

**Titre:** Analyse des complexes oligodésoxyribonucléotide/chitosan par ultracentrifugation analytique  
Title: ultracentrifugation analytique

**Auteur:** Yves Niebel  
Author:

**Date:** 2013

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Niebel, Y. (2013). Analyse des complexes oligodésoxyribonucléotide/chitosan par ultracentrifugation analytique [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/1266/>  
Citation:

## Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/1266/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de recherche:** Gregory De Crescenzo, Michael D. Buschmann, & Marc Lavertu  
Advisors:

**Programme:** Génie biomédical  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ANALYSE DES COMPLEXES OLIGODÉSOXYRIBONUCLÉOTIDE/CHITOSAN PAR  
ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE

YVES NIEBEL

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

DÉCEMBRE 2013

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

ANALYSE DES COMPLEXES OLIGODÉSOXYRIBONUCLÉOTIDE/CHITOSAN PAR  
ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE

présenté par : NIEBEL Yves

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. GERVAIS Thomas, Ph.D., président

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. BUSCHMANN Michael, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. LAVERTU Marc, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. KORNBALATT Jack, Ph.D., membre

## **REMERCIEMENTS**

Tout d'abord, je remercie mon directeur de recherche, le professeur Grégory De Crescenzo de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir encadré, et soutenu tout au long de ma maîtrise.

Je remercie également mon co-directeur, le Dr. Marc Lavertu pour son énorme soutien et son aide, ainsi que sa disponibilité durant mes deux années de maîtrise.

Je remercie le professeur Michael Buschmann d'avoir été un codirecteur pour cette maîtrise.

Un merci à mon tuteur de l'ENSTA ParisTech, le Dr Laurent Elkaïm, et à la direction de la formation et de la recherche ainsi qu'à la direction des relations internationales de l'ENSTA ParisTech, de m'avoir encadré, écouté et soutenu dans le cadre de ce double diplôme.

Merci au Dr. Peter Schuck, de m'avoir accueilli durant mon stage MÉDITIS au National Institutes of Health et pour son aide précieuse. Je remercie aussi Dr. Huanying (Joy) Zhao, Dr. Patrick Brown, et Andréa Balbo. Merci à tous, de m'avoir appris à utiliser l'ultracentrifugeuse et d'avoir répondu à mes nombreuses questions.

Je remercie le GRSTB et le programme MÉDITIS pour leur soutien financier durant mes deux années de maîtrise.

Je remercie aussi tous mes collègues étudiants et les employés que j'ai rencontrés au cours de mes deux années de maîtrise dans les différents laboratoires où j'ai été. Merci pour les bons moments passés ensemble et pour l'aide apportée durant mon projet.

Un merci également à tous mes amis de Montréal, de Washington, de France et à toutes les personnes que j'ai croisées qui ont rendu ces deux années très riches en expérience.

Un grand merci également à Addy Medjo, Addydanse, son équipe, sa troupe, et tous les artistes que j'ai rencontrés pendant ces deux années, qui m'ont permis de ne pas me décourager.

Pour finir, je tiens à remercier ma famille pour son soutien inconditionnel durant ces deux années.

## RÉSUMÉ

Notre étude s'intéresse à caractériser de manière fine par ultracentrifugation analytique (AUC) et diffusion dynamique de la lumière (DLS) des complexes utilisés en thérapie génique. Ces derniers sont obtenus en condensant des oligodésoxynucléotides (ODN) et un polymère naturel dérivé de la chitine, le chitosan. À des fins de comparaison, un autre polymère utilisé pour la complexation des ODN est testé en parallèle, à savoir le polyéthylènimine (PEI). L'analyse combinant les deux techniques a montré des particules très poreuses (au-dessus de 80% de porosité), avec des rayons hydrodynamiques pondérés en masse de 46 et 55 nm pour les complexes chitosan/ODN et PEI/ODN respectivement. La transformation de la distribution de sédimentation de coefficient en distribution de masse molaire a permis de déterminer la masse molaire moyenne de ces polyplexes. 19 et 29 MDa ont été trouvés respectivement pour les complexes chitosan/ODN et PEI/ODN. L'AUC permet de déterminer également la stœchiométrie, c'est-à-dire le ratio N/P, et le  $dn/dc$  des polyplexes de manière précise. Les valeurs 0,117 et 0,152 mL/g ont été obtenues pour le  $dn/dc$  des complexes chitosan/ODN et PEI/ODN respectivement. Les ratios N/P déterminés sont de 1,3 et 2,5 pour ces mêmes complexes. Afin de valider nos résultats et notre méthode par AUC et DLS, les complexes sont également caractérisés par diffusion statique de la lumière (SLS), et par microscopie électronique à balayage (SEM). Les résultats obtenus valident notre méthode et démontrent que la combinaison des deux techniques, AUC et DLS, est une méthode puissante pour caractériser des polyplexes aussi bien en déterminant leur taille, leur stœchiométrie, leur porosité ou encore leur masse molaire.

## ABSTRACT

Analytical ultracentrifugation (AUC) and dynamic light scattering (DLS) were combined to characterize polyplexes formed with 10 kDa chitosan or 10 kDa PEI and oligodeoxynucleotides (ODN). Combined analysis revealed that both polyplexes were highly porous (over 80%) and that their weight-average hydrodynamic diameters were of 46 and 55 nm for chitosan/ODN and PEI/ODN complexes, respectively. Transformation of the sedimentation coefficient distribution to a size and molecular weight distribution, gave an average molecular weight of 19 and 29 MDa for chitosan and PEI polyplexes, respectively. Data from AUC also allowed for the calculation of the actual,  $dn/dc$  namely 0.117 and 0.152 for chitosan/ODN and PEI/ODN polyplexes respectively and N/P ratios, namely 1.3 and 2.5 for chitosans/ODN and PEI/DON polyplexes, respectively. Additional data from scanning electron microscopy and static light scattering confirmed the conclusions that were initially derived from AUC and DLS, thus validating that the combination of AUC and DLS is a powerful approach to characterize polyplexes in terms of refractive index increment, size and molecular weight distributions as well as porosity.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	III
RÉSUMÉ .....	IV
ABSTRACT .....	V
TABLE DES MATIÈRES .....	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES .....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XII
LISTE DES ANNEXES .....	XIII
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 1      REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
1.1      Thérapie génique .....	3
1.1.1      Généralités.....	3
1.1.2      ARN interférent vs Oligodésoxy nucléotide (ODN).....	4
1.2      Caractérisation des complexes en thérapie génique .....	5
1.2.1      Diffusion dynamique et statique de la lumière (DLS et SLS).....	5
1.2.2      Techniques de microscopie .....	7
1.2.3      Autres méthodes de caractérisation .....	7
1.3      Ultracentrifugation analytique.....	8
1.3.1      Aspect théorique de l'ultracentrifugation analytique [6, 21] .....	8
1.3.2      Ultracentrifugeuse analytique [6, 21].....	12
1.3.3      Une méthode de caractérisation des protéines et macromolécules .....	15
1.4      Caractérisation des nanoparticules par AUC .....	18
1.4.1      Caractérisation des colloïdes .....	18

1.4.2 Caractérisation des complexes à base d'ADN/ARN.....	20
CHAPITRE 2 L'ANALYSE COMBINÉE DES COMPLEXES POLYCATIONS/ODN PAR ULTRACENTRIGATION ANALYTIQUE ET DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIÈRE RÉVÈLE LEUR TAILLE, LEUR VARIATION D'INDICE DE RÉFRACTION, LEUR STOÉCHIOMÉTRIE, LEUR POROSITÉ ET LEUR MASSE MOLÉCULAIRE.....	22
2.1 Présentation de l'article.....	22
2.2 Combined Analysis of Polycation/ODN Polyplexes by Analytical Ultracentrifugation and Dynamic Light Scattering Reveals their Size, Refractive Index Increment, Stoichiometry, Porosity and Molecular Weight.....	23
2.2.1 Author names .....	23
2.2.2 Author adress.....	23
2.2.3 Keywords .....	23
2.2.4 ABSTRACT .....	24
2.2.5 Introduction .....	25
2.2.6 Theoretical Aspect.....	27
2.2.7 Materials and Methods .....	31
2.2.8 Results and Discussion.....	37
2.2.9 Conclusion.....	46
2.2.10 Associated content.....	47
2.2.11 Author information.....	47
2.2.12 Acknolwedgment .....	47
CHAPITRE 3 DISCUSSION GÉNÉRALE ET RECOMMANDATIONS .....	48
3.1 Discussion générale.....	48
3.2 Recommandations .....	49
CONCLUSION .....	51

BIBLIOGRAPHIE .....	52
---------------------	----

**LISTE DES TABLEAUX**

Table 1. Molecular characteristics of Chitosan and PEI .....	31
Table 2. Refractive index increment $dn/dc$ of the different species. ....	37
Table 3. Concentration of free polymers and polyplex N/P ratios (calculated with equation (32)). .....	38
Table 4. Estimation of porosity $\varepsilon_p$ based on the AUC and DLS results and equation (28) for both polyplexes.....	41
Table 5. Aggregation number related to both polyplexes .....	42
Table 6 : Number-average diameter calculated from SEM imaging and AUC and weight average diameter calculated from AUC. ....	43
Table 7. $M_w$ deduced from SLS and AUC measurements.....	45

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Formation des complexes .....	3
Figure 2. Structure chimique du chitosan ayant un pourcentage d'acétylation DA (à gauche), et du PEI linéaire (à droite). .....	4
Figure 3. En SLS, la lumière diffusée est mesurée à différents angles $\Theta$ . .....	6
Figure 4. Principe de mesure de la DLS pour un échantillon. .....	6
Figure 5. Représentation des forces appliquées sur une particule dans une ultracentrifugeuse analytique. .....	9
Figure 6. Schéma d'un secteur d'une cellule ( $r_m$ étant la position radiale du ménisque et $r_b$ la position radiale du fond de la cellule). .....	11
Figure 7. Exemple de franges obtenues par AUC lors de la sédimentation d'une espèce. ....	13
Figure 8. Rotor d'AUC pouvant contenir 8 cellules, vitesse maximale de 50 000 tours par minute.	
.....	13
Figure 9. Exemple de cellules d'analyse d'AUC avec une pièce centrale à double secteur. ....	14
Figure 10. Distribution des coefficients de sédimentation pour des billes de polystyrène monodisperse de 100 nm.....	16
Figure 11. Table of content .....	24
Figure 12. (A) Reproducibility of (1-3) chitosan/ODN and (4-6) PEI/ODN polyplexes as investigated by AUC (B) Sedimentation coefficient distribution of (1) PEI, (2) Chitosan, (3) ODN, (4) Chitosan/ODN and (5) PEI/ODN polyplexes. Sedimentation was performed at 50000 and 10000 rpm for single species and polyplexes, respectively. ....	40
Figure 13. SEM images of (A, B) chitosan/ODN and (C, D) PEI/ODN polyplexes. Polyplex size distribution from SEM imaging for (E) chitosan/ODN and (F) PEI/ODN polyplexes.....	44
Figure 14. $ls-g^*(s)$ (left) and normalized $ls-g^*(s)$ (right) distributions of chitosan/ODN polyplexes for the stock solution (solid line), 2-fold dilution (dashed line) and 4-fold dilution (dotted line). The normalized $ls-g^*(s)$ distributions are superimposed, which is indicative of ideal behavior.....	58

Figure 15. ls-g*(s) (left) and normalized ls-g*(s) (right) distributions of PEI/ODN polyplexes for the stock solution (solid line), 2-fold dilution (dashed line) and 4-fold dilution (dotted line). The normalized ls-g*(s) distributions are superimposed, which is indicative of ideal behavior.....	58
Figure 16. Sedimentation velocity data fit with the ls-g*(s) model along with the residual (left) and the ls-g*(s) distribution (right) of the chitosan/ODN polyplexes. RMSD is 0.008492...	59
Figure 17. Sedimentation velocity data fit with the ls-g*(s) model along with the residual (left) and the ls-g*(s) distribution (right) of the PEI/ODN polyplexes. RMSD is 0.003845. ....	59
Figure 18. Debye plot of Chitosan/ODN polyplexes obtained by static light scattering to measure the molecular weight of polyplexes. The correlation coefficient is 0.957. ....	60
Figure 19. Intensity-weighted size distribution (left), and correlogram (right) obtained by DLS for Chitosan/ODN polyplexes.....	60
Figure 20. Debye plot of PEI/ODN polyplexes obtained by static light scattering to measure the molecular weight of polyplexes. The correlation coefficient is 0.958. ....	61
Figure 21. Intensity-weighted size distribution (left), and correlogram (right) obtained by DLS for PEI/ODN polyplexes.....	61
Figure 22. Vitesse du fluide dans la couche limite .....	62
Figure 23. Sphère isolante se trouvant dans un écoulement fluide de vitesse $U$ .....	64

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

ADN	Acide désoxyribonucléique
AF4	fractionnement à flux forces couplées (asymmetrical flow field-flow fractionation)
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférent
AUC	Ultracentrifugation analytique (Analytical Ultracentrifugation)
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering)
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis (Analyse du déplacement/suivi des nanoparticules)
ODN	Oligodésoxyribonucleotides
pARNi	Petit ARN interférent
PEI	Polyéthylenimine
SLS	Diffusion statique de la lumière (Static Light Scattering)

## **LISTE DES ANNEXES**

ANNEXE 1 – SUPPORTING INFORMATION (ARTICLE) .....	57
ANNEXE 2 – INTERACTIONS ÉLÉCTROSTATIQUES.....	62

## INTRODUCTION

Introduire du matériel génétique dans les cellules est devenu depuis plusieurs décennies, une nouvelle approche thérapeutique afin de soigner de nombreuses maladies rares ne répondant pas aux traitements habituels.

L'introduction d'ADN ou d'ARN se fait à l'aide de deux catégories de vecteurs : les virus et les vecteurs non-viraux. Les vecteurs non-viraux ont un grand intérêt dû à leur faible toxicité, leur plus grande sûreté et leur facilité de production. Leur fabrication requiert l'usage de polycations, comme le chitosan et le polyéthylènimine. Ces derniers forment par interactions électrostatiques des complexes stables avec l'ADN et l'ARN, complexes pouvant par la suite être internalisés par les cellules [1, 2].

La caractérisation de ces complexes se révèle essentielle pour s'assurer de leur efficacité et de leur non-toxicité ainsi que pour comprendre l'impact des paramètres expérimentaux utilisés pour les générer, au niveau macromoléculaire, dans une optique de recherche et développement. Les études initiales caractérisant les complexes à base de chitosan utilisent fréquemment la diffusion dynamique de la lumière et la microscopie électronique [3]. Une étude plus poussée a aussi permis leur caractérisation par la méthode de fractionnement à flux forces couplées (AF4). Cette approche a également permis de déterminer la stoechiométrie des complexes [4]. Une étude plus récente s'est intéressée aux complexes PEI/ADN plasmidique et les a caractérisés par microscopie à force atomique et par ultracentrifugation analytique [5]. Alors que cette technique est principalement utilisée pour caractériser les protéines et leurs interactions, son application à la caractérisation des colloïdes et les nanoparticules est de plus en plus fréquente [6].

Ce mémoire traite donc de la caractérisation de ce type de complexes par ultracentrifugation analytique, à savoir des complexes formés par la condensation d'oligodésoxy nucléotides et du chitosan. Bien que ces complexes aient déjà été caractérisés par différentes techniques, ils n'ont jamais encore été étudiés par ultracentrifugation analytique. Développer une telle méthode de caractérisation s'avère donc novateur pour ce type de complexes; elle pourrait permettre une caractérisation plus précise quant à la polydispersité des échantillons. Pour des fins de validation et de comparaison, notre étude inclut l'utilisation de l'AUC pour la caractérisation de complexes ODN/PEI.

Le premier chapitre présente l'ultracentrifugation analytique et les récentes avancées concernant la caractérisation des complexes utilisés en thérapie génique. L'article soumis pour publication est présenté dans le chapitre 2 avec sa présentation et la problématique du mémoire. Pour terminer, le chapitre 3 discute les résultats et se penche sur les futurs travaux à réaliser.

## CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE

### 1.1 Thérapie génique

#### 1.1.1 Généralités

La thérapie génique a pour but d'introduire du matériel génétique dans des cellules somatiques présentant un dysfonctionnement génétique. Une thérapie génétique idéale remplit trois rôles: la déficience génétique est corrigée et non remplacée, le système de livraison n'induit pas une réponse immunitaire et la transfection du matériel se limite aux cellules ciblées. En plus du système immunitaire, de multiples barrières doivent être franchies au sein du corps humain et de la cellule pour pouvoir assurer la livraison du matériel génétique. Les composants essentiels en thérapie génique sont : le matériel génétique (ADN/ARN), les composants régulant l'expression du gène utilisé, et le système de livraison [1].

L'intérêt se porte plus particulièrement sur le vecteur qui permet de délivrer le matériel génétique. Un vecteur idéal se doit d'être non toxique et non-immunogène. Il cible spécifiquement les cellules à traiter et possède une haute capacité de transfection. Sa production doit être facile à grande échelle et peu coûteuse. Le vecteur doit former avec le matériel génétique des complexes stables et reproductibles ayant une durée de demi-vie plus longue que l'ADN seul dans les fluides biologiques. Deux types de vecteurs sont étudiés pour livrer le matériel génétique dans la cellule : les vecteurs viraux, et les vecteurs non-viraux [1, 2].

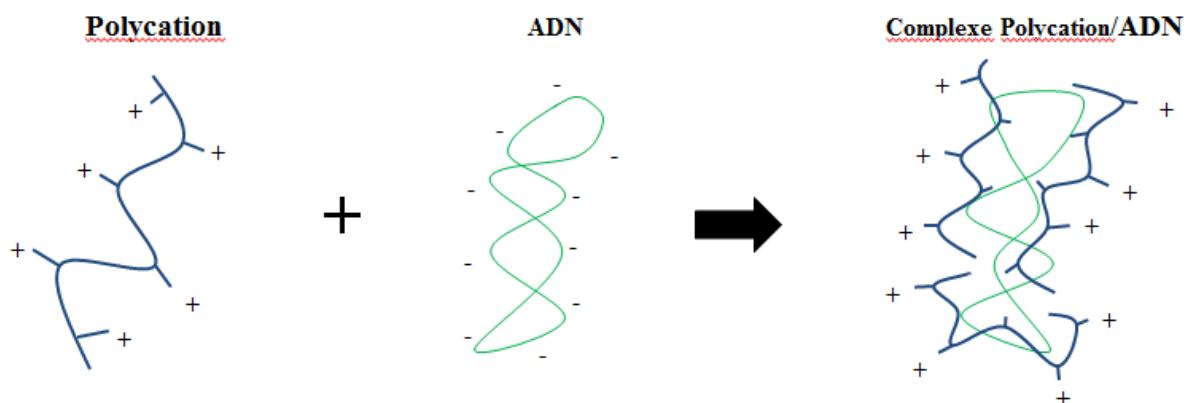


Figure 1. Formation des complexes

Les polycations sont des polymères dont l'unité répétitive porte un groupe électrolyte qui se charge positivement en solution aqueuse. Ces polymères font partie des vecteurs non-viraux. Chargés positivement, ils ont la capacité de condenser l'ADN ou l'ARN, chargé négativement, et de produire des complexes stables de petite taille (figure 1). Deux polycations présentent un fort potentiel en thérapie génique : le chitosan, un polymère naturel, et le polyethylenimine (PEI), un polymère synthétique (figure 2) [7, 8].

