



HAL
open science

Nanoparticules pour le biomédical: Interactions biologiques et couronne protéique

Lionel Maurizi

► **To cite this version:**

Lionel Maurizi. Nanoparticules pour le biomédical: Interactions biologiques et couronne protéique. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Bourgogne - Franche-Comté, 2023. tel-04251999

HAL Id: tel-04251999

<https://hal.science/tel-04251999>

Submitted on 23 Oct 2023

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

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



Travaux scientifiques
présentés à
l'Université de Bourgogne Franche-Comté
en vue de l'obtention d'une
Habilitation à diriger les recherches

**Nanoparticules pour le biomédical :
Interactions biologiques et couronne protéique**

soutenue le jeudi 13 juillet 2023 par :

Lionel Maurizi

Composition du jury

Nadine Millot	Professeure, Université de Bourgogne	Présidente du jury
Karine Anselme	Directrice de recherche CNRS, Université de Haute-Alsace	Rapporteure
Sylvie Begin	Professeure, Université de Strasbourg	Rapporteure
Fabienne Gauffre	Directrice de recherche CNRS, Université Rennes 1	Rapporteure
Gerrit Borchard	Professeur, Université de Genève	Examineur
Heinrich Hofmann	Professeur, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne	Examineur
Lucien Saviot	Directeur de recherche CNRS, Université de Bourgogne	Examineur

*À Sandra
&
À Antonin*

Plan

Abréviations	i
Introduction.....	1
Chapitre A. Activités de recherche passées et futures : Nanoparticules pour applications biomédicales et leurs interactions biologiques	7
Partie A.I. Synthèses et caractérisations de nanoparticules pour applications biomédicales ...	13
A.I.1. En introduction: exemples de nanoparticules synthétisées.....	14
A.I.2. Fonctionnalisations et caractérisations de surface des NPs.....	17
A.I.2.1. Couplage conjoint de PEG + DMSA : analyse quantitative	17
A.I.2.2. PVA-SPIONs : NPs optimisées pour fonctionnalisation reproductible.....	21
A.I.2.3. Système cœur / coquille reproductible à base de PVA-SPIONs.....	23
A.I.3. Scale-up pour transfert de technologie.....	26
A.I.3.1. Par voie hydrothermale (25 MPa, 150°C)	27
A.I.3.2. Par voie eau supercritique (25 MPa, 400°C)	29
A.I.4. Conclusion sur les synthèses des nanoparticules.....	32
Partie A.II. SPIONs pour diagnostic médical	35
A.II.1. SPIONs comme agents de contraste directs en IRM	36
A.II.1.1. Influence de la charge de surface sur la biodistribution des SPIONs.....	36
A.II.1.2. SPIONs fonctionnalisées pour imagerie bimodale PET/IRM.....	39
A.II.2. Marquage passif de macrophages pour détection d'arthrite	41
A.II.2.1. Détection de l'arthrite et réponse inflammatoire	41
A.II.2.2. Suivi du traitement de l'arthrite avec des PVA-SPIONs	44
A.II.3. Marquage de cellules souches pour suivi de greffe	46
A.II.4. Conclusions sur le diagnostic médical avec des SPIONs.....	50

Partie A.III. Interactions biologiques des SPIONs	53
A.III.1. Différents tests cellulaires après incubations avec des SPIONs	54
A.III.2. Interactions hématologiques des SPIONs.....	60
A.III.2.1. Influence du greffage du PVA et de la charge sur la toxicité des cellules immunitaires humaines.....	60
A.III.2.2. Influence des PVA-SPIONs sur l'hémolyse	63
A.III.3. Conclusions sur les interactions biologiques des nanoparticules	66
Partie A.IV. Interactions entre protéines et nanoparticules: la "protein corona"	69
A.IV.1. Rôle de la chimie de surface sur la formation de la protein corona	70
A.IV.2. <i>In vivo</i> protein corona : influence sur la biocirculation.....	74
A.IV.3. L'importance de la standardisation et de la reproductibilité avec la protein corona. 78	
A.IV.4. Conclusion sur la protein corona.....	81
Partie A.V. Conclusion générale et résumé sur les activités de recherche	85
A.V.1. Articles principaux des activités de recherche	89
Partie A.VI. Projets Scientifiques: Nouvelles Applications Biomédicales & Protein Corona	93
A.VI.1. Nouveaux développements nanomédicaux.....	95
A.VI.1.1. Continuer le développement de NPs pour transfert industriel.....	95
A.VI.1.2. Nouvelles applications en imagerie et thérapie	96
A.VI.1.3. Caractériser l'exposition accidentelle aux NPs	98
A.VI.2. Standardisation de la mesure de la protein corona.....	100
A.VI.2.1. Etude fondamentale des interactions protéines / NPs	100
A.VI.2.2. Influence des modèles biologiques sur la protein corona.....	101
A.VI.2.3. Mesure de la protein corona en flux pour se rapprocher du <i>in vivo</i>	102
A.VI.3. Rôle de la protein corona sur les comportements biologiques des NPs.....	104
A.VI.3.1. Rôle de la protein corona sur les interactions des NPs avec le sang.....	104
A.VI.3.2. Influence de la protein corona sur la biodistribution des NPs	105
A.VI.4. Le futur de la nanomédecine: le contrôle de la protein corona ?.....	107
A.VI.4.1. Optimiser la protein corona pour études <i>in vitro</i>	107
A.VI.4.2. Optimiser la PC pour améliorer <i>in vivo</i> les NPs	108
A.VI.5. Conclusion sur les futurs projets de recherche.....	110

Chapitre B. Curriculum Vitae	111
Formations	112
Expériences professionnelles.....	112
Productions scientifiques et encadrements	113
Publications scientifiques.....	113
Communications scientifiques	118
Encadrements scientifiques	118
Principales expériences dans l’animation de recherche.....	125
Recherche internationale.....	125
Recherche nationale.....	126
Recherche industrielle.....	126
Enseignements.....	127
Responsabilités collectives et diffusion de la culture scientifique	127
Responsabilités collectives.....	127
Diffusion de la culture scientifique	127
Bibliographie	129

Abréviations

DMSA	Acide dimercaptosuccinique
DRX	Diffraction des Rayons X
FBS	Fetal Bovine Serum
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LC MS/MS	Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry
MPI	Magnetic Particles Imager
MSCs	Cellules souches mésenchymateuses
NPs	Nanoparticules
PC	Protein Corona
PEG	Polyéthylène Glycol
PEG-SPIONs	SPIONs fonctionnalisées avec PEG
PEG-SPIONs + DMSA	SPIONs fonctionnalisées au PEG et du DMSA
PET	Positron Emission Tomography
PVA	Alcool Polyvinylique
PVA-SPIONs	SPIONs couverts de PVA
RES	Système réticuloendothéliale
SC	Supercritique
Silica@PVA-SPIONs	Cœur / coquille de PVA-SPIONs / Silice
SPIONs	Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles
TEM	Transmission Electron Microscopy
TiONTs	Nanotubes de titanate
XPS	X-Ray photoelectron spectrometry

Introduction

Introduction

Avant de commencer, ce travail, j'ai essayé de lire et surtout de comprendre les différentes démarches d'habilitations à diriger les recherche (HDR) de scientifiques proches de mon domaine et de collègues que je côtoie (Millot 2005; Sandre 2012; Demoisson 2015; Leray 2022). Mon interprétation de cette littérature est que, même si les HDR ont des organisations plus ou moins communes, *i.e.* présentation du chercheur, de ses activités de recherche et d'enseignement ainsi que de ses futurs projets, écrire et défendre une HDR me paraît être un exercice personnel propre à la culture scientifique et la personnalité du candidat. De mon point de vue, je vois l'HDR comme un travail de synthèse de mes expériences antérieures démontrant ma capacité à mener et surtout à diriger des projets de recherches de manière « autonome ». Bien que l'envie d'autonomie soit une des raisons principales pour présenter cette HDR, je pense néanmoins que la recherche ne peut pas se faire en autarcie et que les résultats viennent certes d'idées parfois individuelles mais aussi surtout d'échanges et de rencontres enrichissantes. Je crois que l'évolution professionnelle, comme celle personnelle est avant tout faite de rencontres qui forgent des caractères et permettent de s'épanouir et de trouver ses points forts et points faibles. Ainsi, dans cette introduction, je citerai et remercierai les personnes qui m'ont donné l'opportunité de développer ma personnalité et d'émanciper mes compétences. Enfin, il me semble que l'évolution de notre mission de chercheur fait place à une plus grande individualité des carrières et que cela peut apparaître comme excluant les étudiant(e)s que nous formons alors qu'ils sont l'essence même de beaucoup des résultats de recherches de nos institutions académiques. Je citerai aussi la plupart de ces étudiants qui ont été indispensables à l'obtention des résultats présentés dans ce manuscrit. Toutes ces relations professionnelles qui sont même devenues pour certain(e)s des ami(e)s me permettent encore aujourd'hui de poursuivre ou d'amorcer des projets collaboratifs nationaux et internationaux.

Dans le cadre de la rédaction de ce rapport, différentes décisions ont été prises. En premier lieu, je pense qu'il est important de ne pas être exhaustif mais plutôt percutant sur ses principaux travaux. Ainsi, je ne présenterai que les études que j'estime être les plus représentatives et ayant le plus influencé les thématiques que je souhaiterais développer durant ces prochaines années. De plus, j'ai préféré détailler ces travaux de manière à voir leurs impacts sur l'évolution de mes intérêts de recherche plutôt que d'une manière purement chronologique. Par ailleurs, il est courant d'ajouter au manuscrit les travaux significatifs du candidat. Je pense qu'en 2023, à l'heure de la prise de conscience écologique et de la science ouverte, il n'est plus utile de surcharger un document quand des outils tels que la plateforme d'archive ouverte HAL existent. J'ai fait la démarche de déposer tous mes documents publiés sur HAL et mettrai les liens HAL de tous les travaux cités dans ce manuscrit dans la partie sur mes projets de recherche. Enfin, je ne présenterai mon CV qu'à la fin de ce manuscrit sans rentrer (trop) dans les détails car je pense que cela n'est pas très intéressant à détailler outre mesure ni indispensable pour le lecteur. De plus, il existe aujourd'hui déjà beaucoup de sites

Introduction

web regroupant la plupart de ces informations (Scopus, Publons, ORCID, Lens, Researchgate...).

Dans le cadre de ce rapport le plan s'articulera donc en trois parties principales :

- 1) Les principales activités de recherche
- 2) Les projets de recherche que je souhaiterais mener ces prochaines années
- 3) Mon Curriculum Vitae un peu détaillé

De formation ingénieur en génie des procédés donc destiné à des emplois plutôt industriels dans la pétrochimie, l'agroalimentaire ou l'environnement, j'ai toujours eu l'envie et le besoin d'approfondir et d'essayer de comprendre (peut-être un peu trop) de nombreux concepts scientifiques. Par une rencontre avec Nadine Millot (et par un peu de chance) nous avons obtenu un financement de thèse CNRS à l'Université de Bourgogne de Dijon en 2007 sur un sujet très intrigant : *l'élaboration de nanoparticules d'oxyde de fer comme agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM)*. De culture familiale très médicale et par un intérêt certain, je suis sorti de ma zone de confort d'ingénieur génie chimique pour me plonger dans le (nano)monde des nanomatériaux, de la caractérisation, de la fonctionnalisation de surface et même de la biologie cellulaire et de l'imagerie médicale. Lors de ma thèse de doctorat soutenue fin 2010 (Maurizi 2010) j'ai appris au contact de Nadine Millot et de Frédéric Bouyer, mes deux encadrants, la synthèse, la caractérisation et la fonctionnalisation des nanoparticules, principalement pour applications biomédicales. Nadine m'a aussi inculqué un positivisme et un soutien à toute épreuve avec l'envie commune d'aller « vite à la biologie ». La biologie justement, j'y ait été introduit par David Vandroux, Laure Dumont et Gérard Lizard qui m'ont appris les rudiments de la culture cellulaire et de la cytotoxicité. J'ai donc mené cette thèse en gérant la partie nanoparticules, fonctionnalisation, caractérisation tout en apprenant chaque jour sur les exigences de la biologie cellulaire et même de l'imagerie médicale grâce à Paul Walker et François Brunotte. J'ai aussi mis à profit mes connaissances d'ingénieur pour me concentrer, avec un étudiant de Master (à l'époque), Jérémy Paris, sur un aspect de la synthèse de nanoparticules qui m'intéressaient particulièrement : le scale-up et la reproductibilité. A la fin de ce travail et diplôme, je ne me considérais pas comme un expert d'une des disciplines explorées mais me sentais assez armé pour travailler dans des projets regroupant nanomatériaux/biologie/médecine.

Suite à ma soutenance, j'ai rejoint, pendant 4 ans (2011-2015), le groupe de Heinrich Hofmann à l'école polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL) sur un projet européen FP7 : Nanodiara. Notre groupe était très central dans ce projet et devait développer des nanoparticules d'oxyde de fer pour la détection et le traitement des pathologies arthritiques. La chance pour un jeune chercheur avec ce type de projet est la pluridisciplinarité et le pluriculturalisme. J'ai pu travailler avec des hôpitaux notamment à la Charité de Berlin avec Cindy Strehl et Timo Gaber qui m'ont permis de travailler sur les toxicités sanguines des

Introduction

nanoparticules. Avec ce même organisme, je me suis même initié au marquage de cellules souches avec le doctorant Frank Schulze. Avec l'hôpital de Genève et de Nijmegen j'ai parfait ma culture sur l'IRM et ai même commencé à m'intéresser, à l'EPFL avec la doctorante Usawadee Sakulkhu et Marie-Gabrielle Beuzelin, aux interactions entre les protéines et la surface des nanoparticules. Ce projet européen avait également des collaborateurs industriels et le développement de méthodes « GMP-like » était aussi une part importante des compétences que j'ai développées. A la fin de ce contrat, j'avais une approche plus d'ingénierie sur les nanoparticules développées de manière suffisamment robuste pour éviter tous les biais liés à la physicochimie pour mieux étudier et comprendre leurs interactions biologiques. Poussé pour H. Hofmann, j'ai développé cette approche scientifique que j'utilise encore aujourd'hui dans mes projets de recherche : mes NPs développées ne sont peut-être pas « parfaites » mais le sont et le seront toujours de la même manière et cela pour plusieurs années.

Enfin, intéressé par tenter ma chance dans le monde académique français, j'ai décidé de tenter les concours du CNRS en 2016 et pour cela je suis parti à Dublin City University (DCU) en Irlande pour 6 mois (2015) puis à Basel Universität pour 7 mois (2016) pour continuer sur des projets européens (UNION) et suisse sur les nanoparticules et nano-assemblages. Ces plus courtes expériences m'ont aidé dans la rédaction et la préparation de mon concours CNRS tout en m'apportant d'autres compétences et approches sur les nanoparticules notamment les polymersomes.

Fin 2016, j'ai passé le concours en tant que chargé de recherche au CNRS, eu la chance d'être sélectionné et ai choisi d'aller au laboratoire ICB avec Nadine Millot pour continuer à développer des nanoparticules pour les applications médicales et surtout travailler sur l'étude de la couronne protéique, discipline dont je suis tombé « amoureux » durant mon séjour à l'EPFL. Avec Victoire Asila, Dihia Refsi (2 étudiantes de Master 2), Célia Marets (doctorante) et Lucien Saviot son « vrai » directeur de thèse, nous avons commencé à étudier certains aspects de la couronne protéique et surtout le développement de différentes chimies de surface de NPs pour étudier leurs influences sur sa formation. J'ai aussi étudié d'autres approches avec Cintia Marques, doctorante d'Olivier Jordan et Gerrit Borchard de l'Université de Genève. Avec Nadine Millot et Anne-Laure Papa (ancienne doctorante en même temps que je l'étais mais maintenant Professeure à George Washington University) nous avons aussi étudié l'influence des interactions des protéines sur les comportements biologiques des NPs dans le sang. Dorra Ben Elkhadi, nouvelle doctorante arrivée en mars 2023, travaillera avec moi, Emmanuel de Maistre du CHU de Dijon et Arnaud Ponche de l'Université de Haute-Alsace pour approfondir la compréhension des interactions entre les NPs et le sang notamment l'impact de la couronne protéique.

Introduction

De part ces expériences, je me considère toujours comme épanoui et utile dans un environnement pluridisciplinaire regroupant physicochimie, nanomatériaux, biologie et médecine. Je ne me considère pas comme un spécialiste des sciences de la vie mais j'essaie toujours de comprendre ces disciplines et d'adapter mes méthodes et approches à leurs exigences. Dans la suite de ce manuscrit, je présenterai mes principaux travaux de recherche sous le plan articulé de la manière suivante :

- 1) Synthèses et caractérisations de nanoparticules pour applications biomédicales. Je détaillerai les méthodes de synthèse, de fonctionnalisation et de caractérisations originales que j'ai développées depuis ma thèse. J'insisterai également sur les aspects de reproductibilité, répétabilité et scale-up que je trouve primordiaux dans l'innovation biomédicale.
- 2) En deuxième partie je me concentrerai sur un type de nanoparticules que j'utilise quasi-exclusivement en biologie : les SPIONs (superparamagnetic iron oxide nanoparticles). Je présenterai leurs applications en imagerie médicale comme agents de contraste direct ou en marquage cellulaire.
- 3) En troisième partie, je détaillerai les interactions biologiques que nous avons observées et quantifiées et qui ont influencé les futurs projets que j'aimerais développer. Les interactions cellulaires et hématologiques des SPIONs seront présentées.
- 4) Enfin, j'introduirai le sujet que j'ai découvert à l'EPFL et sur lequel je veux le plus améliorer mes connaissances : le rôle de l'interface chimique de surface/fluide biologique sur les comportements biologiques des NPs. Je décrirai mes premiers résultats et critiques sur les mesures de la couronne protéique *in vitro* et sur *in vivo*.
- 5) Après une conclusion sur ces projets, mes projets de recherche seront présentés en fin de manuscrit et se concentreront sur le développement de nanoparticules et sur la compréhension des interactions NPs/fluides biologiques dans le but d'améliorer la nanomédecine.

**Chapitre A. Activités de recherche
passées et futures : Nanoparticules pour
applications biomédicales et leurs
interactions biologiques**

Activités de recherche passées et futures : Nanoparticules pour applications biomédicales et leurs interactions biologiques

Suite à mes études d'ingénieur en génie des procédés, j'ai développé, durant ma thèse, des compétences sur la synthèse de nanoparticules (NPs) pour applications biomédicales. Dans le cadre des différents projets, expériences et rencontres qui ont parsemé mon parcours, mes activités et intérêts scientifiques ont divergé de mes connaissances principales acquises durant ma thèse. Ainsi mes compétences ont évolué de la synthèse et la caractérisation de NPs à leur utilisation en biologie puis se sont tournées vers une compréhension des phénomènes importants à contrôler pour comprendre leurs interactions biologiques. Ces activités ont évolué et ont enrichi ma compréhension de la nanomédecine ainsi que mes envies d'approfondissement sur certains de ses aspects.

De par leur structure, leur taille et/ou leur chimie, les propriétés intrinsèques des NPs leur confèrent un intérêt particulier pour leur utilisation en nanomédecine (Penn et al. 2003). Leurs tailles nanométriques leur permettent d'interagir avec le monde du vivant souvent par injection ou mise en contact directe, cela soulevant également des questions de toxicité induites par ces nanomatériaux (Lewinski et al. 2008). Pour résumer succinctement, les NPs inorganiques ont démontré leurs intérêts pour le biomédical divisé en quatre domaines : i) la détection ; ii) l'imagerie ; iii) le ciblage et iv) la thérapie (Figure 1).

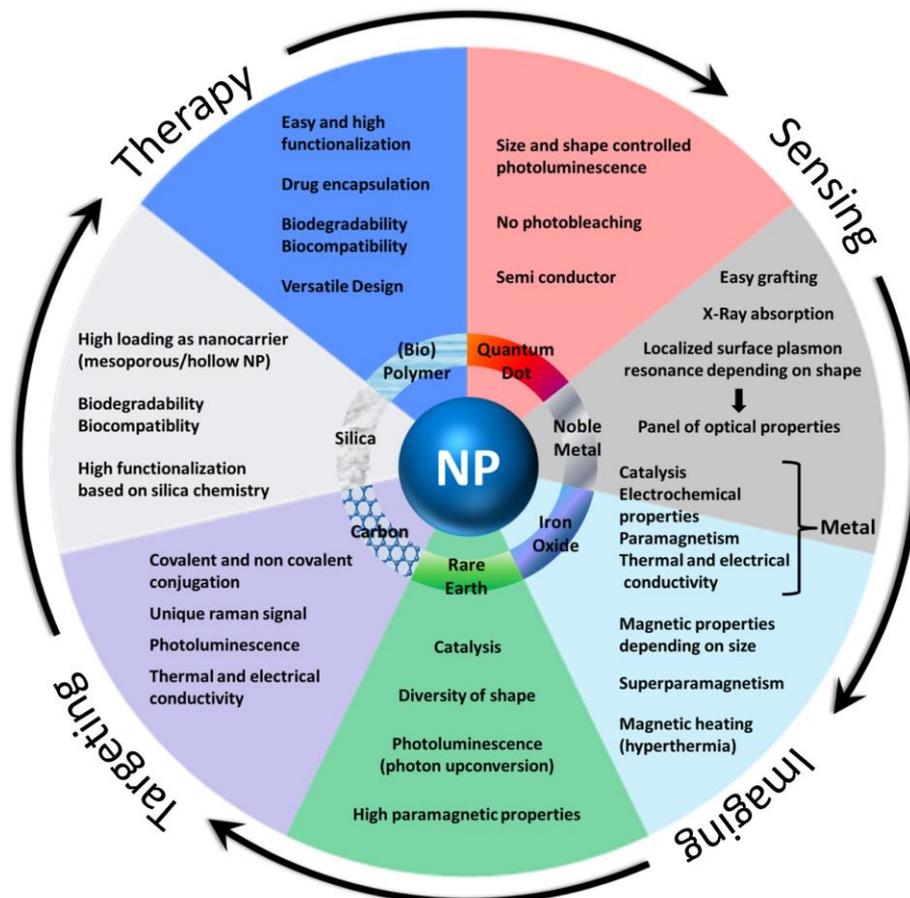


Figure 1 : Applications biomédicales en fonction des différentes propriétés des nanoparticules. (De Crozals et al. 2016)

Il existe de nombreuses nanoparticules constituées d'une pléthore de différents matériaux leur conférant, couplées à leur taille nanométrique, des propriétés

Activités de recherche passées et futures : Nanoparticules pour applications biomédicales et leurs interactions biologiques physicochimiques particulières. Les NPs métalliques comme l'or, par exemple, ont démontré leur intérêt en imagerie médicale et en détection notamment par leur effet de résonance plasmonique (Zhou et al. 2015). Les NPs de silice (SiO₂) quant à elles, ont une très grande porosité permettant l'encapsulation de principes actifs pour la délivrance de médicaments (Mamaeva et al. 2013; Varache et al. 2015). Pour finir cette liste non exhaustive, les NPs d'oxyde de fer peuvent posséder des propriétés superparamagnétiques permettant leur détection en imagerie par résonance magnétique (IRM) (Kiru et al. 2022), leur séparation ou même de les utiliser dans le cadre de thérapie par hyperthermie (Marins et al. 2018). Ces NPs sont aussi souvent fonctionnalisées en surface avec des polymères (Bishop et al. 2015), des molécules d'intérêts biologiques (Dai et al. 2015) ou dans des systèmes de type cœur/coquille (Kao et al. 2018) pour améliorer les interactions biologiques telles que la stabilité (Marins et al. 2018), la furtivité (Weiss et al. 2019) ou encore le ciblage (Cerrato and Langel 2018). C'est cette chimie de surface qui va influencer les comportements biologiques observés, à certains moments désirés et à d'autres moments à éviter (Gratton et al. 2008).

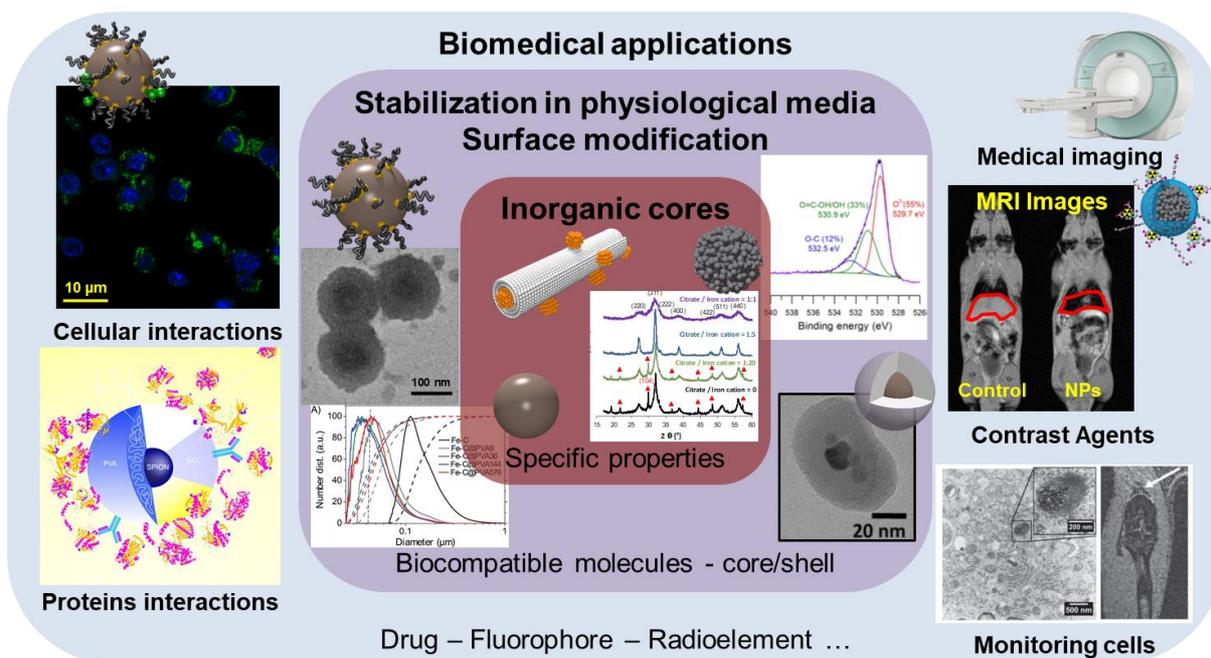


Figure 2 : **Nanoparticules pour applications biomédicales.** Des nanoparticules (majoritairement) inorganiques apportent des propriétés physicochimiques originales pour des nanohybrides fonctionnalisés et stabilisés avant d'étudier leurs potentiels en biologie et médecine et de comprendre leurs interactions biologiques.

Le but de ce rapport n'est pas de lister les possibles applications et effets biologiques de toutes les NPs existantes, de nombreuses revues s'étant déjà chargés de détailler tout cela notamment avec la publication dont est tirée la Figure 1 (De Crozals et al. 2016). L'objectif principal de la synthèse de mes projets est d'essayer de se concentrer sur les points qui me paraissent les plus importants à étudier pour améliorer l'étude de la nanomédecine et ainsi d'accélérer le transfert de la recherche académique vers le patient.

Durant mes projets, collaborations et encadrements, mes activités de recherche sont toujours parties de la synthèse de nanoparticules inorganiques majoritairement à base de

Activités de recherche passées et futures : Nanoparticules pour applications biomédicales et leurs interactions biologiques

métaux et d'oxydes métalliques possédant des propriétés physico-chimiques innovantes pour le développement de nanosondes ou des nanovecteurs diagnostiques, thérapeutiques ou théranostiques. Pour optimiser leurs performances et leurs adaptabilités dans les environnements biologiques visées, ces NPs ont été modifiées en surface avec des molécules organiques d'intérêt. Enfin, les nanohybrides ainsi obtenus ont été testés en nanomédecine que ce soit en imagerie médicale, en biologie cellulaire ou à l'interface avec les fluides biologiques pour étudier leurs interactions avec les protéines. Le schéma classique des projets de recherche menés est résumé en Figure 2.

A la suite de ces diverses études, les trois principaux objectifs de mon approche scientifique de la nanomédecine se sont fait plus clairs :

1. Toujours penser aux méthodes de synthèses des NPs en répondant aux exigences biologiques. La science des matériaux ne doit pas être le principal frein au développement de la nanomédecine (Paliwal et al. 2014).
2. L'interface entre la chimie de surface et le monde biologique est le paramètre à étudier pour comprendre les comportements biologiques et la toxicité des NPs (Cao et al. 2017).
3. L'adsorption des protéines des fluides biologiques est une des clés à un meilleur contrôle de ces comportements biologiques (Hajipour et al. 2014).

Cette partie intitulée « activités de recherche » résume donc les principaux projets et résultats obtenus ayant fait mûrir et évoluer mes activités de recherche. Cette évolution sera divisée en 4 parties résumant les résultats obtenus lors des projets et encadrements les plus significatifs et répondant aux trois objectifs fixés :

1. En premier lieu, les synthèses, fonctionnalisations et caractérisations de NPs pour applications biomédicales seront présentées en se concentrant sur un des principaux objectifs des méthodes développées : la reproductibilité et le scale-up. Cette partie illustrera le cœur de mes compétences en matériaux : toujours développer des nanomatériaux avec le moins de variabilité physico-chimique pour éviter les biais de résultats lors de leur utilisation en biologie. La chimie de surface jouant un rôle crucial dans les interactions entre les NPs et le monde du vivant, le contrôle précis de la fonctionnalisation fait partie des points les plus approfondis dans cette partie.
2. Une deuxième partie se concentrera sur l'utilisation de différentes NPs d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIONS) en imagerie médicale. Pour les raisons présentées dans la partie précédente, les NPs majoritairement étudiées en biologie et spécifiquement en imagerie par résonance magnétique (IRM) seront les SPIONS. Dans le cadre de collaborations fructueuses avec divers hôpitaux européens, ces NPs ont été testées comme agents de contraste que ce soit directement après injection ou dans le cas de marquage de cellules

Activités de recherche passées et futures : Nanoparticules pour applications biomédicales et leurs interactions biologiques

immunitaires ou souches. L'impact des fonctionnalisations de surface sur les biodistributions ainsi que la réponse inflammatoire *in vivo* ont également été étudiés.

3. Dans une troisième partie, quelques travaux sur les interactions biologiques de ces SPIONs seront résumés notamment l'influence de la chimie de surface sur les réponses cellulaires et hématologiques. Différents tests biologiques permettant d'estimer les réponses cellulaires telles que la cytotoxicité, le stress oxydant ou l'inflammation seront mis en place. La recherche de NPs « modèles » pouvant être utilisées comme témoin positif à l'échelle nanométrique sera également présentée. Enfin, l'impact des SPIONs sur le sang (fluide le plus en contact avec ces NPs) sera examiné.
4. Enfin, la dernière partie présentera les premiers résultats qui introduiront les projets de recherche envisagés pour les prochaines années : les interactions entre protéines et NPs → la « Protein Corona ». Le rôle de la chimie de surface sur l'adsorption des protéines sur les NPs ainsi que le rôle de ces molécules sur le comportement *in vivo* seront étudiés. Enfin, les pistes à explorer pour optimiser ces études seront présentées.

Comme dans le cadre de la majorité des projets de recherches menés, aucun des résultats n'a été obtenu seul. Ainsi, à la fin de chacune de ces parties, les principaux projets, encadrements, collaborations rencontrés dans ces études seront résumés. Les publications ayant découlé de ces études seront également listées et leurs liens HAL seront en Partie A.I.

A la suite de la présentation de ces activités de recherches, les futurs projets à mener sur ces thématiques nanomédicales seront présentés et détaillés. Elle se concentreront majoritairement sur l'étude et l'exploitation de cette protein corona tout en poursuivant le développement de NPs et l'exploration de potentielles applications biomédicales.

Partie A.I. Synthèses et caractérisations de nanoparticules pour applications biomédicales

Partie A.I. Synthèses et caractérisations de nanoparticules pour applications biomédicales ...	13
A.I.1. En introduction: exemples de nanoparticules synthétisées.....	14
A.I.2. Fonctionnalisations et caractérisations de surface des NPs.....	17
A.I.2.1. Couplage conjoint de PEG + DMSA : analyse quantitative	17
A.I.2.2. PVA-SPIONs : NPs optimisées pour fonctionnalisation reproductible.....	21
A.I.2.3. Système cœur / coquille reproductible à base de PVA-SPIONs.....	23
A.I.3. Scale-up pour transfert de technologie.....	26
A.I.3.1. Par voie hydrothermale (25 MPa, 150°C)	27
A.I.3.2. Par voie eau supercritique (25 MPa, 400°C)	29
A.I.4. Conclusion sur les synthèses des nanoparticules.....	32

Les nanoparticules (NPs) ont démontré leurs intérêts pour de nombreuses potentielles applications en médecine que ce soit en thérapie (Mottas et al. 2019; Bittner et al. 2021) et en diagnostic (Zhou et al. 2015; Kania et al. 2018). Dans la plupart des études, les NPs utilisées doivent être fonctionnalisées pour améliorer leur biocompatibilité, leur stabilité, leur ciblage et/ou leur furtivité (Gillich et al. 2013; Schöttler et al. 2016; Marins et al. 2018). Le cœur de mes activités de recherche s'est toujours concentré sur la synthèse de NPs majoritairement à base de métaux et d'oxydes métalliques conférant des propriétés physico-chimiques innovantes à des nanosondes ou des nanovecteurs diagnostiques, thérapeutiques ou théranostiques.

Dans cette première partie les choix d'approche dans les protocoles et les matériaux utilisés seront présentés. Dans un premier point introductif, les différentes NPs développées seront listées. Puis, durant le reste de cette partie ainsi que tout au long de ce document, les résultats se concentreront sur les oxydes de fer superparamagnétiques (SPIONs) et leurs fonctionnalisations de surface avec des molécules biocompatibles : le polyéthylène glycol (PEG) et l'alcool polyvinylique (PVA). Le choix de l'utilisation du PVA pour modifier ces SPIONs et d'utiliser ces NPs comme des « standards » dans l'environnement d'un projet européen sera justifié. Toutes les synthèses ont été développées avec les objectifs conjoints de reproductibilité et de mise à grande échelle (scale-up). En lien avec cette volonté, dans la dernière sous-partie, des NPs obtenues à l'aide d'un dispositif préindustriel fonctionnant en conditions hydrothermales ou eau supercritique seront détaillées.

A.I.1. En introduction: exemples de nanoparticules synthétisées

Depuis la thèse de doctorat puis en post-doctorats à l'EPFL, à DCU et à l'université de Basel et enfin depuis le recrutement au laboratoire ICB de Dijon en tant que chargé de recherche au CNRS, de nombreuses nanoparticules ont été synthétisées, fonctionnalisées et finement caractérisées. Les principales NPs obtenues sont présentées dans la Figure A.I-1.

Ce résumé des activités scientifiques se concentrant sur les SPIONs dans le reste du document, ces NPs seront présentées succinctement pour laisser place dans la suite de cette partie à des exemples approfondis de fonctionnalisations sur les NPs d'oxyde de fer.

- a) En premier lieu, les nanoparticules d'oxyde de fer (SPIONs : Figure A.I-1-a) sont obtenues par voie hydrothermale (voir partie A.I.3 pour plus de détails) et par voie chimie douce (Maurizi et al. 2009; Luce 2020) à partir de co-précipitation d'ions ferreux et ferriques souvent avec un ratio molaire Fe^{II}/Fe^{III} égal à 0,5 (Gupta et al. 2007; Tian et al. 2022). Les SPIONs possèdent des propriétés superparamagnétiques permettant leurs utilisations en imagerie par résonance magnétique (Basly et al. 2013; Kiru et al. 2022) (IRM) mais également pour la séparation de matériels biologiques, par exemple (Gonzalez-Moragas et al. 2015; Galmarini et al. 2018). Deux phases spinelles d'oxyde de

fer sont généralement obtenues : la magnétite Fe_3O_4 et sa phase oxydée la maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. A l'exception de la partie de scale-up de synthèses de SPIONs (partie A.I.3) la phase des SPIONs utilisées ne sera pas présentée car son influence sur les résultats obtenus n'a pas été testée.

- b) Des nanoparticules d'or ont également été développées lors de la thèse de Célia Marets (Marets en cours). Dans ce projet, nous nous sommes peu intéressés aux propriétés optiques des NPs d'or (Rodrigues et al. 2021). L'obtention de différentes tailles de NPs a permis d'étudier l'influence de ce paramètre sur l'adsorption des protéines à leur surface. Les synthèses de NPs d'or ont été optimisées à partir de la méthode de Turkevich (Turkevich et al. 1951) consistant à réduire un sel d' Au^{III} en Au^0 dans un milieu réducteur. En ajoutant des ligands lors de la synthèse et en jouant sur d'autres paramètres (température et temps de réaction), différentes tailles ont pu être obtenues. Deux exemples sont présentés en Figure A.I-1-b.
- c) A la fin de ma thèse, avec l'aide de la Dr. Anne-Laure Papa, des nanotubes de titanate (TiONTs) ont été couplés à des SPIONs (Figure A.I-1-c (Papa et al. 2011)). Lors de la synthèse hydrothermale des TiONTs avec des précurseurs de TiO_2 en solution basique et à 150°C , des SPIONs obtenues par voie chimie douce ont été ajoutées. L'idée était de coupler les propriétés superparamagnétiques des SPIONs à la forme allongée de TiONTs utile pour la transfection par exemple (Papa et al. 2012). Cette étude préliminaire a pu être poursuivie par une thèse de doctorat (Paris 2013).
- d) Dans le cadre d'une collaboration en 2011 à l'EPFL avec Noemi Aguilo-Aguayo du groupe FEMAN de l'Université de Barcelone (Espagne) dans le cadre de sa thèse de doctorat, des nanoparticules de carbone encapsulant des nanoparticules de fer ont été obtenues (Aguiló-Aguayo et al. 2014). Ces NPs ont été synthétisées par décharge d'arc électrique plasma. Ces NPs n'étant pas stables en conditions physiologiques, leur stabilisation avec des polymères biocompatibles a été optimisée (Figure A.I-1-d).
- e) A l'EPFL, une optimisation de l'encapsulation de SPIONs dans des coquilles de silice a été réalisée (Figure A.I-1-e). Ces synthèses ont permis un dépôt d'invention à l'EPFL et feront l'objet d'une présentation plus poussée en partie A.I.2.3 Ces NPs symbolisent une volonté de se concentrer sur l'aspect reproductibilité et scale-up des synthèses de NPs (Maurizi et al. 2014b, 2015a; Maneprakorn et al. 2017).
- f) Lors d'une expérience de quelques mois à l'Université de Basel en 2016, des polymersomes ont été synthétisés (Figure A.I-1-f). Ces NPs organiques sont obtenues à partir de copolymères triblocs. Il est possible de modifier ces

Synthèses et caractérisations de nanoparticules pour applications biomédicales

polymères pour rendre ces polymersomes perméables à certains ions comme des nanomembranes (Zhang et al. 2012; Lomora et al. 2015) ou même des nanoréacteurs (Rigo et al. 2018).

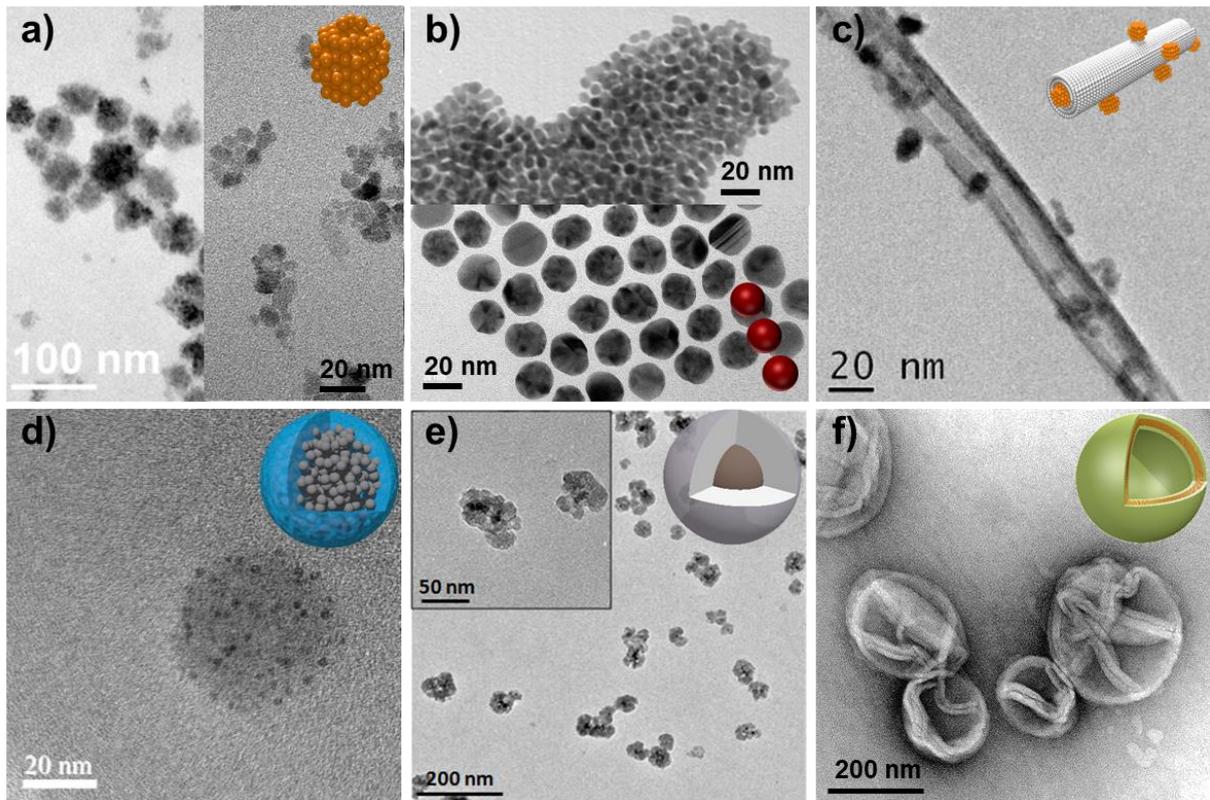


Figure A.I-1 : Exemples de nanoparticules synthétisées pour applications biomédicales (images en microscopie électronique à transmission). a) différentes nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (SPIONs) obtenues par voie hydrothermale (gauche) et chimie douce (droite) (Thomas et al. 2019; Maurizi et al. 2009) ; b) nanoparticules d'or (Au NPs) de 6 nm (en haut) et de 20 nm (en bas) (Marets en cours) ; c) nanotubes de titanate (TiONTs) recouverts de SPIONs (Papa et al. 2011) ; d) nanoparticules de Fe encapsulées dans du carbone (Aguiló-Aguayo et al. 2014) ; e) SPIONs encapsulées dans de la silice (Maurizi et al. 2014b) et f) polymersomes (Rigo et al. 2018)

Différentes NPs ont été synthétisées et caractérisées au cours des expériences pré- et post-doctorales. La plupart de ces nanohybrides ont eu des applications dans le domaine biologique. La suite de cette partie se concentrera seulement sur la fonctionnalisation et caractérisation de surface des SPIONs, ces NPs étant celles majoritairement utilisées dans mes travaux.

Toutes les NPs utilisées lors de mes différentes expériences professionnelles ont été développées dans un esprit de reproductibilité et répétabilité ainsi que pour être facilement transférable au moins pré-industriellement.

A.I.2. Fonctionnalisations et caractérisations de surface des NPs

Les nanoparticules d'oxyde de fer (SPIONs) possèdent des propriétés superparamagnétiques intéressantes pour des applications biomédicales mais elles sont instables dans les conditions physiologiques (NaCl 0,15M et pH 7,4) car, entre autres, leur point isoélectrique est proche de pH 7. Pour améliorer leur stabilité colloïdale, des modifications des chimies de surface sont nécessaires. Dans le cadre de l'étude de la compréhension des phénomènes biologiques induits par les NPs, le contrôle de cette chimie de surface est aussi primordial. Dans cette partie, différentes approches de fonctionnalisation de surface seront présentées:

- Le couplage polyéthylène glycol (PEG) et de DMSA (dimercaptosuccinic acid) pour stabilisation et post-fonctionnalisation
- Le PVA (alcool polyvinylique) comme stabilisant de base pour reproductibilité et scale-up des fonctionnalisations : système cœur/coquille

A.I.2.1. Couplage conjoint de PEG + DMSA : analyse quantitative

Dans une première partie, la fonctionnalisation conjointe de polyéthylène glycol silanisés (PEG-Si) avec d'un acide carboxylique (DMSA : dimercaptosuccinic acid) a été étudiée (Maurizi et al. 2009, 2015b, 2019). L'idée était de coupler les propriétés stabilisantes et furtives des fonctionnalisations au PEG (Marins et al. 2018; Abushrida et al. 2020) avec les groupement thiols (SH) du DMSA pour post-fonctionnaliser les SPIONs avec des molécules réactives à cette chimie (Shubayev et al. 2009; Bellat 2012).

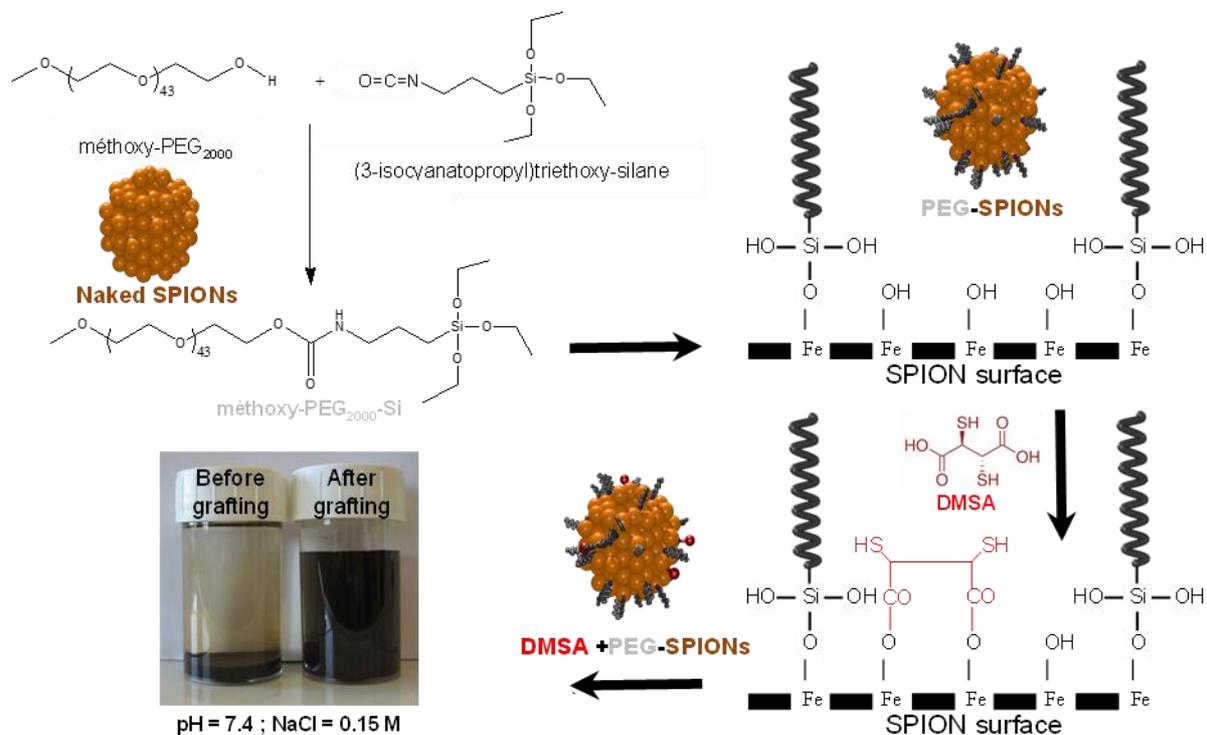


Figure A.I-2 : Fonctionnalisations conjointes des SPIONs avec des PEGs silanisés et du DMSA. (Maurizi et al. 2009, 2015b)

Synthèses et caractérisations de nanoparticules pour applications biomédicales

En premier lieu, les methoxy-PEGs ont été silanisés puis greffés à la surface des SPIONs à pH=4 dans une mélange d'eau et d'éthanol pendant 48h. 2 heures avant l'arrêt de la réaction, du DMSA est ajouté puis les suspensions sont dialysées (seuil de coupure 12-14 kDa) dans l'eau pendant 48h. Cette réaction est résumée et illustrée en (Figure A.I-2).

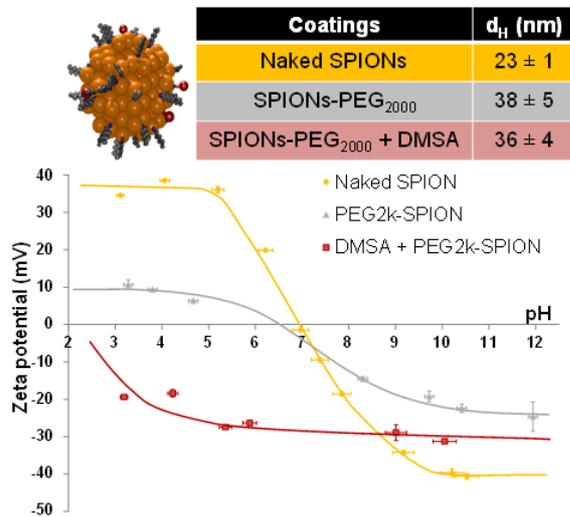


Figure A.I-3 : **Caractérisations en suspension des SPIONs-PEG-SPIONs + DMSA.** Potentiels Zeta en fonction du pH des SPIONs fonctionnalisées avec du PEG₂₀₀₀ et du PEG₂₀₀₀ + DMSA [Maurizi et al., 2015b]

Différentes longueurs de chaînes de PEGs ont été choisies (550 ; 2000 et 5000 g.mol⁻¹) et ces suspensions ont été tout d'abord caractérisées en diffusion dynamique de la lumière (DLS) et potentiel zêta pour comparer leurs comportements colloïdaux. La Figure A.I-3 compare les diamètres hydrodynamiques et les potentiels zêta en fonction du pH de SPIONs nues, fonctionnalisées avec du PEG₂₀₀₀-Si et du PEG₂₀₀₀-Si + DMSA. Les résultats sont identiques pour les PEG₅₅₀ et PEG₅₀₀₀. Greffer du PEG-Si augmente le diamètre hydrodynamique mais le DMSA n'influence pas significativement cette taille par rapport

au PEG seul. En revanche, là où le PEG seul n'influence pas le point isoélectrique (PIE), se situant vers pH 7, le DMSA charge négativement les SPIONs fonctionnalisées sur toute la gamme de pH étudiée.

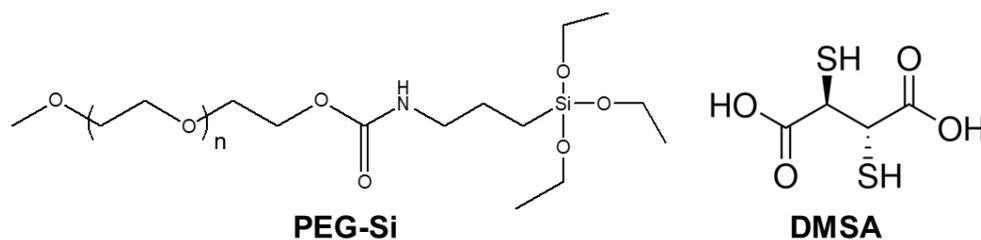


Figure A.I-4 : **Structures du PEG-Si et du DMSA.**

En complément de ces analyses assez qualitatives, des mesures en TGA (thermogravimetric analyses) ont été réalisées en couplage avec de l'XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) pour quantifier la proportion de chacune des deux molécules à la surface des SPIONs nues (Figure A.I-5-a). Pour cela, la surface spécifique des SPIONs obtenue en BET (Brunauer, Emmett et Teller) est nécessaire pour au final obtenir des valeurs en molécules par nm². La surface spécifique des SPIONs nues utilisées est de 110 ± 1 m².g⁻¹. Les calculs se sont basés sur les éléments présents et significatifs pour les deux molécules : l'azote pour le PEG-Si et le soufre pour le DMSA (Figure A.I-4).

Les analyses en TGA (Figure A.I-5-b) montrent un lien évident entre la masse molaire du PEG-Si et la perte de masse. Avec cette technique seule, il n'est pas possible de quantifier le mélange complexe PEG et DMSA car leurs pertes de masses apparaissent sensiblement aux mêmes températures. Par XPS, les proportions d'atomes présents à la surface des SPIONs fonctionnalisés ont été mesurées. En se concentrant sur la proportion de soufre et d'azote, respectivement S_{DMSA} et N_{PEG} (Figure A.I-5-c), il a été possible de remonter à la proportion de carbone et d'oxygène provenant du PEG et du DMSA ainsi que la quantité de PEG et DMSA en comptant qu'une quantité de soufre équivaut à $\frac{1}{2}$ DMSA (2 S par DMSA) et qu'une quantité d'azote est équivalente à la quantité de PEG.

Avec les données ATG, XPS et BET, les proportions de PEG et de DMSA ont été calculées. Les équations suivantes décrivent les calculs pour obtenir les nombres de PEG et de DMSA par nm^2 .

Tout d'abord, à l'aide des proportions de N_{PEG} et de S_{DMSA} il est possible de calculer les quantités molaires (n) de DMSA et de PEG.

$$Eq. 1 \quad \frac{n_{DMSA}}{n_{PEG}} = \frac{\frac{S_{DMSA}}{2}}{N_{PEG}} \rightarrow n_{DMSA} = \frac{(\frac{S_{DMSA}}{2})}{N_{PEG}} \times n_{PEG} = \beta \times n_{PEG}$$

Où S_{DMSA} est la proportion molaire de S trouvée par XPS et N_{PEG} la proportion molaire de N trouvé en XPS.

