

Titre: Utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer comme nouveau
Title: traitement potentiel pour l'athérosclérose

Auteur: Arthur Ruellan
Author:

Date: 2015

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Ruellan, A. (2015). Utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer comme nouveau
traitement potentiel pour l'athérosclérose [Master's thesis, École Polytechnique
de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/1814/>
Citation:

Document en libre accès dans PolyPublie Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1814/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: L'Hocine Yahia
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

UTILISATION DE NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER COMME NOUVEAU
TRAITEMENT POTENTIEL POUR L'ATHÉROSCLÉROSE

ARTHUR RUELLAN

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

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

MAI 2015

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

UTILISATION DE NANOPARTICULES D'OXYDE DE FER COMME NOUVEAU
TRAITEMENT POTENTIEL POUR L'ATHÉROSCLÉROSE

présenté par : RUELLAN Arthur

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

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

M. SAVADOGO Oumarou, D. d'état, président

M. YAHIA L'Hocine, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. SIAJ Mohamed, Ph. D., membre

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de cette maîtrise.

En premier lieu, je remercie Dr. Yahia, professeur à l'Ecole polytechnique de Montréal. En tant que Directeur de recherche, il m'a guidé dans mon travail.

Je remercie aussi Dr. Nasciemento, pour son soutien sans faille tout au long de mes recherches, ainsi que pour son expertise en chimie.

Je remercie Dr. Mbeh, pour sa patience lors de ma formation en cytotoxicité.

Je remercie le Dr. Mehri et son équipe à l'Institut de Cardiologie de Montréal pour m'avoir permis d'utiliser son laboratoire.

Je remercie enfin Dr. Sacher, pour ses précieux conseils.

RÉSUMÉ

L'athérosclérose est une épidémie mondiale dont les facteurs de risque sont nombreux, comme le mode de vie ou les prédispositions génétiques, entre autres. Le traitement de l'athérosclérose est abordé de deux manières différentes : l'une vise l'abaissement des taux de lipoprotéines de basse densité (LDL) dans le sang pour éviter ou diminuer la genèse de plaques d'athérome, tandis que l'autre approche vise la suppression des plaques d'athérome par la chirurgie, ou encore par l'implantation de stents. Bien que ces deux approches soient peu adaptées aux patients externes ou ceux qui présentent une hypercholestérolémie, il est urgent de développer de nouveaux médicaments et technologies qui pourraient aider ces patients. À cet égard, une arme classique pour abaisser le taux de LDL du sang est la plasmaphérèse. Cependant, elle nécessite quotidiennement une hospitalisation de longue durée, ce qui diminue la qualité de vie des personnes soumises à de tels traitements. Par conséquent, ce mémoire de maîtrise vise à présenter l'application de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIONs) pour diminuer les niveaux de LDL-libre présents dans le sang. En effet, nous présentons une preuve de concept d'un nouveau traitement potentiel pour l'athérosclérose, utilisant les SPIONs fonctionnalisés ciblant le LDL. Nous avons évalué la biocompatibilité de ces SPIONs à travers des tests de cytotoxicité *in vitro* et d'hémocompatibilité. Notre capacité à déplacer ces SPIONs, de manière unidirectionnelle, sous l'influence d'un champ magnétique, démontre la faisabilité de les utiliser dans un système de circulation sanguine *ex vivo* contenant un piège magnétique afin de les récupérer une fois qu'ils ont fixé le LDL dans le sang. Par des essais *ex vivo* avec du plasma sanguin de lapin hypercholéstéromique, nous avons trouvé que chaque interaction de SPIONs, à 0,5 mg/ml, diminue la concentration de LDL d'au moins 34%.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a worldwide epidemic related to several factors including lifestyle and genetic predisposition. There are two main approaches to treating atherosclerosis: one that aims lowering levels of low-density lipoprotein (LDL) in the bloodstream to avoid or decrease genesis of atheroma plaques, and the other approach aims to remove atheroma plaques through surgical techniques such as by-pass surgery or stent implantation. As these two approaches are inadapted for outpatients or those who present hypercholesterolemia, it is urgent to develop new drugs and technologies to address these situations. A conventional weapon for lowering the LDL level from bloodstream is the plasmapheresis which it requires long daily hospitalization time and therefore impacts the quality of life of patients. Therefore, this thesis aims to present the application of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) as vectors to decrease the levels of free-LDL in the bloodstream. Indeed we present the proof of concept of a potential new treatment for atherosclerosis using the functionalized SPIONs targeting LDL. We have evaluated the biocompatibility of those SPIONs through *in vitro* cytotoxicity and hemocompatibility tests. Our ability to move these SPIONs, uni-directionally, under a magnetic field, demonstrates the feasibility of using them in an *ex-vivo* blood circulation system, containing a magnetic trap to gather them once they have fastened to the LDL present in the blood. By *ex vivo* tests with hypercholesterolemic rabbit blood plasma, we have found that each interaction of SPIONs, at 0.5 mg/mL, decreases the concentration of LDL by at least 34%.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XI
LISTE DES ANNEXES.....	XII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Contexte	1
1.2 Objectifs et hypothèses.....	2
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
2.1 L'athérosclérose	4
2.2 Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques.....	9
2.3 Biocompatibilité des nanoparticules	22
MATÉRIELS ET MÉTHODES	27
2.4 Synthèse des nanoparticules.....	27
2.5 Biocompatibilité des nanoparticules	29
2.6 Nanonavigation	32
2.7 Réduction du LDL dans le sang	35
CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....	38
3.1 Viabilité cellulaire	38
3.2 Hémocompatibilité	39

3.3 Mouvement des nanoparticules	41
3.4 Interaction entre le LDL et les SPIONs	42
CHAPITRE 4 DISCUSSION.....	46
4.1 Biocompatibilité	46
4.2 Piège magnétique	47
4.3 Réduction du LDL.....	48
CHAPITRE 5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	51
LISTE DE RÉFÉRENCES.....	54
ANNEXES	59

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1: Définition du terme « Nanoparticule » pour les normes ISO/TS 80004 et ASTM E2456	9
--	---

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 : Structure de la paroi d'un vaisseau sanguin (Sanofi Aventice France).....	5
Figure 2-2 : Développement de l'athérosclérose.....	6
Figure 2-3 : Structure du LDL.....	8
Figure 2-4: Structure du Fe ₃ O ₄ : a) structure de la maille; b) positions relatives des 3 ions	10
Figure 2-5 : Formule chimique du Dextran.....	12
Figure 2-6 : Livraison de médicaments dans une tumeur à l'aide de nanoparticules magnétiques	14
Figure 2-7 : Aimantation en fonction du champ magnétique appliqué pour différents matériaux	16
Figure 2-8 : Stratégie de séparation de nanoparticules magnétiques dans un fluide en mouvement.	19
.....	19
Figure 2-9 : Concentration des particules magnétiques de diamètre de 425 nm en fonction du temps, pour une mesure expérimentale (ligne continue), un modèle de simulation qui ne tient pas en considération l'interaction entre les particules (carrés) et un modèle la tient en considération (cercles) La concentration initiale est de 0,1 mg/ml.....	20
Figure 2-10 : Simulation de trajectoires de nanoparticules magnétiques dans un vaisseau sanguin pour différentes position de l'aimant (a) 2.5cm (b) 3.5cm (c) 4.5cm (d) 5.5cm ⁵⁶	21
Figure 2-11 : Microphotographie de particules magnétiques dans le liquide au-dessus d'un piège annulaire (a) sans courant (b) avec courant I=0.35 A ⁵⁷	21
Figure 2-12 : Le groupe de travail ISO TC 229 et ses connections ⁶⁵	23
Figure 0-1: Polyéthylène glycol	27
Figure 0-2: Polyéthylène glycol modifié.....	27
Figure 0-3 : Répartition des SPIONs sur plaque de 96 trous pour test de viabilité cellulaire (du plus clair au plus foncé : SPION 1, 2 et 3).....	30
Figure 0-4 : Montage utilisé lors de la nanonavigation.....	32
Figure 0-5 : Intensité du champ pour deux bobines fonctionnant en sens inverse (rouge) et dans le même sens (bleu) (abscisse en mètres et ordonnées en Tesla).....	34

Figure 0-6 : Intensité du gradient du carré du champ pour deux bobines fonctionnant en sens inverse (rouge) et dans le même sens (bleu) (abscisse en mètres et ordonnées en UA)	34
Figure 0-7 : Stratégie pour déterminer l'évolution du LDL dans le plasma.....	36
Figure 3-1 : Effet des nanoparticules sur la viabilité cellulaire.....	38
Figure 3-2 : Effet de la concentration des nanoparticules sur la viabilité cellulaire	39
Figure 3-3 : Effet des nanoparticules sur l'hémolyse	40
Figure 3-4 : Effet des nanoparticules sur l'activation de la Pselectine	41
Figure 3-5 : Mouvement des SPIONS en présence de champ magnétique.....	42
Figure 3-6 : Vitesse moyenne des SPIONs avec et sans champ magnétique.....	42
Figure 3-7 : Courbe de calibration pour déterminer la concentration en LDL	43
Figure 3-8 : Concentration initiale en LDL dans les échantillons de plasmas	44
Figure 3-9 : Effet de SPION3 sur l'évolution temporelle de la concentration en LDL	44
Figure 3-10 : Effet de SPION3@AB sur l'évolution temporelle de la concentration en LDL.....	45
Figure 4-1 : Effet de l'interaction spécifique anti-LDL/LDL sur l'évolution temporelle de la concentration en LDL.....	50

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FACS	Fluorescent active cell sorting
FBS	Sérum de veau fœtal
ICM	Institut de Cardiologie de Montréal
LDL	Lipoprotéines à basse densité
NPs	Nanoparticules
SPIONs	Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles

LISTE DES ANNEXES

Annexe A – Protocole pour le passage cellulaire.....	59
Annexe B – Protocole pour le test au presto bleu	60
Annexe C – Protocole pour le test d'hémolyse	61
Annexe D – Protocole pour la mesure du LDL.....	62
Annexe E – Protocole pour le test d'activation plaquettaire	63
Annexe F – Protocole pour la mesure de la concentration en LDL	64

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Contexte

L'athérosclérose est une maladie complexe, qui implique de nombreuses biomolécules, en particulier les lipoprotéines à basse densité (LDL) et leur forme oxydée (oxLDL). Les patients présentant une grande concentration de LDL dans le sang ($>100\text{mg/mL}$) présentent davantage de risques de développer des plaques athérosclérotiques. Une stratégie pour combattre la maladie est donc de diminuer cette concentration, en suivant par exemple un régime alimentaire allégé en matières grasses, ou à l'aide de médicaments, les statines, qui ont démontré leur efficacité dans le traitement de l'hypercholestérolémie, mais dont les effets secondaires sont aujourd'hui trop importants. Mais l'efficacité de ces dernières méthodes est limitée. Dans les cas où la concentration en LDL est très élevée (due à un problème métabolique par exemple), les traitements actuels sont parfois impuissants. Une stratégie alternative est de filtrer le sang des patients pour y retirer le LDL. Pour cela, il faut trouver un moyen de sélectionner cette molécule. Le filtre classique que chacun a en tête est celui de la cafetière : le café solide est mélangé à l'eau, puis passé à travers un papier poreux dont les pores sont suffisamment petits pour ne pas laisser passer les particules de café restantes. Il s'agit ici d'une sélection par la taille. Dans notre étude, le LDL ne possède pas une taille suffisante pour être sélectionné par ce critère : il est bien plus petit (environ 20 nm) que les cellules du sang (environ 5 μm). Le moyen le plus efficace de sélectionner une biomolécule est de la cibler avec un anticorps spécifique. On peut alors penser à deux types de filtres :

- Filtre passif : le sang passe à travers une membrane perméable sur laquelle sont fixés des anticorps anti-LDL. Ceci peut engendrer des problèmes de débit sanguin lors d'une filtration instantanée *ex vivo*, voire l'activation de thrombus aux endroits où le stress shielding est le plus important.
- Filtre actif : ce sont les anticorps libres qui viennent rencontrer les molécules de LDL du sang.

En considérant la deuxième stratégie, il faut se poser la question suivante : comment le complexe formé entre le LDL et l'anti-LDL peut-il être récupéré ? Il faut greffer à l'extrémité de chaque anti-LDL un moteur ou un transformateur que l'on active lorsque l'interaction avec la cible a eu

lieu. Les nanoparticules magnétiques sont alors une solution car il est possible de les manipuler à l'aide de champs extérieurs: elles transforment l'énergie magnétique fournie en énergie cinétique, et peuvent ainsi nous servir de moteur pour récupérer le complexe formé entre le LDL et l'anticorps.

1.2 Objectifs et hypothèses

1.2.1 Stratégie générale

Une stratégie générale pour traiter l'athérosclérose est donc de réaliser un système *ex vivo*, dans lequel on injecte les nanoparticules magnétiques sur lesquelles sont fixés des anticorps anti-LDL. Celles-ci viennent fixer le LDL du sang et sont récupérées à l'aide de champs magnétiques.

1.2.2 Objectif principal

L'objectif principal de cette étude est le suivant :

Démontrer la possibilité d'utiliser les propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques fonctionnalisées pour baisser le taux de LDL dans le sang.

1.2.3 Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques de cette étude sont les suivants :

- Démontrer la non-toxicité des SPIONs ;
- Démontrer l'hémocompatibilité des SPIONs ;
- Caractériser le mouvement des SPIONs dans un fluide sous des champs magnétiques biocompatibles ;
- Réduire la concentration en LDL dans le sang animal à l'aide des SPIONs.

1.2.4 Hypothèses

Les hypothèses que nous voulons vérifier sont les suivantes :

- Les SPIONs ne sont pas toxiques pour les cellules ;
- Les SPIONs sont hémocompatibles ;

- Les SPIONs de 20nm peuvent être manipulées avec des champs magnétiques ;
- La greffe d'anti-LDL sur les SPIONs permet de diminuer la concentration en LDL après interaction.

1.2.5 Axes de résolution

Pour atteindre ces objectifs, nous allons réaliser une étude *in vitro* de nanoparticules recouvertes ou non de polymères pour déterminer leur toxicité et identifier les moins toxiques. Nous étudierons ensuite leur capacité à rester compatible avec le sang par une étude *ex vivo*. Puis nous verrons s'il est possible de les diriger sous des champs magnétiques. Enfin nous les mettrons en interaction avec du sang animal et déterminerons la concentration de LDL au cours du temps.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 L'athérosclérose

Les maladies cardiovasculaires deviennent aujourd’hui la première cause de mortalité dans les pays développés¹. Plus de la moitié des décès sont dus à des problèmes athérosclérotiques, qui peuvent mener à des attaques cardiaques ou des accidents vasculaires cérébraux. Le vieillissement de la population grâce au développement fulgurant de la médecine ces dernières décennies entraîne d’autres complications comme un manque d’exercice et un métabolisme ralenti chez les personnes âgées, deux facteurs de risque de la maladie. Et si, en Europe et en Amérique du Nord, les décès dus aux maladies infectieuses sont moins importants, les problèmes dus à une alimentation trop grasse menant au développement de l’athérosclérose sont devenus une priorité des agences de santé, qui s’efforcent de renforcer leurs stratégies de prévention.

2.1.1 Développement de la maladie

L’athérosclérose est caractérisée par un épaississement et une perte d’élasticité des parois de l’artère (plaqué d’athérome), ce qui entraîne une réduction du flux sanguin, voire un blocage². Les vaisseaux concernés sont les artères les plus larges, comme l’aorte, les carotides, ou les artères coronaires. On distingue deux causes menant au développement de la maladie : une infection (le parasite intracellulaire *Chlamydia pneumoniae*³, le virus de l’herpès *cytomegalovirus*⁴, les virus de l’herpès simplex de type 1 et 2⁵, ainsi que la bactérie *Helicobacter pylori*⁶), ou un dysfonctionnement endothérial⁷. Nous nous intéressons ici à cette dernière cause, car c’est celle-ci qui met en jeu le LDL.

2.1.1.1 Dysfonctionnement endothérial

Le dysfonctionnement endothérial est une des causes principales du développement de la maladie. Les facteurs de risque pouvant mener à ce dysfonctionnement sont abordés dans la partie 2.1.2. La paroi des vaisseaux sanguins est constituée, de l’intérieur vers l’extérieur, de l’endothélium (monocouche de cellules endothéliales), du tissu musculaire lisse et du tissu conjonctif (Figure 2-1). L’endothélium assure plusieurs fonctions de régulation, comme la viscosité du sang ou le tonus vasculaire, en permettant des échanges et réactions biochimiques responsables de la dilatation ou du rétrécissement du vaisseau⁸. Cette capacité peut être perdue en

l'absence ou en présence de certaines molécules ou protéines, provoquant une réponse pro-inflammatoire, une prolifération des cellules musculaires et la production de facteurs de coagulation, ce qui attire les leucocytes sur la paroi. On appelle ce phénomène « dysfonctionnement endothérial ».

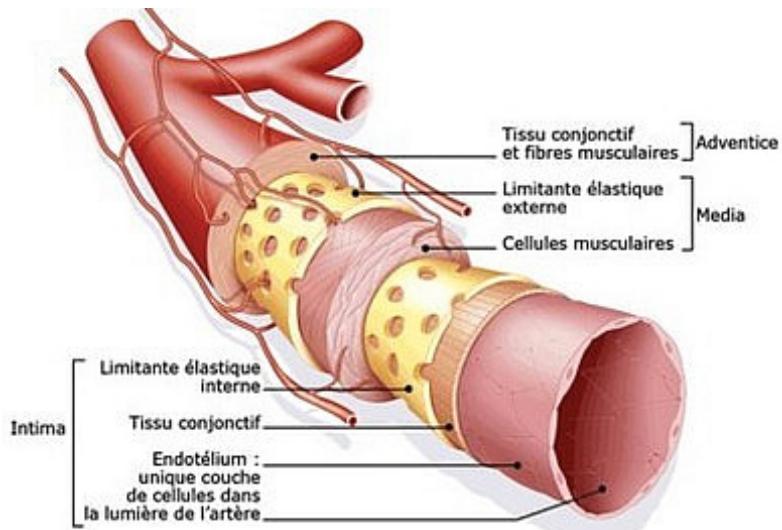


Figure 2-1 : Structure de la paroi d'un vaisseau sanguin (Sanofi Aventice France)

2.1.1.2 Lésion athérosclérotique

L'activation de l'endothélium est suivie de l'augmentation du nombre de protéines d'adhésion à sa surface. Les monocytes circulant dans le sang s'y attachent davantage. Elles rentrent à l'intérieur de l'espace entre l'endothélium et le muscle (diapédèse) où elles se différencient en macrophages. Il se forme ainsi une structure composée de macrophages et de lipoprotéines, qui est l'ancêtre de la future plaque d'athérome (Figure 2-2). Certains macrophages ingèrent les lipides et deviennent des cellules spumeuses, caractéristiques du développement de l'athérosclérose. Ces deux types cellulaires produisent alors un nombre important de facteurs pro-inflammatoires et facteurs de croissance. Ils recrutent les cellules musculaires à proximité dans cette cavité. La présence de lipoprotéines en excès induit la mort à la fois des macrophages et des cellules musculaires et le recrutement de fibroblastes, créant une capsule fibreuse instable. Si celle-ci se brise, elle met en contact l'intérieur de la plaque et la lumière du vaisseau sanguin, induisant alors l'apparition de thrombus, et donc l'obstruction du vaisseau.

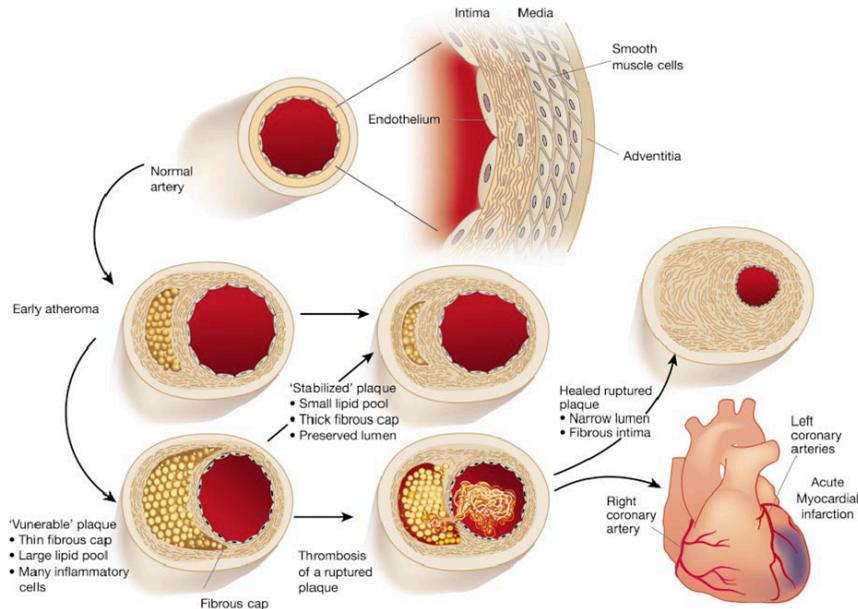


Figure 2-2 : Développement de l'athérosclérose⁹

2.1.2 Facteurs de risque

2.1.2.1 Modes de vie

Certaines habitudes de vie ont une conséquence sur l'apparition des maladies cardiovasculaires, et particulièrement de l'athérosclérose¹ :

- Alcool : l'alcool augmente la pression sanguine et la présence de triglycérides dans le sang.
- Régime alimentaire : un régime trop gras et avec trop peu de fruits et légumes est un facteur de risque de développement de maladies coronariennes.
- Cigarette : en 2014, 30% des morts coronariennes sont attribuées à la cigarette. Le risque augmente avec la fréquence et le nombre de cigarettes consommées.
- Inactivité physique et l'obésité sont également considérés comme des facteurs de risques.

2.1.2.2 Facteurs de risque intrinsèques

Nous présentons ici une liste non exhaustive des facteurs de risques de l'athérosclérose intrinsèques¹ :

- Sexe : il existe une grande différence entre les hommes et les femmes quant au nombre d'événements cardiaques subvenant après 40 ans. Ceci est expliqué principalement par les différences hormonales (la testostérone peut déclencher le développement d'une plaque et les estrogènes le préviennent) et génétiques (encore peu connues).
- Âge : le nombre de maladies coronariennes augmente avec l'âge. L'exposition à des facteurs de risques est en effet plus importante, et la probabilité d'une lésion endothéiale est plus élevée à un certain âge car le système de régulation est moins performant.
- Diabète : ce facteur de risque peut être expliqué à la fois par l'hyperglycémie et par l'hypertension artérielle.
- Génétique : les gènes mis en cause dans le développement de l'athérosclérose font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches et ne sont pas encore clairement identifiés.
- Cholestérol : un trop basse concentration en cholestérol à haute densité (HDL) ainsi qu'une trop haute concentration en cholestérol à basse densité (LDL) constitue un facteur de risque de développement de la maladie.

2.1.2.3 Le mauvais cholestérol

Les lipoprotéines de basse densité (LDL, aussi appelées « mauvais cholestérol ») (Figure 2- 3) jouent un rôle central dans le développement de la plaque d'athérome lorsqu'elles sont sous leur forme oxydée (oxLDL) :

- elles peuvent activer la protéine kinase C et ainsi le facteur-kB nucléaire (NFkB), un facteur de transcription qui augmente la transcription de gènes codant pour l'enzyme de conversion angiotensine, pour des molécules d'adhérence des cellules endothéliales ou encore pour des enzymes qui favorisent le stress oxydatif¹⁰. Ceci provoque le dysfonctionnement endothérial ;
- elles induisent l'expression de MCP-1, une protéine chimio-attractante de monocytes présente à la surface des cellules endothéliales¹¹ ;
- elles entrent dans l'espace sub-endothélial après activation des mastocytes (cellules entre l'endothélium et le muscle lisse)¹² ;

- elles facilitent la prolifération des macrophages dans la plaque¹³ ;
- elles induisent la différentiation des macrophages en cellules spongieuses¹⁴.