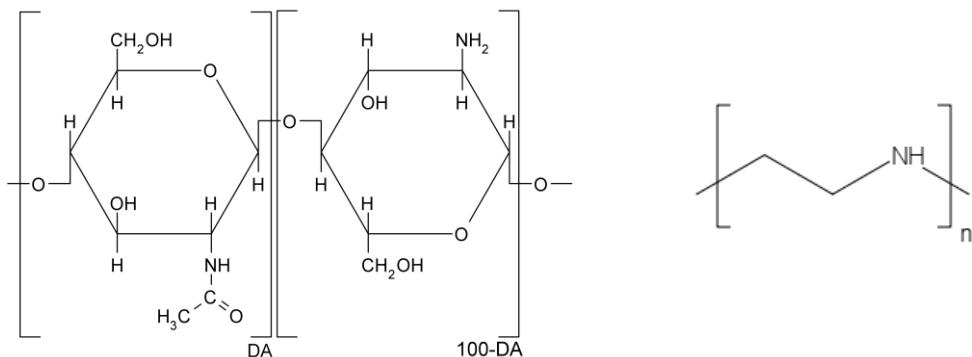


Figure 2. Structure chimique du chitosan ayant un pourcentage d'acétylation DA (à gauche), et du PEI linéaire (à droite).

Le chitosan est un dérivé de la chitine, un polysaccharide produit par de nombreux crustacés. Il est produit par désacétylation chimique ou enzymatique, c'est-à-dire le remplacement du groupe acétyle ( $\text{COCH}_3$ ) sur une partie des monomères de la chitine par un simple atome d'hydrogène H. Le pourcentage d'acétylation appelée DA est le rapport du nombre de monomère acétylée sur le nombre de total de monomère. Dans la littérature le pourcentage de désacétylation DDA est également mentionné, comptant alors le nombre de monomère désacétylé.

### 1.1.2 ARN interférent vs Oligodésoxy nucléotide (ODN)

Les ARN interférents (ARNi) sont utilisés en thérapie génique pour éviter l'expression de certaines protéines qui sont surexprimées dans les cellules. Les petits ARN interférents (siRNA ou pARNi) sont une catégorie d'ARNi. Ce sont des petits brins d'ARN double brin de 21 à 24 nucléotides. Ces petits ARN vont activer une voie cellulaire qui va dégrader un ARN messager ciblé empêchant la traduction de cet ARN messager en protéine. C'est une méthode basée sur un mécanisme naturel qui réduit au silence un gène donné [9]. Cette technique est utilisée en thérapie génique en synthétisant des petits ARN interférents afin de traiter des maladies dues à la

surexpression de certaines protéines, comme apolipoprotéine (APOB) pour l'hypercholestérolémie [10], ou encore TNF-a pour l'arthrite rhumatoïde [11].

Les ODN sont des molécules d'ADN double hélice de petite taille. Ils sont souvent utilisés pour imiter le comportement de pARNi. Un ODN équivalent à un pARNi aura les mêmes paires de bases, sauf que l'uracile (U) sera remplacé par la thymine (T), et que ses bases sont liées à un désoxyribose et non à un ribose (comme dans l'ARN). Les ODN sont plus simples d'utilisation, car ils sont plus résistants à la dégradation et moins coûteux à produire, tout en ayant des comportements similaires lorsqu'ils forment des complexes en présence de polycations [9].

## 1.2 Caractérisation des complexes en thérapie génique

Caractériser des complexes destinés à la thérapie génique revient à déterminer par différentes techniques leur taille, leur forme, leur stœchiométrie et leur potentiel zêta. Dans l'industrie, cette caractérisation est essentielle pour s'assurer de la qualité du produit fabriqué et pour prédire, jusqu'à un certain point son efficacité et sa non-toxicité ; elle est absolument nécessaire dans le domaine pharmaceutique et biomédical.

### 1.2.1 Diffusion dynamique et statique de la lumière (DLS et SLS)

Ces deux méthodes utilisent la caractéristique ondulatoire de la lumière. Un faisceau lumineux avec une longueur d'onde donnée est envoyé sur une particule. Cette onde électromagnétique va moduler les charges et la particule va se comporter comme un dipôle électromagnétique qui à son tour va générer une nouvelle onde électromagnétique de manière isotropique. Lorsque la particule est grande, plusieurs dipôles sont générés, chacun émettant une nouvelle onde électromagnétique. Ces ondes émises peuvent interférer entre elles, et sont caractéristiques de la particule étudiée. Sa mesure permet donc de déterminer certaines des caractéristiques de cette dernière [12].

Dans le cas de la SLS, la lumière diffusée est mesurée par des détecteurs placés à différents angles et permet de déterminer la masse molaire de la particule, le second coefficient du viriel, et le rayon de giration (figure 3). Ce type d'études a été mené pour différents types de complexes, comme les complexes formés d'ADN et de poly-L-Lysine, ou encore des micelles composés de polymères synthétiques [13-15]. Les mesures sont réalisées pour des solutions très diluées à différents angles, car la diffusion de la lumière n'est pas forcément isotrope (particules de grandes tailles, particules non sphériques, ...). Cette technique SLS nécessite la connaissance de

la variation de l'indice de réfraction,  $dn / dc$ , des particules. Ce dernier est le plus souvent mesuré à l'aide d'un réfractomètre. Dans certains cas, une hypothèse d'additivité est admise, mais elle est souvent revérifiée [14]. Cette hypothèse suppose que la variation de l'indice de réfraction est la moyenne pondérée par la masse de la variation d'indice de réfraction des constituants. Dans le cas des polyplexes, ce serait l'ADN et le polycation.

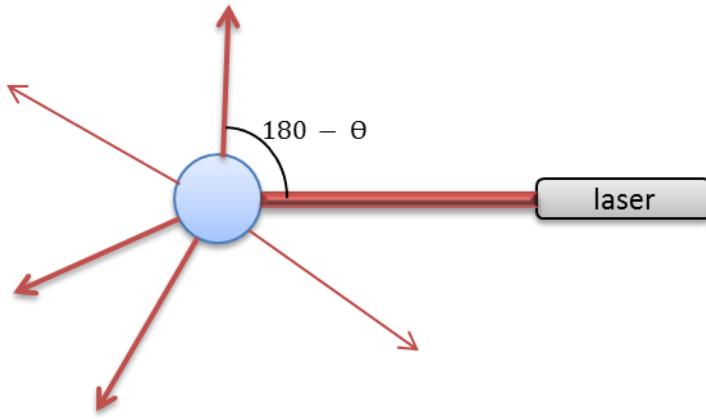


Figure 3. En SLS, la lumière diffusée est mesurée à différents angles  $\Theta$ .

Dans le cas de la DLS, la variation de l'intensité lumineuse diffusée est mesurée au cours du temps, en se basant sur le déplacement de type brownien des particules (figure 4). Cette technique permet de mesurer rapidement le rayon hydrodynamique des particules. En revanche elle est très sensible aux poussières et aux grosses particules. Cette technique est souvent utilisée pour caractériser de nombreux types de particules, y compris des polyplexes chitosan/ADN plasmidique [3, 16].

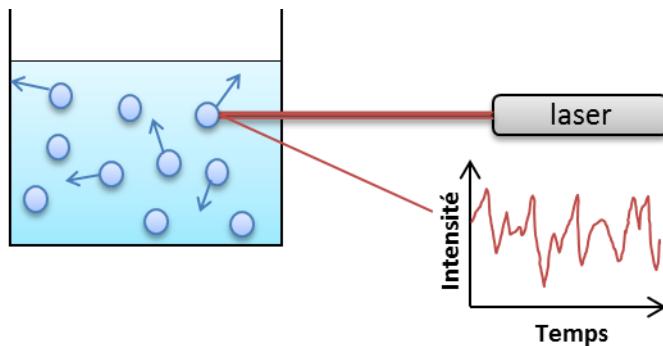


Figure 4. Principe de mesure de la DLS pour un échantillon.

En utilisant la SLS, et la DLS, deux paramètres différents sont obtenus, le rayon de giration  $R_g$ , et le rayon hydrodynamique  $R_h$ . Le rapport des deux  $R_g / R_h$  permet de d'obtenir des indications sur la forme de la particule (sphère, ellipsoïde, ...) [12].

### **1.2.2 Techniques de microscopie**

Plusieurs techniques sont utilisées dans la littérature afin de caractériser les complexes, la microscopie électronique à balayage, la microscopie à force atomique (AFM) ou encore la microscopie en transmission (TEM). Ces techniques permettent d'observer les particules. Leur forme et leur taille peuvent donc être évaluées directement.

Dans le cas de la SEM, les échantillons sont recouverts d'un film métallique conducteur, tel qu'un film d'or, suite à une technique de séchage. Ils sont ensuite placés dans une chambre à vide et balayés par un faisceau d'électrons. L'échantillon réemet des électrons, appelés électrons secondaires, qui sont mesurés à l'aide de capteurs. Une image précise est ainsi obtenue. Cette technique permet une observation de chaque particule ou complexe, en revanche, le mode préparatoire des échantillons peut les modifier (agrégation, rétrécissement). Notons que cette technique a déjà été utilisée pour des complexes à base de chitosan et d'ADN plasmidique [4].

Pour l'AFM, les échantillons sont également séchés. Ils sont ensuite parcourus par une sonde semblable à une pointe effilée [17]. Cette sonde faite dans la majorité des cas à base de silicium, dont la base est de l'ordre de quelques millimètres, pour permettre à l'opérateur de la placer dans l'appareil avec une pointe de l'ordre de quelques nanomètres. Les mesures obtenues par la sonde, soit par contact direct, soit par sa vibration permettent d'obtenir une image précise de l'échantillon. Cette technique a été utilisée récemment pour caractériser les complexes PEI/ADN plasmidiques [5].

### **1.2.3 Autres méthodes de caractérisation**

Il existe d'autres méthodes de caractérisation qui permettent d'obtenir certains ou plusieurs paramètres de façon simultanée.

Pour déterminer la stœchiométrie de ce type de complexe à base d'ADN, le dosage colorimétrique basé sur l'utilisation de l'Orange II est utilisée pour les polymères cationiques possédant des groupes amines  $\text{NH}_3^+$ , tel que le PEI et le chitosan [18]. Les solutions contenant les

complexes sont d'abord centrifugées à haute vitesse. Les complexes sédimentent ne laissant que les polymères libres en solution. Le surnageant est alors récolté et titré à l'aide d'un colorant l'Orange II. Cette méthode a été utilisée par plusieurs auteurs pour caractériser les types de complexes suivants: ADN plsamidique/chitosan, ADN plasmidique/PEI [4, 5].

Le fractionnement à flux forces couplées (AFFFF) est une technique permettant d'obtenir la taille des complexes et leur stoechiométrie en une seule expérience [4, 19]. Les particules sont injectées dans un canal rempli de solvant subissant un déplacement laminaire constant. Chaque particule se déplacera en fonction de sa position dans le canal (plus elle est au centre, plus elle avancera vite) et en fonction de son coefficient de diffusion. A la sortie du canal, les particules sont mesurées grâce des détecteurs (absorbance, DLS, ...).

La titration calorimétrique isotherme (ITC) est également une méthode de caractérisation permettant de comprendre la formation des complexes par l'entremise des variations enthalpiques résultantes. Elle a été utilisée pour caractériser les complexes ADN plasmidique/chitosan [20].

### 1.3 Ultracentrifugation analytique

#### 1.3.1 Aspect théorique de l'ultracentrifugation analytique [6, 21]

##### 1.3.1.1 Théorie simplifiée de Svedberg

Considérons dans un premier temps, une particule de masse  $m_p$  de densité  $\rho_p$  se trouvant dans un solvant de densité  $\rho_s$  et viscosité  $\eta_s$ . A l'intérieur d'une centrifugeuse en action, cette particule est soumise à un champ gravitationnel du type  $\omega^2 r$  créé lors de la rotation du rotor, où  $r$  correspond à la position radiale de la particule et  $\omega$  à la vitesse angulaire du rotor.

En mécanique newtonienne, trois forces sont appliquées sur notre particule en mouvement :

- la force de sédimentation  $\vec{F}_s$ , équivalente au poids de la particule dans ce type de champ gravitationnel ;
- la poussée d'Archimède  $\vec{F}_b$ , équivalente au poids du fluide  $m_s$  déplacé par la particule ;
- la force de friction  $\vec{F}_f$ , de coefficient de friction  $f$ , proportionnelle à la vitesse  $u$  de la particule (figure 5).

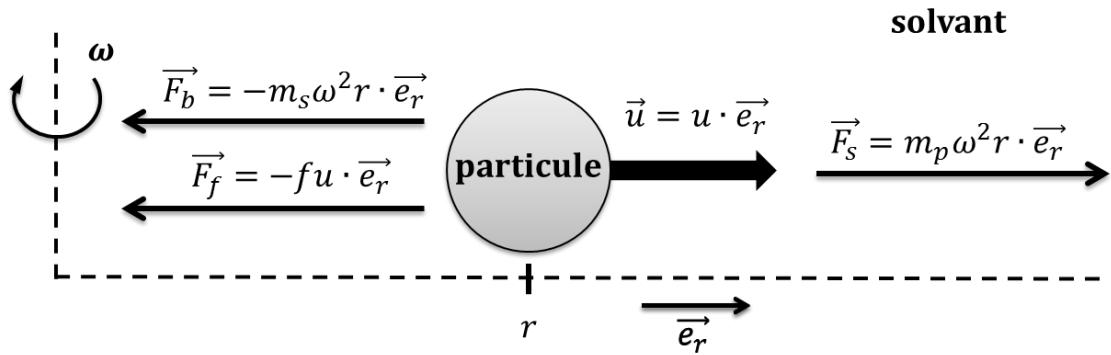


Figure 5. Représentation des forces appliquées sur une particule dans une ultracentrifugeuse analytique.

Si les trois forces précédentes entrent en équilibre immédiatement, la particule se déplace à une vitesse  $\vec{u}$  constante et nous pouvons écrire :

$$\vec{F}_s + \vec{F}_b + \vec{F}_f = \vec{0} \quad 1$$

$$m_p \omega^2 r - m_s \omega^2 r - f u = 0 \quad 2$$

En introduisant  $M$  la masse molaire de la particule,  $N_A$  le nombre d'Avogadro,  $\bar{v}$  le volume spécifique partiel de la particule (qui est l'inverse de la densité de celle-ci), l'équation précédente devient :

$$\frac{M(1-\bar{v} \cdot \rho_s)}{N_A \cdot f} = \frac{u}{\omega^2 r} \equiv s \quad 3$$

Nous avons introduit le coefficient de sédimentation  $s$  qui est une caractéristique de notre macromolécule (dans le cas des solutions idéales). Le coefficient de sédimentation a pour unité le Svedberg de symbole S. Il est équivalent à  $10^{-13} \text{ s}^{-1}$ .

Le coefficient de friction  $f$  dépend à la fois de la taille et de la forme de la particule mais aussi dans le régime dans lequel la particule se trouve (turbulent versus laminaire). Dans notre cas nous nous plaçons dans le régime laminaire. Si nous considérons le cas d'une particule sphérique pleine, l'équation de Stokes-Einstein donne :

$$f = \frac{k_b T}{D} = \frac{R \cdot T}{N_A \cdot D} = 3\pi \cdot \eta_s \cdot d_p \quad 4$$

avec  $k_b$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température,  $R$  la constante des gaz parfaits,  $D$  le coefficient de diffusion,  $d_p$  le diamètre de la nanoparticule.

Cela nous donne l'équation de Svedberg qui est utilisée pour déterminer la masse molaire à partir du coefficient de sédimentation d'une particule :

$$M = \frac{s \cdot RT}{D \cdot (1 - \bar{\nu} \cdot \rho_s)} \quad 5$$

De la même manière, nous pouvons obtenir le diamètre d'une particule sphérique à partir du coefficient de sédimentation en utilisant l'équation de Stokes-Einstein :

$$d_p = \sqrt{\frac{18 \cdot \eta_s \cdot s}{(\rho_p - \rho_s)}} \quad 6$$

### 1.3.1.2 Les équations de Lamm

Une méthode plus générale, basée sur une analyse thermodynamique de la sédimentation, permet d'arriver aux équations de Lamm, qui permettent de décrire la majorité des expériences de sédimentation dans le cas de solutions dites idéales.

Considérons pour cela un volume  $dV$  dans un secteur d'une cellule subissant le champ gravitationnel  $\omega^2 r$ . Nous nous intéresserons au transport de masse au sein de ce volume, qui est défini par sa largeur le long du chemin optique  $a$ , son épaisseur  $dr$ , et sa hauteur qui dépend de l'angle du secteur  $\phi$  (figure 6).

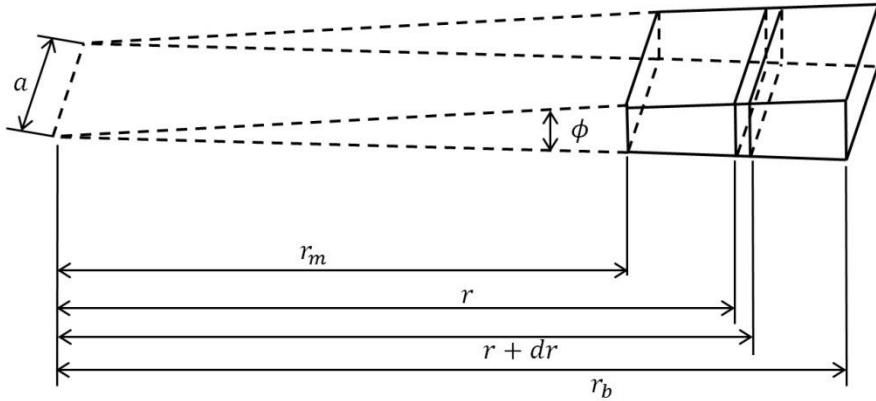


Figure 6. Schéma d'un secteur d'une cellule ( $r_m$  étant la position radiale du ménisque et  $r_b$  la position radiale du fond de la cellule).

Deux mécanismes gouvernent le déplacement des particules au sein de ce volume : la diffusion et la sédimentation.

Ainsi, la variation de masse de soluté transporté par sédimentation à travers la surface se trouvant à la position radiale  $r$ , notée  $dm_s / dt$  est :

$$\frac{dm_s}{dt} = c \cdot \phi ar \cdot u = c \cdot \phi ar \cdot s \cdot \omega^2 r \quad 7$$

avec  $c$  la concentration en soluté à la position radiale  $r$  et en introduisant le coefficient de sédimentation  $s$  défini précédemment.

En utilisant la première loi de Fick, la masse transportée par diffusion, notée  $dm_D / dt$  est :

$$\frac{dm_D}{dt} = -D \cdot \phi ar \cdot \frac{\partial c}{\partial r} \quad 8$$

La variation de masse à travers la surface se trouvant à la position radiale  $r$ , notée  $dm / dt$  est donc :

$$\frac{dm}{dt} = \phi ar \left[ cs\omega^2 r - D \frac{\partial c}{\partial r} \right] = \phi ar \vec{J} \quad 9$$

avec  $\vec{J}$  le transport au travers de la surface.