Les masses des molécules sont ensuite calculées de la manière suivante

$$Eq. 2 \quad m_{molecules}(g) = n_{PEG} \times (M_{PEG} \times \Delta m_{PEG}) + n_{DMSA} \times (M_{DMSA} \times \Delta m_{DMSA}) = \Delta m$$

Où Δm_{PEG} et Δm_{DMSA} sont les pertes de masses des deux molécules seules en TGA et sont égales à 98%. $M_{PEG} = 2250 \text{ g.mol}^{-1}$ et $M_{DMSA} = 182.22 \text{ g.mol}^{-1}$. Δm est la perte de masse des PEG-SPIONs + DMSA en TGA.

Ainsi, en combinant les Eq. 1 et Eq. 2 la masse totale des molécules peut s'écrire

$$Eq. 3 \quad \Delta m_{molecules} = n_{PEG} \times [(M_{PEG} \times \Delta m_{PEG}) + \beta \times (M_{DMSA} \times \Delta m_{DMSA})]$$

$$n_{PEG} = \frac{\Delta m}{(M_{PEG} \times \Delta m_{PEG}) + \beta \times (M_{DMSA} \times \Delta m_{DMSA})}$$

Enfin, pour calculer les nombres de molécules de PEG ou DMSA par nm^2 de SPIONs nues, il suffit d'appliquer l'équation suivante:

$$Eq. 4 \quad \text{PEG ou DMSA}/nm^2 = \frac{n_{PEG \text{ ou DMSA}} \times 6.02 \times 10^{23}}{S_{BET}}$$

Où S_{BET} est la surface spécifique des SPIONs nues.

Ainsi, avec une analyse précise des caractérisations en XPS, TGA et BET des SPIONs fonctionnalisés avec du PEG et du DMSA, il a été possible de quantifier la concentrations de ces molécules à la surface des SPIONs (Figure A.I-5-d).

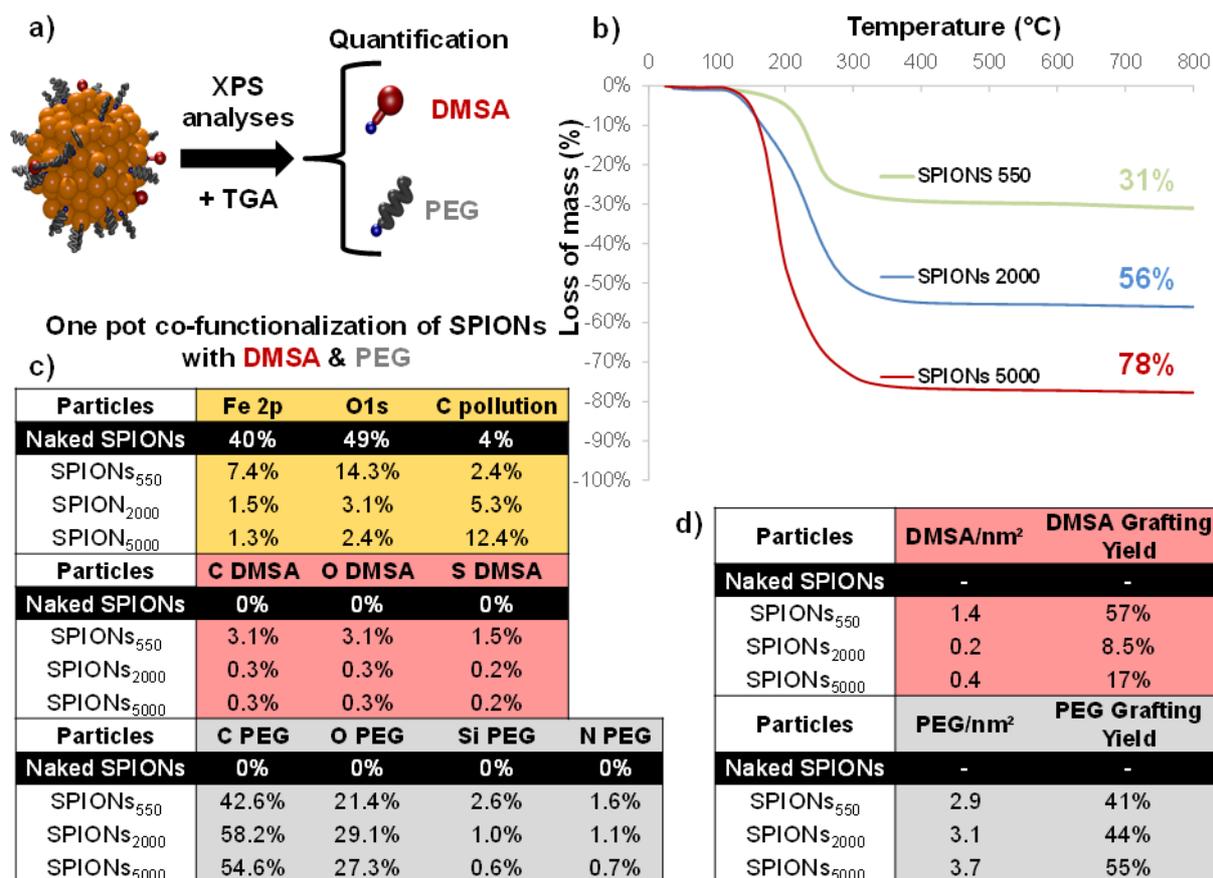


Figure A.1-5 : Quantification des molécules sur une fonctionnalisation complexe PEG-SPIONs + DMSA.

a) fonctionnalisations de PEG et DMSA ; b) TGA des trois types de PEG-SPIONs + DMSA c) et d) proportions atomiques des deux molécules en XPS ainsi que leur taux de greffage respectif (Maurizi et al. 2019)

Il a été démontré que la quantité de DMSA était plus importante (1.4 DMSA/nm²) quand il a été greffé avec des PEG de petite taille moléculaire (550 g.mol⁻¹) que quand c'était le cas avec de plus grand PEGs (2000 et 5000 g.mol⁻¹). Pour le PEG, en revanche, la taille du polymère ne semble pas influencer significativement leur taux de greffage.

Ces études ont démontré qu'avec une caractérisation fine de la fonctionnalisation des NPs il est possible de quantifier les molécules présentes à leur surface. Même s'il existe, il est vrai, de nombreuses approximations dans ces calculs, ils restent un atout dans mon travail que j'ai continué à développer pour obtenir et comparer des estimations de taux de greffage lors de la modification de surface de NPs. Dans d'autres études, la TGA n'a pas été utilisée car destructives mais d'autres méthodes sont tout de même possibles comme la mesure par fluorescence ou la titration des molécules n'ayant pas réagi. Il est à noter que lors de mes diverses expériences scientifiques, j'ai souvent partagé mon envie d'approfondir l'analyse du greffage des molécules sur les NPs avec différents étudiants et collègues pour les aider à mieux appréhender l'efficacité de leurs méthodes de fonctionnalisation (Bellat 2012; Paris 2013; Loiseau 2017; Luce 2020; Marets en cours).

A.I.2.2. PVA-SPIONS : NPs optimisées pour fonctionnalisation reproductible

Dans cette partie, la fonctionnalisation optimisée des SPIONS sera présentée. La molécule choisie est l'alcool polyvinylique (PVA) pour ses propriétés de biocompatibilité approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) (Paradossi et al. 2003).

La modification de surface des SPIONS a été optimisée dans le laboratoire du Pr. Hofmann à l'EPFL avant mon arrivée (Chastellain et al. 2004; Petri-Fink et al. 2005). Le protocole consiste en un mélange équivolume d'une solution de PVA et de suspension de SPIONS nues avec un ratio massique PVA/Fe de 9/1. Ce ratio massique apporte la meilleure stabilité dans les conditions physiologiques. Un équilibre d'adsorption se crée entre le PVA et la surface des SPIONS (Chastellain et al. 2003) et une couche de polymère se lie de manière forte aux SPIONS. Cette caractéristique a permis de développer l'idée d'utiliser ces PVA-SPIONS comme NPs de base pour les post-fonctionnalisations (description plus loin dans cette partie). L'absence de purification des PVA-SPIONS après fonctionnalisation a souvent été une critique émise envers cette méthode mais de nombreuses études *in vitro* (dont certaines seront présentées en partie A.III.2.1) ont été réalisées pour tester les potentiels phénomènes toxicologiques induits par les molécules de PVA non adsorbées.

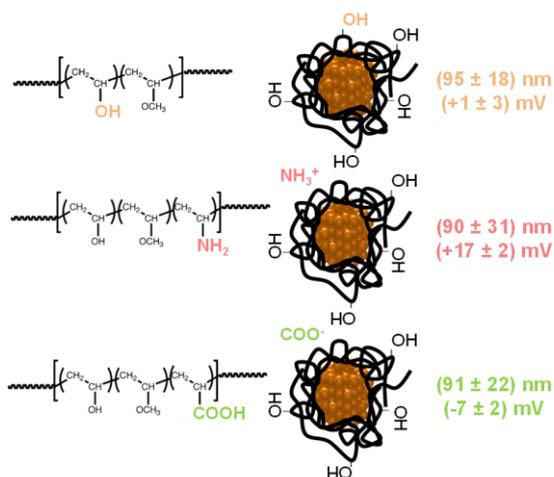


Figure A.I-6 : PVA-SPIONS. Exemples de fonctionnalisations de SPIONS avec différents PVA: neutres, chargés positivement et négativement [Sakulku et al., 2014a]

Lors de la thèse de doctorat de Dr. Sakulku (Sakulku 2013), ces synthèses ont été optimisées en ajoutant des PVA de différents poids moléculaires et fonctionnalisés avec des groupements chimiques conférant différentes charges (amine : NH_2 charges (+) et carboxyles COOH charges (-)) (Sakulku et al. 2014a, b). Cela a permis d'obtenir des PVA-SPIONS de tailles hydrodynamiques d'environ une centaine de nanomètres indépendamment des polymères utilisés avec différentes charges (positives, neutres et négatives) résumées en Figure A.I-6.

L'utilisation de PVA pour fonctionnaliser et stabiliser les SPIONS a permis d'obtenir des nanohybrides de manière reproductible et en grande quantité. Ces NPs ont été utilisées dans le cadre d'un projet européen FP7 : Nanodiara. Durant ce projet, des outils nanométriques ont été développés pour la détection précoce de l'arthrite rhumatoïde et l'ostéo-arthrite. Les propriétés superparamagnétiques des SPIONS ayant montré leur intérêt pour la détection par IRM mais également pour séparer ou concentrer du matériel biologique, ces PVA-SPIONS ont été centraux dans le cadre du projet. Les nombreux partenaires du projet (résumés en Figure A.I-7) dépendaient des résultats obtenus par notre groupe et l'idée a été de partir d'un Master batch de PVA-SPIONS qui ne

devait pas varier tout au long des étapes du projet évitant ainsi les biais d'observations biologiques dus aux variations physicochimiques de nos nanomatériaux. Ce master batch était suivi et alimenté tout au long du projet par de nouvelles synthèses satisfaisant des critères d'analyse définis au préalable. Ainsi, chaque SPION puis chaque PVA-SPION étaient finement caractérisées avant d'être ajoutées au Master batch. La cristallinité ainsi que le diamètre de cristallite (obtenu par TEM) des SPIONs nues était vérifiés systématiquement à chaque synthèse. Puis le diamètre hydrodynamique, le potentiel zêta ainsi que la concentration en polymères et en SPIONs (lyophilisation et TGA) étaient analysés. Les PVA-SPIONs étaient stockées à 5 mg_{Fe}/mL (soit environ 7 mg_{SPIONs}/mL) afin d'être suffisamment concentrées pour tous les essais biologiques ultérieurs. Enfin, une première analyse de cytotoxicité sur HePG2 et RAW 264.7 était réalisée. Avant envoi des NPs aux partenaires européens, l'absence de contamination des suspensions était contrôlée et un certificat d'analyses était joint à l'envoi.

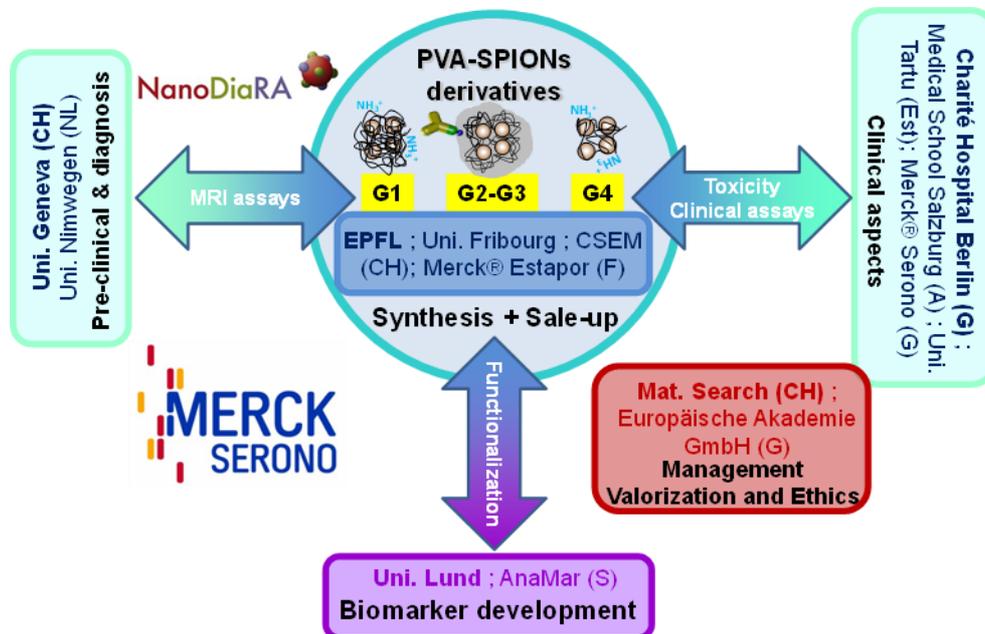


Figure A.I-7 : Schéma du consortium du projet européen FP7 Nanodiara où la synthèse de SPIONs était centrale.

La Figure A.I-8 résume l'approche choisie, qui pourrait être qualifiée « d'ingénierie des nanohybrides », initiée lors du projet Nanodiara. Les PVA-SPIONs possédant des groupements NH₂ (aPVA) ont été utilisées comme des NPs de génération 1 (G1) pour certains essais biomédicaux. La maîtrise du procédé de fabrication couplée aux premières études biologiques réalisées sur ces NPs ont permis de commencer à les utiliser dès le début du projet notamment *in vivo* en IRM (partie A.II.1), *in vitro* en toxicité (partie A.III.2) ou lors d'essais cliniques avec la société Merck. Nanodiara s'est divisé en deux familles d'applications : le diagnostic *in vivo* et *in vitro*. Pour les applications *in vitro*, le but était de rechercher des biomarqueurs de l'arthrite et de les concentrer dans un dispositif aimanté. Pour augmenter l'efficacité magnétique des SPIONs, ces NPs ont été concentrées dans des systèmes cœur / coquille de silice qui ont ensuite été fonctionnalisés par du PEG puis une streptavidine et un anticorps. Ces NPs appelées G2 et G3 pour respectivement les systèmes cœur / coquille

nus et après PEG-streptavidine-Anticorps ont été synthétisées à partir de NPs G1. L'étude du développement des NPs G2 sera détaillée en partie A.I.2.3. Pour les applications *in vivo*, les NPs G1 ont également été modifiées en greffant de manière covalente le PVA à la surface des SPIONs (NPs G4) en utilisant la même approche que les NPs G2 (plus de détails en partie A.III.2.1). L'approche consistant à partir d'une génération de NPs pour en obtenir d'autres a permis d'éviter, à nouveau, des biais due à la physicochimie des SPIONs, les « cœurs magnétiques » étant toujours les mêmes pour toutes les applications et les partenaires du projet. De plus, pour les étapes de fonctionnalisation, le PVA a permis d'améliorer la stabilité des SPIONs durant les réactions d'encapsulation ou de greffage.

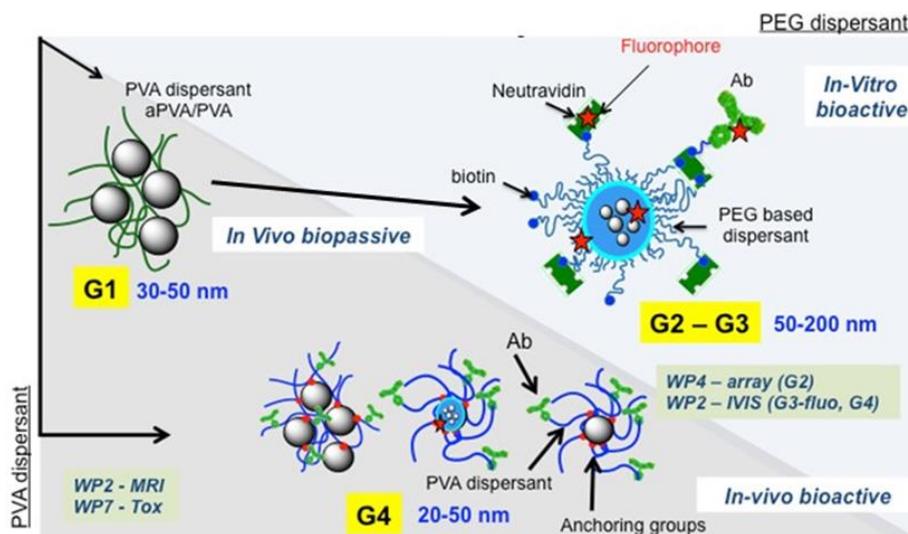


Figure A.I-8 : Schéma résumant l'approche globale de fonctionnalisation initiée lors du projet européen FP7 Nanodiara. Le scale-up et la reproductibilité permettent d'obtenir différentes générations de SPIONs à base de Master batch de PVA-SPIONs.

A.I.2.3. Système cœur / coquille reproductible à base de PVA-SPIONs

Durant la caractérisation et l'optimisation des PVA-SPIONs, leur stabilité ainsi que la reproductibilité et la répétabilité de leur synthèse sont apparues comme un atout majeur quant à leur utilisation comme NPs de base pour d'autres fonctionnalisations. Dans le cadre du projet européen Nanodiara, des systèmes cœur/coquille (silica@PVA-SPIONs) ont été développées à partir de NPs G1. Dans une étude paramétrique, l'influence du ratio massique (Ri) PVA / Fe a été étudiée. Des SPIONs nues (à 10 mg_{Fe}/mL) ont été mélangées (équi-volume) à de solutions de PVA dans des Ri allant de 0 à 9. Ces suspensions ont ensuite été diluées dans l'éthanol auquel a été ajoutée une quantité constante de TEOS (Tetraethyl orthosilicate) utilisé comme précurseur de silice. La réaction d'hydrolyse / condensation (Stober et al. 1968; Kralj et al. 2011) est ensuite amorcée en milieu basique avec de l'ammoniaque avant de centrifuger les NPs obtenues pour éliminer l'excédent de réactifs.

L'idée de ces études était d'utiliser les PVA pour:

1. Stabiliser les SPIONs durant la période d'encapsulation
2. Condenser la silice à la fois sur les hydroxyles de surface des SPIONs mais aussi sur les fonctions OH du PVA créant ainsi une réticulation entre PVA et SPIONs.

La Figure A.I-9 illustre les différentes morphologies de silica@PVA-SPIONs obtenues. Le ratio R_i joue un rôle déterminant dans la dispersité et la morphologie des nanohybrides. En l'absence de PVA la méthode de synthèse choisie entraîne l'obtention de billes de silice sans SPIONs à l'intérieur sphériques et d'agglomérats difformes de silice et de SPIONs. Avec du PVA mais dans un ratio R_i inférieur à 4, Les agrégats silice/SPIONs sont toujours présents mais plus les silices sphériques « vides ». A partir de R_i égale à 4, une morphologie originale (caractérisée de nano-framboise) apparaît et l'augmentation du ratio semble augmenter la taille des NPs.

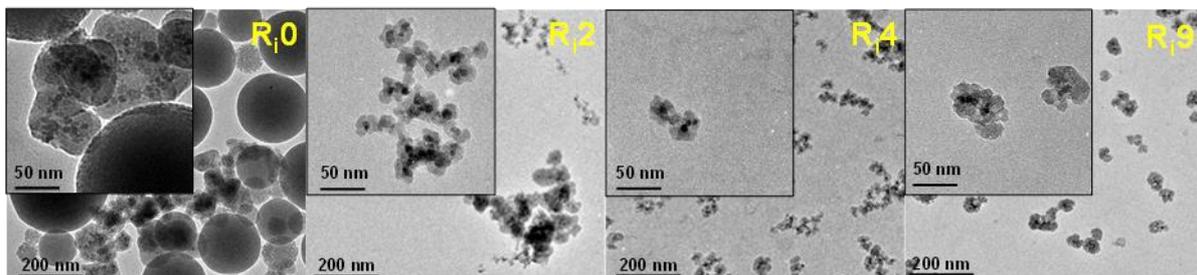


Figure A.I-9: Images TEM des NPs de silice encapsulant des PVA-SPIONs (Silica@PVA-SPIONs) à différents ratios PVA/Fe (R_i). (Maurizi et al. 2014b, 2015a; Maneepprakorn et al. 2017)

Des caractérisations plus fines des SPIONs@silica (Figure A.I-10) ont permis de proposer un mécanisme de formation de ces silices originales. En plus de mesures en TEM, le diamètre hydrodynamique des nanohybrides stables ($R_i \geq 4$) corrobore la tendance d'augmentation de taille avec l'augmentation de la quantité de PVA. L'indice de polydispersité (PDI) des silica@PVA-SPIONs passe également d'environ 0,3 pour les PVA-SPIONs seules à des PDI inférieurs à 0,1 après encapsulation dans la silice. Ceci prouve la possible réticulation entre le PVA et le SPIONs formant toujours une bille monodisperse « figée » par la silice. En mesure de surface spécifique (SSA en Figure A.I-10) la variation est, quant à elle, inversement proportionnelle au ratio R_i . Cette observation a été expliquée par une augmentation de la porosité des nanohybrides confirmant la réticulation entre le PVA et les SPIONs. Des analyses TGA et d'ICP (Induced Coupled Plasma spectroscopy) ont permis de quantifier le PVA restant, les SPIONs et la silice menant ainsi à deux informations essentielles :

1. A l'aide d'un calcul utilisant les taille TEM des SPIONs et des silices, couplées au densité et au concentration de ces deux matériaux, le nombre de SPIONs par bille a été mesuré. Plus le ratio R_i augmente et avec lui la taille des nanohybrides, plus les nanosphères contiennent des SPIONs.
2. La perte de masse en TGA a permis de quantifier le PVA restant après purification et de revenir sur un ratio massique final (R_f) PVA / Fe.

De manière surprenante, le ratio R_f semble être primordial sur la morphologie, la porosité et la taille des nanohybrides. Trois valeurs de R_f ont été retenues et ont permis de proposer un mécanisme réactionnel (Figure A.I-10) : $R_f \leq 1$; $1 \leq R_f \leq 2$ et $R_f \approx 2$. Pour les R_f inférieurs à 1, la concentration de PVA ne semble pas assez importante pour améliorer la stabilisation des SPIONs et ainsi leur encapsulation dans la silice. Entre 1 et 2, R_f est suffisant pour obtenir des Silica@PVA-SPIONs de morphologie et de taille reproductible. Avec un R_f égale à 2, les NPs augmentent un peu en taille mais gagnent surtout en porosité.

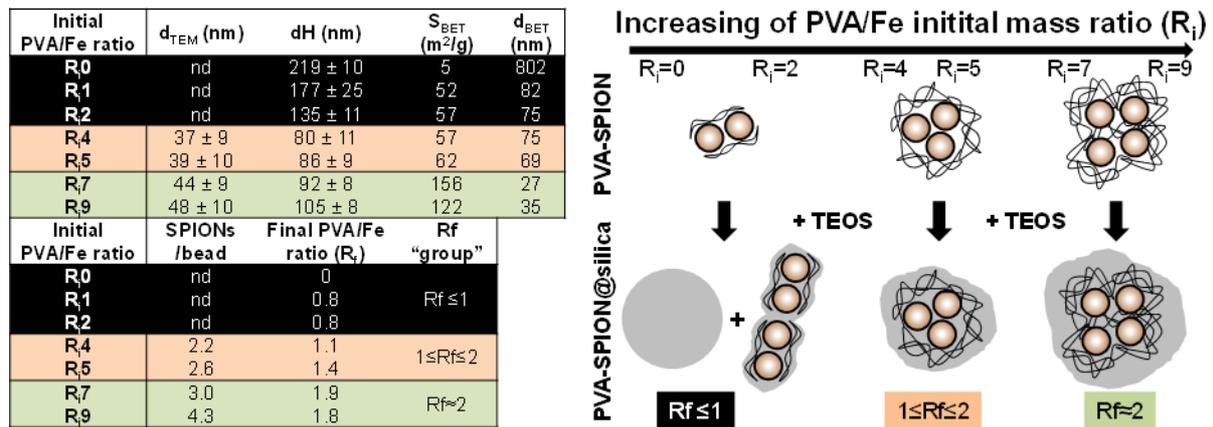


Figure A.I-10 : Caractérisations des tailles et surface spécifiques des Silice@PVA-SPIONs et explication du mécanisme de synthèse de formation de ces NPs en fonction du ratio R_i . (Maurizi et al. 2014b)

L'utilisation des PVA-SPIONs comme NPs pour greffer une coquille de silice a permis de paramétrer des nanohybrides originaux. Les ratios PVA/Fe R_i et surtout R_f , permettent de contrôler la taille, le nombre de SPIONs par bille (et donc leur pouvoir magnétique) et la porosité pour le piégeage et le relargage possibles de diverses molécules. Le PVA permet la stabilité des SPIONs durant la fonctionnalisation et ainsi la simplification du protocole de synthèse. Cette approche originale a fait l'objet d'un dépôt d'invention à l'EPFL qui n'a, malheureusement, pas été suivi de brevet car la méthode, bien qu'intéressante, était trop simplifiée pour prouver son activité inventive (le fameux exemple du crayon-gomme).

Cependant, ces Silica@PVA-SPIONs ont été utilisées durant toute ma carrière de chercheur. En premier lieu, la robustesse du protocole de synthèse permet une reproductibilité sans faille et surtout une répétabilité par n'importe quel opérateur. Par exemple, ces NPs sont synthétisées dans le cadre de projet d'étudiants de différents niveaux (de la L3 à la thèse) et les caractéristiques (tailles, morphologies etc.) obtenues sont toujours identiques. Ces nanohybrides ont même été utilisées dans le cas de projet industriel avec une société suisse et également dans le cadre de transfert de technologies entre l'EPFL et le centre Nanotec de Thaïlande (voir CV et (Maneeprakorn et al. 2017)). Enfin, cette approche a aussi permis d'optimiser le greffage du PVA sur les SPIONs (partie A.III.2.1).

A.I.3. Scale-up pour transfert de technologie

Toujours avec les exigences biomédicales et avec l'objectif du transfert de technologie des méthodes de synthèse, une partie des NPs ont été produites à l'aide d'un dispositif hydrothermal en continu développé en 2001 au sein du laboratoire ICB par le Dr. Daniel Aymes (Xin 2005) et amélioré par Dr. Frédéric Demoisson (Demoisson 2015) depuis son arrivé en 2008. Ce procédé (Figure A.I-11) permet de synthétiser en continu à des débits de l'ordre de 20 à 60 mL.min⁻¹ des NPs dans des conditions allant de la chimie douce au domaine eau supercritique (T > 374°C et P > 22 MPa). Avec ce dispositif, des SPIONs ont été obtenues (Figure A.I-11) dans des conditions hydrothermales (150°C, 25 MPa) et en eau supercritique (400°C, 25 MPa). Dans un première partie, les paramètres de synthèses hydrothermales ayant permis d'obtenir des SPIONs directement fonctionnalisées avec des morphologies différentes seront étudiés. Dans la seconde partie, l'influence du précurseur sur l'obtention de SPIONs en domaine eau supercritique sera présentée.

Le procédé se compose de trois voies principales (Figure A.I-11) :

1. La voie des précurseurs
2. La voie basique ou eau suivant les conditions hydrothermales choisies
3. La voie d'eau qui est préchauffée puis chauffée dans le réacteur où les voies 1 et 2 s'écoulent à contre-courant.

La température et la pression sont contrôlées tout au long du dispositif. Après réaction (de l'ordre de 4 à 8 secondes), les suspensions formées sont refroidies brutalement et, après filtration à 7 et 2 µm, sont récoltées en sortie du dispositif. Les suspensions sont enfin purifiées avant caractérisations.

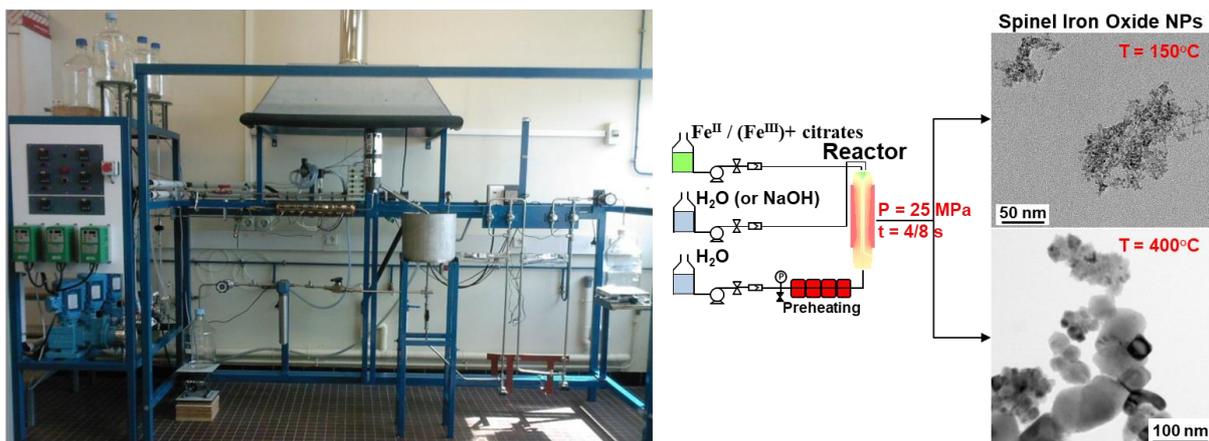


Figure A.I-11 : Dispositif hydrothermal de synthèses d'oxyde de fer allant des conditions hydrothermales jusqu'au domaine eau supercritique. (Maurizi et al. 2011, 2014a; Demoisson 2015)

A.I.3.1. Par voie hydrothermale (25 MPa, 150°C)

Le but de l'utilisation d'un dispositif de synthèse hydrothermal en continu était d'obtenir des NPs en grande quantité (plusieurs grammes par jour) et aussi de manière reproductible toujours pour éviter les biais physicochimiques lors des études biologiques. Dans une première étude, l'influence de l'ajout de citrates aux précurseurs ferreux et ferrique sur la cristallinité et la morphologie des SPIONs synthétisées a été étudiée. L'idée était au départ d'essayer de fonctionnaliser directement les SPIONs avec des citrates pendant la synthèse tel que cela avait déjà été réalisé en batch (Nigam et al. 2011; Andreas et al. 2012). De plus, les conditions hydrothermales étant oxydantes et propices à la formation d'une phase d'oxyde de fer thermodynamiquement stable mais pas superparamagnétique (l'hématite $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), les citrates étaient aussi envisagés comme un antioxydant (Xue et al. 2009). Enfin, l'effet chélatant des molécules de citrates permettait, en batch, de réduire la taille des cristallites (Hunt et al. 1995; Bee et al. 1995).

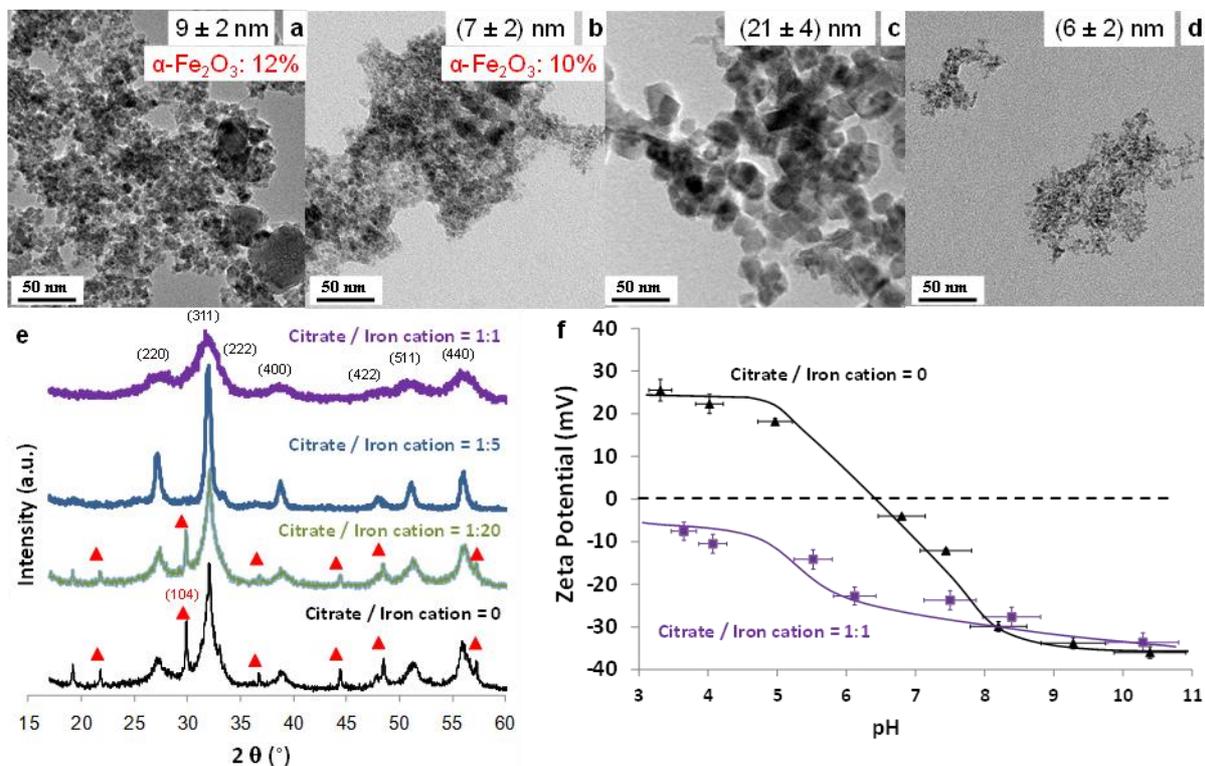


Figure A.I-12 : Analyses morphologique, de taille et de fonctionnalisations des SPIONs obtenues en conditions hydrothermales. Influence du ratio citrates : Fe sur la morphologie, la taille et la présence d'hématite lors de synthèses hydrothermales (150°C, 25 MPa ; 60 mL.min⁻¹) : a) 0 : 1 ; b) 1 : 20 ; c) 1 : 5 et d) 1 : 1 ; e) DRX des différents SPIONs obtenus avec différents ratios citrates : Fe et f) potentiel Zeta en fonction du pH des SPIONs nues et synthétisées avec ration citrates / Fe = 1/1 (Maurizi et al. 2011)

Suivant ces précédentes études sur des synthèses « classiques » de SPIONs, différents ratio molaire Fe/citrates ont été mélangés dans les précurseurs. Les ratios 0/1 ; 1/20 ; 1/5 et 1/1 ont été choisis. La co-précipitation s'est déroulée en milieu basique (NaOH 1M). Les paramètres de synthèse étaient de 150°C, 25 MPa et 3*20 mL.min⁻¹ (temps de réaction de 4 secondes). Les Figure A.I-12 a-d présentent les images TEM des différentes SPIONs obtenues

et la Figure A.I-12-e leurs diffractogrammes des rayons X. Les morphologies observées montrent des SPIONs magnétite de l'ordre de 9 nm en absence de citrate mais avec une proportion massique d'hématite de l'ordre de 12% d'environ 65 nm. La proportion massique d'hématite est obtenue à partir des calculs de Dr. Thomas Belin (Belin 2002) sur la proportions des pics de diffractions caractéristiques (220) de la magnétite et (104) de l'hématite. Avec un ratio de citrates de 5%, les SPIONs sont plus petits (7 nm) avec toujours une présence d'hématite de l'ordre de 10% et plus petite (30 nm). A partir de 20% de citrates, il n'y a plus d'hématite mais les cristallites observées sont bien plus grosses qu'initialement (21 nm). Enfin, avec un ratio de 100%, les SPIONs obtenues sont très fines (6 nm) et sont même chargées négativement à pH 7 comme le montre les potentiels zêta (Figure A.I-12-f) en fonction du pH des SPIONs nues (PIE à pH 7) et des SPIONs-citrates au ratio de 100% (PIE à pH < 3). Les citrates ont donc permis de réduire l'oxydation des SPIONs en hématite et même de réduire leur taille et de les stabiliser à pH physiologique tout cela à une production en continu de l'ordre de 5 g.h⁻¹.

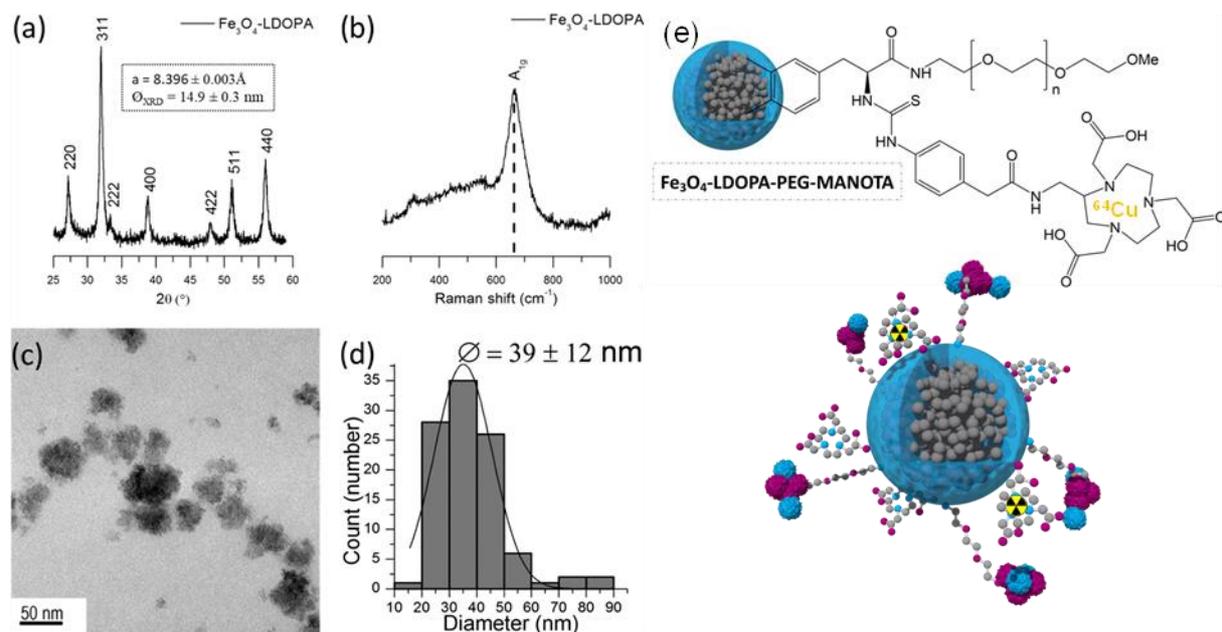


Figure A.I-13 : SPIONs synthétisées et fonctionnalisées avec de la L-DOPA (SPIONs-LDOPA) en une étape dans le dispositif hydrothermal en continu (150°C, 25 MPA ; 80 mL.min⁻¹). a) DRX de la poudre obtenue ; b) spectre Raman démontrant la présence de magnétite; c) image TEM des SPIONs obtenues ; d) diamètre moyen obtenu par comptage des NPs et e) PEGylation et fonctionnalisations de SPIONs-LDOPA pour imagerie bimodale PET/MRI (Thomas et al. 2019).

Sur la base de cette étude préliminaire, d'autres molécules stabilisantes et antioxydantes ont été testées par le Dr. Guillaume Thomas (Thomas 2015) : DHCA (3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid) et L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine). La partie suivante présentera les synthèses de SPIONs avec la L-DOPA. Le protocole était similaire aux SPIONs-citrates avec un ratio molaire Fe^{III}/Fe^{II} = 2 et un ratio molaire L-DOPA/Fe = 100%. Les paramètres de synthèse hydrothermale ont été de 150°C, 25 MPa et 80 mL.min⁻¹. La diffraction des rayons X a mis en évidence la présence de la phase magnétite d'environ 15 nm sans hématite résiduelle (Figure A.I-13-a). La spectroscopie Raman a confirmé la présence de

magnétite et l'absence d'hématite ou de maghémite. (Figure A.I-13-b). La L-DOPA a empêché l'oxydation des SPIONs tout en leur apportant une taille de cristallites et une morphologie (Figure A.I-13-c) plus grande que les tailles observées lors des synthèses classiques (de l'ordre de 15 nm par rapport à 6-10 nm généralement). En DLS (Figure A.I-13-d), les SPIONs-L-DOPA ont une taille hydrodynamique d'environ 40 nm compatible avec les applications biologiques visées. Ces NPs synthétisées en une étape, en continu et de manière reproductible ont ensuite été fonctionnalisées avec un PEG et un macrocycle Manota (développé par l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne : ICMUB) permettant le radiomarquage des SPIONs avec du ^{64}Cu pour leur utilisation en imagerie médicale notamment avec le système bimodale PET/IRM du Centre George François Leclerc (CGFL) de Dijon. Ces résultats seront présentés en partie A.II.1.2.

A.I.3.2. Par voie eau supercritique (25 MPa, 400°C)

A l'aide du dispositif hydrothermal en continu, des SPIONs ont été synthétisées en domaine eau supercritique ($T = 400^\circ\text{C}$ et $P = 25 \text{ MPa}$). L'eau supercritique permet de précipiter des sels inorganiques sans présence de solution basique (Aimable 2007; Demoisson 2015). Ainsi, les conditions eau supercritiques ont eu lieu avec différents ratios molaires $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ et $\text{Fe}/\text{citrate}$ s. En se basant sur les études en voie hydrothermales, les citrates ont été utilisés pour réduire l'oxydation des SPIONs. Le débit total a été réduit à $30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (temps de réaction de 8 secondes) pour éviter le colmatage rapide des filtres du dispositif. Trois conditions ont été étudiées : a) ratio classique $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}} = 1/2$; b) ratio avec Fe^{II} seulement : $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}} = 3/0$ et c) ratio avec Fe^{II} seulement et $\text{Fe}/\text{citrate}$ s = $1/1$. Les NPs ainsi obtenues ont été purifiées par centrifugations successives dans l'eau avant lyophilisation pour caractérisations.

La Figure A.I-14 et la Figure A.I-15-a résument les caractéristiques morphologiques et cristallographiques obtenues avec les trois conditions étudiées. En premier lieu, avec le ratio $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ classique, les NPs obtenues sont exclusivement de phase hématite, de taille 70 nm (par DRX ou TEM) et monodisperses (Figure A.I-14-a et Figure A.I-15-a). L'obtention de cette phase non désirée est due aux conditions eau supercritique qui sont thermodynamiquement favorables à sa formation notamment dans le cadre de NPs de taille supérieure à 20 nm (Jolivet et al. 2004). L'oxydation sans doute très rapide des Fe^{II} présents en solution en Fe^{III} a aussi probablement aidé à la cristallisation des NPs sous forme $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$. En réduisant la quantité de Fe^{III} à zéro (Figure A.I-14-b et Figure A.I-15-a), les NPs obtenues sont un mélange massique de 59% de phase superparamagnétique (maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ou magnétite Fe_3O_4) et de 41% d'hématite. Bien que les tailles soient polydisperses et malgré la présence encore importante d'hématite, utiliser uniquement du Fe^{II} a permis d'obtenir plus de 50% en masse de phase superparamagnétique. Les mesures de tailles par TEM montrent deux populations, une centrée sur 60 nm et une autre sur 175 nm. Il n'est cependant pas possible de vraiment tirer des conclusions sur cette observation, des très petite NPs étant également observées en

TEM (Figure A.I-14-b) mais non quantifiées pour cause d'agglomération importante des échantillons. Il semblerait en regardant les pics de diffraction en Figure A.I-15-a que la structure des grosses NPs soient plutôt hématite et que celle des plus petites non mesurées en TEM soient magnétite (ou maghémite).

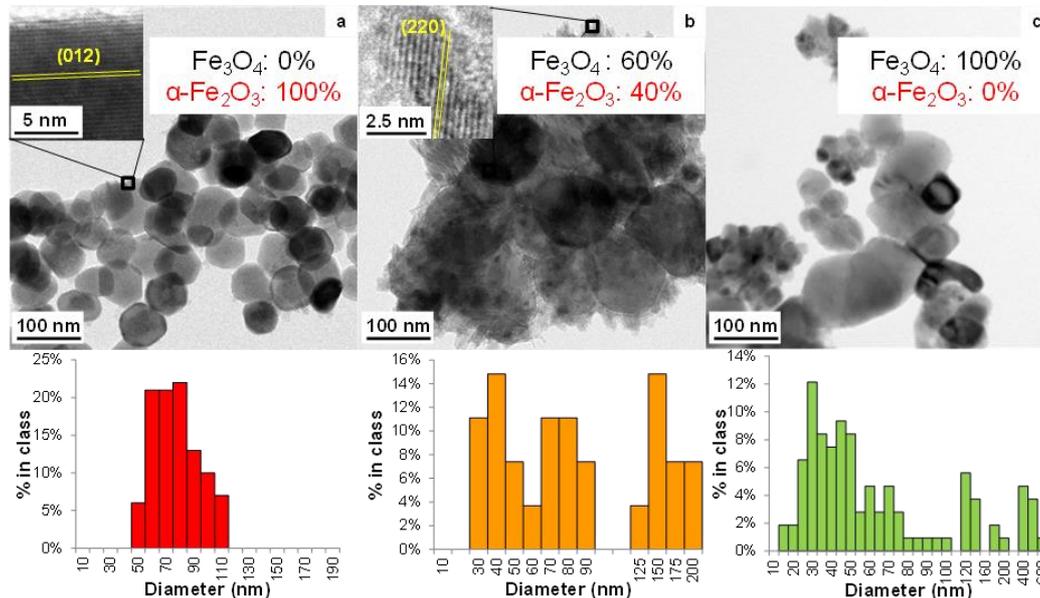


Figure A.I-14 : Analyses morphologique et de taille des NPs obtenues en conditions eau supercritique. Clichés TEM et comptage de tailles des NPs obtenues avec le dispositif hydrothermal en continu en conditions eau supercritique (400°C ; 25 MPa ; 30 mL.min⁻¹) à différentes conditions : a) Fe^{II}/Fe^{III} = 1/2 et citrates/Fe = 0/1 ; b) Fe^{II}/Fe^{III} = 3/0 et citrates/Fe = 0/1 et c) Fe^{II}/Fe^{III} = 3/0 et citrates/Fe = 1/1 (Maurizi et al. 2014a)

En ajoutant 100% molaire de citrates aux ions Fe^{II} avant la synthèse en eau supercritique, la phase hématite a disparu (Figure A.I-14-c et Figure A.I-15-a ; proportion massique < 0.5%) laissant place à de la magnétite et de la maghémite. Les tailles par TEM montrent une très grande polydispersité des résultats de quelques dizaines de nanomètres à plus de 600 nm pour certaines cristallites. Le diffractogramme de cet échantillon fait apparaître un dédoublement des pics de la phase spinelle (Figure A.I-15-b) traduisant la présence de grosses NPs de magnétite ($a = 8.397 \text{ \AA}$) et de plus petites de maghémite ($a = 8.350 \text{ \AA}$). En ajustant les deux populations des diffractogrammes, il a été possible d'obtenir une taille de cristallites de maghémite de l'ordre de 32 nm et de magnétite d'environ 106 nm. Les SPIONs obtenues grâce à l'effet antioxydant des citrates n'ont pas été stabilisées et aucun citrate n'a été retrouvé à la surface de ces NPs après purification.

Avec cette étude paramétrique de l'influence de l'oxydation du Fer avec ou sans citrates en conditions eau supercritique, il a été possible de proposer un mécanisme de synthèse pendant les 8 secondes de réaction. Avec un ratio classique Fe^{II}/Fe^{III} = 1/2, les conditions eau supercritique oxyde presque instantanément les Fe^{II} en Fe^{III} entraînant la formation d'hématite, phase oxydée composée exclusivement de Fe^{III} et qui va croître lors de la réaction.

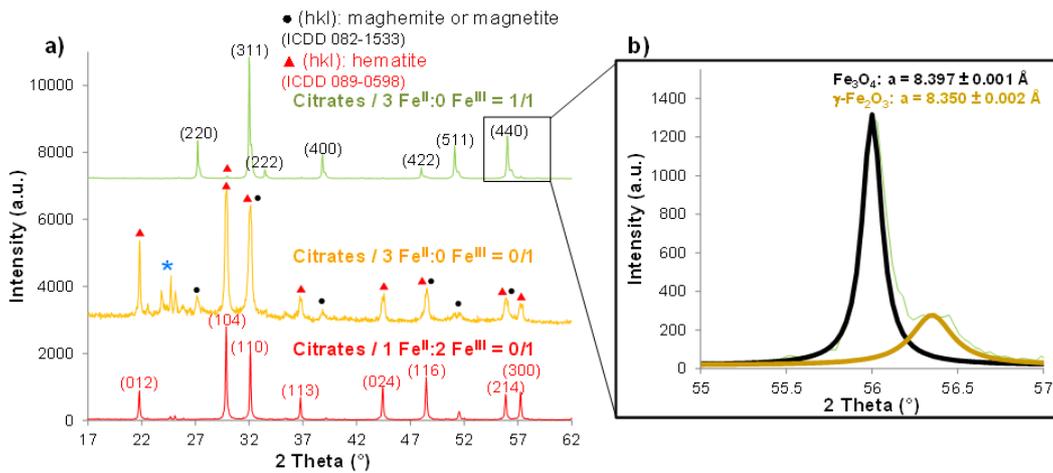
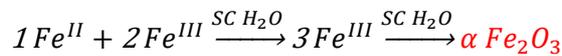
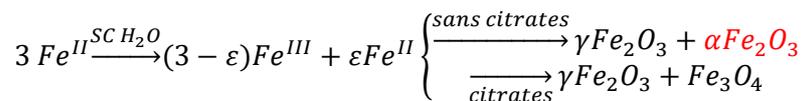


Figure A.I-15 : **Caractérisations cristallographiques des NPs obtenus en conditions eau supercritique.** a) DRX des NPs obtenues avec le dispositif hydrothermal en continu en conditions eau supercritique (400°C ; 25 MPa ; 30 mL.min⁻¹) à différentes conditions et b) zoom sur le pic de diffraction montrant la présence de deux phases d'oxyde de fer (Maurizi et al. 2014a)



En ce qui concerne l'utilisation de Fe^{II} uniquement avec ou sans citrates, le mécanisme d'obtention des NPs doit se baser sur une oxydation de certains Fe^{II} en Fe^{III} entraînant un ratio sous-stœchiométrique Fe^{II}/Fe^{III} (Tronc et al. 1992; Jolivet et al. 1992) et la formation d'une phase spinelle oxydée (γ-Fe₂O₃) de petite taille et d'une phase spinelle non oxydée de plus grande taille (Fe₃O₄). Sans les citrates, ces dernières NPs sont en compétition avec les conditions oxydantes de l'eau supercritique et se transforment en leur phase thermodynamiquement stable : l'hématite (α-Fe₂O₃). Cela expliquant l'observation TEM (Figure A.I-14-b et Figure A.I-15-a) montrant de petites NPs de spinelle, probablement des maghémite qui sont déjà à leur niveau d'oxydation le plus stable, et des grosses d'hématite. Les citrates évitent l'oxydation des magnétites favorisant ainsi leur croissance par dissolution/recristallisation. Les mécanismes réactionnels proposés sont les suivants :



L'étude paramétrique de formation de NPs d'oxyde de fer en domaine eau supercritique n'a pas permis d'obtenir des SPIONs stables et compatibles pour les applications biomédicales notamment à cause des tailles de cristallites importantes et d'une très grande polydispersité. En revanche, elle a permis de comprendre le mécanisme de formation de la phase spinelle superparamagnétique dans ces conditions même si de nombreuses inconnues demeurent comme la croissance extrêmement rapide de ces NPs en eau supercritique (plus d'un demi micron en seulement 8 secondes).

A.I.4. Conclusion sur les synthèses des nanoparticules

Cette première partie a tenté de résumer les compétences initiales acquises en physicochimie et plus précisément en synthèses, fonctionnalisations et caractérisations de nanoparticules pour applications biomédicales. Durant mes différentes expériences, des NPs ont été synthétisées et fonctionnalisées avec des polymères ou des coquilles biocompatibles. Des caractérisations fines sont toujours nécessaires pour connaître précisément la chimie de surface des nanohybrides. Ce contrôle de la surface avec de nombreux outils de d'analyses permet de mieux anticiper et comprendre les interactions biologiques des NPs développées notamment dans les fluides biologiques complexes.

