

Université



Thèse de doctorat

Spécialité : chimie

Option : chimie appliquée

Présentée par

Ouahiba HOCINE

**Nanoparticules de Silice Mésoporeuses Fonctionnalisées pour la
Thérapie Photodynamique et la Vectorisation.**

Devant le jury d'examen composé de :

M. Ali	KHOUIDER	Professeur	U.S.T.H.B	Président
M. Amar	SAHMOUNE	Professeur	U.M.M.T.O	Directeur de thèse
M. Jean-Olivier	DURAND	Chargé de recherche HDR	CNRS, Montpellier	Co-Directeur de thèse
M ^e . Laurence	RAEHM	Maître de Conférences	Univ. Montpellier II	Examinatrice
M. Smain	HOCINE	Professeur	U.M.M.T.O	Examineur
M. Makhlouf	BOUFATIT	Professeur	U.S.T.H.B.	Examineur

Soutenue le : 01/07/2012

Remerciements

Ce présent travail a été réalisé sous la direction scientifique de Monsieur Amar SAHMOUNE Professeur à la faculté des Sciences de l'université de Tizi-Ouzou et Jean Olivier DURAND Chargé de Recherche (HDR) au CNRS de Montpellier dans le cadre d'une bourse Algéro-française (BAF). Je tiens à leur exprimer toute ma reconnaissance pour leurs soutiens et pour m'avoir accordé leur confiance. Je tiens à exprimer toute ma gratitude à M. Jean Olivier Durand pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet passionnant et pour sa constante disponibilité au cours des stages que j'ai effectués au sein du laboratoire CMOS.

Je tiens à remercier profondément Messieurs les Professeurs André VIOUX et Hubert MUTIN, ancien et actuel directeurs du laboratoire de Chimie Moléculaire et Organisation du Solide CMOS de l'institut Charles Gerhardt (Université Montpellier II) de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et d'avoir mis à ma disposition tout les moyens nécessaires au cours de mes séjours au laboratoire.

Je tiens à remercier vivement Madame Laurence RAEHM Maître de Conférences à l'université de Montpellier II pour son suivi, son soutien scientifique et moral qu'elle m'a manifesté tout au long de la préparation de cette thèse. Je lui exprime également ma profonde gratitude pour avoir accepté de faire partie du jury de soutenance de ce travail.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Ali KHOUIDER, Professeur à l'Université des sciences et Technologies Houari Boumédiène d'Alger (USTHB), pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur Makhlof BOUFATIT, Professeur à l'USTHB, Monsieur Smain HOCINE, Professeur à l'université de Tizi-Ouzou, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime toute mon amitié à tous les membres du laboratoire CMOS; chercheurs, étudiants, personnels techniques ou administratifs, pour leur aide, sympathie et la bonne ambiance qu'ils ont su créer. Je remercie, en particulier David Brevet pour son aide quotidienne. Je remercie très chaleureusement Magali Gary-Bobo, pour avoir réalisé l'ensemble des tests biologiques et pour toutes les discussions que j'ai eues avec elle sur la partie biologique.

Remerciements

Je remercie le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique de m'avoir octroyé une bourse d'étude BAF de 18 mois. Sans ce financement ces travaux de thèse n'auraient pas pu se réaliser.

Je remercie également toutes mes amies pour leur soutien et encouragement durant toutes ces années de thèse particulièrement Kahina, Chabha, Tassadit et Baya. Je n'oublie pas Warda que j'ai rencontrée à Montpellier, sans elle mes soirées et week end auraient été très difficiles.

Pour finir un grand merci à tous ceux qui m'ont épaulée d'une manière plus privée. Tout d'abord mes parents, mes frères et sœurs, qui m'ont toujours soutenue, mais également toutes mes amies pour leur soutien et encouragement durant toutes ces années de thèse.

Introduction générale	1
Chapitre 1- Introduction bibliographique	4
1. Matériaux mésoporeux structurés.....	5
1.1. Synthèse. <i>Microémulsion directe</i>	6
1.2. Mécanisme de formation	7
1.3. Nanoparticules de silice mésoporeuses (MSN).....	9
2. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules de silice	10
2.1. Modification par imprégnation	10
2.2. Modification impliquant des liaisons covalentes	11
2.2.1. Greffage post-synthèse	11
2.2.2. Fonctionnalisation in-situ par co-condensation.....	12
3. Applications biologiques des MSN	13
3.1. MSN pour la délivrance contrôlée de médicaments.....	13
3.1.1. Générations de vecteurs de principe actifs.....	15
3.1.2. Travaux de références	18
3.2. Nanoparticules et photothérapie dynamique.....	22
3.2.1. Historique.....	23
3.2.2. Phototoxicité	24
3.2.3. Réactions d'oxydation générées par l'oxygène singulet en milieu cellulaire	26
3.2.4. Photosensibilisateurs idéaux en photothérapie dynamique	26
3.2.5. Porphyrines	27
3.2.5. Travaux de référence	29
4. Conclusion	31
Bibliographie	32
Chapitre 2- Nanoparticules de silice mésoporeuses en photothérapie Dynamique	38
A. Nanoparticules de silice fonctionnalisées par des porphyrines pour la PDT	40
1. Synthèse des porphyrines	40

1.1.	Porphyrine cationique.....	41
1.2.	Porphyrine anionique.....	42
1.3.	Synthèse de nanoparticules de silice sans porphyrines.....	42
1.4.	Encapsulation de porphyrines par voie non covalente.....	43
1.5.	Encapsulation de porphyrines par voie covalente.....	44
2.	Caractérisation des nanoparticules de silice.....	47
2.1.	Caractérisation de l'encapsulation des porphyrines par spectroscopie UV/Visible.....	47
2.2.	Microscopie Electronique à Transmission et à Balayage.....	49
2.3.	Diffusion dynamique de la lumière DDL.....	51
2.4.	Adsorption et désorption de gaz BET.....	53
2.5.	Diffraction des rayons X sur poudre.....	55
3.	Activité biologique des MSN.....	57
3.1.	Production de l'oxygène singulet.....	57
4.2.	Activité PDT des nanoparticules.....	57
4.2.1.	Lignée cellulaire.....	57
4.2.2.	Milieu de culture.....	58
4.2.3.	Test de viabilité cellulaire au MTT.....	58
4.2.4.	Phototoxicité.....	59
B.	Ciblage et thérapie photodynamique.....	62
1.	Amination des nanoparticules.....	62
3.2.	Caractérisation.....	63
1.1.1.	Test à la ninhydrine.....	63
1.1.2.	Caractérisation par la RMN CP-MAS du ²⁹ Si.....	64
1.1.3.	Caractérisation par adsorption de gaz BET.....	66
2.	Greffage de la molécule ciblant sur les nanoparticules aminées.....	67
3.3.	Synthèse de la molécule ciblant (réaction de couplage).....	67
3.4.	Greffage du squarate-mannose.....	68
3.5.	Dosage du squarate-mannose dans les nanoparticules.....	69
3.	Activité PDT des nanoparticules greffées par des molécules ciblantes.....	71
C.	Internalisation des nanoparticules.....	72
1.	Rappel sur la spectroscopie de fluorescence.....	72
2.	Principe de la microscopie confocale.....	73
3.	Synthèse de nanoparticules encapsulant la fluorescéine isothiocyanate.....	74
3.6.	Amination des nanoparticules MSN-FITC.....	75

3.7. Greffage de la molécule ciblante sur les nanoparticules aminées.....	76
4. Fluorescence des échantillons	76
5. Observation en microscopie confocale.....	77
D. Conclusion	79
Partie expérimentale.....	80
Bibliographie	90

Chapitre 3 - Nanoparticules de silice mésoporeuses pour la vectorisation.....93

A. Nanoparticules de silice pour la délivrance de principes actifs	95
1.Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules de silice	95
2.Caractérisation des nanoparticules.....	96
2.1.Diffusion dynamique de la lumière DDL	96
2.2.Adsorption et désorption de gaz BET.....	97
3.Encapsulation de la camptothécine	98
3.1.Définition.....	98
3.2.Propriétés pharmacologiques	98
3.3.Choix de cette molécule comme principe actif.....	99
3.4.Incorporation de la CPT dans les nanoparticules.....	99
4.Tests de cytotoxicité.....	100
B. Couplage photothérapie dynamique - délivrance de principe actif	103
1.Cytotoxicité des nanoparticules.....	103
2.Phototoxicité	104
C. Nanoparticules de silice pour la délivrance contrôlée de médicaments	107
1.Protection photolabile	108
2.Protection de la fonction amine par le groupement NVOC.....	109
3.Greffage du groupement NVOC- γ Glu sur les nanoparticules aminées	110
4.Déprotection de la fonction carboxylique de MSN-NVOC- γ Glu	112
5.Greffage du groupement pyrène-méthanol sur MSN-NVOC- γ Glu.....	113
6.Caractérisation	114
a.Adsorption et désorption de gaz BET	114
b.Diffusion dynamique de la lumière	115
7.Photodéprotection de la fonction amine.....	116
a.Mécanisme de déprotection	116

b. Photodéprotection à 365 nm	118
c. Photodéprotection à 420 nm	119
8. Greffage du dendrimère sur nanoparticules aminées	120
D. Conclusion	121
Partie expérimentale	123
Bibliographie	130
Conclusion générale	133
Annexe	136

Liste des abréviations

APTS	AminoPropylTriéthoxySilane
BET	Brunauer, Emmett et Teller : méthode de calcul de la surface spécifique par Adsorption / désorption de gaz
BJH	Barrett, Joyner et Halenda : méthode de calcul du diamètre des pores par adsorption / désorption de gaz
Capan-1	Cellules de cancer du pancréas
CCM	Chromatographie sur couche mince
CPT	Camptothécine
CTMABr	Bromure de CétylTriMéthylAmine
DCC	DiCyclohexylCarbodiimide
DDL	Diffusion dynamique de la lumière
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	DiMéthylFormamide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
Et₃N	Triéthylamine
FITC	FluorescéineIsoThioCyanate
EtOH	Ethanol
HCT-116	Cellules humaines de cancer de colon
IR	Spectroscopie Infra Rouge
MDA-MB-231	Cellules humaines de cancer de sein
MCM	Mobil Composition of Matter
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MSN	Nanoparticules de Silice Mésoporeuses (Mesoporous Silica Nanoparticles)
MSN-APTS	Nanoparticule greffée avec de l'APTS
MSN-Man	Nanoparticules greffée avec du squarate mannose
MSN-NVOC Glu	Nanoparticules greffée avec du NVOC-Glu
MSN-NVOC Glu-Py	Nanoparticules greffée avec du NVOC-Glu et du pyrène méthanol
MTT	Bromure de 3-(4,5-diMéthylThiazol-2-yl)-2,5-diphényl Tétrazolium
NVOC-Cl	6-Nitroveratrylchloroformiate

NVOC-Glu	Acide glutamique protégé avec du NVOC-Cl
PDT	Thérapie Photo Dynamique
Py-OH	Pyrène méthanol
Rdt	Rendement
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
TEOS	TétraEthOxySilane
TFA	Acide Trifluoroacétique
THF	TétraHydroFurane
UV/Visible	Spectroscopie Ultra-Violet / Visible

Liste des figures

Figure 1.1 : Structure des matériaux mésoporeux M41S :a) MCM-41, b) MCM-48, MCM-50.....	6
Figure 1.2 : Schématisation (A) d'une micelle directe et (B) d'une micelle inverse	6
Figure 1.3 : procédé sol-gel.....	7
Figure 1.4 : Mécanismes de formation des MCM-41proposés par Beck	8
Figure 1.5 : Mécanisme de formation des MCM-41 proposé par le groupe de Stucky	8
Figure 6 : Mécanisme de nucléation des MSN	9
Figure 1.7 : Modification de la surface de la silice par greffage à partir d'alkoxysilanes ..	11
Figure 1.8 : Hydrolyse (a) et co-condensation (b) des molécules d'alkoxysilane et d'organosilane.	12
Figure 1.9 : Schématisation des vecteurs de (A) première, (B) seconde et (c) troisième génération	17
Figure 1.10 : Représentation des FMSNs encapsulant la CPT	19
Figure 1.11 : Représentation du mécanisme d'activation du système de délivrance	19
Figure 1.12 : Mécanisme d'ouverture des nanovalves	20
Figure 1.13 : mécanisme d'ouverture et fermeture des nanovalves reversibles.....	21
Figure 1.14 : Représentation d'une MSN dont les pores encapsulent des molécules hôtes (vancomycine) et sont bouchés par des portiers (CdS).....	22
Figure 1.15 : Principe de la PDT.....	23
Figure 1.16: Photosensibilisateurs utilisés en PDT.....	24
Figure 1.17 : Mécanisme photochimique de la PDT (Diagramme de Jablonski)	25
Figure 1.18 : Profils spectraux des principaux composants endogènes	27
Figure 1.19 : Mise en évidence du système π à 18 électrons et nomenclature IUPAC des carbones caractéristiques d'une porphyrine libre.....	28
Figure 1.20 : Spectre UV-visible caractéristique d'une porphyrine base libre	28
Figure 1.21: Schéma de synthèse des MSN-PpIX	30
Figure 2.1 : Structure des porphyrines utilisées	40
Figure 2.2 : Schéma de synthèse de la porphyrine 2.....	41
Figure 2.3 : Schéma de synthèse de la porphyrine anionique 4	42
Figure 2.4 : Schéma de synthèse de nanoparticules de silice par microémulsion directe...	43
Figure 2.5 : Poudre de nanoparticules de silice MSN et nanoparticules encapsulant la porphyrine 1(MSN-1).....	44
Figure 2.6 : Silylation des porphyrines	45