En utilisant l'équation de continuité, on obtient donc l'équation 10.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \vec{\nabla} \cdot \vec{J} \quad 10$$

Ce qui mène aux équations de Lamm :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[ \left( D \frac{\partial c}{\partial r} - cs\omega^2 r \right) \cdot r \right] \quad 11$$

Soit en développant :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) - \omega^2 s \left( r \frac{\partial c}{\partial r} + 2c \right) \quad 12$$

Les deux mécanismes décrits précédemment réapparaissent dans la forme finale des équations# de Lamm : le transport lié à la diffusion, avec le coefficient de diffusion  $D$ , et le transport lié à la sédimentation (et au champ gravitationnel produit par l'ultracentrifugeuse), avec le coefficient de sédimentation  $s$ .

Dans le cas des solutions idéales  $s$  et  $D$  ne dépendent pas de la concentration en particules. De nombreux phénomènes peuvent rendre la solution non-idéale, rendant  $D$  et  $s$  dépendant de la concentration  $c$ .

### 1.3.2 Ultracentrifugeuse analytique [6, 21]

#### 1.3.2.1 L'ultracentrifugeuse et le rotor

L'ultracentrifugeuse analytique disponible au laboratoire est fournie par Beckman Coulter®. Deux modèles sont actuellement sur le marché : les ProteomeLab® XL-A et XL-I, le premier permettant un suivi de l'absorbance des échantillons, le second permettant également de mesurer des franges liées au principe d'interférométrie de Rayleigh (figure 7). Les deux modèles peuvent atteindre des vitesses allant jusqu'à 60 000 tours par minute, ce qui représente un champ gravitationnel de 290 000 g, où g est le champ gravitationnel de la Terre ( $g = 9.8 \text{ m/s}^2$ ).

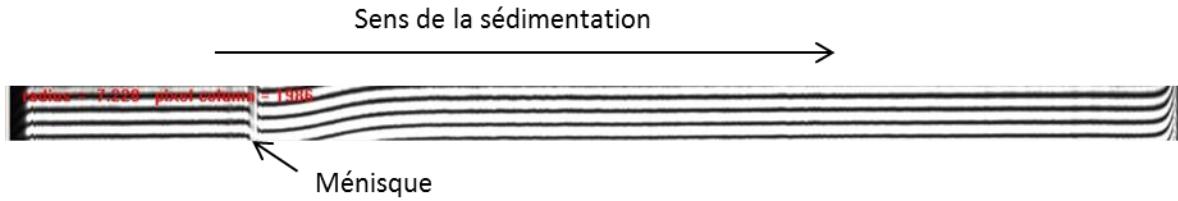


Figure 7. Exemple de franges obtenues par AUC lors de la sédimentation d'une espèce.

Le rotor est placé sous vide durant l'expérience, pour éviter les frictions liées à l'air. La température, fixée par l'opérateur entre 0°C et 40°C pour des raisons biologiques et mécaniques, est précise à 0,5°C près.

Les rotors commercialisés sont en titane et peuvent contenir de 4 à 8 cellules, selon le type de détecteurs utilisé et la vitesse souhaitée. Le rotor de 8 cellules (figure 8) a une vitesse maximale de 50 000 tours par minutes (soit 200 000 g). Cela permet d'analyser en parallèle jusqu'à 8 échantillons par interférence et 7 par absorbance.

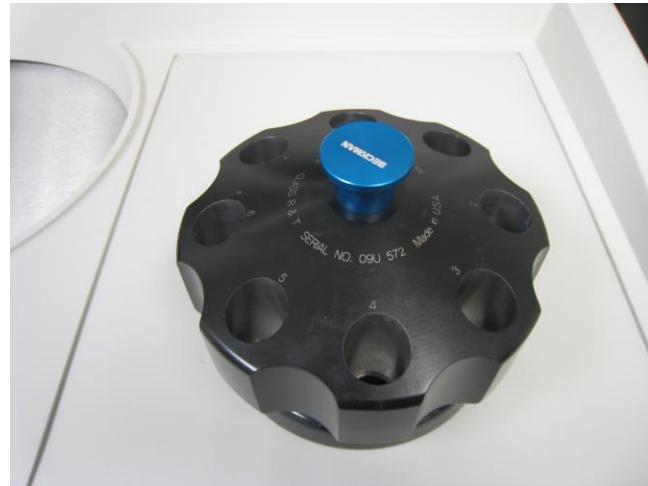


Figure 8. Rotor d'AUC pouvant contenir 8 cellules, vitesse maximale de 50 000 tours par minute.

### 1.3.2.2 Les cellules d'analyse

Les cellules d'analyse (figure 9) sont en contact direct avec l'échantillon et le solvant. Elles doivent répondre à deux principaux critères :

- ne pas fuir ou se distordre sous la pression créée par le fort champ gravitationnel produit par la centrifugeuse ;

- laisser passer la lumière à travers des vitres stables de quartz ou de saphir, pour permettre la détection.

La différence principale entre les cellules se fait selon leur pièce centrale. Il en existe de plusieurs types, mais la principale utilisée est celle contenant deux secteurs, l'un pour le solvant, et l'autre pour l'échantillon ; leur épaisseur est de 12 mm.



Figure 9. Exemple de cellules d'analyse d'AUC avec une pièce centrale à double secteur.

### 1.3.2.3 Les détecteurs

Les données recueillies par une ultracentrifugeuse analytique sont des profils de concentration  $c(r)$  dans la cellule à différents instants. L'ultracentrifugeuse analytique ProteomeLab XL-I® fournie par Beckman Coulter® possède deux moyens de détection indépendants pouvant être utilisés durant la même expérience : l'interférence et l'absorbance.

La mesure d'absorbance, utilisant une lampe au Xénon pouvant aller de 190 nm à 800 nm, permet de calculer directement la concentration de l'échantillon dans la cellule en utilisant la loi de Beer-Lambert (équation 1.13) :

$$A = l \cdot \varepsilon \cdot c$$

13

avec  $A$  l'absorbance mesurée,  $l$  le chemin optique,  $c$  la concentration, et  $\varepsilon$  le coefficient d'extinction molaire de l'espèce à la longueur d'onde mesurée. Les protéines absorbent à 280 nm si elles contiennent des acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane) ou des cystine, c'est-à-dire deux cystéines liées par un point disulfure ; quant à l'ADN, il absorbe à 280 nm et à 260 nm.

Les mesures de franges se basent sur l'interférométrie de Rayleigh. La vitesse de la lumière dépend de l'indice de réfraction du milieu, lui-même dépendant de la composition du milieu (principalement la concentration des espèces en solution). Un laser diode à 655 nm illumine les deux secteurs de la cellule produisant des franges d'interférences. Lors de la sédimentation des variations de ces franges sont observées et mesurées en nombre de franges,  $J(r)$ . Le nombre de franges permet de remonter à la concentration d'après l'équation 1.14 :

$$J(r) = \frac{l \cdot (dn/dc)}{\lambda} \cdot c(r) \quad 14$$

avec  $dn/dc$  la variation de l'indice de réfraction, et  $\lambda$  la longueur d'onde. Cette formule n'est valide que dans le cas d'une expérience de vitesse de sédimentation ('Sedimentation Velocity'). Dans le cas d'une expérience de sédimentation à l'équilibre ('Sedimentation Equilibrium'), seule une concentration relative en franges est connue, et une autre technique s'avère nécessaire pour connaître la concentration réelle.

Chaque détecteur a sa propre vitesse de mesure. Dans le cas de l'interférence, la mesure de toute la cellule est prise instantanément, alors que pour l'absorbance, la cellule est balayée afin de mesurer en chaque point l'absorbance pour une durée totale de 1 minute environ.

### 1.3.3 Une méthode de caractérisation des protéines et macromolécules

L'ultracentrifugation analytique est une méthode classique de caractérisation des protéines et des macromolécules. Développée par Theodor Svedberg durant les années 1920, elle a permis d'étudier de nombreuses macromolécules et phénomènes macromoléculaires, par exemple la réPLICATION de l'ADN [22]. Combinée à d'autres méthodes d'analyse, elle permet de déterminer avec grande précision la pureté d'un échantillon, de caractériser les interactions entre des protéines ainsi que la stoechiométrie des complexes résultants, de déterminer des changements de conformation et de mesurer des constantes d'équilibre de système hétérogène [23]. Deux types d'expériences sont réalisés pour analyser les protéines et les macromolécules : celles dites de 'Sedimentation Velocity' et de 'Sedimentation Equilibrium'.

### 1.3.3.1 Sedimentation Velocity (Vitesse de sédimentation)

Avec l'expérience de type 'Sedimentation Velocity', la sédimentation des particules en solution est suivie au cours du temps. La vitesse est telle que la sédimentation prédomine sur la diffusion, mais la diffusion ne peut être négligée dans de nombreux cas. Plusieurs modèles existent pour analyser les résultats obtenus et obtenir une distribution de coefficients de sédimentation .

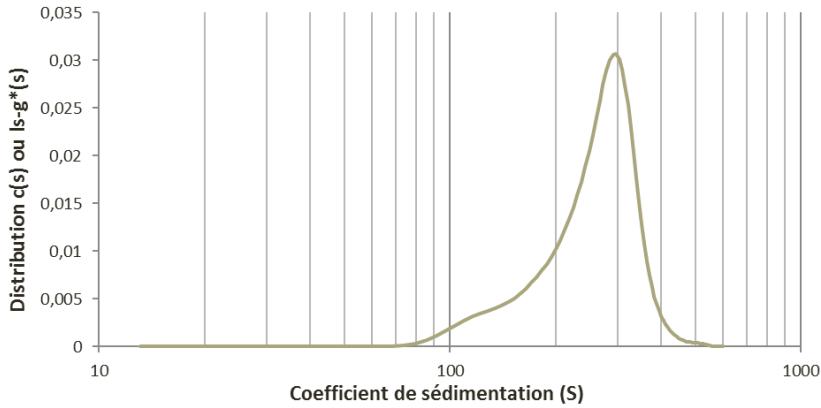


Figure 10. Distribution des coefficients de sédimentation pour des billes de polystyrène monodisperse de 100 nm.

La distribution  $c(s)$  est calculée de prime abord pour la majorité des échantillons analysés. Elle permet de savoir rapidement si un échantillon est hétérogène et de connaître le modèle à utiliser par la suite. Même si la sédimentation prédomine, le modèle tient compte de la diffusion des espèces en solution. De plus, le modèle suppose que les particules n'interagissent pas entre elles, et que la solution est idéale. Le signal mesuré est reconstruit par intégration pour tous les scans obtenus au cours de la sédimentation selon [6] :

$$a(r,t) \equiv \int c(s) L(s, r, t) ds \quad 15$$

avec  $a(r,t)$  le signal obtenu par ultracentrifugation,  $L(s, r, t)$  les solutions de l'équation de Lamm calculées avec la méthode des éléments finis. Dans ce modèle, le rapport entre le coefficient de friction de la macromolécule  $f$  et celui d'une sphère parfaite  $f_0$  est optimisé et supposé le même pour toutes les espèces en solution.

La distribution  $ls - g^*(s)$  se base sur les mêmes hypothèses que la distribution  $c(s)$ , mais elle néglige les phénomènes de diffusion face au phénomène de sédimentation. Cette hypothèse est

valide pour les grandes particules denses (nanoparticules d'or ou billes de polystyrène par exemple). La résolution se base sur des fonctions en escaliers  $U(s, r, t)$  (équation 16) [6].

$$U(s, r, t) = e^{-2\omega^2 st} \cdot \begin{cases} 0 & \text{si } r < r_m e^{-2\omega^2 st} \\ 1 & \text{sinon} \end{cases} \quad 16$$

avec  $r_m$  la position radiale du ménisque.

Par intégration, le signal  $a(r, t)$  est reconstruit comme précédemment (équation 1.17).

$$a(r, t) \equiv \int ls \cdot g^*(s) U(s, r, t) ds \quad 17$$

Ces résolutions numériques ont été implémentées dans le logiciel SEDFIT développé par Peter Schuck [24, 25].

### 1.3.3.2 Sedimentation Equilibrium (Équilibre de sédimentation)

Une expérience de type 'Sedimentation Equilibrium', comme son nom l'indique est une expérience où un équilibre de sédimentation est atteint. Un profil de concentration indépendant du temps est obtenu. Cherchant à obtenir un équilibre, la vitesse de la centrifugeuse est beaucoup plus faible qu'en mode 'Sedimentation Velocity' pour une même espèce. À l'équilibre, la sédimentation et la diffusion de l'espèce analysée s'annulent donnant :

$$0 = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[ \left( D \frac{\partial c}{\partial r} - \omega^2 sr \right) r \right] \quad 18$$

qui, dans le cas d'une espèce pure, peut se résoudre [6] :

$$a(r) = a_0 e^{M(1-\bar{\nu}\rho) \frac{\omega^2}{2RT} (r^2 - r_0^2)} \quad 19$$

avec  $a_0$  la valeur du signal au rayon de référence  $r_0$ .

A l'inverse des expériences de type 'Sédimentation Velocity', un seul scan est obtenu pour une vitesse donnée. Celui-ci étant insuffisant pour une analyse cohérente, deux scans supplémentaires sont alors pris en compte pour des vitesses différentes.

Dans le cas d'une auto- ou d'une hétéro-association, la solution des équations de Lamm ressemble fortement à celle obtenue ci-dessus. Cela revient à sommer des exponentielles, ce qui présente un fort potentiel de produire une erreur d'interprétation si les espèces en solution ne sont pas connues. La principale utilité d'une expérience de type 'Sedimentation Equilibrium' est de calculer la masse molaire de l'échantillon et les constantes d'équilibre qui sont directement accessibles par la résolution des équations de Lamm. En revanche, une expérience de type 'Sedimentation Equilibrium', se suffit rarement à elle-même, mais complète une expérience de type 'Sedimentation Velocity'.

Le logiciel SEDPHAT est utilisé pour résoudre ce genre de problème, car il permet de considérer de nombreuses situations associatives différentes [26].

## 1.4 Caractérisation des nanoparticules par AUC

### 1.4.1 Caractérisation des colloïdes

La caractérisation des colloïdes et nanoparticules par ultracentrifugation analytique a été rendue plus facile depuis la mise en place de l'interférométrie de Rayleigh sur l'ultracentrifugeuse. À l'inverse de nombreuses protéines qui absorbent à 260 nm, de très nombreux colloïdes (certains polymères et sucres par exemple), n'absorbent pas entre 190 et 800 nm, rendant leur analyse par ultracentrifugation impossible jusque-là. Leur analyse reste compliquée de nos jours malgré l'implémentation des interféromètres sur les ultracentrifugeuses.

En effet, l'hypothèse d'idéalité des solutions qui est souvent supposée dans le cas des protéines, n'est plus forcément présente dans le cas de certains polymères comme le chitosan [27]. Le phénomène de non-idéalité est souvent expliqué de trois manières différentes :

- la viscosité du fluide augmente avec la concentration en particules, ce qui implique une diminution du coefficient de sédimentation ;
- la densité de la solution dépend de la concentration, ce qui implique que la solution au fond de la cellule est plus dense et peut ralentir la sédimentation de manière importante ;
- une particule en se déplaçant laisse derrière elle un vide qui est remplacé par du fluide provoquant un courant inverse à la sédimentation et donc la ralentit.

Le plus souvent un coefficient de sédimentation intrinsèque  $s_0$  est obtenu en extrapolant une dilution infinie:

$$s(c) = \frac{s_0}{1 + k_s c} \quad 20$$

avec  $k_s$  le coefficient de non-idealité.

Les effets de charges sont aussi à considérer dans les effets de non-idealité. Les effets de charges sont liés aux interactions électrostatiques des espèces chargées en solution. Ils ont tendance à ralentir la sédimentation de l'espèce chargée à étudier. Deux effets de charges sont à distinguer, le primaire et le secondaire. Lors de la sédimentation d'une particule chargée, les contre-ions se déplacent avec elle pour maintenir la neutralité de la solution. Étant beaucoup plus légers que la particule elle-même, ils vont ralentir le déplacement de la particule, et donc mener à une sous-estimation de son coefficient de sédimentation. Cet effet s'annule en diminuant la concentration de l'espèce chargée ou en augmentant la force ionique de la solution. Pour les protéines et les macromolécules, le plus souvent étudiées, l'ajout de 50 mM de NaCl ou KCl est suffisant. L'effet de charge secondaire est lié à la nature des contre-ions, qui peuvent légèrement modifier le coefficient de sédimentation surtout pour les espèces légères, comme l'albumine de sérum bovin [28]. L'effet de charge primaire est également présent pour les polyélectrolytes très utilisés en thérapie génique. Des études en mode 'Sedimentation Equilibrium' se sont intéressés à ce phénomène pour déterminer la charge des particules à l'aide de nouveaux modèles théoriques [29].

Pour certains colloïdes, très denses et très grands, la sédimentation est tellement rapide, que seulement quelques scans sont possibles. C'est le cas par exemple de particules d'or qui nécessitent de très faibles vitesses pour leur étude par absorbance [30, 31]. C'est aussi potentiellement le cas pour la majorité des complexes à base d'ADN, si l'on se base sur les données de la littérature, aussi bien sur leur taille que sur leur volume spécifique partiel. La vitesse de sédimentation pour certains colloïdes est tellement grande, qu'en quelques secondes ils ont atteint le fond de la cellule. L'interférométrie de Rayleigh permet en partie de résoudre ce problème, grâce à sa rapidité de détection et de mesure [21].

## 1.4.2 Caractérisation des complexes à base d'ADN/ARN

La caractérisation des complexes à base d'ADN en thérapie génique par ultracentrifugation analytique est un champ d'études pratiquement inexistant si nous nous basons sur la littérature scientifique actuelle.

### 1.4.2.1 Une étude pionnière

En fait, une seule étude s'intéresse aux complexes formés par un plasmide d'ADN avec du PEI [5]. Dans cette étude, ces complexes sont formés dans 50 mM de NaCl à différents ratios N/P. Le ratio N/P est le nombre d'atomes d'azote des polycations pouvant capter un proton sur le nombre d'atomes de phosphate chargés négativement de l'ADN ou ARN. La vitesse de l'ultracentrifugeuse a été fixée entre 1 000 tours par minute ( $80\text{ g}$ ) et 40 000 tours par minute ( $130\,000\text{ g}$ ) en fonction de la taille des nanoparticules. Les deux systèmes de détection de l'ultracentrifugeuse analytique ont été utilisés simultanément pour recueillir les résultats.

Trois modèles sont appliqués pour étudier les résultats obtenus par ultracentrifugation analytique : les distributions  $c(s)$  et  $ls - g^*(s)$  décrites précédemment, et la distribution  $c(s, f / f_0)$ , qui ajoute une dimension supplémentaire à la résolution. Pour chaque sédimentation de coefficient s, le rapport des coefficients de friction  $f / f_0$  peut donc varier. Une transformation en taille est réalisée en utilisant l'équation de Stokes-Einstein et en introduisant le coefficient de friction  $f / f_0$ . Le volume spécifique partiel nécessaire à la détermination de la taille a été obtenu en utilisant la méthode de variation de la densité [32].

Dans cette étude, la détermination du ratio N/P a été fournie par la méthode d'Orange II pour les faibles concentrations en PEI libre (soit les faibles ratios N/P initiaux). À plus fortes concentrations, l'ultracentrifugeuse analytique est utilisée. Le suivi de la sédimentation du PEI libre à haute vitesse a permis de déterminer sa concentration en solution, et donc de déterminer la quantité de PEI lié à l'ADN.