De plus, avec ma formation d'ingénieur en génie des procédés, je me concentre toujours sur le développement de protocoles de synthèse de NPs robustes, reproductibles, répétables et simplifiés avec pour but de diminuer les erreurs possibles d'observations lors des études biologiques. Ainsi, les études d'interactions biologiques sont toujours initiées en premier lieu sur des NPs contrôlées et produites en quantité suffisantes pour éviter tout biais induit par les déviations physicochimiques de matériaux moins contrôlés ou en moindre quantité. Il a été possible, par exemple, d'utiliser les PVA-SPIONs comme NPs de base pour ensuite leur greffer de manière covalente des polymères ou les encapsuler dans ces coquilles de silice. Par ailleurs, une partie de ma recherche s'est aussi intéressée au scale-up de la synthèse de NPs soit par optimisation en batch (pour les silices par exemple) mais également à l'aide du dispositif de synthèse hydrothermale présent au laboratoire ICB. Il a possible d'obtenir plusieurs grammes par jours de SPIONs fonctionnalisées avec des molécules organiques stabilisantes, quantité primordiale pour des études *in vivo* notamment. Ces synthèses optimisées ont même fait l'objet d'un transfert de technologie entre l'EPFL et le centre Nanotec de Thaïlande et le Jozef Stefan Institut de Slovénie.

Dans cette même optique de contrôle et de transférabilité rapide des NPs, la majorité de ma recherche s'intéresse aux applications possibles de NPs bien maîtrisées répondant aux critères de reproductibilité, répétabilité et scale-up : les SPIONs. Dans la suite de ce manuscrit, des analyses *in vivo* et *in vitro* avec et sur ces SPIONs seront présentées.

Les projets, encadrements et publications principaux sont résumées ci-dessous.

Projets associés

- Projet Régional ANER : Nanoprot (2019-2022)
- Projet Européen FP7 Nanodiara (2010-2014)

Collaborations principales associées

- CHU et CGFL, Dijon
- Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB), Dijon
- National Nanotechnology Center, Thaïlande

Encadrements principaux associés

- Célia Marets (09/19- en cours) ; Thèse de doctorat : *Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules (NPs) pour l'étude des interactions NPs-protéines*
- Dr Annette Luce (10/16-03/20) ; Thèse de doctorat: *Biotests innovants pour l'évaluation de la toxicité de nanoparticules*
- Dr. Usawadee Sakulkhu (09/09-05/13); Thèse de doctorat : *Preparation of coated nanoparticles and investigation of their behavior in biological environment*
- Dr. Weerakanya Maneepakorn (2012); Docteur visiteur Nanotec Thaïlande (3 mois): *Nouvelle thématique sur les oxydes de fer biocompatibles en Thaïlande*
- Dr. Noemí Aguiló Aguayo (01/08-11/12) ; visite de 3 mois en 2011 : *Production and characterisation of carbon-encapsulated iron nanoparticles by arc-discharge plasma*
- Alexis Claveau (09/13-01/14) ; Projet de Master 2 : *Investigation and optimization of the covalent grafting of polymers on SPIONs by crosslinking of silica precursors*
- Vanessa Dao Mai (03/12-07/12) ; Stage de Master 2 : *Fluorescent Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications*
- Nicolas Leclaire (03/12-06/12) ; Projet de Master 2 : *Synthesis and Characterization of Silica-coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles For Biomedical Applications*
- Jérémy Paris (2009 & 2010) ; Stages de Master 1 et 2 : *Elaboration de nanoparticules d'oxydes de fer pour applications biomédicales: synthèse et fonctionnalisation*

Publications principales

- *Efficient quantification by X-ray photoelectron spectroscopy and thermogravimetric analyses of the one-pot grafting of two molecules on the surface of iron oxide nanoparticles*, L. Maurizi*, F. Sallem, J. Boudon, O. Heintz, H. Bisht, F. Bouyer and N. Millot*, **J. Nanosci. Nanotech.**, 19 (8), 4920-4929, **2019** (DOI: [10.1166/jnn.2019.16796](https://doi.org/10.1166/jnn.2019.16796))
- *Innovative Magnetic Nanoparticles for PET/MRI Bimodal Imaging*, G. Thomas, J. Boudon, L. Maurizi, M. Moreau, P. Walker, I. Severin, A. Oudot, F. Demoisson, F. Denat, S. Poty, C. Goze, F. Brunotte and N. Millot, **ACS Omega**, 4 (2), 2637-2648, **2019** (DOI: [10.1021/acsomega.8b03283](https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03283))

- *Superparamagnetic nanohybrids with cross-linked polymers providing higher in vitro stability*, W. Maneeprakorn, **L. Maurizi**, H. Siriket; T Wutikhun, T. Dharakul and H. Hofmann, **J. Mater. Sci.**, 52 (16), 9249-9261, **2017** (DOI: [10.1007/s10853-017-1098-2](https://doi.org/10.1007/s10853-017-1098-2))
- *Polymer adsorption on iron oxide nanoparticles for one-step amino-functionalized silica encapsulation*, **L. Maurizi***, A. Claveau and H. Hofmann, **J. Nanomater.**, 2015 (2015), ID 732719, **2015** (DOI: [10.1155/2015/732719](https://doi.org/10.1155/2015/732719))
- *Influence of surface charge and polymer coating on internalization and biodistribution of PEG-modified iron oxide nanoparticles*, **L. Maurizi**, A.-L. Papa, L. Dumont, F. Bouyer, P. Walker, D. Vandroux and N. Millot, **J. Biomed. Nanotech.**, 11, (1), 126-136, **2015** (DOI: [10.1166/jbn.2015.1996](https://doi.org/10.1166/jbn.2015.1996))
- *Fast and continuous synthesis of spinel nanostructured iron oxide in supercritical water: influence of cations and citrates*, **L. Maurizi**, F. Bouyer, M. Ariane, R. Chassagnon and N. Millot, **RSC advances**, 4 (86), 45673-45678, **2014** (DOI: [10.1039/C4RA08562K](https://doi.org/10.1039/C4RA08562K))
- *Syntheses of cross-linked polymeric superparamagnetic beads with tunable properties*, **RSC Advances**, **L. Maurizi***, U. Sakulkhu, L. A. Crowe, N. Leclair, V. Mai Dao, J.-P. Vallée and H. Hofmann, 4 (22), 11142-11146, **2014** (DOI: [10.1039/C3RA48004F](https://doi.org/10.1039/C3RA48004F))
- *One step continuous hydrothermal synthesis of very fine stabilized superparamagnetic nanoparticles of magnetite*, **L. Maurizi**, F. Bouyer, J. Paris, F. Demoisson, L. Saviot and N. Millot, **Chem. Commun.**, 47, (42), 11706-11708, **2011**, (DOI: [10.1039/C1CC15470B](https://doi.org/10.1039/C1CC15470B))
- *Synthesis of Titanate Nanotubes Directly Coated with USPIO in Hydrothermal Conditions: A New Detectable Nanocarrier*, A.-L. Papa[†], **L. Maurizi**[†], D. Vandroux, P. Walker and N. Millot, **J. Phys. Chem. C**, 115 (39), 19012-19017, **2011** (DOI: [10.1021/jp2056893](https://doi.org/10.1021/jp2056893))
- *Easy Route to Functionalize Iron Oxide Nanoparticles via Long-Term Stable Thiol Groups*, **L. Maurizi**, H. Bisht, F. Bouyer and N. Millot, **Langmuir**, 25, (16), 8857-8859, **2009** (DOI: [10.1021/la901602w](https://doi.org/10.1021/la901602w))

Partie A.II. SPIONs pour diagnostic médical

Partie A.II. SPIONs pour diagnostic médical	35
A.II.1. SPIONs comme agents de contraste directs en IRM	36
A.II.1.1. Influence de la charge de surface sur la biodistribution des SPIONs.....	36
A.II.1.2. SPIONs fonctionnalisées pour imagerie bimodale PET/IRM.....	39
A.II.2. Marquage passif de macrophages pour détection d'arthrite	41
A.II.2.1. Détection de l'arthrite et réponse inflammatoire	41
A.II.2.2. Suivi du traitement de l'arthrite avec des PVA-SPIONs	44
A.II.3. Marquage de cellules souches pour suivi de greffe	46
A.II.4. Conclusions sur le diagnostic médical avec des SPIONs.....	50

Des nanoparticules d'oxyde de fer ont été synthétisées lors de divers projets pour les utiliser comme agents de contrastes en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). En effet, les SPIONs possèdent des propriétés superparamagnétiques leur conférant un effet sur le temps de relaxation transversale (T2) des protons permettant, potentiellement, de diminuer le temps d'exposition du patient en IRM (Babes et al. 1999; Basly et al. 2013). Les SPIONs génèrent un contraste dit « négatif » assombrissant l'environnement proches de ces NPs dont la relaxivité r_2 sert à estimer leur pouvoir contrastant. Dans le cadre des différentes études présentées dans ce rapport, les SPIONs ont été étudiées en imagerie du petit animal (modèle murin). Les SPIONs ont été utilisées comme agents de contraste en IRM:

- Soit en injection directe dans l'animal pour mesurer la biodistribution des NPs
- Soit pour suivre l'évolution d'une pathologie par marquage cellulaire passif
- Soit par marquage de cellules injectées dans l'animal pour détecter le devenir de ces cellules *in vivo*.

A.II.1. SPIONs comme agents de contraste directs en IRM

Dans cette partie des SPIONs fonctionnalisées synthétisées soit par co-précipitation classique soit par voie hydrothermale continue ont été directement injectées dans des modèles murins. Dans le premier cas, l'influence de la charge de surface sur la biodistribution des SPIONs a été étudiée notamment par IRM. Enfin, des SPIONs fonctionnalisées comme agents de contraste bimodaux PET/IRM ont été évaluées.

A.II.1.1. Influence de la charge de surface sur la biodistribution des SPIONs

Des SPIONs de tailles de cristallites de 9 nm ont été fonctionnalisées avec du PEG₂₀₀₀ silanisé et un mélange de PEG₂₀₀₀-Si et de DMSA comme présenté en partie A.I.2.1. Les tailles hydrodynamiques de ces deux SPIONs (PEG_{2k}-SPIONs et DMSA + PEG_{2k}-SPIONs) étaient de l'ordre de 38 et 36 nm respectivement avec un potentiel zêta à pH 7 de -3 et -30 mV. L'influence de la charge et de la chimie de surface a donc été étudiée. Ces NPs ont été comparées à une suspension d'agent de contraste commerciale à base de SPIONs fonctionnalisées aux Dextran : le Resovist ($\Phi_{\text{cristallite}} = 8 \text{ nm}$; $\Phi_{\text{hydrodynamique}} = 22 \text{ nm}$ et potentiel zêta = -22 mV) et une solution de sérum physiologique (NaCl pH7 0,15 M) a été utilisée comme contrôle. Les mesures de relaxivités r_2 ont été réalisées sur les trois différents types de SPIONs. Puis, 100 μL de chaque suspension à $1.68 \text{ mg}_{\text{Fe}}.\text{mL}^{-1}$ (soit $168 \mu\text{g}_{\text{Fe}}$ / souris) ont été injectées dans un minimum de $n = 3$ souris (souris albinos femelle de 3 mois) qui ont été imagées en IRM clinique (3 T) à 1, 3 et 24 heures.

Les relaxivités r_2 des SPIONs nues, fonctionnalisées et du Resovist sont toutes dans la même gamme de valeur (entre 260 et $290 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$) montrant que les différentes modifications de surface n'influencent pas les propriétés magnétiques des oxydes de fer.

Les images IRM des souris 3 heures après injections sont présentées Figure A.II-1-a. Les foies, cerclés de rouge, montrent un assombrissement du contraste par rapport au

contrôle des SPIONs Resovist et PEG_{2k} + DMSA plus prononcé qu'avec les SPIONs PEG_{2k} uniquement. La Figure A.II-1-b quantifie le contraste des foies et cœur à différents temps et avec différentes NPs. Plus la valeur de contraste est faible, plus la présence de SPIONs est importante. Ainsi, pour les Resovist et DMSA + PEG_{2k}-SPIONs, le contraste du foie est bas dès 1 heure après injection et reste constant durant les 24 heures d'observation. En revanche, avec les PEG_{2k}-SPIONs il apparaît que le contraste du foie est supérieur pendant les 3 premières heures après injection démontrant une captation hépatique retardée. Pour les contrastes cardiaques, aucune différence significative n'a été observée prouvant l'absence de SPIONs dans cet organe.

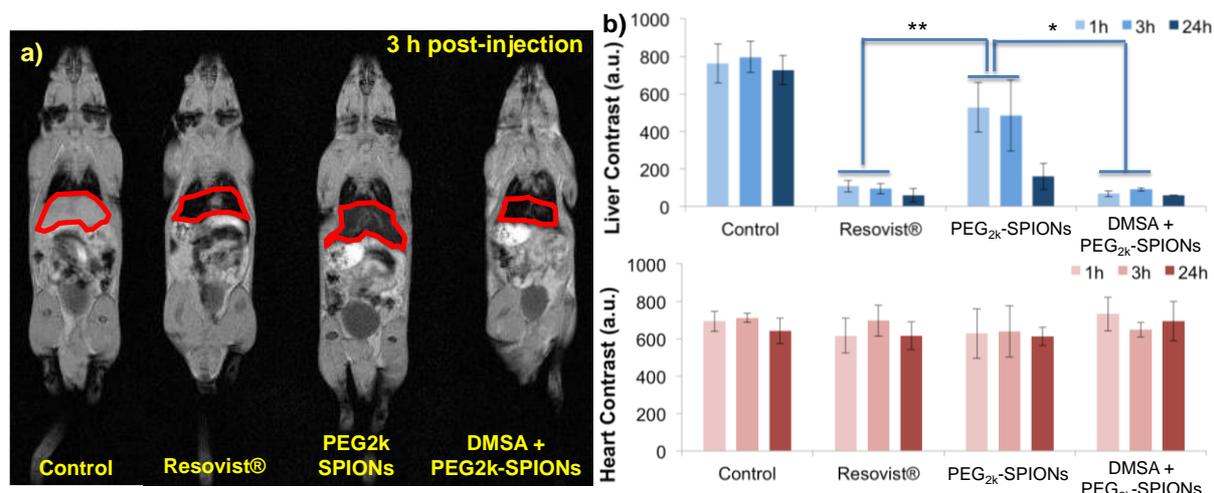


Figure A.II-1 : Analyses IRM de la biodistribution des SPIONs fonctionnalisées. a) images MRI de souris injectées avec des PEG_{2k}-SPIONs et PEG_{2k}-SPIONs + DMSA comparées à un contrôle et du Resovist (le foie est cerclé de rouge) et b) mesures des contrastes hépatiques et cardiaques à différents temps pour ces mêmes souris (n = minimum 3) significativités à : *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01 (Maurizi et al. 2015b)

En Figure A.II-2, des analyses au bleu de Prusse sur des coupes histologiques ont été effectuées. Le bleu de Prusse permet de révéler le fer dissout en se colorant en bleu (Zboril et al. 2004; Khodavirdilo 2012). Ainsi, il est possible d'observer et, dans certains cas, de quantifier la présence de SPIONs. Il est à noter que cette technique ne peut pas donner une information sur l'internalisation réelle des oxydes de fer mais sur leur co-localisation, les observations se faisant sur NPs dissoutes et par microscopie optique. Avec cette méthode, il a tout de même été possible de confirmer que des SPIONs étaient localisées dans le foie des souris injectées et que la concentration de NPs semblait effectivement plus importante 3 heures après injection pour les Resovist et les DMSA + PEG_{2k}-SPIONs que pour les PEG_{2k}-SPIONs. Dans les tissus cardiaques, aucune SPION n'a été trouvée.

En conclusion sur cette étude et en premier lieu, il a été démontré que les SPIONs synthétisées apportaient bien un contraste T2 sur certains organes cibles, notamment le foie. Cette captation hépatique est la voie classique d'élimination des NPs notamment d'oxyde de fer (Briley-Saebo et al. 2004). Les SPIONs fonctionnalisées avec des PEG₂₀₀₀ et de potentiel zêta neutre ont montré une captation hépatique retardée par rapport aux SPIONs chargées

SPIONs pour diagnostic médical

négativement prouvant la plus grande furtivité des NPs avec des chimie de surface comportant ce polymère mais quand celui-ci est neutre (Lee et al. 2015; Ramniceanu et al. 2016). Cette étude préliminaire a aussi permis d'apporter une première estimation sur l'influence cruciale de la surface des NPs sur leurs comportements biologiques notamment *in vivo*. La charge mais aussi la chimie ou la longueur des polymères semblent jouer un rôle et ce sont sur ces bases que mes études sur les interactions à l'interface des NPs et des fluides biologiques ont débutés (Partie A.III).

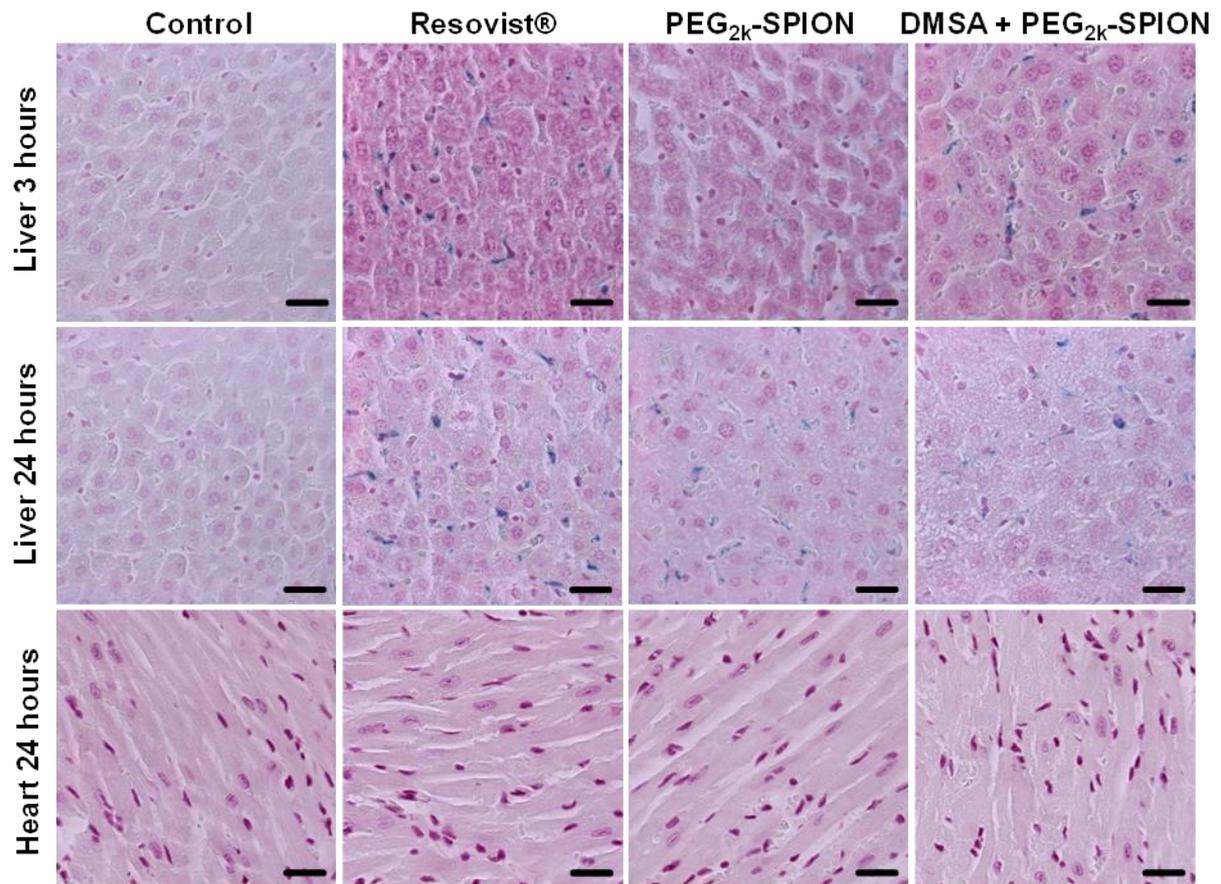


Figure A.II-2 : Biodistribution des SPIONs fonctionnalisées Colorations par bleu de Prusse de tissus de foie (3h et 24h) et de cœur (24h) après injections de PEG_{2k}-SPIONs et PEG_{2k}-SPIONs + DMSA comparées à un contrôle et au Resovist (Maurizi et al. 2015b)

A.II.1.2. SPIONs fonctionnalisées pour imagerie bimodale PET/IRM

Dans le cadre d'un équipement d'excellence (Equipex Imappi pour integrated magnetic resonance and positron emission tomography in preclinical imaging), un appareil d'imagerie préclinique du petit animal a été développé en collaboration avec la société MR Solutions et le Centre Georges-François Leclerc (CGFL) de Dijon. Cet outil couple en une seule étape la tomographie par émission de positrons (PET) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Ainsi, les avantages de ces deux techniques sont associés tels que la sensibilité et l'imagerie moléculaire de la PET et la bonne résolution spatiale et temporelle de l'IRM.

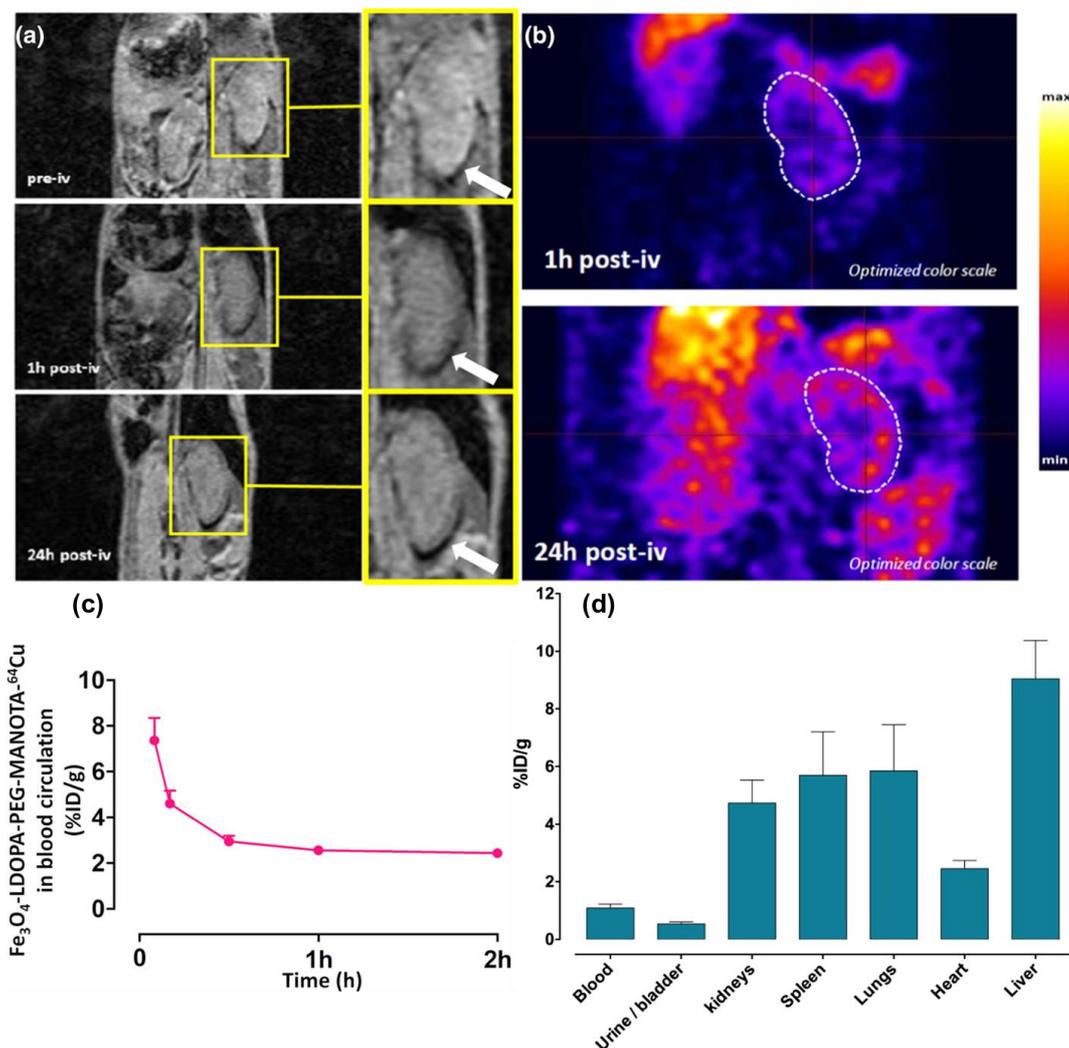


Figure A.II-3 : Imagerie IRM et PET avec les SPIONs-LDOPA-PEG-MANOTA-⁶⁴Cu (SPIONs-⁶⁴Cu) bimodaux et analyses de leur biodistribution et biocirculation. (a) images MRI pondérées en T2* et (b) images PET du cortex rénal à différents temps d'injection dans la souris avant, 1h et 24h après injection au SPIONs-⁶⁴Cu. c) Evaluation de la biocirculation des SPIONs-⁶⁴Cu pendant 2h après injection (n = 3) et d) Evaluation de la biodistribution des SPIONs-⁶⁴Cu 48h après injection en i.v. (intraveineuse) dans la souris. Les valeurs sont représentées en pourcentages de la dose injectée (n = 4). (Thomas et al. 2019)

Les SPIONs synthétisées avec de la L-DOPA à l'aide du dispositif hydrothermal en continu (partie A.I.3.1) puis fonctionnalisées avec des PEG et un macrocycle contenant un radioélément (⁶⁴Cu) ont été utilisées dans cette étude. Elles seront nommées SPIONs-⁶⁴Cu dans la suite de cette partie. La relaxivité r2 des SPIONs-⁶⁴Cu est de 360 ± 10 mMFe⁻¹ s⁻¹ valeur,

qui, dans les conditions de mesures (magnétismes différents de la partie précédente des PEG-SPIONs) est près de 2,5 fois plus élevée que la r_2 du Resovist ($148 \text{ mMFe}^{-1} \text{ s}^{-1}$) due notamment à la grande taille de cristallites des SPIONs-LDOPA.

Des souris (souris CD-1 femelle de 20-25 g) ont été injectées avec des SPIONs- ^{64}Cu à une concentration comprise entre 5 et 8 MBq puis ont été imagées dans l'appareil PET/IRM 1 heure et 24 heures après injection. La Figure A.II-3-a montre l'assombrissement du signal au niveau du cortex rénal même 24 heures après injection. Un signal PET est détecté dans cette même région (Figure A.II-3-b) prouvant la co-localisation des ^{64}Cu et des SPIONs et donc l'efficacité de ces NPs comme agents de contraste bimodaux.

L'imagerie ayant prouvé la co-localisation des SPIONs et des ^{64}Cu , des quantifications de la radioactivité dans les organes et le sang ont été effectuées pour estimer la biodistribution et la biocirculation de ces NPs. 20 μL de SPIONs- ^{64}Cu ont été injectées (2,5-3 MBq) et les échantillons de sang ont été prélevés à 5 min, 10 min, 30 min, 1h et 2h et la radioactivité a été quantifiée et donnée en pourcentage de la dose injectée. 48 heures après injection, les souris ont été sacrifiées et les radioactivités de différents organes ont également été analysées. En Figure A.II-3-c, la biocirculation des SPIONs- ^{64}Cu chute rapidement de 8 à 2% de la dose injectée en moins de 2 heures suivant l'injection. Ces NPs se retrouvent majoritairement dans le foie, la rate, les poumons et les reins (En Figure A.II-3-d) avec toujours près de 50% de la dose administrée retrouvée 48 heures après injection.

Cette étude a démontré le potentiel des SPIONs- ^{64}Cu comme agent de contraste bimodaux dont plus de 50% sont toujours présent dans l'organisme 48 heures après injection.

A.II.2. Marquage passif de macrophages pour détection d'arthrite

Des PVA-SPIONs ont également été utilisées pour détecter les zones d'inflammations induites par l'arthrite du genou et pour également tester l'efficacité d'un traitement à cette pathologie. L'idée de ces études était de voir si les NPs restaient dans la zone d'inflammation permettant ainsi de la mettre en évidence par IRM. En effet, une fois dans le flux sanguin, les macrophages du système réticuloendothélial (RES) devaient phagocyter les SPIONs (Rogers and Basu 2005). De plus, ces cellules immunitaires sont connues pour aller vers les zones d'inflammation (Beckmann et al. 2003; Brochet et al. 2006). Ainsi, injectées en i.v. (intraveineux) ou en i.a. (intra-articulaire), les SPIONs sont internalisées par des macrophages puis devraient se retrouver sur les zones d'inflammations pour pouvoir y être détectées en IRM.

A.II.2.1. Détection de l'arthrite et réponse inflammatoire

Lors d'une étude réalisée lors du projet européen Nanodiara, des PVA-SPIONs ont été testées pour détecter, en IRM, l'arthrite du genou chez la souris (souris C57Bl/6J de 12 semaines avec ou sans arthrite). Pour cela, ces NPs ont été injectées soit en i.v. soit directement dans le genou (i.a.).

La possibilité de détecter par IRM les PVA-SPIONs dans les zones d'inflammation a été testée. Les réponses inflammatoires à court et long terme (14 jours) des PVA-SPIONs et du PVA seul ont également été étudiées. Des souris contrôles et avec de l'arthrite ont été injectées en i.v. et en i.a. avec des PVA-SPIONs:

- En i.v., deux doses de 200 μL ont été testées : une faible (3,3 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{kg}$) et une forte (33 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{kg}$)
- En i.a. deux doses de 6 μL ont été testées : une faible (6 $\mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{genou}$) et une forte 24 $\mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{genou}$.

En Figure A.II-4 (A-B) des images IRM montrent l'absence de changement de contraste sur des genoux sans arthrite injectés avec des PVA-SPIONs par rapport à un genou contrôle avec arthrite (A et B). Dans la Figure A.II-4 (C-D), un contraste T2 est observé (flèches bleues) sur des genoux avec arthrite injectés en i.v. et en i.a. à fortes doses prouvant la présence et l'accumulation des PVA-SPIONs dans la zone enflammée du genou par rapport à un genou sain (en B). Les PVA-SPIONs injectées directement dans l'articulation se retrouvent internalisées par les cellules de la synoviale (présence révélée par bleu de Prusse en Figure A.II-4-E).

Avec la méthode d'injection en i.a., les NPs restent dans l'articulation au moins 14 jours que ce soit dans un genou sain ou arthritique. Ainsi, la question de la toxicité à long terme des PVA-SPIONs s'est posée et a été étudiée. Les faibles et fortes doses un jour après injection en i.a. ont été étudiées (6 et 24 $\mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{genou}$) quand seulement les fortes doses 14 jours après injection ont été observées. Une faible et forte dose de PVA seul au concentration suivant le protocole des PVA-SPIONs présenté en partie A.I.2.2 a également été injectée en i.a.

(respectivement 54 et 216 $\mu\text{g}_{\text{PVA}}/\text{genou}$) et tous les résultats ont été comparés au PBS. Des coupes histologiques des genoux des souris ont été réalisées 1 jour et 14 jours après injections en i.a. et l'inflammation a été notée de 0 à 3 avec :

- 0 = pas d'inflammation
- 1= quelques cellules inflammatoires dans la cavité de l'articulation et dans la synoviale
- 2 = la cavité et la synoviale sont partiellement remplies par des cellules inflammatoires
- 3 = la cavité et la synoviale sont complètement remplies de cellules inflammatoires.

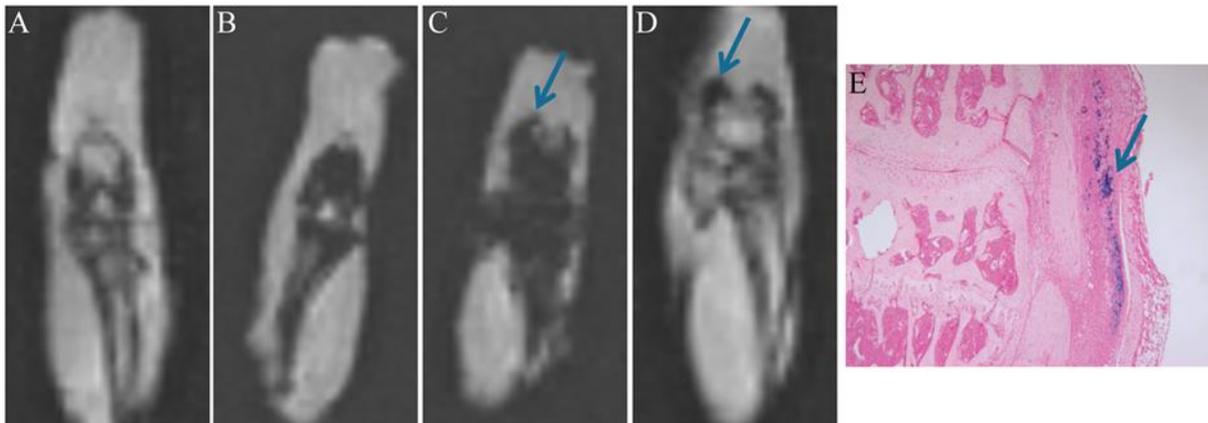


Figure A.II-4 : **Images IRM-et histologie au bleu de Prusse pour visualiser les PVA-SPIONs dans l'articulation du genou arthritique.** A) genou avec arthrite sans PVA-SPIONs ; B) genou sans arthrite avec injection en i.v. de PVA-SPIONs C) et D) genou avec arthrite injectés en i.v. et i.a., respectivement, avec des PVA-SPIONs. Les flèches bleues montrent la perte de signal dans le tissu synovial et donc la présence de PVA-SPIONs dans la zone d'inflammation et E) marquage au bleu de Prusse d'un genou arthritique injecté en i.a. indiquant l'internalisation des PVA-SPIONs par les cellules de la synoviale (Grossissement 100x) (Vermeij et al. 2015).

En Figure A.II-5-a, les PVA-SPIONs à forte dose induisent une réponse inflammatoire modérée 1 jour après injection par rapport au contrôle quand la faible dose qui n'induit, elle, aucune réponse. La forte dose de PVA semble induire également une faible réponse inflammatoire mais non statistiquement significative. Les Figure A.II-5-b et Figure A.II-5-c montrent la présence et l'absence de cellules inflammatoires dans les genoux injectés respectivement avec des PVA-SPIONs à forte dose et du PBS.

14 jours après injection (Figure A.II-5-d), aucune différence d'inflammation n'est observée entre des souris arthritiques injectées avec des fortes doses de PVA-SPIONs ou de PVA seul comparativement à une injection de PBS. Les coupes histologiques (Figure A.II-5-e-f) confirment la présence de quelques cellules inflammatoires après injection de PVA-SPIONs ou dans le contrôle mais sans différence significative entre les deux conditions.

Les PVA-SPIONs ont pu être détectées dans le genou une fois injectées soit en i.v. soit directement dans l'articulation grâce notamment à leur internalisation par les cellules du RES. 14 jours après injection, les NPs sont toujours présentes dans la synoviale. Des études de coupes histologiques ont quantifié une inflammation précoce induite par une forte dose de PVA-SPIONs qui n'est plus observée 14 jours après injection.

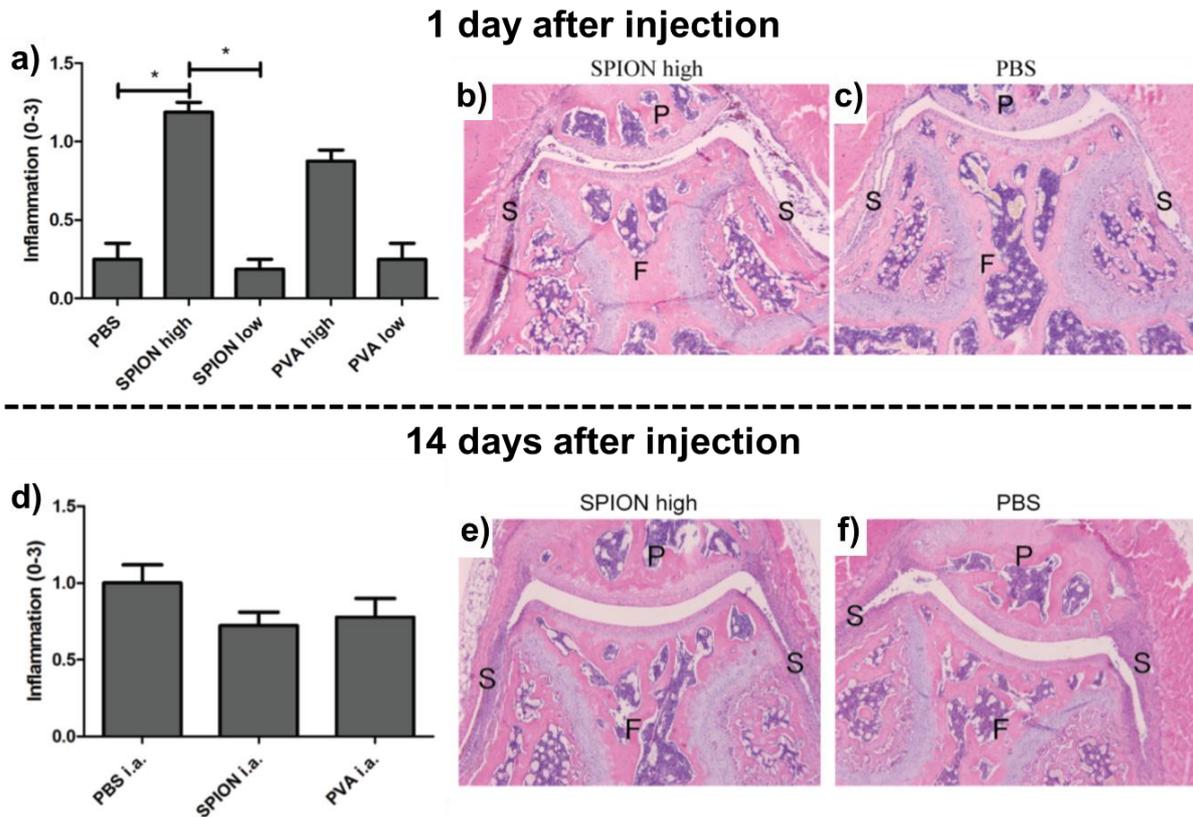


Figure A.II-5 : **Analyses histologiques d'articulation du genou après injection de PVA-SPIONs et de PVA seul.** a) taux d'inflammation après injection en i.a. de souris avec un contrôle (PBS) et des concentrations fortes et faibles de PVA-SPIONs et PVA sur des souris. Inflammations sur coupes histologiques sur b) et c) des souris injectées avec une forte concentration de PVA-SPIONs et du PBS ; d) Taux d'inflammation après injection en i.a. de souris avec un contrôle (PBS) et des concentrations fortes de PVA-SPIONs et PVA. Comparaison de l'inflammation sur coupes histologiques de souris injectées avec e) une forte dose de PVA-SPIONs et f) du PBS. Grossissement 50x. F = fémur, P = patella, S = synoviale (n = 4 par groupe pour a-c et n=8 de d-f). * p<0.05, ** p<0.01 (Vermeij et al. 2015)

A.II.2.2. Suivi du traitement de l'arthrite avec des PVA-SPIONs

Lors d'une étude avec l'hôpital de Genève (HuGe), l'effet de la Dexaméthasone (Dexa) a été étudiée par IRM en utilisant également le marquage passif des macrophages comme vecteurs pour diriger les SPIONs vers la zone d'inflammation. Des rats (femelles Lewis de 6 à 8 semaines et 150 et 175g) avec arthrite induite ont été utilisés. Une partie des rats a été traitée par Dexa 2 et 5 jours après induction d'arthrite. Des rats contrôles ont reçu une solution de sérum physiologique. 5 heures après la dernière injection de Dexa, 7 mg_{Fe}/rat de PVA-SPIONs ont été injectés et les rats ont été imagés 6, 10 et 13 jours après induction d'arthrite. L'hypothèse de cette étude était relativement identique à celle précédente (partie A.II.2.1) : suivre l'arthrite grâce à des macrophages marqués de PVA-SPIONs phagocytés.

En Figure A.II-6-a, des images de genou de rat arthritique traité et non traité ont été observées. Les flèches rouges montrent l'assombrissement du signal et donc la présence de SPIONs dans la région d'inflammation. Pour le genou traité par Dexa, le contraste T2 semble moins prononcé que sur le genou non traité. En analysant et moyennant un grand nombre d'intensité de contrastes (n= 13 et n = 15 respectivement pour les genoux non traités et traités), il a été possible d'estimer l'évolution de la présence de SPIONs et donc de macrophages dans cette zone d'inflammation (Figure A.II-6-b). L'intensité du signal décroît significativement plus vite en quelques jours dans les genoux traités par Dexa que dans les genoux non traités. Ainsi, la diminution du signal traduit une baisse de l'inflammation et donc une preuve de l'efficacité du traitement à la Dexa.

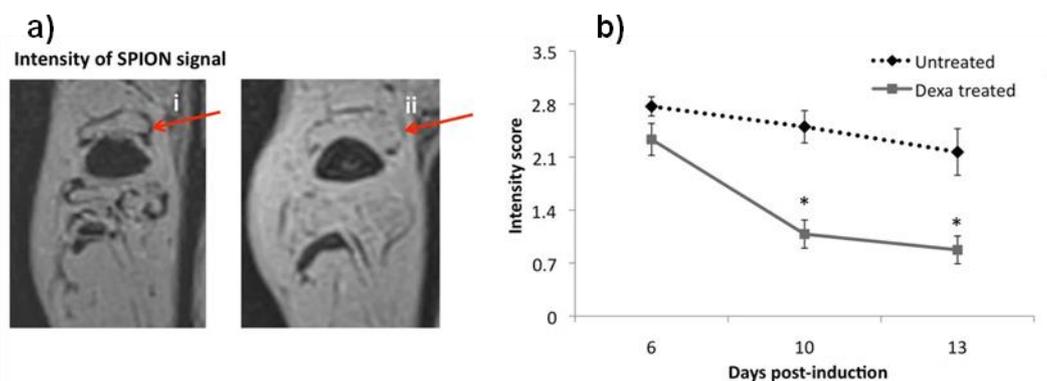


Figure A.II-6 : Suivi par MRI de l'efficacité du traitement par dexaméthasone dans l'arthrite du genou du rat. a) images MRI pondérées en T1-montrant l'intensité du signal des PVA-SPIONs dans la synoviale dans i) un genou non traité et ii) traité et b) graphiques montrant les scores d'intensité MRI (3 est une grande intensité et 0 une faible intensité) des genoux traités et non traités. (n = 13 minimum) * P = 0.02 ou moins (Gramoun et al. 2014)

Une analyse au Bleu de Prusse a également été réalisée sur des coupes histologiques de genoux traités et non traités 13 jours après induction d'arthrite. La Figure A.II-7-A-B illustre la présence de SPIONs (révélées par bleu de Prusse : points bleus sur les figures soulignés par les flèches rouges) dans la synoviale. Pour le genou non traité, le nombre de SPIONs semble être plus important que pour le genou traité par Dexa. Des analyses d'images sur 4 zones des différents genoux (n = 5 animal par condition) ont permis d'estimer le nombre de zones et de

point bleus de bleu de Prusse (Figure A.II-7-C-D). Les zones et les nombres de SPIONs présents sont bien, comme lors des observations en IRM, significativement inférieurs dans les genoux traités par rapport à ceux non traités démontrant, à nouveau, l'efficacité de la dexaméthasone pour diminuer l'inflammation de l'arthrite.

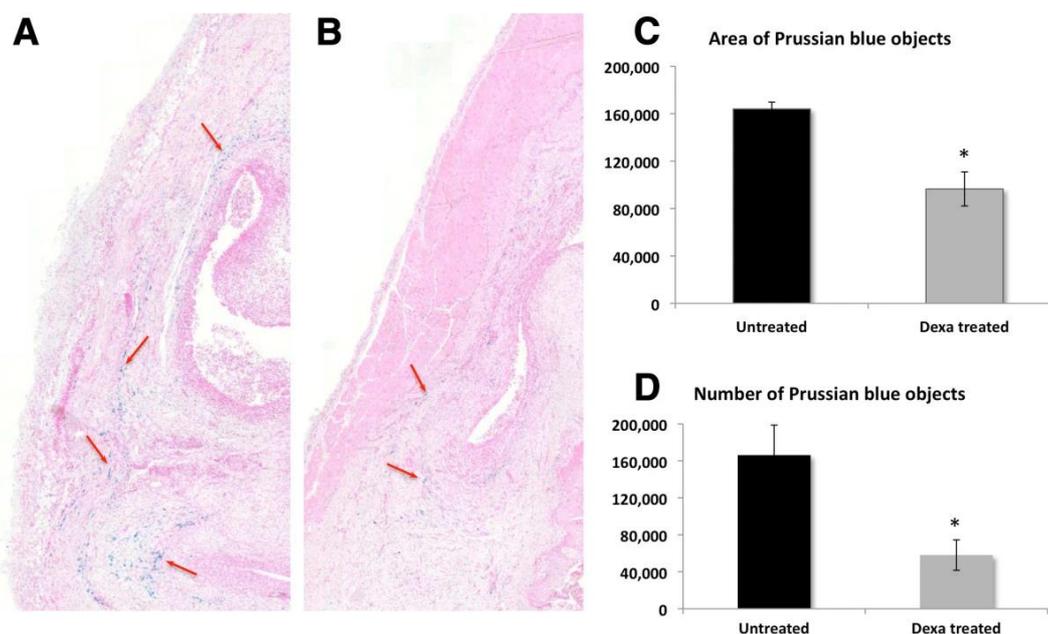


Figure A.II-7 : **Distribution et quantification des PVA-SPIONs dans la synoviale 13 jours après induction** Images de la synoviale a) non traitée et traitée 13 jours après induction d'arthrite. c) et d) quantification de l'aire d) et du nombre e) des PVA-SPIONs dosées par bleu de Prusse 13 jours après induction d'arthrite. Les images ont été analysées par le logiciel Tissue Studio® (n = 5 sur 4 aires d'analyses par animal) * (C) P = 0.005 et (D) P = 0.016 comparés au contrôle (Gramoun et al. 2014)

Lors de ces deux études, les PVA-SPIONs, une fois injectées dans le sang ou dans l'articulation ont bien été phagocytées par les macrophages du RES qui se sont ensuite retrouvés vers les zones d'inflammation où ils sont restés pendant au moins deux semaines (temps des analyses présentées) et ont pu être détectées par IRM. Ce marquage passif des macrophages a également permis de prouver et quantifier l'efficacité d'un traitement de l'arthrite par IRM. Enfin, il a été démontré que ces nanohybrides induisaient une réponse inflammatoire précoce modérée mais qui disparaissait avec le temps (moins de 15 jours après injection).

A.II.3. Marquage de cellules souches pour suivi de greffe

Après avoir utilisé les SPIONs directement comme agents de contraste en IRM ou en marquant passivement des macrophages après injection, le but de cette partie a été de marquer des cellules souches avec des PVA-SPIONs pour suivre la greffe de cellules souches sur des genoux défectueux dans le cadre de traitement des pathologies arthritiques.

En premier lieu, des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) ont été marquées *in vitro* avec des PVA-SPIONs pendant 4 et 24h à une concentration de $100 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{mL}$. La présence des PVA-SPIONs a été révélée par bleu de Prusse (données non montrées) et par observations en TEM (Figure A.II-8). Les images TEM ont permis de prouver l'internalisation des PVA-SPIONs dans des vésicules de l'ordre de 350 nm mais aussi dans des clusters plus petits d'environ 50 nm dans le cytoplasme.

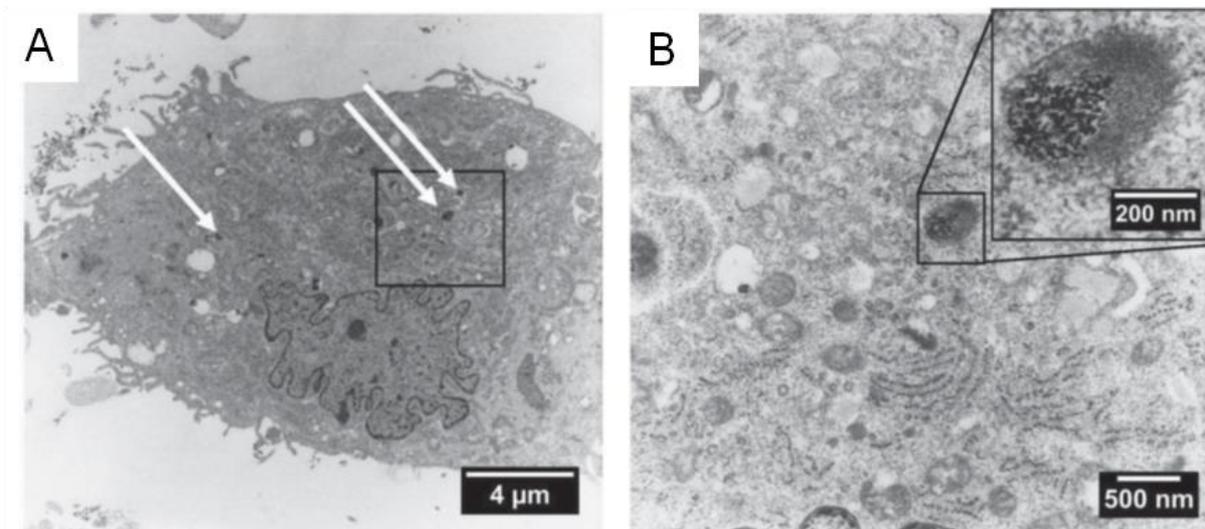


Figure A.II-8 : **Internalisation des PVA-SPIONs dans des cellules souches mésenchymateuses (MSCs)**. A et B: Images MET à différents grossissements de MSCs marquées avec des PVA-SPIONs. Les flèches blanches indiquent la présence des PVA-SPIONs (Schulze et al. 2014)

L'influence des PVA-SPIONs à différentes concentrations (25, 50 et $100 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{mL}$) sur les différenciations des MSCs en différentes cellules a été étudiée. Une différenciation adipogénique a été induite pendant 14 jours et, à la suite de la réaction, les acides gras ont été marqués par de l'OilRed O et quantifiés par photométrie. La Figure A.II-9 A – B démontre que 100% des MSCs se sont bien différenciées quelle que soit la concentration de PVA-SPIONs utilisée.

La différenciation chondrogénique des MSCs a également été réalisée par essai protéoglycane pendant 21 jours avant d'être détectée par marquage au bleu d'Alcian pour révéler le taux de cellules différenciées. Les PVA-SPIONs n'ont pas influencé la différenciation des MSCs en cellules de cartilage (Figure A.II-9 C – D).

SPIONs pour diagnostic médical

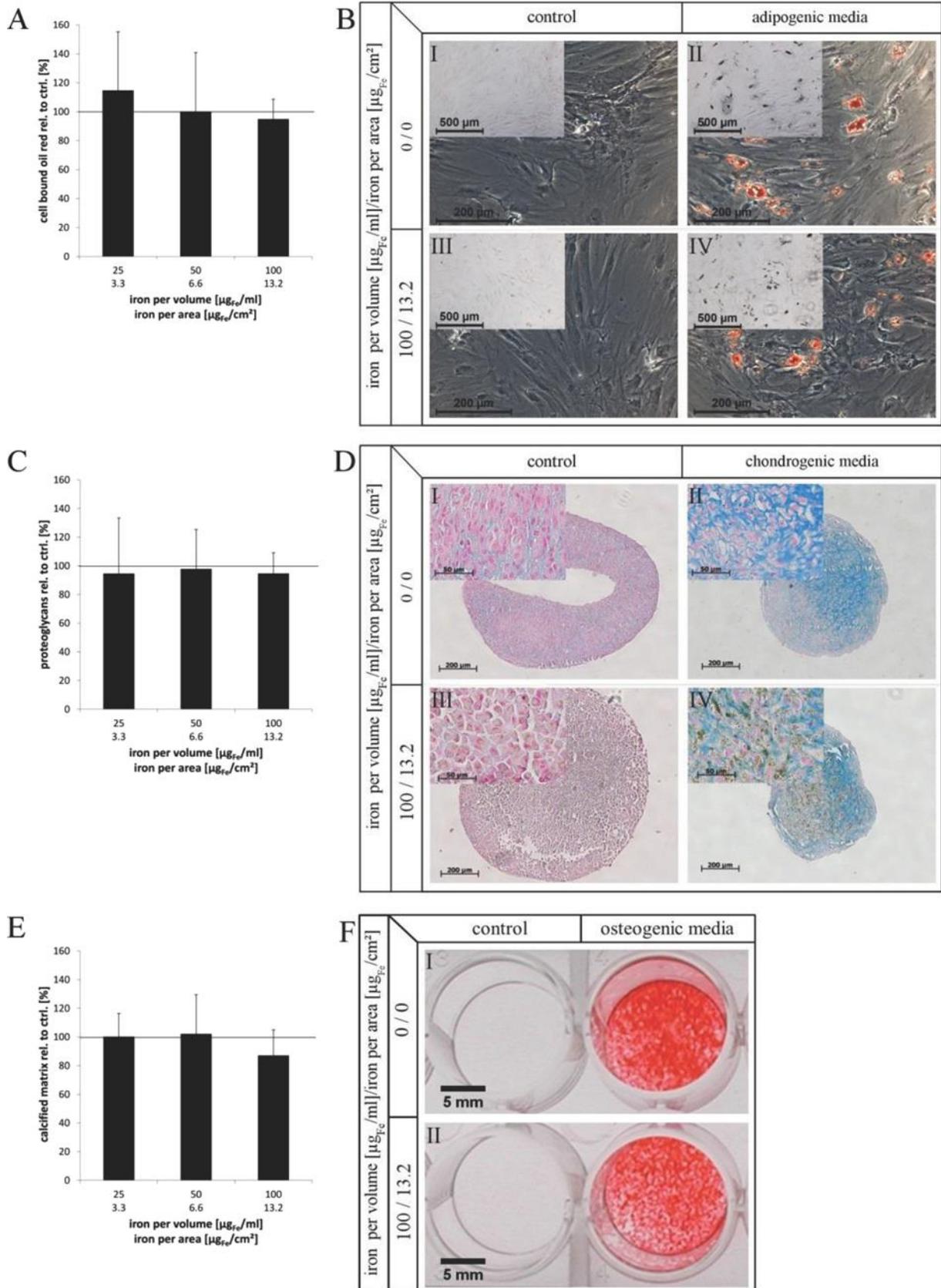


Figure A.II-9 : **Influence des PVA-SPIONs sur la différenciation des MSCs.** Des MSCs marquées avec du PVA-SPIONs ont été étudiées quantitativement (A, C et E) et qualitativement (B, D et F). A,B) différenciation adipogénique par marquage Oil red O ; C,D) chondrogenic différenciation par essai protéoglycane et marquage au bleu Alcian et E,F) différenciation ostéogénique par marquage au rouge Alizarin (Schulze et al. 2014)

Enfin, les MSCs ont subi une différenciation ostéogénique pendant 13 jours et la matrice calcifiée a été quantifiée par marquage au rouge Alizarin. Les PVA-SPIONs n'ont pas influencé cette différenciation qui a permis de différencier 100% des MSCs (Figure A.II-9 E - F).

