R. M. Fratila, M. de Las Heras, S. Menao Guillén, J. J. Puente Lanzarote and C. Solans, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, **10**, 4548–4560.
- 97 P. Zhang, F. Sun, S. Liu and S. Jiang, *J. Controlled Release*, 2016, **244**, 184–193.
- 98 P. Grenier, I. M. de O. Viana, E. M. Lima and N. Bertrand, *J. Controlled Release*, 2018, **287**, 121–131.
- 99 X. Wang, C. Yang, C. Wang, L. Quo, T. Zhang, Z. Zhang, H. Yan and K. Liu, *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.*, 2016, **59**, 766–772.
- 100 D. Esposito, C. Conte, G. D. Poggetto, A. Russo, A. Barbieri, F. Ungaro, C. Arra, G. Russo, P. Laurienzo and F. Quaglia, *J. Mater. Chem. B*, 2018, **6**, 5922–5930.
- 101 C. D. Spicer, C. Jumeaux, B. Gupta and M. M. Stevens, *Chem. Soc. Rev.*, 2018, **47**, 3574–3620.
- 102 J. Kreuter, D. Shamenkov, V. Petrov, P. Ramge, K. Cychutek, C. Koch-Brandt and R. Alyautdin, *J. Drug Target.*, 2002, **10**, 317–325.
- 103 R. Dal Magro, F. Ornaghi, I. Cambianica, S. Beretta, F. Re, C. Musicanti, R. Rigolio, E. Donzelli, A. Canta, E. Ballarini, G. Cavaletti, P. Gasco and G. Sancini, *J. Controlled Release*, 2017, **249**, 103–110.
- 104 M. Mahmoudi, S. Sheibani, A. S. Milani, F. Rezaee, M. Gauberti, R. Dinarvand and H. Vali, *Nanomed.*, 2015, **10**, 215–226.
- 105 T. U. Wani, S. N. Raza and N. A. Khan, *Polym. Bull.*, 2020, **77**, 3865–3889.
- 106 R. Cagliani, F. Gatto and G. Bardi, *Materials*, 2019, **12**, 1991.
- 107 J. H. Park, J. A. Jackman, A. R. Ferhan, J. N. Belling, N. Mokrzecka, P. S. Weiss and N.-J. Cho, *ACS Nano*, 2020, **14**, 11950–11961.

-
- 108 H.-J. Chung, H.-J. Kim and S.-T. Hong, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, 2020, **23**, 102089.
- 109 N. V. Konduru, R. M. Molina, A. Swami, F. Damiani, G. Pyrgiotakis, P. Lin, P. Andreozzi, T. C. Donaghey, P. Demokritou and S. Krol, *Part. Fibre Toxicol.*, 2017, **14**, 42.
- 110 A. Wang, T. Yang, W. Fan, Y. Yang, Q. Zhu, S. Guo, C. Zhu, Y. Yuan, T. Zhang and Y. Gan, *Adv. Healthc. Mater.*, 2019, **8**, 1801123.
- 111 L. Gonzalez-Moragas, S.-M. Yu, E. Carenza, A. Laromaine and A. Roig, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2015, **1**, 1129–1138.
- 112 S.-M. Yu, L. Gonzalez-Moragas, M. Milla, A. Kolovou, R. Santarella-Mellwig, Y. Schwab, A. Laromaine and A. Roig, *Acta Biomater.*, 2016, **43**, 348–357.
- 113 Q. Peng, X.-Q. Wei, Q. Yang, S. Zhang, T. Zhang, X.-R. Shao, X.-X. Cai, Z.-R. Zhang and Y.-F. Lin, *Nanomed.*, 2015, **10**, 205–214.
- 114 C.-Y. Lin, C.-M. Yang and M. Lindén, *RSC Adv.*, 2019, **9**, 33912–33921.
- 115 E. L. L. Yeo, P. S. P. Thong, K. C. Soo and J. C. Y. Kah, *Nanoscale*, 2018, **10**, 2461–2472.
- 116 H. Cai, Y. Ma, Z. Wu, Y. Ding, P. Zhang, X. He, J. Zhou, Z. Chai and Z. Zhang, *NanoImpact*, 2016, **3–4**, 40–46.
- 117 R. Leibe, I.-L. Hsiao, S. Fritsch-Decker, U. Kielmeier, A. M. Wagbo, B. Voss, A. Schmidt, S. D. Hessman, A. Duschl and G. J. Oostingh, *Arch. Toxicol.*, 2019, **93**, 871–885.
- 118 K. Giri, I. Kuschnerus, J. Ruan and A. E. Garcia-Bennett, *Adv. Ther.*, 2020, **3**, 1900110.
- 119 U. Sakulkhu, L. Maurizi, M. Mahmoudi, M. Motazacker, M. Vries, A. Gramoun, M.-G. Ollivier Beuzelin, J.-P. Vallée, F. Rezaee and H. Hofmann, *Nanoscale*, 2014, **6**, 11439–11450.
- 120 P. S. Naidu, E. Denham, C. A. Bartlett, T. McGonigle, N. L. Taylor, M. Norret, N. M. Smith, S. A. Dunlop, K. S. Iyer and M. Fitzgerald, *RSC Adv.*, 2020, **10**, 2856–2869.
- 121 H. Zhang, T. Wu, W. Yu, S. Ruan, Q. He and H. Gao, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, **10**, 9094–9103.
- 122 C. Corbo, R. Molinaro, F. Taraballi, N. E. Toledano Furman, K. A. Hartman, M. B. Sherman, E. De Rosa, D. K. Kirui, F. Salvatore and E. Tasciotti, *ACS Nano*, 2017, **11**, 3262–3273.
- 123 Z. S. Al-Ahmady, M. Hadjidemetriou, J. Gubbins and K. Kostarelos, *J. Controlled Release*, 2018, **276**, 157–167.
- 124 K. Kristensen, T. B. Engel, A. Stensballe, J. B. Simonsen and T. L. Andresen, *J. Controlled Release*, 2019, **307**, 1–15.
- 125 N. Bertrand, P. Grenier, M. Mahmoudi, E. M. Lima, E. A. Appel, F. Dormont, J.-M. Lim, R. Karnik, R. Langer and O. C. Farokhzad, *Nat. Commun.*, 2017, **8**, 1–8.
- 126 R. García-Álvarez, M. Hadjidemetriou, A. Sánchez-Iglesias, L. M. Liz-Marzán and K. Kostarelos, *Nanoscale*, 2018, **10**, 1256–1264.
- 127 J. Lazarovits, S. Sindhvani, A. J. Tavares, Y. Zhang, F. Song, J. Audet, J. R. Krieger, A. M. Syed, B. Stordy and W. C. W. Chan, *ACS Nano*, 2019, **13**, 8023–8034.
- 128 Z. Liu, X. Zhan, X. Xu, Y. Wu and Z. Gu, *Part. Part. Syst. Charact.*, 2018, **35**, 1700418.
- 129 M. Hadjidemetriou, Z. Al-Ahmady and K. Kostarelos, *Nanoscale*, 2016, **8**, 6948–6957.
- 130 F. Chen, G. Wang, J. I. Griffin, B. Brenneman, N. K. Banda, V. M. Holers, D. S. Backos, L. Wu, S. M. Moghimi and D. Simberg, *Nat. Nanotechnol.*, 2017, **12**, 387–393.
- 131 M. Hadjidemetriou, Z. Al-ahmady, M. Buggio, J. Swift and K. Kostarelos, *Biomaterials*, 2019, **188**, 118–129.
- 132 M. Hadjidemetriou, S. McAdam, G. Garner, C. Thackeray, D. Knight, D. Smith, Z. Al-Ahmady, M. Mazza, J. Rogan, A. Clamp and K. Kostarelos, *Adv. Mater.*, 2019, **31**, 1970027.
- 133 F. K. Alanazi, D. R. Lu, F. Shakeel and N. Haq, *J. Liposome Res.*, 2014, **24**, 53–58.