Cet article bien qu'extrêmement intéressant semble contenir plusieurs contradictions alors que plusieurs points ne sont pas assez développés. Cet article s'intéresse à des complexes PEI/pDNA formés à pH physiologique et à forte concentration en sel, or dans ces conditions les complexes formés ont une forte tendance à l'agrégation, ce qui est observé. Il est difficile par la suite de

d'analyser les résultats obtenus par AUC, DLS et AFM en sachant qu'au cours du temps ce type de complexes forment des agrégats de plus en plus grand, le plus souvent de manière non reproductible.

#### **1.4.2.2 Nos connaissances actuelles.**

Considérant les limites de l'étude précédente, nous avons approché le problème de manière différente. Nous nous sommes placés dans un cas idéal de particules sphériques poreuses. La porosité a été démontrée dans la littérature pour des particules à base de chitosan et ADN plasmidique [33, 34]. Ces particules sont donc très poreuses (au-dessus de 85% de porosité). Cela a également été montrée en étudiant la densité de ce type de particules, qui est entre 0.3 g/mL et 0.6 g/mL [35]. Cette densité a été calculée en mesurant la masse de ces particules et leurs rayons hydrodynamiques. En revanche le volume spécifique partiel de leurs composants (ADN, chitosan et PEI) montre qu'ils sont très denses (au-dessus de 1.5 g/mL) [27, 36].

Les polyplexes se forment par interactions électrostatiques. Les constantes d'association trouvées dans une précédente étude pour des complexes à base de chitosan et de plasmide sont aux alentours de  $10^9 - 10^{10}$  M [20]. Après formation, les particules sont stables et ne se dissocient pas, ce qui facilite leur caractérisation aussi bien par diffusion dynamique de la lumière que par ultracentrifugation analytique.

**CHAPITRE 2 L'ANALYSE COMBINÉE DES COMPLEXES  
POLYCATIONS/ODN PAR ULTRACENTRIGATION ANALYTIQUE  
ET DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIÈRE RÉVÈLE LEUR  
TAILLE, LEUR VARIATION D'INDICE DE RÉFRACTION, LEUR  
STOÉCHIOMÉTRIE, LEUR POROSITÉ ET LEUR MASSE  
MOLÉCULAIRE.**

## **2.1 Présentation de l'article**

L'ultracentrifugation analytique est une technique intéressante pour caractériser de nombreux colloïdes, mais elle a été rarement utilisée pour caractériser les complexes à base de matériel génétique [5, 6]. Nous cherchons ici à caractériser des complexes à base d'ODN et de chitosan ainsi que ceux à base de PEI et d'ODN par ultracentrifugation analytique. Quelles caractéristiques physico-chimiques de nos polyplexes donnent l'ultracentrifugation analytique ? Est-elle aussi précise que d'autres techniques ? Pouvons-nous la combiner avec d'autres méthodes pour avoir de plus amples informations sur nos polyplexes ?

Ce mémoire et cet article répondent à ces questions en utilisant. Nous nous intéressons tout particulièrement aux complexes chitosan/ODN et PEI/ODN. Comme son titre l'indique, nous combinerons également l'ultracentrifugation analytique avec une autre technique, la diffusion dynamique de la lumière.

## **2.2 Combined Analysis of Polycation/ODN Polyplexes by Analytical Ultracentrifugation and Dynamic Light Scattering Reveals their Size, Refractive Index Increment, Stoichiometry, Porosity and Molecular Weight.**

### **2.2.1 Author names**

Yves Niebel, Michael D. Buschmann, Marc Lavertu\*‡, Gregory De Crescenzo\*‡

### **2.2.2 Author address**

Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (QC), Canada H3C 3A7.

### **2.2.3 Keywords**

Chitosan, PEI, siRNA-mimicking ODN, Static Light Scattering, Electron Microscopy

## 2.2.4 ABSTRACT

Analytical ultracentrifugation (AUC) and dynamic light scattering (DLS) were combined to characterize polyplexes formed with 10kDa chitosan or 10kDa PEI and oligodeoxynucleotides (ODN). Combined analysis revealed that both polyplexes were highly porous (over 80%) and that their weight-average hydrodynamic diameters were of 46 and 55 nm for chitosan/ODN and PEI/ODN complexes, respectively. Transformation of the sedimentation coefficient distribution to a size and molecular weight distribution, gave an average molecular weight of 19 and 29 MDa for chitosan and PEI polyplexes, respectively. Data from AUC also allowed for the calculation of the actual  $dn/dc$  and N/P ratios of each polyplex. Additional data from scanning electron microscopy and static light scattering confirmed the conclusions that were initially derived from AUC and DLS, thus validating that the combination of AUC and DLS is a powerful approach to characterize polyplexes in terms of refractive index increment, size and molecular weight distributions as well as porosity.

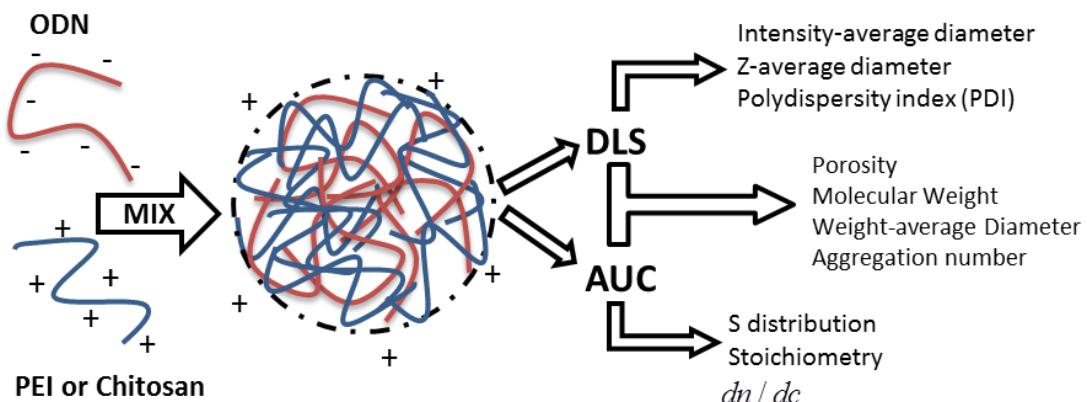


Figure 11. Table of content

### 2.2.5 Introduction

Interest in the field of non-viral gene therapy has risen significantly in the past years due to some recent success in human clinical studies [37-39] of small interfering RNA (siRNA). As a result, a great diversity of siRNA delivery systems are currently being developed, including lipid nanoparticles (lipoplexes) [40], polymeric nanoparticles (polyplexes) [41, 42] and siRNA conjugates [2]. Among cationic polymers, the synthetic polycation polyethyleneimine (PEI) is the most widely used to deliver siRNA [43], while chitosan-derived vectors have garnered increasing interest as chitosan is biocompatible [44], biodegradable [45] and nontoxic [46].

In order to establish clear structure-activity relationships for optimizing polyplexes, a complete characterization of their physicochemical properties relying on the use of multiple independent analytical techniques is required. Particle size and size distribution are the most widely assessed properties of these nano-sized systems since they significantly influence their behavior and functionality. Amongst other important physicochemical properties are the surface charge, the molecular weight and the amount of free excess polycation, the latter was recently shown to play a very determinant role in transfection [47, 48]. Dynamic light scattering (DLS) and electron microscopy (EM) are commonly used techniques for size measurement [3, 15], while Doppler velocimetry and static light scattering (SLS) are used for zeta potential (surface charge) and molecular weight determination, respectively. A combined technique where Asymmetrical Flow-Field Flow Fractionation (AF4) is coupled to light scattering and UV/vis spectroscopy was used recently to determine the size distribution and stoichiometry of chitosan-based polyplexes [4].

Analytical Ultracentrifugation (AUC) has become a powerful technique to characterize proteins and their interactions, since the development of new computer-based modeling relying on the Lamm equation [24, 26]. It has also been proven to be of great interest for colloid analysis [21, 49]. However, to the best of our knowledge, there is only one study in the literature reporting the use of AUC for the characterization of polycation/nucleic-acid complexes [5]. As for AF4, AUC has the ability to separate species according to their size and, therefore, allows for the quantification of free excess polycations in polyplex solutions. Moreover, the sedimentation coefficient distribution provided by AUC can be converted into a hydrodynamic size distribution if one knows the particle partial specific volume while assuming that the particle is a compact sphere [21]. Such an assumption provides a minimal value of the hydrodynamic size and is

appropriate for compact structures such as dense nanoparticle and globular proteins [50]. Although polyelectrolyte complexes such as polyplexes are much more compact than their individual constituents, the particle density (i.e. particle mass divided by particle hydrodynamic volume) normally ranges from 0.3 to 0.7 g/mL and can even be lower, especially if the mismatching of the intercharge distance between the constituents is large [35]. A comparison of these values with the inverse of the partial specific volume of the polyplex constituents (e.g. 1.79 and 1.69 g/mL for DNA [36] and chitosan [27], respectively) reveals that these structures are highly porous. Porosity values as high as 95% have been reported for chitosan-plasmid DNA complexes [33, 34]. Their porosity must be known in order to precisely convert particle sedimentation coefficient into hydrodynamic size.

We report here a new approach for the characterization of polycation/nucleic acid complexes, which relies on a combination of AUC and DLS measurements in order to overcome the challenge associated with the inherent porosity of this type of nanoparticles. Polyplexes formed between siRNA-mimicking oligodeoxynucleotide (ODN) and chitosan or PEI were used as models to demonstrate the advantages of AUC/DLS combination to determine porosity, particle size, size distribution, molecular weight, stoichiometry and incremental refractive index of polyplexes. For validation purposes, polyplexes were also characterized by SLS and EM.

## 2.2.6 Theoretical Aspect

### 2.2.6.1 Sedimentation of a porous particle in a centrifugal field.

The porous sphere model is used to represent the polyplex and a nondraining behavior is assumed, a common assumption for polymers [51]. When placed in a centrifugal gravitational field, three forces are acting on the particle, namely the gravitational force  $\vec{F}_s$  (equation (21)), the buoyant force  $\vec{F}_b$  (equation (22)), and the frictional force  $\vec{F}_f$  (equation (23)), as previously reported[52, 53]:

$$F_s = (1 - \varepsilon_p) \frac{4\pi}{3} \bar{v} a^3 \cdot \omega^2 r \quad (21)$$

$$F_b = -(1 - \varepsilon_p) \frac{4}{3} \pi a^3 \cdot \rho \quad (22)$$

$$F_f = -f \cdot u = -f \cdot s \cdot \omega^2 r \quad (23)$$

where  $\omega$  is the angular speed,  $r$  is the distance from the center of rotation,  $a$ ,  $\bar{v}$  and  $\varepsilon_p$  are the radius, the partial specific volume and the porosity of the particle, respectively,  $\rho$  and  $\eta_s$  are the solvent density and viscosity, respectively and  $u$  is the speed of the particle when the three forces come into balance. It is noteworthy that the mass and the buoyant mass of the particle are corrected by the porosity parameter,  $\varepsilon_p$ , while the same frictional force as for a compact and non-porous sphere of equivalent size is considered to act on the polyplex since non-draining behavior is expected. The porosity is considered to be independent of the particle size and the spheres were considered to be homogeneous throughout all calculations in this study. Using Stokes Einstein equation [21], the diameter  $d_p$  can be deduced from the sedimentation coefficient using:

$$d_p = 2a = \sqrt{\frac{18 \cdot \eta \cdot s}{(1 - \varepsilon_p)(1/\bar{v} - \rho)}} \quad (24)$$

### 2.2.6.2 $c(s)$ and $ls - g^*(s)$ models for the analysis of AUC sedimentation profiles.

Two models were used here to analyze sedimentation data in this study. The  $c(s)$  distribution model is based on the numerical resolution of the Lamm Equation (equation (25)) for ideal species that do not interact with each other. It is implemented into the SEDFIT software with a maximum entropy regularization [24].

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right) - \omega^2 s \left( r \frac{\partial c}{\partial r} + 2c \right) \quad (25)$$

where  $c$  is the mass concentration of a given species,  $\omega$  is the angular speed,  $D$  is the diffusion coefficient,  $s$  is the sedimentation coefficient,  $t$  is the time and  $r$  is the radius or distance from the center of the centrifuge. This model was used for the analysis of the sedimentation data of single species.

The least-square boundary model, known as the  $ls - g^*(s)$  distribution, is also based on the numerical resolution of the Lamm equation (equation (25)), but for ideal non-interacting and non-diffusing species ( $D=0$ ). It is also implemented in the SEDFIT software, but with a Tikhonov-Philips regularization procedure [25]. This model was used for the analysis of the sedimentation data of polyplexes.

The weight-average diameter of polyplexes was determined from the sedimentation coefficient distribution as follows:

$$d_{p,w,AUC} = \frac{\int ls - g^*(s) \cdot d_p(s) \cdot ds}{\int ls - g^*(s) \cdot ds} \quad (26)$$

where  $d_p(s)$  is the diameter calculated with equation (24).

### 2.2.6.3 Intensity-weighted average hydrodynamic diameter derived from AUC

The intensity-weighted average hydrodynamic diameter (also provided by DLS),  $d_{p,I,AUC}$ , was also calculated from the  $ls - g^*(s)$  distribution as follows:

$$d_{p,I,AUC} = \frac{\int ls - g^*(s) \cdot d_p(s)^4 \cdot ds}{\int ls - g^*(s) \cdot d_p(s)^3 \cdot ds} \quad (27)$$

This calculation of  $d_{p,I,AUC}$  (for comparison with DLS results) assumes Rayleigh scattering, i.e. an isotropic scattering with intensity that is proportional to the square of the particle mass or, equivalently, to the 6<sup>th</sup> power of its size ( $R^6$ ). The DLS size distributions of polyplex (Figures S6 et S8 in supplementary information) revealed that most of the particles were sufficiently small to be considered as Rayleigh scatterers (for an angle of detection of 173° and a laser wavelength of 633 nm, the  $R^6$  dependence of intensity was satisfied for hydrodynamic diameters up to about 100 nm or so) and the use of equation (27) was thus appropriate.

#### 2.2.6.4 Calculation of porosity by combining AUC and DLS.

The porosity,  $\varepsilon_p$ , was calculated from the intensity-weighted average diameters measured by DLS,  $d_{p,I,DLS}$ , and determined by AUC,  $d_{p,I,AUC}$ , supposing that particles were not porous ( $\varepsilon_p = 0$ ). Considering that DLS and AUC intensity-weighted diameters should be equal, the porosity parameter was calculated by combining (24) and (27):

$$\varepsilon_p = 1 - \left( \frac{d_{p,I,AUC}(\varepsilon_p = 0)}{d_{p,I,DLS}} \right)^2 \quad (28)$$

#### 2.2.6.5 Number-weighted average diameter and weight-average molecular weight derived from AUC.

Number-weighted average diameter,  $d_{p,N,AUC}$ , was calculated from the  $ls - g^*(s)$  distribution by including the porosity derived from equation (28) as follows:

$$d_{p,N,AUC} = \frac{\int \frac{ls - g^*(s)}{d_p^3(s)} \cdot d_p(s) \cdot ds}{\int \frac{ls - g^*(s)}{d_p^3(s)} \cdot ds} \quad (29)$$

Number-weighted average diameter was determined for comparison with SEM results.

Similarly, weight average molecular weight,  $M_{w,AUC}$ , was calculated from the  $ls - g^*(s)$  distribution by correcting the mass of compact sphere with the porosity derived from equation (28) as follows:

$$M_{w,AUC} = \frac{\int ls - g^*(s) \cdot (1 - \varepsilon_p) \frac{4\pi}{3V} \left(\frac{d_p(s)}{2}\right)^3 \cdot ds}{\int ls - g^*(s) \cdot ds} \quad (30)$$

$M_{w,AUC}$  was calculated for comparison with results from SLS.

## 2.2.7 Materials and Methods

### 2.2.7.1 Materials.

Ultrapure chitosan with a degree of deacetylation (DDA) of 92.7% was depolymerized using nitrous acid to achieve a number average molecular weight ( $M_n$ ) of 10 kDa following previously published procedure [3]. Molecular weight distribution and DDA were determined by size exclusion chromatography [54] and  $^1\text{H}$  NMR [55], respectively. Oligodeoxynucleotide: sense 5'-GTCATCACACTGAATACCAAT-3'; antisense: 5'-ATTGGTATTCACTGTGATGACAC-3' ( $M_w$  13451.9 Da), which is an ApoB1 siRNA-mimicking [56] ODN, was from IDT. Linear Polyethylenimine (Product N°:765090) and Hydrochloric Acid (1N) were from Sigma. Chitosan and PEI properties are shown in Table 1.

Table 1. Molecular characteristics of Chitosan and PEI

	$M_n$ (kDa)	Polydispersity Index (PDI)	DDA
Chitosan	8.1	1.2	92.7%
PEI	9.7 <sup>1</sup>	1.2 <sup>1</sup>	-

<sup>1</sup> Values from the supplier

### 2.2.7.2 Preparation of the ODN/polycation complexes.

Chitosan (5 mg/mL) and PEI (2 mg/mL) stock solutions were prepared by dissolving the polymer overnight in deionized water and HCl with HCl:glucosamine or HCl:ethyleneimine molar ratios of 1. ODN was dissolved in deionized water. All polymer stock solutions were filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  filter prior to use. Complexes were formed by adding an equal volume (between 50  $\mu\text{L}$  and 500  $\mu\text{L}$ ) of polycation solution into a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ODN solution. Mixing was done by quickly pipetting up and down the final solution. Samples were allowed to incubate at room temperature for 30 minutes before DLS, SLS and EM analysis. For AUC experiments, samples were placed directly into the instrument to reach thermal equilibrium. All polyplexes were prepared at an

amine:phosphate molar ratio (N/P ratio) of 5, i.e., for a 100 µg/mL ODN solution, a 270 µg/mL chitosan solution or a 65 µg/mL PEI solution was used to prepare polyplexes. All experiments were performed in the presence of 10 mM NaCl, the concentration that was determined to be necessary to eliminate any electrostatic contributions to the sedimentation coefficient. This final ionic strength was achieved by adding a volume of 50 mM NaCl solution corresponding to 20% of the sample volume, a few minutes after polyplex preparation. For  $dn/dc$  measurement and the determination of the N/P ratios of the PEI/ODN polyplexes, the complexes were prepared using a 200 µg/mL ODN solution. The concentration of polycation solution was adjusted accordingly in order to maintain a mixing N/P ratio of 5.

#### 2.2.7.3 Analytical Ultracentrifugation.

AUC of all polyplex samples was performed using a ProteomeLab XL-I instrument (Beckman Coulter) equipped with a titanium 8-hole rotor (Beckman Coulter, An-50 Ti). The cells were assembled with sapphire windows and Epon charcoal-filled double sector, 12 mm pathlength centerpieces. The reference and the sample sectors were filled with 400 µL of 10 mM NaCl aqueous solution and 400 µl of sample solution, respectively. All the experiments were performed at 20°C and the samples were placed in the centrifuge for at least one hour prior to centrifugation to ensure thermal equilibrium was reached for the analysis. For single species (ODN, PEI, chitosan), AUC speed was fixed at 50,000 rpm (RCF = 200,000g). Sedimentation profiles were collected by interference optics using a laser diode at 655 nm and analyzed using the  $c(s)$  distribution. For polyplexes, the speed was fixed at 10,000 rpm (RCF = 7300 g). Sedimentation profiles were collected by measuring absorbance (260 nm) for polyplexes (following ODN) and analyzed using the  $ls - g^*(s)$  distribution.