L'influence de la migration des MSCs une fois marquées avec des PVA-SPIONs a été étudiée. Des MSCs non marquées et marquées avec différentes concentrations de PVA-SPIONs (25, 50 et 100 $\mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{mL}$) ont été cultivées avec un intervalle de 500 μm entre deux rangées de cellules. La migration recouvrant cet intervalle a été observée en microscopie optique pendant 24 heures (Figure A.II-10 A - B) et quantifiée en pourcentage d'intervalle recouvert. La migration semble accélérer en présence de PVA-SPIONs avec un effet dose. Cette observation pourrait être un avantage dans le cadre de l'utilisation *in vivo* de cellules souches pour la cicatrisation. Il faut tout de même être prudent car un changement de migration des MSCs est un phénomène inconnu qui pourrait également avoir des conséquences sur les thérapies à base de MSCs marquées.

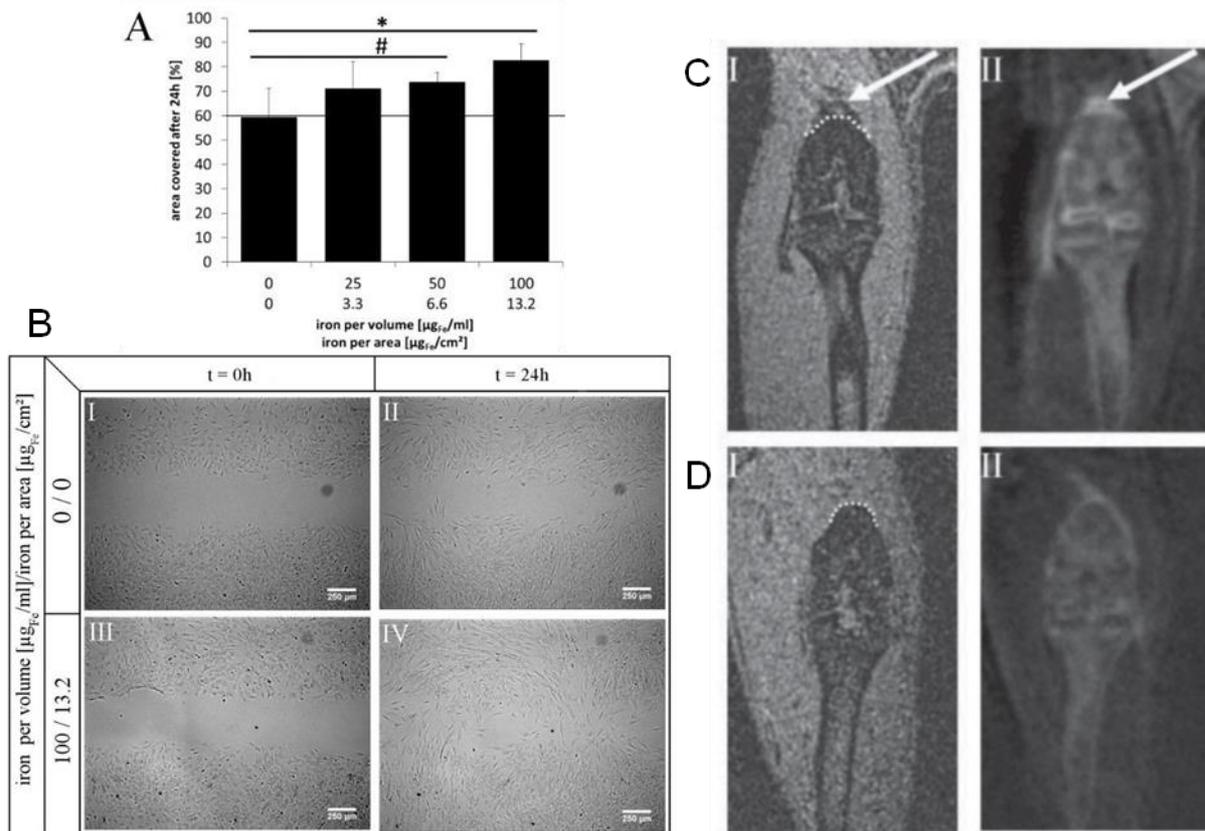


Figure A.II-10 : **Migration de MSCs stimulées par marquage au PVA-SPIONs.** A) migration de MSCs marquées aux PVA SPIONs ont été étudiées sur un test de cicatrisation pendant 24h (* $p = 0.001$; # $p = 0.069$). B) images représentatives du test de cicatrisation sur donneur. **Visualisation *in vivo* par MRI 3T de MSCs marquées avec des PVA-SPIONs** C) images coronales (I, II) de rotule de rat injectées avec des MSCs marquées. D) images coronales de rotule de rat injectées avec des MSCs non marquées. Les flèches blanches représentent les MSCs marquées et les lignes blanches le contour de la diaphyse fémorale (Schulze et al. 2014)

Des rates de 150 à 175 g (6 à 8 semaines) ont été injectées en i.a. avec des MSCs marquées et non marquées au PVA-SPIONs et les genoux ont été imagés en IRM 3T. Une perte de signal est observée en En Figure A.II-10 C-D dans la section basse du fémur 24 heures (zone

en pointillés blancs avec flèches blanches) après injection avec des MSCs marquées par rapport à des MSCs non marquées. Cette observation confirme la présence de MSCs détectées en IRM grâce aux PVA-SPIONs internalisées. Cette présence des MSCs avec PVA-SPIONs a également été confirmée par marquage au bleu de Prusse de coupes histologiques (résultats non montrés dans ce rapport).

Les PVA-SPIONs ont correctement marqué des MSCs pour permettre leur détection dans le cadre d'une greffe pour thérapie de genou arthritique. Elles n'ont pas semblé influencer les différenciations adipogénique, chondrogénique et ostéogénique des MSCs. Il semblerait en revanche que les NPs améliorent la migration des MSCs ce qui pourraient être un atout dans le cadre de l'utilisation de cellules souches marquées en thérapie cellulaire.

A.II.4. Conclusions sur le diagnostic médical avec des SPIONs

Dès le début de mes expériences de recherche, les NPs développées ont été et sont toujours utilisées en imagerie par résonance magnétique (IRM) que ce soit au CHU et au CGFL à Dijon ou avec les hôpitaux de Genève (Suisse), de Nijmegen aux Pays Bas ou de Charité à Berlin (Allemagne). La robustesse des protocoles de synthèses et les caractérisations fines des SPIONs développées ont permis d'éviter les changements de physicochimie entraînant des biais lors des analyses des résultats biologiques.

Les études présentées dans cette partie ont démontré l'intérêt de nos NPs pour différentes analyses et observations IRM :

1. En premier lieu, les SPIONs classiques et obtenues par voie hydrothermale ont pu être étudiées comme agents de contraste en IRM. Des SPIONs couplées à un isotope radioactif ont démontré leur intérêt en imagerie bimodale de PET/IRM grâce à l'instrument présent et développé au sein du CGFL de Dijon. L'influence de la chimie de surface, notamment la charge et le type de polymères, sur la biodistribution des NPs a été mise en évidence. Ce rôle fait partie des principaux projets de recherche étudiés que je présenterai plus en détails en partie A.IV.2.
2. Des PVA-SPIONs ont aussi permis de marquer, après injection dans la souris, des macrophages qui ont ensuite mis en évidence par IRM l'inflammation du genou dans le cas de pathologies arthritiques et même pu suivre leur traitement par la même méthode. Ce marquage passif est un élément fondamental dans le suivi de réactions inflammatoires et les études présentées ont démontré l'intérêt de nos NPs dans ces analyses.
3. Enfin, des PVA-SPIONs ont aussi marqué, *in vitro*, des cellules mésenchymateuses (MSCs) pour pouvoir détecter, en IRM, leur usage thérapeutique par greffe sur des articulations arthritiques du genou. Les NPs n'ont pas influencé la différenciation des MSCs et ont amélioré leur rapidité de migration dans le cas d'utilisation en cicatrisation.

Ces projets sur l'imagerie médicale ont permis d'amorcer des collaborations fortes nationales mais aussi européenne, notamment avec Genève et Berlin, et internationale (Université de Stanford). Des projets découlant de ces rencontres et travaux seront présentés dans la partie A.VI.1 notamment sur de nouvelles techniques d'imagerie médicale. Dans la suite de la présentation de mes principales activités de recherche, les études présentées se concentreront sur l'étude des paramètres influençant les interactions biologiques cellulaires et hématologiques des SPIONs.

Les projets, encadrements et publications principaux sont résumés ci-dessous.

Projets associés

- Projet Imappi (2019-2020)
- Projet Européen FP7 Nanodiara (2010-2014)

Encadrements principaux associés

- Dr. Usawadee Sakulkhu (09/09-05/13); Thèse de doctorat : *Preparation of coated nanoparticles and investigation of their behavior in biological environment*

Collaborations principales associées

- CHU et CGFL, Dijon
- Hôpital Charité Berlin, Allemagne
- HuGe : Hopitaux de Genève, Suisse
- NVH Medicinal, Dijon
- Professeur Daldrup-Link Lab, School of Medicine, Stanford, USA
- Radboud University Medical Center, Nijmegen, Pays Bas

Publications principales

- *Innovative Magnetic Nanoparticles for PET/MRI Bimodal Imaging*, G. Thomas, J. Boudon, **L. Maurizi**, M. Moreau, P. Walker, I. Severin, A. Oudot, F. Demoisson, F. Denat, S. Poty, C. Goze, F. Brunotte and N. Millot, **ACS Omega**, 4 (2), 2637-2648, **2019** (DOI: [10.1021/acsomega.8b03283](https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03283))
- *The in-vivo use of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles to detect inflammation elicits a cytokine response but does not aggravate experimental arthritis*, E. A. Vermeij, M. B. Bennink, L. Crowe, **L. Maurizi**, J.-P. Vallée, H. Hofmann, P. L.E.M. van Lent, W. B. van den Berg, M. I. Koenders and F. A.J. van de Loo, **PLOS One**, 10 (5), e0126687, **2015** (DOI: [10.1371/journal.pone.0126687](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126687))
- *Influence of surface charge and polymer coating on internalization and biodistribution of PEG-modified iron oxide nanoparticles*, **L. Maurizi**, A.-L. Papa, L. Dumont, F. Bouyer, P. Walker, D. Vandroux and N. Millot, **J. Biomed. Nanotech.**, 11, (1), 126-136, **2015** (DOI: [10.1166/jbn.2015.1996](https://doi.org/10.1166/jbn.2015.1996))
- *Amino-polyvinyl alcohol coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles are suitable for monitoring of mesenchymal stromal cells in vivo*, F. Schulze, A. Dienelt, S. Geissler, P. Zaslansky, J. Schoon, K. Henzler, P. Guttman, A. Gramoun, L. A. Crowe, **L. Maurizi**, J.P. Vallée, M. Hofmann, H. Hofmann, G. N. Duda and A. Ode, **Small**, 10 (21), 4340-4351, **2014** (DOI: [10.1002/smll.201400707](https://doi.org/10.1002/smll.201400707))
- *Monitoring the effects of arthritis treatment by MRI in vivo using iron oxide nanoparticle-labeled macrophages*, A. Gramoun, L. A. Crowe, **L. Maurizi**, W. Wirth, F. Tobalem, K. Grosdemange, G. Coullerez, F. Eckstein, M.I. Koenders, W.B. Van den Berg, H. Hofmann and J-P. Vallée, **Arthritis Res. Ther.**, 16 (3), R131, **2014** (DOI: [10.1186/ar4588](https://doi.org/10.1186/ar4588))

Partie A.III. Interactions biologiques des SPIONs

Partie A.III. Interactions biologiques des SPIONs	53
A.III.1. Différents tests cellulaires après incubations avec des SPIONs	54
A.III.2. Interactions hématologiques des SPIONs.....	60
A.III.2.1. Influence du greffage du PVA et de la charge sur la toxicité des cellules immunitaires humaines.....	60
A.III.2.2. Influence des PVA-SPIONs sur l'hémolyse	63
A.III.3. Conclusions sur les interactions biologiques des nanoparticules	66

Les SPIONs fonctionnalisées obtenues ont été, d'une part, testées en imagerie médicale et, d'autre part, leurs interactions avec les systèmes biologiques ont été analysées. Comme c'est également le cas *in vivo*, l'internalisation cellulaire et la potentielle toxicité des SPIONs sont influencées par la chimie de surface des NPs (Shang et al. 2014; Mondini et al. 2015; Demirer et al. 2015; Du et al. 2015; Augustine et al. 2020). Dans les présentations, il est souvent plus commun de commencer par les résultats *in vitro* avant ceux *in vivo*. Dans ce rapport, j'ai préféré résumer les tests biologiques réalisés *in vitro* après les essais en imagerie médicale. En effet, les résultats qui seront présentés dans cette partie mettent en lumière les facteurs physico-chimiques qui ont été optimisés en Partie A.I mais également qui influenceront les futures projets à mener (Partie A.VI). La majorité des études d'interactions biologiques des SPIONs présentées dans cette partie se sont concentrées sur l'impact de ces NPs avec RES (système réticuloendothélial) notamment le sang et les cellules hépatiques et immunitaires. En effet, quelle que soit la voie d'entrée des NPs dans l'organisme, celles-ci vont majoritairement finir par se retrouver dans le système sanguin (Docter et al. 2015). Les différentes études de cette partie seront divisées en deux parties présentant:

- Différents tests de réponses cellulaires de différentes lignées (hépatiques, immunitaires et d'oligodendrocytes) après incubations avec des SPIONs
- L'évaluation du rôle du PVA sur la réponse immunitaire et l'hémolyse

A.III.1. Différents tests cellulaires après incubations avec des SPIONs

Dans une première étude, les PEG₂₀₀₀-SPIONs et PEG₂₀₀₀-SPIONs + DMSA (partie A.I.2.1) ont été mises en contact avec des cellules immortalisées de types macrophages (264.7 souche de souris) et hépatocytes (HepG2 lignée humaine). Le Resovist a été utilisé comme une suspension contrôle de SPIONs et le sérum physiologique comme contrôle classique. En Figure A.III-1, les co-localisations des différentes SPIONs dans les cellules HepG2 et RAW 264.7 ont été observées par révélation au bleu de Prusse. La présence de Resovist et de PEG₂₀₀₀-SPIONs + DMSA est clairement mise en évidence par les nombreuses tâches bleues observées par rapport au contrôle. En revanche les PEG₂₀₀₀-SPIONs sont peu co-localisées et seulement avec les hépatocytes. Le PEG seul semble donc ralentir l'interaction cellulaire des SPIONs de même qu'il retardait la captation hépatique *in vivo* (partie A.II.1.1). La méthode du bleu de Prusse souvent utilisée pour les interactions cellulaires des SPIONs ne peut pas réellement prouver leur internalisation. Pour la prouver, d'autres méthodes sont nécessaires telles que la microscopie confocale qui peut analyser des coupes de l'ordre de 60 nm mais qui nécessite des NPs fluorescentes, fonctionnalisation qui pourrait aussi modifier les mécanismes d'internalisation. La microscopie électronique est aussi une solution permettant d'observer une coupe « centrale » de la cellule. Dans le cas de cette étude, des images TEM (données non montrées) ont été réalisées et ont démontré l'internalisation des différents SPIONs avec toujours moins de NPs avec les PEGs seuls. Cette technique est plutôt qualitative

car il est compliqué d'observer des dizaines de coupes de centaines de cellules pour quantifier les SPIONs. Le bleu de Prusse est donc souvent utilisé pour quantifier les SPIONs.

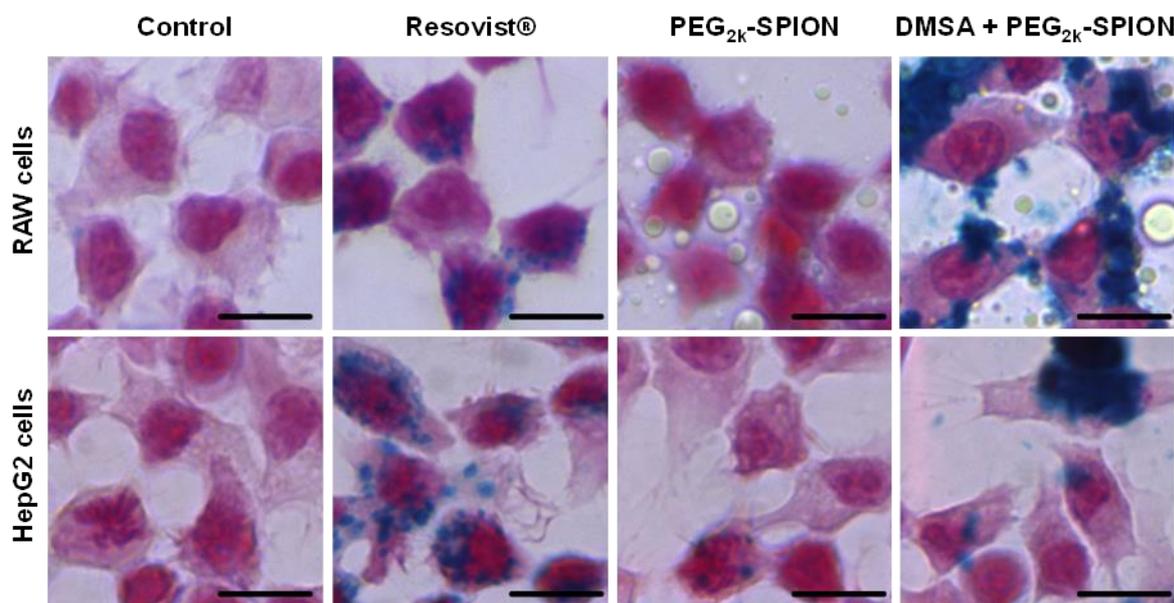


Figure A.III-1 : Co-localisation de différents SPIONs et de cellules RAW 264.7 et HepG2. Observations par microscopie optique des cellules marquées au bleu de Prusse pour révéler la présence de PEG₂₀₀₀-SPIONs et PEG₂₀₀₀-SPIONs + DMSA comparées au Resovist et à un contrôle 3 heures après incubation. Barre d'échelle : 10 μ m

La cytotoxicité de ces mêmes NPs a été testée à différentes concentrations (25 et 50 μ g_{NPs}/cm²) et sur les mêmes lignées cellulaires (Figure A.III-2). Le test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) a été choisi pour quantifier l'activité mitochondriale et la comparer au contrôle pour obtenir des pourcentages de viabilités. Le Resovist et les SPIONs fonctionnalisées n'influencent pas la viabilité cellulaire que ce soit sur les RAW ou les HePG2. Quelques différences significatives sont observées entre les conditions mais ne peuvent pas être considérées comme induisant de la cytotoxicité. Pour les Resovist et les PEG₂₀₀₀-SPIONs + DMSA dans les cellules RAW 24h après incubation, une « sur-viabilité » est observée. Ceci est sans doute dû à des SPIONs mal éliminées lors des étapes de lavage et à un contrôle ayant été mal calibré pour ces fortes concentrations. En effet, les SPIONs absorbent dans la zone du MTT induisant ainsi une absorbance supérieure au contrôle.

Il est intéressant de noter que les concentrations choisies ont été exprimées en μ g de NPs par surface de puits. Ce choix a été motivé par les cellules qui étaient adhérentes et il nous paraissait plus approprié de comparer la dose par surface de puits plutôt que par volume de puits, une grande partie du volume des puits n'ayant pas de cellules. Cette approche n'a plus été utilisée par la suite car les partenaires biologistes et médecine des autres études avaient l'habitude de travailler avec des concentrations volumiques. Il est cependant intéressant de noter que l'équipe de Peter Wick de l'EMPA St Gallen en Suisse, avec qui j'ai travaillé sur le passage de NPs dans le placenta, (études non résumées dans ce manuscrit) a démontré que les analyses de nanotoxicité cellulaires nécessitaient un effort d'harmonisation (Elliott et al. 2017). Dans leur étude, différentes équipes d'une dizaine de laboratoires ont

réalisé les mêmes tests cellulaires et ont démontré que la lignée cellulaire, l'échange de milieu lors des tests, la manipulation des cellules et même l'état de dispersion des NPs jouaient un rôle crucial dans la reproductibilité des expériences. Il serait donc important, dans le cadre d'études de cytotoxicité induite par les NPs de mieux planifier ces analyses et de penser à des contrôles adaptés aux NPs étudiées. Il serait intéressant de d'anticiper cette approche lors de futurs projets mettant en jeu la nanotoxicologie.

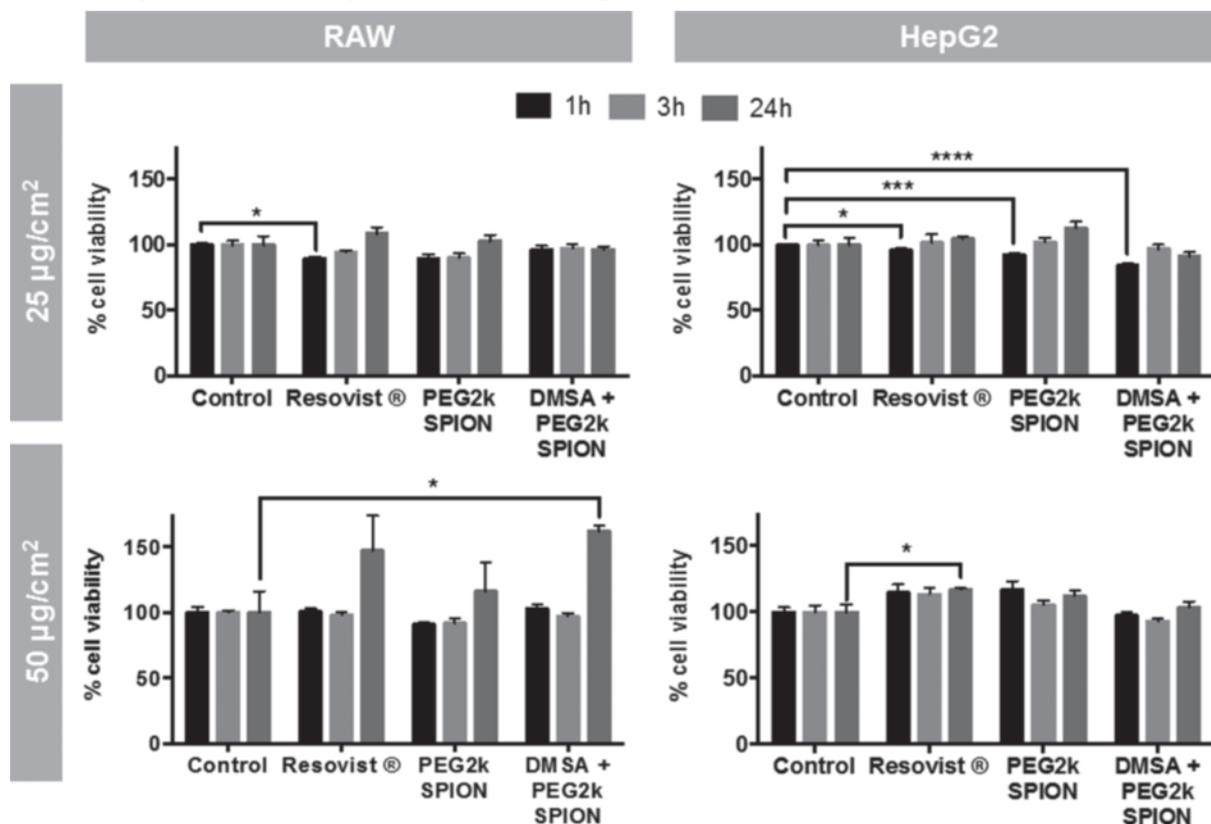


Figure A.III-2 : Tests de cytotoxicité à différents temps et concentrations de SPIONs sur des cellules RAW 264.7 et HepG2. Mesures par tests MTT de la cytotoxicité de PEG₂₀₀₀-SPIONs et PEG₂₀₀₀-SPION + DMSA comparées au Resovist et à un contrôle. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

Dans le cadre d'un autre projet, les impacts des PEG₂₀₀₀-SPIONs sur des oligodendrocytes murins (cellules 158 N) ont été testés. Même si ce modèle cellulaire n'est pas lié au RES et au sang à proprement parler, les méthodes mises en place ont permis d'être utilisées dans le cadre de la thèse du Dr. Annette Luce (Luce 2020). Différentes concentrations de NPs ont été incubées avec les cellules 158 N (1 ; 5 ; 10 ; 50 et 100 µg_{Fe}/mL).

En premier lieu, le stress oxydant des nanohybrides a été évalué par cytométrie de flux de deux manières : par mesures des formes actives de l'oxygène (FAO) et du niveau de glutathion réduit (GSH). En Figure A.III-3-a, les FAO ont été quantifiées par rapport au contrôle à l'aide du test H2DCF-DA 2h, 4h et 6h après incubation avec les PEG₂₀₀₀-SPIONs à 100 µg_{Fe}/mL. Le taux de GSH a aussi été mesuré (Figure A.III-3-b) et comparé à un contrôle et un contrôle positif (Diamide) 6 heures après incubation avec les NPs à 50 et 100 µg_{Fe}/mL. Aucun effet des nanohybrides sur un potentiel stress oxydatif induit sur les cellules 158 N n'a été démontré.

Interactions biologiques des SPIONs

Les NPs ont été quantifiées par coloration au Perls (identique au fonctionnement du bleu de Prusse) et par dosage en ICP (Inductively Coupled PLasma spectroscopy). Les concentrations et le nombre de cellules marquées avec des NPs ne semblent pas suivre une tendance linéaire (Figure A.III-3-c). En effet, alors qu'avec une très faible concentration de SPIONs ($1 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{mL}$), déjà 40% des cellules observées étaient marquées et donc en contact avec ces NPs, en multipliant par 100 la concentration incubée, le pourcentage de cellules marquées a juste doublé. En ICP, il a été possible de retrouver 90% de la quantité de SPIONs mise en contact à $1 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{mL}$ mais à $10 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{mL}$ seulement 50% des SPIONs ont été retrouvés et seulement 28% pour la plus forte concentration ($100 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{mL}$). Cette tendance semble être due à une potentielle saturation de la surface des cellules empêchant le transport des NPs à travers la membrane et potentiellement à l'effet protecteur du PEG retardant l'internalisation cellulaire.

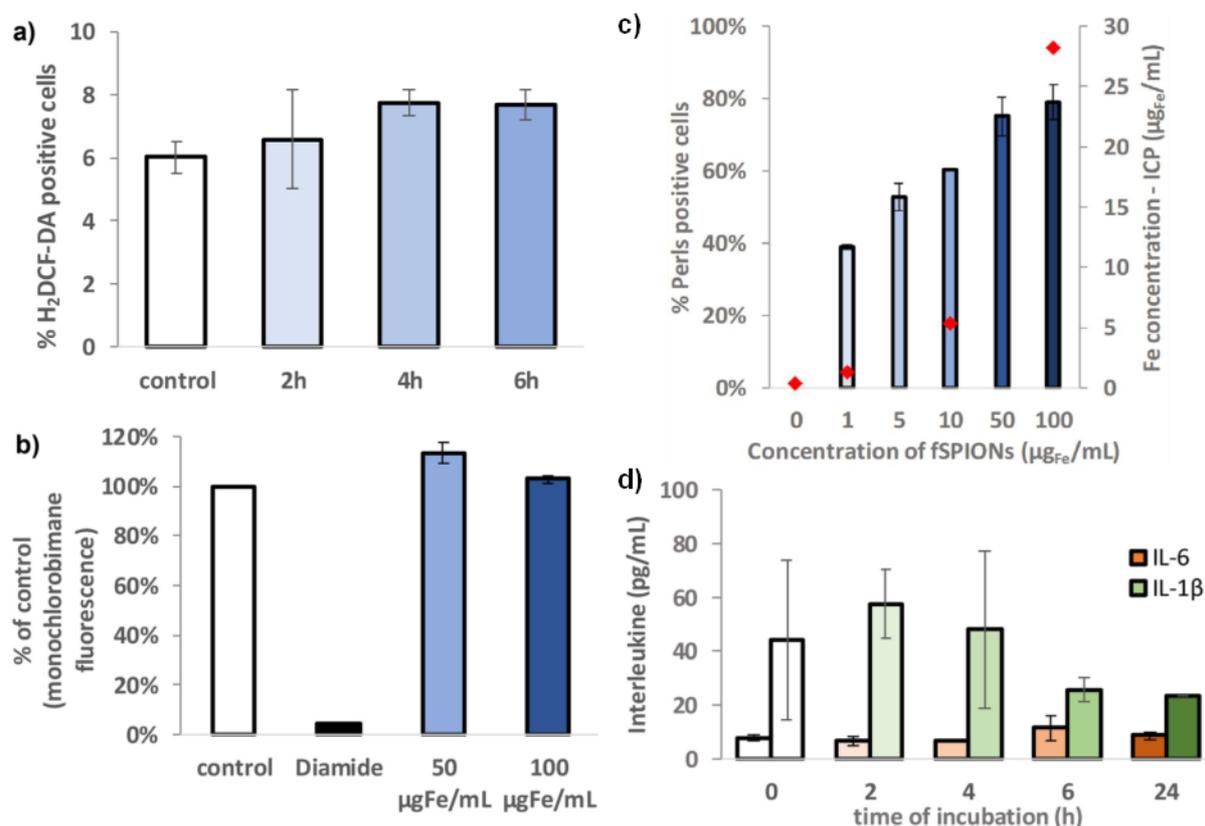


Figure A.III-3 : Tests cellulaires sur cellules 158N mises en contact avec PEG-SPIONs a) quantification par cytométrie de flux de cellules positives au H₂DCF-DA à $100 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{mL}$ PEG₂₀₀₀-SPIONs; b) quantification 6h après incubation par cytométrie de flux de glutathion réduit évaluée en pourcentage de la fluorescence du contrôle (cellules non traitées) et 0.5mM diamide utilisé comme contrôle positif ($n = 3$); c) pourcentage de cellules positives au Perls et concentration en fer (losanges rouges) après incubation 24h avec des PEG-SPIONs ($n = 3$) et d) concentrations de IL-6 and IL-1β dans le milieu de culture des cellules incubées avec $100 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{mL}$ de PEG-SPIONs ($n=3$) (Sruthi et al. 2018)

Enfin, les réponses inflammatoires des cellules ont été estimées en dosant les interleukines 6 et 1β (Figure A.III-3-d). Aucune sécrétion significative des IL-6 et IL-1β n'a été observée 2, 4, 6 et 24 heures après incubation avec des PEG₂₀₀₀-SPIONs prouvant que le PEG₂₀₀₀ semble prévenir la réponse inflammatoire chez les cellules 158N. Cette étude a

montré que le PEG permet de prévenir tout effet cellulaire indésirable potentiellement induit par les SPIONs.

Cette étude a aussi permis de mettre en place plus de tests pour évaluer les réponses cellulaires induites par les SPIONs que de simples analyses de cytotoxicité. Le stress oxydant et la réponse inflammatoire de même que l'internalisation des SPIONs sont des paramètres importants à étudier. Dans le cadre de la thèse d'Annette Luce (Luce 2020), ces nouveaux tests et d'autres de génotoxicité ont été mis en place. Ces résultats n'étant pas encore publiés, ils ne seront pas présentés dans ce rapport. En revanche, ce projet a aussi mis en évidence le fait que, très souvent, les tests cellulaires utilisés n'ont pas de contrôle positif adaptés aux propriétés nanométriques testées. Ainsi, des NPs utilisables comme témoin positif ont été évaluées notamment dans le cadre de test de cytotoxicité et de stress oxydatif.

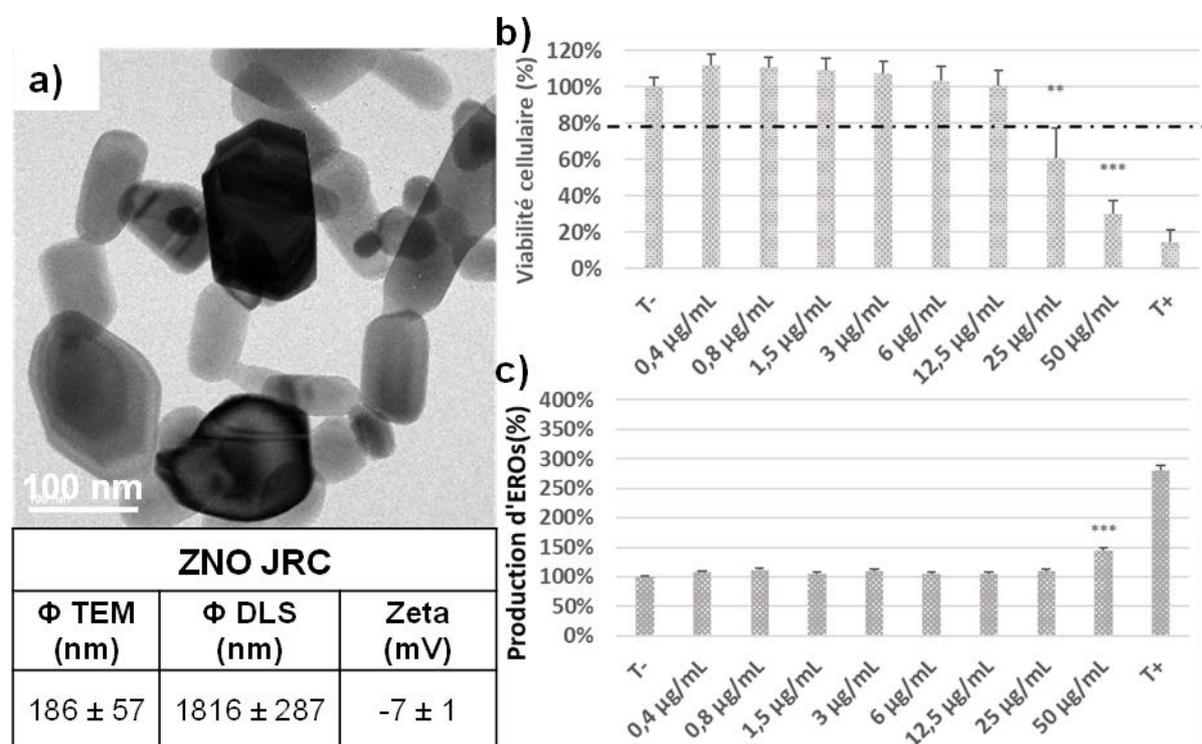


Figure A.III-4 : **Nanoparticules utilisées comme témoin positif.** a) image TEM et caractérisations de ces NPs ; b) viabilité cellulaire 24 heures après incubation à différentes concentrations et avec l'eau ultra pure comme témoin négatif (T-) et le SDS à 3% comme témoin positif (T+) et c) production d'espèces réactives à l'oxygène (EROs) avec différentes concentrations de NPs et l'eau ultra pure comme T- et le tert-butylhydroperoxyde (tBHP) comme T+. (n = 8) (Luce 2020)

Les nanoparticules testées ont été produites par un joint research center (JRC) à Ispra en Italie. Leur composition est de l'oxyde de Zinc (ZnO) avec une taille de cristallite de l'ordre et 186 nm et un diamètre hydrodynamique et un potentiel zéta à pH de, respectivement 1800 nm et -7 mV (Figure A.III-4-a). Ces NPs ont été développées dans le cadre d'un projet européen en collaboration avec l'ANSES (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) sur la génotoxicité des NPs (Nanogenotox). Les ZNO JRC ont été choisies pour leur potentiel comme témoin positif en tests de génotoxicité mais aussi potentiellement en toxicité et stress oxydatif. En Figure A.III-4-b et c, les NPs ont

Interactions biologiques des SPIONs

été incubées 24 heures à différentes concentrations (de 0,4 et 50 $\mu\text{g}_{\text{NPs}}/\text{mL}$) dans les cellules HepG2 (souche hépatique). La viabilité cellulaire influencée par les NPs de ZnO a été mesurée avec le test au rouge neutre et la production d'espèces réactives de l'oxygène avec le réactif H2DCF-DA. Les NPs du JRC ont démontré un effet cytotoxique et oxydatif au-delà de 12,5 $\mu\text{g}_{\text{NPs}}/\text{mL}$ et 25 $\mu\text{g}_{\text{NPs}}/\text{mL}$ les plaçant comme des candidates intéressantes pour être utilisées en tant que témoin positif nanostructuré.

Dans cette partie, différents tests cellulaires ont été développés pour quantifier la réponse cellulaire des PEG₂₀₀₀-SPIONs. Comme lors des études *in vivo*, la chimie de surface semble influencer l'internalisation cellulaire des SPIONs. Lors de toutes les analyses effectuées sur les SPIONs avec PEG₂₀₀₀ (+ DMSA ou non) il n'a pas été possible d'observer, *in vitro*, un effet négatif que ce soit toxique, oxydant ou inflammatoire avec ces NPs ne permettant donc pas de conclure sur l'effet de ces fonctionnalisations sur les réponses cellulaires. La nécessité de mieux mettre en place les tests cellulaires pour les NPs nous a permis de choisir des NPs (ZnO) pouvant être utilisées comme contrôle négatif lors des prochaines études. Après ces études préliminaires, les influences d'une autre fonctionnalisation (le PVA) sur la réponse des cellules sanguines et de l'hémolyse ont été évaluées.

A.III.2. Interactions hématologiques des SPIONs

Dans cette partie, l'influence des PVA-SPIONs sur les cellules immunitaires et sur l'hémolyse a été testée. Pour toutes applications biologiques que ce soit médicale ou toxicologique et quelle que soit leur voie d'entrée, les NPs vont finir dans le sang (Yoon et al. 2014; Docter et al. 2015) et induiront différentes interactions avec les cellules immunitaires ou les autres molécules (dont les protéines) présentes dans ce fluide. Dans un premier temps, l'importance du contrôle de la fonctionnalisation au PVA a été évaluée. En deuxième lieu, les interactions hématologiques de cette même chimie de surface ont été étudiées. Ces études cellulaires préliminaires sont surtout présentées dans ce rapport pour mettre en avant les futures analyses à réaliser lors de futurs projets de recherche.

A.III.2.1. Influence du greffage du PVA et de la charge sur la toxicité des cellules immunitaires humaines

Une des principales questions sur le choix de la fonctionnalisation par adsorption de PVA est la potentielle réponse toxique de ce polymère. En effet, le protocole optimisé des PVA-SPIONs (partie A.I.2.2) permet d'obtenir des NPs couvertes de PVA mais avec potentiellement une désorption de certains polymères dans le milieu physiologique étudié. Aucune toxicité aigüe n'a été observée *in vitro* dans le cadre d'une étude sur les cellules immunitaires humaines (Strehl et al. 2015) et également *in vivo* (partie A.II.2.1). En revanche, dans ces travaux, une réponse inflammatoire précoce s'estompant après quelques heures a été mesurée.

Il a donc été envisagé que, contrairement au PEG (partie A.III.1), le PVA induit une réponse inflammatoire. Ainsi, du PVA à différentes concentrations (1, 10 et 100µg/mL) a été incubé dans du sang humain pendant 24h. En Figure A.III-5-a, la sécrétion d'interleukine (IL-1β) a été mesurée et a démontré le potentiel inflammatoire du PVA seul. Pour essayer de limiter cet effet du PVA seul, la fonctionnalisation des NPs a été optimisée en le greffant de manière covalente à leur surface. Des PVA-SPIONs obtenues en suivant le protocole de la partie A.I.2.2 ont ensuite été mélangées avec de l'APTES ((3 aminopropyl)triéthoxysilane) pour faire une réticulation comme avec le TEOS (partie A.I.2.3) mais en diminuant la condensation (donc sans potentielle couche de silice) et en ajoutant des groupements amine (NH₂) pour charger positivement les SPIONs à pH 7. Cette charge a été modulée par la quantité d'APTES utilisée. Les PVA-SPIONs greffées ont été purifiées par réacteur magnétique.

Trois PVA-SPIONs d'environ 30 nm ont été développées (Figure A.III-5-b):

- PVA-SPIONs avec adsorption classique positives (+22 mV ; PVA/Fe = 9) → **G1**
- PVA-SPIONs greffées très positives (++ : +31 mV; PVA/Fe = 1) **G4**
- PVA-SPIONs greffées positives (+ : +21 mV; PVA/Fe = 1)

Interactions biologiques des SPIONs

L'influence du taux de greffage et de la charge sur la réponse inflammatoire ont été étudiées. En analysant l'interleukine pro inflammatoire IL 17 (Figure A.III-5-c) sur les sangs incubés avec les différents SPIONs au trois mêmes concentrations que le PVA précédemment (1, 10 et 100 $\mu\text{g}_{\text{NPs}}/\text{mL}$), des effets de la charge et du PVA « libre » ont été examinés. Ainsi, avec les PVA-SPIONs « classiques » une réponse inflammatoire significative est observée dès une concentration de 10 $\mu\text{g}_{\text{NPs}}/\text{mL}$ sans doute liée au PVA désorbé de ces NPs. Une fois le PVA greffé, la charge de surface semble tout de même induire une sécrétion de IL-17 aux plus fortes concentrations. En optimisant le greffage du PVA et sa charge, les PVA-SPIONs n'ont pas montré de sécrétion de cette interleukine dans les concentrations étudiées.

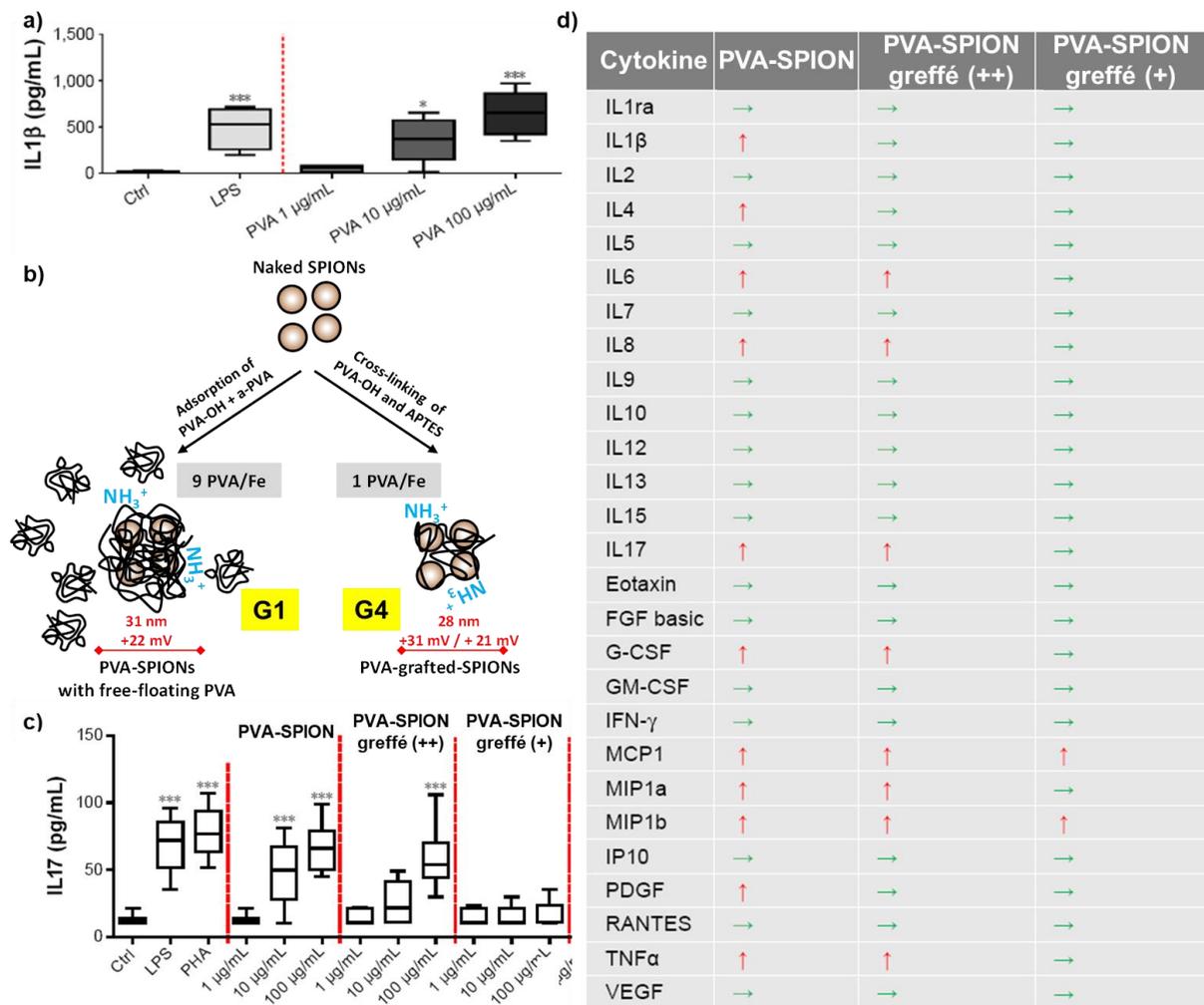


Figure A.III-5 : Influence du PVA sur la sécrétion de cytokines des cellules immunitaires humaines : a) Sécrétion de cytokine IL-1β après incubation avec différentes concentrations de PVA ; b) fonctionnalisation de SPIONs avec du PVA adsorbé (G1) et greffé (G4) à différentes charges ; c) mesures de la cytokine IL-17 à différentes concentrations de différents PVA-SPIONs et d) résumé des sécrétions de cytokines induites par les différentes modifications de surface des PVA-SPIONs (100 $\mu\text{g}_{\text{NPs}}/\text{mL}$). Les flèches rouges indiquent une augmentation significative et les flèches vertes l'absence de changement. APTES, (3-aminopropyl)triéthoxysilane ; LPS, lipopolysaccharide ; PHA, Phaseolus vulgaris *** $P < 0.001$ (Strehl et al. 2016)

Dans la Figure A.III-5-d, de nombreuses sécrétions de cytokines par le sang complet ont été évaluées après incubation avec les trois différents PVA-SPIONs à 100 $\mu\text{g}_{\text{NPs}}/\text{mL}$. Le tableau résume si la sécrétion de la cytokine augmente significativement par rapport au

contrôle (symbolisée par une flèche rouge) ou si elle reste constante (flèche verte). Comme déjà observé lors de précédentes études *in vitro* et *in vivo* (Strehl et al. 2015; Vermeij et al. 2015), les PVA-SPIONs classiques (G1) provoquent la sécrétion de nombreuses cytokines. En greffant de manière covalente, un peu de moins de cytokines semble être produites notamment les IL-1 β et IL-4 corroborant la possible réaction inflammatoire produite par le PVA désorbé des PVA-SPIONs « classiques » par rapport aux optimisées.

Une autre observation intéressante vient de la grande différence de réaction inflammatoire entre les PVA-SPIONs greffées très positives (+31 mV) et un peu moins positive (+21 mV). La diminution de 10 mV fait passer la production significative de cytokines de 8 (sur les 27 testées) pour les PVA-SPIONs greffées (++) à seulement 2 pour les PVA-SPIONs greffées (+). Dans le cas des NPs moins positives, seulement les chimiokines (MCP1 et MIP1b) sont sécrétées et aucune surproduction des cytokines pro-inflammatoires n'est observée (comme IL6 et IL17 par exemple). Ces chimiokines semblent être avantageuses pour la migration des cellules immunitaires vers les tissus enflammés mais des études complémentaires devraient être effectuées pour clarifier cette observation.

Une des hypothèses avancées pour tenter d'expliquer cette différence importante de réaction inflammatoire entre différentes charges de surface concerne l'adsorption des protéines sanguines à la surface des NPs. En effet, des études antérieures ont démontré que la fonctionnalisation de surface pouvait influencer l'adsorption des protéines du fluide dans lequel les NPs ont été incubés (Lundqvist et al. 2008). Une autre étude (Mahmoudi et al. 2015) a également démontré que les interactions entre les protéines et la surface des NPs dépendaient, entre autres, de la charge des NPs et que ces protéines adsorbées influençaient également l'internalisation cellulaire ou la cytotoxicité observées. Dans une de nos études (Sakulkhu et al. 2015), il a été démontré que des NPs moyennement chargées avaient 40% moins de protéines que des NPs très chargées. Ces interactions entre la surface des NPs et les protéines semblent être un élément crucial dans la compréhension des phénomènes biologiques induits par les NPs. Les études menées sur ce sujet seront présentées dans la Partie A.IV.

Pour conclure sur l'influence des interactions entre les PVA-SPIONs et le sang humain, il a été démontré que ce polymère n'induit pas d'apoptose ou de nécrose sur les cellules immunitaires. En revanche, il apparaît que le PVA désorbé semble générer une réaction inflammatoire non négligeable qui s'estompe en greffant ce polymère et même disparaît en diminuant un peu la charge positive des NPs. Etudier plus en détails le rôle de la surface des NPs sur les interactions biologiques est primordial notamment l'adsorption des protéines plasmatiques.

A.III.2.2. Influence des PVA-SPIONs sur l'hémolyse

Dans la lignée de l'étude précédente, l'influence de différents PVA-SPIONs sur l'hémolyse a été étudiée. Des SPIONs fonctionnalisées avec deux PVAs de poids moléculaires différents (12 et 31 kDa) ont été utilisés avec l'ajout de PVA-COOH et PVA-NH₂ (partie A.I.2.2) pour les charger, respectivement, négativement et positivement. Les PVA-SPIONs avec du PVA de 12 kDa chargées positives, neutres ou négatives ont été nommées 12⁺, 12⁰ et 12⁻. Pour les PVA-SPIONs avec du PVA de 31 kDa elle ont été nommées 31⁺, 31⁰ et 31⁻.