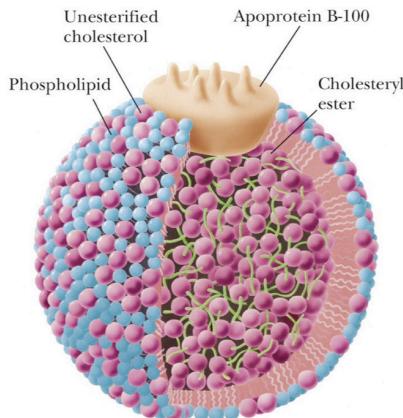


Figure 2-3 : Structure du LDL¹⁵

2.1.3 Traitements de l'hypercholestérolémie

2.1.3.1 Régime alimentaire

Le régime préconisé par l'*International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease* pour réduire les risques d'hypercholestérolémie est le suivant¹⁶ :

- Réduction des graisses alimentaires à moins de 30% des calories. Le cholestérol alimentaire doit être inférieur à 300 mg de cholestérol par jour. Les acides gras saturés doivent représenter moins d'un tiers des graisses alimentaires et être substitués par les acides gras mono- et polyinsaturés et des glucides complexes;
- L'alimentation doit être enrichie en grains entiers ainsi qu'en fruits et légumes frais;
- L'apport calorique doit être limité afin de conserver une masse corporelle normale;
- Les patients souffrant d'hypertension doivent limiter la consommation de sel (<4 g ou 70 mmol de sel de table par jour) et d'alcool.

2.1.3.2 Médicaments : la famille des statines

Les statines sont des médicaments qui ont pour but de diminuer la concentration en cholestérol dans le sang, en particulier celle du LDL¹⁷. Elles sont impliquées dans la cascade de réactions biochimiques menant à la production de cholestérol par la voie métabolique de l'HMG-CoA

réductase. Les effets secondaires peuvent être des crampes musculaires¹⁸, des lésions des cellules hépatiques, l'apparition du diabète, une insuffisance rénale... La prise de statines en trop grande quantité est augmentée donc le risque d'apparition d'effets secondaires graves : il n'est pas possible de traiter les patients présentant des taux trop élevés en cholestérol. Il est possible de diminuer de 30% la concentration en LDL en utilisant ces médicaments.

2.1.3.3 LDL et aphérèse

L'aphérèse est une technique qui permet de séparer certaines substances du sang. Elle est utilisée pour trier les cellules, mais aussi les molécules. Les résultats de l'application de cette méthode pour diminuer le niveau de LDL montrent une augmentation de la vasodilatation des vaisseaux sanguins et peu de réduction du LDL¹⁹. Cette méthode n'est pas encore approuvée par la FDA.

2.2 Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques

2.2.1 Définitions

2.2.1.1 Nanoparticules

La définition de la terminologie utilisée dans la nanotechnologie est un facteur important qui fait partie de la standardisation et sert de guide pour les travaux de recherche menés par les entreprises et instituts de recherche. Différentes agences de normalisations donnent une définition des nanoparticules^{20,21} (Tableau 2.1). On y comprend notamment que l'échelle nanométrique se situe entre 1nm et 100nm, même si certains continuent d'appeler nanoparticule un objet de taille supérieure à 100nm^{22,23}.

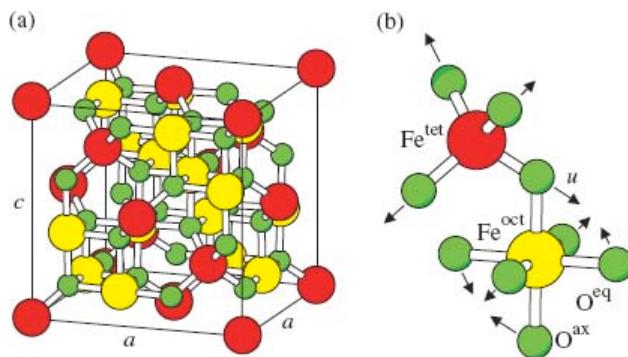
Tableau 2-1: Définition du terme « Nanoparticule » pour les normes ISO/TS 80004 et ASTM E2456

ISO/TS 80004 (partie 8)	ASTM E2456
<p><i>Nanoparticule :</i> « Nano-objet dont les trois dimensions externes sont à l'échelle nanométrique »</p> <p><i>Nano-objet :</i> « Matériau dont une, deux ou les trois dimensions externes sont à la nano-échelle »</p> <p><i>Nano-échelle :</i> « Échelle de longueur s'étendant</p>	<p><i>Nanoparticule :</i> « Sous-classification des particules ultrafines en nanotechnologie, dont les longueurs dans deux ou trois dimensions sont supérieures à 0,001 micromètre (1 nanomètre) et inférieures à environ 0,1 micromètre (100 nanomètres) et qui peut présenter ou non une propriété liée à la taille »</p>

approximativement de 1 nm à 100 nm »

2.2.1.2 Nanoparticules d'oxyde de fer

Ces nanoparticules sont composées d'oxyde de fer Fe_3O_4 , aussi connu sous le nom de tétr oxyde de trifer. Lorsqu'elles ne sont pas en solution, elles forment une poudre noire. Le Fe_3O_4 existe naturellement comme minéral noir à l'échelle macroscopique, la magnétite. Sa structure cristalline est complexe ; elle met en jeu les couples cation ferreux Fe^{2+} /anion O^{2-} et cation ferrite Fe^{3+} /anion O^{2-} qui forment des sous-réseaux FeO et $\text{Fe}_2\text{O}_3^{24}$ (Figure 2-4). L'échange d'électrons entre Fe^{2+} et Fe^{3+} s'effectue facilement dans cette structure, ce qui est à l'origine des propriétés



magnétiques du matériau (partie 2-2-3).

Figure 2-4: Structure du Fe_3O_4 : a) structure de la maille; b) positions relatives des 3 ions

2.2.2 Préparation

2.2.2.1 Synthèse

Il existe de nombreuses méthodes pour synthétiser des oxydes de fer. Certaines reposent sur des procédés chimiques, d'autres physiques ou encore biologiques.

2.2.2.1.1 Procédés chimiques

Ce sont ceux le plus couramment utilisés car ils nécessitent moins d'instruments à coût élevé :

- Procédé sol-gel²⁵ : on mélange du nitrate ferrique ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) avec de l'éthylène glycol à 40°C puis à 80°C pour obtenir le gel. Après séchage à 120°C, puis cuisson à 300°C, on obtient les nanoparticules désirées. Il est difficile de contrôler la taille avec ce procédé.
- Méthode par oxydation²⁶ : le nitrate ferrique est oxydé à 90°C par différents agents.

- Méthode par co-précipitation²⁷ : considérée comme la méthode de préparation la plus efficace et la plus simple, elle permet de contrôler la taille des nanoparticules. Dans une solution d'ions ferrites et ions ferriques, on ajoute une base forte (comme de la soude) et le précipité se forme selon la réaction : $Fe^{2+} + 2Fe^{3+} + 8HO^- = Fe_3O_4 + 4H_2O$
- D'autres méthodes existent, comme la réaction hydrothermique²⁸, l'injection de flux²⁹, la méthode électrochimique³⁰, la méthode aérosol/vapeur³¹, la décomposition sonochimique³², la méthode de fluide supercritique³³, ou l'utilisation de nano-réacteurs chimiques³⁴.

2.2.2.1.2 Procédés physiques et biologiques

Deux procédés physiques de synthèse ont été reportés dans la littérature. Ils présentent l'inconvénient de ne pas contrôler la taille des NPs. Il s'agit de :

- Lithographie électronique³⁵ : on soumet des particules d'oxyde de fer micrométriques à un faisceau d'électrons.
- Dépôt en phase gazeuse³⁶ : on dépose un précurseur gazeux contenant des atomes de fer à l'état d'oxydation +III sur un substrat doré. Sous basses pressions, celui-ci est réduit en ion Fe^{2+} et forme ainsi l'oxyde de fer. Il n'est cependant possible de gouverner qu'une seule dimension à la fois.
- Préparation microbienne³⁷ : cette méthode à bas coût s'avère très reproductible. Sous certaines conditions anaérobies, des bactéries sont capables de produire les particules à partir de $FeOOH$ en présence de glucose.

2.2.2.2 Fonctionnalisation

Très instables dans des conditions oxydatives, il faut recouvrir les SPIONs pour éviter leur dégradation. Des considérations biologiques ou de stratégie de diagnostic ou de traitement invitent le scientifique en quête d'une nouvelle technologie à base de SPIONs à les recouvrir d'un ou plusieurs types de molécules ou biomolécules.

2.2.2.2.1 Recouvrement inorganique

Il est possible de créer une coque métallique ou non métallique autour de la NP pour la protéger.

- Recouvrement d'or³⁸ : il permet de fixer facilement par la suite des alcools ou des acides carboxylique thiolés. Les NPs sont stables sous des conditions acides et neutres.
- Recouvrement de silice³⁹ : celui-ci est souvent réalisé en présence d'alkoxysilanes pour différentes applications. Les NPs sont stables en milieu aqueux.

2.2.2.2 Recouvrement organique

Pour éviter l'agrégation, il est nécessaire de réaliser un recouvrement de polymères qui va créer une interaction stérique opposée à la force thermodynamique à l'origine de l'agrégation.

- Dextran⁴⁰ : ce polymère est souvent utilisé pour recouvrir les biomatériaux implantés dans le corps afin d'améliorer la biocompatibilité (Figure 2-5).

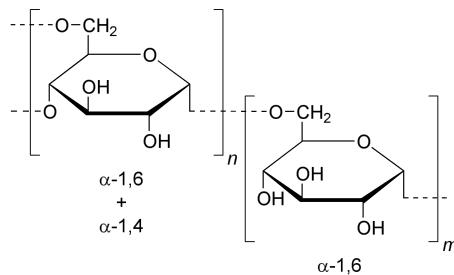


Figure 2-5 : Formule chimique du Dextran

- PEG : le polyéthylène glycol est également largement utilisé dans les biomatériaux. Il est possible de le modifier pour changer le groupe hydroxyle par un groupe amine.

2.2.2.3 Fonctionnalisation biologique

Pour la plupart des applications biologiques, c'est cette étape qui est déterminante pour la réussite d'un diagnostic ou traitement.

- Liaison peptidique : cette liaison a lieu entre une amine et un acide carboxylique. Elle est présente entre les acides aminés d'une protéine. C'est une liaison forte qui est utilisée notamment pour greffer des protéines ou lipoprotéines à la surface des NPs, comme des anticorps ou des peptides.
- Liaisons thiol : les groupes thiols sont présents dans la plupart des protéines et peptides. Les réactions possibles avec ce groupe sont avec le groupe maléimide (O=C1C=CC(=O)N1H) ou l'échange thiol-disulfide ($R_1 - SH + R_2 - S - S - R_3 \rightarrow R_1 - S - S - R_3 + R_2 - SH$).

- Réaction de Click : un groupe azide réagit avec un alkyne pour former un produit de cyclo-addition.

2.2.3 Utilisation en clinique

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont aujourd'hui largement utilisées en médecine, à la fois comme outil de diagnostic et de traitement de maladies⁴¹. Leurs principales applications sont présentées ici.

2.2.3.1 Résonance magnétique

Il s'agit de la première application approuvée par la FDA (en 1996) comme agent de contraste pour détecter des liaisons du foie chez l'humain⁴². Pour mieux comprendre la méthode, il nous faut revenir sur le principe de fonctionnement de l'IRM. Sous l'application d'un champ magnétique extérieur constant \vec{H}_0 , les protons contenus dans les tissus voient leur aimantation s'aligner avec celui-ci. On applique ensuite un second champ magnétique oscillant $\vec{H}_1(t)$ dans le plan perpendiculaire à \vec{H}_0 . L'aimantation est alors soumise à un mouvement de précession autour de l'axe de \vec{H}_0 . On stoppe $\vec{H}_1(t)$ et on mesure à quelle vitesse l'aimantation se réaligne avec l'axe de \vec{H}_0 . Deux temps de relaxation se dégagent : T_1 , relaxation longitudinale et T_2 , relaxation transversale. Il a été démontré que T_2 était fortement diminué lors de la présence de nanoparticules magnétiques dans le milieu⁵⁴. Ceci est dû à l'interaction dipôle-dipôle entre la NP et le proton : l'aimantation de la NP étant alignée avec le champ \vec{H}_0 , elle va faciliter le spin du proton à se réaligner avec \vec{H}_0 .

La diminution du temps de relaxation longitudinal entraîne l'augmentation du contraste sur les images IRM. Il est donc possible de détecter certains tissus (des tumeurs par exemple) en réalisant une fonctionnalisation avec des anticorps dirigés contre certaines protéines membranaires spécifiques des cellules des tissus visés. Les avantages principaux de cette méthode de détection sont le caractère non-invasif, la résolution spatiale et les possibilités de réaliser des tomographies multidimensionnelles. Aujourd'hui, nombreuses sont les études qui utilisent l'IRM et les nanoparticules magnétiques sur des souris ou des rats pour développer également des stratégies de traitement de cancer⁴³ (en combinant cette technique à l'hyperthermie ou la livraison de médicament, voir plus loin). De plus, il est important de vérifier si les

nanoparticules ciblent bien les organes voulus. Des études de biodistribution montrent qu'elles s'accumulent également dans le foie et dans le système réticulo-endothélial, ce qui peut avoir une influence sur leur toxicité (voir partie 2-3).

2.2.3.2 Biocapteurs

La réalisation de biocapteurs de grande efficacité est un défi pour le contrôle d'un environnement cellulaire et pour le diagnostic de certaines maladies (diabète, athérosclérose, etc.). Des idées de nano-biocapteurs s'appuyant sur les propriétés magnétiques des nanoparticules ont émergé au début des années 2000 :

- Multi-capteurs basés sur la fixation d'une enzyme sur une nanoparticule et mesures d'intensités électriques⁴⁴ ;
- Détection de virus par nano-assemblage et mesures de temps de relaxation T_2 ⁴⁵.

2.2.3.3 Livraison de médicaments

Les enjeux thérapeutiques de la livraison de médicaments sont cruciaux, pour augmenter l'efficacité des traitements, ainsi que pour diminuer les effets secondaires. Les propriétés magnétiques des nanoparticules peuvent être utilisées pour les guider jusqu'à un endroit déterminé dans le corps (Figure 2-6). Nous verrons dans la partie 2-2-4 la théorie à l'origine de cette manipulation magnétique.

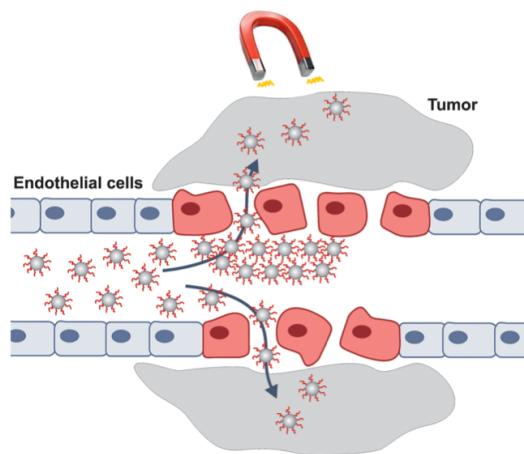


Figure 2-6 : Livraison de médicaments dans une tumeur à l'aide de nanoparticules magnétiques

En général, la structure de la nanoparticule est la suivante : un cœur d'oxyde de fer, un recouvrement polymérique pour diminuer la toxicité et protéger le cœur, et l'attache du

médicament à la surface, qui peut être une protéine, un oligonucléotide ou encore un fragment d'ADN.

2.2.3.4 Hyperthermie

En 1957, il est démontré pour la première fois que des SPIONs de 20nm peuvent induire une augmentation de température dans différents types de tissus biologiques par application d'un champ magnétique de fréquence 1.2Hz⁴⁶. Depuis lors, de nombreuses études se sont attachées à montrer que l'utilisation d'un champ magnétique à haute fréquence sur des nanoparticules est une stratégie efficace pour le traitement de cancers⁴⁷. Les nanoparticules sont dirigées vers les tissus soit grâce à la technique d'attraction magnétique décrite précédemment ou par la présence d'un anticorps spécifique à une protéine exprimée à la surface des cellules tumorales (ciblage actif), soit par l'effet de perméabilité et de rétention accrues (EPR) du fait de l'hypervascularisation des tumeurs⁴⁸. Le champ magnétique augmente la température localement jusqu'à 46°C, mais ne doit pas dépasser 56°C pour ne pas provoquer la carbonisation du tissu. Cette stratégie évite les effets secondaires de la chimiothérapie, et s'avère très puissante pour un grand nombre de cancers.

L'origine de l'élévation de température grâce aux NPs provient de absorption de l'énergie magnétique et de sa dissipation dans les tissus. L'aimantation a tendance à s'aligner avec le champ appliqué. Mais comme celui-ci change de direction rapidement, elle va être en retard. L'alignement se fait par deux mécanismes⁴⁹ :

- la relaxation de Néel : l'aimantation tourne grâce à l'énergie thermique (propriété spécifique au superparamagnétisme, voir partie 2-2-4).
- la relaxation de Brown : la particule tourne sur elle-même.

L'hyperthermie est également utilisée pour la livraison de médicaments⁵⁰. L'augmentation de la température de la particule change la conformation des protéines liées à sa surface qui peuvent alors libérer une substance désirée.

2.2.3.5 Séparation magnétique

En présence d'un champ magnétique, les nanoparticules peuvent permettre de séparer certaines substances biochimiques d'un liquide. Puisque cette technique est celle que nous avons utilisée

dans ce projet, nous consacrons la partie suivante à décrire le comportement des SPIONs sous l'influence de champs magnétiques.

2.2.4 Manipulation magnétique

2.2.4.1 Théorie du superparamagnétisme

Décrit pour la première fois dans une publication en 1959⁵², ce phénomène magnétique complexe décrit un comportement insolite des matériaux à très petite échelle (<100nm). Pour mieux l'appréhender, il faut revenir sur quelques notions de magnétisme dans les matériaux macroscopiques. Dans la suite, l'aimantation du matériau et le champ extérieur appliqué seront notés respectivement M et H .

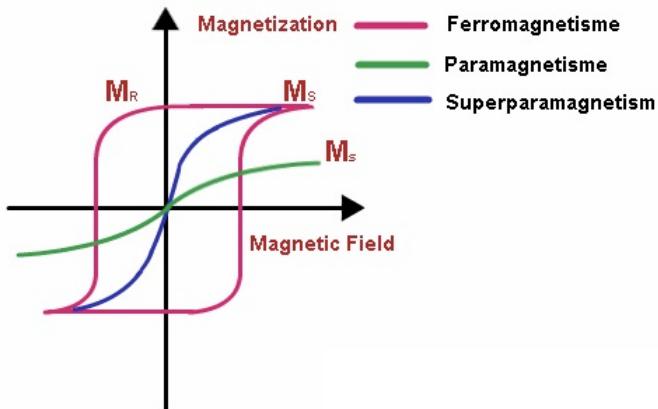


Figure 2-7 : Aimantation en fonction du champ magnétique appliqué pour différents matériaux

Dans certains matériaux dits diamagnétiques, il n'y a pas d'électrons disponibles pour provoquer une aimantation sous l'influence d'un champ extérieur. Si au contraire certains électrons sont disponibles, leurs spins vont avoir tendance à s'aligner sous l'influence du champ et la l'aimantation atteint un maximum appelé aimantation de saturation (M_s)⁵¹. Lorsque le champ redevient nul, on distingue deux types de comportements (voir Figure 2-7) :

- Paramagnétisme : l'orientation des spins redevient aléatoire, et il n'y a plus d'aimantation ($M=0$).
- Ferromagnétisme : l'orientation des spins reste cohérente, et il en résulte une aimantation rémanente M_r ainsi qu'un phénomène d'hystérésis. Cette orientation se fait selon un

certain angle dépendant de la structure cristalline du matériau. On parle d'antiferromagnétisme si deux directions opposées sont privilégiées.

Dans un matériau ferromagnétique, les spins des électrons interagissent entre eux. Il y a un minimum d'énergie si les spins sont alignés ou parfois opposés. On parle de superparamagnétisme lorsque l'énergie thermique apportée à une nanoparticule composée d'un matériau ferromagnétique est suffisante pour que la direction commune choisie par les spins ne dépende plus de la structure cristalline⁵² : elle est aléatoire et peut varier au cours du temps. En l'absence de champ magnétique extérieur, on a donc compétition entre l'énergie magnétique E_m et l'énergie thermique E_{th} régies par les équations suivantes :

$$E_m = KV$$

$$E_{th} = k_B T$$

où K est l'énergie d'anisotropie uniaxiale effective par unité de volume, V le volume de la particule, k_B la constante de Boltzmann et T la température. D'après la théorie statistique de Boltzmann, lorsqu'il y a compétition entre ces deux énergies, l'aimantation de la particule suit l'équation :

$$\frac{\partial M}{\partial t} = f_0 M \exp\left(-\frac{E_m}{E_{th}}\right) = f_0 M \exp\left(-\frac{KV}{k_B T}\right) = \frac{M}{\tau}$$

où f_0 est la fréquence d'essai de la particule pour renverser son aimantation ($\approx 10^9$ s) et τ le temps de vie d'un état magnétique défini comme suit :

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right)$$

Il apparaît alors ici que plus le volume est petit, plus le temps de vie d'un état magnétique est faible. Cet effet superparamagnétique ne se manifeste donc que pour des petites tailles. Ce renversement de direction provoque une mesure d'aimantation nulle si le champ extérieur est nul, ce qui n'est en fait qu'un artefact de mesure. L'aimantation est bien présente, mais sa direction est une moyenne de celle existant le temps de l'expérience. Il n'est plus observé d'effet d'hystérosérisis, mais un comportement linéaire de M par rapport à H :

$$M = \chi H$$

où χ est la susceptibilité magnétique du matériau. Considérant une expérience de 100s à 25°C (une mesure de rémanence par exemple), on trouve un volume critique de :

$$V_c = \frac{25k_B T}{K} \simeq 13 \text{ nm}$$

En dessous d'une dizaine de nanomètres, la nanoparticule est superparamagnétique.