For each species, the partial specific volume reported in the literature was used, namely 0.56 ml/g for ODN [36], 0.59 mL/g for chitosan [27], 0.669 mL/g for PEI [5], 0.58mL/g for chitosan/ODN complexes [33, 34][33, 34][33, 34][33, 34] and 0.50 mL/g for PEI/ODN complexes. We here assumed that the partial specific volumes of polymers/pDNA [5, 33, 34] and polymers/ODN complexes do not significantly differ. SEDNTERP software was used to determine the density and the viscosity of the 10mM NaCl aqueous solution used as solvent [57].

#### 2.2.7.4 Refractive index increment and N/P ratio determination by AUC.

##### 2.2.7.4.1 Refractive index increment of single species.

Chitosan, PEI and ODN were diluted from stock solutions to achieve a final concentration of 0.5 g/L. Each solution was analyzed by AUC as described above at 50,000 rpm using interference optics. The  $dn/dc$  of each species was calculated using the following equation:

$$\Delta J = \frac{l \cdot (dn/dc)}{\lambda} \cdot c \quad (31)$$

where  $\Delta J$  is the number of fringes calculated from the integration of the  $c(s)$  distribution obtained with SEDFIT,  $l$  is the optical path,  $\lambda$  is the laser wavelength and  $c$  is the concentration of species.

##### 2.2.7.4.2 Quantification of unbound polymers by AUC and determination of the N/P ratio of the polyplexes.

Concentration of excess free polycation in polyplex samples was determined by AUC at 50000 rpm using interference optics. After a few minutes, polyplexes had completely sedimented and a new sedimentation boundary corresponding to the lower mass species appeared. It is noteworthy that the absorbance at 260 nm revealed no free ODN left in the solution after complete sedimentation of the polyplexes. Concentration of the free polymer was determined by integrating the  $c(s)$  distribution peak corresponding to the polymers species and using the  $dn/dc$  of the polymer previously calculated using equation (31). The polyplex N/P ratio was then calculated by using the following equation:

$$N/P_{polyplex} = \frac{(c_{p,t} - c_{p,f}) \cdot N_N}{c_{ODN} \cdot N_P} \quad (32)$$

where  $c_{p,t}$  is the total mass concentration of polymers,  $c_{p,f}$  is the mass concentration of free polymers after mixing,  $c_{ODN}$  is the concentration of ODN,  $N_N$  is the number of amine groups per mass unit of polymers and  $N_P$  is the number of phosphate groups per mass unit of ODN.

#### 2.2.7.4.3 Refractive index increment of polyplexes.

The  $dn/dc$  of polyplexes was determined at 10,000 rpm using equation (31). The mass concentration of polyplexes was calculated from the known concentration of ODN and polymer as well as from the N/P ratios of the mix and of the resulting polyplexes using:

$$c_{polyplex} = c_{ODN} + \frac{c_{polymer} \cdot N / P_{polyplex}}{N / P_{mix}} \quad (33)$$

where  $c_{polyplex}$  is the mass concentration of polyplexes,  $c_{ODN}$  is the mass concentration of ODN,  $c_{polymer}$  is the total mass concentration of polymer,  $N / P_{polyplex}$  is the polyplex stoichiometry (equation (32)) and  $N / P_{mix}$  is the mixing N/P ratio.

#### 2.2.7.5 Determination of the number of ODN and polymer per particle.

The weight-average number of ODN and polymer molecules per particle were determined from the calculated weight- average molecular weight (equation (30)) and the polyplex N/P ratio ( $N / P_{polyplex}$ , equation (32)) as follows:

$$N_{ODN} = \frac{M_{w,AUC}}{\left( MW_{ODN} + \frac{q_{ODN} \cdot N / P_{polyplex}}{q_{polycation}} MW_{polycation} \right)} \quad (34)$$

$$N_{polycation} = N_{ODN} \left( \frac{q_{ODN} \cdot N / P_{polyplex}}{q_{polycation}} \right)$$

where  $N_{ODN}$  and  $N_{polycation}$  are the number of ODN and polycation molecules within the particle, respectively,  $M_{w,AUC}$  is the weight-average molecular weight of polyplex calculated using equation (30),  $MW_{ODN}$  and  $MW_{polycation}$  are the molecular weight of ODN and polycation molecules (number-average molecular weight, Table 1) respectively, and  $q_{ODN}$  and  $q_{polycation}$  are the number of charges or ionisable moieties per molecule of ODN and polycation, respectively. Here, chitosan, PEI and ODN, bear 46, 44 and 220 charges or ionisable moieties per molecule on average, respectively.

### 2.2.7.6 Dynamic Light Scattering and Static Light Scattering.

DLS and SLS were performed at 20°C on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument) with a laser wavelength of 633nm and a scattering detection of 173°C. SLS was performed for samples diluted to 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 and 20 µg/mL of ODN. For each concentration, one DLS measurement with one read-out, using both the CONTIN algorithm and the cumulant fit was also performed. Toluene was used as reference solution for SLS measurements. Solutions were analyzed from the lowest to the highest concentration in order to obtain a Debye plot by applying the Rayleigh equation (equation (35)), from which the weight average molecular weight of the polyplexes,  $M_w$ , is determined by an extrapolation to infinite dilution:

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \left( \frac{1}{M_w} + 2A_2c \right) P(\theta) \quad (35)$$

where  $A_2$  is the second virial coefficient,  $R_\theta$  is the ratio of scattered light to incident light also called the Rayleigh ratio,  $c$  is the polyplex mass concentration calculated from the polyplex N/P ratio (equation (33)),  $P(\theta)$  the angular dependence of the polyplex scattering intensity, and  $K$  is an optical constant given by:

$$K = \frac{2\pi}{\lambda^4 N_A} \left( n_0 (dn/dc) \right)^2 \quad (36)$$

where  $\lambda_0$  is the laser wavelength,  $N_A$  is the Avogadro's constant,  $n_0$  is the solvent refractive index, and  $dn/dc$  is the refractive index increment of the polyplexes measured by analytical ultracentrifugation as described above.

A spherical shape correction implemented in the manufacturer software was applied, in agreement with the morphology revealed by EM (see Figure 13).

### 2.2.7.7 Scanning electron microscopy.

Samples were prepared using a Badger 250 Mini Spray to pulverize the polyplex solutions on a silicon substrate, which was subsequently coated with gold. SEM analysis was performed using an environmental SEM (ESEM, Quanta 200 FEG, FEI Company Hillsboro, OR). The high vacuum mode of the ESEM microscope was employed for greater resolution and increased

contrast. An accelerating voltage of 20 kV; a spot size of 3 and a working distance of 5 mm were used. For each sample, 5 to 6 images were acquired and 10 particles/image were characterized for their size. Mean size and standard deviation were calculated from these 50-60 measurements.

#### **2.2.7.8 Statistics.**

Mean and standard deviation for each result were calculated from three independent experiments ( $N=3$ ) for AUC, SLS and DLS experiment.

## 2.2.8 Results and Discussion

### 2.2.8.1 Separation of free polymer and polyplex by AUC allows for the precise determination of polyplex refractive index increment and stoichiometry.

The determination of the refractive index increment ( $dn/dc$ ) of all single species and polyplexes was essential to calculate the N/P ratio as well as to measure the molecular weight of polyplexes by SLS.  $dn/dc$  values of 0.189, 0.293 and 0.168 mL/g were found for chitosan, PEI and ODN, respectively (Table 2). Refractive index increment determined by AUC for chitosan and ODN are in good agreement with previously reported values (Table 2). The slight discrepancy found for PEI (namely 0.293 mL/g in this study vs 0.263 - 0.272 mL/g in the literature [58]) is most likely due to differences between the solvent used in the different studies (10 mM NaCl solution in this study versus 1% formic acid [58]).

Table 2. Refractive index increment  $dn/dc$  of the different species.

	$dn/dc$ measured by AUC (mL/g)	$dn/dc$ from the literature (mL/g)
Chitosan	$0.189 \pm 0.002$	0.190 - 0.192[7, 54]
PEI	$0.293 \pm 0.004$	0.263 - 0.272 [58]
ODN	$0.168 \pm 0.002$	0.168-0.171 [15, 59]
Chitosan/ODN polyplexes	$0.117 \pm 0.005$	n.a.
PEI/ODN polyplexes	$0.152 \pm 0.001$	n.a.

We also determined the concentration of free polymer by analyzing the sedimentation profile of the remaining polymer at high speed (Table 3), as previously reported [5]. These values of free

polymer concentration allowed us to calculate the N/P ratios of the chitosan/ODN and PEI/ODN complexes of 1.3 and 2.4, respectively (Table 3). These N/P ratios are in agreement with those determined using AF4 or Orange II titration (for chitosan) as well as with AUC or a copper-based colorimetric approach (for PEI) (Table 3). Using these polyplex N/P ratios,  $dn/dc$  values of 0.117 mL/g and 0.152 mL/g were then deduced for chitosan/ODN and PEI/ODN polyplexes, respectively, from equations (31) and (33) (Table 2).

Table 3. Concentration of free polymers and polyplex N/P ratios (calculated with equation (32)).

Polyplexes	$c_{p,t}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$c_{p,f}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	N/P ratio AUC results	N/P ratio literature
Chitosan/ODN	108	$79 \pm 2$	$1.3 \pm 0.1$	1.2-1.6 [4]
PEI/ODN	52	$25 \pm 1$	$2.4 \pm 0.1$	2.4-2.5 [5, 60]

In our study, the  $dn/dc$  of polyplexes was directly measured by AUC instead of being calculated by relying on the common assumption of the additivity of the refractive index increment of the two components [15], namely the polycation and the ODN. Furthermore, our results strongly suggest that such the additivity of the refractive index increment of the two components is not applicable to highly interacting multi-component systems, such as polyplexes. Indeed, the additivity assumption would have given theoretical values ranging between the  $dn/dc$  values of singles species, whereas our experimental protocol gave values below this range (Table 2). Thus, AUC stands out as a technique of choice in order to measure  $dn/dc$  for polyplexes since, in contrast to standard refractometry measurements, AUC has the ability to separate complexes from free species. It is noteworthy to recall that the  $dn/dc$  values required for SLS measurements are those corresponding to complexes, the scattering of the free polymer being negligible when compared to that of the complexes.

### **2.2.8.2 Combining AUC and DLS allows for the calculation of porosity, size distribution, aggregation number and molecular weight of polyplexes.**

AUC profiles corresponding to three independent preparations of each type of polyplex (Figure 12A) demonstrated that our experimental protocol was reproducible with manual mixing of ODN and polycations. Furthermore, no sign of polyplex aggregates was present in our samples, in stark contrast with PEI/plasmid DNA polyplexes studied by Perevyazko and colleagues [5]. Analysis of the  $ls - g^*(s)$  distribution gave weight-average sedimentation coefficients,  $S_w$ , of 100 S and 299 S for chitosan/ODN and PEI/ODN polyplexes, respectively, which are at least 20-times higher than those of the individual constituent species (Figure 12B).

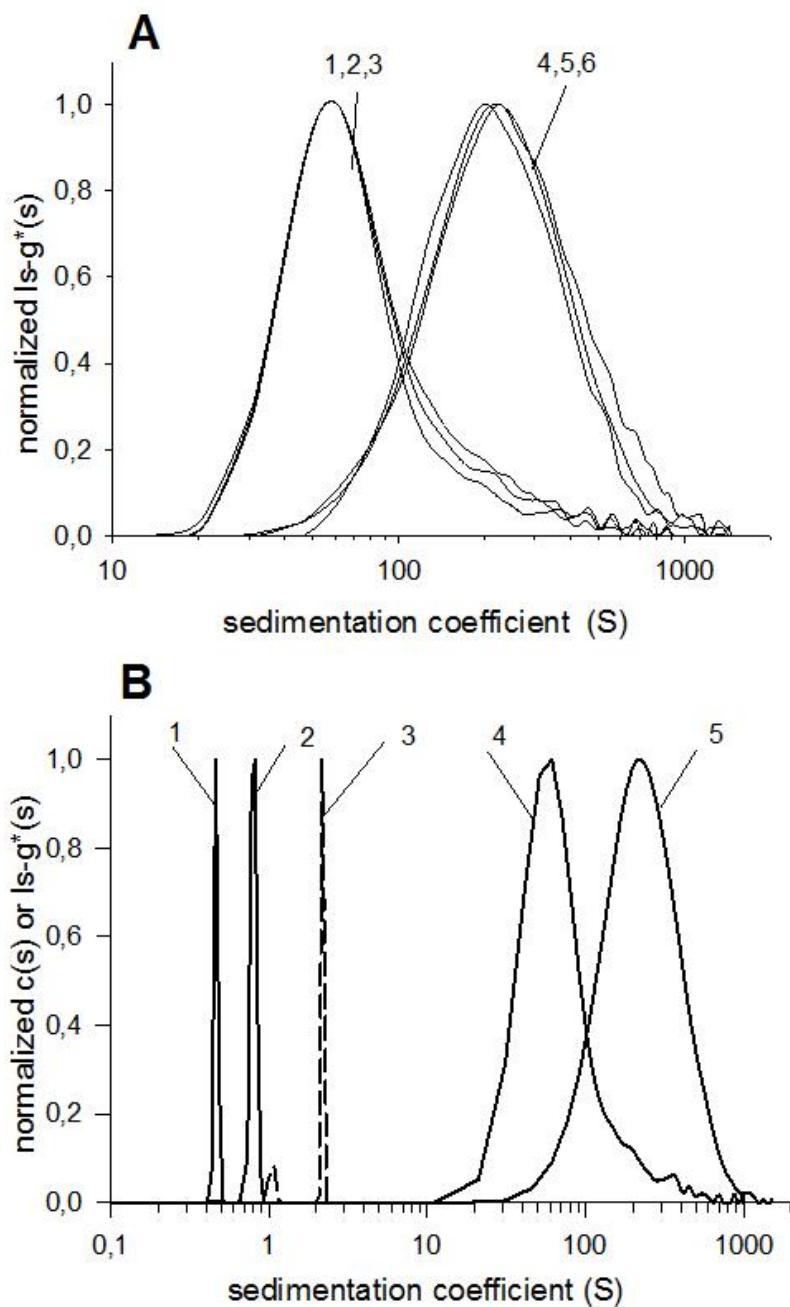


Figure 12. (A) Reproducibility of (1-3) chitosan/ODN and (4-6) PEI/ODN polyplexes as investigated by AUC (B) Sedimentation coefficient distribution of (1) PEI, (2) Chitosan, (3) ODN, (4) Chitosan/ODN and (5) PEI/ODN polyplexes. Sedimentation was performed at 50000 and 10000 rpm for single species and polyplexes, respectively.

A preliminary interpretation of these AUC data, assuming that the polyplexes are compact and spherical, gave intensity weight-average diameters of 31 and 34 nm for chitosan/ODN and PEI/ODN complexes (as calculated using equation (26)). These values were directly compared to the intensity weight-average diameter of the same polyplexes, determined by DLS where diameters of 97 and 82 nm were found for the chitosan/ODN and PEI/ODN polyplexes, respectively (Table 4). The lower sizes from AUC did not account for the highly porous nature of our polyplexes. The porosity ( $\varepsilon_p$ ) could then be calculated by combining AUC and DLS intensity weight average diameters using equation (28).  $\varepsilon_p$  was thereby calculated to be 90% and 83% for chitosan/ODN and PEI/ODN complexes, respectively. Introducing the porosity in equation (24), the weight-average diameters for chitosan/ODN and PEI/ODN polyplexes were found to be 46 nm and 55 nm, respectively (Table 6), as calculated by equation (26).

Table 4. Estimation of porosity  $\varepsilon_p$  based on the AUC and DLS results and equation (28) for both polyplexes.

Polyplexes	$S_w$	$d_{p,I,AUC}$ *	$d_{p,I,DLS}$	$d_{z-average,DLS}$	PDI	$\varepsilon_p$
	(S)	(nm)	(nm)	(nm)		
Chitosan/ODN	$100 \pm 7$	$31 \pm 1$	$97 \pm 7$	$72 \pm 4$	$0.23 \pm 0.02$	$90\% \pm 1\%$
PEI/ODN	$299 \pm 10$	$34 \pm 6$	$82 \pm 5$	$68 \pm 4$	$0.18 \pm 0.02$	$83\% \pm 4\%$

\* assuming that the polyplexes are non-porous.

Porosity was previously introduced theoretically for charged porous spherical nanoparticles exposed to a constant gravitational field in other studies [52, 53]. In this study we assumed a non-draining situation in which the fluid within the particle moves along with it. To the best of our knowledge, porosity corrections were never applied to sedimentation velocity experiments and never combined with DLS in order to characterize polyplexes. Porosity values we calculated in the case of chitosan/ODN polyplexes are close to the value found in the literature for scaffolds made of chitosan and plasmid DNA [33, 34]. The calculation of porosity implied the use of intensity weight-average diameters derived from both DLS and AUC (see equation (28)). For

AUC data, the calculation of the intensity weight-average diameters assumes Rayleigh-type scatterers (i.e., particles with scattered intensities proportional to the sixth power of the radius). Such an approximation held true for most of the particles corresponding to each type of polyplex under study, as revealed by SEM (Figure 13). PEI-derived polyplexes were found to be less porous than their chitosan counterparts, more likely due to higher mismatch of intercharge spacing between chitosan and ODN when compared to that of PEI and ODN (0.52 nm for chitosan [20], 0.25 – 0.35 nm for PEI [61] and 0.17 nm[20] for ODN). Indeed, intercharge spacing mismatches are known to induce swelling of polyelectrolyte complexes [35].

Pioneering work of Pereviazko *et al.* [5] studied PEI/pDNA polyplexes by AUC [5]; however, the authors did not introduce porosity in their analysis of AUC results. Sedimentation coefficients reported by Pereviazko *et al.* [5] were significantly higher than the ones we report here (10,000 versus 300 S). This difference is most likely due to the presence of aggregates since PEI/DNA polyplexes are prone to aggregation at physiological pH and high salt concentrations (as used in their study). In contrast, we used only 10 mM salt concentration and acidic conditions to ensure colloidal stability of polyplexes.

Having determined the N/P ratio and the weight average-molecular weight for each particle, by AUC, it is possible to determine the aggregation number (i.e. the number of copies of each species within a single polyplex - see Table 5). Interestingly, both polyplex types are characterized by amounts of ODN being within the same order of magnitude, despite of significant physicochemical differences between polycations.

Table 5. Aggregation number related to both polyplexes

Polyplexes	$M_{w,AUC}$ (kDa)	Number of ODN	Number of polycations
Chitosan/ODN	$19000 \pm 3000$	$780 \pm 120$	$1000 \pm 160$
PEI/ODN	$29000 \pm 4000$	$1580 \pm 220$	$790 \pm 110$

### 2.2.8.3 SEM imaging confirms the spherical shape of both polyplexes and their size, as determined by DLS/AUC.

Further investigations of our polyplexes by SEM unambiguously confirmed the spherical shape of our polyplexes (Figure 13A-D). Diameters measured by SEM for both chitosan/ODN and PEI/ODN polyplexes were of  $57 \pm 13$  and  $45 \pm 12$  nm respectively (Table 6, Figure 13 2E-F), in agreement with number-average diameter values (equation (29)) derived from AUC experiments (40 and 46 nm for chitosan/ODN and PEI/ODN polyplexes, respectively).

Table 6 : Number-average diameter calculated from SEM imaging and AUC and weight average diameter calculated from AUC.