- 134 E. Choice, A. Ayyobi, P. Pritchard and T. Madden, *Anal. Biochem.*, 1999, **270**, 1–8.
- 135 S. Shanehsazzadeh, C. Gruettner, A. Lahooti, M. Mahmoudi, B. J. Allen, M. Ghavami, F. J. Daha and M. A. Oghabian, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2015, **10**, 225–236.
- 136 A. Frère, A. Baroni, E. Hendrick, A.-S. Delvigne, F. Orange, O. Peulen, G. R. Dakwar, J. Diricq, P. Dubois, B. Evrard, K. Remaut, K. Braeckmans, S. C. De Smedt, J. Laloy, J.-M. Dogné, G. Feller, L. Mespouille, D. Mottet and G. Piel, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, **9**, 2181–2195.
- 137 M. Hadjidemetriou, Z. Al-Ahmady, M. Mazza, R. F. Collins, K. Dawson and K. Kostarelos, *Acs Nano*, 2015, **9**, 8142–8156.
- 138 G. Storm, F. Roerdink, P. Steerenberg, W. De Jong and D. Crommelin, *Cancer Res.*, 1987, **47**, 3366–3372.
- 139 R. K. Kottana, L. Maurizi, B. Schnoor, K. Morris, J. A. Webb, M. A. Massiah, N. Millot and A.-L. Papa, *Small*, 2020, **n/a**, 2004945.
- 140 A. Amici, G. Caracciolo, L. Digiaco, V. Gambini, C. Marchini, M. Tilio, A. L. Capriotti, V. Colapicchioni, R. Matassa, G. Familiari, S. Palchetti, D. Pozzi, M. Mahmoudi and A. Laganà, *RSC Adv.*, 2017, **7**, 1137–1145.
- 141 M. Mahmoudi, A. M. Abdelmonem, S. Behzadi, J. H. Clement, S. Dutz, M. R. Ejtehadi, R. Hartmann, K. Kantner, U. Linne and P. Maffre, *ACS Nano*, 2013, **7**, 6555–6562.
- 142 P. Jain, R. S. Pawar, R. S. Pandey, J. Madan, S. Pawar, P. K. Lakshmi and M. S. Sudheesh, *Biotechnol. Adv.*, 2017, **35**, 889–904.
- 143 G. Rezaei, S. M. Daghighi, I. Haririan, I. Yousefi, M. Raoufi, F. Rezaee and R. Dinarvand, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2019, **179**, 505–516.
- 144 V. Mirshafiee, R. Kim, M. Mahmoudi and M. L. Kraft, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2016, **75**, 188–195.
- 145 M. J. Hajipour, J. Raheb, O. Akhavan, S. Arjmand, O. Mashinchian, M. Rahman, M. Abdolahad, V. Serpooshan, S. Laurent and M. Mahmoudi, *Nanoscale*, 2015, **7**, 8978–8994.
- 146 G. Caracciolo, D. Pozzi, A. L. Capriotti, C. Cavaliere, S. Piovesana, G. L. Barbera, A. Amici and A. Laganà, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 7419–7428.
- 147 L. K. Müller, J. Simon, C. Rosenauer, V. Mailänder, S. Morsbach and K. Landfester, *Biomacromolecules*, 2018, **19**, 374–385.
- 148 A. Solorio-Rodríguez, V. Escamilla-Rivera, M. Uribe-Ramírez, A. Chagolla, R. Winkler, C. García-Cuellar and A. De Vizcaya-Ruiz, *Nanoscale*, 2017, **9**, 13651–13660.
- 149 D. Bonvin, U. Aschauer, D. T. L. Alexander, D. Chiappe, M. Moniatte, H. Hofmann and M. M. Ebersold, *Small*, 2017, **13**, 1700409.
- 150 A. J. Chetwynd, K. E. Wheeler and I. Lynch, *Nano Today*, 2019, **28**, 100758.
- 151 D. Docter, U. Distler, W. Storck, J. Kuharev, D. Wünsch, A. Hahlbrock, S. K. Knauer, S. Tenzer and R. H. Stauber, *Nat. Protoc.*, 2014, **9**, 2030–2044.
- 152 S. Winzen, S. Schoettler, G. Baier, C. Rosenauer, V. Mailänder, K. Landfester and K. Mohr, *Nanoscale*, 2015, **7**, 2992–3001.
- 153 L. Böhmert, L. Voß, V. Stock, A. Braeuning, A. Lampen and H. Sieg, *Nanoscale Adv.*, 2020, **2**, 563–582.
- 154 A. Bekdemir and F. Stellacci, *Nat. Commun.*, 2016, **7**, 13121.
- 155 D. Bonvin, D. Chiappe, M. Moniatte, H. Hofmann and M. M. Ebersold, *Analyst*, 2017, **142**, 3805–3815.
- 156 S. Galmarini, U. Hanusch, M. Giraud, N. Cayla, D. Chiappe, N. von Moos, H. Hofmann and L. Maurizi, *Bioconjug. Chem.*, 2018, **29**, 3385–3393.
- 157 V. Forest and J. Pourchez, *Nano Today*, 2016, **11**, 700–703.
- 158 A. C. Rinkenauer, A. T. Press, M. Raasch, C. Pietsch, S. Schweizer, S. Schwoerer, K. L. Rudolph, A. Mosig, M. Bauer, A. Traeger and U. S. Schubert, *J. Controlled Release*, 2015, **216**, 158–168.