2.2.4.2 Force magnétique

On considère un système formé d'une nanoparticule d'oxyde de fer de rayon R_{NP} et de volume V de susceptibilité magnétique χ_{NP} formant un dipôle magnétique. On néglige l'action de la pesanteur. La force magnétique F_m exercée par un champ magnétique B sur ce système s'écrit :

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

où m est le moment magnétique du dipôle : $\vec{m} = V\vec{M}$ avec $M = (\chi_{NP} - \chi_{eau})H = \Delta\chi H$. Puisque $\vec{B} = \mu_0 \vec{H}$, on obtient :

$$\vec{F}_m = \frac{V\Delta\chi}{\mu_0} (\vec{B} \cdot \vec{\nabla}) \vec{B}$$

En l'absence de champ électrique, l'équation de Maxwell-Ampère donne $\vec{\nabla} \times \vec{B} = \vec{0}$. Or, $\vec{\nabla}(\vec{B} \cdot \vec{B}) = 2\vec{B} \times (\vec{\nabla} \times \vec{B}) + 2(\vec{B} \cdot \vec{\nabla}) \cdot \vec{B}$, donc $(\vec{B} \cdot \vec{\nabla}) \cdot \vec{B} = \frac{1}{2} \vec{\nabla}(\vec{B} \cdot \vec{B}) = \frac{1}{2} \vec{\nabla}(B^2)$. Finalement :

$$\vec{F}_m = \frac{V\Delta\chi}{2\mu_0} \vec{\nabla}(B^2) = A \vec{\nabla}(B^2)$$

(1)

avec $A = \frac{V\Delta\chi}{2\mu_0}$. À cette force magnétique s'oppose une force de viscosité F_d due aux frottements du liquide sur la NP :

$$\vec{F}_d = 6\pi\eta R_{NP} \Delta\vec{v} \quad (2)$$

où η est la viscosité du liquide et Δv est la vitesse de la NP par rapport au liquide. À l'équilibre, on trouve une vitesse de déplacement :

$$\Delta\vec{v} = \frac{R_{NP}^2 \Delta\chi}{9\eta\mu_0} \vec{\nabla}(B^2) \quad (3)$$

Il y a donc d'autant plus de déplacement si la particule est grande, si la viscosité est faible et si le gradient de champ magnétique est élevé.

2.2.4.3 Piège magnétique

Il est donc théoriquement possible de diriger des nanoparticules en utilisant des champs magnétiques⁵³. Des idées de pièges magnétiques ont été données en 2003 par Pankhurst et al. Dans un article fondateur des nanotechnologies magnétiques biomédicales actuelles⁵⁴ (Figure 2-8). Les deux principales sont l'**utilisation d'un ou plusieurs aimants à l'extérieur** du liquide biologique (a) et l'**utilisation de laine métallique** à l'intérieur pour créer localement par induction de forts gradients de champ magnétique (b).

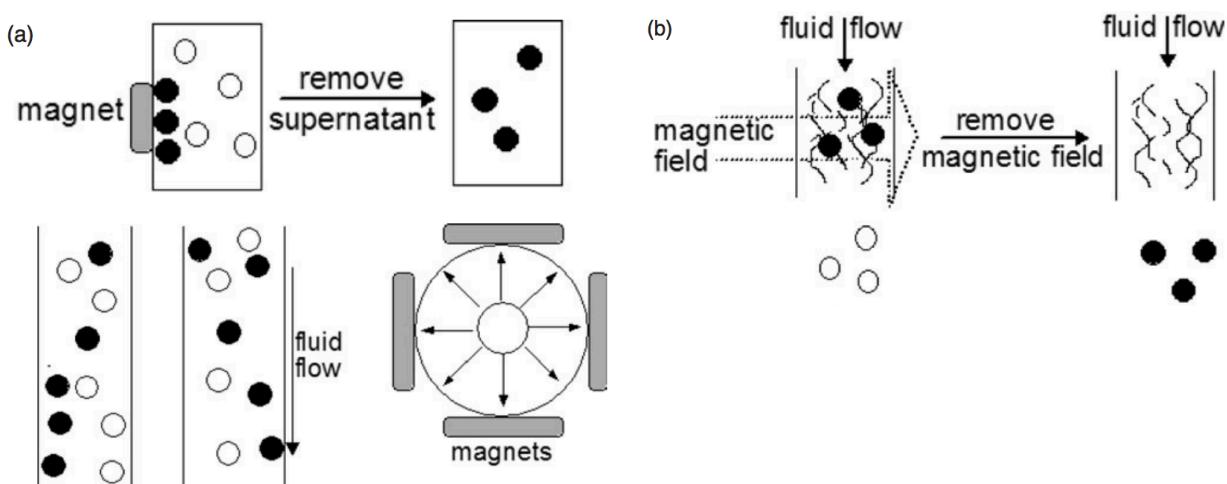


Figure 2-8 : Stratégie de séparation de nanoparticules magnétiques dans un fluide en mouvement.

La première idée a été largement exploitée, notamment à travers les travaux de Schaller et al. qui traitent de l'agrégation des nanoparticules lors de la présence d'un champ magnétique⁵⁵. La technique retenue pour mesurer cette agrégation est une mesure d'absorbance au cours du temps, qui donne accès à la concentration au cours du temps. L'approche à la fois théorique et expérimentale permet de conclure que, pour des nanoparticules de taille supérieure à 100nm, des chaînes de nanoparticules se forment, dû à l'**interaction dipôle-dipôle** entre particules. Un modèle de marche aléatoire prenant en considération ce dernier paramètre est développé et les résultats des simulations sont davantage en concordance avec leurs résultats expérimentaux (Figure 2-9). Leur étude démontre également que la cinétique de séparation des nanoparticules ne dépend pas de la concentration initiale. On peut regretter ici que cette étude ait été réalisée dans un environnement statique, peu représentatif des vaisseaux sanguins.

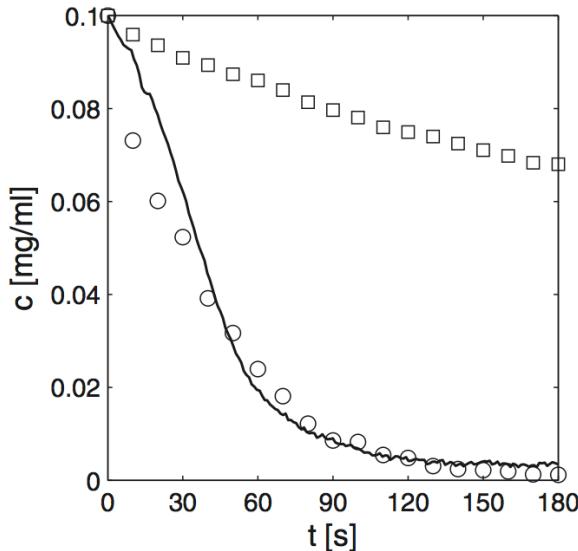


Figure 2-9 : Concentration des particules magnétiques de diamètre de 425 nm en fonction du temps, pour une mesure expérimentale (ligne continue), un modèle de simulation qui ne tient pas en considération l’interaction entre les particules (carrés) et un modèle la tient en considération (cercles) La concentration initiale est de 0,1 mg/ml.

Récemment, une équipe de recherche du département de Mathématiques de l'*Indian Institute of Technology* a davantage exploité les moyens de simulation actuels pour déterminer l’influence de la position d’un aimant chargé de piéger des nanoparticules magnétiques injectées dans un vaisseau sanguin⁵⁶ (figure 2-10). Avec les conditions aux limites les plus proches de la réalité biologique, ils obtiennent le résultat suivant : en plaçant l’aimant à 2,5cm de la paroi sanguine, la totalité des nanoparticules est piégée. À 6,5cm par contre, la plupart des particules restent libres dans le sang. La **distance de l’aimant** apparaît donc comme un facteur important lors de la confection d’un piège magnétique.

La deuxième idée de la Figure 2-8 a été exploitée d’une manière différente à celle présentée initialement par Pankhurst. En lieu et place de la laine métallique, il s’agit de réaliser un réseau de micro-aimants créant des champs locaux très puissants⁵⁷ (Figure 2-11). Ces aimants sont formés d’un fil conducteur traversé par un courant I . Les nanoparticules entrent en contact direct avec les aimants et viennent se loger dans l’anneau prévu à cet effet. On peut cependant regretter le manque d’études cinétiques de séparation de nanoparticules par cette méthode, ainsi que le manque d’applications avec des liquides physiologiques.

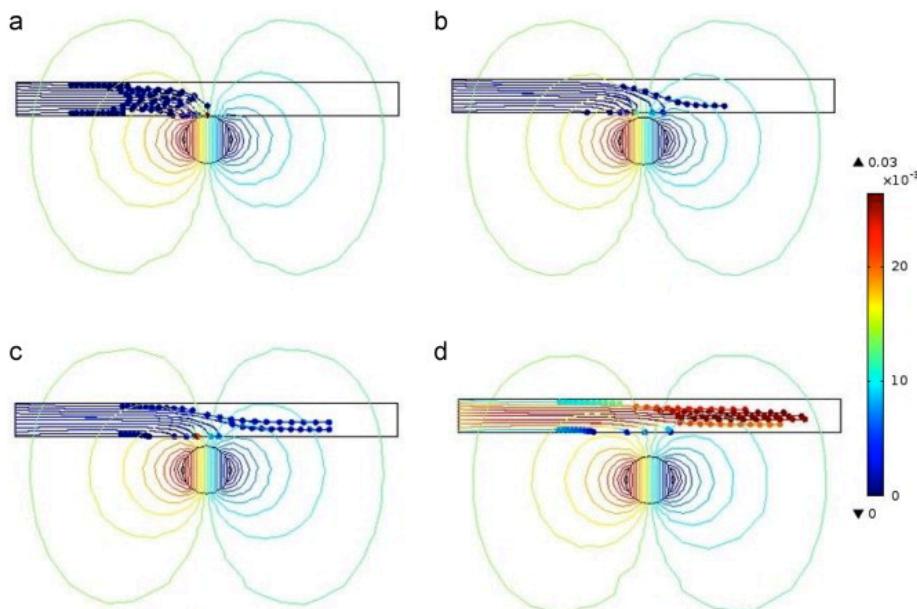


Figure 2-10 : Simulation de trajectoires de nanoparticules magnétiques dans un vaisseau sanguin pour différentes positions de l'aimant (a) 2.5cm (b) 3.5cm (c) 4.5cm (d) 5.5cm⁵⁶

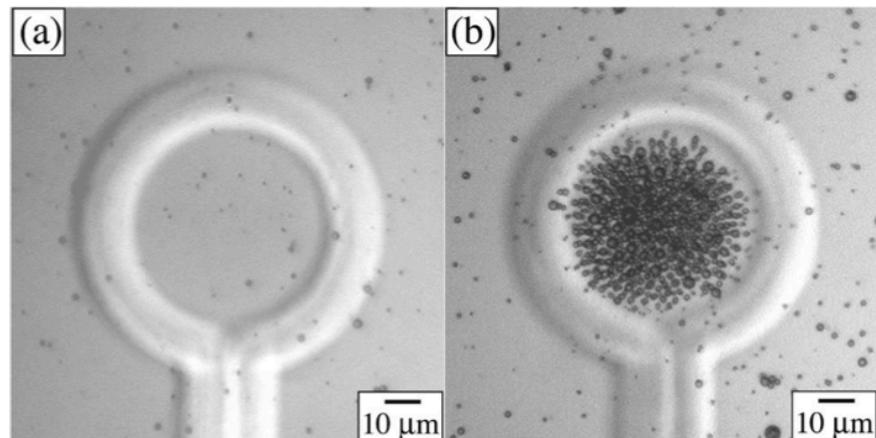


Figure 2-11 : Microphotographie de particules magnétiques dans le liquide au-dessus d'un piège annulaire (a) sans courant (b) avec courant $I=0.35 \text{ A}$ ⁵⁷

D'autres paramètres ont également été mis en avant quant à leur influence sur la séparation des nanoparticules : le nombre de Reynolds⁵⁸, le type d'écoulement⁵⁹, la taille des particules⁶⁰ ou encore le rôle de la surface lors des interactions hydrodynamiques entre particules⁶¹.

2.3 Biocompatibilité des nanoparticules

L'utilisation de matériaux dans la médecine existe depuis la civilisation antique⁶². Au cours des siècles, la sélection des matériaux s'est faite par rapport à leur capacité à bien être intégrés au corps humain, sans créer de toxicité, c'est-à-dire à être biocompatibles. Aujourd'hui, la question de la biocompatibilité est au cœur du développement de technologies en contact direct (prothèses, pacemaker, greffes artificielles, etc.) ou indirect (IRM, ondes radio, etc.) avec les tissus biologiques. Une des réponses les plus fréquentes à l'implantation d'un matériau dans le corps est la formation d'une capsule cellulaire fibreuse autour de celui-ci⁶³. Les nanoparticules sont si petites qu'elles vont interagir directement avec les biomolécules présentes dans l'environnement, et d'autres effets peuvent survenir. Il apparaît aujourd'hui indispensable de développer des standards internationaux indiquant les tests de biocompatibilité à réaliser pour valider l'utilisation d'une nanoparticule en médecine⁶⁴ (2.3.1). Comment sont adaptés les tests de toxicité développés pour des matériaux macroscopiques lorsqu'on veut les appliquer à l'échelle nanométrique et quels sont les tests réalisés par les équipes de recherche en nanomédecine (2.3.2) ? Si les particules sont amenées à interagir avec le sang, nous verrons également les problématiques que cela pose (2.3.3).

2.3.1 Standardisation

L'ensemble des tests de biocompatibilité à réaliser pour un biomatériau macroscopique est décrit dans la norme ISO 10993. Celle-ci n'est pas adaptée pour les nanoparticules :

- + Il faut y ajouter des tests de toxicité car ces dernières peuvent réagir au niveau moléculaire et avoir des effets plus complexes ;
- + Il faut y ajouter des tests d'organotoxicité car une fois dans le corps, leur petite taille leur permet d'atteindre beaucoup d'organes différents ;
- Il faut y enlever les tests de fatigue mécanique et tout autre test qui ne concerne que les matériaux macroscopiques.

Les agences sanitaires (comme la FDA, Santé Canada, etc.) s'appuient sur les normes proposées par les agences de normalisation (comme ISO, ASTM, etc.) lors de la validation d'une technologie en médecine. Le manque de standards actuellement concernant l'utilisation de

nanoparticules induit d'une part le risque de trouver davantage d'effets toxiques sur le corps humain, et d'autre part l'augmentation du délai d'évaluation des risques (jusqu'à 5 ans après dépôt d'un dossier à la FDA). Dans l'agence ISO, le groupe de travail qui concerne la nanotechnologie est le groupe *ISO/TC 229 Technologies*. Il a pour objectif la création de normes autour de :

- la compréhension et le contrôle de la matière et des processus à l'échelle nanométrique, typiquement, mais non exclusivement, au-dessous de 100 nanomètres dans une ou plusieurs dimensions quand l'apparition de phénomènes liés à la dimension permet en général de nouvelles applications;
- l'utilisation des propriétés des objets nanométriques qui diffèrent des propriétés d'atomes individuels, des molécules et des matériaux macroscopiques pour créer des substances améliorées, des dispositifs et des systèmes qui exploitent ces nouvelles propriétés.

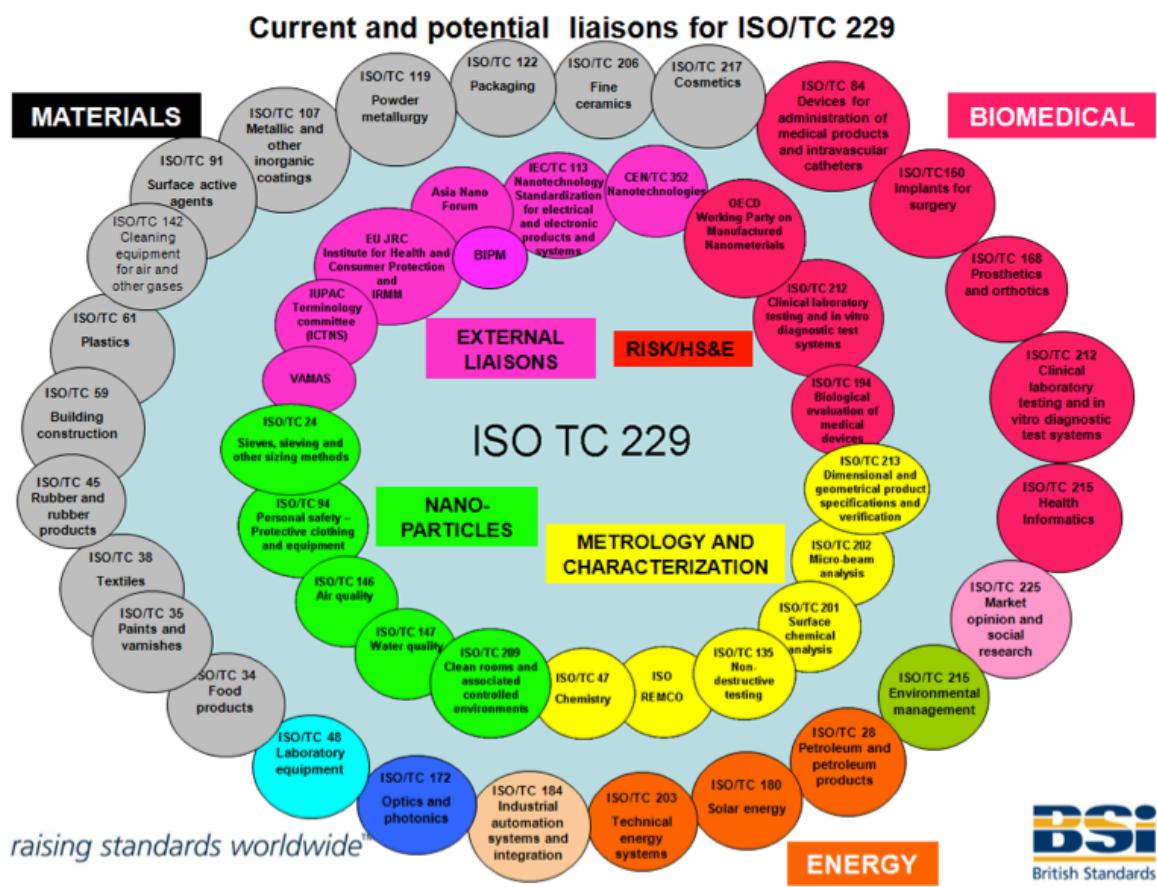


Figure 2-12 : Le groupe de travail ISO TC 229 et ses connections⁶⁵

Ce groupe travaille en collaboration avec de nombreux groupes dans des domaines variés, comme peuvent l'illustrer la Figure 2- 12⁶⁵. Au 1^{er} avril 2015, il a publié 42 normes, dont certaines concernent la toxicité ou la caractérisation physico-chimique des nanoparticules. Bien que celles-ci soient applicables, l'exemple de la terminologie vu précédemment démontre qu'une norme n'est pas toujours respectée.

2.3.2 Cytotoxicité

2.3.2.1 Prédire la toxicité des nanoparticules : l'apport de la thermodynamique

La thermodynamique décrit les échanges d'énergie en chimie et peut être un outil intéressant pour expliquer l'adsorption des protéines à la surface des matériaux, et plus particulièrement des nanoparticules. Les travaux de Dr Leszczynski portent sur la possibilité de prédire la toxicité des nanoparticules en utilisant la thermodynamique (relations structure activité à l'échelle nanométrique – nano-QSAR). Il s'agit de s'intéresser à la relation entre structure et activité pour prévoir les propriétés physico-chimiques des composés et donc la toxicité. Leurs travaux mettent en avant la bonne corrélation entre les simulations et les expériences, et invitent à davantage de recherches pour complexifier encore plus le modèle⁶⁶. Le problème reste complexe et les paramètres très nombreux⁶⁷. De plus, le système biologique étant un système ouvert, les lois classiques de la thermodynamique doivent être adaptées pour considérer les échanges avec l'environnement. L'évaluation expérimentale de la toxicité est longue et coûteuse, et cette méthode permettrait à long terme de donner une estimation des tests à réaliser pour confirmer la non-toxicité de certaines nanoparticules.

2.3.2.2 Test de viabilité cellulaire

Un test de cytotoxicité est un test *in vitro* qui détermine si un biomatériau est toxique pour les cellules. On présente en général les résultats sous la forme d'un pourcentage de cellules mortes versus le total de cellules présentes. Par abus de langage, on trouve aussi le terme de cytotoxicité à la place de viabilité et inversement. Dans ce dernier cas, le pourcentage exprimé représente la fraction de cellules vivantes sur le total de cellules présentes. Il est communément admis qu'en dessous de 80% de viabilité, le matériau est toxique⁶⁸. Nombreuses sont les études qui traitent de la question de la toxicité *in vitro* de nanoparticules, et certaines particulièrement concernent les SPIONs. Nous présentons ici différents tests possibles développés à cet égard.

- Tests MTT/MTS : ces deux tests colorimétriques de viabilité fonctionnent de la même manière. On souhaite déterminer si les cellules possèdent encore une activité métabolique, et plus précisément mitochondriale. Le MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) et le MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) peuvent subir une réduction menant au formazan (qui est violet) en présence d'une enzyme produite par les mitochondries. Grâce à ces méthodes, il a été montré que les SPIONs nues (non recouvertes d'une couche de polymère) sont toxiques dès 1mg/mL (<80% de viabilité)⁶⁹, ainsi que pour 200µg/mL après 24h et plus pour différents recouvrements non polymériques⁷⁰. De plus, lorsqu'elles sont recouvertes de polyvinyl alcohol (PVA), elles ne montrent une toxicité qu'à une concentration de 20 mg/mL⁷¹.
- Test LDH : ce test colorimétrique de cytotoxicité s'appuie sur l'intégrité de la membrane cellulaire. On mesure la quantité de LDH (lactose déshydrogénase) présente dans le surnageant des culture cellulaires. Entre 0 et 1000ppm, les SPIONs fonctionnalisées avec différents groupes ne sont pas toxiques⁷².
- Test Presto bleu⁷³ : ce test colorimétrique est basé sur la réduction de la résazurine par des enzymes mitochondrielles. On mesure l'absorbance après incubation des cellules en présence du colorant. Aucune étude n'a actuellement utilisé cette méthode pour déterminer la toxicité des SPIONs avec recouvrement polymérique⁷⁴.

2.3.3 Hémocompatibilité

Les tests d'hémocompatibilité à réaliser pour des biomatériaux sont présentés dans la norme ISO 10993 - Partie 4 « Sélection des tests pour interactions avec le sang ». Aucun test d'hémocompatibilité n'a été réalisé pour les SPIONs. Il en existe quatre catégories :

- Test d'hémolyse : il s'agit de regarder l'influence du matériau sur la lyse des globules rouges ;
- Test de thrombogénicité : il s'agit de regarder si le matériau induit l'apparition de thrombus, notamment par le biais de l'activation d'une protéine, la Pselectine ;
- Tests de coagulation : on mesure la vitesse de coagulation du sang après contact avec le matériau ;

- Tests d'activation du complément : des effets de vasoconstriction et d'augmentation de perméabilité capillaire peuvent être observés après contact du sang avec le matériau. Ces effets peuvent être quantifiés par la présence de certaines molécules comme les anaphylatoxines C3a et C5a.

Si les études sur les trajectoires des SPIONs dans du sang sont nombreuses, celles qui s'attachent à démontrer qu'elles ne sont pas toxiques pour les différents composants du sang sont rares. Il a été montré que des SPIONs nus (sans recouvrement) n'ont pas d'influence sur le taux de calcium Ca^{2+} dans les globules rouges⁷⁵ alors qu'elles réduisent légèrement leur pH.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.4 Synthèse des nanoparticules

2.4.1 Nanoparticules utilisées

S'appuyant sur les études de biocompatibilité réalisées précédemment, il est important de recouvrir la nanoparticule d'une couche de polymère pour réduire sa toxicité. Nous avons choisi le polyéthylène glycol (PEG, Figure 3-1) qui a démontré sa bonne biocompatibilité sur des matériaux macroscopiques ainsi qu'une facilité à se greffer à la surface des nanoparticules⁷⁶.

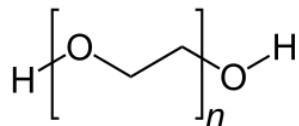


Figure 0-1: Polyéthylène glycol

Afin de tester la réactivité biologique des SPIONs, nous avons également réalisé un recouvrement à partir de PEG modifié pour avoir un groupement amine en fin de chaîne (Figure 3-2).

