

Céline HENOUMONT ⁽¹⁾, Sophie LAURENT ^(1,2),
Robert N. MULLER ^(1,2), Luce VANDER ELST ^{(1,2)*}

⁽¹⁾ Département de Chimie Générale, Organique et Biomédicale, Laboratoire de RMN et d'Imagerie Moléculaire, Université de Mons, 19 avenue Maistriau, B-7000 Mons, Belgique.
Tél : +32 (0) 65 37 35 18, Fax : +32 (0) 65 37 35 33,
luce.vanderelst@umons.ac.be

⁽²⁾ Centre de Microscopie et d'Imagerie Moléculaire (CMMI), 8 Rue Adrienne Bolland, 6041 Gosselies, Belgique.

La spectroscopie HR-MAS : un nouvel outil pour la caractérisation des nanoparticules de fer

Résumé

Le développement de l'imagerie moléculaire nécessite le recours à des agents de contraste qui sont capables de reconnaître spécifiquement une cible à l'échelle moléculaire. Les nanoparticules d'oxyde de fer portant en surface des petits ligands organiques représentent une plateforme intéressante pour l'imagerie moléculaire par IRM. La caractérisation de la surface de ces nanoparticules est une étape importante dans le développement de ces agents. Nous présentons ici la spectroscopie RMN HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning), qui utilise la rotation de l'échantillon à haute vitesse et à l'angle « magique », comme un nouvel outil potentiel pour la caractérisation de la surface des nanoparticules d'oxyde de fer.

HR-MAS spectroscopy: a new tool for the characterization of iron oxide nanoparticles

Abstract

The development of molecular imaging requires the use of contrast agents able to specifically recognize a target at a molecular level. Iron oxide nanoparticles with small organic ligands on their surface are an interesting platform for MRI molecular imaging, and the characterization of their surface is a very important step in the development of these agents. We present here HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning) NMR spectroscopy, which uses the rotation of the sample at high speed and at a so-called "magic" angle, as a new potential tool for

the characterization of the iron oxide nanoparticle surface.

Keywords

MRI, contrast agents, iron oxide nanoparticles, HR-MAS NMR

1. Introduction

L'imagerie médicale évolue ces dernières années vers l'imagerie moléculaire. Elle a pour but de visualiser de manière non invasive le (dys)fonctionnement cellulaire ou les processus moléculaires à l'origine de certaines pathologies, et ce afin d'en améliorer le diagnostic. L'imagerie moléculaire peut également permettre d'observer la libération spécifique de certains médicaments, afin d'améliorer le traitement de ces pathologies. Pour ce faire, il est important de disposer d'une sonde efficace. Les caractéristiques de cette sonde dépendent principalement de la technique d'imagerie utilisée : molécules ou nanoparticules para- ou superparamagnétiques pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), molécules ou nanoparticules fluorescentes pour l'imagerie optique (IO), molécules radioactives pour l'imagerie nucléaire (TEP ou TEMP), microbulles pour l'imagerie par ultrasons (US), ... Pour être efficace en imagerie moléculaire, la sonde doit également posséder une bonne affinité pour la cible cellulaire ou moléculaire. Un vecteur spécifique de cette cible, qui peut être un peptide, un anticorps ou encore un mimétique organique est donc greffé de manière

covalente. La sonde se compose donc de trois parties, le contrastophore, responsable du contraste observé sur l'image, le vecteur permettant la liaison à la cible, et l'espaceur qui permet de faire le lien entre le contrastophore et le vecteur (figure 1).

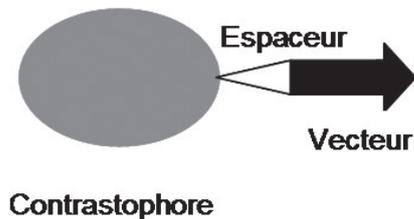


Figure 1 : Schéma d'un agent de contraste moléculaire, composé de trois parties : le contrastophore, le vecteur et l'espaceur.

Notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement à la synthèse d'agents de contraste moléculaires pour l'IRM et développe depuis plusieurs années des nanoparticules d'oxyde de fer [1-7]. Un article paru récemment dans Chimie nouvelle [8] décrit la synthèse et la caractérisation des propriétés magnétiques de ces nanoparticules. Leur caractère superparamagnétique induit en effet une augmentation des vitesses de relaxation des protons de l'eau, ce qui permet leur utilisation en tant qu'agent de contraste pour l'IRM.

L'obtention d'un agent de contraste moléculaire à partir des nanoparticules d'oxyde de fer nécessite le greffage en surface des nanoparticules d'un vecteur spécifique d'une cible cellulaire ou moléculaire. Un challenge important consiste ensuite à caractériser la surface des nanoparticules et à mettre en évidence le greffage covalent du vecteur choisi. Les deux techniques les plus utilisées actuellement pour caractériser la surface des nanoparticules d'oxyde de fer sont la spectroscopie de photons X (XPS) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) [9-11]. La spectroscopie de photons X permet l'analyse élémentaire de la surface d'un matériau, en apportant des informations sur l'environnement chimique des différents atomes présents et sur la nature de leur liaison. La spectroscopie infrarouge permet quant à elle l'identification de certains groupes fonctionnels présents à la surface de la nanoparticule. Ces deux méthodes sont donc très utiles pour obtenir une description qualitative de la présence de certaines espèces chimiques à la surface de la nanoparticule, mais elles ne permettent pas

d'étudier précisément la chimie de surface de la nanoparticule.

Comme démontré récemment [12-13], la spectroscopie RMN à haute résolution et à l'angle magique (RMN HR-MAS) est pour ce faire un outil novateur.

1.1. La spectroscopie HR-MAS

En RMN du liquide, les raies obtenues sont fines car les interactions dipolaires entre spins sont moyennées à zéro suite aux mouvements très rapides des molécules. Cette interaction dipolaire induit par contre un élargissement dramatique des raies en phase solide (plusieurs dizaines de kHz). La force de l'interaction dipolaire dépend de l'angle θ entre le champ magnétique B_0 et le vecteur internucléaire, reliant les 2 spins en interaction, et est proportionnelle à $3\cos^2(\theta) - 1$ (figure 2). L'angle pour lequel la solution de cette relation vaut 0 est de 54.7° et est appelé angle magique. Cet angle est dit « magique » car la rotation rapide d'un échantillon à cet angle de basculement permet de moyennner à zéro toutes les interactions dipolaires présentes au sein de l'échantillon, diminuant ainsi drastiquement les largeurs de raies.