Liste des figures

Figure 2.7 : Spectre FTIR de nanoparticules avant et après élimination du tensio-actif (exemple MSN-2-4)	47
Figure 2.8 : Spectre UV/Vis de nanoparticules encapsulant les porphyrines par voie covalente.....	48
Figure 2.9 : Exemple de correction de spectre d'absorption (MSN-2.8)	49
Figure 1.10 : image MEB des nanoparticules MSN à différents grossissements	50
Figure 2.11 : Cliché TEM des nanoparticules encapsulant les porphyrines à différents grossissements.....	50
Figure 2.12 : Schéma du principe de fonctionnement de la technique de la diffusion dynamique de la lumière ⁷	51
Figure 2.13 : Distribution de taille des nanoparticules.....	52
Figure 2.14 : Courbes d'adsorption et de désorption de gaz BET de nanoparticules encapsulant les porphyrines	54
Figure 2.15 : Distribution poreuse à la désorption	54
Figure 2.16 : Diffractogrammes de DRX des nanoparticules synthétisées.....	55
Figure 2.17 : Représentation schématique du réseau hexagonal des nanoparticules	56
Figure 2.18 : Rendement quantique de formation d' ¹ O ₂	57
Figure 2.19 : Principe chimique du test MTT	59
Figure 2.20 : Mort cellulaire induite par la PDT avec les nanoparticules encapsulant les porphyrines sur les cellules MDA-MB-231	60
Figure 2.21 : Mort cellulaire induite par la PDT avec les nanoparticules MSN-2.8 sur les cellules POE 14	60
Figure 2.22 : Image des cellules MDA-MB-231 observées par microscope à fluorescence.....	61
Figure 2.23 : Greffage de l' APTS sur MSN-3.12	63
Figure 2.24 : Mécanisme de formation du pourpre de Ruhemann.....	64
Figure 2.25 : Sous structures T ⁱ et Q ⁱ en RMN du ²⁹ Si	65
Figure 2.26 : Spectre RMN CP-MAS du ²⁹ Si de a) MSN-3.12 et b) MSN-3.12-APTS	66
Figure 2.27 : Courbes d'adsorption et de désorption de gaz BET de nanoparticules greffées par de l' aminopropyltriéthoxysilane	66
Figure 2.28 : Réaction de couplage squarate-mannose	68
Figure 2.29 : Greffage du squarate mannose sur les nanoparticules MSN-3.12-APTS.....	68
Figure 2.30 : Spectre UV-Visible des nanoparticules greffées avec du squarate-mannose	69
Figure 2.31 : Réaction du résorcinol avec les sucres	70

Liste des figures

Figure 2.32 : Spectre UV-visible représentant le dosage du mannose de MSN-3.12-Man (Le blanc correspond au spectre UV-Vis des nanoparticules non traitées avec du résorcinol).....	70
Figure 2.33 : Mort cellulaire induite par la PDT avec les nanoparticules greffées avec le mannose sur les cellules MDA-MB-231	71
Figure 2.34 : Principe de la fluorescence	72
Figure 2.35 : Fluorochromes utilisés en fluorescence.....	73
Figure 2.36 : Principe du microscope confocal.....	74
Figure 2.37 : Synthèse des nanoparticules MSN-FITC.....	74
Figure 2.38 : Spectre UV-Visible de nanoparticules encapsulant la FITC	75
Figure 2.39 : Dosage du squarate mannose greffé sur les nanoparticules aminées.....	76
Figure 2.40 : Spectre de fluorescence dans l'éthanol des nanoparticules (1,5 mg de nanoparticules dans 5 ml d'EtOH, excitation à 490 nm)	77
Figure 2.41 : Images obtenues par microscopie confocale des cellules MDA-MB-231 après 24 heures d'incubation avec les nanoparticules. A) Co-localisation des nanoparticules fonctionnalisées ou non avec le mannose avec les lysosomes. B) Co-localisation des nanoparticules fonctionnalisées avec le mannose en absence ou en présence d'un excès de mannose.....	78
Figure 3.1 : Spectre UV-Vis caractérisant le dosage du mannose greffé sur les nanoparticules.....	96
Figure 3.2 : Courbes d'adsorption et de désorption de gaz BET des nanoparticules.....	97
Figure 3.3 : Structure de la CPT.....	98
Figure 3.4 : a) dimensions de la molécule de CPT calculées par le logiciel Chem Draw,..	99
Figure 3.5 : Spectre UV-Visible du surnageant après relargage de la CPT dans le DMSO	100
Figure 3.6 : Cytotoxicité des nanoparticules sur cellules de cancer du sein MDA-MB-231 ; C : contrôle (cellules non traitées), EtOH : cellules incubées dans l'éthanol, 1: MSN-APTS, 2: MSN-Man-CPT.....	101
Figure 3.7 : Cytotoxicité des nanoparticules sur cellules de cancer colon HCT-116 ; C : contrôle (cellules non traitées), 1: MSN-CPT, 2: MSN-Man-CPT.....	102
Figure 3.8 : Cytotoxicité des nanoparticules MSN-4-Gal-CPT sur les cellules MDA-MB-231	105
Figure 3.9 : Cytotoxicité des nanoparticules MSN-4-Gal-CPT sur cellules HCT-116.....	105

Liste des figures

Figure 3.10 : Cytotoxicité des nanoparticules MSN-4-Gal (1) et MSN-4-Gal-CPT (2) sur cellules Capan-1	105
Figure 3.11 : Effet du couplage de la PDT et délivrance de la CPT sur les cellules. MDA-MB-231 ; C : Contrôle, 1 : MSN-4-Gal, 2 : MSN-4-Gal-CPT	106
Figure 3.12 : Effet du couplage de la PDT et délivrance de la CPT sur les cellules HCT-116; C : Contrôle, 1 : MSN-4-Gal, 2 : MSN-4-Gal-CPT.....	106
Figure 3.13 : Effet du couplage de la PDT et délivrance de la CPT sur les cellules Capan-1 ; C : Contrôle (cellules non traitées), EtOH : Cellules incubées dans l'éthanol, 1 : MSN-4-Gal, 2 : MSN-4-Gal-CPT	106
Figure 3.14 : Représentation schématique du nanovecteur (Nanoparticule de silice + groupement photoactivable + dendrimère)	107
Figure 3.15 : Réaction de cyclisation intramoléculaire de l'acide γ -glutamique	108
Figure 3.16 : Structure du NVOC-Cl	109
Figure 3.17 : Schéma de protection de la fonction amine de l'acide aminé.....	110
Figure 3.18 : Schéma de greffage du groupement NVOV-Glu.....	111
Figure 3.19 : Spectre UV-visible de nanoparticules greffées avec du NVOC-Glu.....	111
Figure 3.20 : Déprotection de la fonction carboxylique de MSNNVOC- α Glu	112
Figure 3.21 : Spectre UV-Visible de MSN-NVOC Glu après déprotection de la fonction carboxylique	113
Figure 3.22 : Schéma de greffage du pyrène-méthanol.....	113
Figure 3.23 : Spectre UV-Vis des nanoparticules greffées avec le pyrène méthanol	114
Figure 3.24 : Isothermes d'adsorption et désorption de gaz BET des nanoparticules greffées au pyrène méthanol	115
Figure 3.25 : Mécanisme de photodéprotection	116
Figure 3.26 : Structure de l'hydrochlorate de semicarbazide.....	117
Figure 3.27 : Suivi de la photodéprotection par UV-Visible à 365 nm	118
Figure 3.28 : Suivi de la photodéprotection par spectroscopie de fluorescence	119
Figure 3.29 : Suivi de la photodéprotection par UV-Visible à 420 nm	120
Figure 3.30 : Structure du dendrimère PAMAM-OH	121

Liste des tableaux

Tableau 2.1 : Nanoparticules synthétisées	46
Tableau 2.2 : Pics d'absorbance des porphyrines dans les nanoparticules	48
Tableau 2.3 : Quantités de porphyrines encapsulées dans les nanoparticules.....	49
Tableau 2.4 : Rayon hydrodynamique des nanoparticules.....	52
Tableau 2.5 : Caractéristiques BET des matériaux synthétisés.....	54
Tableau 2.6 : Paramètres DRX des nanoparticules	56
Tableau 2.7 : Définition de l'environnement des différentes espèces du silicium et de leur déplacement chimique en RMN du ^{29}Si	64
Tableau 2.8 : Caractéristiques BET des matériaux greffés par de l'APTS	67
Tableau 2.9 : Quantification de la localisation des nanoparticules dans les lysosomes.....	79
Tableau 3.1 : Rayon hydrodynamique des nanoparticules greffées avec du mannose.....	95
Tableau 3.2 : Caractéristiques BET des nanoparticules synthétisées greffées avec le mannose.....	96
Tableau 3.3 : Caractéristiques BET des nanoparticules greffées avec le NVOC-Glu et le pyrène méthanol	114
Tableau 3.4 : Rayon hydrodynamique déterminé par DDL des nanoparticules greffées avec le NVOC-Glu et le pyrène méthanol.....	114

Introduction générale

Introduction générale

Une des tendances actuelles en matière de recherche scientifique est de produire des nanostructures faites d'une grande variété de matériaux et d'en comprendre les propriétés et fonctionnalités afin de développer de nouvelles technologies. Ayant déjà bouleversé, au cours de ces dernières années, les domaines de l'électronique appliquée² aux technologies de l'information et de la communication, de l'informatique, des semi conducteurs et des matériaux composites, les nanotechnologies sont aujourd'hui un outil irremplaçable dans l'étude chimique, biologique et médicales du vivant.

Les principales applications des nanotechnologies, et notamment de nanoparticules, dans le domaine médical sont la vectorisation des médicaments, les puces à ADN et en bioimagerie permettant ainsi l'amélioration de la détection précoce et le traitement de nombreuses pathologies (cancers ou maladies infectieuses par exemple).

La vectorisation des médicaments est basée sur le principe d'adressage, qui consiste à encapsuler le médicament dans un nanovecteur, de telle sorte que celui-ci ne délivre son principe actif qu'après avoir pénétré la cellule malade de manière à réduire la toxicité des médicaments.

Synthétisées dans les années 1990, les nanoparticules mésoporeuses de silice telles que les MCM-41, sont des matériaux qui présentent une surface spécifique élevée et une mésoporosité ordonnée pouvant permettre leur utilisation dans le domaine de la médecine. Leur caractéristiques structurales modulables (surface, diamètre de pores et morphologie) et l'innocuité de la silice amorphe qui les composent en font de bons candidats pour l'encapsulation de principes actifs variés.

L'objectif du travail de cette thèse est de synthétiser des nanoparticules de silice de taille nanométrique et de distribution homogène et leur utilisation comme vecteurs de molécules biologiques.

Le manuscrit est divisé en trois chapitres, le premier chapitre de ce mémoire est une étude bibliographique. Il présente d'abord des notions générales sur les matériaux mésoporeux siliciques. Ensuite, nous nous intéresserons aux différentes applications des nanoparticules de silice, et plus particulièrement à la photothérapie dynamique et l'encapsulation de principes actifs de médicaments.