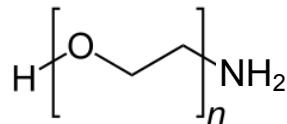


Figure 0-2: Polyéthylène glycol modifié

De plus, afin de déterminer le mouvement des SPIONs sous l'influence de champs magnétiques, nous avons décidé de fixer une molécule fluorescente sur les nanoparticules. Enfin, pour réaliser une interaction spécifique avec le LDL, nous avons fixé l'anticorps anti-LDL à la surface des SPIONs. Nous avons donc réalisé la synthèse des SPIONs suivants :

- **SPION1** : Fe₃O₄ sans recouvrement ;
- **SPION2** : Fe₃O₄ + PEG non modifié ;
- **SPION3** : Fe₃O₄ + PEG modifié ;
- **SPION3@fluorescéine** : SPION3 + fluorescéine à la surface ;
- **SPION3@AB** : SPION3 + anticorps à la surface ;

2.4.2 Synthèse de SPION1

La méthode de synthèse retenue pour la nanoparticule d'oxyde de fer est la méthode décrite par Molina et al⁷⁷. Il s'agit d'un procédé de co-précipitation qui est réalisé sous atmosphère inerte. 3ml de FeCl₂.4H₂O (préparé à 1.0 mol.L⁻¹ de HCl) sont ajoutés à 12ml de FeCl₃.6H₂O, en respectant le rapport molaire de 1:2. Après cela, le mélange (Fe II et du Fe III) est ajouté à 150ml de NH₄OH (0,7 mol.L⁻¹) sous agitation magnétique. Un précipité se forme alors. Par la suite, SPION1 est lavé avec de l'eau Milli-Q jusqu'à pH neutre; l'échantillon obtenu est séché par lyophilisation. Nous obtenons alors une solution de 1mg.mL⁻¹ de SPION1 dilué dans de l'eau.

2.4.3 Synthèse de SPION2

SPION2 est préparée de la même manière que SPION1, à la différence que la solution de HCl à 1.0 mol.L⁻¹ est remplacée par une solution de PEG₂₀₀₀₀ 0.5% en masse dans 1.0 mol.L⁻¹ de HCl.

2.4.4 Synthèse de SPION3

À partir de SPION1, une solution à 0,5% en masse de PEG modifié est ajoutée pour obtenir une solution de 1 mg.mL⁻¹. Le mélange est soumis au bain à ultrasons pendant une heure. Après cela, le mélange reste à agitation mécanique pendant 23 heures.

2.4.5 Synthèse de SPION3@fluorescéine

À partir de 10mL de la solution de SPION3, 5mg de fluorescéine est ajoutée. Le tout est soumis au bain à ultrasons pendant une heure, et gardé à l'abri de la lumière à température ambiante.

2.4.6 Synthèse de SPION3@anti-LDL

5 mg de SPION3 sont dispersés dans 2 ml d'eau et soumis au bain à ultrasons pendant une heure. Après cela, 100 µl de l'anticorps monoclonal anti-LDL (clone 3H3) est ajouté à cette dispersion. Les échantillons sont placés pendant plus de 15 minutes au bain à ultrasons glacé et utilisés le jour-même.

2.5 Biocompatibilité des nanoparticules

Nous souhaitons utiliser les SPIONs injectées dans le sang. Nous devons vérifier si elles n'induisent pas de toxicité. Nous avons réalisé des tests de cytotoxicité *in vitro* ainsi que des tests d'hémocompatibilité.

2.5.1 Cytotoxicité

2.5.1.1 Préparation des nanoparticules

Les nanoparticules doivent être stérilisées avant le test pour ne pas induire de toxicité provenant d'une contamination lors de la synthèse en milieu non stérile (laboratoire de chimie). Les techniques de stérilisation sont nombreuses, et nous avons sélectionné celle qui n'affecte pas la surface : la méthode des ondes ultraviolettes. Après 12h sous lampe UV, les solutions contenant les SPIONs 1, 2 et 3 sont centrifugées à 1500rpm pendant 5min, et le solvant remplacé par un milieu de culture contenant du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 5% de sérum de veau fœtal (FBS) ainsi que 1% d'antibiotique (pénicilline/streptomycine). Le rôle du FBS est d'accélérer le développement cellulaire ; celui de l'antibiotique est d'éviter la contamination du milieu par des bactéries.

Afin de garder une bonne efficacité du système de couplage SPION-LDL, la concentration en SPIONs ne peut être trop faible ($>10\mu\text{g/mL}$). Mais nous avons vu que la concentration à partir de laquelle la toxicité augmente est 1mg/mL . Nous avons donc choisi les concentrations $C_1=0.1\text{mg/mL}$, $C_2=0.5\text{mg/mL}$ et $C_3=1\text{mg/mL}$. Ces solutions sont soumises à la sonde ultrasons pendant 30 minutes et doivent être utilisées le jour-même pour éviter la dégradation des particules ainsi que du milieu.

2.5.1.2 Culture cellulaire

La lignée cellulaire choisie est une lignée de fibroblastes de souris, sensibles à l'inflammation. Ces cellules vont mourir assez facilement si les particules induisent une faible toxicité. Nous estimerons donc qu'en deçà de 80% de viabilité cellulaire, les particules sont toxiques.

La croissance est réalisée dans des flasques de 75cm^3 en présence de DMEM, 10% de FBS ainsi que 1% d'antibiotique, à 37°C en présence de 5% de CO_2 et 95% d'air. Lorsque la confluence

atteint 80% (2 ou 3 jours), l'ajout de trypsine permet de détacher les cellules de la flasque et après changement du milieu de culture, on obtient une solution contenant les cellules (ANNEXE A).

2.5.1.3 Test au presto bleu

Le test au presto bleu (voir 2-3-2) permet de déterminer la viabilité cellulaire. Le protocole détaillé pour ce test est présenté en ANNEXE B. Nous testons la viabilité pour SPION1, SPION2 et SPION3 pour les concentrations C₁, C₂ et C₃. Nous utilisons une plaque de 96 puits (Figure 3-3). Le contrôle négatif (pas de toxicité) est représenté par la culture de cellules en l'absence de toute particule (en vert). Le contrôle positif (grande toxicité) est la présence de quantum dots (nanoparticules toxiques) à 0.5mg/mL (en rouge). Puisqu'il s'agit d'une mesure de fluorescence, nous devons soustraire l'effet des nanoparticules sur la fluorescence. Pour cela, nous mesurons également celle des NPs en l'absence de cellules (« blanks », lignes E à H). Quatre duplicates pour chaque mesure ont été utilisés. Nous obtenons alors la plaque de 96 puits suivante :

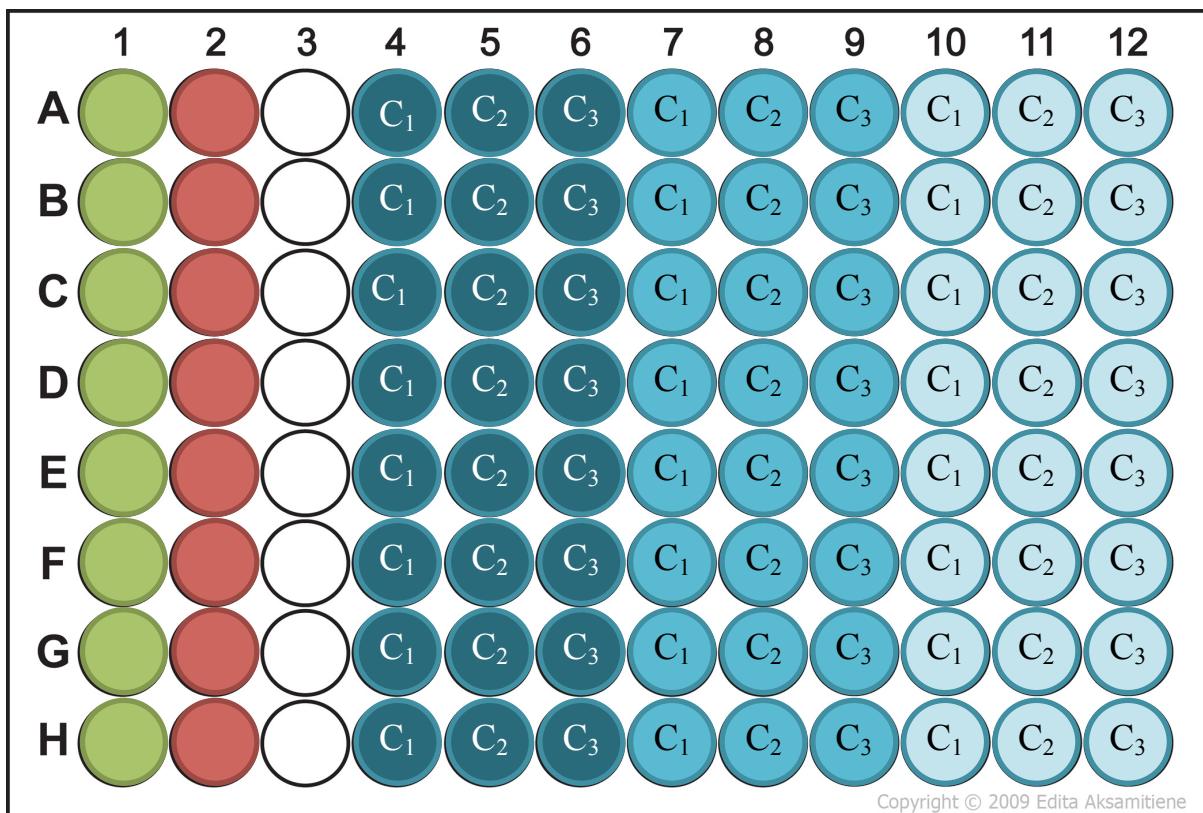


Figure 0-3 : Répartition des SPIONs sur plaque de 96 puits pour test de viabilité cellulaire (du plus clair au plus foncé : SPION 1, 2 et 3)

Les cellules sont placées dans les puits en présence milieu de culture de telle sorte qu'il y a 5000 cellules par puits, et incubées (37°C en présence de 5% de CO₂ et 95% d'air) pendant 24h. Le milieu est ensuite remplacé par les solutions de SPIONs dans le milieu de culture, puis la plaque est à nouveau placée à l'incubateur pendant 24h. Le presto bleu est alors ajouté dans chaque puits dont on mesure la fluorescence absolue par spectrométrie.

2.5.2 Hémocompatibilité

Il existe plusieurs tests pour détecter l'influence d'un matériau sur le sang (voir 2-3-3). Nous avons réalisé les deux tests principaux : l'hémolyse et l'activation des plaquettes.

2.5.2.1 Préparation des nanoparticules

De la même façon que pour le test de viabilité cellulaire, les SPIONs sont stérilisés 12h à la lampe UV. Après centrifugation (1500rpm, 5 minutes), le solvant est remplacé par une solution saline (0,9% en chlorure de sodium), puis les solutions à trois différentes concentrations sont soumises à la sonde ultrasons pendant 30 minutes.

2.5.2.2 Échantillons sanguins

Les échantillons sanguins sont fournis le jour-même par l'Institut de Cardiologie de Montréal. Il s'agit d'un donneur sain. Le sang est centrifugé (700rpm pendant 10min) pour recueillir d'un coté la partie RBC (érythrocytes, ou globules rouges) et de l'autre le plasma avec les plaquettes et les leucocytes (ou globules blancs).

2.5.2.3 Test d'hémolyse

Le protocole détaillé est présenté en ANNEXE C. Seule la partie RBC est utilisée dans ce test. Les SPIONs sont ajoutées à différentes concentrations. Le contrôle négatif (pas d'hémolyse) est assuré par l'absence de particules. Le contrôle positif est l'injection d'eau qui, par augmentation de la pression osmotique, provoque la lyse des globules rouges. Après 30min d'incubation, les échantillons sont centrifugés et on mesure l'absorbance absolue des surnageants.

2.5.2.4 Test d'activation plaquettaire

Le protocole détaillé est présenté en ANNEXE D. Un anticorps fluoré dirigé contre la Pselectine (CD62P-CD) est ajouté au milieu. Lorsque la protéine est présente, celui-ci va entrer dans la

cellule qui va devenir fluorescente. Différentes concentrations de SPIONs sont ajoutées à la partie contenant les plaquettes. L'adénosine di-phosphate est une base libre qui est capable d'activer les plaquettes. Elle sert donc de contrôle positif. Notre contrôle négatif est l'absence de particules. On détecte les cellules fluorescentes par FACS (*fluorescent active cell sorting*).

2.6 Nanonavigation

2.6.1 Préparation des nanoparticules

En se basant sur les résultats de biocompatibilité obtenus avec les différents SPIONs, nous avons choisi de réaliser la nanonavigation avec seulement SPION3. Avant utilisation, la solution contenant SPION3@Fluoroscéine est soumise au bain ultrasons pendant 30 minutes.

2.6.2 Montage expérimental

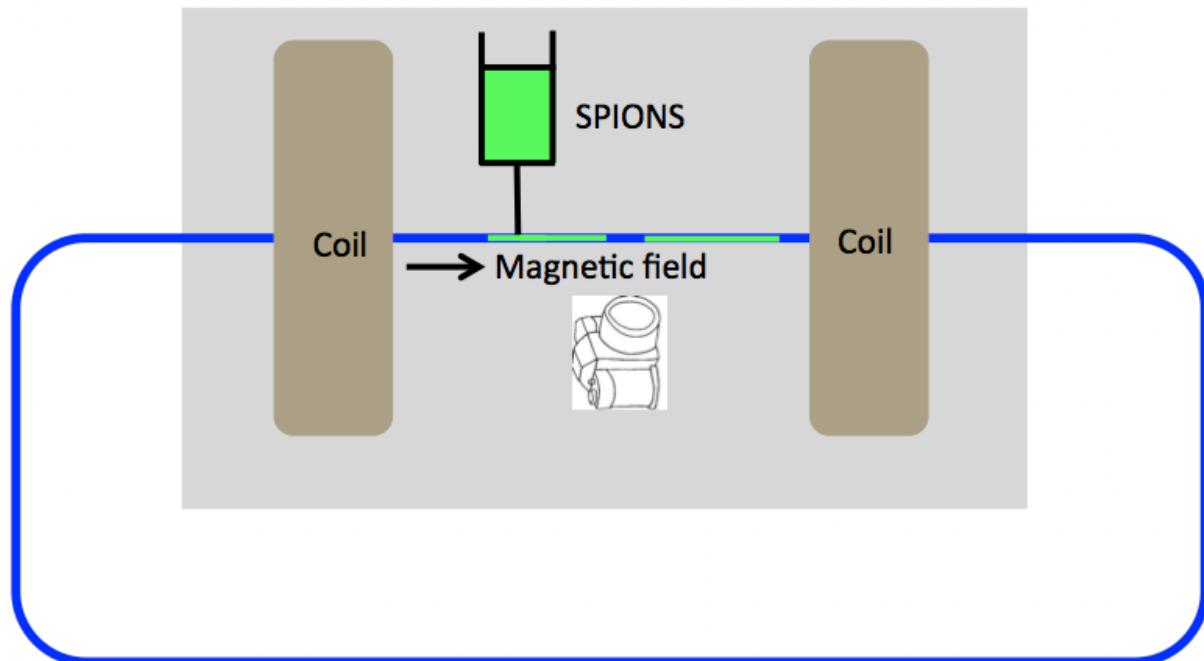


Figure 0-4 : Montage utilisé lors de la nanonavigation

Nous avons voulu démontrer la possibilité de diriger les SPIONs dans une direction donnée. Pour cela, un système composé de deux bobines électriques a été mis en place (Figure 3-4). Sur l'axe des bobines, le champ peut être facilement calculé. Nous y avons placé un tube rempli d'eau pour

simuler le déplacement dans un liquide physiologique. Un volume de 0.1mL de SPIONs est injecté à l'aide d'une seringue hermétiquement connectée au tube. Par la suite, le système est plongé dans le noir et exposé à la lumière UV. Des photos sont prises par un appareil photo toutes les 30s.

2.6.3 Orientation des bobines

L'intensité du courant injecté dans les bobines peut être contrôlée, tout comme la tension. Il est également possible de contrôler le sens dans lequel le courant circule dans les deux bobines. Le champ magnétique créé par une bobine, près de son axe est :

$$B_x(x) = \frac{\mu_0 n I R^2}{2(R^2 + x^2)^{3/2}}$$

où μ_0 est la constante de perméabilité du vide, n le nombre de spires de la bobine, I l'intensité du courant, et R le rayon de la bobine. Le champ total est l'addition des deux champs si les deux bobines fonctionnent dans le même sens, et la soustraction des deux dans le cas inverse. Si on place le repère au milieu des deux bobines, on obtient :

$$B_x(x) = \frac{\mu_0 n I R^2}{2} \left[\frac{1}{\left(R^2 + \left(x - \frac{L}{2} \right)^2 \right)^{3/2}} \pm \frac{1}{\left(R^2 + \left(x + \frac{L}{2} \right)^2 \right)^{3/2}} \right]$$

où L est la distance entre les bobines. Le gradient selon l'axe principal est alors :

$$\frac{\partial B_x}{\partial x}(x) = \frac{3}{2} \mu_0 n I R^2 \left[\frac{x - \frac{L}{2}}{\left(R^2 + \left(x - \frac{L}{2} \right)^2 \right)^{5/2}} \pm \frac{x + \frac{L}{2}}{\left(R^2 + \left(x + \frac{L}{2} \right)^2 \right)^{5/2}} \right]$$

Les courbes de l'intensité du champ magnétique et du gradient du carré du champ sur l'axe des bobines sont données dans les figures 3-5 et 3-6 ($I=100A$, $n=100$, $R=0.1m$, $L=0.4m$, $\mu_0 = 12.6 \cdot 10^{-7} T \cdot m \cdot A^{-1}$). Le calcul de la vitesse de formule (3) donne alors (avec $R_{NP} = 10nm$, $\eta = 10^{-3} Pa \cdot s$, $\Delta\chi = 7.3 \cdot 10^{-3}$)

$$v = 2 \cdot 10^{-4} m/s$$

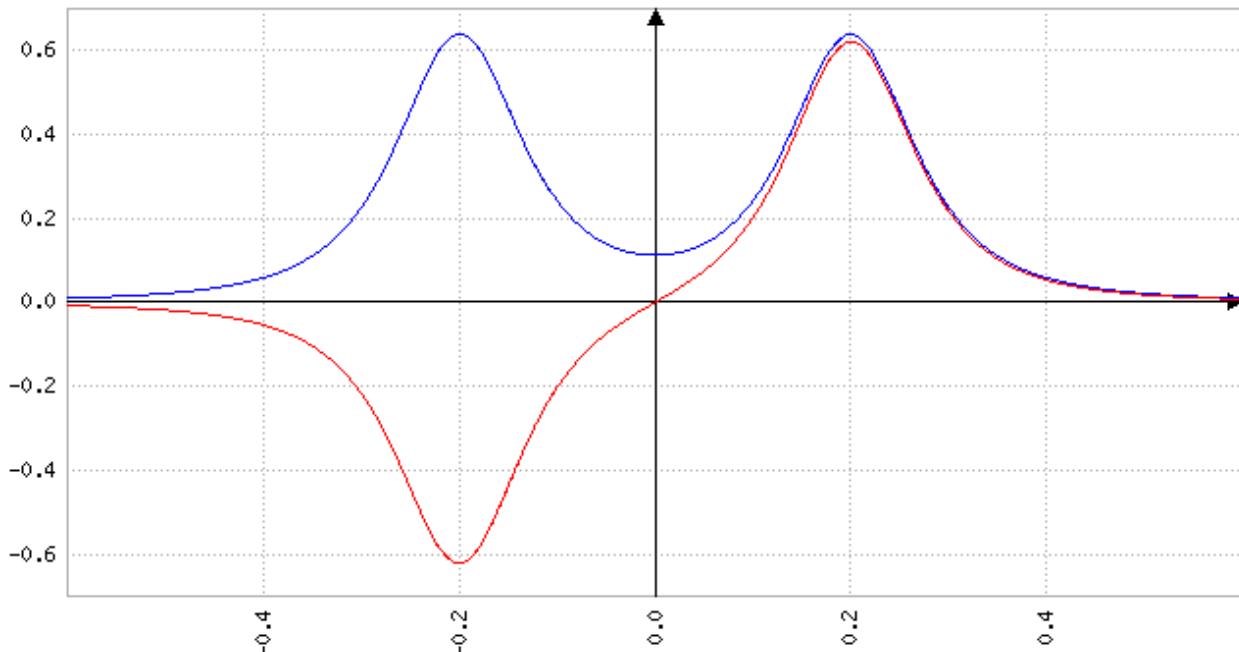


Figure 0-5 : Intensité du champ pour deux bobines fonctionnant en sens inverse (rouge) et dans le même sens (bleu) (abscisse en mètres et ordonnées en Tesla)

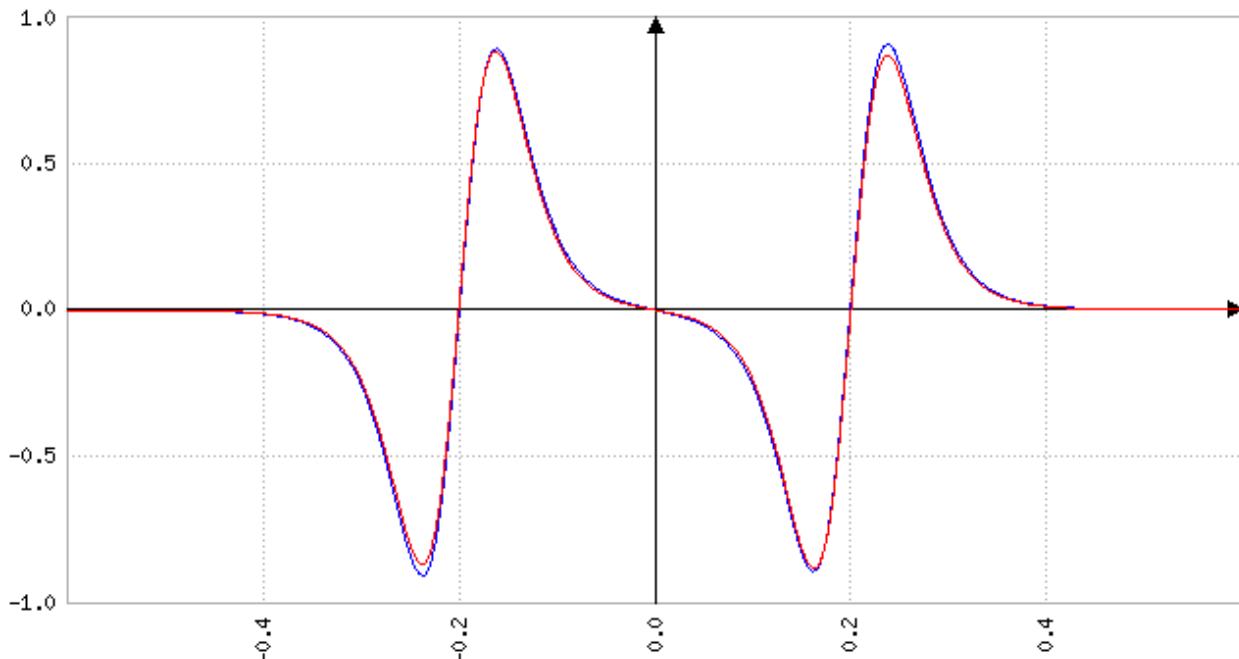


Figure 0-6 : Intensité du gradient du carré du champ pour deux bobines fonctionnant en sens inverse (rouge) et dans le même sens (bleu) (abscisse en mètres et ordonnées en UA)

2.6.4 Position de l'injection

Pour des raisons de symétrie, la position initiale de l'injection avait été déterminée au milieu des deux bobines. Or le calcul réalisé en 2-2-4 nous montre que la force est proportionnelle au gradient du champ au carré $\frac{\partial B_x^2}{\partial x}(x) = 2 \frac{\partial B_x}{\partial x}(x)B_x(x)$. Pour $x = 0$, il faut donc à la fois que B_x et son gradient ne s'annulent pas, ce qui est le cas quelle que soit la situation (bobines inversées ou non). L'injection des SPIONs doit donc être effectuée autre part qu'au milieu des deux bobines. Nous avons choisi une injection au quart de la distance entre les bobines ($x_0 = -L/4$), là où le gradient du carré du champ est maximal, et la force magnétique également.