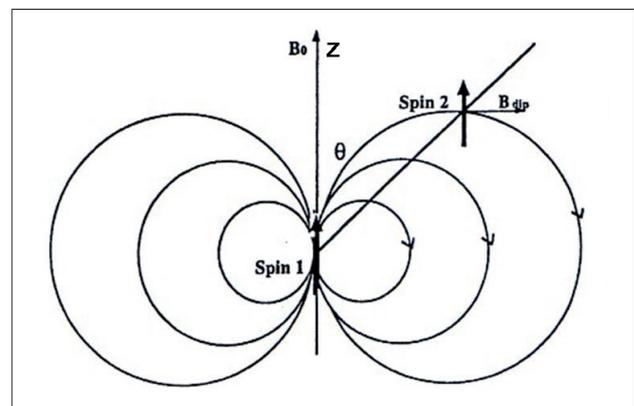


Figure 2 : Lignes de champ dipolaire d'un spin 1 orienté selon la direction z de B_0 et à l'origine. Ce champ n'a plus de composante selon z quand l'angle θ est de 54.7° , solution de $3\cos^2(\theta) - 1 = 0$ [14].

La spectroscopie HR-MAS est une technique utilisée principalement pour l'étude de milieux hétérogènes, possédant une interface liquide/solide. La rotation à l'angle magique va en effet supprimer non seulement les interactions dipolaires, mais aussi l'anisotropie du déplacement chimique et l'anisotropie due aux différences de susceptibilité magnétique à l'interface entre le solide et le liquide.

La spectroscopie HR-MAS permet donc d'obtenir un spectre RMN de molécules organiques se trouvant sur une interface solide/liquide, comme si elles se trouvaient en solution. Les séquences classiques utilisées en RMN du liquide restent d'application en spectroscopie HR-MAS. Les raies obtenues seront néanmoins d'autant plus fines que les molécules à l'interface possèdent une mobilité conformationnelle isotropique, cette mobilité isotropique contribuant partiellement à annuler les interactions dipolaires et l'anisotropie du déplacement chimique.

La spectroscopie HR-MAS est donc couramment utilisée pour l'étude de différents tissus ou cellules [15-18], pour le suivi de réactions chimiques se faisant sur support solide, comme la synthèse peptidique [19-22], ou encore pour étudier le mécanisme de séparations chromatographiques [23-24].

1.2. Application de la HR-MAS à l'étude des nanoparticules d'oxyde de fer

L'étude par RMN de nanoparticules d'oxyde de fer est rendue difficile par le caractère superparamagnétique de ces particules. La distribution très hétérogène du champ magnétique autour d'un échantillon magnétique est en effet responsable d'un élargissement très important des raies dans le spectre RMN. Grâce à une rotation rapide de l'échantillon à

l'angle magique, la spectroscopie HR-MAS permet néanmoins de diminuer fortement cet élargissement. Ceci est illustré à la figure 3.

La figure 3 montre qu'avec une sonde de RMN liquide classique, le pic de l'eau est tellement large qu'il masque complètement tous les autres signaux. La littérature mentionne qu'en travaillant à très haute dilution, il est possible d'obtenir des signaux suffisamment fins et résolus [12]. Néanmoins, même pour une concentration très faible en fer, le pic de l'eau reste très large et aucun autre signal ne se détache du bruit de fond. Sur les spectres HR-MAS, au contraire, les signaux obtenus sont beaucoup plus fins et des pics supplémentaires sont visibles à droite du pic de l'eau.

Dans cet article, une étude HR-MAS réalisée sur des nanoparticules de fer greffées d'une part avec du polyéthylène glycol (PEG), et d'autre part avec un peptide de 6 acides aminés est présentée (figure 4) [13]. Le peptide utilisé est le « scramble » d'un peptide ciblant l'apoptose et sélectionné au sein du laboratoire par la technique du phage display [25]. Le terme « scramble » signifie que les acides aminés sont les mêmes que ceux du peptide initial mais dans un ordre différent. La séquence d'acides aminés de ce peptide est Ser-Val-Ser-Leu-Leu-Thr.

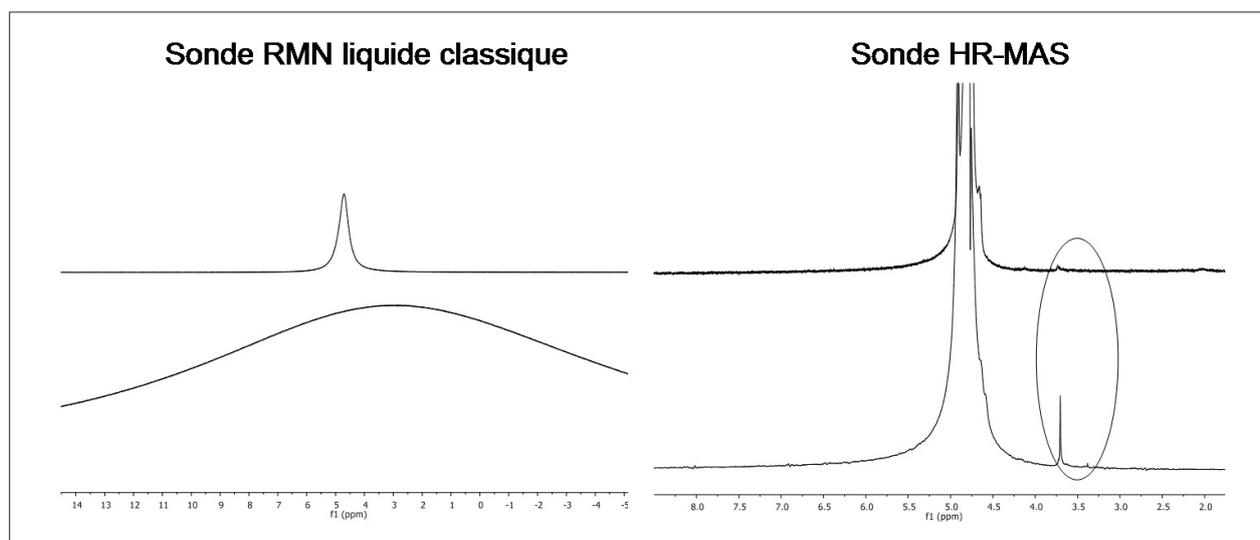


Figure 3 : Spectres ^1H de nanoparticules d'oxyde de fer. Les spectres de gauche ont été relevés avec une sonde de RMN liquide classique, tandis que les spectres de droite ont été relevés sur les mêmes particules avec une sonde HR-MAS. Les spectres du bas ont été relevés sur une solution 220 mM en fer, tandis que les spectres du haut ont été relevés sur une solution 4 mM en fer. Ces spectres ont été relevés à 500 MHz dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90%/10%), sans présaturation du pic de l'eau.