Polyplexes	$d_{p,N,SEM}$ (nm)	$d_{p,N,AUC}$ (nm)	$d_{p,w,AUC}$ (nm)
Chitosan/ODN	$57 \pm 14^1$	$40 \pm 1^3$	$46 \pm 3^3$
PEI/ODN	$45 \pm 10^2$	$46 \pm 1^3$	$55 \pm 3^3$

<sup>1</sup> standard deviation calculated from 100 measurements from 6 different pictures

<sup>2</sup> standard deviation calculated from 60 measurements from 5 different pictures

<sup>3</sup> standard deviation calculated from independent experiments (N=3)

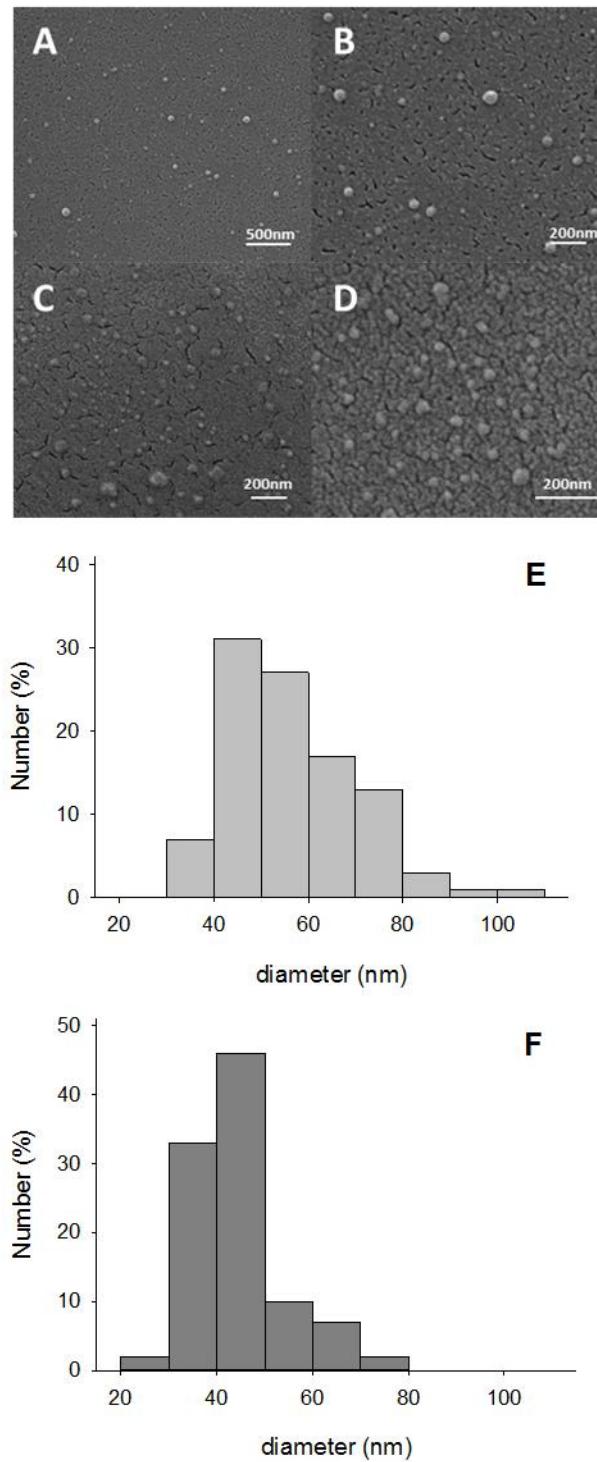


Figure 13. SEM images of (A, B) chitosan/ODN and (C, D) PEI/ODN polyplexes. Polyplex size distribution from SEM imaging for (E) chitosan/ODN and (F) PEI/ODN polyplexes.

#### 2.2.8.4 SLS weight-average molecular weight measurement supports conclusions from AUC/DLS about porosity.

Weight-average molecular weights of 20 and 14 MDa (Table 7) were derived from SLS Debye plots (using equations (35) and (36)) of chitosan/ODN and PEI/ODN polyplexes, respectively. Given our measured polyplex porosity (Table 4), one can transform the  $l_s - g^*(s)$  distribution (Figure 12) into a molar mass distribution, and thus calculate the weight-average molecular weight of the different polyplexes using equation (30). This gives a weight-average molecular weight of 19 and 29 MDa for chitosan/ODN and PEI/ODN polyplexes, respectively (Table 7). While excellent agreement was found comparing weight-average molecular weights from AUC to SLS for chitosan-based polyplexes (Table 7), in the case of PEI-based polyplexes, the molecular weight measured by AUC was two fold higher than that measured by SLS. Such a discrepancy may arise from the precision of both AUC and SLS measurements. Furthermore, a closer inspection of the Debye plot of PEI/ODN samples (Figure 20) revealed a slightly negative second virial coefficient, which is indicative of attractive interactions that could induce aggregation and thus compromise the precision of the measurement (note that the second virial coefficient for chitosan-based polyplexes was positive, indicating repulsion between chitosan-based polyplexes). Nevertheless, molecular weights that were deduced from AUC and SLS measurements were within the same order of magnitude, thus strongly supporting once again the porous nature of our polyplexes.

Table 7.  $M_w$  deduced from SLS and AUC measurements.

Polyplexes	$M_{w,SLS}$ (MDa)	$M_{w,AUC}$ (MDa)
Chitosan/ODN	$20 \pm 1.4$	$19 \pm 3$
PEI/ODN	$13.9 \pm 0.6$	$29 \pm 4$

### 2.2.9 Conclusion

We have demonstrated that a combination of AUC and DLS measurements constitutes a powerful approach for a detailed characterization of polycation/ODN polyplexes. Of salient interest, the use of AUC alone allowed for the determination of the N/P ratio (stoichiometry) and refractive index increment of the polyplexes. The latter cannot be predicted by additivity rules previously applied to non-interacting multicomponent systems. Accurate  $dn/dc$  data is crucial for precise molecular weight determination from SLS measurements. Moreover, a combination of AUC and DLS allowed for the determination of almost all physicochemical parameters of polyplexes under study, including sedimentation coefficient distribution, size distributions, molecular weight distributions and porosity. Additional measurements performed by SLS and SEM validated the conclusions derived from AUC and DLS techniques.

## **2.2.10 Associated content**

More experimental data as well as AUC, DLS and SLS results. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.”

## **2.2.11 Author information**

### **2.2.11.1 Corresponding Author**

\* gregory.decrescenzo@polymtl.ca or marc.lavertu@polymtl.ca

### **2.2.11.2 Author Contributions**

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. ‡These authors contributed equally to this work.

### **2.2.11.3 Notes**

The authors declare no competing financial interest.

## **2.2.12 Acknowledgment**

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC) (Y.N., M.L., M.B.) and the Canada Research Chair Protein-enhanced Biomaterials (G.D.C.). Y.N. received fellowships from the GRSTB (FRQ-S) and the MEDITIS (NSERC) programs as well as a scholarship grant from ENSTA ParisTech. The authors would like to thank Monica Iliescu Nelea for technical assistance with SEM experiments.

## CHAPITRE 3 DISCUSSION GÉNÉRALE ET RECOMMANDATIONS

### 3.1 Discussion générale

L'ultracentrifugation analytique a permis de calculer de manière indépendante la variation de l'indice de réfraction  $dn/dc$  pour les espèces pures, donnant des résultats similaires à ceux de la littérature (table 2). En utilisant le ratio N/P, déterminé également par AUC, le  $dn/dc$  des deux types de complexes ont été calculé. Il est à souligner que les techniques classiques de réfractométrie considèrent toutes les espèces en solution, face à l'AUC, qui mesure l'unique contribution des polyplexes. Bien que l'hypothèse d'additivité fonctionne pour des systèmes composés de plusieurs espèces qui n'interagissent pas entre elles, l'AUC démontre que cette méthode n'est pas valide pour les polyplexes, bien qu'utilisé dans la littérature [15].

La combinaison des méthodes AUC et DLS pour calculer la porosité n'est valide que dans le cadre de l'approximation de Rayleigh pour les particules suffisamment petites (inférieur à 100 nm). Au-dessus de cette valeur, l'intensité mesurée à notre angle de mesure, n'est en revanche plus proportionnel au rayon à la puissance 6. Cette combinaison de techniques s'avère très intéressante, car elle a permis de déterminer de manière rapide, de très nombreux paramètres en utilisant de concentrations faibles de matériel dans de faibles volumes (400 µL).

La microscopie électronique, ainsi que la SLS confirme les résultats obtenus par DLS et AUC ainsi que la sphéricité de nos particules, et la validité du modèle utilisé. Certaines différences sont en revanche observables, mais peuvent être expliqués par les biais des diverses méthodes utilisées [16]. Ces deux techniques supplémentaires soutiennent les résultats obtenus et l'efficacité de cette combinaison de techniques.

### 3.2 Recommandations

Pour la suite des travaux, une mesure de la porosité de manière indépendante devrait être réalisée et comparer à celle mesurée par l'AUC et la DLS. Pour ce faire, l'utilisation d'un pycnomètre à gaz a été rapportée dans plusieurs études [33, 34]. Mais pour pouvoir utiliser un tel matériel, une méthode de séchage des complexes doit être mise au point et validée afin de s'assurer de leur intégrité lors de la mesure de porosité. Une méthode de lyophilisation est actuellement développée au sein du laboratoire, mais des excipients sont également présents lors du séchage.

L'utilisation d'une méthode de fractionnement pour obtenir des particules plus monodisperses devrait également être considérée. L'utilisation de l'AFFFF peut être envisagée. Ces deux premiers points sont à poursuivre en priorité, car il permettrait de valider notre méthode d'analyse en plus de la SEM et SLS.

Par la suite une étude plus complète sur les polyplexes chitosan/ODN devrait être faite, en variant le type de chitosan (masse molaire et degré d'acétylation). Il faut également étudier l'influence du ratio N/P sur le mélange et la forme des complexes, ainsi que la solution tampon utilisés pour former les complexes (contrôle du pH, et force ionique).

Le volume spécifique partiel des deux types de polyplexes a été obtenu dans la littérature. Une méthode expérimentale devrait être développée afin de déterminer ce volume spécifique partiel pour différents complexes. La variation de la densité (contrast density method) [32] serait intéressante car la concentration des polyplexes est très faible, limitant l'utilisation d'un densitomètre. En revanche, le deutérium et le sel ont tendance à provoquer l'agrégation de ceux-ci, ce qui invalide les résultats obtenus. En revanche l'utilisation du sucre, par exemple, modifierait également la densité du solvant sans porter atteinte à l'intégrité des polyplexes. Il serait intéressant de poursuivre dans cette voie, pour renforcer encore la méthode d'analyse développée.

Une autre méthode d'analyse, la Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), qui gagne en popularité, ajouterait de la richesse aux résultats. Cette technique se base sur le suivi de chaque nanoparticule indépendamment les unes des autres en se basant sur leur mouvement brownien. Cette technique a déjà été comparée à la DLS mais pas encore à l'AUC et pas pour ce type de complexes [62].

Il serait également intéressant d'étudier par la suite toutes sortes de complexes formés à base d'ADN ou de siRNA. Ces futurs travaux permettraient de confronter notre méthode d'analyse à d'autres types de polyplexes. Il serait judicieux d'étudier de manière plus exhaustive les complexes d'ADN ou de siRNA avec le chitosan. Le chitosan utilisé ici est un chitosan léger avec un très fort pourcentage de désacétylation. Le PEI est tout aussi léger. Une prochaine étude pourrait se consacrer à la caractérisation des complexes ODN/chitosan avec différentes valeurs de masse molaire pour le chitosan et différents pourcentages de désacétylation. Dans le cas du PEI, l'utilisation d'un polymère branché est aussi possible. Le remplacement des ODN par du siRNA pourrait aussi être envisagé.

## CONCLUSION

La combinaison de l'AUC et de la DLS se révèle donc être une méthode puissante pour caractériser les complexes. De manière indépendante l'AUC peut déterminer la stœchiométrie et la variation d'indice de réfraction des polyplexes. Ce dernier ne peut être déterminé par simple additivité ou par réfractométrie. Le  $dn/dc$  se révèle pourtant essentiel pour la caractérisation de ce type polyplexes par SLS. Qui plus est, combiner l'AUC et la DLS permet de déterminer de nombreux paramètres physico-chimiques pour les polyplexes chitosan/ODN et PEI/ODN tels que la distribution en coefficients de sédimentation, en taille, en poids moléculaire, la porosité, ainsi que le  $dn/dc$ . La SEM et la SLS ont validé les résultats de ces deux techniques renforçant l'intérêt cette nouvelle méthode de caractérisation.

Cette méthode étant très prometteuse, des futurs travaux sont à envisager tels que d'autres complexes ayant la même structure, la détermination indépendante de la porosité, ou la détermination expérimentale du volume spécifique partiel des complexes.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. K. Kim, K. H. Haider, and S. J. Lim, "Gene medicine : A new field of molecular medicine," *Archives of Pharmacal Research*, vol. 24, pp. 1-15, Feb 2001.
- [2] A. Kumari, V. Kumar, and S. K. Yadav, "Nanocarriers: a tool to overcome biological barriers in siRNA delivery," *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 11, pp. 1327-1339, Oct 2011.
- [3] M. Lavertu, S. Methot, N. Tran-Khanh, and M. D. Buschmann, "High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 4815-4824, Sep 2006.
- [4] P. L. Ma, M. D. Buschmann, and F. M. Winnik, "Complete Physicochemical Characterization of DNA/Chitosan Complexes by Multiple Detection Using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation," *Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 9636-9643, Dec 2010.
- [5] I. Y. Perevyazko, M. Bauer, G. M. Pavlov, S. Hoeppener, S. Schubert, D. Fischer, and U. S. Schubert, "Polyelectrolyte Complexes of DNA and Linear PEI: Formation, Composition and Properties," *Langmuir*, vol. 28, pp. 16167-16176, Nov 2012.
- [6] D. J. Scott, S. E. Harding, A. J. Rowe, and R. S. o. Chemistry, *Analytical ultracentrifugation: techniques and methods*: RSC Publishing, 2005.
- [7] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications," *Progress in Polymer Science*, vol. 31, pp. 603-632, Jul 2006.
- [8] S. Patnaik and K. C. Gupta, "Novel polyethylenimine-derived nanoparticles for in vivo gene delivery," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 10, pp. 215-228, Feb 2013.
- [9] H. de Martimprey, C. Vauthier, C. Malvy, and P. Couvreur, "Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: Oligonucleotides and siRNA," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 71, pp. 490-504, Mar 2009.
- [10] B. L. Davidson and P. B. McCray, "Current prospects for RNA interference-based therapies," *Nature Reviews Genetics*, vol. 12, pp. 329-340, May 2011.
- [11] S. J. Lee, S. Son, J. Y. Yhee, K. Choi, I. C. Kwon, S. H. Kim, and K. Kim, "Structural modification of siRNA for efficient gene silencing," *Biotechnology Advances*, vol. 31, pp. 491-503, Sep-Oct 2013.
- [12] W. Schärtl, *Light scattering from polymer solutions and nanoparticle dispersions*: Springer, 2007.
- [13] H. Dautzenberg, J. Hartmann, S. Grunewald, and F. Brand, "Stoichiometry and structure of polyelectrolyte complex particles in diluted solutions," *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 100, pp. 1024-1032, Jun 1996.
- [14] A. Harada and K. Kataoka, "Effect of charged segment length on physicochemical properties of core-shell type polyion complex micelles from block ionomers," *Macromolecules*, vol. 36, pp. 4995-5001, Jul 2003.

- [15] E. Lai and J. H. van Zanten, "Monitoring DNA/poly-L-lysine polyplex formation with time-resolved multiangle laser light scattering," *Biophysical Journal*, vol. 80, pp. 864-873, Feb 2001.
- [16] A. Bootz, V. Vogel, D. Schubert, and J. Kreuter, "Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 57, pp. 369-375, Mar 2004.
- [17] P. Eaton and P. West, *Atomic Force Microscopy*: OUP Oxford, 2010.
- [18] A. Drogoz, L. David, C. Rochas, A. Domard, and T. Delair, "Polyelectrolyte complexes from polysaccharides: Formation and stoichiometry monitoring," *Langmuir*, vol. 23, pp. 10950-10958, Oct 2007.
- [19] P. L. Ma, M. D. Buschmann, and F. M. Winnik, "One-Step Analysis of DNA/Chitosan Complexes by Field-Flow Fractionation Reveals Particle Size and Free Chitosan Content," *Biomacromolecules*, vol. 11, pp. 549-554, Mar 2010.
- [20] P. L. Ma, M. Lavertu, F. M. Winnik, and M. D. Buschmann, "New Insights into Chitosan-DNA Interactions Using Isothermal Titration Microcalorimetry," *Biomacromolecules*, vol. 10, pp. 1490-1499, Jun 2009.
- [21] W. Mächtle and L. Börger, *Analytical ultracentrifugation of polymers and nanoparticles*: Springer, 2006.
- [22] M. Meselson and F. W. Stahl, "The Replication of DNA in Escherichia-Coli," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 44, pp. 671-682, 1958.
- [23] J. L. Cole and J. C. Hansen, "Analytical ultracentrifugation as a contemporary biomolecular research tool," *J Biomol Tech*, vol. 10, pp. 163-76, Dec 1999.
- [24] P. Schuck, "Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling," *Biophysical Journal*, vol. 78, pp. 1606-1619, Mar 2000.
- [25] P. Schuck and P. Rossmanith, "Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling," *Biopolymers*, vol. 54, pp. 328-341, Oct 2000.
- [26] P. Schuck, "On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation," *Analytical Biochemistry*, vol. 320, pp. 104-124, Sep 1 2003.
- [27] G. A. Morris, J. Castile, A. Smith, G. G. Adams, and S. E. Harding, "Macromolecular conformation of chitosan in dilute solution: A new global hydrodynamic approach," *Carbohydrate Polymers*, vol. 76, pp. 616-621, May 16 2009.
- [28] K. O. Pedersen, "On Charge and Specific Ion Effects on Sedimentation in the Ultracentrifuge," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 62, pp. 1282-1290, 1958.
- [29] M. Rasa and A. P. Philipse, "Evidence for a macroscopic electric field in the sedimentation profiles of charged colloids," *Nature*, vol. 429, pp. 857-860, Jun 2004.