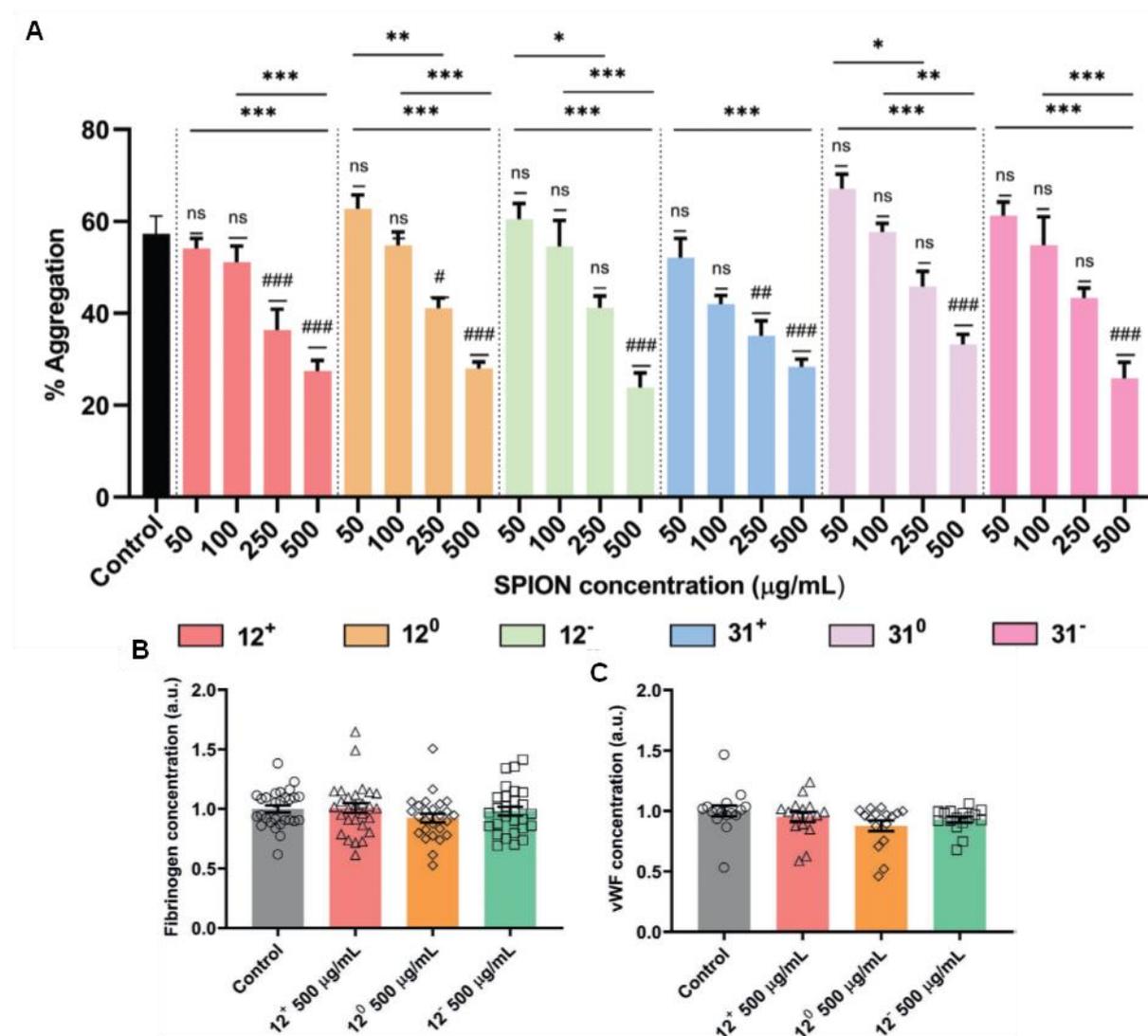


Figure A.III-6 : Influence des PVA-SPIONs sur l'agrégation plaquettaire et les protéines responsables de la coagulation
A) quantification de l'agrégation plaquettaire en présence de différentes concentrations de PVA-SPIONs de 12 et 31kDa de charge positive (+), neutre (0) et négative (-) avec 10 min d'incubation (n = 6 à 18, de 3 à 9 donneurs. Ns : non significatif ; #p ≤ 0.05 ; ##p ≤ 0.01 ; ###p ≤ 0.001 ; *p ≤ 0.05 ; **p ≤ 0.01 ; et ***p ≤ 0.001). De l'ADP à 20 µM a été utilisé comme agoniste plaquettaire. Quantifications des niveaux de B) fibrinogène et de C) facteur de Willebrand (vWF) dans le plasma après 10 min d'incubation avec des PVA-SPIONs (B : n = 28, 14 donneurs et C : n = 16 et 8 donneurs). (Kottana et al. 2021)

Dans un premier temps, l'impact des NPs sur l'agrégation plaquettaire a été mesuré à différentes concentrations de PVA-SPIONs (50, 100, 250 et 500 µg_{NPs}/mL). En Figure A.III-6-a, un effet sur l'agrégation plaquettaire en fonction de la dose des PVA-SPIONs, quel que soit le PVA utilisé, est quantifié. Une légère différence entre les concentrations retardant cette

agrégation est observée mais il a été considéré que toutes les fonctionnalisations utilisées influençaient par effet dose les plaquettes. Ainsi, dans le reste de cette étude, seules les PVA-SPIONs avec du PVA 12 kDa seront étudiées. L'influence des SPIONs sur la coagulation sanguine a été observée dans le cadre de NPs nues (Zhu et al. 2008) ou même fonctionnalisées avec un co-polymère P4VP-g-PEG (Ali et al. 2013). Dans le cas de nos PVA-SPIONs, la coagulation n'a pas été affectée mais la dose de NPs a clairement retardé l'agrégation plaquettaire. Il est donc clair que la chimie de surface semble plus influencer l'hémolyse que le cœur inorganique lui-même.

Pour tenter d'expliquer ce phénomène, les interactions entre les protéines sanguines responsables de la cascade réactionnelle de l'agrégation plaquettaire et de la coagulation, et les PVA-SPIONs (12 kDa) ont été étudiées. Le Fibrinogène et le facteur de Willebrand (vWF) ont été choisis pour quantifier si leurs interactions avec les PVA-SPIONs avaient pu influencer leur concentration dans le sang ou leur conformation. Après incubation dans le plasma avec les SPIONs 12^+ , 12^0 et 12^- aux mêmes concentrations que lors des essais plaquettaires, les NPs ont été retirées du fluide à l'aide d'un aimant. Les concentrations en fibrinogène et en vWF ont été mesurées et aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle et les plasmas ayant été incubés avec les SPIONs (Figure A.III-6-b et -c). Bien qu'il ait été démontré que ces deux protéines s'adsorbent sur nos PVA-SPIONs (Sakulku et al. 2014a, 2015), la concentration des NPs dans le plasma semblait trop faible pour influencer le taux de ces protéines.

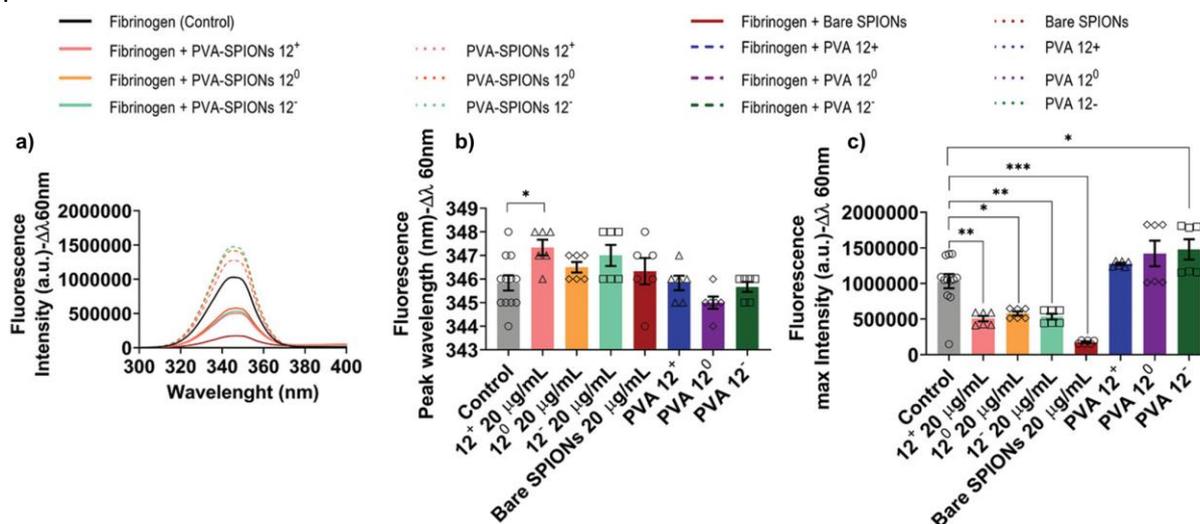


Figure A.III-7 : **Influence des PVA-SPIONs sur la conformation du fibrinogène.** a) courbes de fluorescence du fibrinogène en présence et en absence de SPIONs, PVA-SPIONs et PVA ; b) Longueur d'onde au maximum du pic de fluorescence ($n = 6$ à 12 , $*p \leq 0.05$) et c) Histogrammes du maximum d'intensité du pic de fluorescence pour chaque condition ($n = 6$ à 12 , $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$). (Kottana et al. 2021)

L'adsorption du fibrinogène et du vWF ne semblant pas affecter la concentration de ces protéines dans le plasma, une autre hypothèse a été que la conformation du fibrinogène pouvait, elle, être modifiée et ainsi diminuer son affinité à se lier aux récepteurs des plaquettes diminuant leur efficacité d'agrégation. Cette conformation du fibrinogène a été

Interactions biologiques des SPIONs

mesurée par fluorescence en présence des PVA-SPIONs (12 kDa, 20 μ g_{NPs}/mL, 10 min d'incubation) et reportée en Figure A.III-7. En Figure A.III-7-a et -b, le maximum du pic de fluorescence est significativement différent seulement pour les SPIONs 12⁺. En revanche les intensités du maximum de fluorescence du fibrinogène (Figure A.III-7-c) sont significativement différentes par rapport au contrôle pour toutes les formulations de PVA-SPIONs (et les SPIONs nues) alors que ce n'est pas le cas pour les PVA seuls prouvant que l'adsorption du fibrinogène sur ces NPs influence probablement sa conformation.

En conclusion sur cette étude, la fonctionnalisation avec du PVA de différentes charges influence l'agrégation plaquettaire avec un effet dose. L'adsorption des protéines responsables de cette agrégation, notamment le fibrinogène et le vWF, n'a pas affecté leur concentration dans le sang. En revanche, cette interaction avec les NPs (et pas avec le PVA seul) semble modifier la conformation du fibrinogène pouvant expliquer le délai observé dans l'agrégation plaquettaire. Il est donc important d'étudier les phénomènes impliqués à l'interface entre la surface des NPs et les fluides biologiques pour comprendre les interactions biologiques *in vitro* et *in vivo* des NPs.

A.III.3. Conclusions sur les interactions biologiques des nanoparticules

Cette partie sur les interactions biologiques des NPs n'avait pas pour but d'être exhaustive sur la compréhension biologique des phénomènes complexes de régulation cellulaires car, en premier lieu, toutes ces notions sont assez éloignées de mes compétences. Ensuite, peu de résultats probants ont été observés sur les NPs étudiées notamment car elles devaient être le plus biocompatibles possible.

Les études présentées ont tout de même permis de tirer quelques conclusions sur les SPIONs fonctionnalisées développées et sur les futurs projets à mener sur ces NPs :

1. En premier lieu, les PEG-SPIONs et les PVA-SPIONs ne présentent pas de toxicité de mort cellulaire que ce soit par apoptose ou par nécrose. Comme lors des études *in vivo* (partie A.II.1.1), la charge de surface des PEG-SPIONs influence l'internalisation cellulaires sur souches hépatiques ou macrophages. Ces mêmes PEG-SPIONs ne génèrent aucune réponse négative sur les oligodendrocytes et leur internalisation par ces cellules semble aussi retardée et influencée par la concentration et le polymère à la surface de ces SPIONs.
2. En revanche, les PVA-SPIONs, sans doute par le biais de PVA non liés chimiquement à la surface des SPIONs, génèrent une réponse inflammatoire qui disparaît quand la surface des NPs et leur charge sont contrôlées. Ces PVA-SPIONs retardent aussi l'agrégation plaquettaire avec un effet lié à la dose des NPs incubées.
3. En parallèle de la mise en place de tous ces tests cellulaires, des NPs ont été testées pour être un témoin positif nanométrique. Des NPs de ZnO ont montré une toxicité et un stress oxydant à de faibles doses permettant d'envisager leur utilisation comme contrôle positif dans les analyses cellulaires.
4. Enfin, il est apparu que les interactions entre la chimie de surface et les molécules des fluides biologiques étudiés (notamment dans le sang) semblaient influencer grandement les réponses biologiques après incubation avec les NPs. Par exemple, les PVA-SPIONs ont modifié la conformation du fibrinogène entraînant, sans doute, un retard d'agrégation plaquettaire. L'étude de ces interactions NPs/protéines sera plus détaillée en Partie A.IV.

Ces études sur les interactions cellulaires des NPs ont principalement permis de mettre en place et d'optimiser des tests cellulaires pour nos NPs. Les résultats partiels présentés dans cette partie ont fait apparaître une influence flagrante des interactions entre les protéines et la surface des NPs sur les réponses cellulaires et d'hémolyse observées. Dans le cadre de futurs projets, l'étude du fluide sanguin et de cette couronne de protéines semble primordiale. Les projets, encadrements et publications principaux sont résumés ci-dessous.

Projets associés

- Projet Régional ANER : Nanoprot (2019-2022)
- Projet Imappi (2019-2020)
- Projet Européen FP7 Nanodiara (2010-2014)

Encadrements principaux associés

- Dr Annette Luce (10/16-03/20) ; Thèse de doctorat: *Biotests innovants pour l'évaluation de la toxicité de nanoparticules*

Collaborations principales associées

- Hôpital Charité Berlin, Allemagne
- L'Institut Agro, Dijon
- Laboratoire Bioperoxy, Dijon
- NVH Medicinal, Dijon
- Université George Washington, USA

Publications principales

- *Anti-Platelet Effect Induced by Iron Oxide Nanoparticles: Correlation with Conformational Change in Fibrinogen*, R. K. Kottana, **L. Maurizi**, B. Schnoor, K. Morris, J. A. Webb, M. A. Massiah, N. Millot and A.-L. Papa, **Small**, 17 (1), 2004945, **2021** (DOI: [10.1002/smll.202004945](https://doi.org/10.1002/smll.202004945)) / **Back cover**: (DOI: [10.1002/smll.202170003](https://doi.org/10.1002/smll.202170003))
- *Cellular interactions of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles on oligodendrocytes without detrimental side effects: Cell death induction, oxidative stress and inflammation*, S. Sruthi[†], **L. Maurizi^{†*}**, T. Nury, F. Sallem, J. Boudon, J.M. Riedinger, N. Millot, F. Bouyer and G. Lizard^{*}, **Colloids Surfaces B**, 170 (2018), 454-462, **2018** (DOI: [10.1016/j.colsurfb.2018.06.041](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.041))
- *Modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticle surface enables safer human application*, C. Strehl, **L. Maurizi**, T. Gaber, P. Hoff, T. Broschard, A. R. Poole, H. Hofmann and F. Buttgerit, **Int. J. Nanomed.**, 2016 (11), 5883-5896, **2016** (DOI:[10.2147/IJN.S110579](https://doi.org/10.2147/IJN.S110579))
- *Effects of PVA coated nanoparticles on human immune cells*, C. Strehl, T. Gaber, **L. Maurizi**, M. Hahne, R. Rauch, P. Hoff, M. Hofmann-Antenbrink, A. R. Poole, H. Hofmann and F. Buttgerit, **Int. J. Nanomed.**, 2015 (10),3429-3445, **2015** (DOI: [10.2147/IJN.S75936](https://doi.org/10.2147/IJN.S75936))
- *Influence of surface charge and polymer coating on internalization and biodistribution of PEG-modified iron oxide nanoparticles*, **L. Maurizi**, A.-L. Papa, L. Dumont, F. Bouyer, P. Walker, D. Vandroux and N. Millot, **J. Biomed. Nanotech.**, 11, (1), 126-136, **2015** (DOI: [10.1166/jbn.2015.1996](https://doi.org/10.1166/jbn.2015.1996))

Partie A.IV. Interactions entre protéines et nanoparticules: la “protein corona”

Partie A.IV. Interactions entre protéines et nanoparticules: la “protein corona”	69
A.IV.1. Rôle de la chimie de surface sur la formation de la protein corona	70
A.IV.2. <i>In vivo</i> protein corona : influence sur la biocirculation.....	74
A.IV.3. L'importance de la standardisation et de la reproductibilité avec la protein corona.	78
A.IV.4. Conclusion sur la protein corona.....	81

Synthétiser et fonctionnaliser des NPs pour des applications biomédicales sont un peu le cœur de mes compétences et de mes activités de recherche. Les nanohybrides produits et caractérisés finement ont été utilisés dans de nombreuses études soit *in vivo* majoritairement comme agents de contraste directs ou indirects en imagerie médicale soit pour tester *in vitro* leurs impacts toxicologiques. Dans les parties précédentes, il est apparu que la chimie de surface jouait un rôle crucial à l'interface avec la biologie. En effet, une fois en contact avec des fluides biologiques, la surface des nanoparticules adsorbe les protéines présentes et il se forme une couronne protéique ou « protein corona », terme défini en 2008 (Lundqvist et al. 2008). Plus que la chimie optimisée, c'est plutôt cette protein corona (PC) qui semble influencer les comportements biologiques des NPs (Mahmoudi et al. 2015). Cette dernière va également être influencée par l'environnement dans lequel les NPs vont être incubées (Hajipour et al. 2014). Ainsi, deux approches peuvent être envisagées pour étudier la PC :

- Comprendre le rôle de la chimie de surface des NPs pour la formation de la PC
- Comprendre le rôle de la PC sur les comportements biologiques des NPs.

Dans cette partie différentes études seront détaillées. Dans un premier temps, l'influence de différentes chimies de surface sur la formation de la PC sera présentée. En deuxième partie, l'influence de la protein corona *in vivo* sur la biocirculation des SPIONs sera étudiée. Enfin, l'accent sera mis sur l'importance de la reproductibilité, de la répétabilité et de la bonne mise en place des protocoles dans la mesure de la PC. De la même manière que pour les parties précédentes, seuls les résultats principaux seront illustrés, les études de PC pouvant aussi donner lieu à beaucoup de tableaux de données. Enfin, il est à noter que cette partie a particulièrement influencé mes futurs projets de recherche qui seront présentés dans la dernière partie de ce rapport (Partie A.VI).

A.IV.1. Rôle de la chimie de surface sur la formation de la protein corona

Les NPs développées et présentées en partie A.I.2 possèdent différentes chimies de surface. En première partie, des SPIONs ont été fonctionnalisées dans une coquille de silice sur laquelle une couche de TiO₂ et d'Or ont été ajoutées (Figure A.IV-1). Les NPs obtenues avaient environ toutes les mêmes diamètres hydrodynamiques (entre 100 et 150 nm) et étaient toutes chargées négativement. Ainsi, seule la chimie (SiO₂, TiO₂ ou Au) a été étudié comme paramètre influençant l'adsorption des protéines. Les NPs ont été incubées pendant 1h dans du sérum bovin (FBS) à une concentration de 2,8 mL de FBS par m² de NPs. Bien que cette étude ait testé une dizaine de NPs différentes et quantifié toutes les protéines du sérum présentes dans la PC, par souci de clarté, ce résumé ne se concentrera que sur les cinq protéines les plus abondantes du sérum (Zheng et al. 2006) et sur les trois différentes NPs décrites ci-dessus. En Figure A.IV-1 sont résumées ces cinq protéines ainsi que le nombre de ces protéines trouvées sur les différentes chimies de surface. Il est intéressant de noter que la PC n'est identique sur aucune des trois surfaces. Aucune de ces cinq protéines n'est même

Interactions entre protéines et nanoparticules: la "protein corona"

retrouvée sur la surface de silice quand l'or et l'oxyde de titane en ont, respectivement, trois et deux types. La chimie de surface joue donc un rôle dans l'adsorption de protéines.

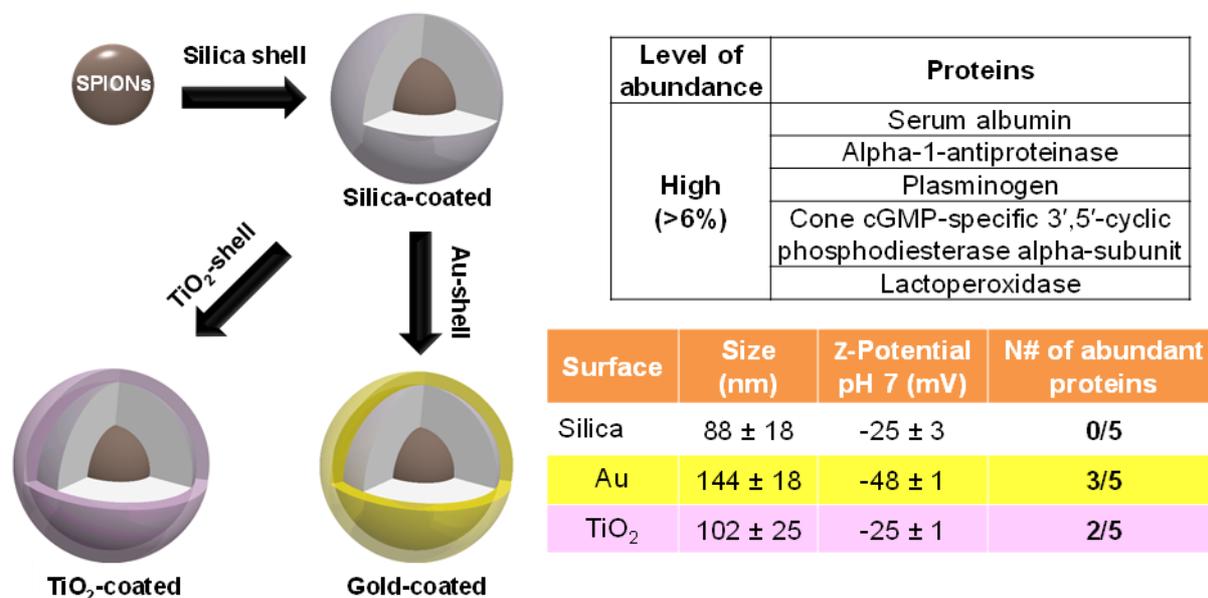


Figure A.IV-1 : Différentes chimies de surface influençant la PC des NPs. Des SPIONs nues (naked) sont encapsulées dans des billes de silice qui ont différents groupes chimiques (COOH, SH et OH) ou matériaux (Au et TiO₂) à leurs surfaces. Leurs diamètres hydrodynamique et potentiels Zeta à pH 7 sont indiqués ainsi que le nombre des 5 protéines les plus abondantes dans le sérum bovin trouvées sur les différentes chimies de surface. (Sakulkhu et al. 2015)

Dans une autre étude des silica@PVA-SPIONs (partie Figure A.IV-2) ont été modifiées pour étudier l'impact de la charge et d'un tout petit changement dans la chimie de surface sur la formation de la PC. Ainsi, ces NPs ont été fonctionnalisées avec des petits acides carboxyliques (citrate et DMSA) apportant donc des fonctions carboxyliques (COOH) et thiols (SH) mais ne changeant pas le potentiel zêta des NPs. Les NPs ont été incubées dans du FBS dans les mêmes conditions que précédemment décrites. Une attention toute particulière a été portée sur la réplication des expériences (n = 3) et à veiller à bien mettre en place un contrôle lors des analyses de PC. Cette importance des réplicas et du contrôle sera décrite en partie A.IV.3. Le but de cette étude était, par analyses statistiques, d'identifier quels étaient les paramètres physicochimiques les plus importants dans l'adsorption des protéines à la surface des NPs.

Les NPs développées et caractérisées sont présentées en Figure A.IV-2-a. Elles ont toutes la même taille hydrodynamique (environ 80-100 nm) et un potentiel zêta identique (de l'ordre de -30 mV) mais possèdent des groupements chimiques différents (COOH ; COOH et SH ; OH). Par analyses statistiques, plus de 250 protéines différentes ont été regroupées en différents groupes (Figure A.IV-2-b):

- Protéines n'ayant aucune affinité spécifique avec la chimie de surface des NPs
- Protéines ayant une affinité avec une des chimies de surface
- Protéines ayant plus d'affinité avec le dispositif qu'avec les NPs

Interactions entre protéines et nanoparticules: la "protein corona"

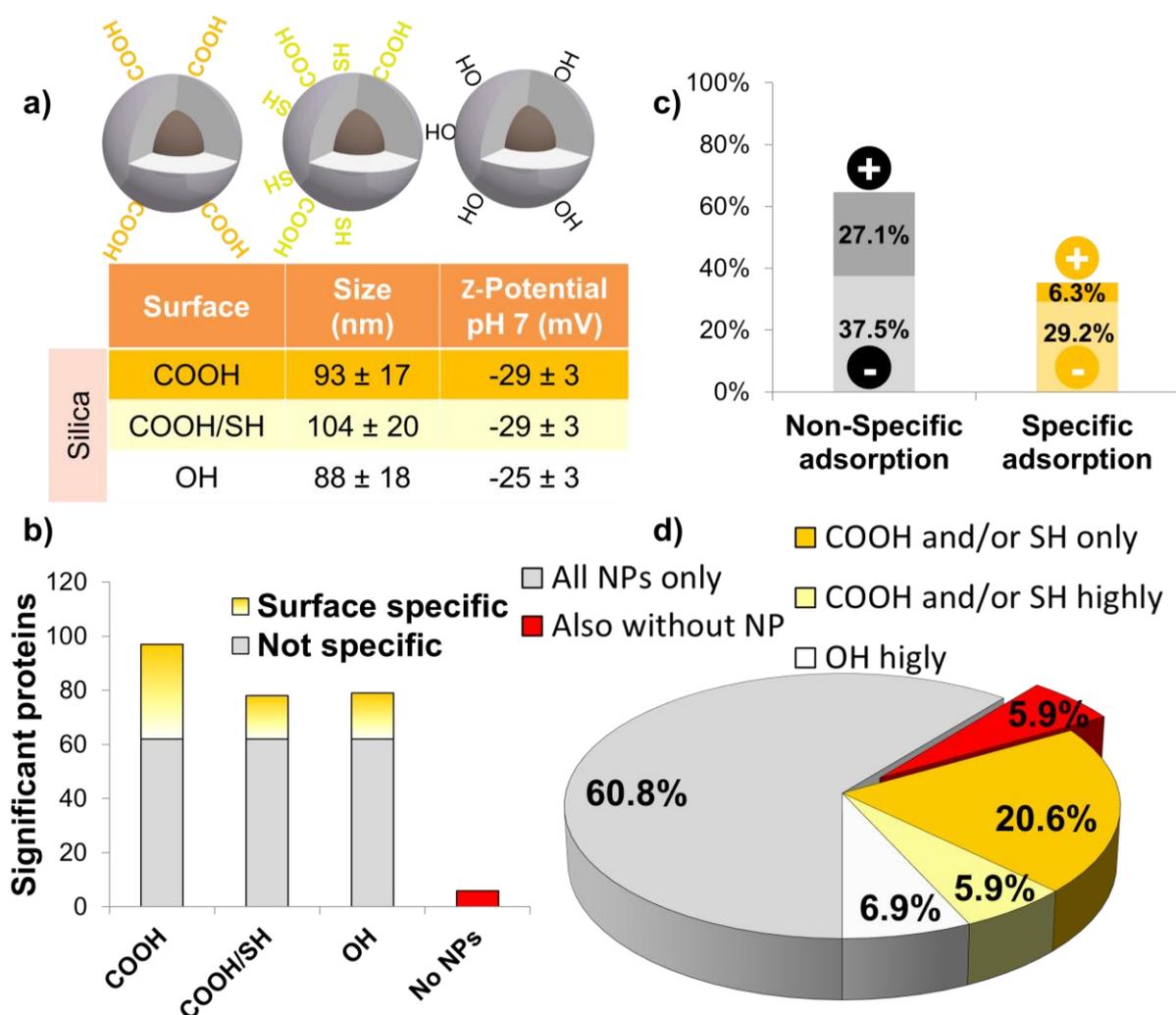


Figure A.IV-2 : **Influences des groupes chimiques de surface sur la formation des PC.** a) présentations et caractérisations des différents groupes chimiques sur des NPs de silices encapsulant des SPIONs ; b) nombre de protéines trouvées à la surface des différentes chimies de surface ((COOH, SH et/ou OH) et sur le contrôle avec ou sans spécificité sur cette chimie ; c) répartition des charges des protéines trouvées sur les NPs avec et sans spécificité par rapport aux groupes de surface (COOH, SH et/ou OH) et d) proportion des protéines ayant plus d'affinités avec le contrôle, les NPs et avec les différents groupes chimiques (Galmarini et al. 2018)

Il apparaît que près de deux tiers des protéines trouvées à la surface des NPs ne semblent avoir aucune affinité particulière avec les différentes chimies de surface. Les NPs avec des groupements COOH semblent avoir plus de différentes NPs que celles possédant des groupements OH puis que celles ayant à la fois des groupements COOH et OH. Enfin, environ 6% des protéines ont plus d'affinité avec le dispositif de séparation qu'avec les NPs.

Interactions entre protéines et nanoparticules: la "protein corona"

En essayant de répartir ces protéines par charge et en se concentrant seulement sur celles ayant des interactions significatives avec les NPs, quatre groupes de protéines apparaissent (Figure A.IV-2-c) :

- Protéines chargées négativement ayant des interactions non spécifiques avec les différentes NPs
- Protéines chargées positivement ayant des interactions non spécifiques avec les différentes NPs
- Protéines chargées négativement ayant des interactions spécifiques avec une des chimies de surface des NPs
- Protéines chargées positivement ayant des interactions spécifiques avec une des chimies de surface des NPs

De manière assez logique, la majorité des protéines chargées positivement (plus de 80% des 27,1% sur les 33,4% de protéines positives) ont plus d'affinité avec la charge de surface quels que soient les groupes conférant les charges négatives de ces NPs. En revanche, près de 45% des protéines négatives trouvées à la surface des NPs (29,2% sur les 66,7% de toutes les protéines négatives) ont une interaction spécifique avec les différents groupes chimiques à leurs surfaces.

En étant plus précis (Figure A.IV-2-d), plus de 60% de toutes les protéines trouvées ont plus d'affinité avec la charge des NPs quand plus de 20% ont une interaction seulement avec les NPs possédant exclusivement des groupes COOH et ou SH. 7% des protéines ont plus d'affinité (mais pas de manière exclusive) avec les NPs avec des groupes OH et 6% avec les COOH et ou SH. Près de 6% des protéines ont également plus d'affinité avec le dispositif de séparation démontrant l'importance de la mise en place d'un système d'analyses des PC robuste (voir partie A.IV.3).

En conclusion, sur cette partie, il a été démontré que la chimie de surface influence grandement les interactions entre les NPs et les protéines du sérum. Dans certains cas, l'albumine (protéine la plus abondante) est même absente de la surface de nos Silica@PVA-SPIONs. Avec des analyses en triplicatas et avec de tout petits changements de surface, il apparaît que la charge de surface semble plus importante que la chimie de surface même si les groupements COOH, SH et OH semblent interagir significativement avec plus de 35% des protéines du FBS. Dans le cadre de la dernière étude présentée, l'affinité des protéines semble être : charge > COOH > OH > SH.

A.IV.2. *In vivo* protein corona : influence sur la biocirculation

Dans d'autres études, la biocirculation dans le sang des PVA-SPIONs de différentes charges (partie A.I.2.2) a été étudiée *in vivo* et la protein corona a été quantifiée sur les différentes NPs. De la même manière, seuls les résultats résumés seront présentés dans cette partie. 7 mg_{Fe} de PVA-SPIONs de charges positives, neutres et négatives ont été injectées dans des rats (Rats Lewis femelles de 200g) et 15 minutes après injection, les animaux ont été sacrifiés. Le sang a été récupéré et les concentrations de SPIONs dans différents organes ont été mesurées. Le sang a été centrifugé pour récupérer le sérum et les différentes PCs ont été quantifiées à la surface des NPs. En parallèle, les NPs ont été incubées dans du sérum de rat (2,8 mL par m² de PVA-SPIONs) pour comparer la PC *in vitro* et *in vivo* (Figure A.IV-3-a).

Les PVA-SPIONs avaient toutes les mêmes tailles hydrodynamiques avec des chimies de surface relativement identiques. En revanche (Figure A.IV-3-b), leurs charges différaient et leurs biocirculation 15 minutes après injection laissait apparaître qu'il ne restait que 43% des NPs positives dans le sang quand il restait plus de 83% de la dose injectée pour les deux autres SPIONs. Les NPs neutres et négatives semblent donc avoir la même biocirculation. En revanche, le nombre de protéines trouvées *in vivo* à la surface de ces NPs était assez différent avec 20 protéines pour les SPIONs neutres et 15 pour les SPIONs négatives. Les SPIONs positives, quant à elles, ont adsorbé environ 14 protéines différentes, nombre très proche des SPIONs négatives et toutes ces protéines trouvées sur ces deux PVA-SPIONs étaient aussi présentes sur les PVA-SPIONs neutres. Il a donc été compliqué de mettre en évidence une protéine (ou un cocktail de protéines) responsables des différentes biocirculations.

En revanche, bien que du sang *in vivo* et du sérum ne peuvent pas être 100% comparables, des premières observations ont quand même mis en avant la très grande variabilité entre les mesures *in vitro* et *in vivo*. La taille des protéines représentées pour les PVA-SPIONs chargées positivement en Figure A.IV-3-b montre une proportion bien plus importante de petites protéines (inférieures à 30 kDa) trouvées à la surface de ces NPs par rapport aux protéines trouvées après incubation dans le sérum qui elles étaient plutôt majoritairement comprises entre 30 et 50 kDa. En comparant les PCs (Figure A.IV-3-c), il apparaît une très grande disparité entre les protéines trouvées *in vitro* et *in vivo* avec très peu de protéines en commun respectivement 10, 12 et 2 pour les PVA-SPIONs positives, neutres et négatives. Là encore, les différences sont très prononcées entre les NPs chargées négativement et neutres bien que leurs biodistributions semblaient identiques.

Interactions entre protéines et nanoparticules: la "protein corona"

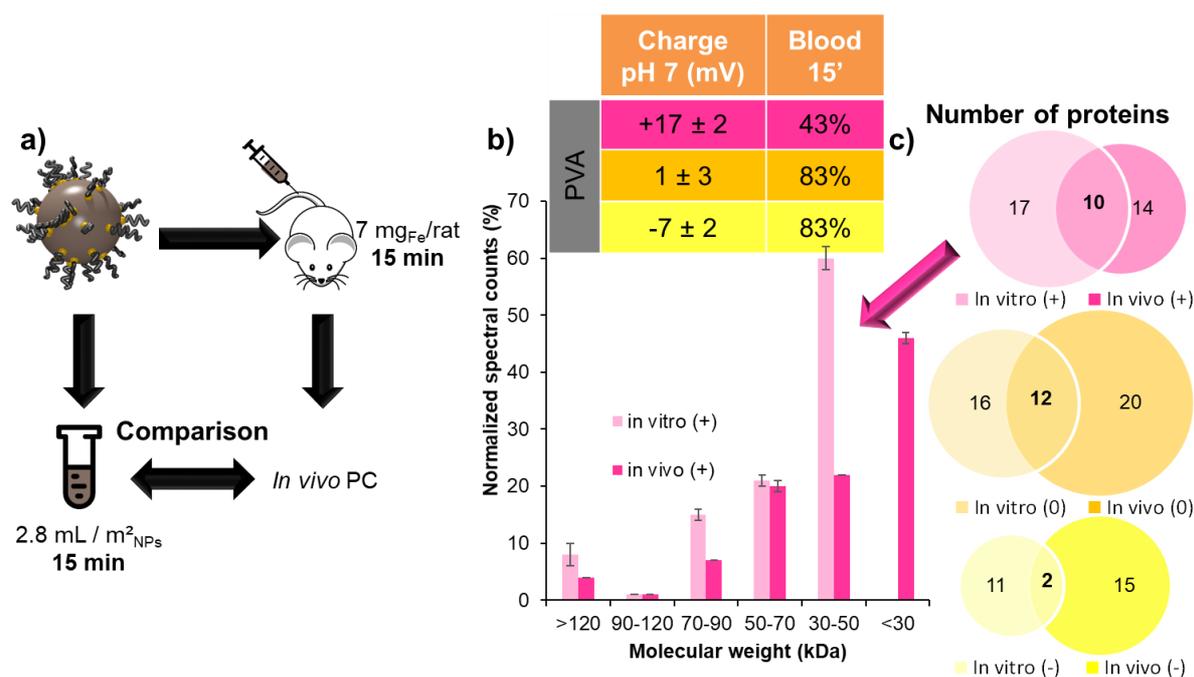


Figure A.IV-3 : **Comparison de la PC *in vitro* et *in vivo*.** a) PVA-SPIONs injectées dans du sérum de rat 15 min et dans un rat pendant 15 min ; b) caractérisations des différents PVA-SPIONs et exemple des proportions de protéines trouvées *in vitro* et *in vivo* sur des PVA-SPIONs chargées positivement et c) nombre de protéines trouvées en commun et seulement *in vitro* ou *in vivo* sur les 3 types de PVA-SPIONs (positives (+), neutres (0) et négatives (-)) (Sakulkhu et al. 2014b)

Cette étude réalisée à l'EPFL avec les hôpitaux universitaires de Genève (Sakulkhu et al. 2014b) a été une première mondiale se concentrant sur l'analyse *in vivo* du rôle de la protein corona sur la biocirculation des NPs. Il a été possible de montrer de manière très réaliste que la protein corona est clairement différente et influencée par la chimie de surface des NPs injectées. Le nombre de protéines différentes pourrait permettre une plus grande biocirculation mais l'absence de différences dans la biodistribution entre les PVA-SPIONs neutres et positives semble contredire cette affirmation. Il est clair que cette étude n'était que préliminaire car ne testant qu'un court temps d'incubation sujet à de grandes variabilités expérimentales et manquant de répliques en faisant une étude certes pionnière mais également incomplète qu'il a fallu et faudra améliorer. Enfin, il faut noter que les différences très importantes observées entre les mesures *in vitro* et *in vivo* apportent de nombreuses interrogations quant aux études sur la toxicité cellulaire reliant les interactions protéiniques *in vitro* par rapport à leurs transpositions *in vivo*.

Lors d'une étude plus récente, l'optimisation de la publication précédente a été réalisée au sein du laboratoire ICB en collaboration avec le Centre Georges-François Leclerc. Pour cela, les biocirculations de PVA-SPIONs positives, neutres et négatives avec deux longueurs de chaînes (12 et 31 kDa) ont déjà été testées. Ces NPs avaient la même taille hydrodynamique et des charges différentes (Figure A.IV-4-a). Ces PVA-SPIONs ont ensuite été injectées dans des rats (Wistar femelles 210-230 g) et 200 µL de sang ont été prélevés sur 7 temps entre 5 et 240 minutes après injection et les concentrations de NPs ont été mesurées (en duplicatas) par susceptibilité magnétique (Maurizi et al. 2014c). Les données ont permis

Interactions entre protéines et nanoparticules: la "protein corona"

de tracer une courbe de biocirculation pour les trois types de NPs (Figure A.IV-4-b). Les résultats ont permis d'affiner les valeurs trouvées lors de la partie précédente. Ainsi, les demi-vies de biocirculation des PVA-SPIONs sont respectivement de 5, 90 et 30 minutes pour les charges positives, neutre et négatives quel que soit le poids moléculaire du PVA démontrant que les comportements des NPs neutres et négatives étaient plus différents qu'initialement observés.

Les protéines ont ensuite été analysées en triplicatas à différents temps post-injection en fonction des demi-vies de biocirculation trouvées. Pour les PVA-SPIONs positives, les PCs ont été quantifiées 5 et 15 minutes après injection ; pour les PVA-SPIONs neutres 5, 30 et 90 minutes après et pour les négatives 5, 15 et 30 minutes après injection. En premier lieu, les résultats préliminaires des PVA-SPIONs 31 kDa sont présentés en Figure A.IV-4-c. Le nombre de protéines trouvées 5 minutes après injection sur ces NPs laisse apparaître la même tendance : plus les NPs circulent longtemps, plus leur PC précoce est composée de protéines variées.

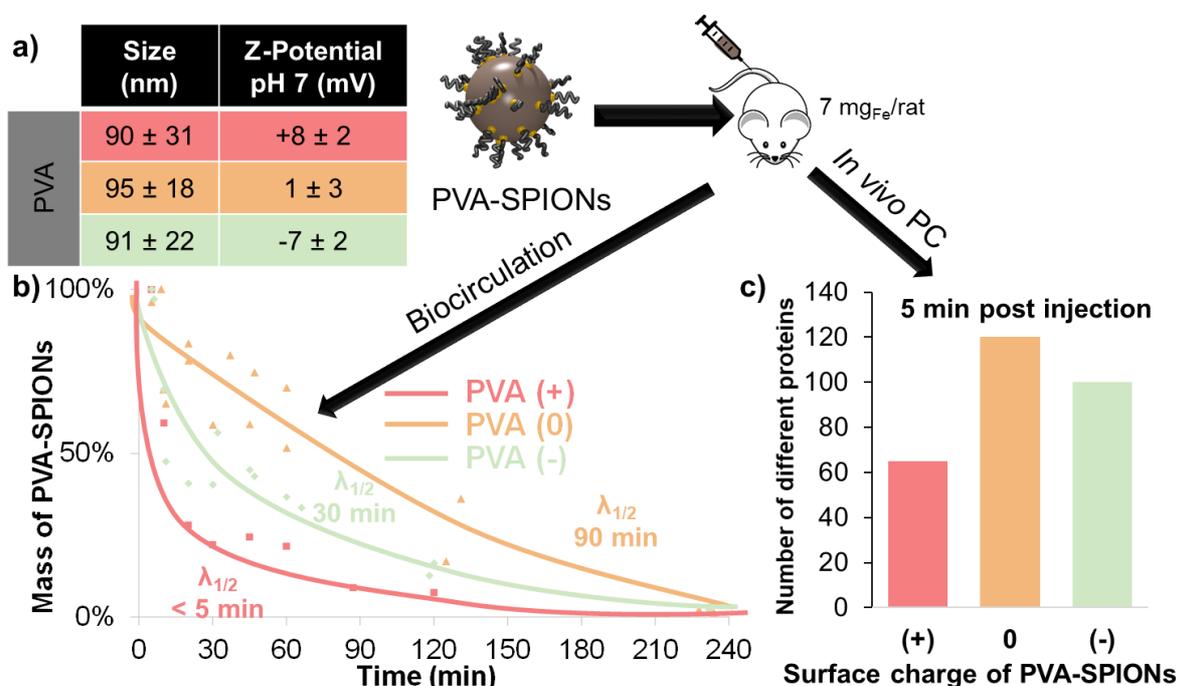


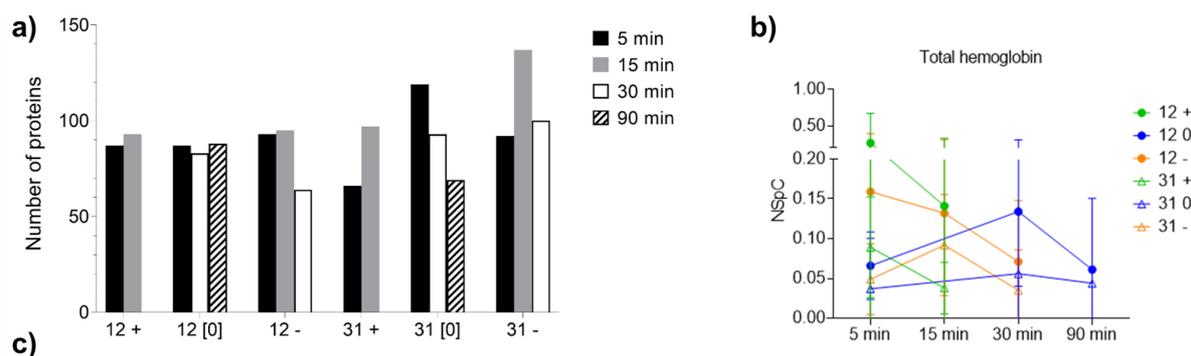
Figure A.IV-4 : Etudes préliminaires de l'influence des charges de PVA-SPIONs 31 kDa sur la biocirculation sanguine et sur la PC in vivo. a) caractérisations des PVA-SPIONs utilisées ; b) biocirculation des différents PVA-SPIONs dans le sang avec leur demi-vie ($\lambda_{1/2}$) et c) nombre de protéines trouvées à la surface des PVA-SPIONs en fonction de leur charge

Cette quantité de protéines précoces trouvées en surface des différentes PVA-SPIONs 31 kDa n'est plus la tendance générale après plusieurs minutes de circulation dans le sang. La variabilité du modèle *in vivo* couplée au grand nombre de données apportent une complexité dans l'analyse des résultats. Pour l'ensemble des PVA-SPIONs, la distribution du nombre de protéines est très aléatoire (Figure A.IV-5-a) et laisse penser que ce n'est clairement pas leur nombre qui définit le comportement biologique mais plutôt la composition de la PC et son évolution dans le temps. Bien que leurs biocirculations soient scrupuleusement identiques, le

Interactions entre protéines et nanoparticules: la "protein corona"

nombre de protéines et l'évolution dans le temps des PVA-SPIONs 12 et 31 kDa ne confirment pas facilement une adsorption de PC comparable.

En regardant un peu plus en détails, il semblerait (Figure A.IV-5-b) que l'hémoglobine pourrait être une des protéines d'intérêt qui pourraient accélérer l'élimination des PVA-SPIONs par le RES. Cette protéine seule ne peut pas expliquer les grandes différences de biocirculation mais pourrait être une des clés de la compréhension de ce comportement biologique. En revanche le fait que cette protéine ne soit pas présente normalement dans le sang peut être aussi une des raisons pour laquelle les PVA-SPIONs positives sont moins circulantes.



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

Figure A.IV-5 : **Influence des chimies de surface et de la cinétique sur la formation de protein corona sur PVA-SPIONs.** a) nombre de protéines trouvées sur les différentes PVA-SPIONs à différents temps post-injection ; b) distribution dans le temps de l'hémoglobine sur les différentes PVA-SPIONs et c) liste de protéines semblant influencer la rétention des NPs dans la circulation sanguine. (Marques et al. 2023)

En se concentrant sur l'analyse statistique de tous les résultats et grâce aux triplicatas effectués, il a été possible de sortir un cocktail de 24 protéines possiblement responsables des circulations des PVA-SPIONs (Figure A.IV-5-b). Les protéines telles que osteopontin, lipoprotéine lipase, coagulation factor VII, matrix Gla protein, secreted phosphoprotein 24, alpha 2H glycoprotein et apolipoprotein C-I ont été trouvées en très haute concentrations dans les NPs ayant une longue biocirculation quand l'hémoglobine subunit beta a été trouvée sur les NPs circulant moins longtemps.

Il est important de noter que l'analyse des protéines est une analyse semi-quantitative permettant de connaître une concentration relative d'une protéine. Notre protocole a permis de travailler à concentrations de NPs constantes mais il serait tout de même intéressant de quantifier de manière plus précise les concentrations de ces protéines clés pour mieux comprendre leur rôle dans la biocirculation. De plus, la variabilité des modèles *in vivo* laisse encore apparaître un besoin d'un meilleur contrôle des conditions expérimentales.

A.IV.3. L'importance de la standardisation et de la reproductibilité avec la protein corona

Durant les quelques études résumées précédemment dans cette partie, il est apparu que les analyses fines de la protein corona dans des système complexes (notamment *in vivo*) apportent beaucoup de biais dus à l'environnement étudié mais aussi aux mesures elles-mêmes. Ce deuxième inconvénient peut être en partie corrigé avec une mise en place rigoureuse de méthodes reproductibles et semi-automatisées. En premier lieu, un réacteur magnétique a été développé au sein du groupe de l'EPFL avec lequel j'ai travaillé (Steitz et al. 2007) permettant de piéger les SPIONs pour séparer les molécules ou les protéines à leur surface. Le désavantage est bien sûr la nécessité d'utiliser des NPs magnétiques mais dans le cadre de mes études, l'utilisation des SPIONs avait déjà été décidée notamment pour cette simplicité de séparation.

La Figure A.IV-6-a présente le réacteur magnétique schématisé utilisé lors de toutes les études réalisées. Après incubation *in vitro* dans du sérum (comme en partie A.IV.1) ou *in vivo* (partie A.IV.2), le fluide comportant des NPs avec une PC et des protéines libres est chargé dans un tube FEP (fluorinated ethylene propylene) de 500 μ L possédant un fil métallique (Fe/Ni) logé au centre d'un réacteur composé de plusieurs aimants néodymes. Après chargement, le système est lavé avec du PBS avec différentes concentrations de NaCl pour éliminer les protéines en suspension et éluer celles non fortement liées à la surface des NPs (Figure A.IV-6-b). Les protéines fortement adsorbées à la surface des NPs sont communément nommées la « hard corona » (Hoang et al. 2022) à mettre en opposition à la « soft corona » qui elle peut se désorber et semble moins influencer les comportements biologiques des NPs (Winzen et al. 2015). Une fois lavées, les NPs sont récupérées et leurs protéines sont ensuite analysées en LC MS/MS (Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry) après avoir été séparées par électrophorèse sur gel (SDS-PAGE).

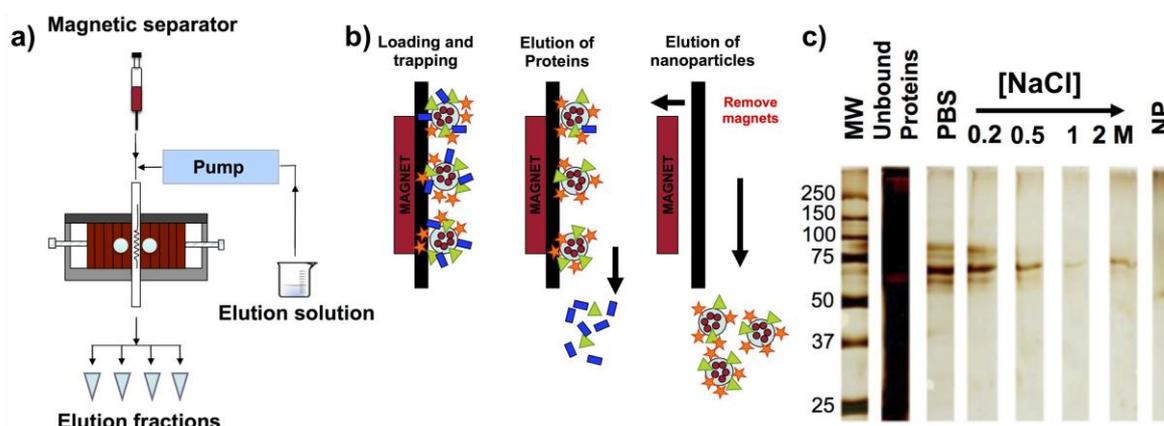


Figure A.IV-6 : **Méthode magnétique pour séparer les protein coronas (PCs) sur les NPs.** a) réacteur magnétique pour éluer les protéines faiblement adsorbées sur les NPs ; b) schéma de l'élution de ces protéines pendant la captation des NPs magnétiques avec leurs protein coronas et c) gels de SDS-PAGE marqué à l'argent sur des PVA-SPIONs négatives à plusieurs étapes d'élution (Sakulkhu et al. 2014a)

Interactions entre protéines et nanoparticules: la “protein corona”

En Figure A.IV-6-c, les protéines trouvées et séparées par SDS-PAGE sont présentées après différentes étapes d'éluion. Les lavages ont été effectués avec du PBS auquel du NaCl a été ajouté pour obtenir différentes concentrations de 0, 0,2 ; 0,5 ; 1 et 2M. L'observation des protéines marquées à l'argent démontre que sans lavage, la quantité de protéines est trop élevée pour observer une adsorption significative sur les NPs. Les différents lavages ont permis d'éliminer les protéines en excès (surtout la soft corona) en augmentant la concentration de NaCl jusqu'à 2M pour retrouver uniquement la hard corona des NPs. Ainsi, pour toutes les analyses de PC, la méthode de lavage choisie a été de 10 volumes de colonne (5 mL à 1 mL/min) avec du PBS 1X classique et 10 volumes de colonnes (5 mL à 1 mL/min) avec du PBS 1X et du NaCl à 2M, éluion contrôlée par pompe à seringue.

Cette méthode de purification de la PC peut rester à optimiser notamment car même si la séparation magnétique semble meilleure que la centrifugation classiquement utilisée avec les NPs (Bonvin et al. 2017), il reste encore des incertitudes quant à la véracité de l'utilisation de fort taux de NaCl pour sélectionner la hard corona alors que ces concentrations n'existent pas dans le vivant. La question de la compétition entre les protéines et la potentielle cinétique de désorption et ré-adsorption des protéines n'ont aussi pas été étudiées avec cette méthode de lavage assez extrême. Il reste donc de nombreuses questions à traiter dans le cadre de futurs projets sur la protein corona (partie A.VI.2).

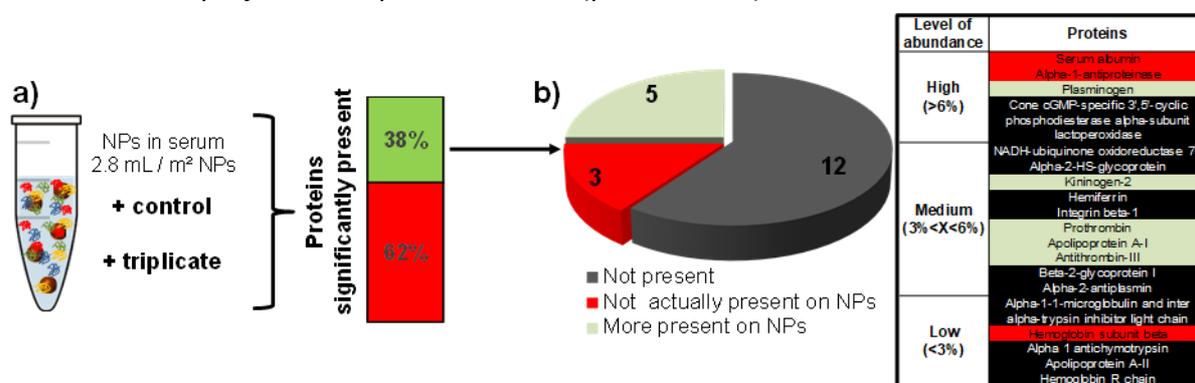


Figure A.IV-7 : **Importance de la reproductibilité et du contrôle sur les analyses de PC.** a) proportion des protéines trouvées à la surface des NPs significativement et statistiquement présentes et b) distribution des 20 protéines les plus présentes dans le sérum (Galmarini et al. 2018)

Dans une dernière étude présentée en partie en A.IV.1, en plus du rôle des petits groupements de surface sur l'adsorption des protéines, l'impact de la reproductibilité et du contrôle sur la protein corona a été analysé. En effet, l'objectif principal a été de regarder les protéines statistiquement présentes et cela grâce à des expériences et analyses réalisées systématiquement en triplicatas. Bien qu'un protocole expérimental soit la base de toute démarche scientifique, l'utilisation de répliques ne semblait pas être la norme dans cette discipline. Cela peut être dû au coût assez important de chaque analyse par LC MS/MS. Dans notre cas, en incubant des Silica@PVA-SPIONs en triplicatas dans du FBS, nous avons trouvé

que seulement 38% des protéines trouvées étaient statistiquement présentes faisant passer le nombre de protéines d'intérêt de 269 à 102 (Figure A.IV-7-a).