-
- 159 O. K. Kari, J. Ndika, P. Parkkila, A. Louna, T. Lajunen, A. Puustinen, T. Viitala, H. Alenius and A. Urtti, *Nanoscale*, 2020, **12**, 1728–1741.
- 160 S. Palchetti, V. Colapicchioni, L. Digiacomo, G. Caracciolo, D. Pozzi, A. L. Capriotti, G. La Barbera and A. Laganà, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, 2016, **1858**, 189–196.
- 161 A. C. G. Weiss, K. Krüger, Q. A. Besford, M. Schlenk, K. Kempe, S. Förster and F. Caruso, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2019, **11**, 2459–2469.
- 162 A. A. Ashkarran, N. Dararatana, D. Crespy, G. Caracciolo and M. Mahmoudi, *Nanoscale*, 2020, **12**, 2374–2383.
- 163 D. Bargheer, J. Nielsen, G. Gebel, M. Heine, S. C. Salmen, R. Stauber, H. Weller, J. Heeren and P. Nielsen, *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2015, **6**, 36–46.
- 164 O. Vilanova, J. J. Mittag, P. M. Kelly, S. Milani, K. A. Dawson, J. O. Rädler and G. Franzese, *ACS Nano*, 2016, **10**, 10842–10850.
- 165 R. Chen and J. E. Riviere, *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology*, 2017, **9**, e1440.
- 166 P. Pengo, M. Şologan, L. Pasquato, F. Guida, S. Pacor, A. Tossi, F. Stellacci, D. Marson, S. Boccardo, S. Pricl and P. Posocco, *Eur. Biophys. J.*, 2017, **46**, 749–771.
- 167 Y. Duan, R. Coreas, Y. Liu, D. Bitounis, Z. Zhang, D. Parviz, M. Strano, P. Demokritou and W. Zhong, *NanoImpact*, 2020, **17**, 100207.
- 168 D. Caputo and G. Caracciolo, *Cancer Lett.*, 2020, **470**, 191–196.
-

Bibliographie de la publication ACS Nano (chapitre 3)

1. Lammers, T.; Kiessling, F.; Ashford, M.; Hennink, W.; Crommelin, D.; Storm, G., Cancer nanomedicine: is targeting our target? *Nature Reviews Materials* 2016, 1 (9), 1-2.
2. Hajipour, M. J.; Fromm, K. M.; Ashkarran, A. A.; de Aberasturi, D. J.; de Larramendi, I. R.; Rojo, T.; Serpooshan, V.; Parak, W. J.; Mahmoudi, M., Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in biotechnology* 2012, 30 (10), 499-511.
3. Moabelo, K. L.; Martin, D. R.; Fadaka, A. O.; Sibuyi, N. R.; Meyer, M.; Madiehe, A. M., Nanotechnology-based strategies for effective and rapid detection of SARS-CoV-2. *Materials* 2021, 14 (24), 7851.
4. Ling, D.; Hackett, M. J.; Hyeon, T., Surface ligands in synthesis, modification, assembly and biomedical applications of nanoparticles. *Nano Today* 2014, 9 (4), 457-477.
5. Han, X.; Xu, K.; Taratula, O.; Farsad, K., Applications of nanoparticles in biomedical imaging. *Nanoscale* 2019, 11 (3), 799-819.
6. Salvati, A.; Pitek, A. S.; Monopoli, M. P.; Prapainop, K.; Bombelli, F. B.; Hristov, D. R.; Kelly, P. M.; Åberg, C.; Mahon, E.; Dawson, K. A., Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nature nanotechnology* 2013, 8 (2), 137-143.
7. Dawson, K. A.; Yan, Y., Current understanding of biological identity at the nanoscale and future prospects. *Nature nanotechnology* 2021, 16 (3), 229-242.
8. Ke, P. C.; Lin, S.; Parak, W. J.; Davis, T. P.; Caruso, F., A decade of the protein corona. *ACS nano* 2017, 11 (12), 11773-11776.
9. Carrillo-Carrion, C.; Carril, M.; Parak, W. J., Techniques for the experimental investigation of the protein corona. *Current Opinion in Biotechnology* 2017, 46, 106-113.
10. Hajipour, M. J.; Safavi-Sohi, R.; Sharifi, S.; Mahmoud, N.; Ashkarran, A. A.; Voke, E.; Serpooshan, V.; Ramezankhani, M.; Milani, A. S.; Landry, M. P., An Overview of Nanoparticle Protein Corona Literature. *Small* 2023, 2301838.
11. Walkey, C. D.; Chan, W. C., Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society Reviews* 2012, 41 (7), 2780-2799.
12. Singh, N.; Marets, C.; Boudon, J.; Millot, N.; Saviot, L.; Maurizi, L., In vivo protein corona on nanoparticles: does the control of all material parameters orient the biological behavior? *Nanoscale Advances* 2021, 3 (5), 1209-1229.
13. Hajipour, M. J.; Laurent, S.; Aghaie, A.; Rezaee, F.; Mahmoudi, M., Personalized protein coronas: a “key” factor at the nanobiointerface. *Biomaterials science* 2014, 2 (9), 1210-1221.
14. Cai, R.; Chen, C., The crown and the scepter: roles of the protein corona in nanomedicine. *Advanced Materials* 2019, 31 (45), 1805740.
15. Hadjidemetriou, M.; McAdam, S.; Garner, G.; Thackeray, C.; Knight, D.; Smith, D.; Al-Ahmady, Z.; Mazza, M.; Rogan, J.; Clamp, A., The human in vivo biomolecule corona onto PEGylated liposomes: a proof-of-concept clinical study. *Advanced Materials* 2019, 31 (4), 1803335.
16. Hajipour, M. J.; Raheb, J.; Akhavan, O.; Arjmand, S.; Mashinchian, O.; Rahman, M.; Abdolahad, M.; Serpooshan, V.; Laurent, S.; Mahmoudi, M., Personalized disease-specific protein corona influences the therapeutic impact of graphene oxide. *Nanoscale* 2015, 7 (19), 8978-8994.