2.6.5 Traitement d'images

Une fois les images récupérées, elles sont traitées à l'aide du logiciel ImageJ. On extrait pour chaque pixel l'intensité du vert, puis on moyenne cette intensité sur chaque colonne. On obtient alors la distribution moyenne en vert de l'image, $I_v(x)$. On détermine ensuite le maximum I_{max} de $I_v(x)$ et on sélectionne x_1 et x_2 tels que $\forall x \notin [x_1; x_2], I_v(x) < 0,8 \cdot I_{max}$. La position du groupe de nanoparticules est alors choisie comme $x_{NP} = \frac{x_2 + x_1}{2}$. On calcule ensuite la vitesse instantanée entre deux images $v(t) = x_{NP}'$.

2.7 Réduction du LDL dans le sang

2.7.1 Préparation des échantillons de plasma de lapin

Le lapin est le modèle animal de grande taille le plus facile à élever pour tester des traitements contre l'athérosclérose⁷⁸. Les échantillons de plasma sanguin de lapins ont été fournis par l'ICM. Les soins des animaux et les procédures ont respecté les lignes directrices du Conseil Canadien sur le Soin des Animaux et ont été approuvés par le comité d'éthique de l'Institut. Les plasmas ont été préparés à partir d'échantillons de sang de lapins de 3 kg soumis à une alimentation normale ($n = 1$) ou à un régime enrichi à 0,5% en cholestérol (Harlan, Indianapolis, Indiana, États-Unis) plus de la vitamine D2 (12 500 à 50 000 UI par jour ; Sigma, Markham, Canada) dans l'eau potable (mise en commun de $n = 30$, 14 ± 1 semaine). Des échantillons de sang ont été obtenus soit par la veine marginale de l'oreille ou par l'aorte au moment du sacrifice sous anesthésie en utilisant de l'EDTA comme anticoagulant. Des échantillons de sang ont été

centrifugés pendant 1 heure à température ambiante, à 2000 g pendant 10 minutes. Les plasmas ont été conservés congelés à -80 ° C jusqu'à utilisation. On obtient du plasma normal (S1) et le plasma hypercholésterolemique (S2).

2.7.2 Préparation des nanoparticules

Les solutions de SPION3 et SPION3@AB sont stérilisées à la lumière UV pendant 12h, puis centrifugées à 1500rpm pendant 5 minutes pour remplacer le PBS. Le tout est soumis à la sonde ultrasons pendant 30 minutes. Les solutions finales ont des concentrations de 3mg/mL.

2.7.3 Suivi de la concentration en LDL au cours du temps

Afin de suivre l'évolution de la concentration en LDL dans le plasma au cours du temps, des échantillons sont prélevés à différents instants (Figure 3-7) :

- $t = 0^-$: avant l'injection des NPs dans le plasma;
- $t = 0^+$: immédiatement après l'injection des NPs dans le plasma;
- $t = 24h$;
- $t = 48h$.

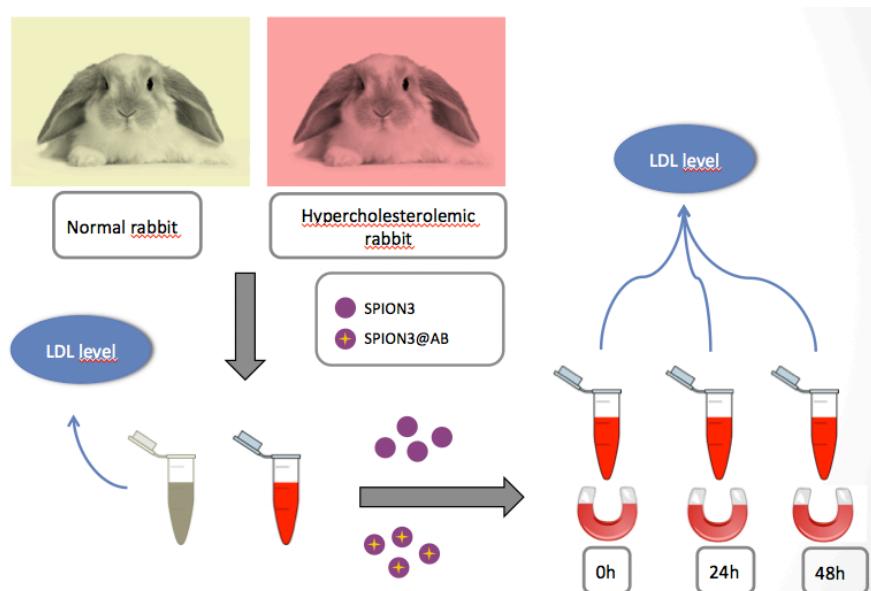


Figure 0-7 : Stratégie pour déterminer l'évolution du LDL dans le plasma

Un total de quatre duplicitas par combinaison (S1+SPION3; S1+SPION3@AB; S2+SPION3; S2+SPION3@AB) a été appliqué. Le protocole détaillé est présenté en ANNEXE F. Le contrôle

négatif est incarné par les plasmas en l'absence de NPs. Nous avons utilisé un calibrateur fourni par la compagnie Wako. À partir de solutions de concentration en LDL connue, nous avons procédé à des dilutions (1mg/mL, 12mg/mL, 60mg/mL, 120mg/mL). La mesure de la concentration se fait par spectroscopie en utilisant le kit fourni par la même compagnie (ANNEXE G). Il est donc nécessaire d'y ajouter une mesure de bruit de fond ou blank (l'eau distillée seule). La mesure finale est une mesure d'absorbance absolue.

CHAPITRE 3 RÉSULTATS

3.1 Viabilité cellulaire

3.1.1 Résultats généraux

Les résultats obtenus pour le test de viabilité cellulaire après interaction avec nanoparticules sont présentés figure 4-1. Après acquisition de la fluorescence absolue d'un échantillon, on soustrait la valeur du blank correspondant et on moyenne sur les quatre duplicitas. Les résultats sont présentés comme un pourcentage du contrôle négatif (cellules seules, pas de toxicité). Plus le pourcentage est proche de 100%, plus les cellules sont vivantes.

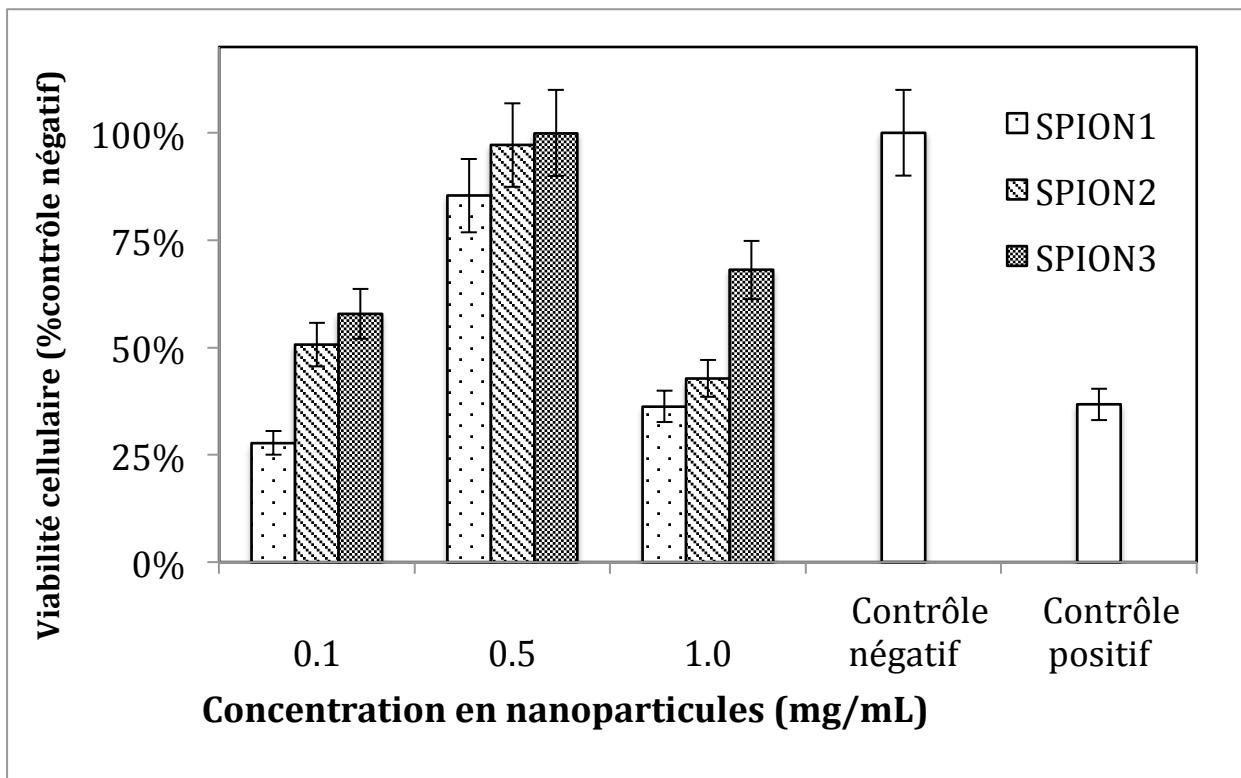


Figure 3-1 : Effet des nanoparticules sur la viabilité cellulaire

3.1.2 Influence du type de particule

Pour les trois concentrations, on observe que la viabilité cellulaire est toujours la plus faible pour SPION1 (28%, 85%, 36%), et la plus grande pour SPION3 (58%, 100%, 68%), tandis que

SPION2 reste au milieu (51%, 97%, 43%). Par ordre de toxicité, SPION1 arrive en premier, suivie de SPION2, puis SPION3.

3.1.3 Influence de la concentration

Quelle que soit la nanoparticule utilisée, on remarque que la concentration pour laquelle la viabilité est la meilleure est 0.5 mg/mL (85%, 97%, 100%), bien plus élevée que pour 0.1 mg/mL (28%, 51%, 58%) et pour 1 mg/mL (36%, 43%, 58%). La concentration la moins毒ique est donc 0.5 mg/mL.

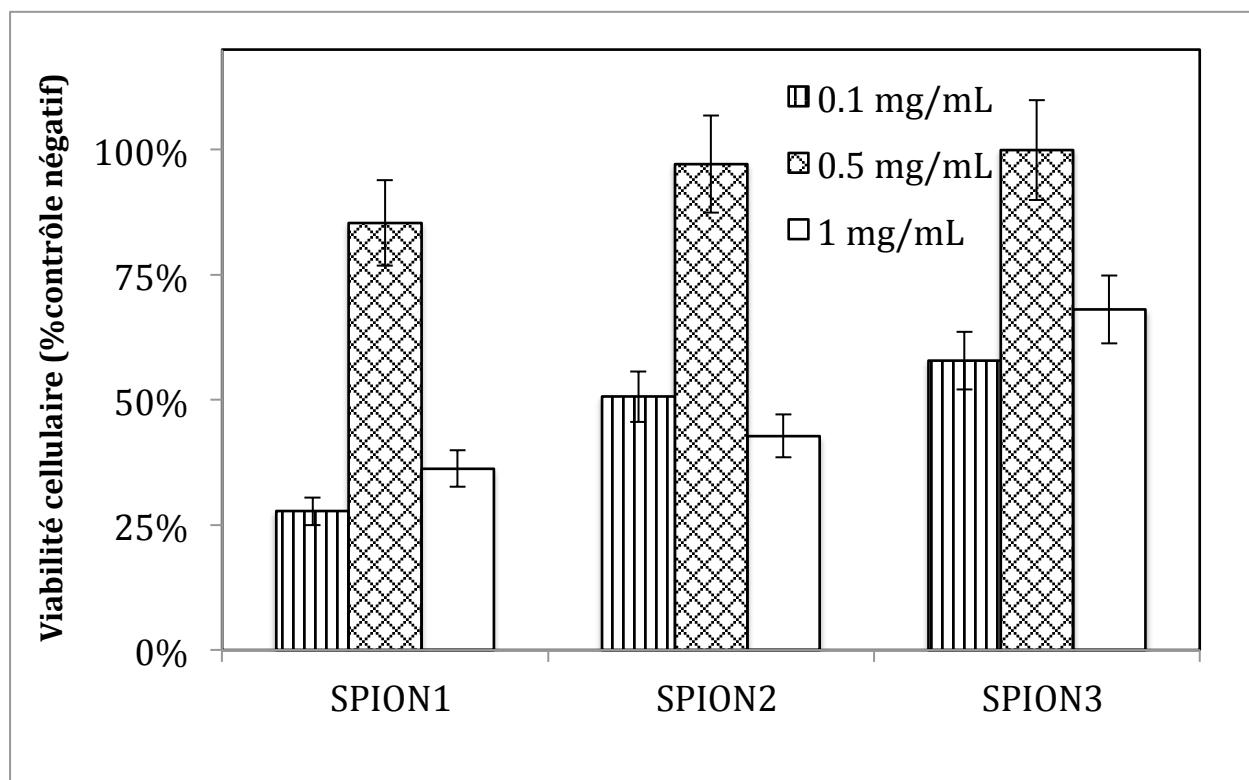


Figure 3-2 : Effet de la concentration des nanoparticules sur la viabilité cellulaire

3.2 Hémocompatibilité

3.2.1 Hémolyse

Les résultats concernant le test d'hémolyse sont présentés figure 4-3. La mesure de l'absorbance est ramenée à un pourcentage par rapport à l'absorbance du contrôle positif. On remarque que quelle que soit la concentration en nanoparticules, l'hémolyse est toujours comprise entre 1.1% et

1.3%, tout comme le contrôle négatif. De plus, nous n'observons pas de différence entre le type de nanoparticule utilisée. Les nanoparticules n'ont donc pas d'effet sur l'hémolyse.

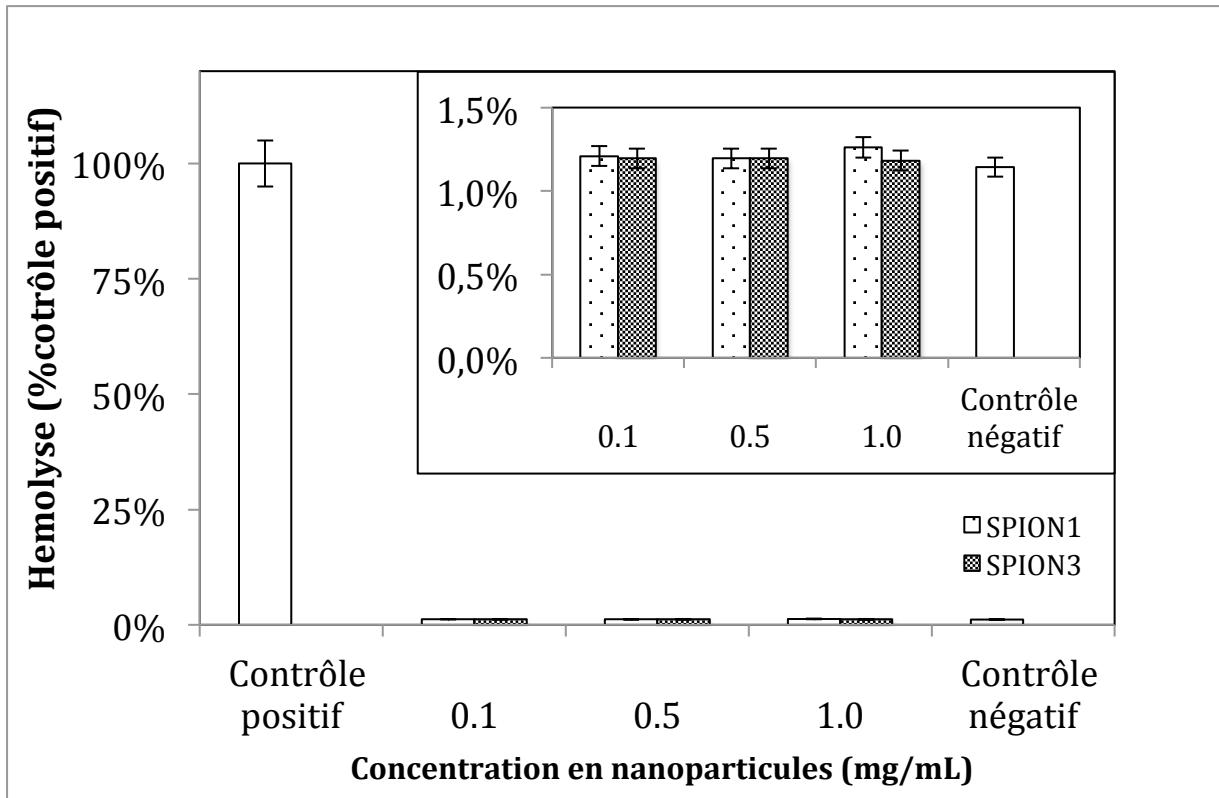


Figure 3-3 : Effet des nanoparticules sur l'hémolyse

3.2.2 Activation des plaquettes

Les résultats du test d'activation de la Pselectine sont présentés dans la figure 4-4. La fluorescence des cellules est répartie selon un histogramme. On fixe un seuil de détection, et on prend comme valeur finale le pourcentage de cellules au dessus de ce seuil. On remarque que, tandis que la valeur du contrôle négatif est autour de 7%, les valeurs obtenues pour SPION1 se situent entre 7% et 10%, alors qu'elles sont entre 11% et 13% pour SPION3. SPION1 et SPION3 semblent très biocompatibles. Aucune différence n'est observable entre les différentes concentrations.

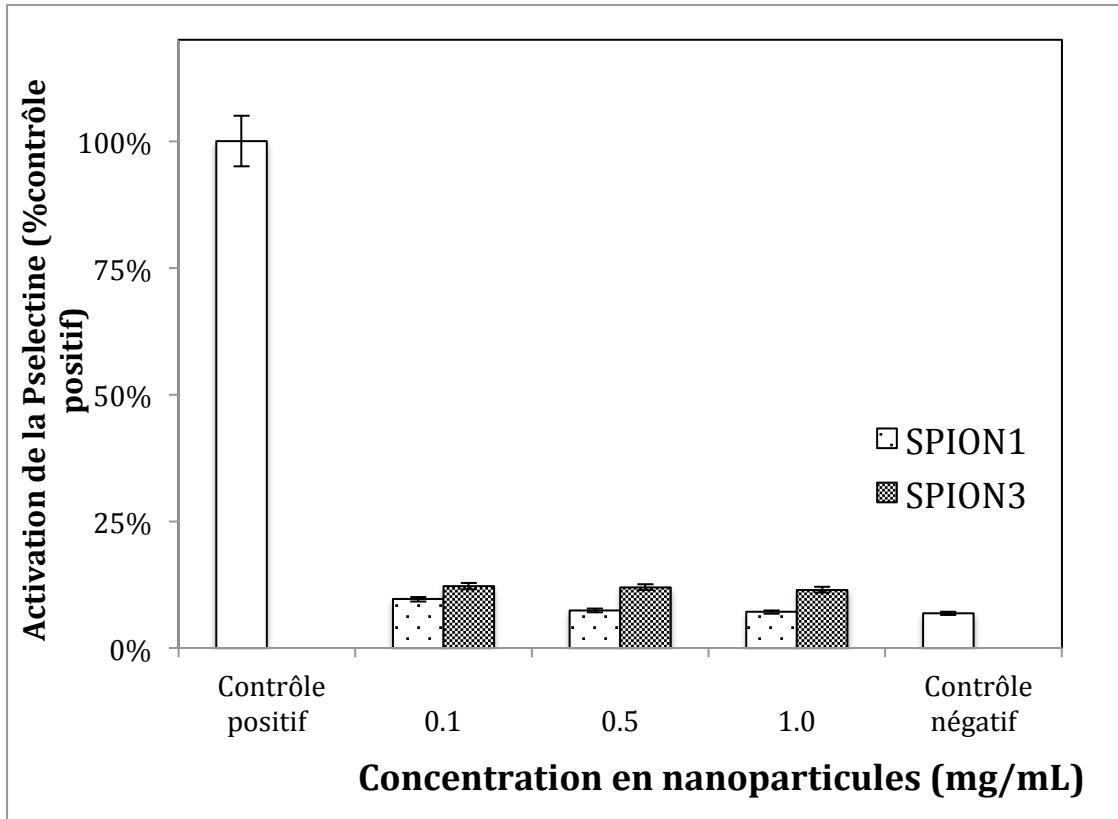


Figure 3-4 : Effet des nanoparticules sur l'activation de la Pselectine

3.3 Mouvement des nanoparticules

Les images du déplacement des NPs après injection dans le liquide en présence de champ magnétique sont présentées figure 4-5. Elles ont été prises toutes les 30 secondes. La flèche indique la position de l'injection. La figure 4-6 indique la vitesse moyenne instantanée du paquet de nanoparticules avec et sans champ magnétique. On distingue un déplacement vers la gauche du paquet de particules, qui se confirme avec le calcul de la vitesse, significativement plus élevée lors de la présence de champ magnétique (environ 0.1mm/s). On observe de plus une diffusion des particules dans le liquide.

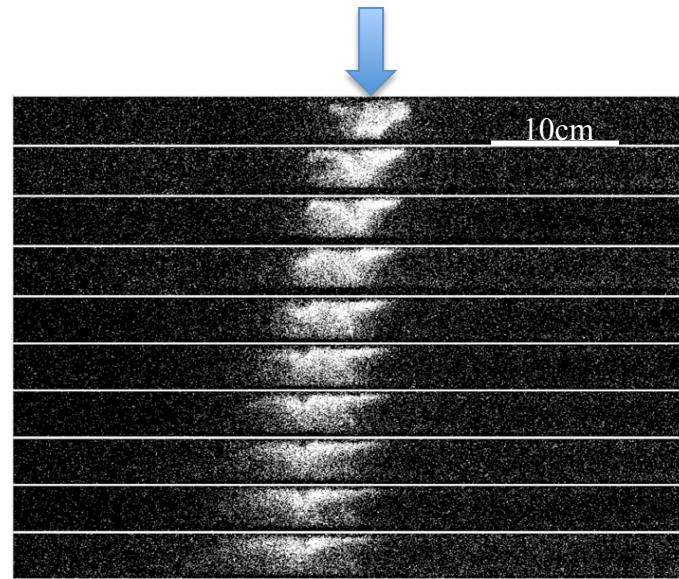


Figure 3-5 : Mouvement des SPIONS en présence de champ magnétique

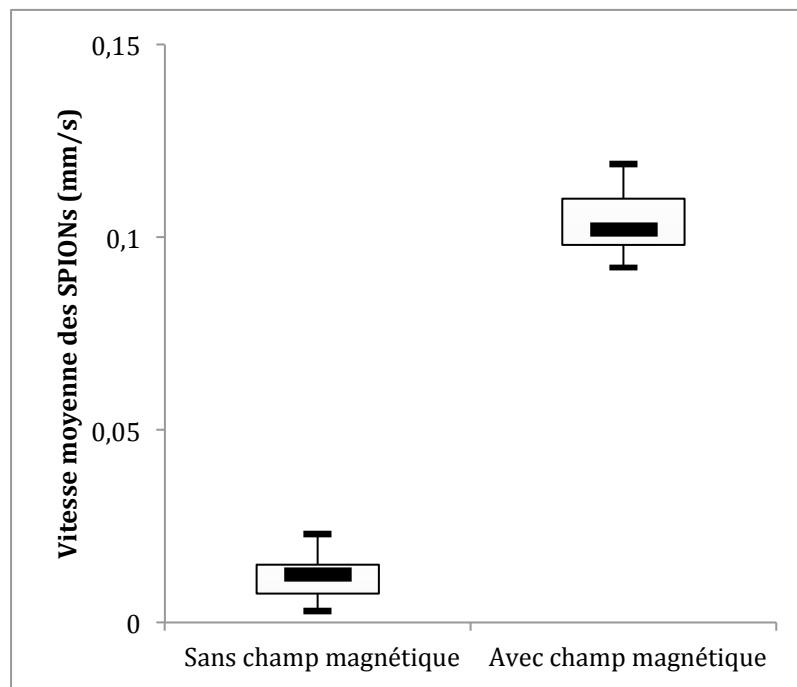


Figure 3-6 : Vitesse moyenne des SPIONS avec et sans champ magnétique

3.4 Interaction entre le LDL et les SPIONS

La mesure de la concentration en LDL se fait par mesure d'absorbance. On soustrait pour chaque échantillon la valeur du blank correspondant.