Sur ces 38% de protéines statistiquement présentes, comme lors de la partie A.IV.1, les résultats se sont concentrés sur les 20 protéines les plus abondantes du sérum. Avec les études statistiques, seulement 8 de ces 20 protéines ont été trouvées comme ayant une interaction spécifique avec une des conditions étudiées. De plus, 3 de ces 8 protéines ont été retrouvées en plus grande quantité sur le tube FEP du réacteur que sur les NPs testées. Parmi ces protéines, l'albumine, protéine de loin la plus abondante dans le sang n'est donc pas retrouvée sur nos NPs. Un des principaux freins à la compréhension de la protein corona est la quantité très importante de protéines trouvées sur les NPs. Cette méthode a donc démontré qu'avec un traitement statistique et un contrôle adaptés, il serait possible d'éliminer une partie des données pour simplifier les analyses des protéines.

Il est évident que toutes les NPs n'auraient pas le même comportement mais l'absence de contrôle dans de nombreuses études sur la PC laisse penser qu'une mise en place plus rigoureuse et standardisée des méthodes de séparation et d'analyses pourrait aider à améliorer la compréhension de ces phénomènes. Il faut aussi noter que quand des centaines de protéines sont trouvées, celles-ci ne sont pas toutes présentes à la surface d'une même NP créant une illusion de PC moyenne à leur surface (Forest and Pourchez 2016). Tous ces prochains défis pour l'observation des interactions entre les protéines et la surface des NPs peuvent donc s'améliorer avec les recommandations précédentes mais dans le cadre d'études fondamentales plutôt *in vitro* ; les expériences *in vivo* apportant beaucoup plus de variabilités inhérentes aux modèles étudiés.

A.IV.4. Conclusion sur la protein corona

Dans cette dernière partie, les interactions entre les protéines plasmatiques du sérum et la surface des NPs ont été étudiées. La grande complexité des résultats obtenus a été simplifiée pour des soucis de compréhension. Ils ont surtout été présentés pour illustrer les points importants à prendre en compte avec la PC et sur lesquels j'aimerais me concentrer lors de mes futurs projets de recherche.

La protein corona peut être divisée en trois disciplines consistant à :

1. Etudier de manière fondamentale les mécanismes impliqués dans cette adsorption surfacique
2. Quantifier le rôle de la chimie de surface sur l'affinité des protéines *in vitro* et plus rarement *in vivo*.
3. Comprendre le rôle des protéines sur les comportements biologiques de ces NPs.

Dans mon cas, de par mes compétences plus expérimentales et d'ingénierie, les deux derniers aspects seulement ont été étudiés pour le moment et résumés dans les trois parties précédentes:

1. Dans un premier temps, le rôle de la chimie de surface avec différents métaux ou des petits groupements provenant de molécules stabilisantes a été étudié. Il a été démontré que la charge semblait avoir une influence plus importante que les fonctions COOH, OH ou SH mais que ces groupements avaient tout de même une affinité forte avec près d'un tiers des protéines trouvées.
2. Dans une deuxième partie, la PC *in vivo* et son influence sur la biocirculation de PVA-SPIONs ont été étudiées. Le rôle de la charge de surface mais pas de la longueur de chaîne du PVA a été démontré. Malgré la complexité des paramètres biologiques pouvant influencer les résultats, une analyse statistique poussée a permis de faire apparaître 24 protéines semblant jouer un rôle crucial dans la biocirculation des NPs.
3. Enfin, l'importance cruciale de la mise en place de méthodes standardisées pour la séparation et l'analyse de la PC a été démontrée. Préparer, quand cela est possible, des répliques et utiliser un contrôle permettrait de réduire drastiquement le nombre de protéines trouvées et ainsi simplifier les conclusions.

Ce que je trouve le plus intéressant dans la discipline de la protein corona et qu'elle apporte souvent plus de questions que de réponses. Ainsi, des nombreux paramètres pourraient encore être étudiés comme (entre autres) :

- La standardisation des méthodes de mesures des protéines en essayant, par exemple, d'être de plus en plus automatisé tout en gardant à l'esprit l'aspect reproductibilité et répétabilité des méthodes. L'aspect cinétique de l'adsorption des protéines semble être aussi un paramètre à étudier.
- Se concentrer sur les interactions avec les protéines plasmatiques car le sang reste le fluide le plus en contact avec les NPs (comme présenté en partie A.III.2.2). Malgré la complexité de ce système biologique, essayer de rester *in vivo* paraît être aussi une approche cruciale à la compréhension et au contrôle du phénomène.
- Contrôler la protein corona en utilisant les données obtenues pour fonctionnaliser les NPs. Ces nanohybrides devenant ainsi biomimétiques avec potentiellement des comportements nouveaux (plus ciblant ou plus circulant par exemples) avec moins de toxicité.

Ces points seront présentés dans la Partie A.VI dans le cadre des futurs projets de recherche envisagés.

Les projets, encadrements et publications principaux sont résumés ci-dessous.

Projets associés

- Projet ANR Nanoblorona (2022-2026)
- Projet Régional ANER : Nanoprot (2019-2022)
- Projet Stanford : Collaborative Research (2020-2022)
- Projet Imappi (2019-2020)
- Projet Européen FP7 Nanodiara (2010-2014)

Encadrements principaux associés

- Dorra Ben Elkadhi (03/23 – en cours) ; Thèse de doctorat : *Nanoparticules dans le sang: optimisation et contrôle de la protein corona*
- Célia Marets (09/19- en cours) ; Thèse de doctorat : *Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules (NPs) pour l'étude des interactions NPs-protéines*
- Dr. Usawadee Sakulkhu (09/09-05/13) ; Thèse de doctorat : *Preparation of coated nanoparticles and investigation of their behavior in biological environment*
- Sullivan Guy (02/21-06/21) ; Stage de Master 2 : *Studies and control of the surface chemistry of nanoparticles for better interaction with proteins*
- Dihia Refsi (02/19-07/19) ; Stage de Master 2 : *Nanoparticules d'oxyde de fer pour applications biomédicales : Influence de la chimie de surface sur leurs comportements biologiques*

- Victoire Asila (02/18-07/18) ; Stage de Master 2: *Nanoparticules d'oxydes de fer pour l'imagerie médicale et la thérapie : synthèse, fonctionnalisation et étude de biocirculation*
- Manon Giraud (09/14-01/15) ; Projet de Master 2: *Investigation of the proteins affinity for negatively charged Silica-coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*
- Noëlie Cayla (03/14-08/14) ; Stage de Master 2: *Investigation of the protein affinity of negatively charged Silica-coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*

Collaborations principales associés

- CHU et CGFL de Dijon
- Hôpitaux HuGe Genève, Suisse
- Professeur Daldrup-Link Lab, School of Medicine, Stanford, USA
- Université de Genève, Suisse

Publications principales

- *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 and **L. Maurizi***, *Nanoscale Advances*, 3, 1209-1229, **2021** (DOI: [10.1039/D0NA00863J](https://doi.org/10.1039/D0NA00863J))/ **Inside front cover:** (DOI: [10.1039/D1NA90021H](https://doi.org/10.1039/D1NA90021H))
- *Anti-Platelet Effect Induced by Iron Oxide Nanoparticles: Correlation with Conformational Change in Fibrinogen*, R. K. Kottana, **L. Maurizi**, B. Schnoor, K. Morris, J. A. Webb, M. A. Massiah, N. Millot and A.-L. Papa, *Small*, 17 (1), 2004945, **2021** (DOI: [10.1002/smll.202004945](https://doi.org/10.1002/smll.202004945)) / **Back cover:** (DOI: [10.1002/smll.202170003](https://doi.org/10.1002/smll.202170003))
- *Beyond unpredictability: the importance of reproducibility in understanding the protein corona of nanoparticles*, S. Galmarini, U. Hanusch (ex Sakulkhu), M. Giraud, N. Cayla, D. Chiappe, N. von Moos, H. Hofmann and **L. Maurizi***, *Bioconjugate Chem.*, 29 (10), 3385-3393, **2018** (DOI: [10.1021/acs.bioconjchem.8b00554](https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00554))
- *Significance of surface charge and shell material of Super-paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) based core/shell nanoparticles on the composition of the protein corona*, U. Sakulkhu, M. Mahmoudi, **L. Maurizi**, G. Coullerez, M. Hofmann-Antenbrink, M. Vries, M. Motzacker, F. Rezaee and H. Hofmann, *Biomater. Sci.*, 3, (2), 265-278, **2015** (DOI: [10.1039/C4BM00264D](https://doi.org/10.1039/C4BM00264D)) / **Inside front cover** (DOI: [10.1039/C5BM90006A](https://doi.org/10.1039/C5BM90006A))
- *Ex situ evaluation of the composition of protein corona of intravenously injected superparamagnetic nanoparticles in rats*, U. Sakulkhu, **L. Maurizi**, M. Mahmoudi, M. Motzacker, M. Vries, A. Gramoun, M.-G. Ollivier Beuzelin, J.-P. Vallée, F. Rezaee and H. Hofmann, *Nanoscale*, 6, (19), 11439-11450, **2014** (DOI: [10.1039/C4NR02793K](https://doi.org/10.1039/C4NR02793K))
- *Protein Corona Composition of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Various Physico-Chemical Properties and Coatings*, U. Sakulkhu, M. Mahmoudi, **L. Maurizi**, J. Salaklang and H. Hofmann, *Scientific Reports*, 4, 5020, **2014** (DOI: [10.1038/srep05020](https://doi.org/10.1038/srep05020))

Partie A.V. Conclusion générale et résumé sur les activités de recherche

Conclusion générale et résumé sur les activités de recherche

Ce rapport résume les activités de recherches les plus significatives menées depuis le doctorat et se situant toujours à l'interface entre les nanomatériaux et le monde biologique. Elles sont regroupées en quatre parties interconnectées (résumées en Figure A.V-1) :

1. **Synthèse de NPs pour applications biomédicales** : le cœur de mes compétences. Une variété de NPs, principalement métalliques, ont été synthétisées et fonctionnalisées avec des molécules biocompatibles. La caractérisation fine de la chimie de surface est une compétence importante notamment pour l'étude à l'interface NPs / milieu biologique. De par ma formation d'ingénieur en génie des procédés, des protocoles et des méthodes de synthèses (notamment en continu) ont été développés avec comme objectifs la reproductibilité, la répétabilité et la diminution de la variabilité physicochimique évitant les biais lors des études biologiques.
2. **SPIONs pour imagerie médicale**. Les NPs les plus utilisées lors de mes projets sont les oxydes de fer superparamagnétiques (SPIONs). Leurs propriétés particulières les rendent utilisables dans l'imagerie par résonance magnétique (IRM) soit par injection directe soit par marquage (passif ou actif) de macrophages ou cellules souches. Différentes fonctionnalisations des SPIONs ont été étudiées en IRM. Les PEGs ou les PVA n'ont pas montré de toxicité à l'exception d'une petite inflammation précoce. En revanche, la chimie de surface influence la biodistribution des NPs notamment la captation hépatique. Un agent bimodal de SPIONs couplées à du ^{64}Cu a été développé pour être testé sur un imageur IRM couplé PET.
3. **Interactions biologiques des SPIONs**. Différents tests cellulaires allant de la cytotoxicité au stress oxydant et à la réponse inflammatoire ont été mis en place. Là où la fonctionnalisation des SPIONs avec du PEG ne semble pas influencer ces réponses biologiques, le PVA semble, en revanche, entraîner la production de cytokines, marqueurs de l'inflammation. La chimie de surface a aussi démontré son rôle dans l'internalisation cellulaire. Enfin, des tests d'hémolyse ont démontré que le PVA retardait l'agrégation plaquettaire sans doute à cause de leur interaction avec du fibrinogène.
4. **La Protein Corona** : thématique principale de ma future recherche. Les différences observées entre les interactions biologiques *in vivo* et *in vitro* testées peuvent s'expliquer par l'adsorption des protéines à la surface des NPs. La protein corona (PC) est influencée par la chimie de surface et plus particulièrement la charge. *In vivo* (une première mondiale), cette PC influence la biocirculation des SPIONs. Enfin, il est primordial de mieux mettre en place les protocoles d'analyses et de séparation de la PC pour être plus reproductible et statistiquement représentatif des phénomènes mesurés.

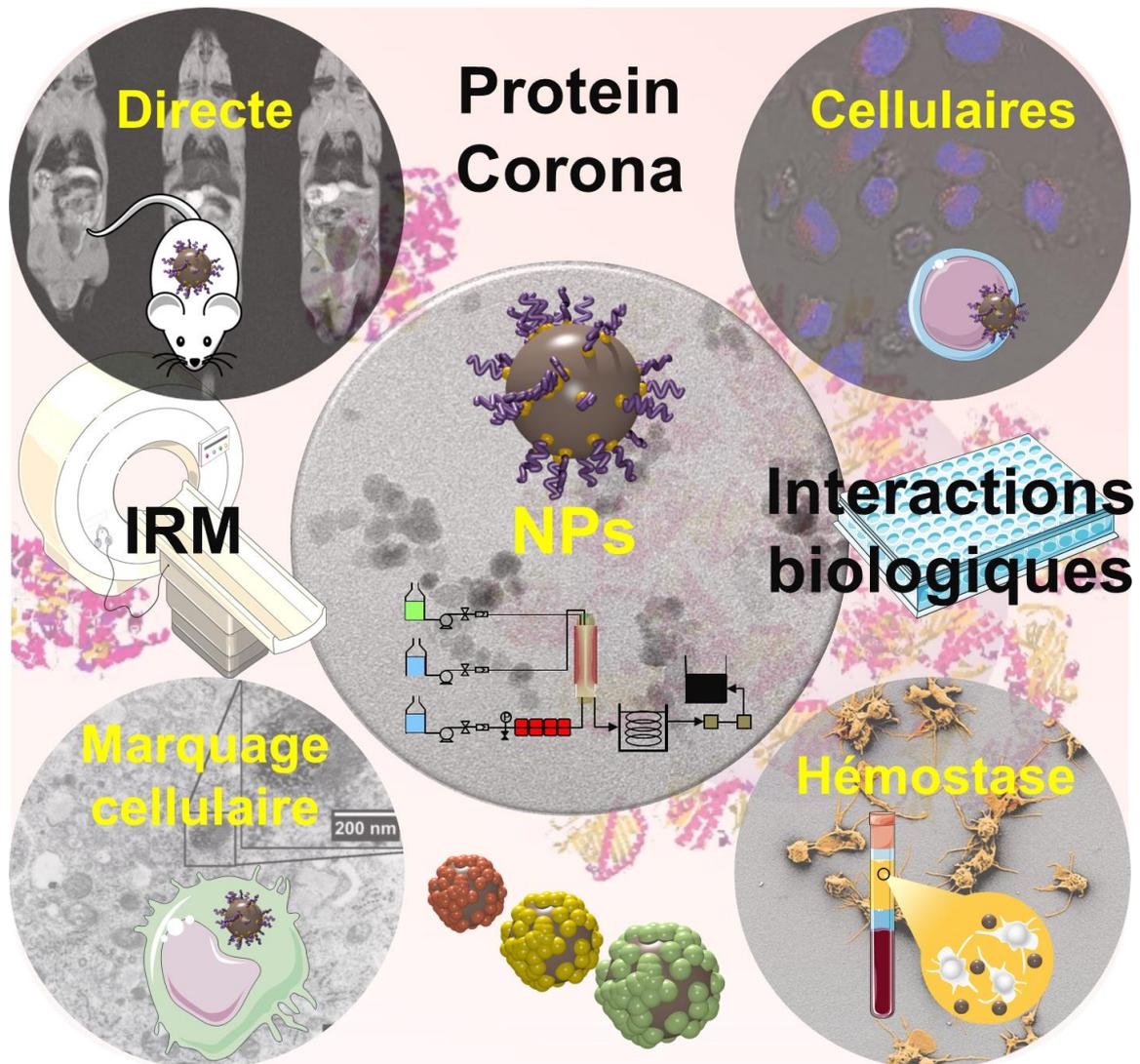


Figure A.V-1 : Résumé schématique des projets de recherche menés depuis le doctorat.

Travailler dans des environnements interdisciplinaires à l'interface entre les sciences des matériaux, la biologie et la médecine demande de l'humilité mais aussi de s'entourer de personnes compétentes avec qui des relations de confiance peuvent être nouées. Tous les projets que j'ai pu mener ont toujours été une force pour l'évolution de ma compréhension des phénomènes physicochimiques et biologiques influençant les comportements des NPs. J'ai eu la chance et l'honneur d'avoir pu travailler avec de nombreux collègues dont certains sont même devenus des amis. Les principaux groupes présentés dans ce rapport sont résumés en Figure A.V-2. Sans leurs compétences, leurs conseils et leur écoute, les projets résumés précédemment n'auraient pas pu être réalisés.

Conclusion générale et résumé sur les activités de recherche

Collaborations (par ordre alphabétique)		Lieu	Principaux projets	Parties
	Bio-peroxIL	<i>Dijon France</i>	Tests cellulaires	A.III.1
	CGFL	<i>Dijon France</i>	Imagerie médicale bimodale Protein Corona <i>in vivo</i>	A.I.2 ; A.II.1 A.IV.2
	Charité	<i>Berlin Allemagne</i>	Tests sur cellules immunitaires humaines Marquage cellules souches	A.II.2 A.III.2
	CHU Dijon	<i>Dijon France</i>	Imagerie médicale	A.I.2 ; A.II.1 A.IV.2
	EPFL	<i>Lausanne Suisse</i>	Scale-up Protein Corona	A.I ; A.II A.III ; A.IV
	HUG	<i>Genève Suisse</i>	Imagerie médicale Protein Corona <i>in vivo</i>	A.II.2 A.IV.2
	ICB	<i>Dijon France</i>	Synthèse hydrothermale Scale-up	A.I ; A.II A.III ; A.IV
	ICMUB	<i>Dijon France</i>	Fonctionnalisation Marquage radioactif	A.I.2
	L'institut Agro Dijon	<i>Dijon France</i>	Tests cellulaires Contrôle positif de NPs en nanotoxicologie	A.III.1
	Nanotec	<i>Pathum Thani Thailand</i>	Fonctionnalisation de NPs	A.I.1
	NVH Medicinal	<i>Dijon France</i>	Imagerie Médicale Tests cellulaires	A.II.1 A.III.1
	Radboud University	<i>Nijmegen Pays Bas</i>	Imagerie médicale Toxicologie	A.II.2
	Stanford Medicine	<i>Stanford USA</i>	Imagerie médicale Protein Corona <i>in vivo</i>	A.II.1 A.IV.2
	The George Washington University	<i>Washington USA</i>	Influence des NPs l'hémolyse	A.III.2
	Université de Genève	<i>Genève Suisse</i>	Protein Corona	A.IV

Figure A.V-2 : *Collaborations établies et avec lesquelles les principales activités de recherche ont été réalisées.*

Enfin, avec ma formation universitaire, mes compétences étaient majoritairement centrées sur la chimie et les (nano)matériaux. A la suite de mes expériences en thèse puis en tant que chercheur à l'étranger et enfin depuis mon retour en France au CNRS, ces compétences se sont enrichies avec des connaissances sur l'imagerie médicale, les interactions biologiques des NPs et surtout sur la protein corona (Figure A.V-3). Mes compétences en synthèses de NPs ont tout de même beaucoup évoluées tout au long de mes expériences de recherche mais je me suis plus tourné vers l'optimisation des protocoles de synthèse et le scale-up pour aller plus rapidement vers la biologie. Les développements des NPs se font toujours avec les exigences biologiques et médicales c'est-à-dire avec des matériaux biocompatibles, des suspensions reproductibles et également avec suffisamment de quantité pour des études *in vivo*. J'ai aussi beaucoup orienté ces synthèses pour optimiser la compréhension de leurs interactions avec les protéines et plus précisément celles plasmatiques.

Conclusion générale et résumé sur les activités de recherche

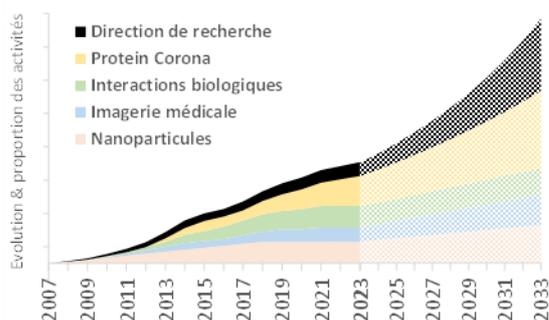


Figure A.V-3 : **Evolution des activités des recherches depuis le doctorat et pour les prochaines années.**

Mes compétences d'encadrement et de gestion de projets ont également progressé au fil des différents projets et étudiant(e)s que j'ai eu la chance de rencontrer et d'encadrer. Depuis mon passage à l'EPFL, la protein corona est une discipline qui me fascine et sur laquelle j'essaie toujours de lier la plupart de mes projets de recherche incluant NPs et applications biomédicales. Je souhaiterais, dans le futur et après cette

HDR, gagner en autonomie pour continuer d'approfondir, principalement, ce sujet en dirigeant un groupe des différentes cultures (matériaux, biologie, pharmacie) avec comme but ultime : la nanomédecine personnalisée (Figure A.V-3).

A.V.1. Articles principaux des activités de recherche

- *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 and **L. Maurizi***, *Nanoscale Advances*, 3, 1209-1229, **2021** (DOI: [10.1039/D0NA00863J](https://doi.org/10.1039/D0NA00863J))/ **Inside front cover**: (DOI: [10.1039/D1NA90021H](https://doi.org/10.1039/D1NA90021H)) [hal-03132542v1](#)
- *Anti-Platelet Effect Induced by Iron Oxide Nanoparticles: Correlation with Conformational Change in Fibrinogen*, R. K. Kottana, **L. Maurizi**, B. Schnoor, K. Morris, J. A. Webb, M. A. Massiah, N. Millot and A.-L. Papa, *Small*, 17 (1), 2004945, **2021** (DOI: [10.1002/smll.202004945](https://doi.org/10.1002/smll.202004945)) / **Back cover**: (DOI: [10.1002/smll.202170003](https://doi.org/10.1002/smll.202170003)) [hal-03052354v1](#)
- *Efficient quantification by X-ray photoelectron spectroscopy and thermogravimetric analyses of the one-pot grafting of two molecules on the surface of iron oxide nanoparticles*, **L. Maurizi***, F. Sallem, J. Boudon, O. Heintz, H. Bisht, F. Bouyer and N. Millot*, *J. Nanosci. Nanotech.*, 19 (8), 4920-4929, **2019** (DOI: [10.1166/jnn.2019.16796](https://doi.org/10.1166/jnn.2019.16796)) [hal-02163532v1](#)
- *Innovative Magnetic Nanoparticles for PET/MRI Bimodal Imaging*, G. Thomas, J. Boudon, **L. Maurizi**, M. Moreau, P. Walker, I. Severin, A. Oudot, F. Demoisson, F. Denat, S. Poty, C. Goze, F. Brunotte and N. Millot, *ACS Omega*, 4 (2), 2637-2648, **2019** (DOI: [10.1021/acsomega.8b03283](https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03283)) [hal-02068644v1](#)
- *Beyond unpredictability: the importance of reproducibility in understanding the protein corona of nanoparticles*, S. Galmarini, U. Hanusch (ex Sakulkhu), M. Giraud, N. Cayla, D. Chiappe, N. von Moos, H. Hofmann and **L. Maurizi***, *Bioconjugate Chem.*, 29 (10), 3385-3393, **2018** (DOI: [10.1021/acs.bioconjchem.8b00554](https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00554)) [hal-02163525v1](#)

- *Cellular interactions of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles on oligodendrocytes without detrimental side effects: Cell death induction, oxidative stress and inflammation*, S. Sruthi[†], **L. Maurizi^{†*}**, T. Nury, F. Sallem, J. Boudon, J.M. Riedinger, N. Millot, F. Bouyer and G. Lizard*, **Colloids Surfaces B**, 170 (2018), 454-462, **2018** (DOI: [10.1016/j.colsurfb.2018.06.041](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.041)) [hal-02163524v1](#)
- *Superparamagnetic nanohybrids with cross-linked polymers providing higher in vitro stability*, **W. Maneepakorn**, **L. Maurizi**, H. Siriket; T Wutikhun, T. Dharakul and H. Hofmann, **J. Mater. Sci.**, 52 (16), 9249-9261, **2017** (DOI: [10.1007/s10853-017-1098-2](https://doi.org/10.1007/s10853-017-1098-2)) [hal-02163533v1](#)
- *Modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticle surface enables safer human application*, C. Strehl, **L. Maurizi**, T. Gaber, P. Hoff, T. Broschard, A. R. Poole, H. Hofmann and F. Buttgerit, **Int. J. Nanomed.**, 2016 (11), 5883-5896, **2016** (DOI:[10.2147/IJN.S110579](https://doi.org/10.2147/IJN.S110579)) [hal-02163419v1](#)
- *Effects of PVA coated nanoparticles on human immune cells*, C. Strehl, T. Gaber, **L. Maurizi**, M. Hahne, R. Rauch, P. Hoff, M. Hofmann-Antenbrink, A. R. Poole, H. Hofmann and F. Buttgerit, **Int. J. Nanomed.**, 2015 (10),3429-3445, **2015** (DOI: [10.2147/IJN.S75936](https://doi.org/10.2147/IJN.S75936)) [hal-02163408v1](#)
- *The in-vivo use of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles to detect inflammation elicits a cytokine response but does not aggravate experimental arthritis*, E. A. Vermeij, M. B. Bennink, L. Crowe, **L. Maurizi**, J.-P. Vallée, H. Hofmann, P. L.E.M. van Lent, W. B. van den Berg, M. I. Koenders and F. A.J. van de Loo, **PLOS One**, 10 (5), e0126687, **2015** (DOI: [10.1371/journal.pone.0126687](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126687)) [hal-02163369v1](#)
- *Significance of surface charge and shell material of Super-paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) based core/shell nanoparticles on the composition of the protein corona*, **U. Sakulkhu**, M. Mahmoudi, **L. Maurizi**, G. Coullerez, M. Hofmann-Antenbrink, M. Vries, M. Motzacker, F. Rezaee and H. Hofmann, **Biomater. Sci.**, 3, (2), 265-278, **2015** (DOI: [10.1039/C4BM00264D](https://doi.org/10.1039/C4BM00264D)) / **Inside front cover** (DOI: [10.1039/C5BM90006A](https://doi.org/10.1039/C5BM90006A)) [hal-02163361v1](#)
- *Polymer adsorption on iron oxide nanoparticles for one-step amino-functionalized silica encapsulation*, **L. Maurizi***, **A. Claveau** and H. Hofmann, **J. Nanomater.**, 2015 (2015), ID 732719, **2015** (DOI:[10.1155/2015/732719](https://doi.org/10.1155/2015/732719)) [hal-02163428v1](#)
- *Influence of surface charge and polymer coating on internalization and biodistribution of PEG-modified iron oxide nanoparticles*, **L. Maurizi**, A.-L. Papa, L. Dumont, F. Bouyer, P. Walker, D. Vandroux and N. Millot, **J. Biomed. Nanotech.**, 11, (1), 126-136, **2015** (DOI: [10.1166/jbn.2015.1996](https://doi.org/10.1166/jbn.2015.1996)) [hal-02163365v1](#)
- *Amino-polyvinyl alcohol coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles are suitable for monitoring of mesenchymal stromal cells in vivo*, F. Schulze, A. Dienelt, S. Geissler, P. Zaslansky, J. Schoon, K. Henzler, P. Guttman, A. Gramoun, L. A. Crowe, **L. Maurizi**, J.P. Vallée, M. Hofmann, H. Hofmann, G. N. Duda and A. Ode, **Small**,10 (21), 4340-4351, **2014** (DOI: [10.1002/smll.201400707](https://doi.org/10.1002/smll.201400707)) [hal-02163382v1](#)

- *Monitoring the effects of arthritis treatment by MRI in vivo using iron oxide nanoparticle-labeled macrophages*, A. Gramoun, L. A. Crowe, **L. Maurizi**, W. Wirth, F. Tobalem, K. Grosdemange, G. Coullerez, F. Eckstein, M.I. Koenders, W.B. Van den Berg, H. Hofmann and J-P. Vallée, **Arthritis Res. Ther.**, 16 (3), R131, **2014** (DOI: [10.1186/ar4588](https://doi.org/10.1186/ar4588)) **hal-02163410v1**
- *Ex situ evaluation of the composition of protein corona of intravenously injected superparamagnetic nanoparticles in rats*, U. Sakulphu, **L. Maurizi**, M. Mahmoudi, M. Motazacker, M. Vries, A. Gramoun, M.-G. Ollivier Beuzelin, J.-P. Vallée, F. Rezaee and H. Hofmann, **Nanoscale**, 6, (19), 11439-11450, **2014** (DOI: [10.1039/C4NR02793K](https://doi.org/10.1039/C4NR02793K)) **hal-02163344v1**
- *Protein Corona Composition of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Various Physico-Chemical Properties and Coatings*, U. Sakulphu, M. Mahmoudi, **L. Maurizi**, J. Salaklang and H. Hofmann, **Scientific Reports**, 4, 5020, **2014** (DOI: [10.1038/srep05020](https://doi.org/10.1038/srep05020)) **hal-02132125v1**
- *Fast and continuous synthesis of spinel nanostructured iron oxide in supercritical water: influence of cations and citrates*, **L. Maurizi**, F. Bouyer, M. Ariane, R. Chassagnon and N. Millot, **RSC advances**, 4 (86), 45673-45678, **2014** (DOI: [10.1039/C4RA08562K](https://doi.org/10.1039/C4RA08562K)) **hal-02163438v1**
- *Syntheses of cross-linked polymeric superparamagnetic beads with tunable properties*, **RSC Advances**, **L. Maurizi***, U. Sakulphu, L. A. Crowe, N. Leclaire, V. Mai Dao, J.-P. Vallée and H. Hofmann, 4 (22), 11142-11146, **2014** (DOI: [10.1039/C3RA48004F](https://doi.org/10.1039/C3RA48004F)) **hal-02163414v1**
- *One step continuous hydrothermal synthesis of very fine stabilized superparamagnetic nanoparticles of magnetite*, **L. Maurizi**, F. Bouyer, J. Paris, F. Demoisson, L. Saviot and N. Millot, **Chem. Commun.**, 47, (42), 11706-11708, **2011**, (DOI: [10.1039/C1CC15470B](https://doi.org/10.1039/C1CC15470B)) **hal-00638205v1**
- *Synthesis of Titanate Nanotubes Directly Coated with USPIO in Hydrothermal Conditions: A New Detectable Nanocarrier*, A.-L. Papa[†], **L. Maurizi**[†], D. Vandroux, P. Walker and N. Millot, **J. Phys. Chem. C**, 115 (39), 19012-19017, **2011** (DOI: [10.1021/jp2056893](https://doi.org/10.1021/jp2056893)) **hal-00785179v1**
- *Easy Route to Functionalize Iron Oxide Nanoparticles via Long-Term Stable Thiol Groups*, **L. Maurizi**, H. Bisht, F. Bouyer and N. Millot, **Langmuir**, 25, (16), 8857-8859, **2009** (DOI: [10.1021/la901602w](https://doi.org/10.1021/la901602w)) **hal-00447491v1**

Partie A.VI. Projets Scientifiques: Nouvelles Applications Biomédicales & Protein Corona

Partie A.VI. Projets Scientifiques: Nouvelles Applications Biomédicales & Protein Corona	93
A.VI.1. Nouveaux développements nanomédicaux.....	95
A.VI.1.1. Continuer le développement de NPs pour transfert industriel.....	95
A.VI.1.2. Nouvelles applications en imagerie et thérapie	96
A.VI.1.3. Caractériser l'exposition accidentelle aux NPs.....	98
A.VI.2. Standardisation de la mesure de la protein corona	100
A.VI.2.1. Etude fondamentale des interactions protéines / NPs	100
A.VI.2.2. Influence des modèles biologiques sur la protein corona.....	101
A.VI.2.3. Mesure de la protein corona en flux pour se rapprocher du <i>in vivo</i>	102
A.VI.3. Rôle de la protein corona sur les comportements biologiques des NPs.....	104
A.VI.3.1. Rôle de la protein corona sur les interactions des NPs avec le sang.....	104
A.VI.3.2. Influence de la protein corona sur la biodistribution des NPs	105
A.VI.4. Le futur de la nanomédecine: le contrôle de la protein corona ?.....	107
A.VI.4.1. Optimiser la protein corona pour études <i>in vitro</i>	107
A.VI.4.2. Optimiser la PC pour améliorer <i>in vivo</i> les NPs	108
A.VI.5. Conclusion sur les futurs projets de recherche.....	110

Dans la lignée des études menées et présentées dans les parties précédentes, différentes problématiques sont apparues sur lesquelles je souhaiterais poursuivre mes activités de recherche. Elles se concentreront majoritairement sur la compréhension des phénomènes influençant la protein corona et sur son contrôle pour un développement amélioré des nanoparticules en nanomédecine. Ces projets de recherche se feront, comme précédemment, en étroites collaborations avec des chercheurs en sciences biologiques et médicales nationales et internationales.

Avant de détailler ces projets, grâce aux équipes rencontrées lors de mes précédentes expériences professionnelles ainsi que celles à venir, d'autres questionnements et applications sont apparues et seront également présentées dans cette partie. Ainsi, quatre axes de recherches seront proposés dont trois se concentreront sur l'analyse et le contrôle de la protein corona justifiant la conclusion et les perspectives (Partie A.V) de l'orientation future de mes activités de recherche :

1. Des nouvelles applications et collaborations internationales biomédicales seront présentées. L'utilisation des compétences en synthèses et surtout en caractérisations fines des nanoparticules permettra d'amorcer des nouvelles thématiques en nanomédecine.
2. Suite aux premières études d'analyses de la protein corona, la standardisation de son analyse est apparue comme un point crucial à développer. Différentes approches seront proposées pour mieux comprendre les interactions entre protéines et surfaces de NPs.
3. Des nouvelles études, plus approfondies, sur le rôle de la protein corona dans les comportements biologiques des NPs seront menées. Dans le cadre de projets déposés et des collaborations déjà amorcées, une partie de ces projets se concentrera sur les interactions *in vivo*, cette discipline étant toujours peu étudiée.
4. Enfin, l'utilisation de la protein corona pour contrôler les comportements biologiques des NPs sera étudiée. Le but, peut-être un peu utopiste, de cette partie serait de préparer des NPs avec une protein corona contrôlée pour obtenir des nanohybrides optimisés.

A.VI.1. Nouveaux développements nanomédicaux

Une grande partie des compétences acquises lors des différentes expériences scientifiques reposent sur le contrôle des étapes de synthèses et également sur les caractérisations fines des nanoparticules avec, toujours comme objectif final, l'application biomédicale. Les futurs projets que j'aimerais mener me permettront de mettre à profit ces compétences pour notamment continuer de développer des nouveaux nanomatériaux aux propriétés prometteuses tout en expérimentant des nouvelles applications médicales. De plus, j'aimerais également aider à résoudre des problématiques médicales tournées vers la toxicologie des NPs après expositions qu'elles soient accidentelles ou volontaires.

A.VI.1.1. Continuer le développement de NPs pour transfert industriel

En suivant mes objectifs et résultats présentés précédemment, il est primordial de continuer à développer des NPs en gardant à l'esprit la potentielle transférabilité des méthodes vers l'industrie ainsi que la biocompatibilité des méthodes choisies.

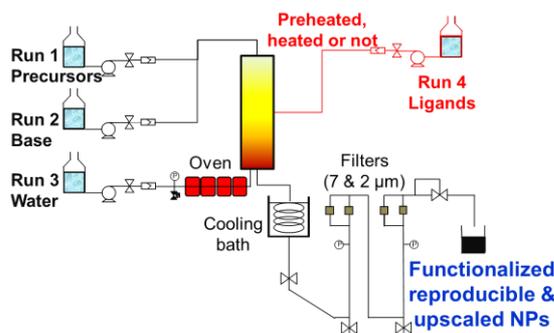


Figure A.VI-1: **Dispositif hydrothermal en continu du laboratoire ICB mis à jour avec une voie permettant la fonctionnalisation, en une étape, de diverses NPs**

Pour cela, j'aimerais continuer de proposer des synthèses de NPs réalisées, notamment, avec le dispositif hydrothermal en continu du laboratoire ICB. Comme présenté lors de la partie A.I.3, je pense que le développement de nano-solutions pour le médical repose sur un contrôle accru des étapes de synthèse tout en se concentrant sur la production à grande échelle des NPs (Paliwal et al. 2014). Même si cette approche peut sembler un peu moins attirante qu'un développement

plus fondamental des NPs, il devient crucial de toujours garder à l'esprit l'aspect scale-up et reproductibilité pour le biomédical (Gavilan et al. 2023). Lors de mes précédentes expériences, j'ai démontré que, connaître ses NPs et être capable de les produire en grande quantité avaient permis de diminuer les biais lors des études biologiques et ainsi également d'accélérer les différents projets réalisés.

Au sein du laboratoire ICB et suite à la thèse du Dr. Guillaume Thomas (Thomas 2015), le procédé de synthèse en voie hydrothermal et en continu du laboratoire ICB a été doté d'une nouvelle entrée permettant d'ajouter directement en continu des ligands biocompatibles (Figure A.VI-1). Cependant, depuis cette optimisation, peu de projets se sont concentrés sur la synthèse de NPs directement fonctionnalisées en une étape pour les applications biomédicales. Je pense que ce dispositif possède un avantage certain pour la transférabilité de nos nanohybrides vers l'industrie pharmaceutique.

D'autres groupes conçoivent aussi leurs nanohybrides avec une approche préindustrielle (Mohamed et al. 2022; Operti et al. 2022; Khairnar et al. 2022; Li et al. 2023) et il faut conserver cette avance technologique en continuant le développement sur ce procédé. Ainsi, assez prochainement, les SPIONs fonctionnalisées avec du PVA et/ou du PEG seront toujours synthétisées en une seule étape. Le rendement attendu serait de l'ordre d'environ $5 \text{ g}_{\text{SPIONs}} \cdot \text{h}^{-1}$ soit au moins 40 g de SPIONs par jour. Ces NPs permettront de continuer mes premières études biomédicales en imagerie médicale ou sur les interactions protéines / NPs. Pour les prochains développements de NPs, il faudra toujours les imaginer avec des méthodes classiques de la recherche en matériaux biocompatibles mais leur transférabilité sur le procédé scale-up devra être rapidement réalisée.

Ce premier projet peut être vu comme un fil rouge à suivre tout au long de ma future carrière en nanomatériaux pour le biomédical. Ce choix de développement biocompatible, simplifié et transférable de NPs est et sera toujours un objectif pour ma recherche.

A.VI.1.2. Nouvelles applications en imagerie et thérapie

Avec les NPs développées et à développer, j'aimerais explorer d'autres applications biomédicales notamment en thérapie et en imagerie.

La majorité des projets menés se sont concentrés sur l'aspect diagnostic des SPIONs (Partie A.II) mais il serait intéressant de regarder aussi leur aspect thérapeutique notamment en hyperthermie. Quand les oxyde de fer ont une taille de cristallite supérieure aux 7-10 nm classiquement obtenus (de l'ordre de 15 nm), les SPIONs peuvent s'échauffer localement sous l'effet d'un champ magnétique oscillant (Hilger and Kaiser 2012) et ainsi détruire les cellules environnantes notamment celles malignes, ces dernières étant plus sensibles aux augmentations de température (Kumar and Mohammad 2011) (Figure A.VI-2-a). A nouveau, grâce au dispositif hydrothermal en continu, la taille des cristallites pourrait être contrôlée pour atteindre les valeurs désirées tout en produisant des grandes quantités de produits. Des SPIONs de 15 à 20 nm présentées dans la partie A.I.3.1 pourraient être utilisées dans le cadre d'applications en hyperthermie. Cette nouvelle application pourrait être réalisée avec le laboratoire de « Biopharmaceutical Sciences » de l'Université de Genève qui a déjà développé et breveté un système de polymère injectable composé de SPIONs pour l'embolisation des tumeurs (Renard et al. 2009; Le Renard et al. 2010).

Lors d'une mission de deux mois à la School of Medicine de l'université de Stanford (CA, USA), j'ai travaillé dans le groupe de la Professeure Daldrup-Link et ai découvert une nouvelle méthode d'imagerie médicale : le Magnetic Particle Imager (MPI en Figure A.VI-2-b). Un nombre très restreint de laboratoires possèdent cet instrument qui est encore développé au niveau préclinique. En résumant très simplement son fonctionnement, le principe du MPI consiste en l'utilisation d'aimants puissants créant une région sans champ magnétique (Field Free Region ou FFR). Quand des NPs superparamagnétiques rentrent dans ce FFR, un signal est reçu et mesuré. Les NPs qui ne passent pas dans le FFR n'émettent pas de signal et le FFR

est déplacé dans le volume à analyser. Ainsi, le MPI ne peut détecter que les SPIONs et ainsi ne pas être sensible à la résonance magnétique des tissus vivants comme c'est le cas en IRM. Le MPI est donc plutôt une technique pour suivre les comportements des SPIONs, en imagerie moléculaire par exemple (Nejadnik et al. 2019; Kiru et al. 2022), et est donc très complémentaire à l'IRM.

Lors de ma visite dans le groupe de la professeure Daldrup-Link, des SPIONs synthétisées par voie chimie douce et hydrothermale et fonctionnalisées avec du PVA ou de l'APTES ont été testées sur cet instrument. En Figure A.VI-2-c les signaux des différents SPIONs sont illustrés en comparaison au Ferumoxytol (un produit pharmaceutique à base de SPIONs utilisé aux USA). Les SPIONs « classiques » avec APTES ou PVA ont montré un signal quatre fois plus élevé que celui du Ferumoxytol. En revanche, les SPIONs obtenues par voie hydrothermale ont donné un signal identique mais leurs stabilités n'étaient pas maximisées ; démontrant également le travail restant sur l'optimisation du scale-up de ces NPs.

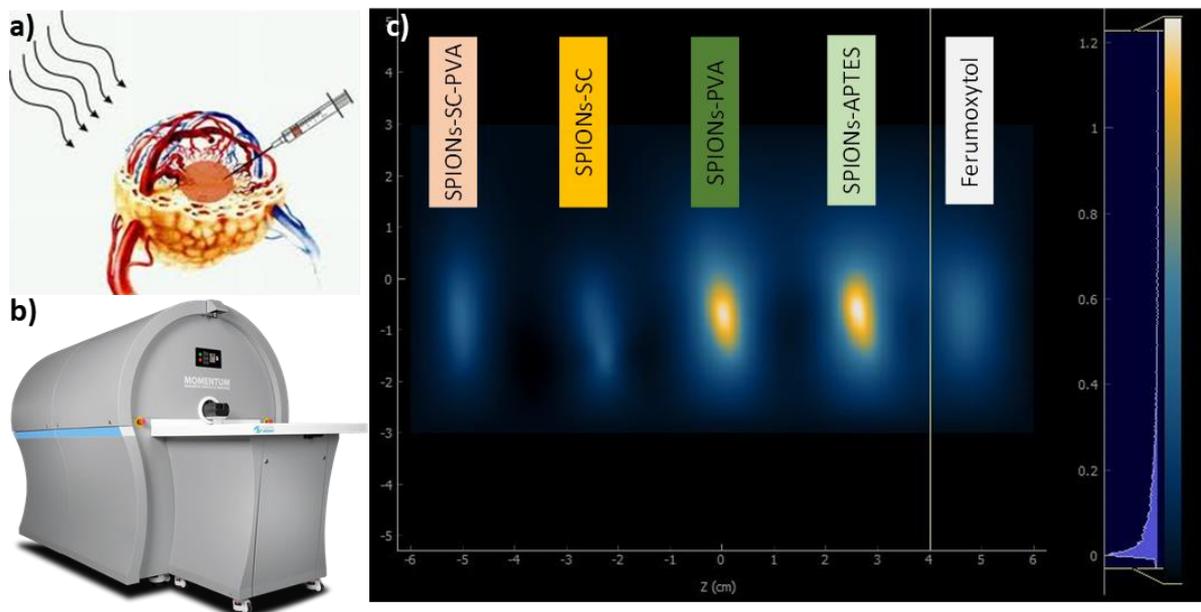


Figure A.VI-2 : **Nouvelles applications biomédicales des SPIONs.** a) schéma de la réaction d'hyperthermie après injection de SPIONs dans une tumeur ; b) Magnetic Particle Imager (MPI) de Momentum présent à la School of Medicine de Stanford (USA) et c) premiers résultats obtenus en 2022 sur le MPI avec des SPIONs synthétisées et fonctionnalisées par rapport au Ferumoxytol. SC : par procédé hydrothermal, PVA : Alcool polyvinylique et APTES : (3-aminopropyl)triéthoxysilane

A.VI.1.3. Caractériser l'exposition accidentelle aux NPs

Une dernière approche que j'aimerais initier dans les prochaines années serait de me concentrer également sur l'approche toxicologique des NPs. La plupart des projets menés ont regardé l'aspect toxicologique des NPs développées mais avec un objectif d'éviter leur toxicité dans le cadre de nanosondes d'imagerie médicale par exemple.

Des premières études sur la toxicité des NPs notamment sur la génotoxicité et sur la recherche de contrôles positifs nanoparticulaires ont été amorcées lors de la thèse du Dr. Annette Luce (Luce 2020). Pour aller plus loin, il serait intéressant d'explorer la toxicité induite par l'exposition aux NPs. J'avais participé à quelques études sur la toxicité des NPs de TiO_2 (Moos et al. 2016) et sur le passage des NPs de polystyrène dans le placenta (Grafmüller et al. 2015) qui n'ont pas été présentées dans cette habilitation à diriger les recherches.

Lors de ces différents projets, mon expertise en caractérisation des NPs a été nécessaire notamment les conditions de stabilité colloïdale, la chimie de surface et la protein corona. En collaboration avec l'université médicale de Greifswald en Allemagne, un projet que nous voudrions mener serait d'étudier la toxicité induite par les NPs générées par les implants orthopédiques (Figure A.VI-3). L'enjeu de ce type de projet serait de caractériser les NPs une fois extraites de l'organisme et d'être capable de comparer leurs propriétés physicochimiques dans les tissus et en dehors. Lier la protein corona et les réponses toxicologiques serait aussi un objectif très important à mener. L'originalité de ce projet serait d'analyser des NPs générées à l'intérieur de l'organisme vivant en opposition aux études souvent tournées vers les NPs ingérées accidentellement.

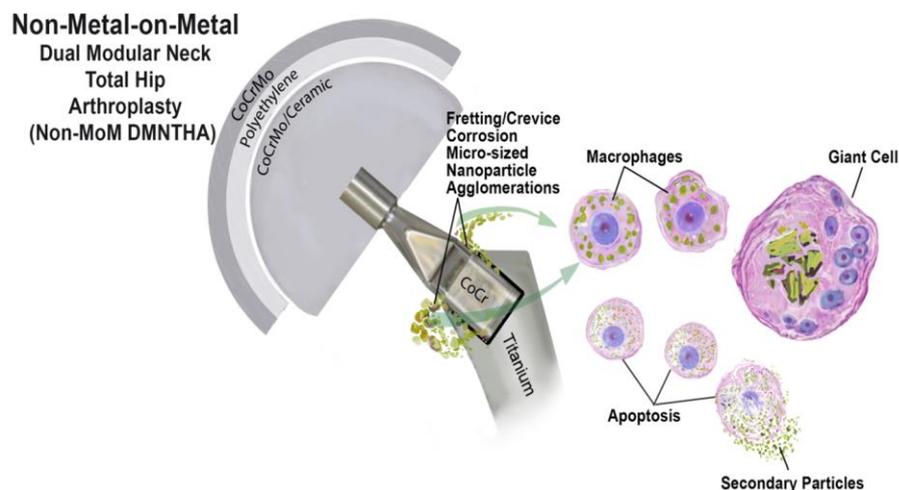


Figure A.VI-3 : NPs métalliques induites par les prothèses orthopédiques : impact sur la toxicité des tissus.

Les différents nouveaux projets que je souhaiterais mener se concentreront, dans une première partie, sur l'optimisation des synthèses de NPs pour applications pharmaceutiques. J'aimerais aussi continuer d'utiliser nos NPs dans divers domaines médicaux dont j'ai présenté deux approches possibles dans les prochaines années. Enfin, j'aimerais aussi utiliser mes

compétences en caractérisations fines des NPs pour aider à comprendre les phénomènes de toxicité comme par exemple, l'exposition aux NPs générées par les prothèses orthopédiques.

Les collaborations et possibles demandes de financements pour les prochains projets détaillées dans cette partie sont listés ci-dessous.

Futurs projets possibles

- Projet SNF (Swiss National Science Foundation) Sinergia
- Projet NIH (National Institutes of Health)
- Projet Horizon Europe

Projets associés

- Projet ANR Nanoblorona (2022-2026)
- Projet Stanford : Collaborative Research (2020-2022)

Collaborations principales associés

- Biopharmaceutical Sciences, Université de Genève, Suisse
- Professeur Daldrup-Link Lab, School of Medicine, Stanford, USA
- Universitätsmedizin Greifswald KÖR, Allemagne
- Particles-Biology Interactions Lab, EMPA St Gallen, Suisse

A.VI.2. Standardisation de la mesure de la protein corona

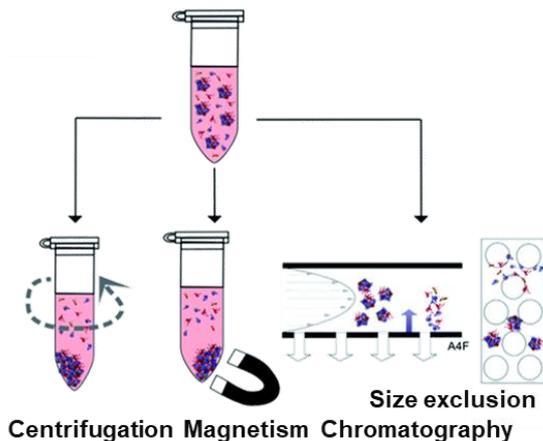


Figure A.VI-4 : Un des freins à l'analyse de la "protein corona (PC) : les analyses de protein corona ne sont pas standardisées (Böhmert et al. 2020)

En 2021, nous avons publié une revue résumant les dernières avancées sur les études de la protein corona (PC) plus spécifiquement *in vivo* (Singh et al. 2021). Dans la partie « discussion » de cette publication plusieurs défis pour améliorer les analyses de la PC ont été présentés. Un des problèmes majeurs de l'étude de la protein corona est l'absence de standardisation des méthodes d'analyses (Figure A.IV-4). Il existe de nombreuses approches pour séparer et quantifier les PCs à la surface des NPs (Böhmert et al. 2020) et ces méthodes

semblent même influencer les résultats obtenus (Bonvin et al. 2017). De plus, comme présenté lors de la partie A.IV.3, les modèles étudiés et la reproductibilité / la répétabilité sont deux facteurs également très importants pour comprendre les interactions protéines / NPs.

Ainsi trois projets d'approches différentes et complémentaires seront menés dans les prochaines années.

A.VI.2.1. Etude fondamentale des interactions protéines / NPs

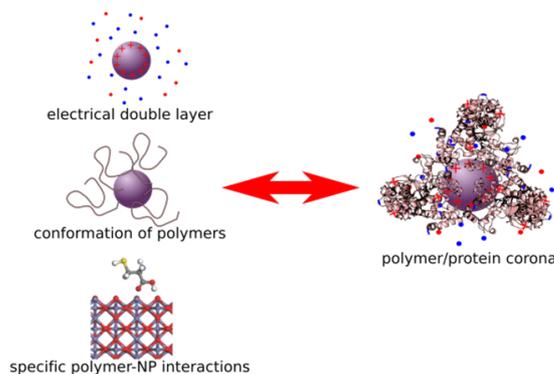


Figure A.VI-5 : Approche théorique pour la compréhension des interactions protéines / NPs.

La plupart des études menées sur la protein corona se sont concentrées sur une approche qui pourrait être qualifiée « d'empirique ». Comme présenté en Partie A.IV, des NPs de chimies de surface variées ont été incubées dans différents fluides biologiques et les protéines ayant une interaction forte ont été quantifiées et sélectionnées. Ces études demandent souvent un important traitement statistique des données et, malgré les efforts menés

pour mettre en place des protocoles reproductibles et répétables, il me semble que nos études manquent d'analyses plus fondamentales.

Ainsi, il serait intéressant, en parallèle d'analyses biologiques de la PC, de se concentrer également sur les paramètres permettant à une protéine en particulier de s'adsorber à la surface des NPs. Par exemple, l'idée serait d'étudier plus en détails les phénomènes de double couche électronique et de conformation des polymères à la surface des NPs avec des

expériences modèles couplées à des analyses numériques (Figure A.VI-5). Commencer par des polymères permettrait d'avoir moins de variabilité avec ces molécules qu'avec des protéines. Les PVAs semblent être de bons candidats car ils sont plutôt linéaires et peuvent posséder différentes tailles et des fonctions chimiques proches de celles présentes dans les acides aminés de protéines (COOH, NH₂, SH...). A la suite de ces expériences préliminaires, travailler sur des peptides serait aussi envisagé pour se rapprocher des comportements « réels » des protéines. La caractérisation fine des surfaces des NPs avec des outils présents à l'Université de Bourgogne ou de Haute Alsace permettrait d'apporter plus d'information sur l'affinité et l'évolution de la conformation des protéines une fois en contact avec les NPs. En couplant la simulation numérique et la caractérisation des surfaces des NPs, ce projet pourrait permettre de mieux appréhender les interactions entre la surface des NPs et les protéines. Il faudra pour cela trouver des partenaires en simulation numérique et bien appréhender le transfert entre les sciences fondamentales et expérimentales ce qui permettrait également de sortir un peu de ma « zone de confort ».