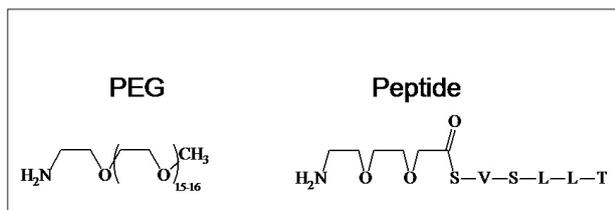


Figure 4 : Structures du PEG et du peptide greffés en surface des nanoparticules d'oxyde de fer.

2. Matériel et méthodes

2.1. Réactifs utilisés

Le polyéthylène glycol utilisé, le O-(2-aminoéthyl)-O'-méthylpolyéthylène glycol, a été fourni par la société Fluka (Diegem, Belgique). Ce polyéthylène glycol de masse moléculaire 750 possède une fonction amine terminale permettant son greffage covalent en surface des nanoparticules d'oxyde de fer (figure 4).

Le peptide utilisé a été fourni par la société PolyPeptide (Strasbourg, France) et sera appelé par la suite peptide E3 scramble. Comme le montre la figure 4, il possède à l'extrémité N-terminale un petit espaceur de type PEG terminé par une fonction amine primaire permettant le greffage covalent du peptide en surface des nanoparticules.

Les nanoparticules d'oxyde de fer ont été synthétisées au laboratoire selon un protocole déjà bien décrit dans la littérature [6-8]. Un organosilane, l'anhydride (triéthoxysilyl)propylsuccinique (TEPSA), est utilisé pour recouvrir la surface des nanoparticules d'une fine couche de polysiloxane possédant des groupements carboxylates. Les particules présentent un diamètre moyen de ~ 10 nm.

2.2. Greffage covalent du PEG et du peptide en surface des nanoparticules d'oxyde de fer

Les fonctions carboxylates présentes en surface des nanoparticules sont activées par du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) et réagissent ensuite avec la fonction amine présente sur le PEG et le peptide pour former un lien amide.

L'EDCI et le PEG ou le peptide sont ajoutés sous forme de poudre à la solution de nanoparticules (pour une concentration en fer d'environ 200 mM, 20

μmol de PEG ou de peptide et 80 μmol d'EDCI sont ajoutées). Le pH est ajusté à environ 7 et la solution est placée sous agitation pendant 24h. L'excès de PEG ou de peptide ainsi que l'EDCI sont ensuite éliminés par ultrafiltration (filtres de polyéthersulfone de cut-off 30000, Merck Millipore).

La concentration en fer des solutions de nanoparticules avant et après greffage est déterminée par relaxométrie après digestion en présence d'acide des particules de fer [25].

2.3. Mesures HR-MAS

Les spectres HR-MAS du proton ont été relevés sur un spectromètre AvanceII-500 travaillant à 500 MHz (Bruker, Karlsruhe, Allemagne), avec une vitesse de rotation de 5000 Hz, sauf mention contraire. Les échantillons ont été préparés avec un minimum de D_2O (10%) et introduits dans un rotor de zirconium de 50 μl . La saturation du pic de l'eau a été réalisée avec la séquence noesypr1d.

Les spectres « classiques » ont été réalisés sur le même spectromètre AvanceII-500 avec une sonde BBI. Les échantillons étant solubilisés dans H_2O avec 10% de D_2O , la même séquence noesypr1d a été utilisée afin de supprimer le pic de l'eau.

3. Résultats et discussion

3.1. Nanoparticules d'oxyde de fer greffées avec du PEG

3.1.1. Tests préliminaires

Ces nanoparticules ont été les premières particules sur lesquelles la faisabilité de la HR-MAS pour détecter le greffage de molécules organiques en surface a été testée dans notre laboratoire. L'influence de 2 facteurs clés selon l'article de Polito et al. [12] a donc été évaluée : la vitesse de rotation et la concentration en fer.

- Influence de la vitesse de rotation

Différents spectres HR-MAS des nanoparticules ont été relevés à des vitesses de rotation croissante (figure

5). Les résultats montrent que l'augmentation de la vitesse de rotation n'a pas énormément d'influence sur la qualité des spectres et provoque même au contraire un léger élargissement des pics. Cela avait également été décrit dans l'article de Polito et al. [12]. Ils avaient montré qu'à haute vitesse de rotation, l'effet centrifuge qui est créé provoque un élargissement des pics.

D'autre part, une vitesse de rotation trop faible génère des pics de rotation relativement intenses dans le spectre. Ces pics sont facilement reconnaissables car ils sont symétriques et sont séparés par une fréquence en Hz égale à la vitesse de rotation.

Ces mesures ont donc permis d'établir que la vitesse de rotation optimale pour réaliser les mesures HR-MAS est égale à 5000 Hz. Cette vitesse a toujours été utilisée par la suite.

- Influence de la concentration en fer

Les spectres relevés sur des solutions de concentration décroissante en fer montrent que les signaux obtenus sont relativement fins, même à très haute concentration en fer (figure 6). Le spectre relevé à la plus faible concentration en fer ne montre par contre quasiment plus aucun signal. La limite de détection a donc visiblement été atteinte pour cet échantillon.

Cette étude montre que le choix de la concentration en fer est essentiellement déterminé par la limite de détection du spectromètre RMN. En effet, contrairement à ce qui était décrit dans l'article de Polito et al. [12], aucun élargissement des signaux n'est observé lorsque la concentration en fer augmente, et ce jusqu'à une concentration assez élevée de 220 mM en fer.

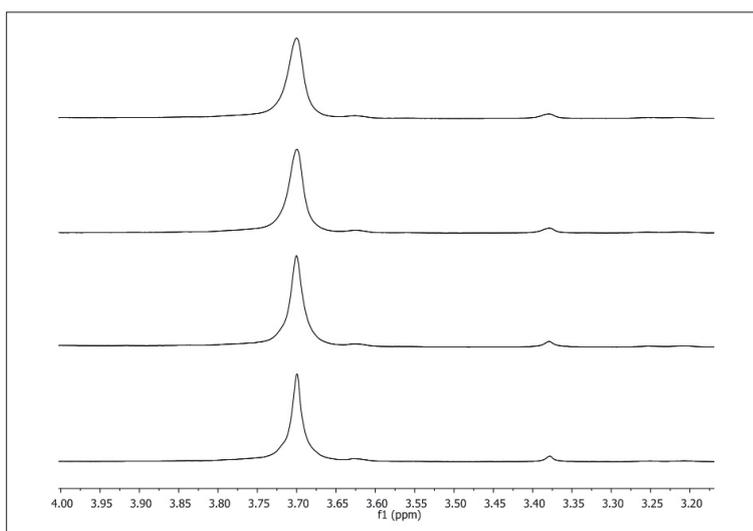


Figure 5 : spectres HR-MAS relevés à 500 MHz avec une séquence permettant la saturation du pic de l'eau. La vitesse de rotation utilisée augmente de bas en haut et vaut successivement 5000 Hz, 7500 Hz, 9000 Hz et 10000 Hz. La concentration en fer est de 220 mM.