3.4.1 Courbe de calibration

En connaissant les valeurs des concentrations de différentes solutions calibratrices (0, 1, 12, 60 et 120 mg/mL), on reporte la valeur de l'absorbance relative sur un graphique. La figure 4-7 montre la courbe obtenue.

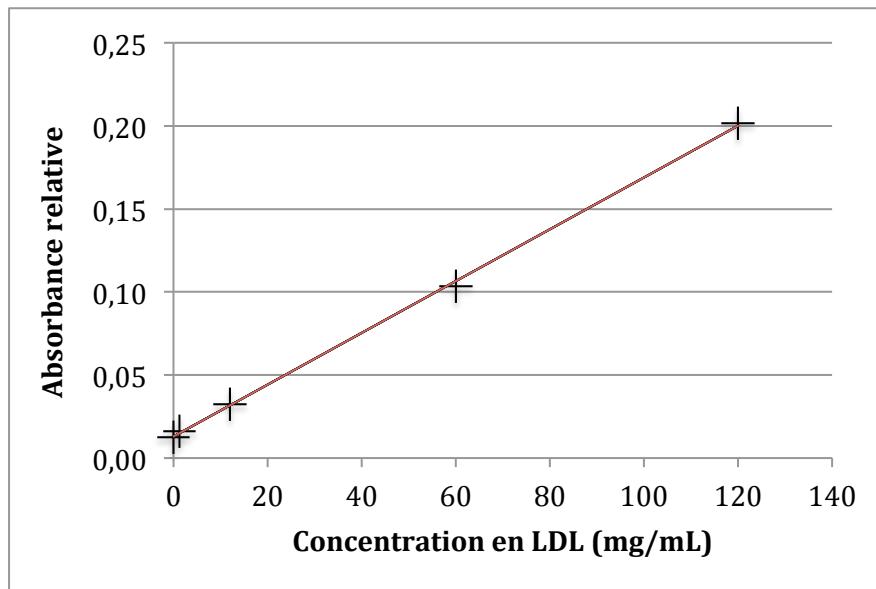


Figure 3-7 : Courbe de calibration pour déterminer la concentration en LDL

Le coefficient de détermination R^2 vaut 0.99947, ce qui est très acceptable. L'équation de la droite est :

$$Ab_{rel} = 0,0016[LDL] + 0,013$$

À l'aide de la mesure de l'absorbance relative, on peut ainsi déterminer la concentration en LDL. La concentration initiale en LDL des deux plasmas de lapin est donnée figure 4-8. Elle est bien plus élevée pour le lapin ayant subi un régime hypercholésteromique, ou « Lapin LDL++ » dans les graphiques (721 ± 50 mg/mL) que pour le lapin sain (14mg/mL).

3.4.2 En l'absence d'anticorps

Les résultats pour le suivi de la concentration de LDL au cours de temps en présence de SPION3 sont présentés figure 4-9. On remarque que pour le lapin sain, la concentration diminue jusqu'à 56 +/-5% au bout de 48h, alors qu'elle atteint un plateau autour de 88% pour le lapin hypercholésteromique.

3.4.3 En présence d'anticorps

Les résultats obtenus pour le suivi de la concentration de LDL au cours du temps en présence de SPION3@AB sont présentés figure 4-10. Pour le lapin sain, la concentration en LDL diminue au cours du temps jusqu'à 59 +/- 5% au bout de 48h. Pour l'autre lapin, elle diminue juste après injection des NPs (66 +/- 5%), puis augmente pour atteindre 77 +/- 5% après 24h.

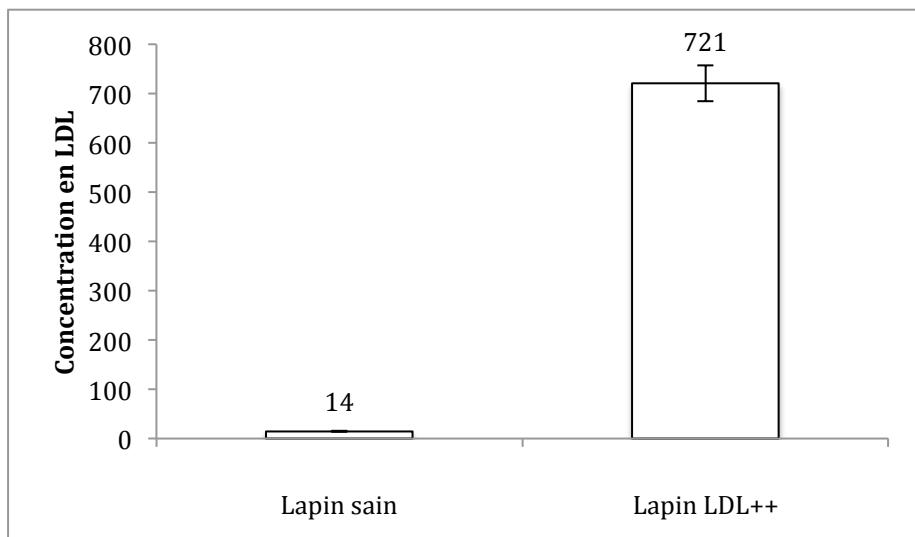


Figure 3-8 : Concentration initiale en LDL dans les échantillons de plasmas

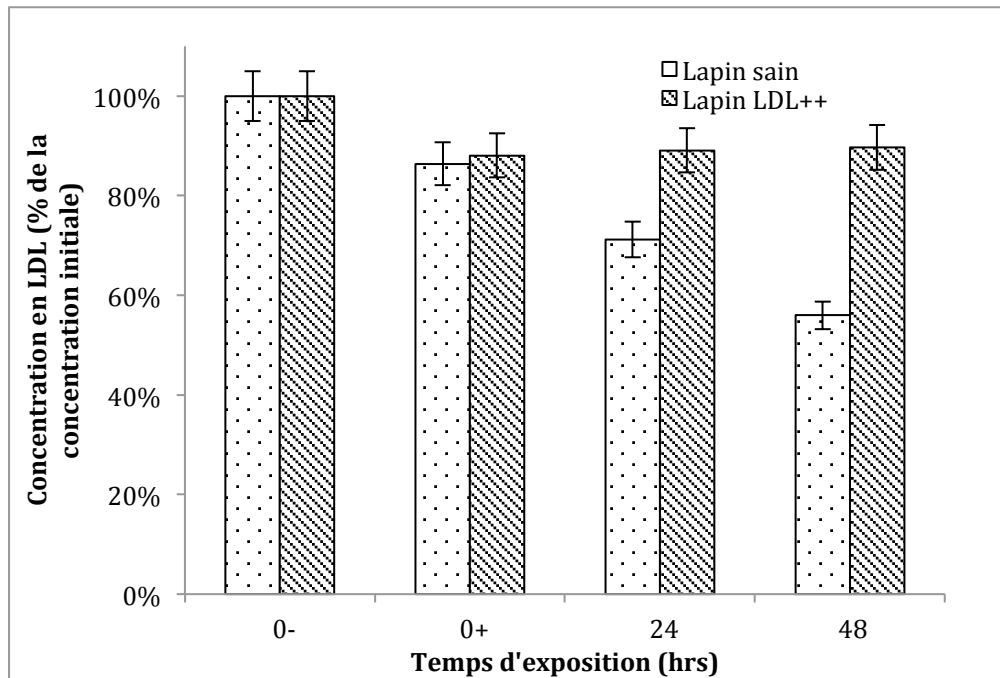


Figure 3-9 : Effet de SPION3 sur l'évolution temporelle de la concentration en LDL

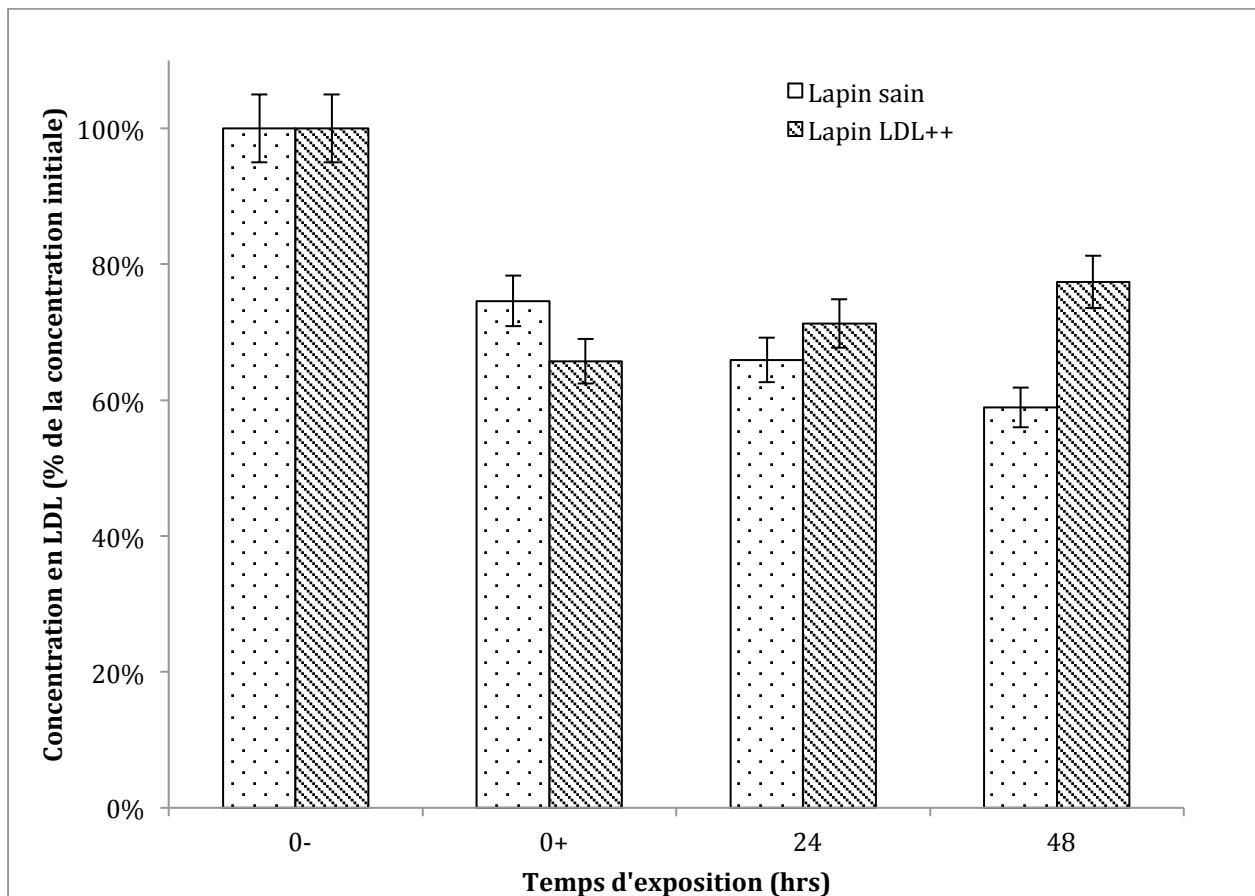


Figure 3-10 : Effet de SPION3@AB sur l'évolution temporelle de la concentration en LDL

CHAPITRE 4 DISCUSSION

4.1 Biocompatibilité

4.1.1 Chimie de surface

Comme annoncé dans le chapitre 3, une viabilité cellulaire acceptable est au delà de 80%. La présence de polymère à la surface de la particule la rend moins toxique. Ceci correspond à ce qui a été vu dans revue de littérature. On observe également une différence entre SPION2 et SPION3 : le groupe caractéristique chimique présent à la surface est donc un facteur induisant plus ou moins de toxicité. Le groupement amine semble être le moins toxique. La constante d'acidité d'un alcool ($K_a=10^{-16}$) est plus faible que celle de l'amine qui existe sous la forme NH_3^+ en solution ($K_a=10^{-10}$). Ce comportement très basique des alcools pourrait être la raison de leur toxicité plus importante.

4.1.2 Agglomération des SPIONs et réactivité de surface

À faibles concentrations (0.1mg/mL), les nanoparticules interagissent moins entre elles. Elles se comportent comme si elles étaient seules dans le milieu. Elles peuvent donc interagir avec toutes les biomolécules présentes par adsorption à la surface. Cette réactivité chimique accrue induit davantage de toxicité, car une fois adsorbées à la surface, la fonction des protéines est altérée, et par là-même le phénotype de la cellule change.

À grandes concentrations (1mg/mL), les nanoparticules vont avoir tendance à s'agglomérer par interactions thermodynamiques. Ces agglomérats peuvent atteindre des tailles micrométriques, et interagir directement avec la paroi des cellules pour induire de la toxicité.

4.1.3 Interaction avec le sang

Les tests d'hémocompatibilité réalisés donnent des résultats qui sont en dessous des valeurs pour lesquelles il y a danger pour le sang (20% d'hémolyse et 20% d'activation plaquettaire). On sait pourtant que des molécules du milieu sanguin vont se fixer à la surface des nanoparticules. Il apparaît que malgré ce phénomène, aucune thrombose ni endommagement des globules rouges n'a lieu. On peut l'expliquer par plusieurs hypothèses :

- le nombre de biomolécules qui se fixent à la surface des SPIONs n'est pas suffisant pour perturber l'équilibre biochimique du sang;
- l'équilibre est perturbé mais le sang réagit par une cascade de réactions qui produisent les biomolécules manquantes pour rétablir l'équilibre;
- l'équilibre n'est pas rétabli et les tests réalisés ne nous permettent pas d'avoir les indications en ce sens.

La première hypothèse pourrait être vérifiée en réalisant des tests de caractérisation physico-chimique une fois l'interaction avec le sang terminée, et en déterminant la composition de la corona. Pour vérifier la deuxième hypothèse, il nous faudrait mesurer la concentration de différentes molécules au cours du temps, et observer ou non une rétroaction positive. La dernière hypothèse peut être vérifiée en réalisant les tests complémentaires d'hémocompatibilité : test de coagulation et activation du complément.

4.2 Piège magnétique

4.2.1 Diffusion de particules

Après injection des SPIONs, ceux-ci sont à la fois soumis à la force magnétique, mais également à la diffusion à l'intérieur du liquide :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$$

où D est le coefficient de diffusion des NPs dans l'eau. La solution générale de cette équation est :

$$c(x, t) = \frac{c_0}{S(4\pi Dt)^{1/2}} \exp\left(\frac{-x^2}{4Dt}\right)$$

où S est la surface des NPs et c_0 la concentration initiale. Il s'agit d'une gaussienne centrée en 0, dont la largeur augmente au cours du temps. Le centre du paquet ne bouge pas si aucune force extérieure ne s'applique.

De plus, le calcul de la vitesse à l'aide de l'équation (3) donne $v \approx 0.2 \text{ mm/s}$, donc les expériences semblent confirmer la théorie. Le facteur 2 peut être expliqué en considérant les

interactions entre particules, qui leur font perdre de l'énergie. Il faut donc s'attendre à ce que les particules se dispersent dans le milieu. Un effet de diffusion ($l>1\text{cm}$) est observable après environ (avec $D=10^{-9}$) :

$$\tau \approx \frac{l^2}{D} = 10^4\text{s} \approx 3h$$

ce qui n'est pas observable dans l'application voulue (un délai de l'ordre d'une minute entre l'injection et la récupération des SPIONs).

4.2.2 Séparation magnétique

Bien que facilement calculables, les valeurs du gradient de champ magnétique créé avec les deux bobines électriques utilisées sont inférieures à celles retrouvées près d'un aimant commercial. L'efficacité d'un piège magnétique situé *ex vivo* est donc démontrée. Pour savoir si le traitement est plus efficace que les traitements actuels (statines, plasmaphérèse), il est important de comparer la réduction du LDL, ce que nous faisons à la partie suivante.

4.3 Réduction du LDL

4.3.1 Interaction non-spécifique

On parle d'interaction non-spécifique lorsqu'aucun complexe spécifique entre un anticorps et son antigène ne se forme. Le LDL s'attache aux SPIONs malgré l'absence d'anticorps car sa concentration diminue au cours du temps. À la surface de la particule, il entre en compétition avec plusieurs autres biomolécules, comme le HDL. Par effet Vroman, les molécules les plus rapides ou en plus grande quantité vont se fixer en premier à la surface. Elles seront ensuite remplacées par celles qui ont davantage d'affinité avec la surface. Le fait que la concentration continue à diminuer pour le plasma de lapin sain montre que le LDL continue à se fixer à la surface des SPIONs. Il remplace donc d'autres molécules et on peut dire que son affinité avec la surface est grande. Tant qu'il y a des sites non occupés par du LDL sur les nanoparticules, ce dernier va s'y greffer. On peut cependant s'attendre qu'au bout d'un certain temps, tous les sites soient occupés. C'est ce qu'il se passe dans le deuxième cas : la grande concentration initiale en LDL induit une fixation plus rapide du LDL sur les SPIONs, ainsi que la saturation des sites accepteurs de LDL, d'où l'observation d'un plateau.

4.3.2 Interaction spécifique

On parle d'interaction spécifique avec le LDL lorsqu'un anticorps anti-LDL se fixe au LDL. Lorsqu'on injecte des SPION3@AB dans le plasma sanguin, les interactions spécifiques et non spécifiques ont lieu : le LDL peut se fixer à l'anticorps mais aussi s'adsorber à la surface, comme dans le cas précédent. Afin d'obtenir les résultats correspondant uniquement à l'interaction spécifique, nous devons soustraire à ces derniers résultats ceux obtenus précédemment avec l'injection de SPION3. Nous obtenons alors le graphique présenté en figure 5-1. On remarque alors le même comportement quelque soit le plasma : une diminution après injection des SPIONs, puis une augmentation jusqu'à 100% et 90% respectivement. Le LDL est donc relâché dans le plasma progressivement au cours du temps. La liaison avec les particules n'est donc pas très forte, mais la cinétique de libération du LDL n'est pas grande (50% des LDL attrapés au départ sont relâchés après 48h). On peut faire ici deux hypothèses :

- soit la liaison SPION3-AB est faible compte tenu de la méthode de préparation. Dans ce cas, le complexe AB@LDL est relâché, et la méthode colorimétrique de détection du LDL est tout de même efficace sur ce complexe.
- soit la liaison AB-LDL est faible. Dans ce cas, le LDL seul est libéré. Cette situation n'est pas censée se produire, puisque les anticorps sont fournis par l'industrie.

4.3.3 Traitement de l'athérosclérose

Des deux effets (spécifiques et non-spécifiques) combinés, nous obtenons une réduction de 34% du cholestérol pour le lapin malade (concentration initiale de 720mg/mL et concentration après interaction de 470mg/mL). Si on attend 24h ou 48h, on remarque que le LDL est relâché dans le plasma. La meilleure efficacité du traitement est donc obtenue après quelques minutes d'interaction.

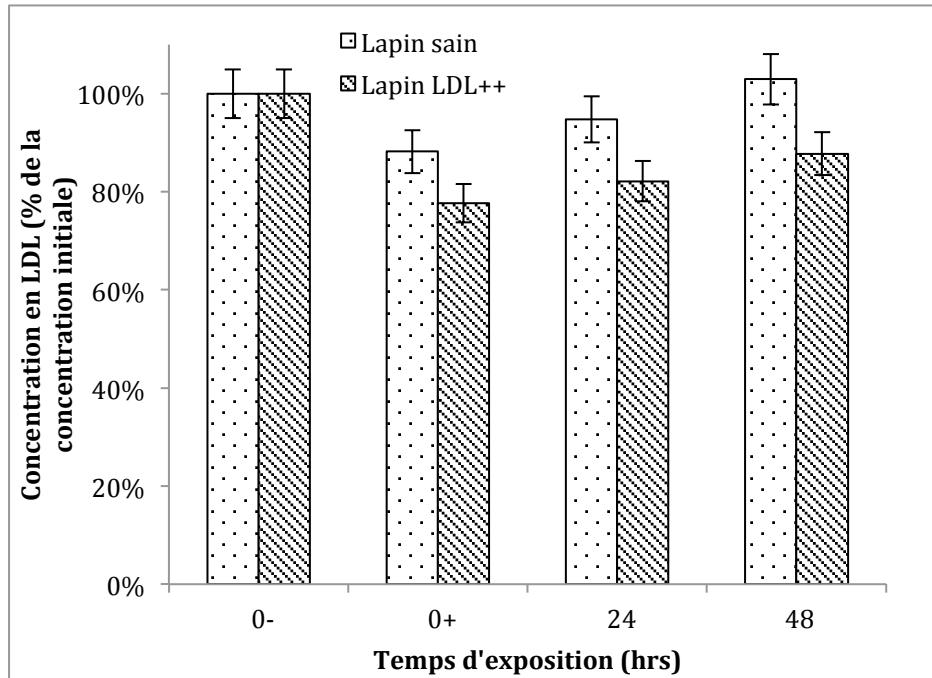


Figure 4-1 : Effet de l'interaction spécifique anti-LDL/LDL sur l'évolution temporelle de la concentration en LDL

Lors de l'expérience réalisée, une seule injection de nanoparticules a été effectuée dans le plasma. En exploitant cette stratégie, après deux injections, la concentration serait diminuée de 56%, et après trois injections, de 71%. Le traitement proposé est donc le suivant :

1. Sélection des patients hypercholésteromique;
2. Réalisation d'un système de circulation du sang *ex vivo* au niveau du bras;
3. Injection de SPION3@AB à 0.5mg/mL puis récupération magnétique immédiate;
4. Lavage des SPIONs;
5. Répétitions des étapes 3 et 4.