Pour finir sur l'aspect fondamental des études de la PC, il serait aussi crucial de mieux appréhender les analyses statistiques des protéines trouvées à la surface des NPs. Bien que les analyses en LC MS/MS soient assez onéreuses il est tout de même primordial de réaliser des répliques d'expériences et pas seulement d'analyses. Comme démontré en partie A.IV.3, des triplicatas expérimentaux couplés une analyse statistique rigoureuse ont permis de tirer de meilleures conclusions sur les protéines trouvées à la surface de nos NPs. Là encore, il faudra se tourner vers des groupes spécialisés dans le traitement d'un grand nombre de données.

A.VI.2.2. Influence des modèles biologiques sur la protein corona

Après avoir tenté de diminuer les biais physicochimiques des NPs pour étudier leur PC (partie A.I.2.2), une autre approche serait également d'essayer de limiter certaines modifications dues aux matériels biologiques étudiés.

Par exemple, il a été démontré que les PCs trouvées sur des mêmes NPs étaient différentes en fonction de l'animal étudié (Müller et al. 2018). Il ne sera bien sûr pas possible de s'affranchir des modèles animaux mais, si les collaborations futures le permettent, travailler *in vitro* uniquement sur des fluides humains serait un atout indéniable pour la transférabilité des résultats de PC. En collaboration avec le CHU de Dijon, nous avons démarré, début 2023, un essai clinique permettant d'utiliser du sang de patient pour nos études d'interactions sanguines des NPs ([NCT05690542](#)). Avec ces échantillons, les prochaines analyses se feront sur l'humain. Les liens entre les PCs et les comportements sanguins des NPs seront réalisés et présentés en partie A.VI.3.

En ce qui concerne les biais biologiques pouvant influencer les analyses entre les protéines et la surface des NPs, nous allons commencer par nous concentrer sur l'anticoagulant utilisé lors du prélèvement et sur l'état de santé du patient. Lors du

prélèvement des plasmas, le sang est collecté dans un anticoagulant qui peut avoir une influence sur les comportements des NPs et sur leurs interactions avec les protéines plasmatiques. Par exemple, le citrate est souvent utilisé dans les études d'hémolyse (ce qui nous intéressera lors de nos projets sang / NPs) car il permet de bloquer la coagulation de manière réversible (Bath and Butterworth 1996). Cependant, du côté sciences des matériaux, le citrate permet de fonctionnaliser la surface des NPs (comme présenté en partie A.I.3.1). Ainsi, il pourrait être possible que les NPs voient leur chimie de surface évoluer au contact du plasma citraté. Très peu d'études se sont concentrées sur ce paramètre médical bien qu'il paraisse crucial sur la PC (Schoettler et al. 2016). Une étude vient de démarrer en collaboration avec l'Université de Genève et le CHU de Dijon pour tester l'influence de quatre anticoagulants sur les interactions entre les protéines plasmatiques et la surface de trois types de PVA-SPIONs (chargées positivement, neutre et négativement). Nous allons travailler sur un seul donneur (pour éviter des variabilités biologiques) et espérons observer des différences significatives pour ensuite mieux mettre en place nos futures études sur la PC plasmatique humaine. Cette étude a été à l'initiative de Célia Marets que je remercie pour cette excellente idée.

Une autre approche serait d'étudier l'impact des pathologies sur la formation de la PC. De telles études ont déjà été réalisées pour analyser de manière aléatoire l'impact de l'état de santé sur les interactions protéines / surface des NPs (Hajipour et al. 2015). Il serait plus intéressant, dans notre cas, de se concentrer sur les phénomènes influençant l'hémolyse si nous voulons comprendre le rôle des NPs sur ces pathologies.

Dans ces deux exemples, il reste crucial de discuter et d'échanger avec des partenaires médecins spécialistes des fluides biologiques et du sang plus particulièrement pour comprendre les exigences et les limitations techniques de leur discipline.

A.VI.2.3. Mesure de la protein corona en flux pour se rapprocher du *in vivo*

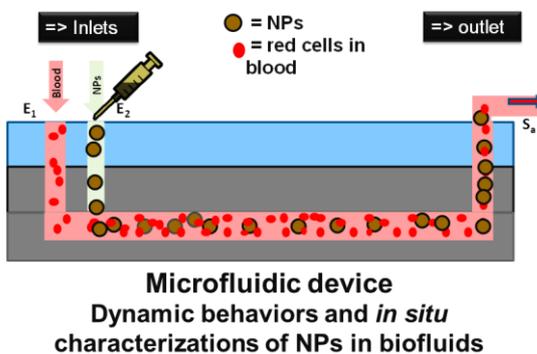


Figure A.VI-6 : *Dispositif microfluidique instrumenté pour analyser en flux les comportements biologiques des NPs et leurs PCs*

Avec mes compétences en ingénierie chimique, je pense enfin, qu'au-delà des variations entre les différentes techniques de séparations des PCs, une limitation dans leurs analyses reste l'absence d'automatisation des procédés. Une étude de 2016 a démontré que les mesures de PCs étaient différentes en statique et en dynamique (Palchetti et al. 2016). En flux, les interactions entre les protéines et les NPs seraient plus proches d'un comportement

dans un fluide biologique *in vivo*.

Ainsi, en collaboration avec l'institut FEMTO-ST de Besançon, nous allons développer un dispositif microfluidique instrumenté permettant de mesurer, en flux, les comportements biologiques des NPs (Figure A.VI-6). Ce dispositif commencera par travailler sur des fluides simples pour mesurer l'évolution, en flux, de certains paramètres physicochimiques des NPs comme la stabilité colloïdale, la dissolution, le potentiel zêta. Rapidement, nous nous concentrerons sur les fluides biologiques pour étudier, en plus des caractéristiques précédentes, l'adsorption des protéines plasmatiques et les réactions sanguines (hémolyse et réaction avec le système immunitaire voir partie A.VI.3). Avec ce dispositif, nous espérons nous rapprocher du comportement réel des NPs une fois injectées dans le sang pour mieux comprendre leurs comportements biologiques.

Les différents projets présentés sur la standardisation des analyses des NPs se concentreront sur trois objectifs :

1. Mieux comprendre les interactions fondamentales entre les protéines et les NPs et se concentrer sur les analyses statistiques des données obtenues
2. Mieux anticiper les biais d'observations sur les analyses de PC dues aux paramètres biomédicaux étudiés
3. Mieux développer des méthodes proches de *l'in vivo* pour quantifier et séparer les protéines plasmatiques adsorbées à la surface des NPs

Les collaborations et possibles demandes de financements pour les prochains projets détaillées dans cette partie sont listées ci-dessous.

Futurs projets possibles

- Projet EUR Région Bourgogne Franche-Comté (peut-être accepté en Juillet 2023)
- Projet SNF (Swiss National Science Foundation) Sinergia
- Projet ANR (CE19: Technologies pour la santé)

Projets associés

- Projet ANR Nanoblorona (2022-2026)

Collaborations principales associés

- Advanced Colloidal Materials Engineering, EMPA Dübendorf, Suisse
- Université de Haute Alsace, Mulhouse, France
- Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, Dijon, France
- Biopharmaceutical Sciences, Université de Genève, Suisse
- Service d'hématologie, CHU de Dijon, France
- FEMTO-ST, Besançon, France

A.VI.3. Rôle de la protein corona sur les comportements biologiques des NPs

En plus de mieux étudier fondamentalement la formation de la protein corona, il serait aussi intéressant de connaître son impact sur les comportements biologiques des NPs. Durant de futurs projets qui seront détaillés dans cette partie, l'idée serait de se concentrer sur le rôle des propriétés des NPs sur les réactions avec le sang en distinguant des projets *in vitro* sur le sang humain et *in vivo* sur des modèles animaux (murins par exemple). Le postulat de ces projets est que le sang reste la voie d'entrée principale de l'exposition aux NPs qu'elle soit accidentelle ou après injection (Docter et al. 2015) et qu'une fois en contact avec ce fluide biologique les protéines plasmatiques vont influencer les devenir des NPs. Les projets qui seront réalisés ces prochaines années seront directement les suites des études présentées en parties A.III.2et A.IV.2 respectivement pour les approches *in vitro* et *in vivo*. L'influence des paramètres physicochimiques des NPs sur les différentes PCs sera quantifiée et leur rôle sur leurs réponses hématologiques et leur biodistribution sera étudié.

A.VI.3.1. Rôle de la protein corona sur les interactions des NPs avec le sang

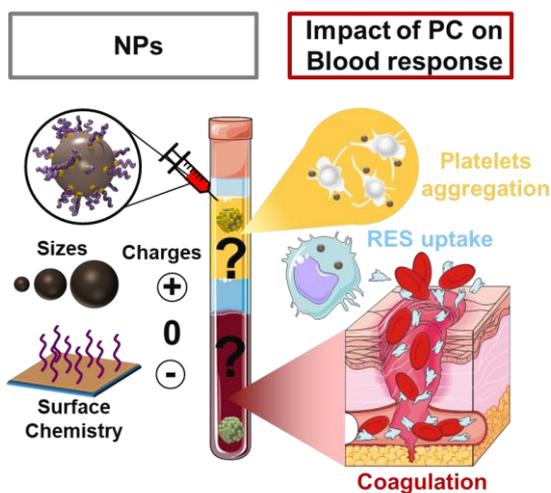


Figure A.VI-7 : **Etude des paramètres physicochimiques influençant la formation de la PC dans le sang humain :** impacts de la taille, de la charge et de la chimie de surface des NPs sur leur PCs et sur l'agrégation plaquettaire, l'interaction avec le RES et la coagulation.
RES : Système réticuloendothélial

En continuation d'une étude réalisée en 2021 (Kottana et al. 2021), l'influence de la chimie de surface sur la PC et sur l'hémolyse sera analysée (Figure A.VI-7). Comme expliqué dans les projets de la partie A.VI.2.2, les expériences se concentreront sur le sang humain pour accélérer le transfert technologique vers le patient. Les paramètres des NPs étudiés seront les caractéristiques classiques observées dans la littérature (Treuel et al. 2015) : la taille, la charge et la chimie de surface. Différentes NPs seront ensuite incubées dans du sang complet humain provenant du service d'hématologie du CHU de Dijon (essai clinique [NCT05690542](#)).

Les impacts des propriétés des NPs sur l'agrégation plaquettaire, l'internalisation par le RES et sur la coagulation seront quantifiés tout en analysant la protein corona. Pour aller plus loin que ce qui a été observé lors de nos précédentes études (partie A.IV.1), en plus des mesures en LC MS/MS, la masse moyenne de protéines par NPs sera quantifiée de même que l'influence de la surface sur la conformation des protéines. Pour ce dernier paramètre, nous avons démontré que le changement de conformation du fibrinogène pouvait être une des raisons pour laquelle nos PVA-SPIONS

semblaient retarder l'agrégation plaquettaire (Kottana et al. 2021). Le but final de ce projet *in vitro* serait donc de trouver un lien entre les protéines plasmatiques adsorbées à la surface des NPs et les comportements de ces mêmes NPs dans le sang. Ce projet permettrait aussi de lier nos activités physicochimiques à des partenaires du monde médical pour mieux appréhender les problématiques d'hémolyse pour un développement plus biocompatibles de nos NPs. Cela pourrait aussi permettre de démarrer une nouvelle thématique potentiellement plus toxicologique sur les NPs (de l'environnement ou manufacturées). Ainsi, ce projet pourrait aussi trouver un lien avec les projets sur l'exposition accidentelle aux NPs (partie A.VI.1.3) ainsi que la mesure en dynamique de la PC (partie A.VI.2.3).

A.VI.3.2. Influence de la protein corona sur la biodistribution des NPs

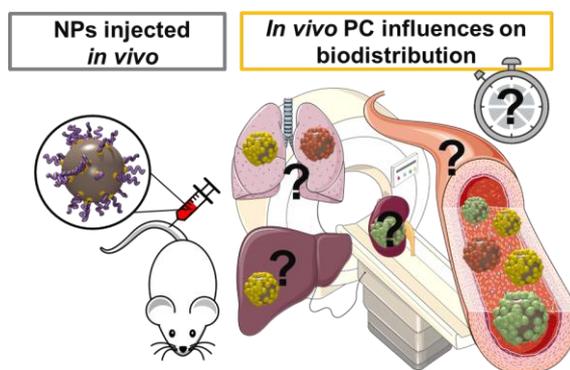


Figure A.VI-8 : Etude des paramètres physicochimiques influençant la formation de la PC *in vivo* : rôle de la protein corona *in vivo* sur la biodistribution et la clairance des NPs.

Dans la même optique, l'influence des propriétés des NPs sur la PC plasmatique *in vivo* ainsi que le rôle de ces protéines sur la biodistribution seront étudiés. Ce projet s'inscrit dans la continuité de notre étude pionnière de 2014 (Sakulkhu et al. 2014b) ainsi que celle de 2023 (Marques et al. 2023) qui ont approfondi le rôle crucial de certaines protéines dans la biocirculation des NPs (partie A.IV.2). Des NPs biocompatibles bien maîtrisées seront injectées dans le modèle animal (probablement murin : Figure A.VI-8)

et les NPs seront récupérées à différents temps pour quantifier leurs concentrations dans le sérum (biocirculation) ainsi que leurs PCs. Leurs internalisations dans les cellules du RES seront également mesurées. De plus, pour améliorer la compréhension des biodistributions de ces NPs, les animaux seront imagés et sacrifiés pour suivre l'élimination des NPs. Pour travailler avec nos collaborations au CGFL de Dijon, les NPs étudiées seront sans doute des SPIONs pour suivi en IRM.

En 2021, encore très peu de publications se concentraient sur l'étude *in vivo* de la PC (Singh et al. 2021). Cela peut être expliqué par la complexité du traitement des données en LC MS/MS notamment avec les grandes variabilités observables sur les modèles *in vivo*. En se concentrant sur une mise en place rigoureuse des méthodes de séparations et d'analyses tout en veillant à bien établir des contrôles et des répliques (partie A.VI.2), le projet proposé pourrait permettre d'obtenir des informations cruciales pour comprendre le devenir *in vivo* des NPs développées pour applications biomédicales ou même accidentellement ingérées.

Les projets proposés dans cette partie auront pour but de continuer d'avancer sur la compréhension du rôle de la PC sur les comportements biologiques des NPs. Le fluide étudié sera le sang soit humain pour des études cliniques *in vitro*, soit animal pour des études *in vivo*. Les analyses protéiniques se feront avec l'objectif de standardisation et de reproductibilité des méthodes. Nous espérons également que le dispositif microfluidique développé en partie A.VI.2.3 pourra être utilisé dans cette quête d'amélioration de l'étude des interactions entre les protéines et la surface des NPs.

Les collaborations et possibles demandes de financements pour les prochains projets détaillées dans cette partie sont listés ci-dessous.

Futurs projets possibles

- Projet EUR Région Bourgogne Franche-Comté (peut-être accepté en Juillet 2023)
- Projet ANSES (questions à la recherche sur les fibres et nanomatériaux)
- Projet de la Ligue contre le cancer

Projets associés

- Projet ANR Nanoblorona (2022-2026)

Collaborations principales associés

- FEMTO-ST, Besançon, France
- Université de Haute Alsace, Mulhouse, France
- INSERM, Dijon, France
- Anne-Laure Papa Lab, George Washington University, USA
- Biopharmaceutical Sciences, Université de Genève, Suisse
- Service d'hématologie, CHU de Dijon, France
- Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France

A.VI.4. Le futur de la nanomédecine: le contrôle de la protein corona ?

Dans cette partie, deux projets seront présentés également répartis en applications *in vitro* et *in vivo*. Tout en consacrant une grande partie des futurs études scientifiques menées ces prochaines années à la compréhension des phénomènes physicochimiques et biologiques de la protein corona, une autre approche se concentrera sur son contrôle dans le but d'optimiser le développement de NPs. Depuis plusieurs années, certaines publications soulignent l'importance d'exploiter cette PC pour améliorer les NPs pour applications biomédicales (Figure A.VI-9). En exploitant les résultats de projets d'études de l'influence de la PC sur les comportements biologiques (partie A.VI.3), des protéines d'intérêts pourraient être utilisées pour fonctionnaliser la surface de NPs. Les nouveaux nanohybrides obtenus pourraient être qualifiés de biomimétiques et auraient des comportements biologiques optimisés. Les deux projets présentés dans cette partie détailleront deux approches envisagées pour tester cette hypothèse.

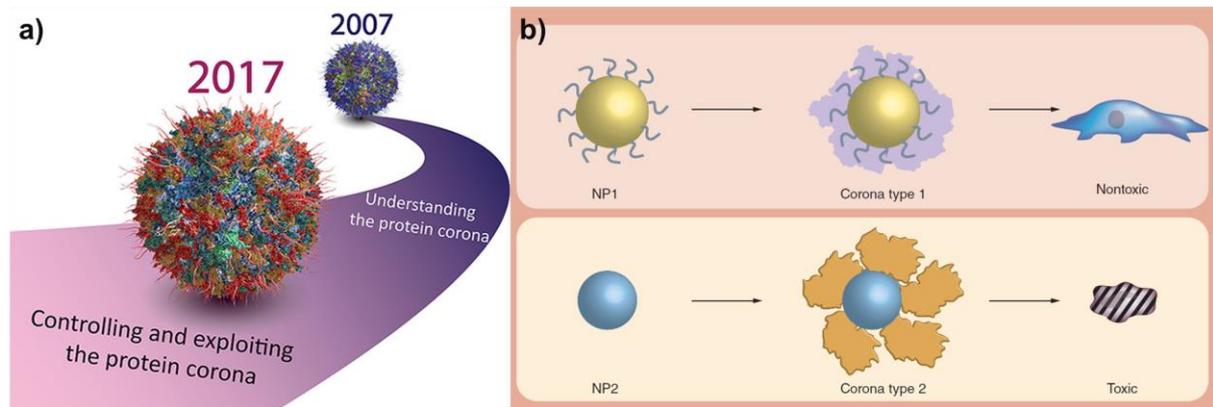


Figure A.VI-9 : **Contrôler la protein corona pour améliorer la nanomédecine.** a) Ke et al. ont discuté l'importance de ne plus seulement étudier la protein corona mais de la contrôler pour exploiter ses propriétés biologiques (Ke et al. 2017) et b) Hamad-Schifferli proposait aussi de mieux contrôler la PC pour diminuer, par exemple, la toxicité des NPs (Hamad-Schifferli 2015)

A.VI.4.1. Optimiser la protein corona pour études *in vitro*

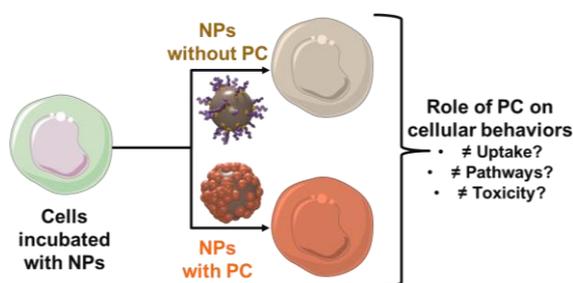


Figure A.VI-10 : **Evolution des interactions cellulaires des NPs en contrôlant leur PCs.**

Dans cette partie, la PC des NPs sera modifiée avant incubation avec des cellules et les réponses cellulaires seront mesurées. En première approche, des cellules seront cultivées dans des milieux cellulaires sans sérum. Des NPs seront ensuite soit pré-incubées dans du sérum ou soit non pré-incubées et seront ensuite mises en contact avec les cellules (Figure A.VI-10). Les

comportements cellulaires tels que l'internalisation (quantification et voies d'entrée) ainsi que les réactions toxicologiques (mort cellulaire, inflammation...) seront mesurés. Les modèles cellulaires étudiés se concentreront, en premier lieu, sur les cellules immunitaires pour rester

dans les analyses de sang. A la suite de ces expériences, les NPs seront incubées dans des protéines spécifiques d'intérêts (Ritz et al. 2015) ayant démontré une influence sur les NPs lors des études d'analyse de la PC (partie A.VI.3.1). Enfin, ces mêmes protéines seront greffées de manière covalente à la surface des NPs. L'activité de ces protéines greffées sera également analysée et les nouvelles interactions cellulaires, attendues comme optimisées, seront étudiées. Ces mêmes NPs seront aussi évaluées lors d'études sur l'hémolyse. Les premières idées de ce projet viennent des discussions amorcées par Célia Marets et de Dr. Thomas Nury sous la supervision du Dr. Gérard Lizard que je souhaite remercier dans ce rapport.

A.VI.4.2. Optimiser la PC pour améliorer *in vivo* les NPs

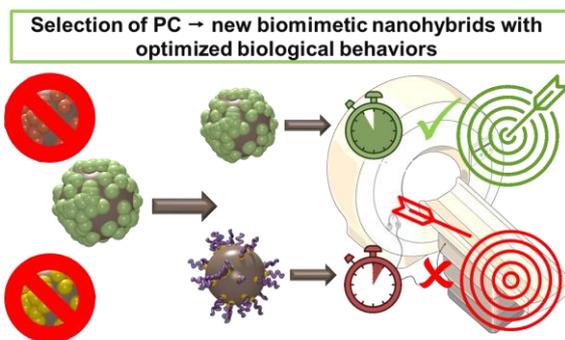


Figure A.VI-11 : **Optimisation de la PC de NPs pour améliorer leurs comportements *in vivo*** : nanohybrides biomimétiques avec clairance retardée et/ou ciblage amélioré

Dans ce dernier projet, l'approche proposée dans la partie précédente (partie A.VI.4.1) sera répétée pour optimiser la biocirculation et le ciblage des NPs (Figure A.VI-11). Comme expliqué lors des précédents (partie A.IV.2) et futurs (partie A.VI.3.2) projets, l'approche *in vivo* sur la protein corona reste un défi important que je souhaiterais relever. Fort de l'avance prise durant ces dernières années (Sakulkhu et al. 2014b; Marques et al. 2023), je souhaiterais utiliser les données protéiniques accumulées pour sélectionner

certaines protéines afin, dans un premier temps, d'améliorer la biocirculation des NPs. Ces nanohybrides biomimétiques auront des protéines greffées de manière covalente à leur surface et leur biodistribution chez l'animal sera mesurée en imagerie médicale et dosage chimique sur les organes. Les résultats attendus seront d'obtenir des NPs plus circulantes. Enfin, pour cibler des pathologies spécifiques, des protéines d'intérêt seront également utilisées pour modifier la surface de nouvelles NPs optimisées.

Les projets proposés dans cette dernière partie seront, peut-être, les plus ambitieux car ils nécessiteront de bien sélectionner des protéines ayant démontré un effet positif sur les comportements *in vitro* ou *in vivo* afin de développer de nouvelles NPs biomimétiques avec ces protéines à leur surface. Ces projets regrouperont des expertises de nombreux domaines rencontrés lors des différents projets (passés et futurs) telles que la modification de surface des NPs, l'étude et l'exploitation de la PC, l'analyse des protéines (conformation, activité, greffage...), la biologie cellulaire, l'hématologie et l'imagerie médicale. Par rapport à d'autres projets, les risques peuvent sembler plus élevés mais les résultats attendus permettraient de passer un cap dans le développement de nanomédicaments pour une nanomédecine personnalisée.

Les collaborations et possibles demandes de financements pour les prochains projets détaillées dans cette partie sont listés ci-dessous.

Futurs projets possibles

- Projet EUR Région Bourgogne Franche-Comté (peut-être accepté en Juillet 2023)
- Projet ANSES (questions à la recherche sur les fibres et nanomatériaux)
- Projet de la Ligue contre le cancer
- Projet SNF (Swiss National Science Foundation) Sinergia
- Projet NIH (National Institutes of Health)
- Projet Horizon Europe

Projets associés

- Projet ANR Nanoblorona (2022-2026)

Collaborations principales associés

- FEMTO-ST, Besançon, France
- Biopharmaceutical Sciences, Université de Genève, Suisse
- Professeur Daldrup-Link Lab, School of Medicine, Stanford, USA
- Université de Haute Alsace, Mulhouse, France
- Advanced Colloidal Materials Engineering, EMPA Dübendorf, Suisse
- INSERM, Dijon, France
- Anne-Laure Papa Lab, George Washington University, USA
- Service d'hématologie, CHU de Dijon, France
- Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France

A.VI.5. Conclusion sur les futurs projets de recherche

Dans cette dernière partie de ce rapport, les principaux projets de recherche ont été présentés. Comme expliqué en partie conclusion (Partie A.V), sans oublier l'approche nanoparticules et applications biomédicales, la majorité de mes aspirations scientifiques se dirigeront vers l'étude approfondie, le contrôle et l'utilisation de la protein corona pour la nanomédecine (Figure A.VI-12). J'ambitionne d'utiliser cette discipline assez récente pour trouver des solutions innovantes pour la médecine en couplant les propriétés intéressantes des nanoparticules avec les protéines qui prouvent leur utilité dans de nombreuses régulations biologiques.

Avec ces futurs projets, j'amorcerai une nouvelle thématique interdisciplinaire sur la nanomédecine qui, j'espère, génèrera de nouvelles collaborations nationales et surtout internationales pour enrichir ma culture scientifique et me confronter à de nouveaux enjeux. Je souhaite également, sortir de ma zone de confort en améliorant encore mon interdisciplinarité en poursuivant des projets plus fondamentaux avec des approches de simulation numérique tout en me tournant vers la nanotoxicologie. Enfin, j'aimerais plus orienter une partie de ma recherche vers l'industrie pour, peut-être paradoxalement, gagner un peu plus d'indépendance financière pour pouvoir mener des études, parfois, peut-être un peu trop fondamentales pour la médecine.

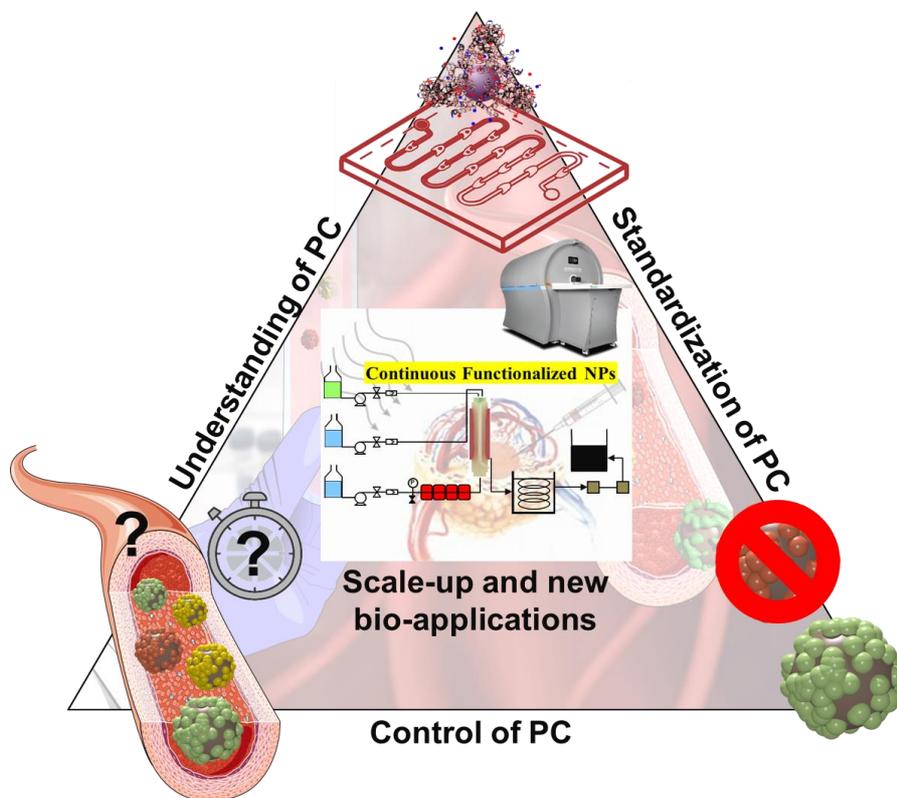


Figure A.VI-12 : Résumé des différents projets interconnectés à mener à partir de 2023

Chapitre B. Curriculum Vitae

Chapitre B. Curriculum Vitae.....	111
Formations.....	112
Expériences professionnelles.....	112
Productions scientifiques et encadrements.....	113
Publications scientifiques.....	113
Communications scientifiques.....	118
Encadrements scientifiques.....	118
Principales expériences dans l’animation de recherche.....	125
Recherche internationale.....	125
Recherche nationale.....	126
Recherche industrielle.....	126
Enseignements.....	127
Responsabilités collectives et diffusion de la culture scientifique.....	127
Responsabilités collectives.....	127
Diffusion de la culture scientifique.....	127

Dr. Lionel MAURIZI

CR CNRS – Docteur en chimie-physique & Ingénieur en génie des procédés

05/05/1983

Formations



Doctorat en Chimie-Physique de l'Université de Bourgogne (Dijon)

11/07 – 12/10

Dijon (F)

Elaboration de nanoparticules fonctionnelles : applications comme agents de contraste en IRM / Directrice et co-encadrant: N. Millot & F. Bouyer



Master & Diplôme d'ingénieur en Génie des procédés de l'UTC (Université de Technologie de Compiègne)

09/04 – 08/07

Compiègne(F)



License 2 de Sciences de la Matière à l'Université de Bourgogne

09/02 – 08/04

Dijon (F)

Expériences professionnelles



Laboratoire ICB / CNRS (UMR 6303)

Depuis 11/16

Dijon (F)

⇒ **Chargé de Recherche CNRS** : Etude des interactions entre les protéines des milieux biologiques et les nanoparticules et scale-up de production de nanoparticules pour applications biomédicales



University of Basel : Equipe du Prof. C. Palivan

02/16 – 08/16

Basel, (CH)

⇒ **Post-doctorant** : Développement de nanoparticules polymériques dans le cadre d'un pôle de recherche suisse



Dublin City University: Equipe du Dr. D. Brougham

07/15 – 01/16

Dublin (IE)

⇒ **Post-doctorant** : Auto-assemblage de nanoparticules (projet européen **UNION : NMP.2012.1.4-2**)



Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne: Equipe du Prof. H. Hofmann

02/11 – 02/15

Lausanne (CH)

⇒ **Senior Scientist** : Group leader développement de nanoparticules pour détection des pathologies arthritiques (projet Européen **NANODIARA : NMP-2008-4.0-1**)



Laboratoire ICB

11/07 – 01/11

Dijon (F)

⇒ **Doctorant puis chercheur (2 mois)** : Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules pour applications comme agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM)

Productions scientifiques et encadrements

Publications scientifiques

ID-HAL: [lionel-maurizi](#) / **ORCID:** [0000-0002-6346-7623](#) / (**Scopus** / **Publons** / **Lens**)

- ⇒ 39 articles de revues (publications) à comité de lecture
- ⇒ 4 actes de colloques (proceedings) à comité de lecture
- ⇒ 4 chapitres de livres

Publications dans des journaux à comité de lecture

Personnes encadrées dans l'étude / * : auteur correspondant / † : co-premier auteur

1. *A Comprehensive Review on Barium Titanate Nanoparticles as a Persuasive Piezoelectric Material for Biomedical Applications: Prospects and Challenges*, A. Sood, M. Desseigne, A. Dev, **L. Maurizi**, A. Kumar, N. Millot and S.S. Han, **Small**, 2206401, **2022** (DOI: [10.1002/smll.202206401](#))
2. *Characterization Challenges of Self-Assembled Polymer-SPIONs Nanoparticles: Benefits of Orthogonal Methods*, C. Marques, **L. Maurizi**, G. Borchard and O. Jordan, **Int. J. Mol. Sci.**, 23 (24), 16124, **2022** (DOI: [10.3390/ijms232416124](#))
3. *Titanate nanoribbon-based nanobiohybrid for potential applications in regenerative medicine*, **L. Maurizi**[†], V. Bellat[†], M. Moreau, E. De Maistre, J. Boudon, L. Dumont, F. Denat, D. Vandroux and N. Millot, **RSC advances**, 2022 (12), 26875-26881, **2022** (DOI: [10.1039/D2RA04753E](#))
4. *Kinematic modelisation and parametric study of mechanosynthesis of hydroxyfluorapatite*, H. Hajjia, M. Abdellaoui, **L. Maurizi**, S. Nasr, N. Millot and E. Ben Salem, **Advanced Powder Technology**, 32 (10) 3585-3600, **2021** (DOI: [10.1016/j.apt.2021.08.013](#))
5. *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 and **L. Maurizi**^{*}, **Nanoscale Advances**, 3, 1209-1229, **2021** (DOI: [10.1039/D0NA00863J](#)) / **Inside front cover:** (DOI: [10.1039/D1NA90021H](#))
6. *Anti-Platelet Effect Induced by Iron Oxide Nanoparticles: Correlation with Conformational Change in Fibrinogen*, R. K. Kottana, **L. Maurizi**, B. Schnoor, K. Morris, J. A. Webb, M. A. Massiah, N. Millot and A.-L. Papa, **Small**, 17 (1), 2004945, **2021** (DOI: [10.1002/smll.202004945](#)) / **Back cover:** (DOI: [10.1002/smll.202170003](#))
7. *Taurine-Conjugated Mussel-Inspired Iron Oxide Nanoparticles with an Elongated Shape for Effective Delivery of Doxorubicin into the Tumor Cells*, N. Singh, N. Millot, **L. Maurizi**, G. Lizard and R. Kumar, **ACS Omega**, 5 (26), 16165-16175, **2020** (DOI: [10.1021/acsomega.0c01747](#))
8. *Efficient quantification by X-ray photoelectron spectroscopy and thermogravimetric analyses of the one-pot grafting of two molecules on the surface of iron oxide nanoparticles*, **L. Maurizi**^{*}, F. Sallem, J. Boudon, O. Heintz, H. Bisht, F. Bouyer and N. Millot^{*}, **J. Nanosci. Nanotech.**, 19 (8), 4920-4929, **2019** (DOI: [10.1166/jnn.2019.16796](#))

9. *Elaboration of trans-resveratrol derivative-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for glioma treatment*, F. Sallem, R. Haji, D. Vervandier-Fasseur, T. Nury, **L. Maurizi**, J. Boudon, G. Lizard and N. Millot, **Nanomaterials**, 9 (2), 287, **2019** (DOI: [10.3390/nano9020287](https://doi.org/10.3390/nano9020287))
10. *Innovative Magnetic Nanoparticles for PET/MRI Bimodal Imaging*, G. Thomas, J. Boudon, **L. Maurizi**, M. Moreau, P. Walker, I. Severin, A. Oudot, F. Demoisson, F. Denat, S. Poty, C. Goze, F. Brunotte and N. Millot, **ACS Omega**, 4 (2), 2637-2648, **2019** (DOI: [10.1021/acsomega.8b03283](https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03283))
11. *Beyond unpredictability: the importance of reproducibility in understanding the protein corona of nanoparticles*, S. Galmarini, U. Hanusch (ex Sakulkhu), M. Giraud, N. Cayla, D. Chiappe, N. von Moos, H. Hofmann and **L. Maurizi***, **Bioconjugate Chem.**, 29 (10), 3385-3393, **2018** (DOI: [10.1021/acs.bioconjchem.8b00554](https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00554))
12. *Cellular interactions of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles on oligodendrocytes without detrimental side effects: Cell death induction, oxidative stress and inflammation*, S. Sruthi[†], **L. Maurizi^{†*}**, T. Nury, F. Sallem, J. Boudon, J.M. Riedinger, N. Millot, F. Bouyer and G. Lizard*, **Colloids Surfaces B**, 170 (2018), 454-462, **2018** (DOI: [10.1016/j.colsurfb.2018.06.041](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.041))
13. *In vitro interaction and biocompatibility of titanate nanotubes with microglial cells*, S. Sruthi, A. Loiseau, J. Boudon, F. Sallem, **L. Maurizi**, P.V. Mohanan, G. Lizard and N. Millot, **Toxicology and Applied Pharmacology**, 353 (2018), 74-86, **2018** (DOI: [10.1016/j.taap.2018.06.013](https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.06.013))
14. *Nanoscience based strategies to engineer antimicrobial surfaces*, S. Rigo, C. Cai, G. Gunkel-Grabole, **L. Maurizi**, X. Zhang, J. Xu and C. Palivan, **Advanced Science**, 5 (5), 1700892, **2018** (DOI: [10.1002/advs.201700892](https://doi.org/10.1002/advs.201700892))
15. *Characterization of liposome-containing SPIONs conjugated with anti-CD20 developed as a novel theranostic agent for central nervous system lymphoma*, S. Saesoo, S. Sathornsumetee, P. Anekwiang, C. Treetidnipa, P. Thuwajit, S. Bunthot, W. Maneeprakorn, **L. Maurizi**, H. Hofmann, R. U. Rungsardthong and N. Saengkrit, **Colloids Surface B**, 161 (2018), 497-507, **2018** (DOI: [10.1016/j.colsurfb.2017.11.003](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.003))
16. *Superparamagnetic nanohybrids with cross-linked polymers providing higher in vitro stability*, W. Maneeprakorn, **L. Maurizi**, H. Siriket; T. Wutikhun, T. Dharakul and H. Hofmann, **J. Mater. Sci.**, 52 (16), 9249-9261, **2017** (DOI: [10.1007/s10853-017-1098-2](https://doi.org/10.1007/s10853-017-1098-2))
17. *Effectiveness of hand washing on the removal of iron oxide nanoparticles from human skin ex vivo*, N. A. Lewinski, A. Berthet, **L. Maurizi**, A. Eisenbeis and N. B. Hopf, **J. Occup. Environ. Hyg.**, 14 (8), D115-D119, **2017** (DOI: [10.1080/15459624.2017.1296238](https://doi.org/10.1080/15459624.2017.1296238))
18. *Pro-oxidant effects of nano-TiO₂ on Chlamydomonas reinhardtii during short-term exposure*, N. von Moos, V. B. Koman, C. Santschi, O. J.F. Martin, **L. Maurizi**, A. Jayaprakash, P. Bowen and V. I. Slaveykova, **RSC advances**, 6 (116), 115271-115283, **2016** (DOI: [10.1039/C6RA16639C](https://doi.org/10.1039/C6RA16639C))
19. *Modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticle surface enables safer human application*, C. Strehl, **L. Maurizi**, T. Gaber, P. Hoff, T. Broschard, A. R. Poole, H. Hofmann and F. Buttgerit, **Int. J. Nanomed.**, 2016 (11), 5883-5896, **2016** (DOI: [10.2147/IJN.S110579](https://doi.org/10.2147/IJN.S110579))

20. *Effect of PVA-coated nanoparticles on human T helper cell activity*, C. Strehl, S. Schellmann, **L. Maurizi**, M. Hofmann-Antenbrink, H. Hofmann, F. Buttgereit and T. Gaber, **Toxicology Letters**, 246 (2016), 52-58, **2016** (DOI:[10.1016/j.toxlet.2016.01.003](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.01.003))
21. *Transfer studies of polystyrene nanoparticles in the ex vivo human placenta perfusion model: key sources of artifacts*, 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. Mat.**, 16 (4), 044602, **2015** (DOI:[10.1088/1468-6996/16/4/044602](https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/4/044602))
22. *Polymer adsorption on iron oxide nanoparticles for one-step amino-functionalized silica encapsulation*, **L. Maurizi***, [A. Claveau](#) and H. Hofmann, **J. Nanomater.**, 2015 (2015), ID 732719, **2015** (DOI:[10.1155/2015/732719](https://doi.org/10.1155/2015/732719))
23. *Bidirectional transfer study of Polystyrene nanoparticles across the placental barrier in an ex vivo human placental perfusion model*, S. Grafmueller, P. Manser, L. Diener, P.-A. Diener, X. Maeder-Althaus, **L. Maurizi**, W. Jochum, H. F. Krug, T. Buerki-Thurnherr, U. von Mandach and P. Wick, **Environ. Health Persp.**, 123 (12), 1280-1286, **2015** (DOI:[10.1289/ehp.1409271](https://doi.org/10.1289/ehp.1409271))
24. *The in-vivo use of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles to detect inflammation elicits a cytokine response but does not aggravate experimental arthritis*, E. A. Vermeij, M. B. Bennink, L. Crowe, **L. Maurizi**, J.-P. Vallée, H. Hofmann, P. L.E.M. van Lent, W. B. van den Berg, M. I. Koenders and F. A.J. van de Loo, **PLOS One**, 10 (5), e0126687, **2015** (DOI: [10.1371/journal.pone.0126687](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126687))
25. *Effects of PVA coated nanoparticles on human immune cells*, C. Strehl, T. Gaber, **L. Maurizi**, M. Hahne, R. Rauch, P. Hoff, M. Hofmann-Antenbrink, A. R. Poole, H. Hofmann and F. Buttgereit, **Int. J. Nanomed.**, 2015 (10),3429-3445, **2015** (DOI: [10.2147/IJN.S75936](https://doi.org/10.2147/IJN.S75936))
26. *Significance of surface charge and shell material of Super-paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) based core/shell nanoparticles on the composition of the protein corona*, [U. Sakulkhu](#), M. Mahmoudi, **L. Maurizi**, G. Coullerez, M. Hofmann-Antenbrink, M. Vries, M. Motazacker, F. Rezaee and H. Hofmann, **Biomater. Sci.**, 3, (2), 265-278, **2015** (DOI: [10.1039/C4BM00264D](https://doi.org/10.1039/C4BM00264D)) / **Inside front cover** (DOI: [10.1039/C5BM90006A](https://doi.org/10.1039/C5BM90006A))
27. *Influence of surface charge and polymer coating on internalization and biodistribution of PEG-modified iron oxide nanoparticles*, **L. Maurizi**, A.-L. Papa, L. Dumont, F. Bouyer, P. Walker, D. Vandroux and N. Millot, **J. Biomed. Nanotech.**, 11, (1), 126-136, **2015** (DOI: [10.1166/jbn.2015.1996](https://doi.org/10.1166/jbn.2015.1996))
28. *Fast and continuous synthesis of spinel nanostructured iron oxide in supercritical water: influence of cations and citrates*, **L. Maurizi**, F. Bouyer, M. Ariane, R. Chassagnon and N. Millot, **RSC advances**, 4 (86), 45673-45678, **2014** (DOI: [10.1039/C4RA08562K](https://doi.org/10.1039/C4RA08562K))
29. *Visible light optical coherence correlation spectroscopy*, S. Broillet, D. Szlag, A. Bouwens, **L. Maurizi**, H. Hofmann, T. Lasser and M. Leutenegger, **Optics Express**, 22(18), 21944-21957, **2014** (DOI: [10.1364/OE.22.021944](https://doi.org/10.1364/OE.22.021944))

30. *Ex situ evaluation of the composition of protein corona of intravenously injected superparamagnetic nanoparticles in rats*, 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**, 6, (19), 11439-11450, **2014** (DOI: [10.1039/C4NR02793K](https://doi.org/10.1039/C4NR02793K))
31. *Amino-polyvinyl alcohol coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles are suitable for monitoring of mesenchymal stromal cells in vivo*, F. Schulze, A. Dienelt, S. Geissler, P. Zaslansky, J. Schoon, K. Henzler, P. Guttmann, A. Gramoun, L. A. Crowe, **L. Maurizi**, J.P. Vallée, M. Hofmann, H. Hofmann, GN. Duda and A. Ode, **Small**, 10 (21), 4340-4351, **2014** (DOI: [10.1002/smll.201400707](https://doi.org/10.1002/smll.201400707))
32. *Aqueous stabilisation of suspensions of carbon-encapsulated superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications*, N. Aguiló-Aguayo[†], **L. Maurizi**[†], S. Galmarini, M.G. Ollivier Beuzelin, G. Coullerez, E. Bertran and H. Hofmann, **Dalton T.**, 43 (36), 13764-13775, **2014** (DOI: [10.1039/c4dt00085d](https://doi.org/10.1039/c4dt00085d))
33. *Monitoring the effects of arthritis treatment by MRI in vivo using iron oxide nanoparticle-labeled macrophages*, A. Gramoun, L. A. Crowe, **L. Maurizi**, W. Wirth, F. Tobalem, K. Grosdemange, G. Coullerez, F. Eckstein, M.I. Koenders, W.B. Van den Berg, H. Hofmann and J-P. Vallée, **Arthritis Res. Ther.**, 16 (3), R131, **2014** (DOI: [10.1186/ar4588](https://doi.org/10.1186/ar4588))
34. *Protein Corona Composition of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Various Physico-Chemical Properties and Coatings*, U. Sakulkhu, M. Mahmoudi, **L. Maurizi**, J. Salaklang and H. Hofmann, **Scientific Reports**, 4, 5020, **2014** (DOI: [10.1038/srep05020](https://doi.org/10.1038/srep05020))
35. *Syntheses of cross-linked polymeric superparamagnetic beads with tunable properties*, **RSC Advances**, **L. Maurizi**^{*}, U. Sakulkhu, L. A. Crowe, N. Leclaire, V. Mai Dao, J.-P. Vallée and H. Hofmann, 4 (22), 11142-11146, **2014** (DOI: [10.1039/C3RA48004F](https://doi.org/10.1039/C3RA48004F))
36. *A fast and reproducible method to quantify magnetic nanoparticles biodistribution*, **L. Maurizi**^{*}, U. Sakulkhu, A. Gramoun, J.-P. Vallée and H. Hofmann, **Analyst**, 139 (5), 1184-1191, **2014** (DOI: [10.1039/C3AN02153J](https://doi.org/10.1039/C3AN02153J))
37. *One step continuous hydrothermal synthesis of very fine stabilized superparamagnetic nanoparticles of magnetite*, **L. Maurizi**, F. Bouyer, J. Paris, F. Demoisson, L. Saviot and N. Millot, **Chem. Commun.**, 47, (42), 11706-11708, **2011**, (DOI: [10.1039/C1CC15470B](https://doi.org/10.1039/C1CC15470B))
38. *Synthesis of Titanate Nanotubes Directly Coated with USPIO in Hydrothermal Conditions: A New Detectable Nanocarrier*, A.-L. Papa[†], **L. Maurizi**[†], D. Vandroux, P. Walker and N. Millot, **J. Phys. Chem. C**, 115 (39), 19012-19017, **2011** (DOI: [10.1021/jp2056893](https://doi.org/10.1021/jp2056893))
39. *Easy Route to Functionalize Iron Oxide Nanoparticles via Long-Term Stable Thiol Groups*, **L. Maurizi**, H. Bisht, F. Bouyer and N. Millot, **Langmuir**, 25, (16), 8857-8859, **2009** (DOI: [10.1021/la901602w](https://doi.org/10.1021/la901602w))

Publications dans des actes de congrès à comité de lecture

- i. *Nanoparticles as MRI Contrast Agent for Early Diagnosis of RA: Effects of Amino-PVA-Coated SPIONS on CD4+ T Cell Activity*, C. Strehl, **L. Maurizi**, S. Hermann, T. Häupl, H. Hofmann, F. Buttgereit and T. Gaber, **Ann. Rheum. Dis.**, 75, 901-901, **2016** (DOI: [10.1136/annrheumdis-2016-eular.2244](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-eular.2244))
- ii. *Silica-coated superparamagnetic nanoparticles as contrast agent for magnetic resonance imaging: Synthesis and physiological characterizations*, W. Maneeprakorn, T. Dharakul and **L. Maurizi**, **IEEE, IEEE-Nanotechnology**, 1285-1287, **2015** (DOI: [10.1109/NANO.2015.7388867](https://doi.org/10.1109/NANO.2015.7388867))
- iii. *Impact Of Amino-PVA Coated Nanoparticles On Viability And Cytokine Secretion Of Human Immune Cells Obtained From Healthy Donors And Patients With Rheumatoid Arthritis*, C. Strehl, T. Gaber, M. Jakstadt, M. Hahne, P. Hoff, **L. Maurizi**, H. Hofmann, G.-R. Burmester and F. Buttgereit, **Ann. Rheum. Dis.**, 73, 219-219, **2014** (DOI: [10.1136/annrheumdis-2014-eular.1379](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-eular.1379))
- iv. *Comparison of 3T and 14T MRI in a rat antigen-induced arthritis model*, L. A. Crowe, N. Kunz, I. Friedli, A. Gramoun, K. Grosdemange, **L. Maurizi**, G. Coullerez, M.-G. Beuzelin, R. Gruetter, H. Hofmann and J.-P. Vallée, **Proc. I.S.M.R.M.**, 22, 3838, **2014** ([Link](#))

Chapitres de livres

- a. *New Trends in Macromolecular and Supramolecular Chemistry for Biological Applications* editors Marc J.M. Abadie, Mariana Pinteala and Alexandru Rotaru Chapter 8: *Development of Novel Versatile Theranostic Platforms Based on Titanate Nanotubes: Towards Safe Nanocarriers for Biomedical Applications*, J. Boudon, F. Sallem, A. Loiseau, **L. Maurizi**, A.-L. Papa and N. Millot, **Springer**, 151-178, **2021** (ISBN: [978-3-030-57456-7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-57456-7))
- b. *Computational Techniques for Analytical Chemistry and Bioanalysis* editors P. B. Wilson and M. Grootveld, Chapter 8: *Solid State Chemistry: Computational Chemical Analysis for Materials Science*, E. L. da Silva, S. Galmarini, **L. Maurizi**, M. J. C. dos Santos, T. Yang, D. Cooke and M. Molinari, **RSC**, 287-335, **2020** (ISBN: [978-1-78801-461-8](https://doi.org/10.1039/9781788014618))
- c. *Unraveling the Safety Profile of Nanoscale Particles and Materials - From Biomedical to Environmental Applications* editors A. Ferreira de Castro Gomes and M. Passos Sárria, Chapter 2: *Toxicological Risk Assessment of Emerging Nanomaterials: Cytotoxicity, Cellular Uptake, Effects on Biogenesis and Cell Organelle Activity, Acute Toxicity and Biodistribution of Oxide Nanoparticles*, **L. Maurizi**, A.-L. Papa, J. Boudon, S. Sudhakaran, B. Pruvot, D. Vandroux, J. Chluba, G. Lizard and N. Millot, **InTech**, 17-36, **2018** (ISBN: [978-953-51-3940-9](https://doi.org/10.1081/978-953-51-3940-9))
- d. *Nanoparticles: Drug Inhalation Therapy – Events at Air-Blood Tissue Barrier* editors A. Tsuda, P. Gehr, Section VI: *Special issues Chapter 16: Physicochemical, Colloidal, and Transport Properties*, H. Hofmann, **L. Maurizi**, M.-G. Beuzelin, U. Sakulkhu and V. Bernau, **CRC press**, 251-266, **2015** (ISBN: [9781439892794](https://doi.org/10.1081/9781439892794))

Communications scientifiques

Travaux présentés lors de congrès (54)

29 présentations orales (dont 7 présentations invitées)

25 présentations par poster

Encadrements scientifiques

4 co-encadrements thèses, 14 encadrements de Master 2 et environ 15 de stages et projets d'étudiants de niveau L2 à M1 (non détaillés). Les encadrements les plus significatifs sont détaillés ci-dessous. Des encadrements de thèse et de docteur moins longs mais significatifs sont aussi répertoriés plus bas dans le document. Tous ces encadrements ont donné lieu à **16 publications différentes**.

Doctorantes encadrées

- **Dorra Ben-Elkadhi** (03/23 – en cours), Université de Bourgogne, encadrée à 66% avec Dr. Arnaud Ponche (Université de Haute Alsace).

Sujet : *Nanoparticules dans le sang: optimisation et contrôle de la protéine corona*

Résumé: La nanomédecine est une discipline dont l'intérêt public n'a cessé de croître ces vingt dernières années. La possibilité d'utiliser et de modifier les propriétés physico-chimiques des nanoparticules (NPs) pour cibler et soigner n'importe quelle zone du corps devient de plus en plus encourageante.

Cependant, il existe toujours des freins au futur développement de nanosondes tel que le contrôle de leur comportement biologique. En effet, une fois en contact avec des fluides biologiques et spécifiquement avec le sang qui est la voie d'entrée principale des NPs dans l'organisme, celles-ci vont se recouvrir aléatoirement de protéines. Cette couronne protéique va affecter la clairance, la potentielle toxicité et le ciblage de ces NPs.

Ce projet vise d'abord à étudier les paramètres physicochimiques influençant *in vivo* la biodistribution et la réponse sanguine de NPs modèles utilisées en imagerie médicale pour relier les résultats biologiques observés à la formation *in vivo* de la couronne protéique. Des nanohybrides bio-fonctionnalisés possédant moins d'interactions et donc de toxicité pourront être développés pour l'imagerie médicale ou la thérapie avec un devenir biologique optimisé.

- **Célia Marets** (10/19- en cours), Université de Bourgogne Franche-Comté, encadrée à 60% avec Dr. L. Saviot (DR CNRS).

Sujet : *Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules (NPs) pour l'étude des interactions NPs-protéines*

Résumé : L'objectif de ce projet est de développer des nanoparticules par des méthodes reproductibles et d'étudier l'impact de leurs fonctionnalisations de surface sur l'adsorption de molécules organiques de types polymériques ou protéiques. L'influence de ces molécules sera ensuite corrélée aux comportements des nanoparticules en suspension et sur les environnements biologiques. Des nanoparticules d'or, d'oxyde de fer et de silice ont été produites et caractérisées et leurs surfaces ont été fonctionnalisées soit directement lors de la synthèse soit post-synthèse avec des molécules organiques de type polymères et acides carboxyliques. Les interactions entre ces nanoparticules et les protéines du plasma ont été étudiées

(couronne protéique) montrant la complexité de la mesure de la couronne protéique *in vivo*.

Valorisation : 1 publication

- ✓ *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 and L. Maurizi, **Nanoscale Advances**, 3, 1209-1229, **2021** (DOI: [10.1039/D0NA00863J](https://doi.org/10.1039/D0NA00863J))/ **Inside front cover:** (DOI: [10.1039/D1NA90021H](https://doi.org/10.1039/D1NA90021H))

- **Dr. Annette Luce** (10/16-03/20), Université de Bourgogne, encadrée du 11/16 au 03/20 à 25% (non officiellement reconnu par l'école doctorale) avec Pr. N Millot, Pr. M.-C. Chagnon et Dr. I. Séverin (non reconnue également).