Le deuxième chapitre sera consacré à la synthèse et à la caractérisation de nanoparticules de silice mésoporeuses encapsulant des porphyrines comme photosensibilisateurs par liaison covalente. Les matériaux synthétisés seront ensuite testés en thérapie photodynamique sur des lignées cellulaires humaines. L'adressage spécifique de ces nanoparticules vers les cellules tumorales sera étudié dans la deuxième partie de ce chapitre,

Dans le troisième chapitre, l'utilisation de nanoparticules de silice mésoporeuses comme vecteurs de principes actifs sera étudié. L'encapsulation et la libération de la camptothécine, alcaloïde cancéreux, seront étudiées dans la première partie. L'étude de la délivrance contrôlée par la lumière sera étudiée dans la deuxième partie de ce chapitre, les différentes réactions de protection, de greffage des groupements photoactivables et de dendrimères seront décrites et les premiers essais de photodéprotections seront présentés.

Chapitre 1

Introduction bibliographique

Les matériaux poreux sont dénommés selon leur taille de pores : d'après la classification IUPAC, on parlera d'un matériau microporeux lorsque le diamètre des pores est inférieur à 2 nm, mésoporeux pour un diamètre compris entre 2 et 50 nm et enfin macroporeux pour un diamètre supérieur à 50 nm. Dans ce travail nous nous sommes intéressés exclusivement aux solides mésoporeux à porosité organisée et particulièrement aux nanoparticules de silice mésoporeuses communément appelées MSN (Mesoporous Silica Nanoparticles). Ce chapitre donne brièvement quelques notions de base nécessaires à la compréhension du travail présenté dans ce mémoire.

1. Matériaux mésoporeux structurés

En 1971, Chiola et al.¹ décrivaient déjà dans un brevet la synthèse de silice à faible densité réalisée par hydrolyse et condensation du tétraéthoxysilane (TEOS) en présence d'un tensioactif cationique. DiRenzo et al.². Ils ont établi en 1997 que ce travail constituait la première synthèse d'un matériau silicique mésoporeux.

Ce n'est qu'en 1992 que les chercheurs de la Mobil Oil Corporation ont réalisé des études détaillées pour la synthèse et la caractérisation d'une nouvelle famille de matériaux silicatés inorganiques mésoporeux, appelés M41S, dont les silices MCM (Mobil Composition of Matter) font partie^{3, 4}. Cette famille comporte les matériaux de type MCM-41, de structure hexagonale, les matériaux de type MCM-48 possédant une structure cubique et les matériaux de type MCM-50 se présentant sous forme lamellaire (figure 1.1)⁵⁻⁸. Depuis leur découverte en 1992, plusieurs silices mésoporeuses ont été synthétisées par modification de la nature du tensioactif. L'utilisation d'un tensioactif neutre de type copolymère tribloc en milieu acide a ainsi conduit à la famille des matériaux SBA (Santa Barbara)⁷.

Les MCM-41 qui présentent un réseau hexagonal régulier de pores avec une taille de pores bien définie, entre 2 et 10 nm, une surface spécifique très élevée excèdent souvent 1000 m²/g et une haute stabilité chimique et thermique, ont été les plus étudiés et utilisés.

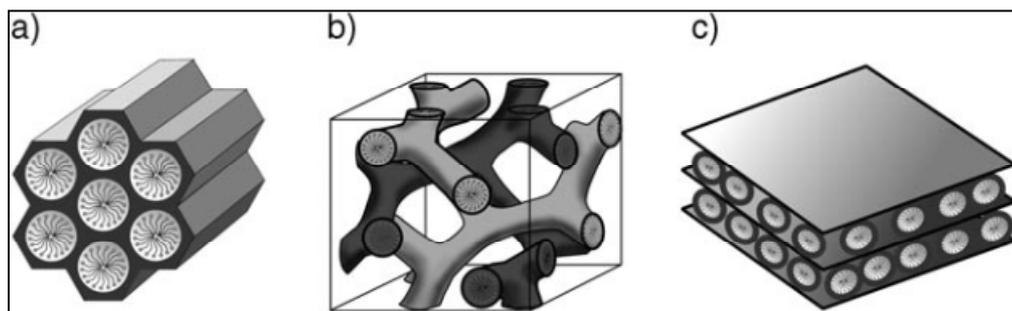


Figure 1.1 : Structure des matériaux mésoporeux M41S :a) MCM-41, b) MCM-48, MCM-50

1.1. Synthèse. Microémulsion directe

La synthèse de silices mésoporeuses s'appuie sur les principes de micro-émulsions directe et inverse. Le phénomène d'émulsion ou de micro-émulsion dépend de la formation de micelles dans la solution. Les micelles sont formées par l'autoorganisation de molécules de tensioactifs à partir de la concentration micellaire critique (CMC). On parle d'émulsion directe lorsqu'il s'agit d'une phase apolaire dispersée dans un solvant polaire (émulsion dite « huile dans eau » ou encore « oil in water », O/W). On parlera donc d'émulsion inverse dans le cas contraire (émulsion dite « eau dans huile » ou « water in oil », W/O). De même, les micelles impliquées dans ces émulsions seront dites directes et inverses (Figure 1.2). La différence essentielle entre micro-émulsion et émulsion consiste en la taille des micelles dont le diamètre est compris entre 10 nm et 500 nm pour une micro-émulsion qui peut atteindre 1 μm dans le cas d'une émulsion.

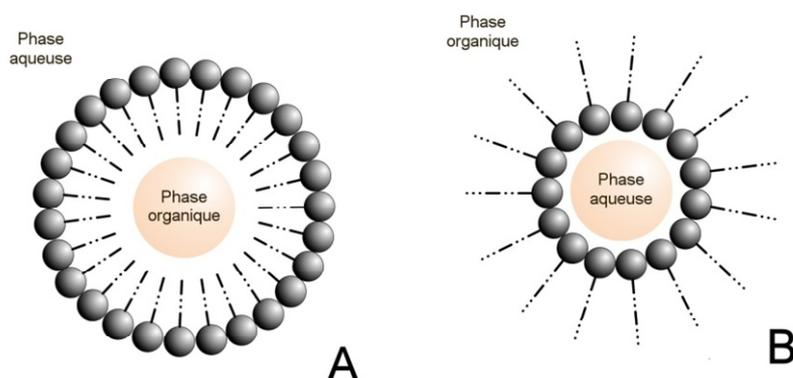


Figure 1.2 : Schématisation (A) d'une micelle directe et (B) d'une micelle inverse

La formation du réseau silicaté des MCM-41, par hydrolyse puis condensation du précurseur silicique (le plus souvent le tétraéthoxysilane) suivant le procédé sol-gel (figure 1.3), s'effectue alors autour des micelles auto-assemblées de tensioactif de type cationique, le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB), en milieu basique. L'élimination du tensioactif, par extraction ou calcination, conduit au matériau final.

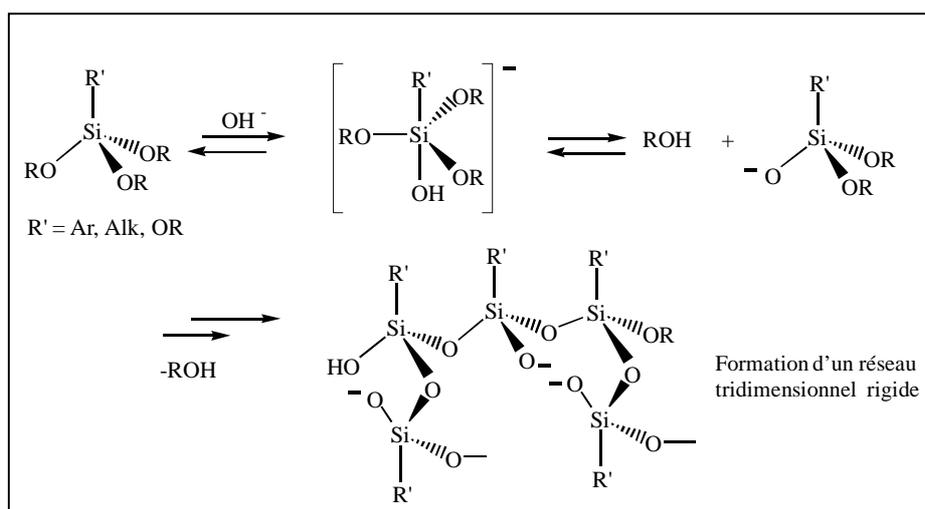


Figure 1.3 : procédé sol-gel

1.2. Mécanisme de formation

L'obtention de ces matériaux est décrite selon plusieurs mécanismes reconnus dans la littérature. Les deux premiers ont été proposés par la Mobil Oil Company^{3,4}. La figure 1.3 représente les deux mécanismes de synthèse proposés par les chercheurs de Mobil en se basant sur la chimie du tensioactif. Le premier mécanisme suppose que les molécules tensioactives forment des micelles puis s'organisent en arrangement hexagonal de cylindres. Enfin, les ions silicates en solution interagissent avec les têtes polaires du tensioactif jusqu'à obtenir la condensation des silicates, ceci conduisant à la formation d'un polymère inorganique. La dernière étape consiste à extraire le tensioactif afin de libérer la porosité et ne conserver ainsi que le squelette silicique poreux. Cette extraction se fait généralement par calcination (figure 1.3.a). Le deuxième mécanisme suggère que l'arrangement hexagonal de la MCM-41 se produit au moment de l'addition du précurseur silicique (figure 1.3.b). Ces mécanismes ont été confirmés depuis par plusieurs groupes⁹⁻¹¹.

Un autre mécanisme a été élaboré par le groupe de Stucky^{12, 13}, il s'agit d'une auto-association des précurseurs de silice et des molécules de tensioactif au cours duquel une phase lamellaire apparaît, puis se transforme progressivement en une phase hexagonale (figure 1.4).

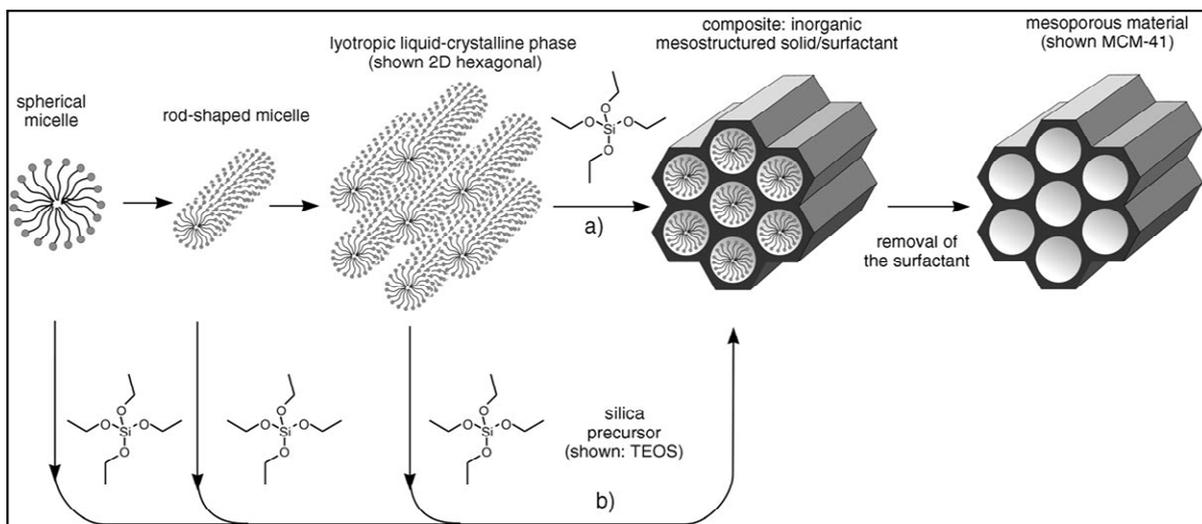


Figure 1.4 : Mécanismes de formation des MCM-41 proposés par Beck¹⁴

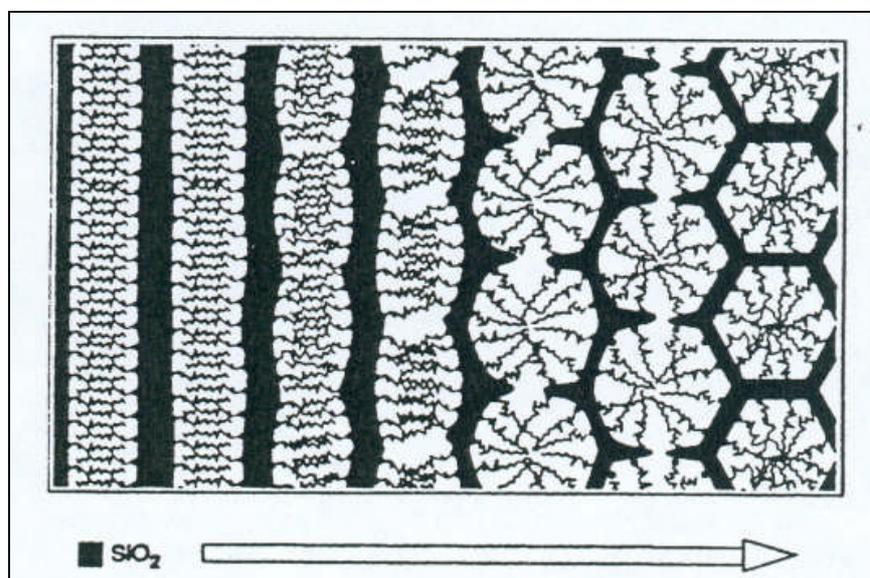


Figure 1.5 : Mécanisme de formation des MCM-41 proposé par le groupe de Stucky¹³

1.3. Nanoparticules de silice mésoporeuses (MSN)

Les silices mésoporeuses de type MCM-41 sont très bien structurées avec un réseau hexagonal de mésopores et présentent un volume poreux important. Cependant le contrôle de la taille des grains et de la polydispersité à l'échelle nanométrique n'est pas aisé. Il aura fallu attendre les premiers travaux de S. Mann en 2001^{15, 16} pour obtenir les premières MSN monodisperses de type MCM-41. Ces nanoparticules ont été préparées par neutralisation rapide au niveau du sol, de l'hydrolyse-polycondensation du TEOS effectuée en milieu basique (NaOH), en présence du tensioactif CTAB. Ces MSN ont un diamètre inférieur à 150 nm et ont été fonctionnalisées par le chromophore 3-(2,4-dinitrophényl-amino)-propyltriéthoxysilane.