-
17. Lotfabadi, A.; Hajipour, M. J.; Derakhshankhah, H.; Peirovi, A.; Saffar, S.; Shams, E.; Fatemi, E.; Barzegari, E.; Sarvari, S.; Moakedi, F., Biomolecular corona dictates A β fibrillation process. *ACS chemical neuroscience* 2018, 9 (7), 1725-1734.
 18. Bertrand, N.; Grenier, P.; Mahmoudi, M.; Lima, E. M.; Appel, E. A.; Dormont, F.; Lim, J.-M.; Karnik, R.; Langer, R.; Farokhzad, O. C., Mechanistic understanding of in vivo protein corona formation on polymeric nanoparticles and impact on pharmacokinetics. *Nature communications* 2017, 8 (1), 777.
 19. Fedeli, C.; Segat, D.; Tavano, R.; Bubacco, L.; De Franceschi, G.; de Laureto, P. P.; Lubian, E.; Selvestrel, F.; Mancin, F.; Papini, E., The functional dissection of the plasma corona of SiO₂-NPs spots histidine rich glycoprotein as a major player able to hamper nanoparticle capture by macrophages. *Nanoscale* 2015, 7 (42), 17710-28.
 20. Ritz, S.; Schöttler, S.; Kotman, N.; Baier, G.; Musyanovych, A.; Kuharev, J.; Landfester, K.; Schild, H.; Jahn, O.; Tenzer, S.; Mailänder, V., Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake. *Biomacromolecules* 2015, 16 (4), 1311-21.
 21. Schöttler, S.; Becker, G.; Winzen, S.; Steinbach, T.; Mohr, K.; Landfester, K.; Mailänder, V.; Wurm, F. R., Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers. *Nat Nanotechnol* 2016, 11 (4), 372-7.
 22. Abbina, S.; Takeuchi, L. E.; Anilkumar, P.; Yu, K.; Rogalski, J. C.; Shenoi, R. A.; Constantinescu, I.; Kizhakkedathu, J. N., Blood circulation of soft nanomaterials is governed by dynamic remodeling of protein opsonins at nano-biointerface. *Nature communications* 2020, 11 (1), 3048.
 23. Tekie, F. S. M.; Hajiramezanali, M.; Geramifar, P.; Raoufi, M.; Dinarvand, R.; Soleimani, M.; Atyabi, F., Controlling evolution of protein corona: A prosperous approach to improve chitosan-based nanoparticle biodistribution and half-life. *Scientific reports* 2020, 10 (1), 1-14.
 24. Anselmo, A. C.; Kumar, S.; Gupta, V.; Pearce, A. M.; Ragusa, A.; Muzykantov, V.; Mitragotri, S., Exploiting shape, cellular-hitchhiking and antibodies to target nanoparticles to lung endothelium: Synergy between physical, chemical and biological approaches. *Biomaterials* 2015, 68, 1-8.
 25. Hu, C.-M. J.; Fang, R. H.; Wang, K.-C.; Luk, B. T.; Thamphiwatana, S.; Dehaini, D.; Nguyen, P.; Angsantikul, P.; Wen, C. H.; Kroll, A. V., Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking. *Nature* 2015, 526 (7571), 118-121.
 26. Zhou, H.; Fan, Z.; Li, P. Y.; Deng, J.; Arhontoulis, D. C.; Li, C. Y.; Bowne, W. B.; Cheng, H., Dense and dynamic polyethylene glycol shells cloak nanoparticles from uptake by liver endothelial cells for long blood circulation. *ACS nano* 2018, 12 (10), 10130-10141.
 27. Alberg, I.; Kramer, S.; Schinnerer, M.; Hu, Q.; Seidl, C.; Leps, C.; Drude, N.; Möckel, D.; Rijcken, C.; Lammers, T., Polymeric nanoparticles with neglectable protein corona. *Small* 2020, 16 (18), 1907574.
 28. Zhang, S.-q.; Fu, Q.; Zhang, Y.-j.; Pan, J.-x.; Zhang, L.; Zhang, Z.-r.; Liu, Z.-m., Surface loading of nanoparticles on engineered or natural erythrocytes for prolonged circulation time: strategies and applications. *Acta Pharmacologica Sinica* 2021, 42 (7), 1040-1054.
 29. Yoo, J.-W.; Chambers, E.; Mitragotri, S., Factors that control the circulation time of nanoparticles in blood: challenges, solutions and future prospects. *Current pharmaceutical design* 2010, 16 (21), 2298-2307.