Sujet : *Biotests innovants pour l'évaluation de la toxicité de nanoparticules*

Résumé : L'objectif de cette thèse est de mettre en place et d'éprouver des biotests originaux, robustes et adaptés aux nanoparticules pour évaluer leur cytotoxicité, génotoxicité, leur potentiel cancérigène ainsi que le stress oxydant qu'elles pourraient engendrer. Ces tests représentent un atout car peu ou non développés dans le monde. Tous les résultats de ces études seront discutés et expliqués grâce à la caractérisation fine des nanoparticules étudiées (taille, forme, état d'agglomération, charge de surface, structure, chimie de surface etc.). Ainsi, huit nanoparticules ont été caractérisées et évaluées : des nanoparticules d'oxyde de fer, un lot de nanoparticules nues et trois lots avec recouvrement de PVA (3 longueurs de chaînes différentes) et également deux lots de nanoparticules de dioxyde de silicium et deux lots de nanoparticules d'oxyde de zinc. Ces développements ont été réalisés dans le but d'adapter des biotests aux nanoparticules ainsi que de mettre au point l'utilisation de certaines d'entre elles comme témoin positif dans les expérimentations. Les nanoparticules d'oxyde de fer non recouvertes de PVA ont montré une induction du stress oxydant ainsi qu'un potentiel promoteur de tumeur alors que celles recouvertes de PVA n'ont pas montré de potentiel toxique. Parmi les nanoparticules témoin positif, le lot NM-200 s'est montré particulièrement efficace dans l'induction d'un potentiel promoteur.

- **Dr. Usawadee Sakulku (Hanusch)** (09/09-05/13), Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, encadrée du 02/11 au 05/13 à 50% avec Pr. H. Hofmann.

Sujet : *Preparation of coated nanoparticles and investigation of their behavior in biological environment.*

Résumé: In a biological fluid, proteins associate with nanoparticles (NPs), and the amount and presentation of the proteins on the surface of the particles leads to an *in vivo* response. Proteins compete for the NP "surface" leading to a protein "corona" that largely defines the biological identity of the particle. This is important for assessing nanoparticle toxicity (i.e. translocation into cells and interference with viability and cellular function), for advancing nanoparticles for imaging, drug delivery, and therapeutic applications (i.e. targeting specific cells, organs, or tumors), and for designing multifunctional nanoparticles (i.e., are there dimensional limits to designing nanoparticles that can target and kill diseased cells?). Thus, knowledge of protein adsorption on NPs is important for understanding the nature of the particle surface seen by the functional machinery of cells.

The goals of this thesis are to develop approaches to study NP-protein interaction based on superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) core as well as different surface materials (polymer, inorganic, metallic). The superparamagnetic property of SPION core benefits an easy magnetically separation. In addition, these particles will be used for protein corona and biodistribution studies. Determining protein composition on NPs would facilitate understanding of NP fate *in vitro* and *in vivo*.

A series of NPs with different surface properties were applied into serum with the same serum: nanoparticle surface ratio. Surface property was found to play a very significant role in determining the protein coronas on the different particles of identical materials. For *in vitro* fetal bovine serum protein adsorption, most of serum proteins generally prefer to bind on the positively charged PVA and inorganic coated SPION more than to the negatively charged nanoparticles. The high number of proteins bound on the negatively charged TiO₂ coated SPION and negatively charged gold-coated SPION resulted from a surface material specificity of these 2 materials. *In vivo* protein adsorption evidences have tended to contradict established theories on *in vitro* subject. *In vivo* serum proteins preferred to bind on the neutral and negatively charged PVA coated nanoparticles more than on the positively charged PVA coated nanoparticles. The absence of protein sharing between the positively to neutral and to negatively charged nanoparticles, as well as the presence of more than 20 proteins sharing between the neutral and negatively charged nanoparticles resulted in the difference of biodistribution. At 15 min post-injection, most of the particles were detected in serum at 39 ± 9%, 74 ± 3% and 76 ± 3% for the positively, neutral and negatively charged PVA coated SPION, respectively. The nanoparticles also observed in the liver with the percentage of 35±5, 5±0 and 7±1, respectively. A hepatic uptake of the positively charged nanoparticles increased during 7 days post-injection, in the meantime, SPION degradation was observed.

This thesis achieved the successful synthesis of core/shell nanoparticle with different surface chemistry and surface charge, and the development of tools for protein adsorption studies. NP surface properties strongly impact on protein adsorption both *in vitro* and *in vivo*. It is shown that the protein compositions of the protein corona influence significantly the biodistribution and toxicity of NPs. The observed differences of *in vitro* and *in vivo* results regarding to the protein adsorption raise questions of validity/reliability to the transfer of conclusions from *in vitro* to *in vivo* evidence.

Valorisations : 7 publications

- ✓ *Beyond unpredictability: the importance of reproducibility in understanding the protein corona of nanoparticles*, S. Galmarini, U. Hanusch (ex Sakulkhu), M. Giraud, N. Cayla, D. Chiappe, N. von Moos, H. Hofmann and **L. Maurizi**, **Bioconjugate Chem.**, 29 (10), 3385-3393, **2018** (DOI: [10.1021/acs.bioconjchem.8b00554](https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00554))
- ✓ *Significance of surface charge and shell material of Super-paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) based core/shell nanoparticles on the composition of the protein corona*, U. Sakulkhu, M. Mahmoudi, **L. Maurizi**, G. Coullerez, M. Hofmann-Antenbrink, M. Vries, M. Motazacker, F. Rezaee and H. Hofmann, **Biomater. Sci.**, 3, (2), 265-278, **2015** (DOI: [10.1039/C4BM00264D](https://doi.org/10.1039/C4BM00264D)) / **Inside front cover** (DOI: [10.1039/C5BM90006A](https://doi.org/10.1039/C5BM90006A))

- ✓ *Ex situ evaluation of the composition of protein corona of intravenously injected superparamagnetic nanoparticles in rats*, 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**, 6, (19), 11439-11450, **2014** (DOI: [10.1039/C4NR02793K](https://doi.org/10.1039/C4NR02793K))
- ✓ *Protein Corona Composition of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Various Physico-Chemical Properties and Coatings*, U. Sakulkhu, M. Mahmoudi, **L. Maurizi**, J. Salaklang and H. Hofmann, **Scientific Reports**, 4, 5020, **2014** (DOI: [10.1038/srep05020](https://doi.org/10.1038/srep05020))
- ✓ *Syntheses of cross-linked polymeric superparamagnetic beads with tunable properties*, **RSC Advances**, **L. Maurizi**, U. Sakulkhu, L. A. Crowe, N. Leclaire, V. Mai Dao, J.-P. Vallée and H. Hofmann, 4 (22), 11142-11146, **2014** (DOI: [10.1039/C3RA48004F](https://doi.org/10.1039/C3RA48004F))
- ✓ *A fast and reproducible method to quantify magnetic nanoparticles biodistribution*, **L. Maurizi**, U. Sakulkhu, A. Gramoun, J.-P. Vallée and H. Hofmann, **Analyst**, 139 (5), 1184-1191, **2014** (DOI: [10.1039/C3AN02153J](https://doi.org/10.1039/C3AN02153J))
- ✓ *Nanoparticles: Drug Inhalation Therapy – Events at Air-Blood Tissue Barrier* editors A. Tsuda, P. Gehr, *Section VI: Special issues Chapter 16: Physicochemical, Colloidal, and Transport Properties*, H. Hofmann, **L. Maurizi**, M.-G. Beuzelin, U. Sakulkhu and V. Bernau, **CRC press**, 251-266, **2015** (ISBN: [9781439892794](https://doi.org/9781439892794))

« Thèses » de Master 2 encadrées

- **Leya Liu** (02/23- en cours), Ingénieure ESIREM et Master 2 Université de Bourgogne encadrée à 50% avec Dr. O. Piétrement
Sujet : *Stabilisation et fonctionnalisation de nanoparticules de sépiolite*
- **Aicha Hamidi** (03/22-06/22), Master 2 Université de Strasbourg encadrée à 50% avec Célia Marets.
Sujet : *Development of Nanoparticles & understanding and control of their blood interactions*
- **Sullivan Guy** (02/21-06/21), Master 2 Université de Bourgogne Franche-Comté encadré à 50% avec Célia Marets.
Sujet : *Studies and control of the surface chemistry of nanoparticles for better interaction with proteins*
- **Dihia Refsi** (02/19-06/19), Master 2 Université de Caen encadrée à 100%
Sujet : *NPs d'oxyde de fer pour applications biomédicales : Influence de la chimie de surface sur leurs comportements biologiques*
- **Amar Alok** (02/19-06/19), Master 2 Université de Bourgogne Franche-Comté encadré à 33% avec Pr. N. Milot et Dr. L. Saviot
Sujet : *Synthesis of gold and silver nanoparticles for studies of stability*
- **Victoire Asila** (02/18-06/18), Master 2 UPMC Paris encadrée à 100%
Sujet : *Nanoparticules d'oxydes de fer pour l'imagerie médicale et la thérapie : synthèse, fonctionnalisation et étude de biocirculation*

- **Manon Giraud** (09/14-01/15), Master 2 EPFL encadrée à 100%
Sujet : *Investigation of the proteins affinity for negatively charged Silica-coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*
Valorisation : **1 publication**
 - ✓ *Beyond unpredictability: the importance of reproducibility in understanding the protein corona of nanoparticles*, S. Galmarini, U. Hanusch (ex Sakulkhu), M. Giraud, N. Cayla, D. Chiappe, N. von Moos, H. Hofmann and **L. Maurizi**, **Bioconjugate Chem.**, 29 (10), 3385-3393, **2018** (DOI: [10.1021/acs.bioconjchem.8b00554](https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00554))
- **Noelie Cayla** (02/14-06/14), Master 2 EPFL emcadrée à 100%
Sujet : *Investigation of the protein affinity of negatively charged Silica-coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*
Valorisation : **1 publication**
 - ✓ *Beyond unpredictability: the importance of reproducibility in understanding the protein corona of nanoparticles*, S. Galmarini, U. Hanusch (ex Sakulkhu), M. Giraud, N. Cayla, D. Chiappe, N. von Moos, H. Hofmann and **L. Maurizi**, **Bioconjugate Chem.**, 29 (10), 3385-3393, **2018** (DOI: [10.1021/acs.bioconjchem.8b00554](https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00554))
- **Mehdi Ahmadi** (02/14-06/14), Master 2 EPFL encadré à 100%
Sujet : *Co-encapsulation of superparamagnetic iron oxide and gold nanoparticles by silica coating via microemulsion method*
- **Alexis Claveau** (09/13-01/10), Master 2 EPFL à 100%
Sujet : *Investigation and optimization of the covalent grafting of polymers on SPIONs by crosslinking of silica precursors.*
Valorisation : **1 publication**
 - ✓ *Polymer adsorption on iron oxide nanoparticles for one-step amino-functionalized silica encapsulation*, **L. Maurizi**, A. Claveau and H. Hofmann, **J. Nanomater.**, 2015 (2015), ID 732719, **2015** (DOI:[10.1155/2015/732719](https://doi.org/10.1155/2015/732719))
- **Katarina Ilic** (02/12-07/12), Master Université de Waterloo encadrée à 50% avec Pr. H. Hofmann
Sujet : *Understanding the Transport Processes of Nanoparticles in Fluidic Media*
- **Vanessa Mai Dao** (02/12-06/12), Master 2 EPFL encadrée à 100%
Sujet : *Fluorescent Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications*
Valorisation : **1 publication**
 - ✓ *Syntheses of cross-linked polymeric superparamagnetic beads with tunable properties*, **RSC Advances**, **L. Maurizi**, U. Sakulkhu, L. A. Crowe, N. Leclaire, V. Mai Dao, J.-P. Vallée and H. Hofmann, 4 (22), 11142-11146, **2014** (DOI: [10.1039/C3RA48004F](https://doi.org/10.1039/C3RA48004F))

- **Nicolas Leclaire** (02/12-06/12), Master 2 EPFL encadré à 100%
Sujet: *Synthesis and characterization of silica-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications*
Valorisation : 1 publication
 - ✓ *Syntheses of cross-linked polymeric superparamagnetic beads with tunable properties*, **RSC Advances**, **L. Maurizi**, **U. Sakulkhu**, L. A. Crowe, **N. Leclaire**, **V. Mai Dao**, J.-P. Vallée and H. Hofmann, 4 (22), 11142-11146, **2014** (DOI: [10.1039/C3RA48004F](https://doi.org/10.1039/C3RA48004F))
- **Jérémy Paris** (02/10-06/10), Master 2 Université de Bourgogne encadré à 50% avec Pr. N. Millot
Sujet : *Elaboration de nanoparticules d'oxydes de fer pour applications biomédicales : synthèse et fonctionnalisation*
Valorisation : 1 publication
 - ✓ *One step continuous hydrothermal synthesis of very fine stabilized superparamagnetic nanoparticles of magnetite*, **L. Maurizi**, F. Bouyer, **J. Paris**, F. Demoisson, L. Saviot and N. Millot, **Chem. Commun.**, 47, (42), 11706-11708, **2011**, (DOI: [10.1039/C1CC15470B](https://doi.org/10.1039/C1CC15470B))

Encadrements significatifs plus courts

- **Dr. Weerakanya Maneepakorn** (06/11-09/11), Docteure de Nanotech Thaïlande encadrée à 50% avec Pr. H. Hofmann
Sujet : *Transfert de technologie pour une nouvelle thématique sur les oxydes de fer biocompatibles en Thaïlande*
Valorisations : 3 publications
 - ✓ *Characterization of liposome-containing SPIONs conjugated with anti-CD20 developed as a novel theranostic agent for central nervous system lymphoma*, S. Saesoo, S. Sathornsumetee, P. Anekwiang, C. Treetidnipa, P. Thuwajit, S. Bunthot, **W. Maneepakorn**, **L. Maurizi**, H. Hofmann, R. U. Rungsardthong and N. Saengkrit, **Colloids Surface B**, 161 (2018), 497-507, **2018** (DOI: [10.1016/j.colsurfb.2017.11.003](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.003))
 - ✓ *Superparamagnetic nanohybrids with cross-linked polymers providing higher in vitro stability*, **W. Maneepakorn**, **L. Maurizi**, H. Siriket; T Wutikhun, T. Dharakul and H. Hofmann, **J. Mater. Sci.**, 52 (16), 9249-9261, **2017** (DOI: [10.1007/s10853-017-1098-2](https://doi.org/10.1007/s10853-017-1098-2))
 - ✓ *Silica-coated superparamagnetic nanoparticles as contrast agent for magnetic resonance imaging: Synthesis and physiological characterizations*, **W. Maneepakorn**, T. Dharakul and **L. Maurizi**, **IEEE**, IEEE-Nanotechnology, 1285-1287, **2015** (DOI: [10.1109/NANO.2015.7388867](https://doi.org/10.1109/NANO.2015.7388867))

- **Cintia Marques** (10/19-11/19), Doctorante de l'Université de Genève encadrée pendant 1 mois à 100%

Sujet : *Syntheses of stabilized iron oxide nanoparticles to study their interactions with proteins*

Valorisation : 1 publication

- ✓ *Characterization Challenges of Self-Assembled Polymer-SPIONs Nanoparticles: Benefits of Orthogonal Methods*, C. Marques, **L. Maurizi**, G. Borchard and O. Jordan, **Int. J. Mol. Sci.**, 23 (24), 16124, **2022** (DOI: [10.3390/ijms232416124](https://doi.org/10.3390/ijms232416124))

- **Nadia von Moos** (2011-2015), Doctorante de l'Université de Genève encadrée pendant quelques études de sa thèse notamment sur les caractérisations de NPs

Sujet : *Acute oxidative stress responses in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to metal oxide nanoparticles*

Valorisations : 2 publications

- ✓ *Beyond unpredictability: the importance of reproducibility in understanding the protein corona of nanoparticles*, S. Galmarini, U. Hanusch (ex Sakulkhu), M. Giraud, N. Cayla, D. Chiappe, N. von Moos, H. Hofmann and **L. Maurizi**, **Bioconjugate Chem.**, 29 (10), 3385-3393, **2018** (DOI: [10.1021/acs.bioconjchem.8b00554](https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00554))
- ✓ *Pro-oxidant effects of nano-TiO₂ on *Chlamydomonas reinhardtii* during short-term exposure*, N. von Moos, V. B. Koman, C. Santschi, O. J.F. Martin, **L. Maurizi**, A. Jayaprakash, P. Bowen and V. I. Slaveykova, **RSC advances**, 6 (116), 115271-115283, **2016** (DOI: [10.1039/C6RA16639C](https://doi.org/10.1039/C6RA16639C))

- **Noemí Aguiló Aguayo** (01/08-11/12), Doctorante de l'Université de Barcelone encadrée à 100% pendant sa visite de 3 mois à l'EPFL pour stabilisation colloïdale de NPs de Fe@C.

Sujet : *Production and characterisation of carbon-encapsulated iron nanoparticles by arc-discharge plasma*

Valorisation : 1 publication

- ✓ *Aqueous stabilisation of suspensions of carbon-encapsulated superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications*, N. Aguiló-Aguayo[†], **L. Maurizi[†]**, S. Galmarini, M.G. Ollivier Beuzelin, G. Coullerez, E. Bertran and H. Hofmann, **Dalton T.**, 43 (36), 13764-13775, **2014** (DOI: [10.1039/c4dt00085d](https://doi.org/10.1039/c4dt00085d))

Principales expériences dans l'animation de recherche

Dans cette partie seront présentés seulement les projets de recherche internationaux, nationaux et industrielles les plus significatifs que j'ai portés et dirigés.

Recherche internationale

Université de Greifswald, Allemagne (2023-en cours)

Collaboration sur les caractérisations de NPs produites à partir d'implants orthopédiques.

Tâches principales en tant que responsable du projet :

- ⇒ Caractérisations fines de la cristallographie, la morphologie et la chimie de surface.
- ⇒ Mise en place d'analyses de la couronne protéiques *in vitro* and *in situ*

Université de Genève (2019-en cours)

Collaboration avec l'Université de Genève : compréhension interface protéines/nanoparticules

Tâches principales en tant que responsable du projet :

- ⇒ Contrat de collaboration entre UBFC et Université de Genève signé en septembre 2020
- ⇒ Echanges d'étudiants entre les 2 universités entre 2019 et 2021 → 1 publication

Stanford collaborative Research (en cours: 2021-2023)

Lauréat 2020 de la bourse de l'université de Stanford (15 k\$) pour collaborer avec Stanford Medicine sur le marquage de cellules avec des nanoparticules. La bourse a été décalée en 2021-2022 à cause de la situation sanitaire.

Tâches principales en tant que responsable du projet :

- ⇒ Mission à Stanford en 2022 pour collaborer avec Stanford Medicine → 1 publication
- ⇒ Accueil d'une étudiante de Bachelor de Stanford à l'été 2022

Nanotec Thaïlande (2011-2014)

Collaborations entre la Suisse et la Thaïlande pour développer des nanoparticules à applications biomédicales.

Tâches principales en tant que responsable du projet :

- ⇒ Accueil et encadrement d'une scientifique de Nanotec (3 mois)
- ⇒ 2 missions pour transfert de technologie dans 4 équipes de Nanotec → 3 publications

Projet européen Nanodiara (2011-2014)

Leader du Work Package 1 (*Particle coating and functionalisation and novel equipment for coating and separation*) du projet européen FP7 **Nanodiara**. Ce WP1 était central aux 6 autres WP regroupant 14 groupes européens.

Tâches principales en tant que responsable du projet :

- ⇒ Responsable d'une équipe de 3 à 7 personnes (doctorants, Master, techniciens)
- ⇒ Co-encadrements d'une doctorante et de 4 stages de Master 2 → 8 publications
- ⇒ Transferts de technologies entre laboratoire et Merck (partenaire du projet)
- ⇒ Collaborations internationales pour recherche de solutions transverses:
 - Hôpital Charité Berlin (D) → 6 publications
 - Hôpitaux de Genève (CH) → 7 publications

Recherche nationale

Projet ANR Nanoblrona (2022-2025)

Projet ANR JC/JC 2021 Nanoblrona (Jeune Chercheur/Jeune Chercheure : 254 k€) sur la compréhension et le contrôle des interactions *in vivo* entre protéines et nanoparticules.

Tâches principales en tant que responsable du projet (à venir) :

- ⇒ Recrutement d'une doctorante et de 3 stages de Master 2 (1 en cours)
- ⇒ Collaborations pour le projet :
 - Régionales (CHU, INSERM, Etablissement français du sang)
 - Internationales (Uni Genève et Stanford) avec potentielles missions du doctorant

Projet régional Bourgogne Franche-Comté Nanoprot (2019-2022)

Projet ANER Nanoprot (accompagnement d'une nouvelle équipe de recherche : 40 k€) couplé à un projet Imappi (Equipement d'excellence (EQUIPEX) – IMAPPI : Integrated magnetic resonance and positron emission tomography in preclinical imaging de 2019 à 2020 : 15 k€) et au recrutement d'une doctorante (Célia Marets : 91 k€) en 2019 sur une bourse MER. Ce projet s'inscrit dans la compréhension du rôle de la chimie de surface des nanoparticules sur l'adsorption de protéines et sur la toxicité des nanoparticules.

Tâches principales en tant que responsable du projet :

- ⇒ Recrutement et co-encadrement d'une doctorante et de 2 stages de M2 → 1 publication
- ⇒ Collaborations pour le projet :
 - Régionales (CHU, INSERM)
 - Suisses (Uni Genève) avec mission de la doctorante en 2022.

Recherche industrielle

Société Ovivo à Basel, Suisse (2018-2022)

Démarrage d'une collaboration avec la société Ovivo en Suisse pour le développement de nanoparticules dans le traitement de l'eau.

Tâches principales en tant que responsable académique du projet :

- ⇒ Démarchage et réunion avec l'industriel
- ⇒ Développement et analyses de nanoparticules
- ⇒ Contrat de confidentialité signé

Projet SNF industriel (2013-2014)

Projet industriels entre l'EPFL et une société suisse (500 kCHF) pour aide à la compréhension et à l'analyse de matériaux spécifiques.

Tâches principales en tant que responsable académique du projet :

- ⇒ Responsable du technicien dédié à ce projet
- ⇒ Adaptation méthodes de laboratoire pour applications industrielles
- ⇒ Organisation de réunion, mission sur installations Développement de nanoparticules

Enseignements

Enseignements	
Depuis 09/17	<u>5^{ème} année d'école d'ingénieur (ESIREM)</u>
Université Bourgogne	Travaux personnels encadrés (36 h par an)
Environ 50h / an	<u>4^{ème} année d'école d'ingénieur et/ou 2^{ème} année de Master</u>
	Suivi de stages (6 à 18 h par an)
	<u>1^{ère} et/ou 2^{ème} année de Master</u>
	Membre des jurys de soutenances de stages
02/11 / 02/15	<u>Bachelor à PhD</u>
EPFL	Synthèses et caractérisations de nanomatériaux
	(15 h TP par an / 15 h TD par an)
11/07 / 12/10	<u>2008 – 2010 : 3^{ème} année Ecole Ingénieurs (AgroSup Dijon)</u>
Université Bourgogne	Techniques industrielles (96 h TP)
1 an de vacances puis	<u>2007 – 2008 : 2^{ème} année DUT (IUT Mes. Phys. le Creusot)</u>
2 ans de Monitorat	Caractérisations physicochimiques (48 h TP / 16 h TD)

Responsabilités collectives et diffusion de la culture scientifique

Responsabilités collectives

Depuis 2022	Directeur adjoint du département Nanosciences du laboratoire ICB : Co-rédaction de la partie projet de recherche du dossier HCERES 2022
Depuis 2020	Editeur chez MDPI (Multidisciplinary Digital Publishing Institute)
2019	Examineur de la thèse de Dr. C. Gestraud
2019	Evaluation de projets scientifiques pour l'ANSES
Depuis 2017	Membre du conseil de laboratoire du laboratoire ICB
Depuis 2011	Rapporteurs d'articles scientifiques : Scientific reports, RSC (Nanoscale, Nanoscale Horizons), Science of the Total Environment, Applied Surface Science etc.

Diffusion de la culture scientifique

Depuis 2019	Co-organisateur de l'évènement une classe un chercheur Visite de collèges et lycées et accueils d'élèves au laboratoire pour échanger sur les métiers de la recherche
2018	Organisation d'une Action Nationale de Formation CNRS : ANF Nanomed <i>Quels verrous restent-ils à lever pour la nanomédecine de demain ?</i> 64 participants du 25 au 28 juin 2018.
Depuis 2017	Participation aux journées portes ouvertes de l'Université de Bourgogne

Bibliographie

- Abushrida A, Elhuni I, Taresco V, et al (2020) A simple and efficient method for polymer coating of iron oxide nanoparticles. *J Drug Deliv Sci Technol* 55:101460. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101460>
- Aguiló-Aguayo N, Maurizi L, Galmarini S, et al (2014) Aqueous stabilisation of carbon-encapsulated superparamagnetic α -iron nanoparticles for biomedical applications. *Dalton Trans* 43:13764–13775. <https://doi.org/10.1039/C4DT00085D>
- Aimable A (2007) Synthèse hydrothermale en continu et en conditions supercritiques du matériau d'électrode positive des batteries Li-ion LiFePO₄ : du matériau au procédé. Université de Bourgogne. [lien](#)
- Ali LMA, Gutiérrez M, Cornudella R, et al (2013) Hemostasis Disorders Caused by Polymer Coated Iron Oxide Nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol* 9:1272–1285. <https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1637>
- Andreas K, Georgieva R, Ladwig M, et al (2012) Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking. *Biomaterials* 33:4515–4525. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.064>
- Augustine R, Hasan A, Primavera R, et al (2020) Cellular uptake and retention of nanoparticles: Insights on particle properties and interaction with cellular components. *Mater Today Commun* 25:101692. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101692>
- Babes L, Denizot B, Tanguy G, et al (1999) Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Used as MRI Contrast Agents: A Parametric Study. *J Colloid Interface Sci* 212:474–482. <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.6053>
- Basly B, Popa G, Fleutot S, et al (2013) Effect of the nanoparticle synthesis method on dendronized iron oxides as MRI contrast agents. *Dalton Trans* 42:2146–2157. <https://doi.org/10.1039/C2DT31788E>
- Bath PMW, Butterworth RJ (1996) Platelet size: Measurement, physiology and vascular disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 7:157–161. <https://doi.org/10.1097/00001721-199603000-00011>
- Beckmann N, Falk R, Zurbrügg S, et al (2003) Macrophage infiltration into the rat knee detected by MRI in a model of antigen-induced arthritis. *Magn Reson Med* 49:1047–1055. <https://doi.org/10.1002/mrm.10480>
- Bee A, Massart R, Neveu S (1995) Synthesis of very fine maghemite particles. *J Magn Magn Mater* 149:6–9. [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(95\)00317-7](https://doi.org/10.1016/0304-8853(95)00317-7)

Bibliographie

- Belin T (2002) Interface externe et propriétés structurales d'un solide nanométrique : cas de nanocristaux de g-Fe₂O₃ adsorption d'eau et transition de phase g-a. These de doctorat, Université de Bourgogne. [lien](#)
- Bellat V (2012) Ingénierie d'un nouveau nanobiohybride à base de nanorubans de titanates pour la médecine régénérative. These de doctorat, Université de Bourgogne. [lien](#)
- Bishop CJ, Tzeng SY, Green JJ (2015) Degradable polymer-coated gold nanoparticles for co-delivery of DNA and siRNA. *Acta Biomater* 11:393–403. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.09.020>
- Bittner A, Gosselet F, Sevin E, et al (2021) Time-Dependent Internalization of Polymer-Coated Silica Nanoparticles in Brain Endothelial Cells and Morphological and Functional Effects on the Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci* 22:1657. <https://doi.org/10.3390/ijms22041657>
- Böhmert L, Voß L, Stock V, et al (2020) Isolation methods for particle protein corona complexes from protein-rich matrices. *Nanoscale Adv* 2:563–582. <https://doi.org/10.1039/C9NA00537D>
- Bonvin D, Chiappe D, Moniatte M, et al (2017) Methods of protein corona isolation for magnetic nanoparticles. *Analyst* 142:3805–3815. <https://doi.org/10.1039/C7AN00646B>
- Briley-Saebo K, Bjornerud A, Grant D, et al (2004) Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats: implications for magnetic resonance imaging. *Cell Tissue Res* 316:315–323. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0884-8>
- Brochet B, Deloire MSA, Touil T, et al (2006) Early macrophage MRI of inflammatory lesions predicts lesion severity and disease development in relapsing EAE. *Neuroimage* 32:266–274. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.03.028>
- Cao Z, Peng F, Hu Z, et al (2017) In vitro cellular behaviors and toxicity assays of small-sized fluorescent silicon nanoparticles. *Nanoscale* 9:7602–7611. <https://doi.org/10.1039/c7nr00530j>
- Cerrato CP, Langel Ü (2018) Cell-Penetrating Peptides Targeting Mitochondria. In: Oliveira PJ (ed) *Mitochondrial Biology and Experimental Therapeutics*. Springer International Publishing, Cham, pp 593–611
- Chastellain M, Petri A, Hofmann H (2004) Particle size investigations of a multistep synthesis of PVA coated superparamagnetic nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* 278:353–360. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.06.025>
- Chastellain M, Petri A, Hofmann H (2003) Superparamagnetic Iron Oxide Nanoarticles for Biomedical Applications: a focus on PVA as a coating. *MRS Online Proc Libr* 789:87–90. <https://doi.org/10.1557/PROC-789-N11.21>

Bibliographie

- Dai Q, Yan Y, Ang C-S, et al (2015) Monoclonal Antibody-Functionalized Multilayered Particles: Targeting Cancer Cells in the Presence of Protein Coronas. *Acs Nano* 9:2876–2885. <https://doi.org/10.1021/nn506929e>
- De Crozals G, Bonnet R, Farre C, Chaix C (2016) Nanoparticles with multiple properties for biomedical applications: A strategic guide. *Nano Today* 11:435–463. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.07.002>
- Demirer GS, Okur AC, Kizilel S (2015) Synthesis and design of biologically inspired biocompatible iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *J Mater Chem B* 3:7831–7849. <https://doi.org/10.1039/C5TB00931F>
- Demoisson F (2015) Habilitation à Diriger des Recherches: R&D dans les entrailles de l'infiniment petit ... ou presque. Université de Bourgogne
- Docter D, Westmeier D, Markiewicz M, et al (2015) The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned - challenge accepted? *Chem Soc Rev* 44:6094–6121. <https://doi.org/10.1039/c5cs00217f>
- Du X-J, Wang J-L, Liu W-W, et al (2015) Regulating the surface poly(ethylene glycol) density of polymeric nanoparticles and evaluating its role in drug delivery in vivo. *Biomaterials* 69:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.048>
- Elliott JT, Rösslein M, Song NW, et al (2017) Toward achieving harmonization in a nanocytotoxicity assay measurement through an interlaboratory comparison study. *ALTEX - Altern Anim Exp* 34:201–218. <https://doi.org/10.14573/altex.1605021>
- Forest V, Pourchez J (2016) The nanoparticle protein corona: The myth of average. *Nano Today* 11:700–703. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.10.007>
- Galmarini S, Hanusch U, Giraud M, et al (2018) Beyond Unpredictability: The Importance of Reproducibility in Understanding the Protein Corona of Nanoparticles. *Bioconjug Chem* 29:3385–3393. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00554>
- Gavilan H, Rizzo GMR, Silvestri N, et al (2023) Scale-up approach for the preparation of magnetic ferrite nanocubes and other shapes with benchmark performance for magnetic hyperthermia applications. *Nat Protoc* 18:783–+. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00779-3>
- Gillich T, Acikgoez C, Isa L, et al (2013) PEG-Stabilized Core-Shell Nanoparticles: Impact of Linear versus Dendritic Polymer Shell Architecture on Colloidal Properties and the Reversibility of Temperature-Induced Aggregation. *Acs Nano* 7:316–329. <https://doi.org/10.1021/nn304045q>

Bibliographie

- Gonzalez-Moragas L, Yu S-M, Carezza E, et al (2015) Protective Effects of Bovine Serum Albumin on Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Evaluated in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *ACS Biomater Sci Eng* 1:1129–1138. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00253>
- Grafmueller S, Manser P, Diener L, et al (2015) Bidirectional Transfer Study of Polystyrene Nanoparticles across the Placental Barrier in an ex Vivo Human Placental Perfusion Model. *Environ Health Perspect* 123:1280–1286. <https://doi.org/10.1289/ehp.1409271>
- Gramoun A, Crowe LA, Maurizi L, et al (2014) Monitoring the effects of dexamethasone treatment by MRI using in vivo iron oxide nanoparticle-labeled macrophages. *Arthritis Res Ther* 16:R131. <https://doi.org/10.1186/ar4588>
- Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, et al (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:11613–11618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801763105>
- Gupta AK, Naregalkar RR, Vaidya VD, Gupta M (2007) Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomed* 2:23–39. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.1.23>
- Hajipour MJ, Laurent S, Aghaie A, et al (2014) Personalized protein coronas: a “key” factor at the nanobiointerface. *Biomater Sci* 2:1210–1221. <https://doi.org/10.1039/C4BM00131A>
- Hajipour MJ, Raheb J, Akhavan O, et al (2015) Personalized disease-specific protein corona influences the therapeutic impact of graphene oxide. *Nanoscale* 7:8978–8994. <https://doi.org/10.1039/c5nr00520e>
- Hamad-Schifferli K (2015) Exploiting the novel properties of protein coronas: emerging applications in nanomedicine. *Nanomed* 10:1663–1674. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.6>
- Hilger I, Kaiser WA (2012) Iron oxide-based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia. *Nanomed* 7:1443–1459. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.112>
- Hoang KNL, Wheeler KE, Murphy CJ (2022) Isolation Methods Influence the Protein Corona Composition on Gold-Coated Iron Oxide Nanoparticles. *Anal Chem*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c05243>
- Hunt CP, Singer MJ, Kletetschka G, et al (1995) Effect of citrate-bicarbonate-dithionite treatment on fine-grained magnetite and maghemite. *Earth Planet Sci Lett* 130:87–94. [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(94\)00256-X](https://doi.org/10.1016/0012-821X(94)00256-X)

Bibliographie

- Jolivet JP, Belleville P, Tronc E, Livage J (1992) Influence of Fe(II) on the Formation of the Spinel Iron Oxide in Alkaline Medium. *Clays Clay Miner* 40:531–539. <https://doi.org/10.1346/CCMN.1992.0400506>
- Jolivet J-P, Chanéac C, Tronc E (2004) Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. *Chem Commun* 481–483. <https://doi.org/10.1039/B304532N>
- Kania G, Sternak M, Jaształ A, et al (2018) Uptake and bioreactivity of charged chitosan-coated superparamagnetic nanoparticles as promising contrast agents for magnetic resonance imaging. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 14:131–140. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.09.004>
- Kao CH, Su WM, Li CY, et al (2018) Fabrication and characterization of ZnS/ZnO core shell nanostructures on silver wires. *Aip Adv* 8:065106. <https://doi.org/10.1063/1.5027015>
- Ke PC, Lin S, Parak WJ, et al (2017) A Decade of the Protein Corona. *ACS Nano*. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08008>
- Khairnar S, Pagare P, Thakre A, et al (2022) Review on the Scale-Up Methods for the Preparation of Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutics* 14:1886. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091886>
- Khodavirdilo B (2012) A cheap and simple method for determining of Antibiotics in pharmaceutical products by using Prussian Blue reaction. *Asian J Biomed Pharm Sci* 2:65–71. [lien](#)
- Kiru L, Zlitni A, Tousley AM, et al (2022) In vivo imaging of nanoparticle-labeled CAR T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119:e2102363119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2102363119>
- Kottana RK, Maurizi L, Schnoor B, et al (2021) Anti-Platelet Effect Induced by Iron Oxide Nanoparticles: Correlation with Conformational Change in Fibrinogen. *Small* 17:2004945. <https://doi.org/10.1002/sml.202004945>
- Kralj S, Drogenik M, Makovec D (2011) Controlled surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles with terminal amino and carboxyl groups. *J Nanoparticle Res* 13:2829–2841. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0171-4>
- Kumar CSSR, Mohammad F (2011) Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 63:789–808. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.008>
- Le Renard P-E, Jordan O, Faes A, et al (2010) The in vivo performance of magnetic particle-loaded injectable, in situ gelling, carriers for the delivery of local hyperthermia. *Biomaterials* 31:691–705. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.091>

Bibliographie

- Lee KL, Shukla S, Wu M, et al (2015) Stealth filaments: Polymer chain length and conformation affect the in vivo fate of PEGylated potato virus X. *Acta Biomater* 19:166–179. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.03.001>
- Leray A (2022) Habilitation à Diriger des Recherches: Apport de la micro(spectro)scopie optique à la biologie. Université de Bourgogne
- Lewinski N, Colvin V, Drezek R (2008) Cytotoxicity of nanoparticles. *Small Weinh Bergstr Ger* 4:26–49. <https://doi.org/10.1002/smll.200700595>
- Li Y, Zhang Z, Huang J, et al (2023) A fast-acting brain-targeted nano-delivery system with ultra-simple structure for brain emergency poisoning rescue. *Nanoscale* 15:4852–4862. <https://doi.org/10.1039/d2nr05093e>
- Loiseau A (2017) Nanotubes de titanate comme nanovecteurs polyvalents : radiosensibilisants du cancer de la prostate et sondes pour l'imagerie nucléaire. These de doctorat, Université Bourgogne Franche-Comté. [lien](#)
- Lomora M, Garni M, Itef F, et al (2015) Polymersomes with engineered ion selective permeability as stimuli-responsive nanocompartments with preserved architecture. *Biomaterials* 53:406–414. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.080>
- Luce A (2020) Biotests innovants pour l'évaluation de la toxicité de nanoparticules. Université de Bourgogne. [lien](#)
- Lundqvist M, Stigler J, Elia G, et al (2008) Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci* 105:14265–14270. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805135105>
- Mahmoudi M, Sheibani S, Milani AS, et al (2015) Crucial role of the protein corona for the specific targeting of nanoparticles. *Nanomed* 10:215–226. <https://doi.org/10.2217/NNM.14.69>
- Mamaeva V, Sahlgren C, Linden M (2013) Mesoporous silica nanoparticles in medicine-Recent advances. *Adv Drug Deliv Rev* 65:689–702. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.018>
- Maneprakorn W, Maurizi L, Siriket H, et al (2017) Superparamagnetic nanohybrids with cross-linked polymers providing higher in vitro stability. *J Mater Sci* 52:9249–9261. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1098-2>
- Marets C (en cours) Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules (NPs) pour l'étude des interactions NPs-protéines. Université de Bourgogne Franche-Comté
- Marins JA, Montagnon T, Ezzaier H, et al (2018) Colloidal Stability of Aqueous Suspensions of Polymer-Coated Iron Oxide Nanorods: Implications for Biomedical Applications. *ACS Appl Nano Mater* 1:6760–6772. <https://doi.org/10.1021/acsanm.8b01558>

Bibliographie

- Marques C, Hajipour MJ, Marets C, et al (2023) Identification of the Proteins Determining the Blood Circulation Time of Nanoparticles. submitted
- Maurizi L (2010) Elaboration de nanoparticules fonctionnelles : applications comme agents de contraste en IRM. PhD Thesis, Université de Bourgogne. [lien](#)
- Maurizi L, Bisht H, Bouyer F, Millot N (2009) Easy Route to Functionalize Iron Oxide Nanoparticles via Long-Term Stable Thiol Groups. *Langmuir* 25:8857–8859. <https://doi.org/10.1021/la901602w>
- Maurizi L, Bouyer F, Ariane M, et al (2014a) Fast and continuous synthesis of nanostructured iron spinel in supercritical water: influence of cations and citrates. *RSC Adv* 4:45673–45678. <https://doi.org/10.1039/C4RA08562K>
- Maurizi L, Bouyer F, Paris J, et al (2011) One step continuous hydrothermal synthesis of very fine stabilized superparamagnetic nanoparticles of magnetite. *Chem Commun* 47:11706–11708. <https://doi.org/10.1039/C1CC15470B>
- Maurizi L, Claveau A, Hofmann H (2015a) Polymer Adsorption on Iron Oxide Nanoparticles for One-Step Amino-Functionalized Silica Encapsulation. *J Nanomater* 2015:e732719. <https://doi.org/10.1155/2015/732719>
- Maurizi L, Papa A-L, Dumont L, et al (2015b) Influence of Surface Charge and Polymer Coating on Internalization and Biodistribution of Polyethylene Glycol-Modified Iron Oxide Nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol* 11:126–136. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.1996>
- Maurizi L, Sakulkhu U, Crowe LA, et al (2014b) Syntheses of cross-linked polymeric superparamagnetic beads with tunable properties. *RSC Adv* 4:11142–11146. <https://doi.org/10.1039/C3RA48004F>
- Maurizi L, Sakulkhu U, Gramoun A, et al (2014c) A fast and reproducible method to quantify magnetic nanoparticle biodistribution. *Analyst* 139:1184–1191. <https://doi.org/10.1039/C3AN02153J>
- Maurizi L, Sallem F, Boudon J, et al (2019) Efficient Quantification by X-ray Photoelectron Spectroscopy and Thermogravimetric Analyses of the One-Pot Grafting of Two Molecules on the Surface of Iron Oxide Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 19:4920–4929. <https://doi.org/10.1166/jnn.2019.16796>
- Millot N (2005) Habilitation à Diriger des Recherches : Rôle des interfaces sur les propriétés des nanomatériaux. Université de Bourgogne
- Mohamed F, Oo MK, Chatterjee B, Alallam B (2022) Biocompatible Supramolecular Mesoporous Silica Nanoparticles as the Next-Generation Drug Delivery System. *Front Pharmacol* 13:886981. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.886981>

Bibliographie

- Mondini S, Leonzino M, Drago C, et al (2015) Zwitterion-Coated Iron Oxide Nanoparticles: Surface Chemistry and Intracellular Uptake by Hepatocarcinoma (HepG2) Cells. *Langmuir* 31:7381–7390. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b01496>
- Moos N von, Koman VB, Santschi C, et al (2016) Pro-oxidant effects of nano-TiO₂ on *Chlamydomonas reinhardtii* during short-term exposure. *RSC Adv* 6:115271–115283. <https://doi.org/10.1039/C6RA16639C>
- Mottas I, Bekdemir A, Cereghetti A, et al (2019) Amphiphilic nanoparticle delivery enhances the anticancer efficacy of a TLR7 ligand via local immune activation. *Biomaterials* 190–191:111–120. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.031>
- Müller LK, Simon J, Rosenauer C, et al (2018) The Transferability from Animal Models to Humans: Challenges Regarding Aggregation and Protein Corona Formation of Nanoparticles. *Biomacromolecules* 19:374–385. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01472>
- Nejadnik H, Pandit P, Lenkov O, et al (2019) Ferumoxytol Can Be Used for Quantitative Magnetic Particle Imaging of Transplanted Stem Cells. *Mol Imaging Biol* 21:465–472. <https://doi.org/10.1007/s11307-018-1276-x>
- Nigam S, Barick KC, Bahadur D (2011) Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. *J Magn Magn Mater* 323:237–243. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2010.09.009>
- Operti MC, Bernhardt A, Pots J, et al (2022) Translating the Manufacture of Immunotherapeutic PLGA Nanoparticles from Lab to Industrial Scale: Process Transfer and In Vitro Testing. *Pharmaceutics* 14:1690. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081690>
- Palchetti S, Colapicchioni V, Digiacoimo L, et al (2016) The protein corona of circulating PEGylated liposomes. *Biochim Biophys Acta-Biomembr* 1858:189–196. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.012>
- Paliwal R, Babu RJ, Palakurthi S (2014) Nanomedicine scale-up technologies: feasibilities and challenges. *AAPS PharmSciTech* 15:1527–1534. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0177-9>
- Papa A-L, Dumont L, Vandroux D, Millot N (2012) Titanate nanotubes: towards a novel and safer nanovector for cardiomyocytes. *Nanotoxicology* 7:1131. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.710661>
- Papa A-L, Maurizi L, Vandroux D, et al (2011) Synthesis of Titanate Nanotubes Directly Coated with USPIO in Hydrothermal Conditions: A New Detectable Nanocarrier. *J Phys Chem C* 115:19012–19017. <https://doi.org/10.1021/jp2056893>

Bibliographie

- Paradossi G, Cavalieri F, Chiessi E, et al (2003) Poly(vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med* 14:687–691. <https://doi.org/10.1023/A:1024907615244>
- Paris J (2013) Nanoparticules d'oxydes de fer et nanotubes de titanate pour l'imagerie multimodale et à destination de la thérapie anticancéreuse. These de doctorat, Université de Bourgogne. [lien](#)
- Penn SG, He L, Natan MJ (2003) Nanoparticles for bioanalysis. *Curr Opin Chem Biol* 7:609–615. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.013>
- Petri-Fink A, Chastellain M, Juillerat-Jeanneret L, et al (2005) Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells. *Biomaterials* 26:2685–2694. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.023>
- Ramniceanu G, Doan B-T, Vezignol C, et al (2016) Delayed hepatic uptake of multi-phosphonic acid poly(ethylene glycol) coated iron oxide measured by real-time magnetic resonance imaging. *Rsc Adv* 6:63788–63800. <https://doi.org/10.1039/c6ra09896g>
- Renard P-EL, Buchegger F, Petri-Fink A, et al (2009) Local moderate magnetically induced hyperthermia using an implant formed in situ in a mouse tumor model. *Int J Hyperthermia* 25:229–239. <https://doi.org/10.1080/02656730802713557>
- Rigo S, Cai C, Gunkel-Grabole G, et al (2018) Nanoscience-Based Strategies to Engineer Antimicrobial Surfaces. *Adv Sci* 5:1700892. <https://doi.org/10.1002/advs.201700892>
- Ritz S, Schoettler S, Kotman N, et al (2015) Protein Corona of Nanoparticles: Distinct Proteins Regulate the Cellular Uptake. *Biomacromolecules* 16:1311–1321. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00108>
- Rodrigues MS, Borges J, Lopes C, et al (2021) Gas Sensors Based on Localized Surface Plasmon Resonances: Synthesis of Oxide Films with Embedded Metal Nanoparticles, Theory and Simulation, and Sensitivity Enhancement Strategies. *Appl Sci* 11:5388. <https://doi.org/10.3390/app11125388>
- Rogers WJ, Basu P (2005) Factors regulating macrophage endocytosis of nanoparticles: implications for targeted magnetic resonance plaque imaging. *Atherosclerosis* 178:67–73. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.08.017>
- Sakulkhu U (2013) Preparation of Coated Nanoparticles and Investigation of their Behavior in Biological Environment. EPFL. [lien](#)
- Sakulkhu U, Mahmoudi M, Maurizi L, et al (2014a) Protein corona composition of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with various physico-chemical properties and coatings. *Sci Rep* 4:5020. <https://doi.org/10.1038/srep05020>

Bibliographie

- Sakulkhu U, Mahmoudi M, Maurizi L, et al (2015) 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* 3:265–278. <https://doi.org/10.1039/C4BM00264D>
- Sakulkhu U, Maurizi L, Mahmoudi M, et al (2014b) Ex situ evaluation of the composition of protein corona of intravenously injected superparamagnetic nanoparticles in rats. *Nanoscale* 6:11439–11450. <https://doi.org/10.1039/C4NR02793K>
- Sandre O (2012) Habilitation à Diriger des Recherches: Nanoparticules magnétiques et structures auto-assemblées avec (ou sans) polymères. Université Pierre et Marie Curie (Paris). [lien](#)
- Schoettler S, Klein K, Landfester K, Mailänder V (2016) Protein source and choice of anticoagulant decisively affect nanoparticle protein corona and cellular uptake. *Nanoscale* 8:5526–5536. <https://doi.org/10.1039/c5nr08196c>
- Schöttler S, Landfester K, Mailänder V (2016) Controlling the Stealth Effect of Nanocarriers through Understanding the Protein Corona. *Angew Chem Int Ed Engl* 55:8806–8815. <https://doi.org/10.1002/anie.201602233>
- Schulze F, Dienelt A, Geissler S, et al (2014) Amino-polyvinyl Alcohol Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles are Suitable for Monitoring of Human Mesenchymal Stromal Cells In Vivo. *Small* 10:4340–4351. <https://doi.org/10.1002/smll.201400707>
- Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU (2014) Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnology* 12:5. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-5>
- Shubayev VI, Pisanic TR, Jin S (2009) Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv Drug Deliv Rev* 61:467–477. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.007>
- Singh N, Marets C, Boudon J, et al (2021) In vivo protein corona on nanoparticles: does the control of all material parameters orient the biological behavior? *Nanoscale Adv* 3:1209–1229. <https://doi.org/10.1039/D0NA00863J>
- Sruthi S, Maurizi L, Nury T, et al (2018) 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* 170:454–462. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.041>
- Steitz B, Salaklang J, Finka A, et al (2007) Fixed bed reactor for solid-phase surface derivatization of superparamagnetic nanoparticles. *Bioconjug Chem* 18:1684–1690. <https://doi.org/10.1021/bc070100v>

Bibliographie

- Stober W, Fink A, Bohn E (1968) Controlled growth of monodisperse silica spheres in micron size range. *J Colloid Interface Sci* 26:62–69. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5)
- Strehl C, Gaber T, Maurizi L, et al (2015) Effects of PVA coated nanoparticles on human immune cells. *Int J Nanomedicine* 10:3429–3445. <https://doi.org/10.2147/IJN.S75936>
- Strehl C, Maurizi L, Gaber T, et al (2016) Modification of the surface of superparamagnetic iron oxide nanoparticles to enable their safe application in humans. *Int J Nanomedicine* 11:5883–5896. <https://doi.org/10.2147/IJN.S110579>
- Thomas G (2015) Nanoparticules de magnétite fonctionnalisées pour l'imagerie bimodale IRM/TEP. Université de Bourgogne. [Lien](#)
- Thomas G, Boudon J, Maurizi L, et al (2019) Innovative Magnetic Nanoparticles for PET/MRI Bimodal Imaging. *ACS Omega* 4:2637–2648. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03283>
- Tian X, Ruan L, Zhou S, et al (2022) Appropriate Size of Fe₃O₄ Nanoparticles for Cancer Therapy by Ferroptosis. *ACS Appl Bio Mater.* <https://doi.org/10.1021/acsbm.2c00068>
- Treuel L, Docter D, Maskos M, Stauber RH (2015) Protein corona - from molecular adsorption to physiological complexity. *Beilstein J Nanotechnol* 6:857–873. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.88>
- Tronc E, Belleville P, Jolivet JP, Livage J (1992) Transformation of ferric hydroxide into spinel by iron(II) adsorption. *Langmuir* 8:313–319. <https://doi.org/10.1021/la00037a057>
- Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc* 11:55–75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>
- Varache M, Bezverkhyy I, Saviot L, et al (2015) Optimization of MCM-41 type silica nanoparticles for biological applications: Control of size and absence of aggregation and cell cytotoxicity. *J Non-Cryst Solids* 408:87–97. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2014.10.020>
- Vermeij EA, Koenders MI, Bennink MB, et al (2015) The In-Vivo Use of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles to Detect Inflammation Elicits a Cytokine Response but Does Not Aggravate Experimental Arthritis. *PloS One* 10:e0126687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126687>
- Weiss ACG, Kelly HG, Faria M, et al (2019) Link between Low-Fouling and Stealth: A Whole Blood Biomolecular Corona and Cellular Association Analysis on Nanoengineered Particles. *ACS Nano* 13:4980–4991. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b00552>

Bibliographie

- Winzen S, Schoettler S, Baier G, et al (2015) Complementary analysis of the hard and soft protein corona: sample preparation critically effects corona composition. *Nanoscale* 7:2992–3001. <https://doi.org/10.1039/c4nr05982d>
- Xin B (2005) De la chimie douce, au milieu hydrothermal étendu au domaine supercritique, du réacteur fermé au dispositif en continu : synthèse d'oxydes métalliques nanostructurés. These de doctorat, Université de Bourgogne. [lien](#)
- Xue XF, Hanna K, Despas C, et al (2009) Effect of chelating agent on the oxidation rate of PCP in the magnetite/H₂O₂ system at neutral pH. *J Mol Catal Chem* 311:29–35. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2009.06.016>
- Yoon HJ, Kozminsky M, Nagrath S (2014) Emerging Role of Nanomaterials in Circulating Tumor Cell Isolation and Analysis. *ACS Nano* 8:1995–2017. <https://doi.org/10.1021/nn5004277>
- Zboril R, Machala L, Mashlan M, Sharma V (2004) Iron(III) oxide nanoparticles in the thermally induced oxidative decomposition of Prussian Blue, Fe-4[Fe(CN)(6)](3). *Cryst Growth Des* 4:1317–1325. <https://doi.org/10.1021/cg049748+>
- Zhang X, Tanner P, Graff A, et al (2012) Mimicking the cell membrane with block copolymer membranes. *J Polym Sci Part -Polym Chem* 50:2293–2318. <https://doi.org/10.1002/pola.26000>
- Zheng X, Baker H, Hancock WS, et al (2006) Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnol Prog* 22:1294–1300. <https://doi.org/10.1021/bp060121o>
- Zhou W, Gao X, Liu D, Chen X (2015) Gold Nanoparticles for In Vitro Diagnostics. *Chem Rev* 115:10575–10636. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00100>
- Zhu M-T, Feng W-Y, Wang B, et al (2008) Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. *Toxicology* 247:102–111. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.02.011>