Le mécanisme de nucléation de ces MSN a été étudié : il se forme des bâtonnets courts de l'ordre de 9 nm de long et 5 nm de large, constitués de micelles de tensioactif autour desquelles une fine couche de silice-silicates de 1-2 nm est présente. Ces particules primitives s'agrègent en nanoparticules sphériques désordonnées de moins de 50 nm de diamètre. Une réorganisation interne en phase nématique (orientation parallèle de la mésostructure, silice plus tensioactif) conduit alors à une particule mono domaine en forme d'ellipse de l'ordre de 60 nm. Les nanoparticules ordonnées et mésoporeuses sont alors obtenues après élongation du système tensioactif-silice (figure 1.5).

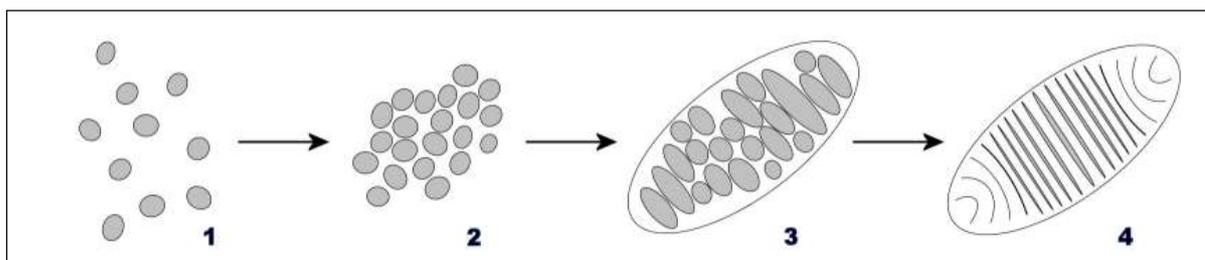


Figure 6 : Mécanisme de nucléation des MSN¹⁷

1 micelles et silices-silicates (5-9 nm), 2 agrégation en nanoparticules sphériques (50 nm), 3 phase nématique (60 nm), 4 MSN (60 nm)

Le tensioactif est éliminé par plusieurs lavages des MSN à l'éthanol. Ce type de synthèse a ensuite été repris par plusieurs groupes^{6, 18-23}, différentes conditions ont été utilisées mais les caractéristiques des MSN obtenues varient très peu avec un diamètre compris entre 100 et 200 nm, un diamètre de pore de 1,8-2,5 nm et une surface spécifique de 800-1000 m²g⁻¹.

2. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules de silice

La fonctionnalisation d'une silice consiste en la modification de sa surface par l'introduction d'un groupement organique, afin de modifier de manière contrôlée ses propriétés chimique et physique. La fonctionnalisation permet de générer de nouveaux matériaux aux propriétés choisies et constitue un enjeu majeur dans de nombreux domaines d'application, comme nous l'expliquerons plus tard.

La surface des silices est constituée de deux formes de silicium : les ponts de siloxane (Si-O-Si) et les groupements silanol (Si-OH). De par leur caractère hydrophobe et leur faible réactivité, les groupements siloxane sont très peu impliqués dans la réactivité de la silice. Ce sont les groupements silanol qui conditionnent la réactivité de la silice et interviennent dans les procédés de fonctionnalisation de la silice. Grâce à cette réactivité et au choix du groupement organique que l'on veut lier à la surface de ces silices, on peut coupler les propriétés physiques de la matrice silicique aux propriétés chimiques spécifiques des molécules organiques choisies. Ainsi cette association permet d'obtenir des matériaux hybrides inorganiques-organiques possédant une certaine stabilité, rigidité, porosité et une réactivité spécifique à des applications recherchées.

Grâce à ses propriétés physiques (surface spécifique, porosité) et chimique (présence de silanol), nous pouvons modifier la surface de la silice par physisorption (imprégnation) ou chimisorption.

2.1. Modification par imprégnation

Elle repose sur des interactions faibles (liaisons électrostatiques, liaisons hydrogène) entre le modifiant organique et la matrice silicatée et implique soit des procédés d'adhésion ou d'interactions électrostatiques, soit l'inclusion du modifiant dans les pores du solide.

La modification de la silice se fait souvent par simple agitation de la solution contenant la molécule organique et la silice, ou bien par l'encapsulation de la molécule organique lors de la formation du réseau silicique en utilisant le procédé sol-gel (pendant la synthèse).

Dans ce cas, les molécules organiques interagissent faiblement avec le squelette inorganique, via des liaisons hydrogène ou avec des interactions des micelles de tensioactifs avec la structure silicique. Ces matériaux, par leurs faibles interactions, peuvent facilement perdre leurs groupements organiques fonctionnels.

2.2. Modification impliquant des liaisons covalentes

Ces méthodes de modifications sont basées sur la réactivité des groupements silanol à la surface de la silice.

2.2.1. Greffage post-synthèse

Cette procédure consiste en l'attachement covalent de la molécule organique sur un support silicaté, organisé ou non, déjà formé. Elle repose sur la condensation des groupements silanol de la surface avec un organosilane, le plus souvent un chlorosilane ou un alkoxyasilane. Parmi les alkoxyasilanes, les composés porteurs des groupements éthoxy et méthoxy sont les plus utilisés en raison de leur plus grande réactivité. La réaction mise en jeu est résumé sur le schéma de la figure 1.6.

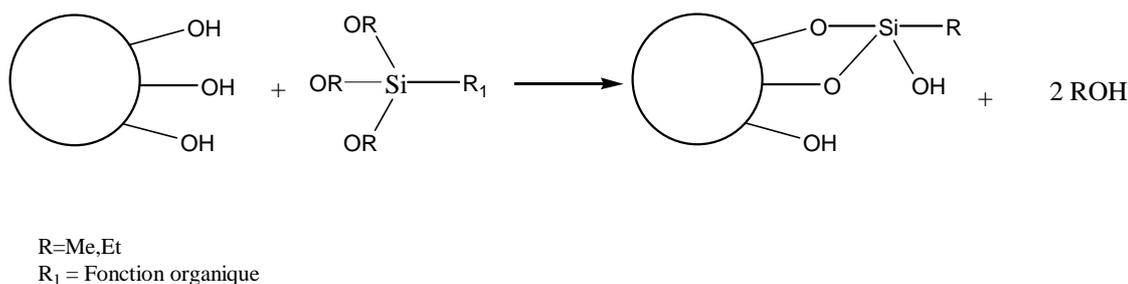


Figure 1.7 : Modification de la surface de la silice par greffage à partir d'alkoxyasilanes

La fonction organique R introduite dans le matériau peut être n'importe laquelle du moment que les conditions de greffage n'engendrent pas sa dégradation ou une altération de sa réactivité puisqu'elle est disponible sous la forme d'organosilane. Les groupements organiques les plus fréquemment introduits sont des fonctions alkyl (-CH₃, -CH₂-CH₃) amino (-NH), cyano (-CN), mercapto (-SH), etc., organosilanes commercialement disponibles. La fonctionnalisation de la silice par des groupements plus complexes, dont les précurseurs silylés ne sont pas disponibles, est réalisable en deux étapes par post-modification des silices aminées ou chlorées. Les fonctions -NH₂ et -Cl jouent alors le rôle d'agents de couplage d'autres molécules.

Dans ce procédé de fonctionnalisation par greffage, le contrôle de la concentration de groupements organiques introduits et leur distribution sont liés aux nombres de groupements silanol à la surface de la silice et à leur accessibilité.

2.2.2. Fonctionnalisation in-situ par co-condensation

Les conditions douces du procédé sol-gel sont compatibles avec les réactions impliquées en chimie organique, donnant ainsi la possibilité d'accéder à des matériaux hybrides par ce biais. Les premières synthèses de ce type ont été décrites par les groupes de Mann ²⁴, Macquarrie ²⁵ et Stein ²⁶. Les silices modifiées synthétisées par cette voie sont alors appelées ORMOSILs (ORganically MODified SILicates). La fonctionnalisation de la silice est réalisée dans ce cas, par co-condensation d'un alkoxyasilane et d'un organoalkoxyasilane porteur du groupement organique selon le processus d'hydrolyse-condensation représenté par la figure 1.7.

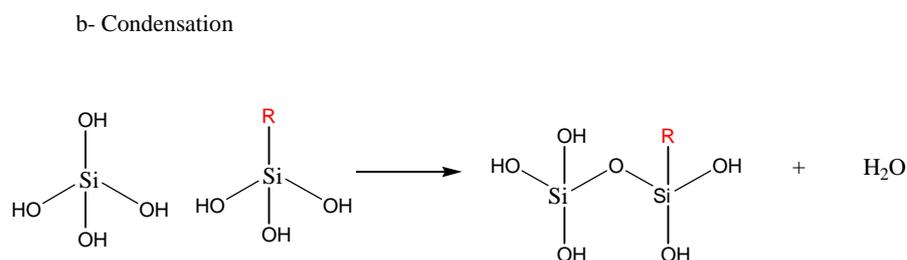
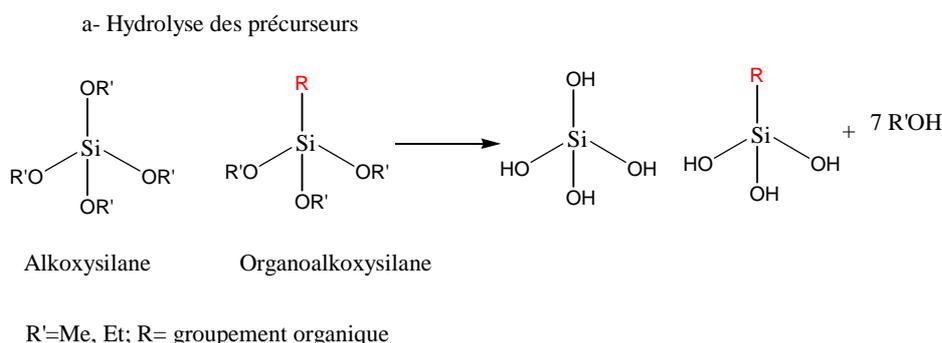


Figure 1.8 : Hydrolyse (a) et co-condensation (b) des molécules d'alkoxyasilane et d'organosilane.

Contrairement à la fonctionnalisation par greffage post-synthèse, cette voie directe permet alors l'incorporation du groupement organique pendant la constitution du réseau silicaté. Cela donne lieu à une distribution plus uniforme des fonctions organiques à la

surface de l'ensemble de la silice par rapport à la méthode du greffage ²⁷. Elle permet également de contrôler la quantité de groupements introduits en modulant le rapport alcoxysilane/organoalcoxysilane employé ²⁸. Néanmoins, un taux trop important des matériaux conduit dans le cas de silices mésostructurées à une perte de leur organisation ²⁹.

3. Applications biologiques des MSN

Du fait de leur faible taille et leurs propriétés spécifiques (distribution étroite de la taille des pores, diamètres modulables, surfaces spécifiques élevées (allant jusqu'à 1000 m²/g) et leur fonctionnalisation avec des molécules variées, les nanoparticules de silice mésoporeuses sont des candidats potentiels pour des applications dans des domaines très variés tels que la catalyse ³⁰⁻³², l'optique ^{33, 34} et les procédés de séparation tels que l'adsorption de métaux ³⁵⁻³⁷.