-
30. Tsoi, K. M.; MacParland, S. A.; Ma, X.-Z.; Spetzler, V. N.; Echeverri, J.; Ouyang, B.; Fadel, S. M.; Sykes, E. A.; Goldaracena, N.; Kathis, J. M., Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver. *Nature materials* 2016, 15 (11), 1212-1221.
31. Cho, W.-S.; Cho, M.; Jeong, J.; Choi, M.; Han, B. S.; Shin, H.-S.; Hong, J.; Chung, B. H.; Jeong, J.; Cho, M.-H., Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and applied pharmacology* 2010, 245 (1), 116-123.
32. Sakulkhu, U.; Maurizi, L.; Mahmoudi, M.; Motazacker, M.; Vries, M.; Gramoun, A.; Beuzelin, M.-G. O.; Vallée, J.-P.; Rezaee, F.; Hofmann, H., Ex situ evaluation of the composition of protein corona of intravenously injected superparamagnetic nanoparticles in rats. *Nanoscale* 2014, 6 (19), 11439-11450.
33. Yamamoto, Y.; Nagasaki, Y.; Kato, Y.; Sugiyama, Y.; Kataoka, K., Long-circulating poly (ethylene glycol)-poly (d, l-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge. *Journal of controlled release* 2001, 77 (1-2), 27-38.
34. Xiao, K.; Li, Y.; Luo, J.; Lee, J. S.; Xiao, W.; Gonik, A. M.; Agarwal, R. G.; Lam, K. S., The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials* 2011, 32 (13), 3435-3446.
35. Sakulkhu, U.; Mahmoudi, M.; Maurizi, L.; Coullerez, G.; Hofmann-Antenbrink, M.; Vries, M.; Motazacker, M.; Rezaee, F.; Hofmann, H., Significance of surface charge and shell material of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) based core/shell nanoparticles on the composition of the protein corona. *Biomaterials science* 2015, 3 (2), 265-278.
36. Zaias, J.; Mineau, M.; Cray, C.; Yoon, D.; Altman, N. H., Reference values for serum proteins of common laboratory rodent strains. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2009, 48 (4), 387-390.
37. Chakraborty, M.; Paul, S.; Mitra, I.; Bardhan, M.; Bose, M.; Saha, A.; Ganguly, T., To reveal the nature of interactions of human hemoglobin with gold nanoparticles having two different morphologies (sphere and star-shaped) by using various spectroscopic techniques. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2018, 178, 355-366.
38. Yang, H.; Hao, C.; Nan, Z.; Sun, R., Bovine hemoglobin adsorption onto modified silica nanoparticles: Multi-spectroscopic measurements based on kinetics and protein conformation. *International journal of biological macromolecules* 2020, 155, 208-215.
39. Devineau, S.; Zargarian, L.; Renault, J. P.; Pin, S., Structure and function of adsorbed hemoglobin on silica nanoparticles: relationship between the adsorption process and the oxygen binding properties. *Langmuir* 2017, 33 (13), 3241-3252.
40. Mobasherat Jajroud, S. Y.; Falahati, M.; Attar, F.; Khavari-Nejad, R. A., Human hemoglobin adsorption onto colloidal cerium oxide nanoparticles: A new model based on zeta potential and spectroscopy measurements. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2018, 36 (11), 2908-2916.
41. Dutra, F. F.; Bozza, M. T., Heme on innate immunity and inflammation. *Frontiers in pharmacology* 2014, 5, 115.
42. Asleh, R.; Marsh, S.; Shilkrut, M.; Binah, O.; Guetta, J.; Lejbkowitz, F.; Enav, B.; Shehadeh, N.; Kanter, Y.; Lache, O., Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circulation research* 2003, 92 (11), 1193-1200.
43. Minović, I.; Eisenga, M. F.; Riphagen, I. J.; van den Berg, E.; Kootstra-Ros, J.; Frenay, A.-R. S.; van Goor, H.; Rimbach, G.; Esatbeyoglu, T.; Levy, A. P.,