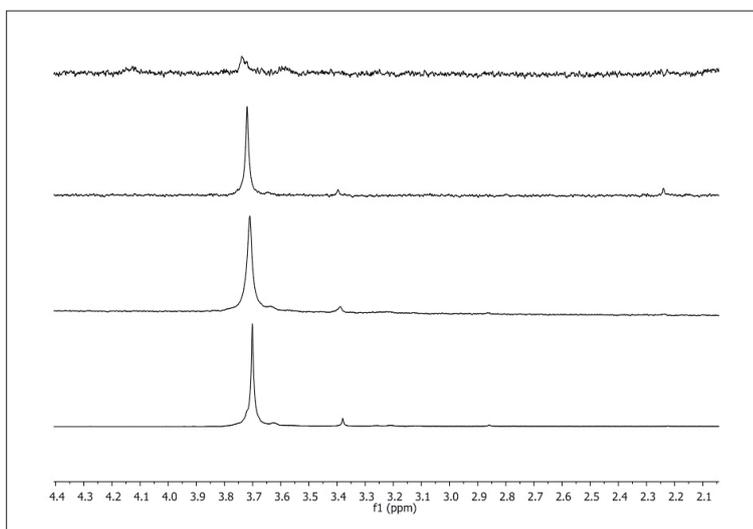


Figure 6 : Spectres HR-MAS relevés à 500 MHz avec une séquence permettant la saturation du pic de l'eau. La concentration en fer diminue de bas en haut et vaut successivement 220 mM, 82 mM, 8 mM et 4 mM.

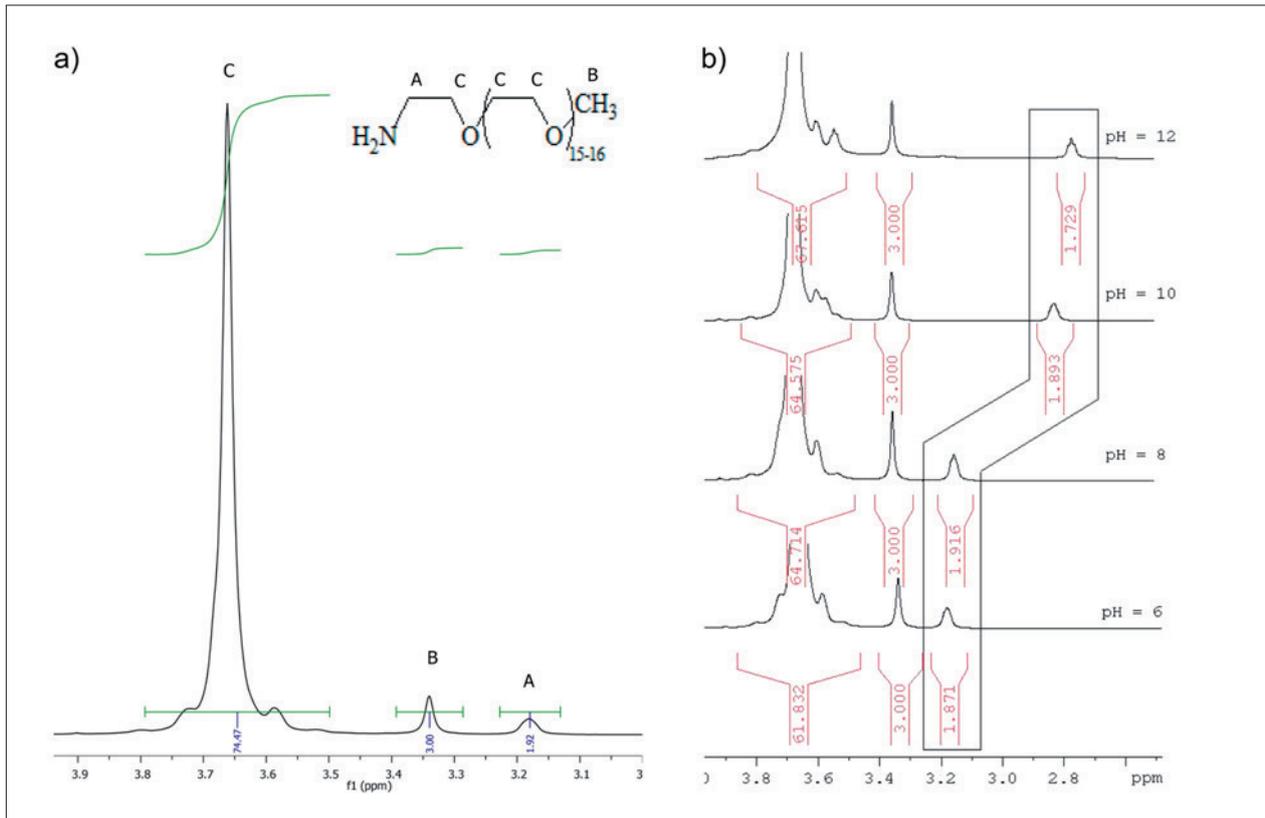


Figure 7 : a) Spectre RMN ¹H du PEG (pH = 6) relevé à 500 MHz. Le spectre a été relevé avec la séquence noesypr1d permettant la saturation du pic de l'eau. L'attribution et l'intégration des différents signaux sont indiquées sur le spectre ; b) Spectres RMN ¹H du PEG relevés à 500 MHz avec la séquence noesypr1d à différents pH. De bas en haut, le pH vaut 6, 8, 10 et 12. L'intégration des différents signaux est indiquée en rouge. L'encadré attire l'attention sur le pic A qui shifté avec le pH.

3.1.2. Mise en évidence du greffage covalent du PEG en surface des nanoparticules de fer

La figure 7a montre le spectre RMN ¹H du PEG, ainsi que l'attribution des différents pics observés. Le pic A correspond au CH₂ en alpha de la fonction amine terminale et son déplacement chimique est sensible au pH, comme le montre la figure 7b. Le déplacement chimique varie de 3.2 ppm à pH 6, correspondant à la forme protonée, à 2.75 ppm à pH 12, correspondant à la forme déprotonée.

Le PEG est greffé à la surface des nanoparticules via la réaction de la fonction amine terminale avec les fonctions carboxylates présentes en surface (formation d'un lien amide). La formation de ce lien amide va donc modifier le déplacement chimique du pic A et permettra de mettre en évidence le greffage covalent du PEG à la surface des nanoparticules.