Les MSN sont actuellement l'objet d'un remarquable intérêt pour de nombreuses utilisations en biologie grâce à leurs caractéristiques importantes telles que leurs pores cylindriques non connectés qui peuvent servir de réservoirs pour des principes actifs, la possibilité de modifier leur surface avec de nombreux groupes fonctionnels. Les applications biologiques des MSN vont du marquage cellulaire ³⁸⁻⁴⁰, de l'imagerie in vivo ⁴¹⁻⁴³ à la délivrance contrôlée de médicaments en passant par la transfection cellulaire ⁴⁴. Dans ce travail nous présenterons l'application des MSN dans la photothérapie dynamique et la délivrance contrôlée de principes actifs.

3.1. MSN pour la délivrance contrôlée de médicaments

L'adressage (ou délivrance spécifique) de molécules thérapeutiques vers un organe, tissu ou cellule malade constitue aujourd'hui un défi majeur pour le traitement des maladies, notamment infectieuses, cancéreuses ou d'origine génétique. En effet de nombreux principes actifs présentent des caractéristiques physicochimiques peu favorables au passage des barrières biologiques qui séparent le site d'administration du médicament de son site d'action. D'autres molécules actives se heurtent à des barrières enzymatiques entraînant leur dégradation et leur métabolisation rapide. L'obtention de concentrations efficaces en thérapeutique au niveau du site d'action ne peut donc se faire qu'au détriment d'une importante déperdition de médicament vers d'autres tissus ou cellules, ce qui occasionne des effets toxiques importants. C'est pour toutes ces raisons que le

développement de vecteurs de médicaments a pris un essor considérable au cours des dernières années. Parmi les vecteurs étudiés, les liposomes, les nanosphères et les nanocapsules sont les plus utilisés.

- Liposomes

Le liposome est une vésicule biodégradable constituée d'une double couche de phospholipides et d'un compartiment aqueux (figure 1.8.A). Certains liposomes peuvent comporter plusieurs bicouches de phospholipides et plusieurs compartiments aqueux. Ils sont apparus en 1965 ⁴⁵ et ont été les premiers à être utilisés comme vecteurs de médicaments. Le principe actif du médicament est encapsulé dans la phase aqueuse quand il est hydrophile, et dans la bicouche lipidique quand il est lipophile.

- Nanosphères

La nanosphère est une nanoparticule constituée d'un polymère formant un réseau, ce polymère étant de préférence biodégradable (figure 1.8.B). Les premières nanosphères ont été développées en 1976 par Birrenbach et Speiser ⁴⁶ en utilisant le polyacrylamide réticulé, un polymère non biodégradable. Par la suite, les systèmes biodégradables, à base de PACA, ont été développés par Couvreur et al dès 1979 ⁴⁷. Dans le cas des nanosphères le médicament est dispersé ou dissous dans la matrice polymère. Son principe actif sera libéré par simple diffusion vers l'extérieur ou à la suite de sa biodégradation dans l'organisme.

- Nanocapsules

La nanocapsule est une nanoparticule de type réservoir. Elle est constituée d'une mince paroi de polymère généralement biodégradable, dont l'épaisseur ne dépasse pas quelques nanomètres, entourant un compartiment huileux ou aqueux qui contient le médicament (figure 1.8.C). Le principe actif est généralement dissous dans le cœur huileux, mais, peut aussi être adsorbé à la surface des nanocapsules.

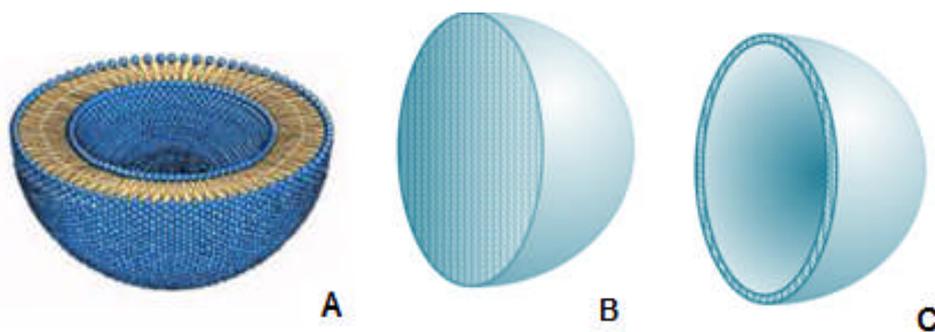


Figure 1.8 : structure de A) liposome, B) nanosphère et C) nanocapsule.

3.1.1. Générations de vecteurs de principe actifs

Le développement des vecteurs de médicaments a connu un essor important au cours de ces dernières années. En fonction de leur biodistribution *in vivo*, ils sont classés en trois générations.

a. Vecteurs de première génération

Les vecteurs de première génération ne présentent aucun greffage en surface (figure 1.9.A). Ils sont généralement administrés par voie intraveineuse et interagissent fortement avec certaines protéines sanguines à cause de la très grande surface spécifique qu'ils développent. Leur surface se recouvre rapidement d'opsonines plasmatiques (protéines spécifiques de récepteurs localisées sur la surface des macrophages comme les immunoglobulines) par création d'interactions hydrophobes fortes. Cela permet aux cellules phagocytaires de les reconnaître comme corps étrangers, de les internaliser par endocytose et finalement de les transporter vers les tissus hépatiques où ils s'accumulent et se concentrent. Cette reconnaissance spécifique des vecteurs de première génération ne permet donc pas de les adresser sélectivement vers des sites autres que le foie, la rate et la moelle osseuse. Elle peut cependant être mise à profit dans le cadre des traitements de métastases hépatiques par exemple.

b. Vecteurs de seconde génération

La nécessité de diriger les médicaments vers des territoires biologiques autres que la sphère hépato-splénique a conduit à modifier la surface des nanovecteurs. Le recouvrement des vecteurs dits de « seconde génération » par des polymères hydrophiles, flexibles et non

ionique tels que les polyéthylène glycols (PEG) et les polysaccharides, empêche les protéines, en particulier les opsonines, de s'adsorber à leur surface (figure 1.9.B). Les vecteurs « pegylés » (recouverts de polyéthylène glycol) présentent un temps de demi-vie plasmique prolongé et une capture hépatique réduite et ne sont plus reconnus par les macrophages de foie, de la rate et de la moelle osseuse. Ils ne se concentrent donc plus spécifiquement au niveau de ces tissus et résident plus longtemps dans la circulation sanguine générale.

c. Vecteurs de troisième génération

Les vecteurs de seconde génération pouvaient grâce à leur temps de demi-vie prolongé dans les milieux sanguins, atteindre les cellules cancéreuses et les foyers infectieux. Cependant, le ciblage spécifique de médicament reste difficile à réaliser ce qui engendre comme effet secondaire une forte toxicité pour les cellules saines.

La notion de ciblage est importante à définir, il s'agit d'augmenter de façon très significative le rapport de la quantité de principe actif ciblée à celle non ciblée. C'est selon ce concept que la 3^{ème} génération de vecteurs a été développée. En effet les cellules cancéreuses sont caractérisées par une surexpression de certains récepteurs ou marqueurs membranaires qui sont habituellement très peu présents, voire complètement absents de la surface des cellules saines. Ces récepteurs surexprimés ne sont pas les mêmes selon le type de cellule tumorale étudiée, mais tous forment des cibles potentielles dans le cadre de la recherche contre le cancer.

Les vecteurs de troisième génération sont donc, non seulement, recouverts de chaînes polymériques hydrophiles mais également de ligands de reconnaissance (anticorps ⁴⁸, peptides ^{49, 50}, sucres ^{51, 52}, acide folique ⁵³⁻⁵⁵) pouvant reconnaître de façon sélective les récepteurs surexprimés à la surface des cellules cibles (figure 1.9.C). La cible biologique (récepteur ou antigène) doit être choisie judicieusement. Elle doit d'une part être présente à la surface des cellules à traiter et d'autre part être internalisée après reconnaissance avec son ligand afin que le principe actif associé puisse être relargué à l'intérieur de la cellule et non à sa surface.

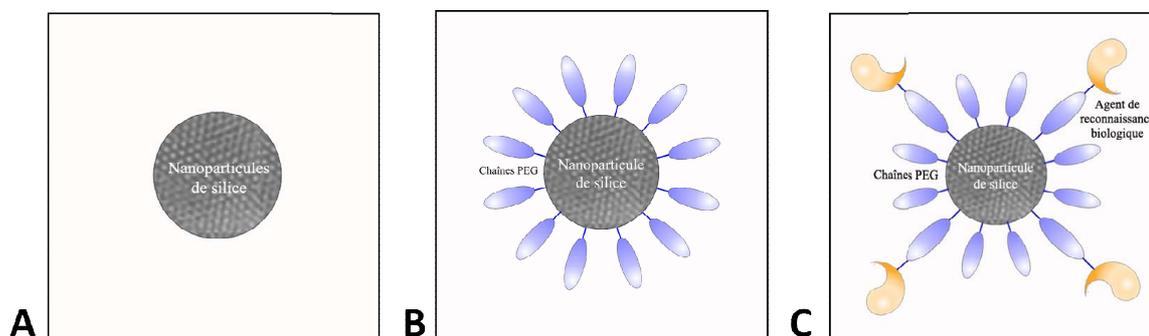


Figure 1.9 : Schématisation des vecteurs de (A) première, (B) seconde et (C) troisième génération ⁵⁶

Depuis quelques années, de nouvelles stratégies de ciblage basées sur le suivi du cheminement du principe actif vers la zone à traiter par imagerie ont été développées, où le relargage du principe actif peut être provoqué via un stimulus externe. Différents stimuli sont envisageables dont les principaux sont le pH, l'oxydoréduction, l'application d'un champ magnétique, la lumière ou encore la température. Grâce à une action rapide et non invasive, ces techniques semblent très prometteuses.

L'éventuel succès de cette stratégie est basé sur la possibilité de construire un vecteur biocompatible permettant de charger une grande quantité de molécules sans en relarguer (c'est-à-dire en libérer) avant d'arriver à destination. Plusieurs prérequis doivent donc être satisfaits par les matériaux afin de pouvoir servir efficacement au relargage de médicaments ^{17, 57}.

- Biocompatibilité du matériau
- Encapsulation des matériaux en de fortes concentrations
- Non-relargage des molécules avant d'arriver aux cellules cibles
- Spécificité vers un type de cellule ou de tissu
- Relargage contrôlé des médicaments avec une vitesse permettant de maîtriser la concentration locale
- Possédant une taille largement inférieure au micron pour permettre leur circulation dans les capillaires sanguins en évitant leur obturation.

Les propriétés chimiques et structurales des MSN répondent bien à ces conditions. En effet les nanoparticules de silice mésoporeuses sont structurées en nid d'abeilles composées de centaines de canaux non interconnectés entre eux, ce qui permet à chaque pore cylindrique de servir de réservoir indépendant de médicament. Plusieurs molécules telles que le paclitaxel ^{58,59}, la doxorubicine ⁶⁰, methoxotrexate ⁶¹, colchicine ⁶², telmisartan ⁶³ et la camptothécine ^{64,65} ont été encapsulées dans des MSN et testées sur des cellules *in vitro* avec succès. Si les deux extrémités des pores des MSN sont closes ou si la solubilité du médicament encapsulé empêche son relargage on parle de concept de « portier » (*gatekeeper*). Ces molécules peuvent être activées par un stimulus externe pour l'ouverture des pores et permettre ainsi le relargage du principe actif.

3.1.2. Travaux de références

Plusieurs travaux publiés au cours de ces dernières années présentent la synthèse et l'étude de certains systèmes nanoparticulaires ayant tout ou partie des caractéristiques requises par les vecteurs de troisième génération. Les travaux les plus intéressants pour notre étude sont les systèmes de délivrance effectués par les groupes de Zink et Lin que nous exposons brièvement dans ce paragraphe.

✓ Travaux de Zink

- Système de délivrance non photoactivable

Le groupe de Zink et al.⁶⁶ a synthétisé des nanoparticules de silice mésoporeuses fonctionnalisées par un agent fluorescent, la fluoresceine isothiocyanate (FITC). Les MSN ainsi synthétisées ont servi de réservoir pour le transport de la camptothécine CPT, un anticancéreux non soluble dans l'eau. L'internalisation de ces nanoparticules dans différentes lignées cellulaires (pancréatiques PANC-1, Capan-1 et AsPc-1, de colon SW 480 et d'estomac MKN 45) a été observée. Le relargage de la CPT ne se produit que dans la partie hydrophobe des cellules et la diffusion des molécules à l'extérieur des pores est gouvernée par le gradient de concentration (figure 1.10). Ces travaux montrent que la mort cellulaire par apoptose est due à la présence de la CPT et non à la toxicité des nanoparticules.