-
- Circulating haptoglobin and metabolic syndrome in renal transplant recipients. *Scientific reports* 2017, 7 (1), 14264.
44. Sakulkhu, U.; Mahmoudi, M.; Maurizi, L.; Salaklang, J.; Hofmann, H., Protein corona composition of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with various physico-chemical properties and coatings. *Scientific reports* 2014, 4 (1), 1-9.
 45. Tenzer, S.; Docter, D.; Kuharev, J.; Musyanovych, A.; Fetz, V.; Hecht, R.; Schlenk, F.; Fischer, D.; Kiouptsi, K.; Reinhardt, C., Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature nanotechnology* 2013, 8 (10), 772-781.
 46. Giulimondi, F.; Vulpis, E.; Digiaco, L.; Giuli, M. V.; Mancusi, A.; Capriotti, A. L.; Laganà, A.; Cerrato, A.; Zenezini Chiozzi, R.; Nicoletti, C., Opsonin-deficient nucleoproteic corona endows unPEGylated liposomes with stealth properties in vivo. *ACS nano* 2022, 16 (2), 2088-2100.
 47. Papini, E.; Tavano, R.; Mancin, F., Opsonins and dysopsonins of nanoparticles: facts, concepts, and methodological guidelines. *Frontiers in immunology* 2020, 11, 567365.
 48. Li, H.; Wang, Y.; Tang, Q.; Yin, D.; Tang, C.; He, E.; Zou, L.; Peng, Q., The protein corona and its effects on nanoparticle-based drug delivery systems. *Acta Biomaterialia* 2021, 129, 57-72.
 49. Icer, M. A.; Gezmen-Karadag, M., The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clinical biochemistry* 2018, 59, 17-24.
 50. Eigenbrot, C., Structure, function, and activation of coagulation factor VII. *Current protein & peptide science* 2002, 3 (3), 287-99.
 51. Bjørklund, G.; Svanberg, E.; Dadar, M.; Card, D. J.; Chirumbolo, S.; Harrington, D. J.; Aaseth, J., The Role of Matrix Gla Protein (MGP) in Vascular Calcification. *Current medicinal chemistry* 2020, 27 (10), 1647-1660.
 52. Zhao, K. W.; Murray, S. S.; Murray, E. J., Secreted phosphoprotein-24 kDa (Spp24) attenuates BMP-2-stimulated Smad 1/5 phosphorylation and alkaline phosphatase induction and was purified in a protective complex with alpha2 - Macroglobulins From Serum. *Journal of cellular biochemistry* 2013, 114 (2), 378-87.
 53. Fuior, E. V.; Gafencu, A. V., Apolipoprotein C1: Its Pleiotropic Effects in Lipid Metabolism and Beyond. *International journal of molecular sciences* 2019, 20 (23).
 54. Mathews, S. T.; Chellam, N.; Srinivas, P. R.; Cintron, V. J.; Leon, M. A.; Goustin, A. S.; Grunberger, G., Alpha2-HSG, a specific inhibitor of insulin receptor autophosphorylation, interacts with the insulin receptor. *Molecular and cellular endocrinology* 2000, 164 (1-2), 87-98.
 55. Coates, T. D., Physiology and pathophysiology of iron in hemoglobin-associated diseases. *Free radical biology & medicine* 2014, 72, 23-40.
 56. Thiele, L.; Diederichs, J. E.; Reszka, R.; Merkle, H. P.; Walter, E., Competitive adsorption of serum proteins at microparticles affects phagocytosis by dendritic cells. *Biomaterials* 2003, 24 (8), 1409-1418.
 57. Mirshafiee, V.; Kim, R.; Park, S.; Mahmoudi, M.; Kraft, M. L., Impact of protein pre-coating on the protein corona composition and nanoparticle cellular uptake. *Biomaterials* 2016, 75, 295-304.
 58. Tonigold, M.; Simon, J.; Estupiñán, D.; Kokkinopoulou, M.; Reinholz, J.; Kintzel, U.; Kaltbeitzel, A.; Renz, P.; Domogalla, M. P.; Steinbrink, K.; Lieberwirth, I.; Crespy, D.; Landfester, K.; Mailänder, V., Pre-adsorption of antibodies enables

- targeting of nanocarriers despite a biomolecular corona. *Nat Nanotechnol* 2018, 13 (9), 862-869.
59. Simon, J.; Müller, L. K.; Kokkinopoulou, M.; Lieberwirth, I.; Morsbach, S.; Landfester, K.; Mailänder, V., Exploiting the biomolecular corona: pre-coating of nanoparticles enables controlled cellular interactions. *Nanoscale* 2018, 10 (22), 10731-10739.
60. Safavi-Sohi, R.; Maghari, S.; Raoufi, M.; Jalali, S. A.; Hajipour, M. J.; Ghassempour, A.; Mahmoudi, M., Bypassing Protein Corona Issue on Active Targeting: Zwitterionic Coatings Dictate Specific Interactions of Targeting Moieties and Cell Receptors. *ACS applied materials & interfaces* 2016, 8 (35), 22808-18.
61. Vincent, M. P.; Bobbala, S.; Karabin, N. B.; Frey, M.; Liu, Y.; Navidzadeh, J. O.; Stack, T.; Scott, E. A., Surface chemistry-mediated modulation of adsorbed albumin folding state specifies nanocarrier clearance by distinct macrophage subsets. *Nat Commun* 2021, 12 (1), 648.
62. Seneca, S.; Simon, J.; Weber, C.; Ghazaryan, A.; Ethirajan, A.; Mailänder, V.; Morsbach, S.; Landfester, K., How Low Can You Go? Low Densities of Poly(ethylene glycol) Surfactants Attract Stealth Proteins. *Macromolecular bioscience* 2018, 18 (9), e1800075.
63. Müller, J.; Bauer, K. N.; Prozeller, D.; Simon, J.; Mailänder, V.; Wurm, F. R.; Winzen, S.; Landfester, K., Coating nanoparticles with tunable surfactants facilitates control over the protein corona. *Biomaterials* 2017, 115, 1-8.
64. Mohammad-Beigi, H.; Hayashi, Y.; Zeuthen, C. M.; Eskandari, H.; Scavenius, C.; Juul-Madsen, K.; Vorup-Jensen, T.; Enghild, J. J.; Sutherland, D. S., Mapping and identification of soft corona proteins at nanoparticles and their impact on cellular association. *Nature Communications* 2020, 11 (1), 4535.
65. Baimanov, D.; Wang, J.; Zhang, J.; Liu, K.; Cong, Y.; Shi, X.; Zhang, X.; Li, Y.; Li, X.; Qiao, R., In situ analysis of nanoparticle soft corona and dynamic evolution. *Nature Communications* 2022, 13 (1), 5389.
66. Casals, E.; Pfaller, T.; Duschl, A.; Oostingh, G. J.; Puentes, V. F., Hardening of the nanoparticle-protein corona in metal (Au, Ag) and oxide (Fe₃O₄, CoO, and CeO₂) nanoparticles. *Small* 2011, 7 (24), 3479-3486.
67. Miclăuș, T.; Bochenkov, V. E.; Ogaki, R.; Howard, K. A.; Sutherland, D. S., Spatial mapping and quantification of soft and hard protein coronas at silver nanocubes. *Nano letters* 2014, 14 (4), 2086-2093.
68. Deng, Z. J.; Liang, M.; Monteiro, M.; Toth, I.; Minchin, R. F., Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nature nanotechnology* 2011, 6 (1), 39-44.
69. Raoufi, M.; Hajipour, M. J.; Shahri, S. M. K.; Schoen, I.; Linn, U.; Mahmoudi, M., Probing fibronectin conformation on a protein corona layer around nanoparticles. *Nanoscale* 2018, 10 (3), 1228-1233.
70. Ashkarran, A. A.; Dararatana, N.; Crespy, D.; Caracciolo, G.; Mahmoudi, M., Mapping the heterogeneity of protein corona by ex vivo magnetic levitation. *Nanoscale* 2020, 12 (4), 2374-2383.
71. Sallem, F.; Haji, R.; Vervandier-Fasseur, D.; Nury, T.; Maurizi, L.; Boudon, J.; Lizard, G.; Millot, N., Elaboration of trans-resveratrol derivative-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for glioma treatment. *Nanomaterials* 2019, 9 (2), 287.
72. Sruthi, S.; Maurizi, L.; Nury, T.; Sallem, F.; Boudon, J.; Riedinger, J. M.; Millot, N.; Bouyer, F.; Lizard, G., Cellular interactions of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles on oligodendrocytes without