La figure 8a montre une comparaison des spectres HR-MAS des nanoparticules nues, des nanoparticules greffées avec le PEG à la même concentration en

fer et du PEG libre en l'absence de particules. Les solutions de particules greffées avec le PEG et de PEG libre sont à un pH identique de ~ 6.5. Le spectre des nanoparticules nues est caractérisé par plusieurs pics entre 2 et 3 ppm, correspondant à la couche de polysiloxane présente en surface des nanoparticules. Le pic plus intense à 3.2 ppm pourrait correspondre au TMAOH qui est utilisé lors de la synthèse pour maintenir le pH légèrement basique. Sur le spectre HR-MAS des nanoparticules greffées avec le PEG, les signaux caractéristiques du PEG sont présents, démontrant la présence de PEG en surface des particules. Il faut également noter que, sur ce spectre, les pics caractéristiques des nanoparticules nues semblent d'intensité plus faible. Cela peut s'expliquer par la présence du PEG qui induit un encombrement stérique en surface et provoque donc une diminution de la mobilité des chaînes de polysiloxane. Cela ne prouve cependant pas que le PEG présent est greffé de manière covalente.

Afin de mettre en évidence le greffage covalent du PEG en surface des particules, du PEG libre à une

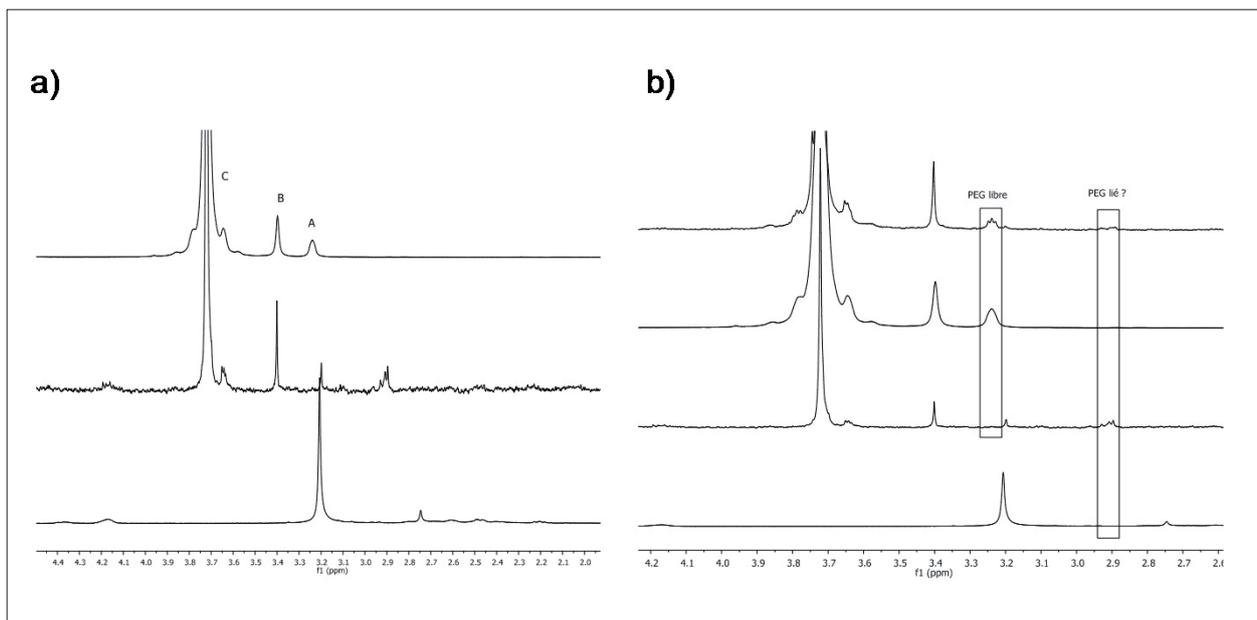


Figure 8 : Spectres HR-MAS relevés à 500 MHz avec la séquence noesypr1d. a) Le spectre du bas correspond aux particules nues, le spectre central correspond aux particules greffées avec le PEG et le spectre du haut correspond au PEG non greffé ; b) Les 3 spectres du bas sont les mêmes que ceux de la figure a et le spectre du haut correspond aux nanoparticules greffées auxquelles a été ajouté du PEG libre 1 mM. Un zoom sur la zone comprise entre 2.6 et 4.2 ppm a été effectué. Les encadrés attirent l'attention sur les pics caractéristiques du PEG libre et du PEG lié.

concentration de 1 mM a été ajouté dans la solution de nanoparticules greffées. Le pH de la solution après l'ajout de PEG libre est resté stable à environ 6.5. Le spectre relevé sur cette solution a été ajouté à la figure 8b et un zoom a été effectué sur la zone comprise entre 2.6 et 4.2 ppm. La comparaison de ces 4 spectres montre que le pic caractéristique du PEG libre à 3.25 ppm n'est pas présent sur le spectre des particules greffées mais apparaît par contre sur le spectre où du PEG libre a été ajouté. Ceci semble donc confirmer que le PEG est bien greffé de façon covalente en surface des nanoparticules de fer.

On observe également un pic à 2.9 ppm, qui n'est pas présent sur le spectre des particules non greffées et sur le spectre du PEG libre, mais qui apparaît par contre sur les 2 autres spectres. Ce pic pourrait donc être caractéristique du PEG greffé et correspondrait au CH_2 en alpha de la fonction amide.

Comme preuve supplémentaire du greffage covalent du PEG en surface des particules, un spectre a été relevé à 2 pH différents, 6.5 et 9.5. En effet, conformément à ce qui est observé à la figure 7b, un shift du pic A devrait être observé si le PEG est non greffé. Aucun shift ne sera par contre observé dans le cas contraire. Ceci est illustré à la figure 9, qui ne

montre aucun shift des pics situés dans la gamme de déplacement chimique d'intérêt (2.7 - 4 ppm). Ceci semble donc confirmer le greffage covalent du PEG en surface des nanoparticules.

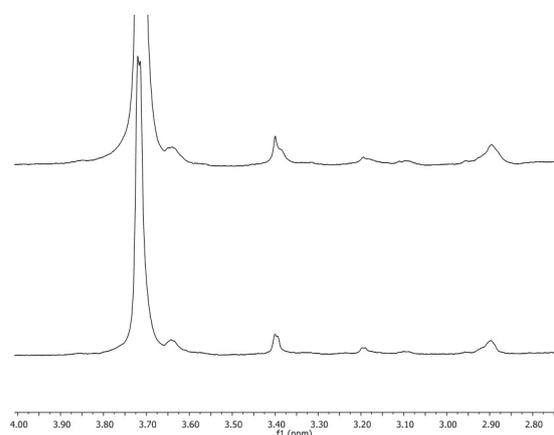


Figure 9 : Spectres HR-MAS relevés à 500 MHz avec la séquence noesypr1d des nanoparticules de fer greffées avec du PEG à différents pH. De bas en haut, le pH vaut 6.5 et 9.5.