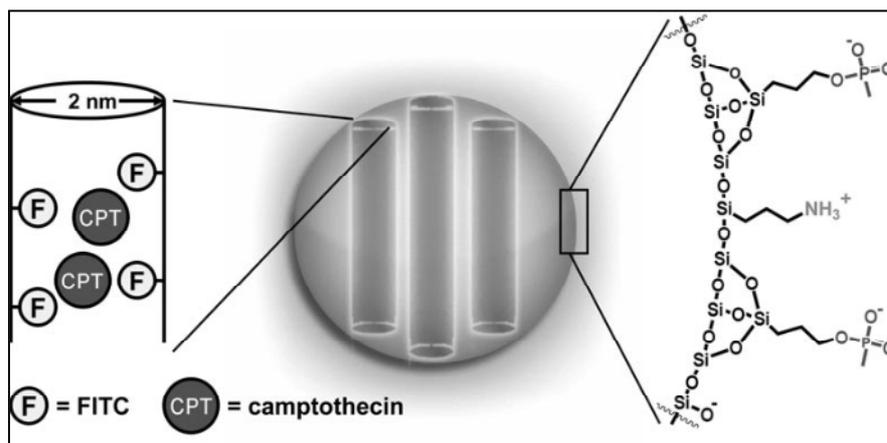


Figure 1.10 : Représentation des FMSNs encapsulant la CPT⁶⁵

- Système de délivrance activable

Le même groupe⁶⁴ a mis au point des systèmes de délivrance contrôlés par la lumière en fonctionnalisant les nanoparticules de silice par une molécule ayant des groupements photolabiles. Un dérivé de l'azobenzène est lié à la surface interne des mésopores de manière covalente via un linker silylé. Le principe de la photoactivation est basé sur l'irradiation des MSN pour induire la photoisomérisation de l'azobenzène, la diminution de la taille de la molécule en passant de l'isomère *trans* à l'isomère *cis* à l'intérieur des pores permet la régulation du relargage de la CPT (figure 1.11). Le relargage des molécules de CPT encapsulées à l'intérieur des pores est influencé significativement par l'intensité de la lumière, la longueur d'onde d'excitation et le temps d'irradiation.

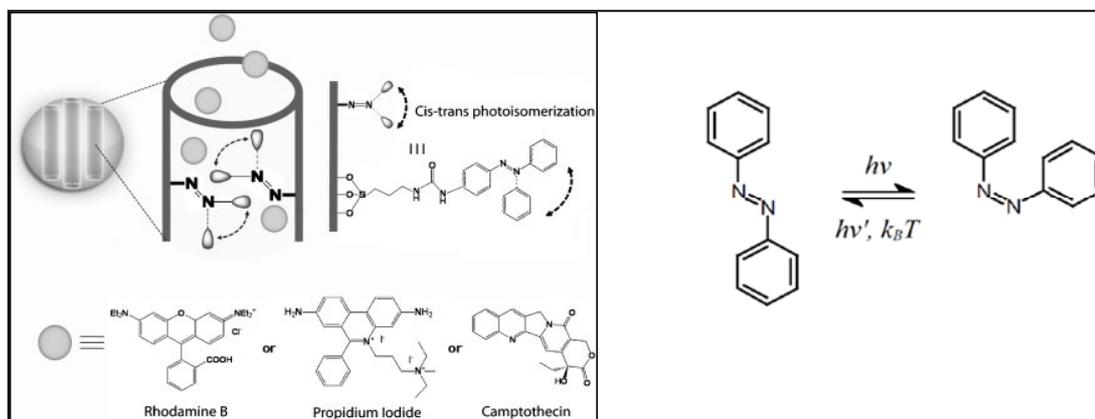


Figure 1.11 : Représentation du mécanisme d'activation du système de délivrance⁶⁴

Le groupe de Stoddart et Zink⁶⁷ a, en outre, élaboré une série de rotaxanes et pseudorotaxanes (molécules constituées d'un anneau moléculaire entourant un fil

moléculaire) qui sont utilisées comme portier. Un [2]-rotaxane, composé d'un dérivé 1,5-dioxynaphtalène (DNPD) agissant comme axe fixe et le cyclobis-(paraquat-p-phénylène) (CBPQT⁴⁺) comme partie macrocyclique mobile du complexe. Un complexe d'iridium étant utilisé comme molécule hôte, un processus de relargage contrôlé de manière redox a été mis en évidence, en utilisant NaBH₃CN comme agent réducteur pour ouvrir la nanovalve (Figure 1.12).

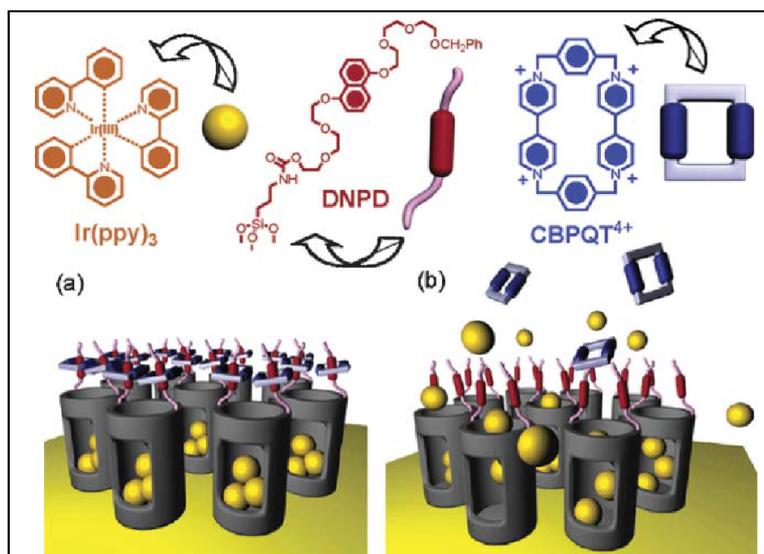


Figure 1.12 : Mécanisme d'ouverture des nanovalves ⁶⁷

(a) Les orifices des nanopores sont couverts de pseudorotaxane (formée de DNPD et CBPQT⁴⁺) qui piège les molécules lumineuses ($Ir(ppy)_3$) à l'intérieur des nanopores, (b) Après avoir accompli une réduction, les molécules hôtes sont libérées.

Ce concept a pu être amélioré en développant un système de nanovalve réversible ⁶⁸, ayant deux sites de reconnaissance sur « l'altère » : le [2]-rotaxane R⁴⁺. Ces deux sites de reconnaissance sont le tetrathiafulvalene (TTF) et le 1,5-dioxynaphtalène (DNP).

Le perchlorate ferrique et l'acide ascorbique ont été utilisés afin d'oxyder et de réduire le complexe. Le principe est le suivant, la partie mobile de la molécule (CBPQT⁴⁺) préfère encercler le site de reconnaissance TTF plutôt que le site DNP, lequel se situe loin des pores d'entrée, laissant ainsi le pont ouvert. L'oxydation des deux électrons de la TTF avec le perchlorate ferrique, forme TTF²⁺, qui déstabilise ses interactions avec le macrocycle. Cela provoque le mouvement du macrocycle vers le site de reconnaissance DNP qui se situe proche des pores d'entrée, fermant la nanovalve. Ce processus est réversible, c'est en

faisant une réduction avec l'acide ascorbique que la partie mobile retrouve sa place, de manière à débloquer les pores.

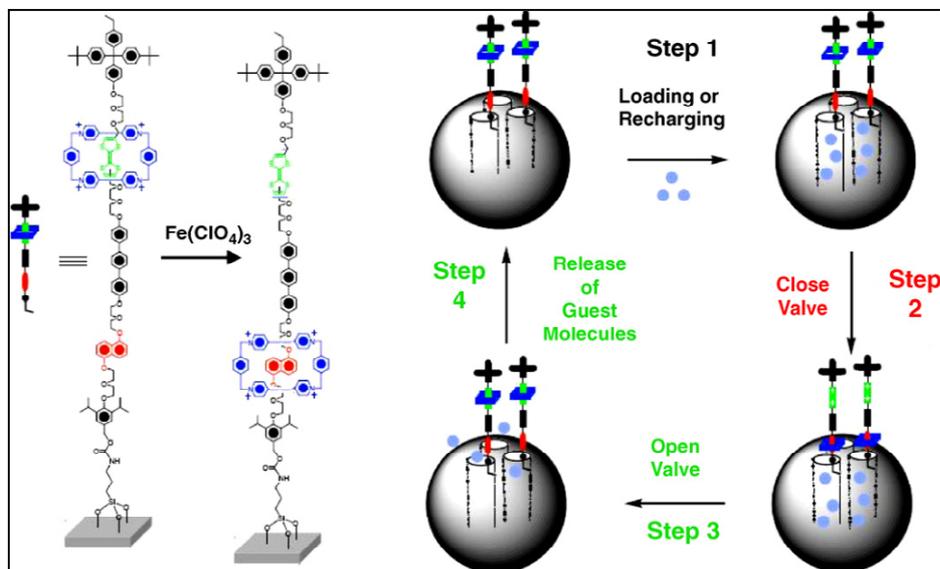


Figure 1.13 : mécanisme d'ouverture et fermeture des nanovalves réversibles⁶⁸

Le modèle a ensuite évolué vers un système biocompatible et modulé par changement de pH ⁶⁹. Ces nanovalves sont basées sur des interactions ion-dipôle entre le polymacrocyclé cucurbit[6]uril et des tiges bisammonium attachées à des MSN chargées de molécules fluorescentes (Rhodamine B) permettant le suivi du relargage en fonction de la variation de pH.

✓ Travaux de Lin

Le groupe de Lin ⁷⁰ a développé le même système de délivrance de médicaments contrôlé de manière redox (Figure 1.12). Ce système est basé sur des MSN recouvertes de nanoparticules de sulfure de cadmium (CdS). Ces particules sont attachées aux MSN via un pont disulfure qui est chimiquement labile et qui peut être coupé par différents agents réducteurs comme le mercaptoéthanol. La vancomycine et l'adénosine triphosphate (ATP) ont été encapsulées dans les pores de ces MSN. Les capacités des nanoparticules de CdS comme « portiers » ont été testées en agitant les MSN modifiées dans une solution de tampon phosphate. Après 12h d'agitation, aucune fuite des agents encapsulés n'a pu être détectée. Par contre, l'ajout d'un agent réducteur, capable de rompre le lien disulfure liant

les nanoparticules CdS aux MSN, permet la libération d'une fraction importante de vancomycine, ce qui démontre l'efficacité de la méthode.

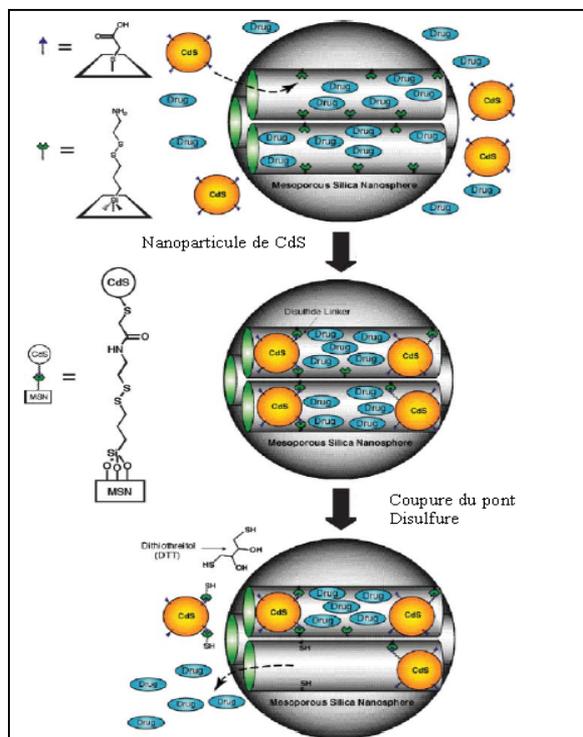


Figure 1.14 : Représentation d'une MSN dont les pores encapsulent des molécules hôtes (vancomycine) et sont bouchés par des portiers (CdS)⁷⁰

3.2. Nanoparticules et photothérapie dynamique

La thérapie photodynamique PDT est une technique originale et prometteuse de traitement de certaines maladies dermatologiques⁷¹, ophtalmologiques^{72, 73} et en oncologie⁷⁴ sans présenter les inconvénients des autres traitements (chimiothérapie, la radiothérapie, etc.). Elle peut venir en remplacement ou complément des traitements plus classiques. Elle est basée sur l'association d'un photosensibilisateur (PS) et d'une source de lumière. Si l'un des deux agents est absent il n'y a pas d'action thérapeutique. La longueur d'onde de la lumière doit correspondre à une longueur d'onde absorbée par le sensibilisateur qui est alors activé. Une réaction photochimique impliquant la formation d'espèces réactives de l'oxygène est responsable d'une destruction des tissus tumoraux (figure 1.13).