- [30] P. H. Brown, "Size Distributions of Quantum Dots and Colloidal Gold Nanoparticles Using Analytical Ultracentrifugation," *Biophysical Journal*, vol. 98, pp. 408A-408A, Jan 2010.
- [31] J. B. Falabella, T. J. Cho, D. C. Ripple, V. A. Hackley, and M. J. Tarlov, "Characterization of Gold Nanoparticles Modified with Single-Stranded DNA Using Analytical Ultracentrifugation and Dynamic Light Scattering," *Langmuir*, vol. 26, pp. 12740-12747, Aug 3 2010.
- [32] P. H. Brown, A. Balbo, H. Y. Zhao, C. Ebel, and P. Schuck, "Density Contrast Sedimentation Velocity for the Determination of Protein Partial-Specific Volumes," *Plos One*, vol. 6, Oct 2011.
- [33] T. Fukushima, T. Hayakawa, M. Kawaguchi, R. Ogura, Y. Inoue, K. Morishita, and K. Miyazaki, "PBS buffer solutions with different pH values can change porosity of DNA-chitosan complexes," *Dental Materials Journal*, vol. 24, pp. 414-421, Sep 2005.
- [34] T. Fukushima, T. Hayakawa, K. Okamura, S. Takeda, Y. Inoue, K. Miyazaki, and Y. Okahata, "Buffer solution can control the porosity of DNA-chitosan complexes," *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, vol. 76B, pp. 121-129, Jan 2006.
- [35] A. F. Thunemann, M. Muller, H. Dautzenberg, J. F. O. Joanny, and H. Lowen, "Polyelectrolyte complexes," in *Polyelectrolytes with Defined Molecular Architecture II*. vol. 166, M. Schmidt, Ed., ed Berlin: Springer-Verlag Berlin, 2004, pp. 113-171.
- [36] G. F. Bonifacio, T. Brown, G. L. Conn, and A. N. Lane, "Comparison of the electrophoretic and hydrodynamic properties of DNA and RNA oligonucleotide duplexes," *Biophysical Journal*, vol. 73, pp. 1532-1538, Sep 1997.
- [37] T. Zimmermann, V. Karsten, J. Harrop, A. Chan, J. Chiesa, G. Peters, R. Falzone, J. Cehelsky, S. Nochur, A. Vaishnav, and J. Gollob, "Phase I First-in-Humans Trial of ALN-TTRsc, a Novel RNA Interference Therapeutic for the Treatment of Familial Amyloidotic Cardiomyopathy (FAC)," *Journal of Cardiac Failure*, vol. 19, pp. S66-S66, Aug 2013.
- [38] M. E. Davis, "The First Targeted Delivery of siRNA in Humans via a Self-Assembling, Cyclodextrin Polymer-Based Nanoparticle: From Concept to Clinic," *Molecular Pharmaceutics*, vol. 6, pp. 659-668, May-Jun 2009.
- [39] J. C. Burnett, J. J. Rossi, and K. Tiemann, "Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials," *Biotechnology Journal*, vol. 6, pp. 1130-1146, Sep 2011.
- [40] A. Cardoso, S. Trabulo, J. N. Moreira, N. Duzgunes, and M. C. P. de Lima, "Targeted Lipoplexes for siRNA Delivery," in *Methods in Enzymology Liposomes, Pt G*. vol. 465, N. Duzgunes, Ed., ed San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 2009, pp. 267-287.
- [41] P. Holzerny, B. Ajdini, W. Heusermann, K. Bruno, M. Schuleit, L. Meinel, and M. Keller, "Biophysical properties of chitosan/siRNA polyplexes: Profiling the polymer/siRNA interactions and bioactivity," *Journal of Controlled Release*, vol. 157, pp. 297-304, Jan 2012.

- [42] S. R. Mao, M. Neu, O. Germershaus, O. Merkel, J. Sitterberg, U. Bakowsky, and T. Kissel, "Influence of polyethylene glycol chain length on the physicochemical and biological properties of poly(ethylene imine)-graft-poly(ethylene glycol) block copolymer/SiRNA polyplexes," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 17, pp. 1209-1218, Sep 2006.
- [43] S. Nimesh, "Polyethylenimine as a promising vector for targeted siRNA delivery," *Current clinical pharmacology*, vol. 7, pp. 121-30, 2012 2012.
- [44] F. L. Mi, Y. C. Tan, H. F. Liang, and H. W. Sung, "In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant," *Biomaterials*, vol. 23, pp. 181-91, Jan 2002.
- [45] H. Onishi and Y. Machida, "Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice," *Biomaterials*, vol. 20, pp. 175-82, Jan 1999.
- [46] A. M. de Campos, Y. Diebold, E. L. Carvalho, A. Sanchez, and M. J. Alonso, "Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: in vitro stability, in vivo fate, and cellular toxicity," *Pharm Res*, vol. 21, pp. 803-10, May 2004.
- [47] M. Thibault, M. Astolfi, N. Tran-Khanh, M. Lavertu, V. Darras, A. Merzouki, and M. D. Buschmann, "Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes," *Biomaterials*, vol. 32, pp. 4639-4646, Jul 2011.
- [48] Y. A. Yue, F. Jin, R. Deng, J. G. Cai, Y. C. Chen, M. C. M. Lin, H. F. Kung, and C. Wu, "Revisit complexation between DNA and polyethylenimine - Effect of uncomplexed chains free in the solution mixture on gene transfection," *Journal of Controlled Release*, vol. 155, pp. 67-76, Oct 2011.
- [49] K. L. Planken and H. Coelfen, "Analytical ultracentrifugation of colloids," *Nanoscale*, vol. 2, pp. 1849-1869, 2010 2010.
- [50] K. Wilson and J. M. Walker, *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*: Cambridge University Press, 2005.
- [51] H. C. Ottinger, "Velocity field in nondraining polymer chains," *Rheologica Acta*, vol. 35, pp. 134-138, Mar-Apr 1996.
- [52] Y. C. Liu and H. J. Keh, "Sedimentation velocity and potential in a dilute suspension of charged porous spheres," *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 140, pp. 245-259, Sep 1998.
- [53] H. J. Keh and W. C. Chen, "Sedimentation velocity and potential in concentrated suspensions of charged porous spheres," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 296, pp. 710-720, Apr 15 2006.
- [54] S. Nguyen, S. Hisiger, M. Jolicœur, F. M. Winnik, and M. D. Buschmann, "Fractionation and characterization of chitosan by analytical SEC and H-1 NMR after semi-preparative SEC," *Carbohydrate Polymers*, vol. 75, pp. 636-645, Feb 2009.
- [55] M. Lavertu, Z. Xia, A. N. Serreqi, M. Berrada, A. Rodrigues, D. Wang, M. D. Buschmann, and A. Gupta, "A validated H-1 NMR method for the determination of the

- degree of deacetylation of chitosan," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 32, pp. 1149-1158, Aug 2003.
- [56] T. S. Zimmermann, A. C. H. Lee, A. Akinc, B. Bramlage, D. Bumcrot, M. N. Fedoruk, J. Harborth, J. A. Heyes, L. B. Jeffs, M. John, A. D. Judge, K. Lam, K. McClintock, L. V. Nechev, L. R. Palmer, T. Racie, I. Rohl, S. Seiffert, S. Shanmugam, V. Sood, J. Soutschek, I. Toudjarska, A. J. Wheat, E. Yaworski, W. Zedalis, V. Koteliansky, M. Manoharan, H. P. Vornlocher, and I. MacLachlan, "RNAi-mediated gene silencing in non-human primates," *Nature*, vol. 441, pp. 111-114, May 2006.
- [57] J. Lebowitz, M. S. Lewis, and P. Schuck, "Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review," *Protein Science*, vol. 11, pp. 2067-2079, Sep 2002.
- [58] P. J. Tarcha, J. Pelisek, T. Merdan, J. Waters, K. Cheung, K. von Gersdorff, C. Culmsee, and E. Wagner, "Synthesis and characterization of chemically condensed oligoethylenimine containing beta-aminopropionamide linkages for siRNA delivery," *Biomaterials*, vol. 28, pp. 3731-3740, Sep 2007.
- [59] D. M. Fishman and G. D. Patterson, "Light scattering studies of supercoiled and nicked DNA," *Biopolymers*, vol. 38, pp. 535-552, Apr 1996.
- [60] S. Boeckle, K. von Gersdorff, S. van der Piepen, C. Culmsee, E. Wagner, and M. Ogris, "Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer," *Journal of Gene Medicine*, vol. 6, pp. 1102-1111, Oct 2004.
- [61] I. Richard, M. Thibault, G. De Crescenzo, M. D. Buschmann, and M. Lavertu, "Ionization Behavior of Chitosan and Chitosan-DNA Polyplexes Indicate That Chitosan Has a Similar Capability to Induce a Proton-Sponge Effect as PEI," *Biomacromolecules*, vol. 14, pp. 1732-40, 2013 Jun 10 (Epub 2013 May 2013).
- [62] V. Filipe, A. Hawe, and W. Jiskoot, "Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates," *Pharm Res*, vol. 27, pp. 796-810, May 2010.
- [63] A. J. Grodzinsky and E. H. Frank, *Introductory nanoscience*: Garland Science, 2011.

## ANNEXE 1 – SUPPORTING INFORMATION

### Sedimentation ideality assessment

Three different concentrations from the same stock of polyplexes in 10mM NaCl aqueous solution were analyzed by sedimentation velocity in order to verify that the sedimentation coefficient distribution is independent of the concentration of polyplexes (i.e. no electrostatic contributions to the sedimentation). Polyplexes were prepared by mixing 400 $\mu$ L of ODN solution at 100 $\mu$ g/mL and 400 $\mu$ L of polymer solution and then diluted with a 50mM NaCl solution to obtain a final 10mM NaCl concentration. Using a 10 mM NaCl aqueous solution, two-fold and four-fold dilutions were then prepared from this stock polyplex solution. Three AUC cells were filled with these solutions and sedimentation data were acquired during the same run (Figure 14 and Figure 15).

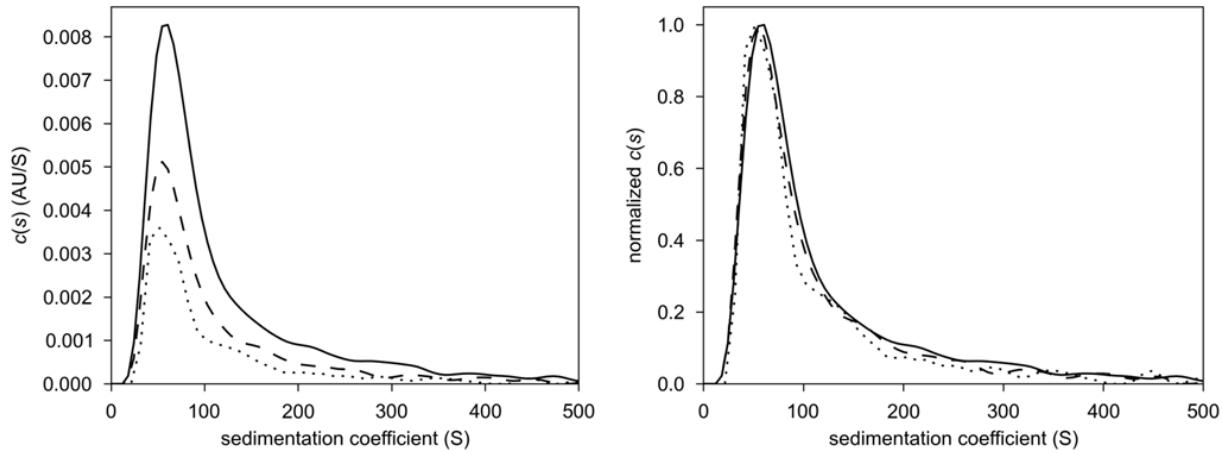


Figure 14.  $ls-g^*(s)$  (left) and normalized  $ls-g^*(s)$  (right) distributions of chitosan/ODN polyplexes for the stock solution (solid line), 2-fold dilution (dashed line) and 4-fold dilution (dotted line). The normalized  $ls-g^*(s)$  distributions are superimposed, which is indicative of ideal behavior.

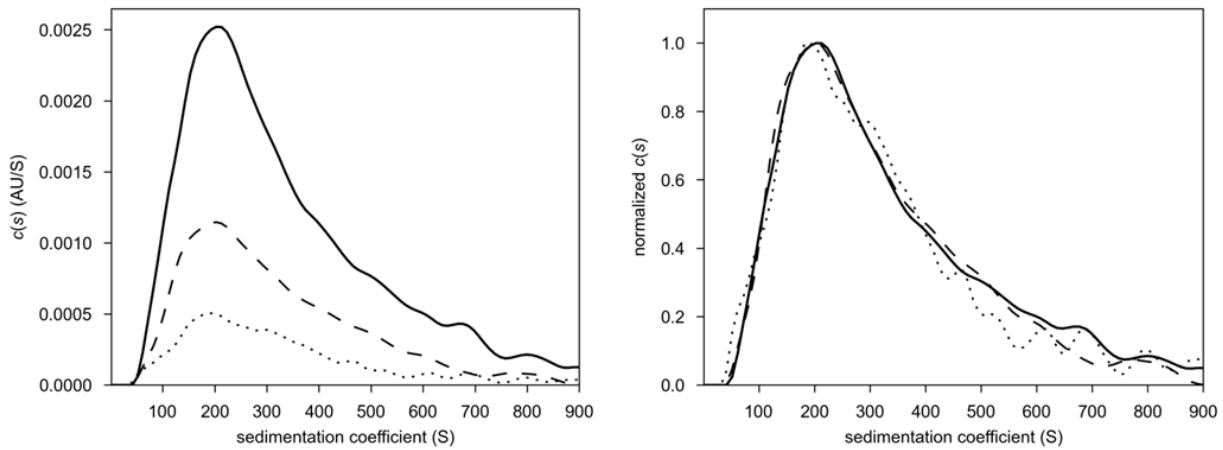


Figure 15.  $ls-g^*(s)$  (left) and normalized  $ls-g^*(s)$  (right) distributions of PEI/ODN polyplexes for the stock solution (solid line), 2-fold dilution (dashed line) and 4-fold dilution (dotted line). The normalized  $ls-g^*(s)$  distributions are superimposed, which is indicative of ideal behavior.

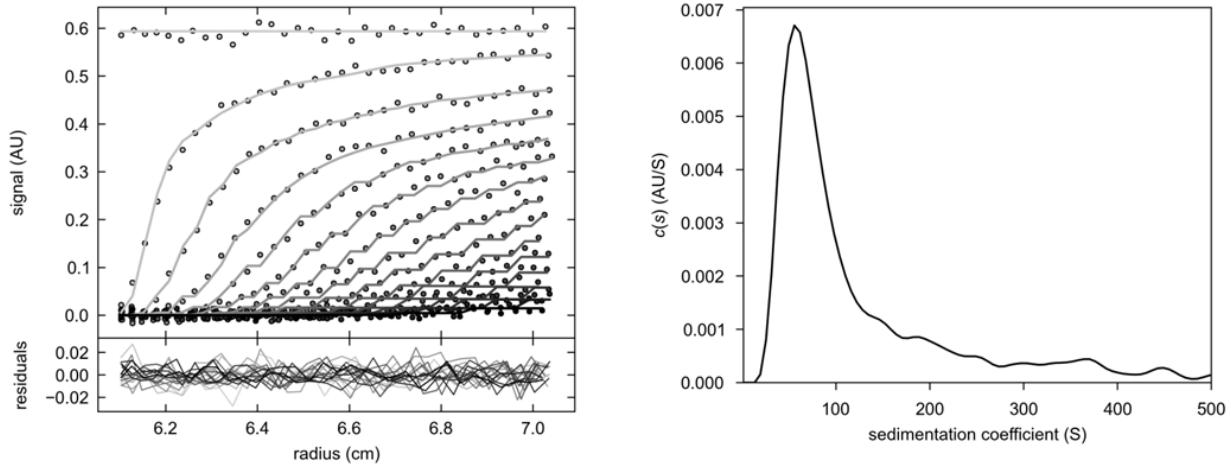


Figure 16. Sedimentation velocity data fit with the ls- $g^*(s)$  model along with the residual (left) and the ls- $g^*(s)$  distribution (right) of the chitosan/ODN polyplexes. RMSD is 0.008492.

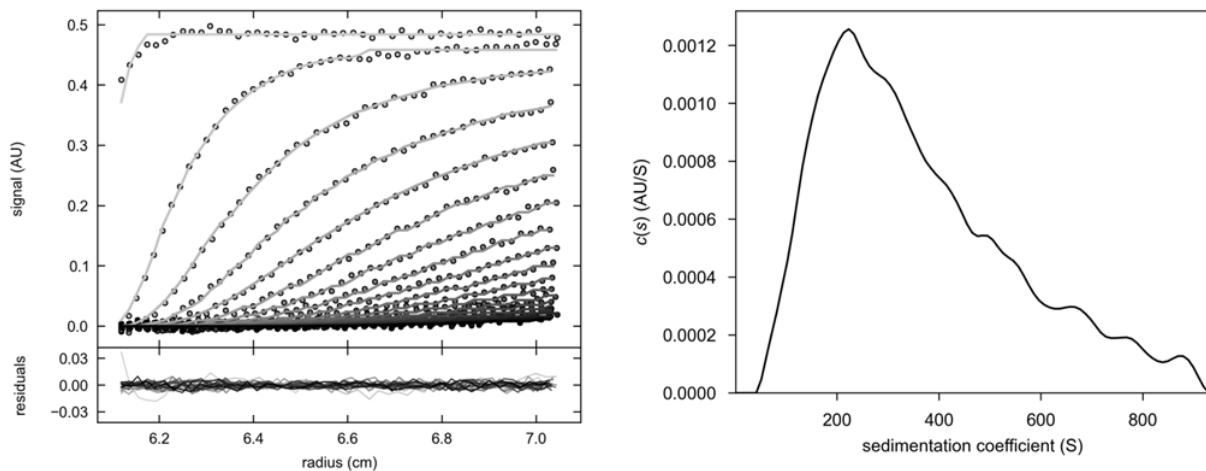


Figure 17. Sedimentation velocity data fit with the ls- $g^*(s)$  model along with the residual (left) and the ls- $g^*(s)$  distribution (right) of the PEI/ODN polyplexes. RMSD is 0.003845.

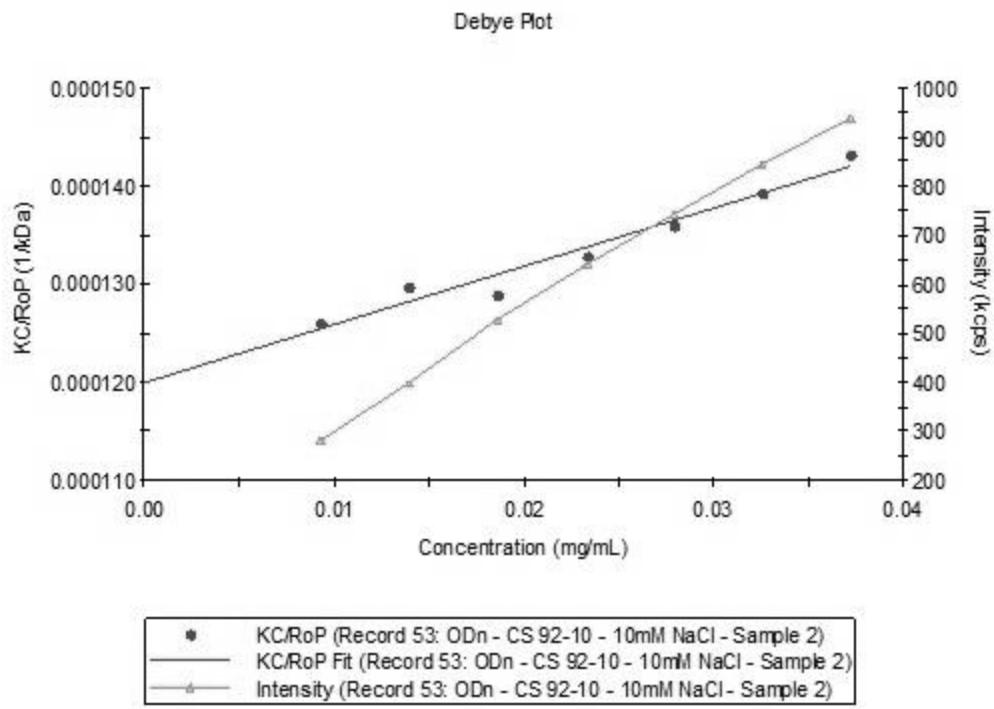


Figure 18. Debye plot of Chitosan/ODN polyplexes obtained by static light scattering to measure the molecular weight of polyplexes. The correlation coefficient is 0.957.