Cette étude HR-MAS sur les nanoparticules greffées avec du PEG a donc permis de mettre en évidence que du PEG est effectivement présent en surface des nanoparticules, et qu'il est vraisemblablement greffé de manière covalente via la formation d'un lien amide.

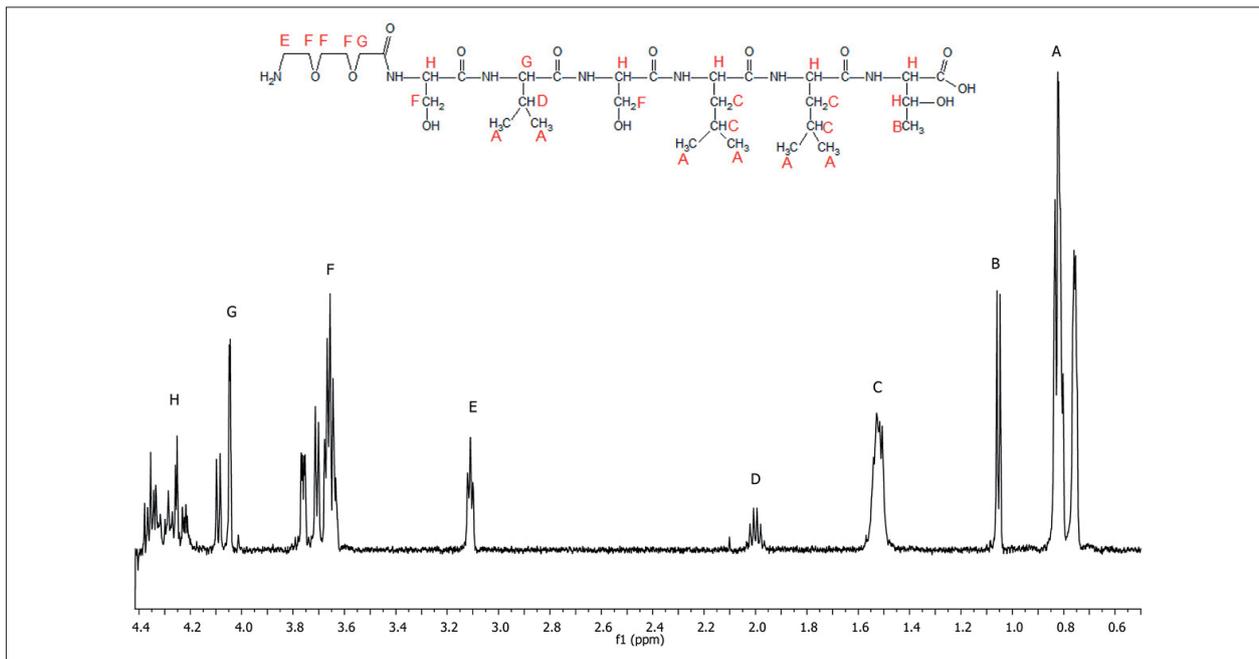


Figure 10 : Spectre RMN ^1H du peptide E3 scramble relevé à 500 MHz. Le spectre a été relevé avec la séquence noesypr1d permettant la saturation du pic de l'eau. L'attribution des différents signaux est indiquée sur le spectre.

3.2. Nanoparticules d'oxyde de fer greffées avec le peptide E3 scramble

3.2.1. Mise en évidence du greffage covalent du peptide en surface des nanoparticules

La même étude a été réalisée sur les nanoparticules greffées avec le peptide E3 scramble. Le spectre RMN ^1H du peptide E3 scramble est présenté à la figure 10 avec l'attribution des différents pics.

Tout comme pour le PEG, le déplacement chimique du pic E, qui correspond au CH_2 en alpha de la fonction

amine terminale, est sensible au pH. De plus, le remplacement de la fonction amine par une fonction amide lors du greffage provoquera un déplacement du pic E.

La figure 11a montre une comparaison des spectres HR-MAS des nanoparticules nues, des nanoparticules greffées avec le peptide à la même concentration en fer et du peptide libre en l'absence de particules. Les solutions de particules greffées avec le peptide et de peptide libre sont à un pH identique de ~ 7 . Comme mentionné précédemment, les petits pics visibles entre 2 et 3 ppm sur le spectre des nanoparticules nues peuvent être attribués à la couche de polysiloxane

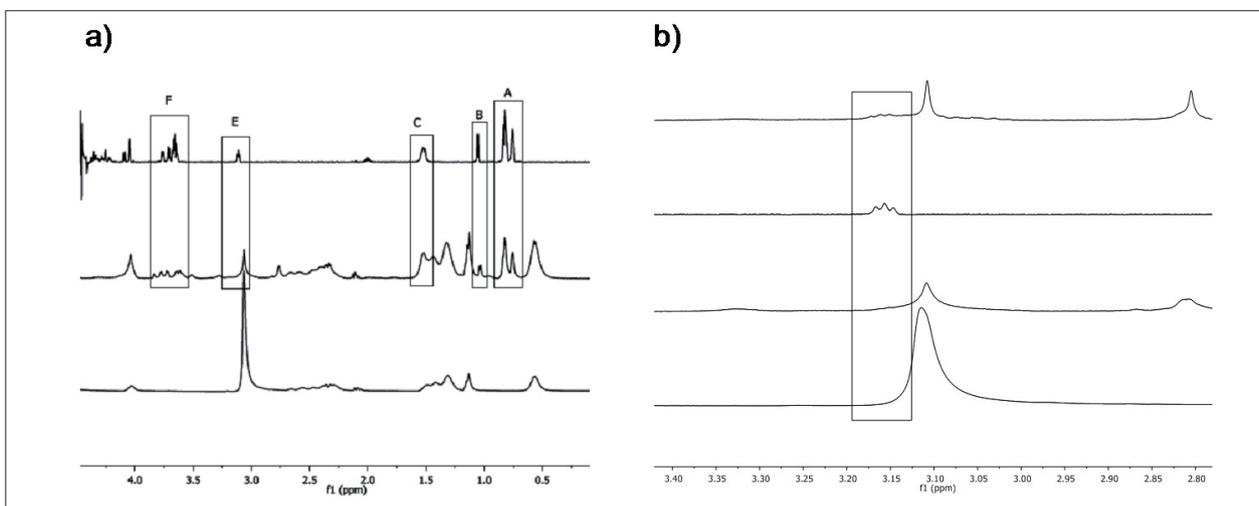


Figure 11 : Spectres HR-MAS relevés à 500 MHz avec la séquence noesypr1d. a) Le spectre du bas correspond aux particules nues, le spectre central correspond aux nanoparticules greffées avec le peptide et le spectre du haut correspond au peptide non greffé ; b) Les 3 spectres du bas sont les mêmes que ceux de la figure a) et le spectre du haut correspond aux nanoparticules greffées auxquelles a été ajouté du peptide libre 0.5 mM. Un zoom sur la zone comprise entre 2.8 et 3.4 ppm a été effectué.

présente en surface des nanoparticules. Le pic plus intense à 3.2 ppm peut quant à lui être attribué au TMAOH. En plus de ces pics, des signaux appartenant au peptide sont présents sur le spectre correspondant aux nanoparticules greffées, comme le montrent les différents encadrés. Du peptide est donc présent en surface des nanoparticules, mais son greffage covalent reste à prouver.