CHAPITRE 5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Synthèse des travaux effectués

Les travaux de recherche effectués au sein du Laboratoire d’Innovation et d’Analyse de Bio-performances ont permis de dégager des éléments scientifiques pour appuyer la thèse d’un potentiel nouveau traitement contre l’athérosclérose. La stratégie mise en avant est de réaliser une injection de nanoparticules d’oxyde de fer superparamagnétiques directement dans le sang par un système *ex vivo* afin de diminuer la quantité de mauvais cholestérol (LDL), responsable du développement de la maladie. Nous avons vérifié nos hypothèses scientifiques initiales : nous avons démontré que les SPIONs utilisés ne sont pas toxiques, n’induisent pas de thrombose ni d’hémolyse dans le sang. De plus, ils sont manipulables dans des champs magnétiques, donc récupérables après injection. Enfin, la présence d’un anticorps anti-LDL à la surface permet de diminuer la concentration en LDL d’un plasma riche en cholestérol de 34%, ce qui laisse espérer une diminution de 71% après trois injections successives, ce qui est bien plus efficace qu’un traitement à base de statines dont les effets secondaires sont nombreux¹⁸. Nous avons mis en place des protocoles inédits qui permettent à la fois de suivre le mouvement des particules dans un champ magnétique par fluorescence, mais également de suivre dans le temps l’évolution de la concentration en LDL dans du plasma sanguin. Ces protocoles peuvent être utilisés pour continuer les recherches sur cette stratégie de traitement innovante. Pour terminer le développement complet de cette stratégie, plusieurs études complémentaires sont nécessaires.

Biocompatibilité

Tout d’abord, il faut s’assurer que les particules n’induisent pas d’activation du complément dans le sang, ni de coagulation. Il est également nécessaire de réaliser des tests pour évaluer la compatibilité de l’action de champs magnétiques forts sur le sang et les cellules. Il a été démontré que l’utilisation de champs magnétiques sur des souris pouvait induire des modifications de la mobilité des spermatozoïdes et de la composition du sperme⁷⁹.

Outre des tests *ex vivo*, il faut appliquer le traitement sur des modèles animaux et réaliser une étude de biodistribution pour déterminer si les particules se retrouvent au niveau de différents organes et si elles y induisent de la toxicité.

Efficacité du complexe NP@LDL

Nous avons vu qu'avec le temps, la liaison entre la particule et le LDL se brise. Un travail de chimiste s'impose pour améliorer la qualité de celle-ci, par exemple en réalisant une liaison peptidique entre plusieurs sites réactifs de l'anticorps et la nanoparticule. On peut aussi penser à augmenter la densité d'anticorps présents à la surface.

Efficacité du piège magnétique

Le design du piège magnétique demande un travail important. Le fluide étant en mouvement dans un système *ex vivo*, il faut que le piège soit très efficace. Deux manières d'augmenter l'efficacité d'un piège sont :

- augmenter la taille de la zone d'action du piège. Pour cela, on peut penser à un circuit qui réalise plusieurs circonvolutions à l'intérieur d'une zone limitée par deux aimants de polarités opposées.
- augmenter la force du piège à chaque position. La force hydraulique a tendance à vouloir emporter les NPs dans le fluide. Pour les retenir, la force magnétique seule doit être très élevée. Il est possible de diversifier les forces qui retiennent les nanoparticules, par exemple en les confinant dans des microcavités.

Le problème principal posé par un design à l'échelle mili- ou micrométrique est l'apparition de thrombus. En effet, les zones dans lesquelles le *stress shielding* est important sont propices à une inflammation locale dans le sang. Il faut donc limiter au maximum ces structures toxiques.

Réutilisabilité

Si les tests de caractérisation physico chimique révèlent que la liaison anticorps-LDL est faible, alors une méthode pour récupérer les nanoparticules est de les laisser en solution et attendre la décomplexation entre l'anticorps et son antigène. Si, au contraire, c'est la liaison SPION-anticorps qui est faible, il faut la renforcer et appliquer les méthodes classiques (précipitation par le sulfate d'ammonium suivie d'une électrophorèse⁸⁰ par exemple) de séparation anticorps-antigène. Dans les deux situations, il est alors possible de réutiliser les nanoparticules et de diminuer grandement le coût du dispositif.

Étude clinique

Après avoir testé notre technologie sur des animaux, et pour finaliser le développement de la stratégie de traitement de l'athérosclérose, il faut réaliser une étude clinique randomisée. La moitié des patients serait soumise soit à l'injection de nanoparticules dans un système *ex vivo*, soit à l'injection d'un placebo. En comparaison, la deuxième moitié serait soumise à un traitement classique à base de statines ou de son placebo. Une étude statistique serait utilisée pour démontrer l'efficacité de la diminution de la concentration en LDL dans le sang, en mesurant par exemple le nombre d'événements cardiovasculaires et la présence de plaques athérosclérotiques.

LISTE DE RÉFÉRENCES

1. Von Eckardstein, A. (Ed.). (2006). Atherosclerosis: diet and drugs (Vol. 170). Springer Science & Business Media.
2. Kaur, S. C. (2006). Biochemistry of atherosclerosis (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
3. Muhlestein, J. B., Anderson, J. L., Hammond, E. H., Zhao, L., Trehan, S., Schwobe, E. P., & Carlquist, J. F. (1998). Infection with Chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation*, 97(7), 633-636.
4. Melnick, J. L., Adam, E., & DeBakey, M. E. (1990). Possible role of cytomegalovirus in atherogenesis. *Jama*, 263(16), 2204-2207.
5. Chiu, B., Viira, E., Tucker, W., & Fong, I. W. (1997). Chlamydia pneumoniae, cytomegalovirus, and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation*, 96(7), 2144-2148.
6. Ameriso, S. F., Fridman, E. A., Leiguarda, R. C., & Sevlever, G. E. (2001). Detection of Helicobacter pylori in human carotid atherosclerotic plaques. *Stroke*, 32(2), 385-391.
7. Bonetti, P. O., Lerman, L. O., & Lerman, A. (2003). Endothelial dysfunction a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(2), 168-175.
8. Brouet, A., Sonveaux, P., Dessimoz, C., Balligand, J. L., & Feron, O. (2001). Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(35), 32663-32669.
9. Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105(9), 1135-1143.
10. Cai, H., & Harrison, D. G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research*, 87(10), 840-844.
11. Cushing, S. D., Berliner, J. A., Valente, A. J., Territo, M. C., Navab, M., Parhami, F., ... & Fogelman, A. M. (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(13), 5134-5138.
12. Ma, H., & Kovanen, P. T. (1997). Degranulation of cutaneous mast cells induces transendothelial transport and local accumulation of plasma LDL in rat skin in vivo. *Journal of lipid research*, 38(9), 1877-1887.
13. Hamilton, J. A., Myers, D., Jessup, W., Cochrane, F., Byrne, R., Whitty, G., & Moss, S. (1999). Oxidized LDL can induce macrophage survival, DNA synthesis, and enhanced proliferative response to CSF-1 and GM-CSF. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(1), 98-105.
14. Li, A. C., & Glass, C. K. (2002). The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature medicine*, 8(11), 1235-1242.
15. <http://segeremma.blogspot.ca/2013/03/how-lld-and-hdl-differ-structurally-and.html>
16. von Eckardstein, A. (Ed.). (2006). Atherosclerosis: diet and drugs (Vol. 170). Springer Science & Business Media.

17. Stone, N. J., Merz, C. N. B., ScM, F. A. C. C., Blum, F. C. B., McBride, F. P., Eckel, F. R. H., ... & Shero, F. S. T. (2013). 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults.
18. Thompson, P. D., Clarkson, P. M., & Rosenson, R. S. (2006). An assessment of statin safety by muscle experts. *The American journal of cardiology*, 97(8), S69-S76.
19. Tamai, O., Matsuoka, H., Itabe, H., Wada, Y., Kohno, K., & Imaizumi, T. (1997). Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation*, 95(1), 76-82.
20. ASTM Standard E2456, 2006, "Standard Terminology Relating to Nanotechnology," ASTM International, West Conshohocken, PA, 2006, DOI: 10.1520/E2456-06, www.astm.org.
21. ISO/TS 80004-8:2013. Nanotechnologies – Vocabulary. Part 8: Nanomanufacturing processes. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2013.
22. Tahara, K., Sakai, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Hirashima, N., & Kawashima, Y. (2009). Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells. *International journal of pharmaceutics*, 382(1), 198-204.
23. Romero, G., Estrela-Lopis, I., Zhou, J., Rojas, E., Franco, A., Espinel, C. S., ... & Moya, S. E. (2010). Surface Engineered Poly (lactide-co-glycolide) Nanoparticles for Intracellular Delivery: Uptake and Cytotoxicity A Confocal Raman Microscopic Study. *Biomacromolecules*, 11(11), 2993-2999.
24. Greenwood, N. N., & Earnshaw, A. (2012). Chemistry of the Elements. Elsevier.
25. Itoh, H., & Sugimoto, T. (2003). Systematic control of size, shape, structure, and magnetic properties of uniform magnetite and maghemite particles. *Journal of colloid and interface science*, 265(2), 283-295.
26. Amemiya, Y., Arakaki, A., Staniland, S. S., Tanaka, T., & Matsunaga, T. (2007). Controlled formation of magnetite crystal by partial oxidation of ferrous hydroxide in the presence of recombinant magnetotactic bacterial protein Mms6. *Biomaterials*, 28(35), 5381-5389.
27. Wu, J. H., Ko, S. P., Liu, H. L., Kim, S., Ju, J. S., & Kim, Y. K. (2007). Sub 5 nm magnetite nanoparticles: Synthesis, microstructure, and magnetic properties. *Materials Letters*, 61(14), 3124-3129.
28. Bakare, P. P., Date, S. K., Khollam, Y. B., Deshpande, S. B., Potdar, H. S., Salunke-Gawali, S., ... & Pereira, E. (2006). Mössbauer effect studies on the formation of iron oxide phases synthesized via microwave–hydrothermal route. *Hyperfine interactions*, 168(1-3), 1127-1132.
29. Salazar-Alvarez, G., Muhammed, M., & Zagorodni, A. A. (2006). Novel flow injection synthesis of iron oxide nanoparticles with narrow size distribution. *Chemical engineering science*, 61(14), 4625-4633.
30. Cabrera, L., Gutierrez, S., Menendez, N., Morales, M. P., & Herrasti, P. (2008). Magnetite nanoparticles: electrochemical synthesis and characterization. *Electrochimica Acta*, 53(8), 3436-3441.
31. Strobel, R., & Pratsinis, S. E. (2009). Direct synthesis of maghemite, magnetite and wustite nanoparticles by flame spray pyrolysis. *Advanced Powder Technology*, 20(2), 190-194.
32. Enomoto, N., Akagi, J. I., & Nakagawa, Z. E. (1996). Sonochemical powder processing of iron hydroxides. *Ultrasonics sonochemistry*, 3(2), S97-S103.
33. Lam, U. T., Mammucari, R., Suzuki, K., & Foster, N. R. (2008). Processing of iron oxide nanoparticles by supercritical fluids. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(3), 599-614.

34. Bakar, M. A., Tan, W. L., & Bakar, N. A. (2007). A simple synthesis of size-reduce magnetite nanocrystals via aqueous to toluene phase-transfer method. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 314(1), 1-6.
35. King, J. G., Williams, W., Wilkinson, C. D. W., McVitie, S., & Chapman, J. N. (1996). Magnetic properties of magnetite arrays produced by the method of electron beam lithography. *Geophysical research letters*, 23(20), 2847-2850.
36. Mathur, S., Barth, S., Werner, U., Hernandez-Ramirez, F., & Romano-Rodriguez, A. (2008). Chemical Vapor Growth of One-dimensional Magnetite Nanostructures. *Advanced Materials*, 20(8), 1550-1554.
37. Moon, J. W., Roh, Y., Lauf, R. J., Vali, H., Yeary, L. W., & Phelps, T. J. (2007). Microbial preparation of metal-substituted magnetite nanoparticles. *Journal of microbiological methods*, 70(1), 150-158.
38. Yu, H., Chen, M., Rice, P. M., Wang, S. X., White, R. L., & Sun, S. (2005). Dumbbell-like bifunctional Au-Fe₃O₄ nanoparticles. *Nano letters*, 5(2), 379-382.
39. Lu, Y., Yin, Y., Mayers, B. T., & Xia, Y. (2002). Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach. *Nano letters*, 2(3), 183-186.
40. Berry, C. C., Wells, S., Charles, S., & Curtis, A. S. (2003). Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 24(25), 4551-4557.
41. Varadan, V. K., Chen, L., & Xie, J. (2008). Nanomedicine: design and applications of magnetic nanomaterials, nanosensors and nanosystems. John Wiley & Sons.
42. Tassa, C., Shaw, S. Y., & Weissleder, R. (2011). Dextran-coated iron oxide nanoparticles: a versatile platform for targeted molecular imaging, molecular diagnostics, and therapy. *Accounts of chemical research*, 44(10), 842-852.
43. Gallo, J., Long, N. J., & Aboagye, E. O. (2013). Magnetic nanoparticles as contrast agents in the diagnosis and treatment of cancer. *Chemical Society Reviews*, 42(19), 7816-7833.
44. Katz, E., Sheeney-Haj-Ichia, L., & Willner, I. (2002). Magneto-Switchable Electrocatalytic and Bioelectrocatalytic Transformations. *Chemistry-a European Journal*, 8(18), 4138-4148.
45. Perez, J. M., Simeone, F. J., Saeki, Y., Josephson, L., & Weissleder, R. (2003). Viral-induced self-assembly of magnetic nanoparticles allows the detection of viral particles in biological media. *Journal of the American Chemical Society*, 125(34), 10192-10193.
46. Gilchrist, R. K., Medal, R., Shorey, W. D., Hanselman, R. C., Parrott, J. C., & Taylor, C. B. (1957). Selective inductive heating of lymph nodes. *Annals of surgery*, 146(4), 596.
47. Huber, D. L. (2005). Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small*, 1(5), 482-501.
48. Maeda, H. (2010). Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjugate chemistry*, 21(5), 797-802.
49. Fortin, J. P., Wilhelm, C., Servais, J., Ménager, C., Bacri, J. C., & Gazeau, F. (2007). Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *Journal of the American Chemical Society*, 129(9), 2628-2635.
50. Hayashi, K., Ono, K., Suzuki, H., Sawada, M., Moriya, M., Sakamoto, W., & Yogo, T. (2010). High-frequency, magnetic-field-responsive drug release from magnetic nanoparticle/organic hybrid based on hyperthermic effect. *ACS applied materials & interfaces*, 2(7), 1903-1911.
51. Cullity, B. D., & Graham, C. D. (2011). *Introduction to magnetic materials*. John Wiley & Sons.

52. Bean, C. P., & Livingston, J. D. (1959). Superparamagnetism. *Journal of Applied Physics*, 30(4), S120-S129.
53. Mathieu, J. B., Martel, S., Yahia, L. H., Soulez, G., & Beaudoin, G. (2003, September). MRI systems as a mean of propulsion for a microdevice in blood vessels. In *Engineering in Medicine and Biology Society, 2003. Proceedings of the 25th Annual International Conference of the IEEE* (Vol. 4, pp. 3419-3422). IEEE.
54. Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., & Dobson, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*, 36(13), R167.
55. Schaller, V., Kräling, U., Rusu, C., Petersson, K., Wipenmyr, J., Krozer, A., ... & Johansson, C. (2008). Motion of nanometer sized magnetic particles in a magnetic field gradient. *Journal of Applied Physics*, 104(9), 093918.
56. Sharma, S., Katiyar, V. K., & Singh, U. (2015). Mathematical modelling for trajectories of magnetic nanoparticles in a blood vessel under magnetic field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 379, 102-107.
57. Lee, C. S., Lee, H., & Westervelt, R. M. (2001). Microelectromagnets for the control of magnetic nanoparticles. *Applied physics letters*, 79(20), 3308-3310.
58. Wael, B. A., Malek, A., & Aziz, C. (2014). Hydrodynamic motion of magnetic particles in a Poiseuille flow. *European Journal of Mechanics-B/Fluids*, 43, 57-64.
59. Haverkort, J. W., Kenjereš, S., & Kleijn, C. R. (2009). Magnetic particle motion in a Poiseuille flow. *Physical Review E*, 80(1), 016302.
60. Ma, M., Wu, Y., Zhou, J., Sun, Y., Zhang, Y., & Gu, N. (2004). Size dependence of specific power absorption of Fe₃O₄ particles in AC magnetic field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 268(1), 33-39.
61. Bruce, I. J., & Sen, T. (2005). Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxy silanes and their application in magnetic bioseparations. *Langmuir*, 21(15), 7029-7035.
62. Smith, G. E., & Dawson, W. R. (1924). Egyptian mummies. G. Allen & Unwin, Ltd..
63. Ratner, B. D. (Ed.). (2004). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Academic press.
64. Nyström, A. M., & Fadeel, B. (2012). Safety assessment of nanomaterials: implications for nanomedicine. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 403-408.
65. HOŠEK, J. NANOTECHNOLOGY TECHNICAL STANDARTIZATION REVIEW.
66. Puzyn, T., Rasulev, B., Gajewicz, A., Hu, X., Dasari, T. P., Michalkova, A., ... & Leszczynski, J. (2011). Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles. *Nature nanotechnology*, 6(3), 175-178.
67. França, R., Zhang, X. F., Veres, T., L'H, Y., & Sacher, E. (2013). Core-shell nanoparticles as prodrugs: Possible cytotoxicological and biomedical impacts of batch-to-batch inconsistencies. *Journal of colloid and interface science*, 389(1), 292-297.
68. Chalmers, J. J., Lara-Velasco, O. R., Tong, X., Zborowski, M., Moore, L. R., & Farag, S. S. (2007). U.S. Patent Application 12/514,618.
69. Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., Shokrgozar, M. A., Milani, A. S., Häfeli, U. O., & Stroeve, P. (2010). A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 300-309.

70. Mbeh, D. A., França, R., Merhi, Y., Zhang, X. F., Veres, T., Sacher, E., & Yahia, L. (2012). In vitro biocompatibility assessment of functionalized magnetite nanoparticles: Biological and cytotoxicological effects. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(6), 1637-1646.
71. Mahmoudi, M., Simchi, A., Milani, A. S., & Stroeve, P. (2009). Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 336(2), 510-518.
72. Hong, S. C., Lee, J. H., Lee, J., Kim, H. Y., Park, J. Y., Cho, J., ... & Han, D. W. (2011). Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *International journal of nanomedicine*, 6, 3219.
73. Boncler, M., Różalski, M., Krajewska, U., Podścdek, A., & Watala, C. (2014). Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 69(1), 9-16.
74. Mbeh, D. A., Javanbakht, T., Tabet, L., Merhi, Y., Maghni, K., Sacher, E., & Yahia, L. H. (2015). Protein Corona Formation on Magnetite Nanoparticles: Effects of Culture Medium Composition, and Its Consequences on Superparamagnetic Nanoparticle Cytotoxicity. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(5), 828-840.
75. Moersdorf, D., Hugounenq, P., Phuoc, L. T., Mamlouk-Chaouachi, H., Felder-Flesch, D., Begin-Colin, S., ... & Bernhardt, I. (2010). Influence of magnetic iron oxide nanoparticles on red blood cells and Caco-2 cells.
76. Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., & Hafeli, U. O. (2009). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles with rigid cross-linked polyethylene glycol fumarate coating for application in imaging and drug delivery. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(19), 8124-8131.
77. Molina, M. M., Seabra, A. B., De Oliveira, M. G., Itri, R., & Haddad, P. S. (2013). Nitric oxide donor superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 33(2), 746-751.
78. Buja, L. M., Kita, T., Goldstein, J. L., Watanabe, Y., & Brown, M. S. (1983). Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 3(1), 87-101.
79. Ramadan, L. A., Abd-Allah, A. R., Aly, H. A., & Saad-El-Din, A. A. (2002). Testicular toxicity effects of magnetic field exposure and prophylactic role of coenzyme Q10 and L-carnitine in mice. *Pharmacological research*, 46(4), 363-370.
80. Northrop, J. H. (1942). Purification and crystallization of diphtheria antitoxin. *The Journal of general physiology*, 25(3), 465-485.

ANNEXES

ANNEXE A – PROTOCOLE POUR LE PASSAGE CELLULAIRE

1. Prendre la flasque contenant les cellules et vérifier la confluence soit par microscopie, soit à travers la lumière, et la mettre dans l'enceinte stérile, après l'avoir nettoyée à l'éthanol 70% ;
2. Vider le contenu de la flasque dans un bécher réservé aux déchets liquides ;
3. Prélever 5 ml de PBS1X stérile et l'ajouter dans la flasque, du côté opposé au feuillet cellulaire pour ne pas l'abîmer ;
4. Repartir le PBS1X sur le feuillet cellulaire, puis vider le contenu de la flasque dans le bécher réservé aux déchets liquide ;
5. Répéter ce lavage une deuxième fois ;
6. Prélever 2 ml de trypsine, selon la confluence, et l'ajouter du côté opposé au feuillet cellulaire stérile, répartir la trypsine, puis déposer la flasque dans l'incubateur réservé aux cellules (37°C, 5% de CO₂) et incuber pendant 2 minutes (Si les cellules sont laissées trop longtemps dans la trypsine, elles finissent pas mourir, car la trypsine dégrade la membrane cellulaire) ;
7. Sortir le tube de l'incubateur, taper un peu sur le côté de la flasque et regarder au microscope si les cellules flottent ;
8. Ajouter 2 ml de milieu de culture contenant 10% de FBS (le même volume que la trypsine) du côté opposé au feuillet cellulaire stérile ;
9. Prélever, avec une pipette, tout le volume (Milieu complet, trypsine, cellules) et mettre dans un tube stérile de 15 ml ;
10. Centrifuger le mélange contenu dans le tube de 15 ml à 400 rcf pendant 3 minutes ;
11. Enlever le milieu et resuspendre le culot soit en grattant le tube sur la grille de l'enceinte ou en faisant des « up and down » avec une p1000 ;
12. Ajouter 2 ml de milieu complet et bien mélanger ;
13. Prélever 100 µl avec une p200 et mettre dans un eppendorf ;
14. Ajouter 20 µl de bleu trypan dans les 100 µl de cellules ;
15. Mélanger les cellules et le bleu trypan en faisant des « up and down » ;
16. Déposer 10µl du mélange dans l'hématocytomètre, recouvert d'une lamelle ;
17. Faire le compte cellulaire ;
18. Calculer le volume à prélever pour avoir le nombre de cellules voulu.

ANNEXE B – PROTOCOLE POUR LE TEST AU PRESTO BLEU

Premier jour : culture cellulaire

1. À l'issu du passage des cellules, obtenir les cellules en suspension ;
2. Calculer V_p le volume total de solution cellulaire à prélever
 - Nombre de puits : 40
 - Volume par puit : 100 μ L
 - Volume total final : $40 \times 100\mu\text{L} \rightarrow 5\text{mL}$
 - Nombre de cellules par puit : 5.000
 - Concentration finale : $5.000 / 0.1 = 50.000 \text{ cells/mL}$
 - Ex (avec $C_i = 2\,000\,000 \text{ cells/mL}$) Volume à prélever : $C_f \times V_f / C_i = 125\mu\text{L}$
3. Dans un tube adapté (15mL) insérer un volume ($V_f - V_p$) de milieu de culture + un volume V_p de la suspension cellulaire obtenue précédemment ;
4. Remplir les puits avec 100 μ L de cette solution ;
5. Incuber à 37°C pendant 24h.

Deuxième jour : traitement avec NPs

1. Préparer les suspensions de NPs dans du milieu de culture DMEM + 5% FBS aux concentrations : $C_1=1\text{mg/mL}$, $C_2=0.1\text{mg/mL}$, $C_3=0.01\text{mg/mL}$;
2. Préparer les suspensions de CDs dans du milieu de culture DMEM + 5% FBS à la concentration : $C=0.5\text{mg/mL}$;
3. Soniquer pendant 1h pour éviter les agrégats ;
4. Retirer les sur-nageants de chaque puit ;
5. Remplir chaque puit avec la solution correspondante ;
6. Incuber à 37°C pendant 24h.