detrimental side effects: Cell death induction, oxidative stress and inflammation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2018, 170, 454-462.

73. Maurizi, L.; Sakulku, U.; Gramoun, A.; Vallee, J.-P.; Hofmann, H., A fast and reproducible method to quantify magnetic nanoparticle biodistribution. *Analyst* 2014, 139 (5), 1184-1191.

74. Galmarini, S.; Hanusch, U.; Giraud, M.; Cayla, N.; Chiappe, D.; von Moos, N.; Hofmann, H.; Maurizi, L., Beyond unpredictability: the importance of reproducibility in understanding the protein corona of nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry* 2018, 29 (10), 3385-3393.

ANNEXES

I. Codes R

K-means

```
#####  
#pathway :  
setwd("C:/chemin")  
getwd()  
#####  
#packages :  
library(cluster)  
library(factoextra)  
#####  
#lecture des donnees :  
pro = read.table(file = "nomdufichier.csv", sep = ";", dec = ",", h = TRUE)  
data <- data.frame(pro) #conversion en matrice  
#kmeans :  
set.seed(123)  
res.km <- kmeans(data[,-1],3,nstart=100)  
  
#avec nstart : assignments initiales aleatoires  
#clustering kmeans:  
res.km$cluster  
  
#visualisation  
fviz_cluster(res.km, data = data[, -1],  
              palette = c("#2E9FDF", "#00AFBB", "#E7B800"),  
              geom = c("point"),  
              labels = 12,  
              ellipse.type = "convex",  
              main = "titre",  
              ggtheme = theme_bw()  
)  
#####
```

MDS

```
#####  
#pathway :  
setwd("C:/chemin")  
getwd()  
#####  
#packages :  
library(ggpubr)  
library(magrittr)  
library(dplyr)
```

```
#####
#lecture des donnees :
pro = read.table(file = "nomdufichier.csv", sep = ";", dec = ",", h = TRUE)
data <- data.frame(pro)

#MDS :
mds <- data %>%
  dist() %>%
  cmdscale() %>%
  as_tibble()
colnames(mds) <- c("Dim.1", "Dim.2")
# tracage MDS :
ggscatter(mds, x = "Dim.1", y = "Dim.2",
  label = rownames(data),
  size = 1,
  repel = TRUE)
# regroupement k-means:
clust <- kmeans(mds, 5)$cluster %>%
  as.factor()
mds <- mds %>%
  mutate(groups = clust)
# graphique :
ggscatter(mds, x = "Dim.1", y = "Dim.2",
  #label = rownames(data),
  color = "groups",
  palette = "jco",
  size = 3,
  ellipse = TRUE,
  ellipse.type = "convex",
  repel = TRUE)
#####
```

Ward

```
#####
library(ggplot2)
library(reshape)
#pathway :
setwd("C:/chemin")
getwd()

#####
#lecture des donnees :
read.table(file = "nomdufichier.csv", sep = ";", dec = ",", h = TRUE)
proteins = read.table(file = "nomdufichier.csv", sep = ";", dec = ",", h = TRUE)
#visualisation data:
mprot = data.frame(proteins)
#transposée :
tmprot = t(proteins)
```

```
#dendrogrammes  
hc.data1=data[,2:17]# Ward's Method #  
wardsmethod<-hclust(dist(scale(hc.data1)),method="ward.D")  
plot(wardsmethod)  
#####
```

II. Valorisation des travaux

Publications dans des journaux à comité de lecture

1. In vivo protein corona on nanoparticles: does the control of all material parameters orient the biological behavior? N. Singh†, **C. Marets**†, J. Boudon, N. Millot, L. Saviot, L. Maurizi (2021) **Nanoscale Advances** 3:1209–1229. <https://doi.org/10.1039/D0NA00863J> †: co-premier auteur

Inside Front Cover: <https://doi.org/10.1039/D1NA90021H>

1. *Encapsulation of Luminescent Gold Nanoclusters into Synthetic Vesicles*. R. M. Chiechio, S. Ducarre, **C. Marets**, A. Dupont, P. Even-Hernandez, X. Pinson, S. Dutertre, F. Artzner, P. Musumeci, C. Ravel, M.-J. L. Faro, V. Marchi (2022) **Nanomaterials** 12:3875. <https://doi.org/10.3390/nano12213875>