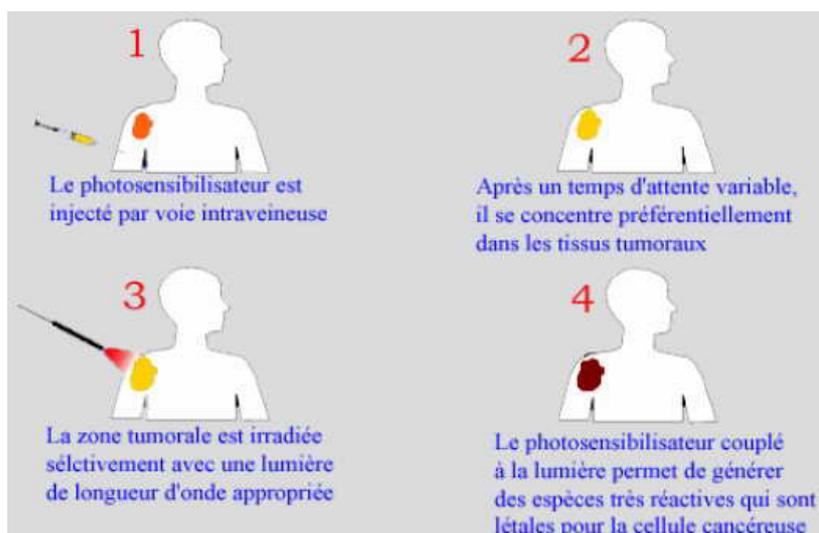


Figure 1.15 : Principe de la PDT

3.2.1. Historique

Les effets thérapeutiques de la lumière sont connus depuis l'antiquité. Les égyptiens utilisaient déjà la lumière combinée à des substances naturelles pour traiter des maladies de peau. Ce n'est qu'à la fin du XIX^{ème} siècle que le concept de photosensibilisation apparaît lorsque Oscar Raab décrit pour la première fois le phénomène phototoxique en associant un colorant (l'acridine) à la lumière ⁷⁵. En 1904, Tappeiner suppose que l'oxygène est essentiel pour le processus et introduit le terme « d'action photodynamique ». Bien que de nombreuses recherches ont été menées et un nouveau sensibilisateur (hématoporphyrine) a été identifié puis modifié en hématoporphyrine dérivé (HpD) ⁷⁶, les premières séries d'applications cliniques de la PDT n'ont toutefois pas donné les résultats escomptés.

Ce n'est qu'au cours des années 1970, avec les expérimentations de Dougherty, que la PDT connaît un véritable essor. Des traitements à base d'hématoporphyrine dérivé HpD et de lumière rouge ont montré de très bons résultats lors d'études précliniques et cliniques ^{77, 78}.

En 1983, la fraction active de l'HpD responsable des propriétés photosensibilisantes a été identifiée par Dougherty. Il montra qu'il s'agissait de l'éther ou de l'ester de dihématoporphyrine. La fraction purifiée de « l'hématoporphyrine dérivée » est commercialisée sous le nom de Photofrin II[®] et fut agréée en PDT dans les applications cliniques au traitement oncologique. En raison d'une efficacité pratique restreinte et du fait que son

application entraînait à long terme une photosensibilisation cutanée, d'autres photosensibilisateurs ont été développés et investigués, parmi lesquels le Foscan® ou la méso-tétra hydroxyphenylchlorine (mTHPC) et l'acide 5-aminolévulinique (5 ALA) (figure 1.14) ^{79, 80} .

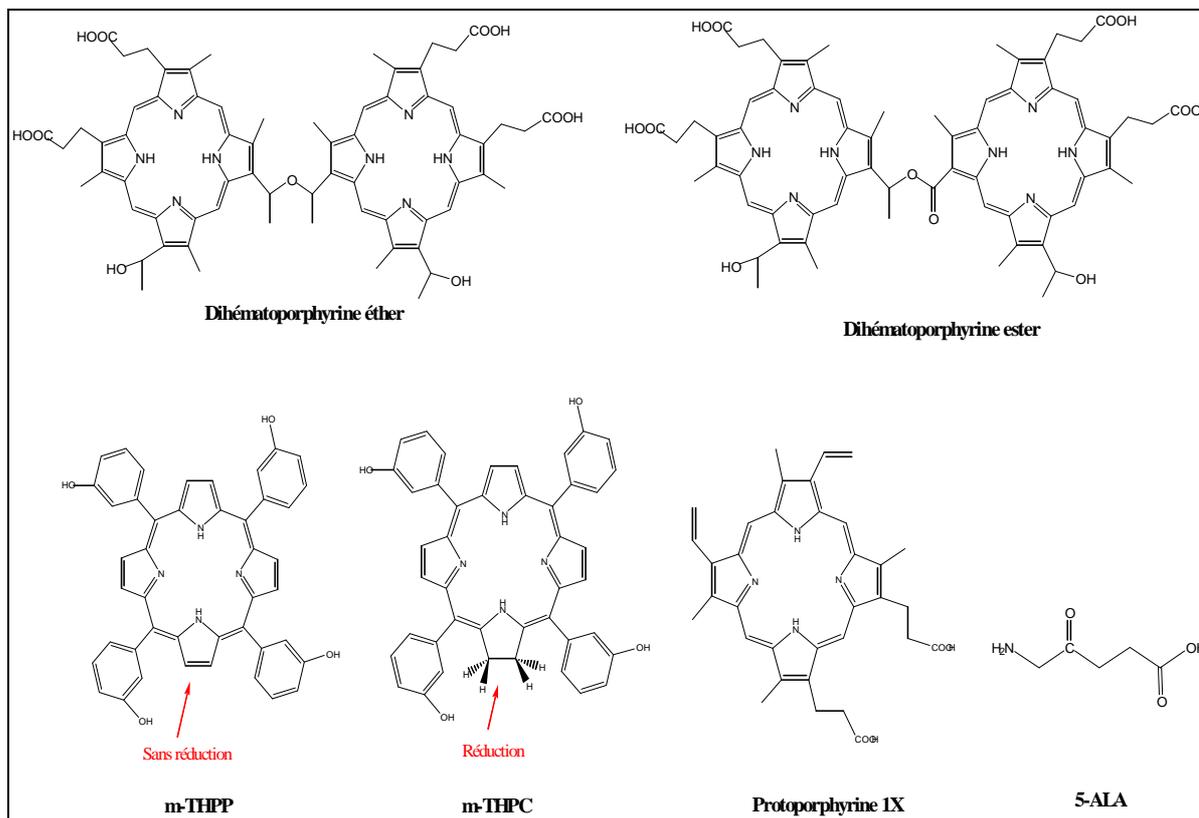


Figure 1.16: Photosensibilisateurs utilisés en PDT

3.2.2. Phototoxicité

La photosensibilisation peut être définie comme un processus au cours duquel l'activation par la lumière d'un chromophore (le photosensibilisateur) va modifier chimiquement une molécule différente (le substrat). Idéalement, le photosensibilisateur devrait jouer un rôle de catalyseur : il devrait se régénérer suite à son interaction avec le substrat et ne devrait pas interférer avec l'issue de la réaction. En photobiologie et en photomédecine, la terminologie « action photodynamique » est réservée aux réactions de photosensibilisation consommant de l'oxygène moléculaire.

Le PS est initialement dans son état fondamental, qui est un état singulet ($^1\text{PS}_0$). L'absorption d'un photon (d'énergie $h\nu$) provenant d'un rayonnement lumineux de longueur d'onde appropriée le fait passer à un état électronique excité ($^1\text{PS}_1^*$, $^1\text{PS}_2^*$, $^1\text{PS}_3^*$...), puis, dans tous les cas, à l'état électronique excité de plus bas énergie $^1\text{PS}_1^*$, par une succession de relaxations vibrationnelles (conversion interne, CI). Il peut alors se produire un retournement de spin, qui, suite à de nouvelles CI, va mener à la formation de l'état triplet excité du PS $^3\text{PS}_1^*$. On parle de conversion inter système (CIS). Le retour à l'état fondamental correspond à une transition entre un état triplet excité et l'état fondamental, transition dite interdite. Par conséquent, la durée de vie de l'état triplet $^3\text{PS}_1^*$ est beaucoup plus longue (1 μs à 1 s, en fonction de l'environnement de la molécule) que celle de l'état singulet (de l'ordre de la ns). Le PS dans son état triplet est donc très réactif et peut interagir avec les molécules qui l'avoisinent. Il est à l'origine des réactions photochimiques de type I et II.

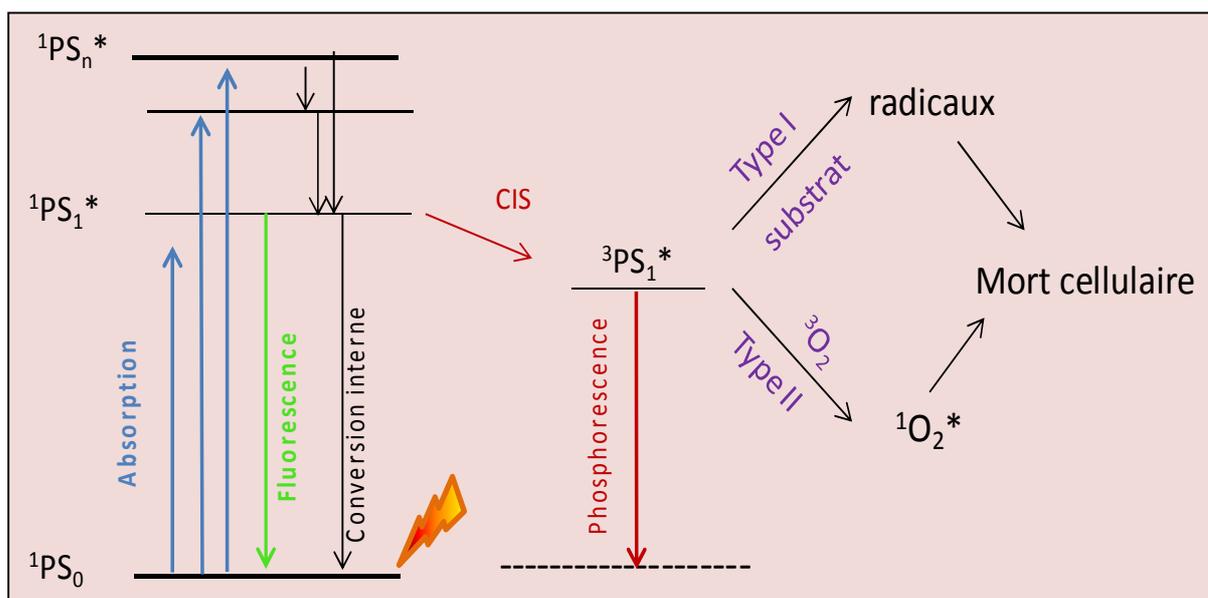


Figure 1.17 : Mécanisme photochimique de la PDT (Diagramme de Jablonski)

Au cours de la réaction de type I, des radicaux libres ou des ions radicalaires sont produits, suite au transfert d'un électron ou d'un atome d'hydrogène entre le PS à l'état triplet et le substrat S pour former des radicaux et des ions radicalaires conduisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène.

Les réactions de type II impliquent un transfert d'énergie du PS à l'état triplet vers l'oxygène moléculaire qui, du fait de la présence de deux électrons célibataires dans sa couche externe, se trouve à l'état triplet à son état fondamental ($^3\text{O}_2$) et le PS retourne à l'état fondamental.

L'émission de fluorescence est utilisée dans un but diagnostique afin de repérer la tumeur de façon précise et dans le but de délimiter la zone de traitement. Par contre, la conversion intersystème est utilisée dans un but thérapeutique suivant les réactions de type I et II. Un PS sera donc, d'autant plus intéressant pour la PDT que son rendement quantique en état triplet sera élevé et que la durée de vie de cet état sera longue⁸¹.