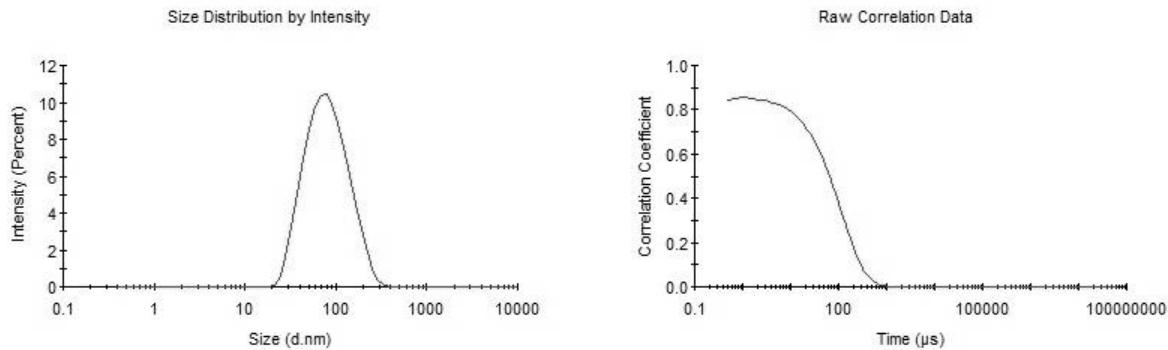


Figure 19. Intensity-weighted size distribution (left), and correlogram (right) obtained by DLS for Chitosan/ODN polyplexes.

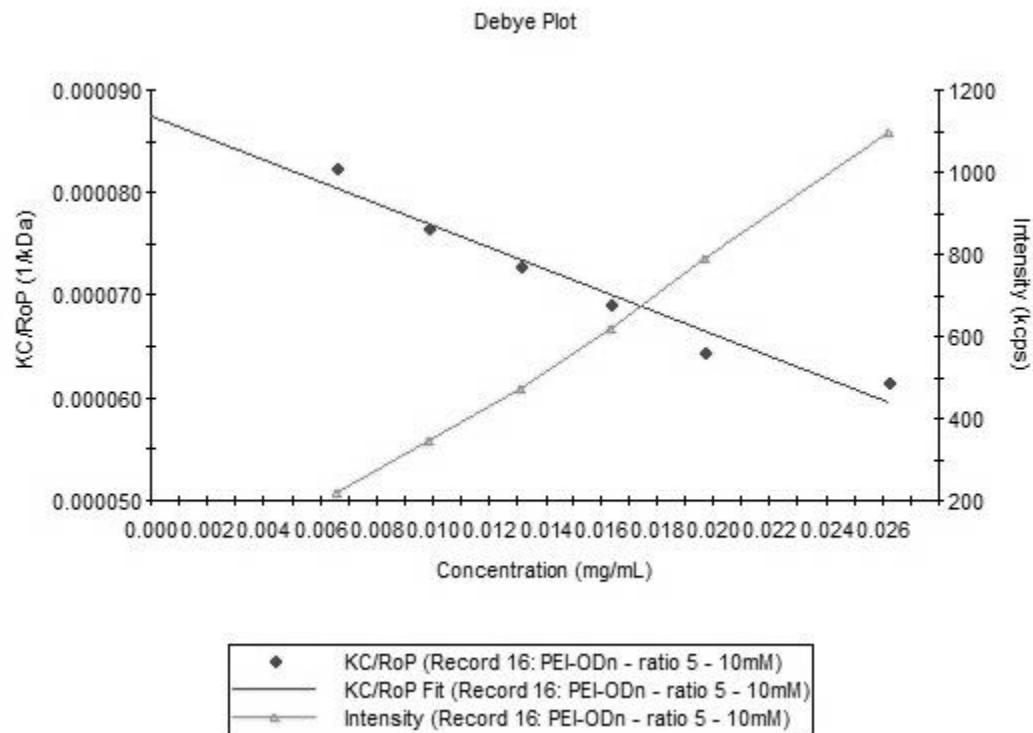


Figure 20. Debye plot of PEI/ODN polyplexes obtained by static light scattering to measure the molecular weight of polyplexes. The correlation coefficient is 0.958.

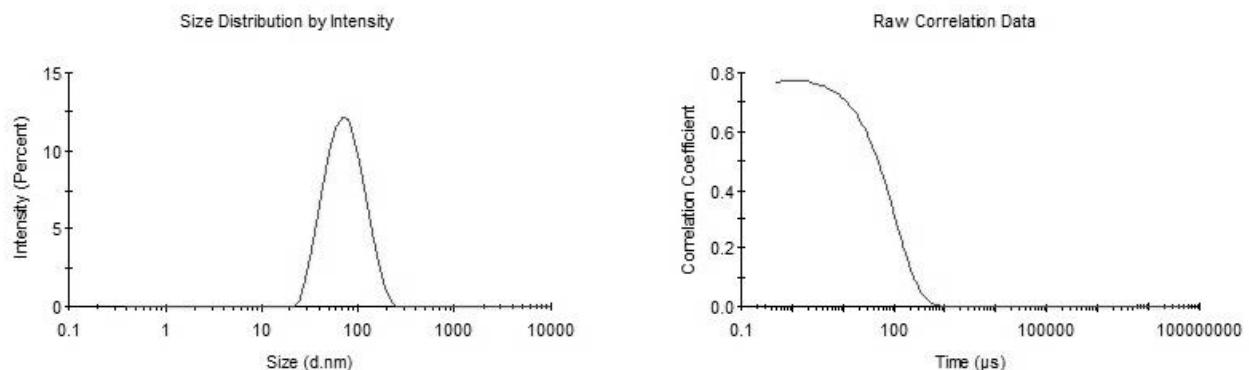


Figure 21. Intensity-weighted size distribution (left), and correlogram (right) obtained by DLS for PEI/ODN polyplexes.

## ANNEXE 2 – INTERACTIONS ÉLÉCTROSTATIQUES

Un challenge actuel de l'ultracentrifugation analytique est de considérer la charge des nanoparticules présentes en solution. Les effets électrostatiques qui en résultent peuvent modifier la valeur des sédimentations de coefficients et mener à une mauvaise interprétation des résultats. Une première approche est de considérer la chute d'une sphère chargée dans un champs gravitationnel [63].

Considérons une sphère tombant dans un champ de gravité. Cela est similaire à étudier un fluide se déplaçant à une même vitesse autour d'une particule fixe. Plaçons dans le cas d'état stationnaire, ce qui signifie que  $\partial \vec{v} / \partial t = 0$ , avec  $\vec{v}$  la vitesse du fluide. Cela est supposé lors de l'ultracentrifugation, la vitesse  $U$  est supposée être atteinte.

Nous appliquons donc Navier Stokes sur la surface de la sphère, à une distance tellement petite que la surface de la particule peut être considérée comme un plan (figure 22):

$$(\rho(\vec{v} \cdot \nabla \vec{v}) + \nabla p) = \eta \nabla^2 \vec{v} + \nabla \cdot \overline{\overline{T}}^e \quad 37$$

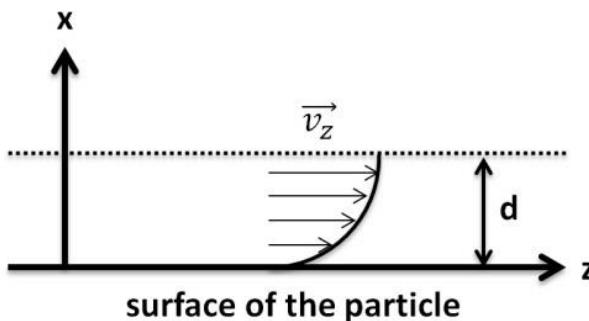


Figure 22. Vitesse du fluide dans la couche limite

avec  $\rho$  la densité du fluide,  $\vec{v}$  la vitesse du fluide,  $p$  la pression,  $\eta$  la viscosité du fluide, et  $\overline{\overline{T}}^e$  le tenseur des contraintes électriques.

La variation de pression peut être considérée comme négligeable comparée aux forces visqueuses et électriques dans la couche limite. Nous obtenons donc :

$$0 = \eta \nabla^2 \vec{v} + \nabla \cdot \overline{\overline{T}}^e \quad 38$$

$$\eta \frac{\partial^2 v_z}{\partial x^2} = - \frac{\partial T_{zx}^e}{\partial x} \quad 39$$

L'intégration des équations précédentes donnent :

$$\eta \frac{\partial v_z}{\partial x} = -T_{zx} + C_1 \quad 40$$

$$\eta \frac{\partial v_z}{\partial x} = \epsilon E_z \frac{\partial \phi}{\partial x} + C_1 \quad 41$$

avec  $C_1$ , une constante qui doit être déterminée,  $\phi$  le potentiel,  $\epsilon$  la constante de permittivité du solvant. À  $x=d$ , la condition frontière donne :

$$\eta \frac{\partial v_z}{\partial x} \Big|_d = \sigma_z^d \quad 42$$

$$\frac{\partial \phi}{\partial x} = 0 \quad 43$$

ce qui donne  $C_1 = \sigma_z^d$ , avec  $\sigma_z^d$  la contrainte à la surface. Une seconde intégration donne :

$$\eta v_z = \epsilon E_z \phi(x) + \sigma_z^d x + C_2 \quad 44$$

Avec  $C_2$ , une autre constante à déterminer,  $E_z$  le champs électrique selon l'axe z. La condition frontière est  $v_z(x=0)=0$  ce qui donne  $C_2 = -\epsilon E_z \zeta$ , avec  $\zeta$  le potentiel zêta de la particule.

À  $x=d$ , on a  $\phi(d)=0$ , d'où :

$$\sigma_z^d = \frac{\epsilon \zeta}{d} E_z + \frac{\eta v_z}{d} \quad 45$$

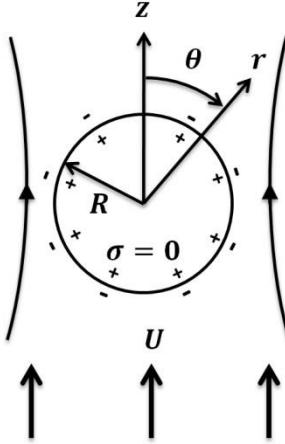


Figure 23. Sphère isolante se trouvant dans un écoulement fluide de vitesse  $U$

En se basant sur la notation sphérique présentée figure 23, et en s'affranchissant du sinus (symbole  $\sim$ ), nous obtenons :

$$\tilde{\sigma}_\theta^d = \frac{\epsilon \zeta}{d} \tilde{E}_\theta + \frac{\eta \tilde{v}_\theta^d}{d} \quad 46$$

Définissons par la suite le potentiel à l'extérieur de la particule. Nous supposons :

$$\phi = \frac{A}{r^2} \cos \theta \quad 47$$

avec  $A$  une constante à déterminer. C'est une solution des équations de Laplace avec aucune charge nette et aucun champ appliqué. Les conditions frontières sont :

$$\left. \frac{\partial \phi}{\partial r} \right|_R = -\frac{2\sigma_d \tilde{v}_\theta^d}{\sigma R} \cos \theta = \frac{2A}{R^3} \cos \theta \quad 48$$

avec  $v_r = \tilde{v}_r^d 2 \cos \theta$  et  $v_\theta = \tilde{v}_\theta^d \cos \theta$ ,  $\sigma_d$  la densité surfacique de charge,  $\sigma$  la conductivité.

$$A = \frac{\sigma_d R^2 \tilde{v}_\theta^d}{\sigma} \quad 49$$

La résolution donne le potentiel à l'extérieur de la particule :

$$\phi = \frac{\sigma_d R^2 \tilde{v}_\theta^d}{\sigma r^2} \cos \theta \quad 50$$

La résolution des équations de Navier Stokes donne :

$$\tilde{\sigma}_\theta^d = -\frac{3\eta U}{2R} - \frac{3\tilde{v}_\theta^d}{R} = \frac{\epsilon\zeta}{d} \tilde{E}_\theta + \frac{\eta\tilde{v}_\theta^d}{d} \quad 51$$

Comme  $R \gg d$ , nous avons  $\frac{3\tilde{v}_\theta^d}{R} \ll \frac{\eta\tilde{v}_\theta^d}{d}$ , d'où :

$$\tilde{v}_\theta^d = -\frac{\frac{3Ud}{2R}}{1 + \frac{\epsilon\zeta\sigma_d}{\eta\sigma R}} \quad 52$$

Le potentiel est donc :

$$\phi = -\frac{\frac{3UdR}{2\sigma}\sigma_d}{1 + \frac{\epsilon\zeta\sigma_d}{\eta\sigma R}} \frac{\cos\theta}{r^2} = \frac{I\Delta}{4\pi r^2 \sigma} \cos\theta \quad 53$$

$$I\Delta = -\frac{(6\pi UR)d\sigma_d}{1 + \frac{\epsilon\zeta\sigma_d}{\eta\sigma R}} \quad 54$$

Nous supposons ensuite que l'espace entre chaque particule est suffisamment grand comparé au rayon  $R$  de la particule. Le champ électrique  $E$  induit n'est donc qu'une simple addition du champ produit par chaque particule, il est donc proportionnel à la concentration  $N$  de particules par unité de volume.

Nous avons donc :

$$E_z = -\frac{NI\Delta}{\sigma} = -\frac{6N\pi R d\sigma_d}{\sigma \left(1 + \frac{\epsilon\zeta\sigma_d}{\eta\sigma R}\right)} U \quad 55$$

Une résolution fournie par Pedersen donne [28] :

$$U = s_0 \omega^2 r - \mu_0 \left( \frac{d\psi}{dr} \right) \quad 56$$

$$\text{avec } E_z = - \left( \frac{d\psi}{dr} \right).$$

On se place dans 10mM de NaCl. Nous pouvons donc faire les calculs dans le cas étudié du projet, c'est-à-dire delui des complexes ODN/chitosan.

Estimation de la vitesse  $U$  durant une expérience d'ultracentrifugation :

$$U = s\omega^2 r \quad 57$$

$$\begin{aligned} s &= 100 \text{ S} = 100 \cdot 10^{-13} \text{ s}^{-1} \\ \omega &= 10000 \text{ rpm} = 10000 \cdot \frac{2\pi}{60} = 1047 \text{ rad.s}^{-1} \\ r &= 6.5 \text{ cm} = 6.5 \cdot 10^{-2} \text{ m} \\ U &= 7.13 \cdot 10^{-7} \text{ m.s}^{-1} \end{aligned}$$

Estimation du nombre de particules par unité de volume :

$$\begin{aligned} N &= \frac{C_m}{\frac{V_{particle}}{\bar{V}}} \quad 58 \\ \bar{V} &= 0.6 \text{ ml.g}^{-1} = 0.6 \cdot 10^{-3} \text{ L.g}^{-1} = 0.6 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3 \cdot \text{g}^{-1} \\ C_m &= 25 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1} = 25 \cdot 10^{-6} \text{ g.mL}^{-1} = 25 \text{ g.m}^{-3} \\ V_{particle} &= \frac{4}{3} \pi R^3 = 2.6 \cdot 10^{-22} \text{ m}^3 \\ R &= 40 \text{ nm} = 4 \cdot 10^{-8} \text{ m}^3 \\ N &= 5,8 \cdot 10^{16} \text{ particules.m}^{-3} \end{aligned}$$

Estimation du rayon  $R$  (DLS) et de la longueur de Debye  $d$  :

$$\begin{aligned} R &= 40 \text{ nm} = 4 \cdot 10^{-8} \text{ m} \\ d &= \frac{0.304}{\sqrt{I}} \text{ nm} = 3 \cdot 10^{-9} \text{ m} \\ I &= 10 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} \end{aligned}$$

Estimation de la densité de charge  $\sigma_d$  en surface :

La sphère est supposée avoir une densité de charge en surface  $\sigma_d$ , un potentiel zêta  $\zeta$ . Une simplification de l'équation de Grahame donne :

$$\sigma_d = \sqrt{8c_0\epsilon k_b T} \sinh\left(\frac{e\zeta}{2k_b T}\right) \quad 59$$

$$\begin{aligned} c_0 &= 1.2 \cdot 10^{22} \text{ particules.m}^{-3} \\ k_b &= 1.38 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \cdot \text{kg.s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1} \\ \epsilon &= \epsilon_0 \epsilon_r = 7.08 \cdot 10^{-10} \text{ F.m}^{-1} \\ \zeta &= 3 \cdot 10^{-2} \text{ V} \\ T &= 293 \text{ K} \\ e &= 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C} \\ \sigma_d &= 3.2 \cdot 10^{-5} \text{ C.m}^{-2} \end{aligned}$$

Estimation de la conductivité  $\sigma$  :

$$\sigma = \lambda_{Na^+} [Na^+] + \lambda_{Cl^-} [Cl^-] \quad 60$$

$$\begin{aligned} \lambda_{Na^+} &= 5.01 \cdot 10^{-3} \text{ S.m}^{-2} \cdot \text{mol.m}^{-1} \\ \lambda_{Cl^-} &= 7.63 \cdot 10^{-3} \text{ S.m}^{-2} \cdot \text{mol.m}^{-1} \\ [Na^+] &= [Cl^-] = 10 \text{ mM} = 10 \text{ mol.m}^{-3} \\ \sigma &= 0.126 \text{ S.m}^{-1} \end{aligned}$$

Estimation de  $E_z$  :

$$E_z = -\frac{6N\pi R d \sigma_d}{\sigma \left(1 + \frac{\epsilon \zeta \sigma_d}{\eta \sigma R}\right)} U \quad 61$$

$$\begin{aligned}
U &= 7.13 \cdot 10^{-7} \text{ m.s}^{-1} \\
N &= 5.8 \cdot 10^{16} \text{ particules.m}^{-3} \\
\sigma &= 0.126 \text{ S.m}^{-1} \\
\sigma_d &= 3.2 \cdot 10^{-5} \text{ C.m}^{-2} \\
R &= 4 \cdot 10^{-8} \text{ m} \\
d &= 3 \cdot 10^{-9} \text{ m} \\
\epsilon = \epsilon_0 \epsilon_r &= 7.08 \cdot 10^{-10} \text{ F.m}^{-1} \\
\zeta &= 3 \cdot 10^{-2} \text{ V} \\
\eta &= 10^{-3} \text{ Pa.s}^{-1} \\
E_z &= -2.3 \cdot 10^{-8} \text{ V.m}^{-1}
\end{aligned}$$

Estimation de  $\mu_0$  calculée à partir de la mesure du potentiel zêta (approximation de Smoluchowski) :

$$\mu_0 = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \quad 62$$

$$\begin{aligned}
\epsilon = \epsilon_0 \epsilon_r &= 7.08 \cdot 10^{-10} \text{ F.m}^{-1} \\
\zeta &= 3 \cdot 10^{-2} \text{ V} \\
\eta &= 10^{-3} \text{ Pa.s}^{-1} \\
\mu_0 &= 2 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}
\end{aligned}$$

Ce qui donne :

$$\begin{aligned}
\mu_0 E_z &\approx -10^{-16} \text{ m.s}^{-1} \\
s\omega^2 r &\approx 10^{-7} \text{ m.s}^{-1} \\
s\omega^2 r &\gg \mu_0 E_z
\end{aligned}$$

Il n'y a donc pas d'effet de charges d'après les calculs théoriques dans le cadre de nos expériences.