2. *Luminescent Gold Nanoclusters Interacting with Synthetic and Biological Vesicles*. R. M. Chiechio, S. Ducarre, G. Moulin, A. Dupont, **C. Marets**, P. Even-Hernandez, F. Artzner, P. Musumeci, G. Franzo, C. Ravel, M.-J. L. Faro, V. Marchi (2022) **J Phys Chem Lett** 13:6935–6943. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.2c01071>

3. *Identification of the Proteins Determining the Blood Circulation Time of Nanoparticles*. C. Marques†, M. J. Hajipour†, C. Marets, A. Oudot, R. Safavi-Sohi, M. Guillemin, G. Borchard, O. Jordan, L. Saviot, L. Maurizi (2023) **ACS Nano** 17:12458–12470. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.3c02041> †: co-premier auteur

Enseignement - encadrement

Activité de doctorant contractuel d'enseignements, *ESIREM (École d'Ingénieurs en Matériaux Développement Durable et Infotronique)*, 128 h TP (64 h/an) :

→ Chimie Organique (1^{ère} année),

→ Physique Générale (1^{ère} année),

→ Céramiques (4^{ème} année)

→ Projet (GEIPI 1^{ère} année : classes préparatoires intégrées)

Présentations dans le cadre de congrès nationaux ou internationaux

Le nom de l'auteur(e) présentant est souligné.

1. *Role of protein corona (PC) on nanoparticles: influence of the surface chemistry*. L. Maurizi, **C. Marets**, J. Boudon, A. Oudot, S. Galmarini, U. Hanusch Sakulkhu, N. von Moos, N. Millot, L. Saviot, H. Hofmann (12/2019) **SF Nano/C Nano 2019** Dijon, France (Poster)

2. *Synthesis and characterization of nanoparticles to study their interactions with proteins*, **C. Marets**, L. Saviot, L. Maurizi, Ecole Résidentielle Interdisciplinaire en Nanosciences et Nanotechnologies, **C Nano (07/2021)**, Erquy, France (Poster)

3. *Proteomics analysis of the influence of nanoparticle charge and hydrophathy on pharmacokinetics/circulation time*. C. Marques, M. Hajipour, **C. Marets**, O. Jordan, G. Borchard, L. Maurizi (12/2022) **SF Nano 2022** Strasbourg, France (Poster)

Titre : Elaboration de nanoparticules inorganiques pour l'étude des interactions nanoparticules-protéines

Mots clés : nanoparticules, couronne protéique, synthèse, caractérisation

Résumé : Les nanoparticules (NPs) font l'objet de nombreuses recherches dans le domaine médical. Leurs applications potentielles sont multiples que ce soit en thérapie ou en diagnostic (thérapie anticancéreuse par hyperthermie, délivrance de médicaments, imagerie optique et/ou par résonance magnétique, etc). Dans la plupart des cas, les NPs sont injectées directement dans le sang. Un problème se pose : avant d'atteindre leur site cible, elles interagissent tout d'abord avec les molécules de l'environnement dans lequel elles sont injectées, en particulier les protéines. Il se forme ce qu'on nomme une « couronne protéique » (ou « protein corona » : PC). Cette PC influence les comportements biologiques des NPs tels que leur cytotoxicité, leur biodistribution ou encore leur internalisation. Elle a donc un impact sur l'efficacité des NPs. Il est d'une importance cruciale de comprendre sa formation et son évolution afin de mieux la contrôler. Dans cette thèse, les différents aspects impactant la couronne protéique sont considérés et un point est fait sur les challenges rencontrés dans ce domaine.

D'après la littérature, les propriétés intrinsèques des NPs influencent la composition et l'évolution de la PC. Les objectifs de ce travail comprennent donc l'élaboration d'une bibliothèque de NPs comportant, entre deux échantillons, au moins un paramètre commun tel que la taille ou la chimie de surface, synthétisées de manière reproductible, contrôlée et à grande échelle. A cette fin, des nanoparticules couramment développées à des fins biomédicales (oxyde de fer, d'or et silice) sont synthétisées, fonctionnalisées (polymères PEG et PVA, citrate et GSH) et caractérisées. Une étude sur l'impact de la taille des polymères en surface et de leur charge sur la PC est menée in vivo. Les protéines composant ces PC sont analysées par LC-MS. Devant la grande quantité et diversité des résultats obtenus, une étude de différentes méthodes statistiques d'analyse de données explore le traitement des jeux de données issus de la protéomique.

Title : Elaboration of inorganic nanoparticles for the study of nanoparticle-protein interactions

Keywords : nanoparticles, protein corona, synthesis, characterization

Abstract : Nanoparticles (NPs) are the subject of much research in the medical field.: their potential applications in therapy or diagnostics are multiple (anticancer therapy by hyperthermia, drug delivery, optical and/or magnetic resonance imaging, etc). In most cases, NPs are injected directly in blood. A problem arises: before reaching their target site, the NPs first interact with the molecules of the environment in which they are injected in, especially proteins. A so-called "protein corona" (PC) forms. This PC influences the biological behavior of NPs such as their cytotoxicity, their biodistribution or their internalization. It has therefore an impact on the effectiveness of the NPs. It is of crucial importance to understand its formation and evolution in order to better control it. In this thesis, the different aspects impacting the protein crown are considered and a point is made on the challenges encountered in this field

According to the literature, the intrinsic properties of NPs influence the composition and evolution of PC. The objectives of this work therefore include the development of a library of NPs with at least one common parameter such as size or surface chemistry between two samples, synthesized in a reproducible, controlled and large-scale manner. To this end, NPs commonly developed for biomedical purposes (iron oxide, gold and silica) are synthesized, functionalized (PEG and PVA polymers, citrate and GSH) and characterized. A study on the impact of the size of the surface polymers and their charge on the PC is carried out in vivo. The proteins making up these PCs are analysed and selected to link them to the biocirculation of the NPs studied. Given the large quantity and diversity of the results obtained, a study of different statistical methods of data analysis explores the processing of data sets from proteomics.