Pour élucider ce point, du peptide libre 0.5 mM a été ajouté à la suspension de nanoparticules greffées. Ceci est représenté à la figure 11b, où le spectre correspondant à cette solution a été ajouté. Un zoom sur la partie du spectre comprise entre 2.8 et 3.4 ppm a été réalisé. L'encadré montre bien que, assez logiquement, le pic E caractéristique du peptide libre à 3.15 ppm est présent sur les spectres du peptide libre et des nanoparticules greffées auxquelles a été rajouté du peptide libre. Sur le spectre correspondant aux nanoparticules greffées, la situation est moins nette, mais un léger épaulement à gauche du pic à 3.1 ppm pourrait suggérer la présence du pic E caractéristique du peptide libre. Un spectre COSY relevé sur cette solution montre de plus une corrélation entre ce léger épaulement et un des pics du massif F, renforçant donc l'hypothèse que cet épaulement qui est observé correspond bien au pic E caractéristique du peptide libre (figure 12).

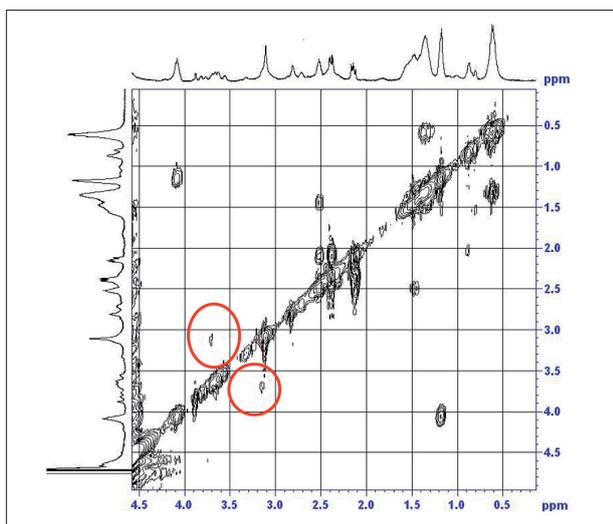


Figure 12 : Spectre COSY à 2 dimensions relevé à 500 MHz avec la sonde HR-MAS sur la solution de nanoparticules greffées avec le peptide E3 scramble. Les tâches de corrélation intéressantes sont entourées en rouge.

Des spectres ont également été relevés à différents pH, afin d'observer un éventuel shift de ce pic (figure 13). Une comparaison des spectres montre que les pics caractéristiques du peptide (encadrés sur la figure

13a) deviennent moins larges au fur et à mesure que le pH augmente, ce qui résulte en une augmentation de l'intensité des différents signaux. Ceci est particulièrement vrai pour les massifs A, B et C. D'autre part, un zoom sur le signal à 3.1 ppm (encadré figure 13b) montre de nouveau un épaulement sur la gauche du signal le plus intense pour les pH de 6.3 et 8.3. Cet épaulement disparaît par contre pour les 2 pH les plus élevés, et un autre pic apparaît à 3.05 ppm. Ce pic est particulièrement intense au pH de 11.5. Ceci renforce encore l'hypothèse que l'épaulement observé sur la figure 11b correspond bien au pic E caractéristique du peptide libre, qui glisse vers un déplacement chimique plus faible lorsque le pH augmente. Un déplacement similaire du pic E est en effet observé sur le peptide seul.

Ces observations peuvent être expliquées par une adsorption chimique du peptide en surface des nanoparticules d'oxyde de fer pour les pH inférieurs à 9, et ce via la formation d'une liaison ionique entre les fonctions carboxylates présentes en surface des particules et la fonction amine protonée du peptide. Lorsque le pH augmente, la fonction amine se déprotonne, menant à la désorption du peptide de la surface des particules. La mobilité conformationnelle du peptide est de ce fait accrue, ce qui explique la diminution de la largeur des raies, et donc l'augmentation des différents signaux caractéristiques du peptide lorsque le pH augmente.

Cette étude HR-MAS réalisée sur les nanoparticules d'oxyde de fer greffées par un petit peptide a donc permis de mettre en évidence que le peptide n'est pas greffé de manière covalente en surface des particules, mais est simplement chimisorbé via la formation d'un lien ionique entre les fonctions carboxylates présentes en surface et la fonction amine terminale du peptide. Il faut cependant noter qu'une faible quantité de peptide pourrait être greffée de manière covalente mais serait indétectable car le pic caractéristique du CH_2 en alpha de la fonction amide est trop petit ou trop large pour ressortir du bruit de fond.

4. Conclusions

Ces deux études ont permis de montrer que le greffage covalent de petites molécules organiques en surface de nanoparticules de fer peut être problématique. Il

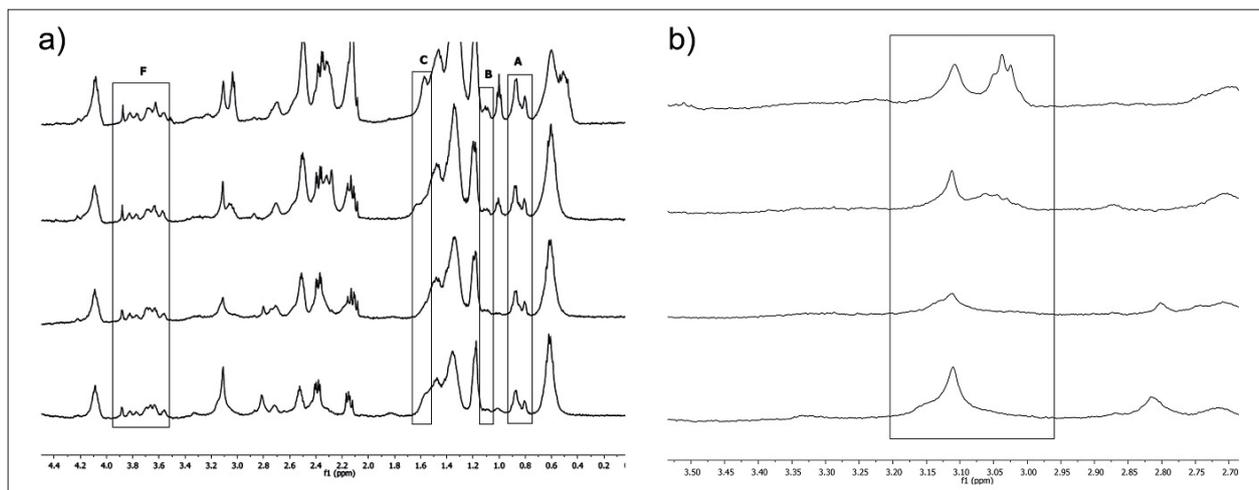


Figure 13 : Spectres HR-MAS relevés à 500 MHz avec la séquence noesypr1d sur des solutions de nanoparticules de fer greffées avec le peptide E3 scramble à différents pH. De bas en haut, le pH vaut 6.3, 8.3, 10.5 et 11.5. a) Spectre complet entre 0 et 4.5 ppm. Les zones encadrées correspondent aux pics caractéristiques du peptide ; b) Zoom sur la zone comprise entre 2.7 et 3.5 ppm. L'encadré attire l'attention sur ce qui pourrait être le pic E caractéristique du peptide libre.