Troisième jour : traitement avec le Presto Bleu

1. Prendre le Presto Bleu dans le 1 frigo en entrant dans le lab ;
2. Dans la salle de manipulation, éteindre les lumières ;
3. Prélever 440 μ L de Presto Bleu et le protéger de la lumière ;
4. Ajouter 10 μ L de presto bleu dans chaque puits (sans enlever le surnageant) ;
5. Couvrir pour protéger de la lumière ;
6. Incuber 30min à 37°C ;
7. Lire la fluorescence à l'aide du spectromètre.

ANNEXE C – PROTOCOLE POUR LE TEST D'HÉMOLYSE

On teste l'hémolyse en testant la lyse des globules rouges.

1. Numérotter les eppendorf (en duplicita):
 - 1** : 0% de lyse (Temoin)
 - 2** : 100 % de lyse (Control positif)
 - 3** : lyse partielle
 - 4** : échantillon 1, 20 µg/ml
 - 5** : échantillon 1, 50 µg/ml
 - 6** : échantillon 1, 100 µg/ml
 - 7** : échantillon 2, 20 µg/ml
 - 8** : échantillon 2, 50 µg/ml
 - 9** : échantillon 2, 100 µg/ml
2. Centrifuger le sang (700 rpm, 10min, fast à la température ambiante) et récupérer les globules rouges en enlevant le plasma et les globules blancs ;
3. Mettre la saline au bain marie ‘a 37° ;
4. Prélever 1ml de RBC ;
5. Prélever 20µL et ajouter à **2**. Ajouter 180µl d'eau ;
6. Ajouter 8ml de saline aux 1ml de RBC ;
7. Dans chaque eppendorf (sauf **2**) ajouter 190µl de RBC dilué
 - Dans **1** ajouter 10µL de RBC dilué
 - Dans **3** ajouter 10µL d'eau
 - Dans **4** ajouter 10µL de l'échantillon 1, C₃
 - Dans **5** ajouter 10µL de l'échantillon 1, C₂
 - Dans **6** ajouter 10µL de l'échantillon 1, C₁
 - Dans **7** ajouter 10µL de l'échantillon 2, C₃
 - Dans **8** ajouter 10µL de l'échantillon 2, C₂
 - Dans **9** ajouter 10µL de l'échantillon 2, C₁
8. Incuber à 37°C avec une agitation légère pendant 30min ;
9. Centrifuger à 700rpm - 1000rpm pendant 5min à 25°C ;
10. Prélever 100 µL de surnageants dans une plaque 96 puits ;
11. Mesurer l'absorbance 541nm.

ANNEXE D – PROTOCOLE POUR LA MESURE DU LDL

1. Numérotter les eppendorfs pour les solutions :

- $S_1^\emptyset(0^-; 0^+; 24h; 48h)$ = Solution 1 sans nanoparticules
- $S_1^{NP}(0^-; 0^+; 24h; 48h)$ = Solution 1 avec SPION3
- $S_1^{NP+AB}(0^-; 0^+; 24h; 48h)$ = Solution 1 avec SPION3@AB
- $S_2^\emptyset(0^-; 0^+; 24h; 48h)$ = Solution 2 sans nanoparticules
- $S_2^{NP}(0^-; 0^+; 24h; 48h)$ = Solution 2 avec SPION3
- $S_2^{NP+AB}(0^-; 0^+; 24h; 48h)$ = Solution 2 avec SPION3@AB

2. Préparer 3x200µL de solutions S_1 (plasma de lapin sain) et S_2 (plasma de lapin hypercholéstéromique) ;
3. Prélever 20µL des 6 solutions et les placer dans $S_i^j(0^-)$ où $i = 1; 2$ et $j = \emptyset; NP; NP + AB$;
4. Ajouter 35mL de SPION3 dans 2 des 190µL restants de S_1 et de S_2 ;
5. Ajouter 35mL de SPION3@AB dans 2 des 190µL restants de S_1 et de S_2 ;
6. Agiter pendant 1 minute puis appliquer un aimant plat sous les solutions ;
7. Prélever 20µL des 6 solutions et les placer dans $S_i^j(0^+)$;
8. Agiter pendant 1 minute puis réserver à température ambiante pendant 24h ;
9. Appliquer un aimant plat sous les solutions puis prélever 20µL des 6 solutions ;
10. Les placer dans $S_i^j(24h)$;
11. Recommencer 7 et 8. Les placer dans $S_i^j(24h)$;
12. Utiliser le kit Wako Compagny pour déterminer la concentration en LDL dans chacun des échantillons.

ANNEXE E – PROTOCOLE POUR LE TEST D’ACTIVATION PLAQUETTAIRE

On teste l’activation des plaquettes en testant l’activation de la protéine Pselectine.

- Numéroter les tubes:
 - 1** : Contrôle négatif (IgG)
 - 2** : Saline
 - 3** : Stimulation des plaquettes (contrôle positif), ADP
 - 4** : échantillon 1, 20 µg/ml
 - 5** : échantillon 1, 50 µg/ml
 - 6** : échantillon 1, 100 µg/ml
 - 7** : échantillon 2, 20 µg/ml
 - 8** : échantillon 2, 50 µg/ml
 - 9** : échantillon 2, 100 µg/ml
- Utiliser le sang au complet non centrifugé ;
- Dans chaque tube ajouter 90µL de sang ;
- Dans tube **1** ajouter 5µL de IgG ;
- Dans chaque tube sauf **1** ajouter 5µL d’anticorps spécifique à la Pselectine (anti-human CD62P-PE antibody)
 - Dans **1** ajouter 5µL de sang
 - Dans **2** ajouter 5µL de sang
 - Dans **3** ajouter 2µL de ADP à 20µM
 - Dans **4** ajouter 5µL de l’échantillon 1, C₃
 - Dans **5** ajouter 5µL de l’échantillon 1, C₂
 - Dans **6** ajouter 5µL de l’échantillon 1, C₁
 - Dans **7** ajouter 5µL de l’échantillon 2, C₃
 - Dans **8** ajouter 5µL de l’échantillon 2, C₂
 - Dans **9** ajouter 5µL de l’échantillon 2, C₁
- Incuber à 37°C pendant 30min ;
- Fixer les solutions avec 900µL de PFA 1% dans chaque tube ;
- Incuber à 25°C pendant 30min ;
- Transférer le contenu des tubes dans des tubes individuels pour cytomètre ;
- Réaliser le FACS au 3^e étage : fixer un seuil de détection et comparer les % de cellules qui dépassent ce seuil ou le Min ou %*Min.

ANNEXE F – PROTOCOLE POUR LA MESURE DE LA CONCENTRATION EN LDL

1. Réaliser les dilutions du calibrateur afin d'obtenir des concentrations de 1, 12, 60 et 120mg/mL ;
2. Prélever 3 μ L de l'échantillon, d'eau distillée et des calibrateurs dans les puits d'une plaque de 96 puits ;
3. Ajouter 279 μ L du réactif 1 ;
4. Agiter et incuber 5 minutes à 37°C ;
5. Mesurer l'absorbance Abs_1 de chaque puit à 600nm (blanks) ;
6. Ajouter 90 μ L du réactif 2 ;
7. Agiter et incuber 5 minutes à 37°C ;
8. Mesurer l'absorbance Abs_2 de chaque puit à 600nm (blanks) ;
9. L'absorbance relative est obtenue par $Abs = Abs_2 - 0.75Abs_1$;
10. Utiliser la courbe de calibration pour déterminer la concentration en LDL.

¹ von Eckardstein, A. (Ed.). (2006). *Atherosclerosis: diet and drugs* (Vol. 170). Springer Science & Business Media.

² Kaur, S. C. (2006). *Biochemistry of atherosclerosis* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.

³ Muhlestein, J. B., Anderson, J. L., Hammond, E. H., Zhao, L., Trehan, S., Schwobe, E. P., & Carlquist, J. F. (1998). Infection with Chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation*, 97(7), 633-636.

⁴ Melnick, J. L., Adam, E., & DeBakey, M. E. (1990). Possible role of cytomegalovirus in atherogenesis. *Jama*, 263(16), 2204-2207.

⁵ Chiu, B., Viira, E., Tucker, W., & Fong, I. W. (1997). Chlamydia pneumoniae, cytomegalovirus, and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation*, 96(7), 2144-2148.

⁶ Ameriso, S. F., Fridman, E. A., Leiguarda, R. C., & Sevlever, G. E. (2001). Detection of Helicobacter pylori in human carotid atherosclerotic plaques. *Stroke*, 32(2), 385-391.

⁷ Bonetti, P. O., Lerman, L. O., & Lerman, A. (2003). Endothelial dysfunction a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(2), 168-175.

⁸ Brouet, A., Sonveaux, P., Dessim, C., Balligand, J. L., & Feron, O. (2001). Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(35), 32663-32669.

⁹ Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105(9), 1135-1143.

¹⁰ Cai, H., & Harrison, D. G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research*, 87(10), 840-844.

¹¹ Cushing, S. D., Berliner, J. A., Valente, A. J., Territo, M. C., Navab, M., Parhami, F., ... & Fogelman, A. M. (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(13), 5134-5138.

¹² Ma, H., & Kovanen, P. T. (1997). Degranulation of cutaneous mast cells induces transendothelial transport and local accumulation of plasma LDL in rat skin in vivo. *Journal of lipid research*, 38(9), 1877-1887.

¹³ Hamilton, J. A., Myers, D., Jessup, W., Cochrane, F., Byrne, R., Whitty, G., & Moss, S. (1999). Oxidized LDL can induce macrophage survival, DNA synthesis, and enhanced proliferative response to CSF-1 and GM-CSF. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(1), 98-105.

¹⁴ Li, A. C., & Glass, C. K. (2002). The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature medicine*, 8(11), 1235-1242.

¹⁵ <http://segeremma.blogspot.ca/2013/03/how-lld-and-hdl-differ-structurally-and.html>

¹⁶ von Eckardstein, A. (Ed.). (2006). *Atherosclerosis: diet and drugs* (Vol. 170). Springer Science & Business Media.

¹⁷ Stone, N. J., Merz, C. N. B., ScM, F. A. C. C., Blum, F. C. B., McBride, F. P., Eckel, F. R. H., ... & Shero, F. S. T. (2013). 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults.

¹⁸ Thompson, P. D., Clarkson, P. M., & Rosenson, R. S. (2006). An assessment of statin safety by muscle experts. *The American journal of cardiology*, 97(8), S69-S76.

¹⁹ Tamai, O., Matsuoka, H., Itabe, H., Wada, Y., Kohno, K., & Imaizumi, T. (1997). Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation*, 95(1), 76-82.

²⁰ ASTM Standard E2456, 2006, "Standard Terminology Relating to Nanotechnology," ASTM International, West Conshohocken, PA, 2006, DOI: 10.1520/E2456-06, www.astm.org.

²¹ ISO/TS 80004-8:2013. Nanotechnologies – Vocabulary. Part 8: Nanomanufacturing processes. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2013.

²² Tahara, K., Sakai, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Hirashima, N., & Kawashima, Y. (2009). Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells. *International journal of pharmaceutics*, 382(1), 198-204.

-
- ²³ Romero, G., Estrela-Lopis, I., Zhou, J., Rojas, E., Franco, A., Espinel, C. S., ... & Moya, S. E. (2010). Surface Engineered Poly (lactide-co-glycolide) Nanoparticles for Intracellular Delivery: Uptake and Cytotoxicity A Confocal Raman Microscopic Study. *Biomacromolecules*, 11(11), 2993-2999.
- ²⁴ Greenwood, N. N., & Earnshaw, A. (2012). *Chemistry of the Elements*. Elsevier.
- ²⁵ Itoh, H., & Sugimoto, T. (2003). Systematic control of size, shape, structure, and magnetic properties of uniform magnetite and maghemite particles. *Journal of colloid and interface science*, 265(2), 283-295.
- ²⁶ Amemiya, Y., Arakaki, A., Staniland, S. S., Tanaka, T., & Matsunaga, T. (2007). Controlled formation of magnetite crystal by partial oxidation of ferrous hydroxide in the presence of recombinant magnetotactic bacterial protein Mms6. *Biomaterials*, 28(35), 5381-5389.
- ²⁷ Wu, J. H., Ko, S. P., Liu, H. L., Kim, S., Ju, J. S., & Kim, Y. K. (2007). Sub 5 nm magnetite nanoparticles: Synthesis, microstructure, and magnetic properties. *Materials Letters*, 61(14), 3124-3129.
- ²⁸ Bakare, P. P., Date, S. K., Khollam, Y. B., Deshpande, S. B., Potdar, H. S., Salunke-Gawali, S., ... & Pereira, E. (2006). Mössbauer effect studies on the formation of iron oxide phases synthesized via microwave–hydrothermal route. *Hyperfine interactions*, 168(1-3), 1127-1132.
- ²⁹ Salazar-Alvarez, G., Muhammed, M., & Zagorodni, A. A. (2006). Novel flow injection synthesis of iron oxide nanoparticles with narrow size distribution. *Chemical engineering science*, 61(14), 4625-4633.
- ³⁰ Cabrera, L., Gutierrez, S., Menendez, N., Morales, M. P., & Herrasti, P. (2008). Magnetite nanoparticles: electrochemical synthesis and characterization. *Electrochimica Acta*, 53(8), 3436-3441.
- ³¹ Strobel, R., & Pratsinis, S. E. (2009). Direct synthesis of maghemite, magnetite and wustite nanoparticles by flame spray pyrolysis. *Advanced Powder Technology*, 20(2), 190-194.
- ³² Enomoto, N., Akagi, J. I., & Nakagawa, Z. E. (1996). Sonochemical powder processing of iron hydroxides. *Ultrasonics sonochemistry*, 3(2), S97-S103.
- ³³ Lam, U. T., Mammucari, R., Suzuki, K., & Foster, N. R. (2008). Processing of iron oxide nanoparticles by supercritical fluids. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(3), 599-614.

-
- ³⁴ Bakar, M. A., Tan, W. L., & Bakar, N. A. (2007). A simple synthesis of size-reduce magnetite nano-crystals via aqueous to toluene phase-transfer method. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 314(1), 1-6.
- ³⁵ King, J. G., Williams, W., Wilkinson, C. D. W., McVitie, S., & Chapman, J. N. (1996). Magnetic properties of magnetite arrays produced by the method of electron beam lithography. *Geophysical research letters*, 23(20), 2847-2850.
- ³⁶ Mathur, S., Barth, S., Werner, U., Hernandez-Ramirez, F., & Romano-Rodriguez, A. (2008). Chemical Vapor Growth of One-dimensional Magnetite Nanostructures. *Advanced Materials*, 20(8), 1550-1554.
- ³⁷ Moon, J. W., Roh, Y., Lauf, R. J., Vali, H., Yeary, L. W., & Phelps, T. J. (2007). Microbial preparation of metal-substituted magnetite nanoparticles. *Journal of microbiological methods*, 70(1), 150-158.
- ³⁸ Yu, H., Chen, M., Rice, P. M., Wang, S. X., White, R. L., & Sun, S. (2005). Dumbbell-like bifunctional Au-Fe₃O₄ nanoparticles. *Nano letters*, 5(2), 379-382.
- ³⁹ Lu, Y., Yin, Y., Mayers, B. T., & Xia, Y. (2002). Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach. *Nano letters*, 2(3), 183-186.
- ⁴⁰ Berry, C. C., Wells, S., Charles, S., & Curtis, A. S. (2003). Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 24(25), 4551-4557.
- ⁴¹ Varadan, V. K., Chen, L., & Xie, J. (2008). *Nanomedicine: design and applications of magnetic nanomaterials, nanosensors and nanosystems*. John Wiley & Sons.
- ⁴² Tassa, C., Shaw, S. Y., & Weissleder, R. (2011). Dextran-coated iron oxide nanoparticles: a versatile platform for targeted molecular imaging, molecular diagnostics, and therapy. *Accounts of chemical research*, 44(10), 842-852.
- ⁴³ Gallo, J., Long, N. J., & Aboagye, E. O. (2013). Magnetic nanoparticles as contrast agents in the diagnosis and treatment of cancer. *Chemical Society Reviews*, 42(19), 7816-7833.
- ⁴⁴ Katz, E., Sheeney-Haj-Ichia, L., & Willner, I. (2002). Magneto-Switchable Electrocatalytic and Bioelectrocatalytic Transformations. *Chemistry-a European Journal*, 8(18), 4138-4148.

-
- ⁴⁵ Perez, J. M., Simeone, F. J., Saeki, Y., Josephson, L., & Weissleder, R. (2003). Viral-induced self-assembly of magnetic nanoparticles allows the detection of viral particles in biological media. *Journal of the American Chemical Society*, 125(34), 10192-10193.
- ⁴⁶ Gilchrist, R. K., Medal, R., Shorey, W. D., Hanselman, R. C., Parrott, J. C., & Taylor, C. B. (1957). Selective inductive heating of lymph nodes. *Annals of surgery*, 146(4), 596.
- ⁴⁷ Huber, D. L. (2005). Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small*, 1(5), 482-501.
- ⁴⁸ Maeda, H. (2010). Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjugate chemistry*, 21(5), 797-802.
- ⁴⁹ Fortin, J. P., Wilhelm, C., Servais, J., Ménager, C., Bacri, J. C., & Gazeau, F. (2007). Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *Journal of the American Chemical Society*, 129(9), 2628-2635.
- ⁵⁰ Hayashi, K., Ono, K., Suzuki, H., Sawada, M., Moriya, M., Sakamoto, W., & Yogo, T. (2010). High-frequency, magnetic-field-responsive drug release from magnetic nanoparticle/organic hybrid based on hyperthermic effect. *ACS applied materials & interfaces*, 2(7), 1903-1911.
- ⁵¹ Cullity, B. D., & Graham, C. D. (2011). *Introduction to magnetic materials*. John Wiley & Sons.
- ⁵² Bean, C. P., & Livingston, J. D. (1959). Superparamagnetism. *Journal of Applied Physics*, 30(4), S120-S129.
- ⁵³ Mathieu, J. B., Martel, S., Yahia, L. H., Soulez, G., & Beaudoin, G. (2003, September). MRI systems as a mean of propulsion for a microdevice in blood vessels. In *Engineering in Medicine and Biology Society, 2003. Proceedings of the 25th Annual International Conference of the IEEE* (Vol. 4, pp. 3419-3422). IEEE.
- ⁵⁴ Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., & Dobson, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*, 36(13), R167.
- ⁵⁵ Schaller, V., Kräling, U., Rusu, C., Petersson, K., Wipenmyr, J., Krozer, A., ... & Johansson, C. (2008). Motion of nanometer sized magnetic particles in a magnetic field gradient. *Journal of Applied Physics*, 104(9), 093918.

⁵⁶ Sharma, S., Katiyar, V. K., & Singh, U. (2015). Mathematical modelling for trajectories of magnetic nanoparticles in a blood vessel under magnetic field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 379, 102-107.

⁵⁷ Lee, C. S., Lee, H., & Westervelt, R. M. (2001). Microelectromagnets for the control of magnetic nanoparticles. *Applied physics letters*, 79(20), 3308-3310.

⁵⁸ Wael, B. A., Malek, A., & Aziz, C. (2014). Hydrodynamic motion of magnetic particles in a Poiseuille flow. *European Journal of Mechanics-B/Fluids*, 43, 57-64.

⁵⁹ Haverkort, J. W., Kenjereš, S., & Kleijn, C. R. (2009). Magnetic particle motion in a Poiseuille flow. *Physical Review E*, 80(1), 016302.

⁶⁰ Ma, M., Wu, Y., Zhou, J., Sun, Y., Zhang, Y., & Gu, N. (2004). Size dependence of specific power absorption of Fe₃O₄ particles in AC magnetic field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 268(1), 33-39.

⁶¹ Bruce, I. J., & Sen, T. (2005). Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxysilanes and their application in magnetic bioseparations. *Langmuir*, 21(15), 7029-7035.

⁶² Smith, G. E., & Dawson, W. R. (1924). *Egyptian mummies*. G. Allen & Unwin, ltd..

⁶³ Ratner, B. D. (Ed.). (2004). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Academic press.

⁶⁴ Nyström, A. M., & Fadeel, B. (2012). Safety assessment of nanomaterials: implications for nanomedicine. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 403-408.

⁶⁵ HOŠEK, J. NANOTECHNOLOGY TECHNICAL STANDARTIZATION REVIEW.

⁶⁶ Puzyn, T., Rasulev, B., Gajewicz, A., Hu, X., Dasari, T. P., Michalkova, A., ... & Leszczynski, J. (2011). Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles. *Nature nanotechnology*, 6(3), 175-178.

⁶⁷ França, R., Zhang, X. F., Veres, T., L'H, Y., & Sacher, E. (2013). Core-shell nanoparticles as prodrugs: Possible cytotoxicological and biomedical impacts of batch-to-batch inconsistencies. *Journal of colloid and interface science*, 389(1), 292-297.

⁶⁸ Chalmers, J. J., Lara-Velasco, O. R., Tong, X., Zborowski, M., Moore, L. R., & Farag, S. S. (2007). *U.S. Patent Application 12/514,618*.

-
- ⁶⁹ Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., Shokrgozar, M. A., Milani, A. S., Häfeli, U. O., & Stroeve, P. (2010). A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 300-309.
- ⁷⁰ Mbeh, D. A., França, R., Merhi, Y., Zhang, X. F., Veres, T., Sacher, E., & Yahia, L. (2012). In vitro biocompatibility assessment of functionalized magnetite nanoparticles: Biological and cytotoxicological effects. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(6), 1637-1646.
- ⁷¹ Mahmoudi, M., Simchi, A., Milani, A. S., & Stroeve, P. (2009). Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 336(2), 510-518.
- ⁷² Hong, S. C., Lee, J. H., Lee, J., Kim, H. Y., Park, J. Y., Cho, J., ... & Han, D. W. (2011). Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *International journal of nanomedicine*, 6, 3219.
- ⁷³ Boncler, M., Różalski, M., Krajewska, U., Podścdek, A., & Watala, C. (2014). Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 69(1), 9-16.
- ⁷⁴ Mbeh, D. A., Javanbakht, T., Tabet, L., Merhi, Y., Maghni, K., Sacher, E., & Yahia, L. H. (2015). Protein Corona Formation on Magnetite Nanoparticles: Effects of Culture Medium Composition, and Its Consequences on Superparamagnetic Nanoparticle Cytotoxicity. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(5), 828-840.
- ⁷⁵ Moersdorf, D., Hugounenq, P., Phuoc, L. T., Mamlouk-Chaouachi, H., Felder-Flesch, D., Begin-Colin, S., ... & Bernhardt, I. (2010). Influence of magnetic iron oxide nanoparticles on red blood cells and Caco-2 cells.
- ⁷⁶ Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., & Hafeli, U. O. (2009). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles with rigid cross-linked polyethylene glycol fumarate coating for application in imaging and drug delivery. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(19), 8124-8131.
- ⁷⁷ Molina, M. M., Seabra, A. B., De Oliveira, M. G., Itri, R., & Haddad, P. S. (2013). Nitric oxide donor superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 33(2), 746-751.

⁷⁸ Buja, L. M., Kita, T., Goldstein, J. L., Watanabe, Y., & Brown, M. S. (1983). Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 3(1), 87-101.

⁷⁹ Ramadan, L. A., Abd-Allah, A. R., Aly, H. A., & Saad-El-Din, A. A. (2002). Testicular toxicity effects of magnetic field exposure and prophylactic role of coenzyme Q10 and L-carnitine in mice. *Pharmacological research*, 46(4), 363-370.

⁸⁰ Northrop, J. H. (1942). Purification and crystallization of diphtheria antitoxin. *The Journal of general physiology*, 25(3), 465-485.