est par conséquent important de pouvoir caractériser complètement leur surface afin de déterminer si le greffage covalent a bien eu lieu. Le relevé de spectres 1D et 2D en HR-MAS s'avère pour ce faire un outil extrêmement intéressant et prometteur.

Remerciements

Les auteurs remercient le Prof. Rudy Willem et Ingrid Verbruggen de la VUB (Vrije Universiteit Brussel) pour leur aide dans l'implémentation de la technique HR-MAS dans notre laboratoire. Nous souhaitons également remercier le Dr. Dimitri Stanicki pour la synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer. Enfin, les auteurs remercient la Région Wallonne (au profit de la spin-off « AGECO »), le Centre de Microscopie et d'Imagerie Moléculaire (CMMI, financé par le Fond Européen du Développement Régional et la Région Wallonne), le Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS), et les programmes ARC, PAI et ENCITE pour les financements octroyés.

Références

- [1] S. Belaïd, S. Laurent, M. Vermeech, L. Vander Elst, D. Perez-Morga, R.N. Muller, *Nanotechnology* **2013**, 24(5), 055705.
- [2] N. Arsalani, H. Fattahi, S. Laurent, C. Burtea, L. Vander Elst, R.N. Muller, *Contrast Media Mol. Imaging* **2012**, 7(2), 185-194.
- [3] C. Burtea, S. Laurent, I. Mahieu, L. Larbanoix, A. Roch, M. Port, O. Rousseaux, S. Ballet, O. Murariu, G. Toubeau, C. Corot, L. Vander Elst, R.N. Muller, *Contrast Media Mol. Imaging* **2011**, 6(4), 236-250.
- [4] F. Liu, S. Laurent, H. Fattahi, L. Vander Elst, R.N. Muller, *Nanomedicine* **2011**, 6(3), 519-528.

- [5] V. Rerat, S. Laurent, C. Burtea, B. Driesschaert, V. Pourcelle, L. Vander Elst, R.N. Muller, J. Marchand-Brynaert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20(6), 1861-1865.
- [6] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R.N. Muller, *Chem Rev.* **2008**, 108(6), 2064-110. Erratum in: *Chem Rev.* **2010**, 110(4), 2574-2574.
- [7] S. Laurent, J.L. Bridot, L. Vander Elst, R.N. Muller, *Future Med. Chem.* **2010**, 2(3), 427-449.
- [8] S. Belaïd, D. Stanicki, S. Laurent, L. Vander Elst, R.N. Muller, *Chimie nouvelle* **2013**, 112, 25-32.
- [9] A.L. Willis, N.J. Turro, S. O'Brien, *Chem. Mater.* **2005**, 17, 5970-5975.
- [10] Y.Y. Liang, L.M. Zhang, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 1480-1486.
- [11] X. Zhenghe, L. Qingxia, J.A. Finch, *Appl. Surf. Sci.* **1997**, 120, 269-278.
- [12] L. Polito, M. Colombo, D. Monti, S. Melato, E. Caneva, D. Prospero, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 12712-12724.
- [13] C. Henoumont, S. Laurent, R.N. Muller, L. Vander Elst, *Anal. Chem.* **2015**, 87(3), 1701-1710.
- [14] G. Lippens, J. Jeener, *Concepts in Magn. Res.* **2001**, 13(1), 8-18.
- [15] M.C. Martinez-Bisbal, L. Marti-Bonmati, J. Piquer, A. Revert, P. Ferrer, J.L. Llacer, M. Poggio, O. Assemat, B. Celda, *NMR in Biomed.* **2004**, 17, 191-205.
- [16] K. Elbayed, V. Berl, C. Debeuckelaere, F.M. Moussallich, M. Poggio, I.J. Namer, J.P. Lepoittevin, *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, 26(1), 136-145.
- [17] B. Jiménez, R. Mirnezami, J. Kinross, O. Clorec, H.C. Keun, E. Holmes, R.D. Goldin, P. Ziprin, A. Darzi, J.K. Nicholson, *J. Proteome. Res.* **2013**, 12(2), 959-968.
- [18] J.J.A. Van Asten, V. Cuijpers, C. Hulsbergen-van de Kaa, C. Soede-Huijbregts, J.A. Witjes, A. Verhofstad, A. Heerschap, *Magn. Res. Mater. Phys.* **2008**, 21, 435-442.
- [19] P. Rousselot-Pailley, D. Maux, J.-M. Wieruszski, J.-L. Aubagnac, J. Martinez, G. Lippens, *Tetrahedron* **2000**, 56, 5163-5167.
- [20] L.R. Carvalho, M.C. Corvo, R. Enugala, M.M. Marques, E.J. Cabrita, *Magn. Reson. Chem.* **2010**, 48(4), 323-330.
- [21] D. Rentsch, C. Stähelin, M. Obkircher, R. Hany, M. Simeunovic, D. Samson, G. Loidl, F. Dick, *ACS Comb. Sci.* **2012**, 14(11), 613-620.
- [22] T. Duchène, C. Mihai, R. Willem, D. Tourwé, *J. Pept. Sci.* **2010**, 16(12), 679-686.
- [23] V. Friebohn, S. Marten, K. Albert, *Magn. Reson. Chem.* **2010**, 48(2), 111-116.
- [24] C. Hellriegel, U. Skogsberg, A. Albert, M. Lmmerhofer, N.M. Maier, W. Lindner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(12), 3809-3816.
- [25] C. Laumonier, J. Segers, S. Laurent, A. Michel, F. Coppée, A. Belayew, L. Vander Elst, R.N. Muller, *J. Biomol. Screen.* **2006**, 11(5), 537-545.
- [26] S. Boutry, D. Forge, C. Burtea, I. Mahieu, O. Murariu, S. Laurent, L. Vander Elst, R.N. Muller, *Contrast Media Mol. Imaging* **2009**, 4, 299-304.