3.2.3. Réactions d'oxydation générées par l'oxygène singulet en milieu cellulaire

La cellule contient un nombre de biomolécules potentiellement oxydables par l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). Les acides aminés en particulier la cystéine, tyrosine et tryptophane sont les plus sensibles à l'oxydation ce qui place la classe abondante des protéines comme première cible de $^1\text{O}_2$. Les lipides insaturés comme les acides gras poly-insaturés constituent également des substrats primordiaux pour $^1\text{O}_2$ généré dans les structures membranaires.

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) en réagissant avec les protéines ou les lipides insaturés produit des hydroperoxydes qui sont des espèces réactives de l'oxygène, secondaires par rapport à celles qui peuvent être formées par réaction de type I. Ces espèces réactives de l'oxygène secondaires peuvent être converties en espèces radicalaires pouvant produire des dommages oxydants majeurs. Ainsi, des dommages de l'ADN peuvent être induits après peroxydation par $^1\text{O}_2$ des lipides insaturés de la membrane, et la peroxydation des protéines par $^1\text{O}_2$ peut conduire à l'inactivation de certaines enzymes⁸².

3.2.4. Photosensibilisateurs idéaux en photothérapie dynamique

Un photosensibilisateur, pour pouvoir être employé *in vitro* doit posséder plusieurs qualités, et notamment, il doit pouvoir être vectorisé vers les tissus cancéreux, il doit être hydrosoluble, de structure chimique parfaitement définie et de synthèse reproductible, être non toxique à l'obscurité, posséder un fort rendement de formation de l'oxygène singulet, être stable vis-à-vis des enzymes circulantes et de la lumière d'irradiation afin d'atteindre les cellules tumorales cibles intactes, et ne pas être dégradé trop rapidement pendant l'illumination.

La profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus biologiques va dépendre de la longueur du rayonnement utilisé et de la nature du tissu. Selon la richesse du tissu en molécules susceptibles d'absorber la lumière incidente (hémoglobine, mélanine, eau, etc.), un photosensibilisateur devra donc posséder un spectre d'absorption dont les pics seront aussi éloignés que possible des bandes d'absorption des différentes molécules biologiques, en particulier de l'hémoglobine (figure 1.16).

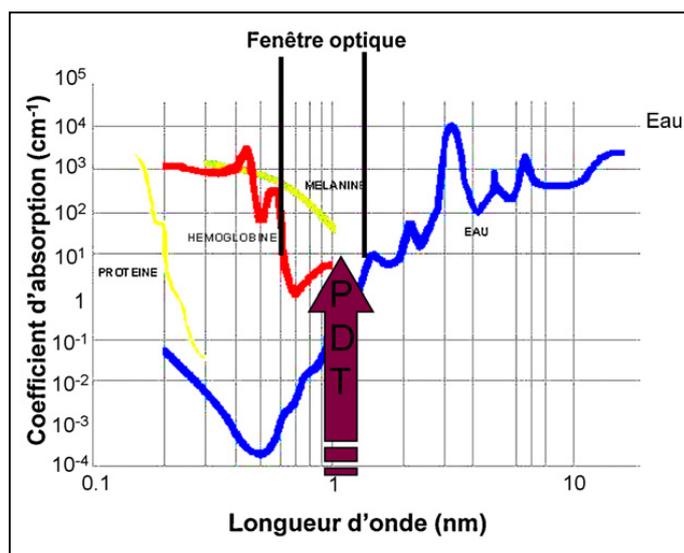


Figure 1.18 : Profils spectraux des principaux composants endogènes ⁸³

3.2.5. Porphyrines

a. Structure

Les porphyrines sont des macrocycles fortement conjugués constitués de quatre unités pyrroliques liées entre elles par des ponts méthine. Le squelette de base est aromatique et l'aromaticité est due, conformément à la règle de Hückel, à un système de 18 électrons π (figure 1.17). De ce fait, ces macrocycles sont d'une part particulièrement stables et d'autre part très fortement colorés. En outre, les porphyrines se comportent comme des diacides ou des dibases, et elles peuvent être métallées par presque plusieurs métaux. Dans le premier cas, la porphyrine est dite « base libre », dans le second cas, elle est dite « métallée ».

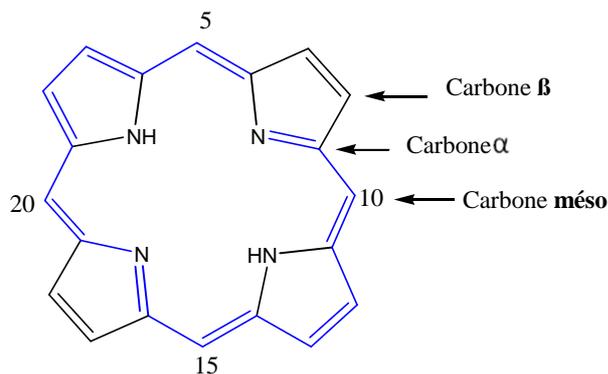


Figure 1.19 : Mise en évidence du système π à 18 électrons et nomenclature IUPAC des carbones caractéristiques d'une porphyrine libre

b. Propriétés spectrales

Si l'on recherche l'origine étymologique du mot " porphyrine ", on constate qu'il dérive du mot grec " *porphura* " qui désignait dans l'antiquité la teinte pourpre. Il n'y a donc rien d'étonnant à ce que les pionniers de la chimie des macrocycles tétrapyrroliques les aient dénommés ainsi compte tenu de leur très forte coloration. En effet, parce que les porphyrines possèdent un système d'électrons π fortement conjugué, ces molécules absorbent dans le domaine du visible et présentent un spectre d'absorption très caractéristique. Il résulte de transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ et se compose d'une bande intense ($\epsilon > 100000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) entre 390 et 430 nm (proche UV) appelée bande de Soret ou bande B et de quatre autres bandes situées entre 480 et 700 nm (Visible) d'intensité dix à vingt fois plus faible appelées bandes Q (figure 1.18).

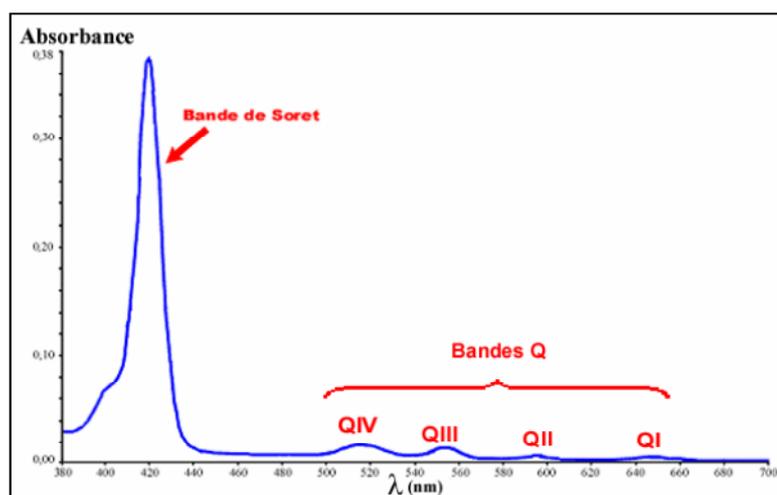


Figure 1.20 : Spectre UV-visible caractéristique d'une porphyrine base libre

c .Applications

Les porphyrines et leurs dérivés constituent une classe très importante de composés biologiques en raison de leur implication dans de nombreux processus d'oxydoréduction. Elles sont responsables de la fixation de l'oxygène par l'hémoglobine ou la myoglobine, et de la photosynthèse chez les plantes. En raison de leur vaste domaine d'applications, le développement de nouvelles stratégies de synthèse de ces composés n'a cessé de croître ces dernières années. Les porphyrines sont utilisées comme catalyseurs régiosélectifs d'hydroxylation ⁸⁴, d'époxydation ⁸⁵, ou encore en tant que matériaux pour l'optoélectronique et la photovoltaïque ⁸⁶⁻⁸⁹. La photothérapie dynamique (PDT) ou photochimiothérapie qui est une technique en plein développement appliquée au traitement des cancers, est un autre domaine d'application de ces macrocycles tétrapyrroliques et fera l'objet du chapitre 2.

3.2.5. Travaux de référence

Plusieurs travaux ont rapporté l'utilisation de photosensibilisateurs dans la PDT, peu sont liés à l'utilisation de nanoparticules de silice pour l'encapsulation de photosensibilisateurs. Dans ce paragraphe, nous présentons les travaux utilisant les MSN pour l'encapsulation de photosensibilisateurs par liaison chimique.

✓ Travaux de Prasad

L'équipe de Prasad, dans son laboratoire, a développé une formulation d'un photosensibilisateur hydrophobe (2-divinyl-2-(1-hexyloxyethyl) ; HPPH) pour la PDT ⁹⁰. Les nanoparticules de silice mésoporeuses sont synthétisées par coprécipitation du photosensibilisateur couplé avec l'iodobenzyl-pyrosilane et le précurseur vinyltriéthoxysilane VTES par microémulsion en utilisant le tween-80 comme tensioactif (figure 1.19).

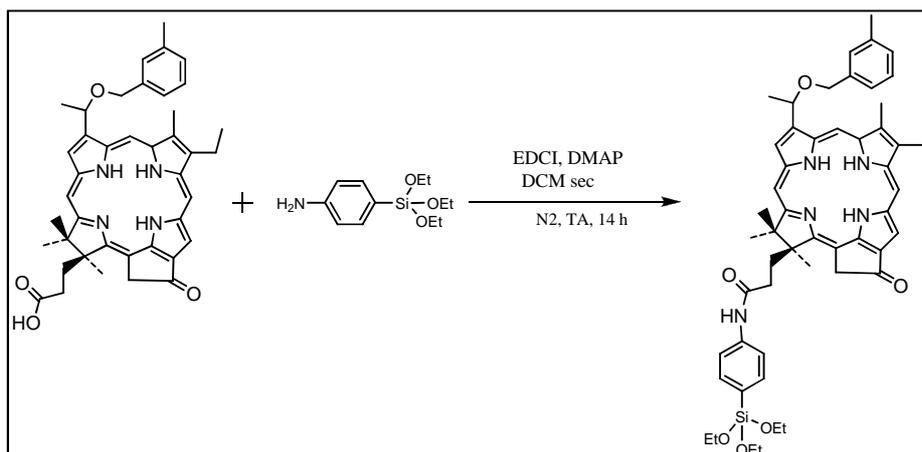


Figure 1.19 : Silylation du photosensibilisateur

Les nanoparticules obtenues sont sphériques et monodisperses de 20 nm de diamètre environ. Ces travaux montrent que la génération de l'oxygène singulet par le photosensibilisateur n'est pas affectée par ce type de nanoparticules. L'efficacité de ces nanoparticules en PDT a été démontrée en testant la viabilité de cellules cancéreuses humaines de type colon-26 après excitation des nanoparticules à 665 nm.

✓ Travaux de Mou

Le groupe de Mou ⁹¹ a synthétisé des nanoparticules mésoporeuses conjuguées avec un photosensibilisateur (protoporphyrine IX) par liaison covalente (figure 1.20), les MSN obtenues sont monodisperses de taille de 110 nm.

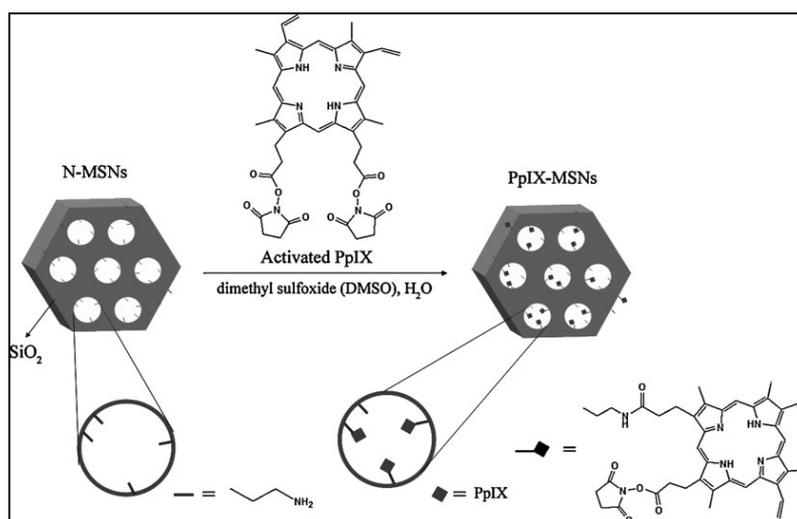


Figure 1.21: Schéma de synthèse des MSN-PpIX

Les travaux ont montré que les porphyrines conservent leur propriété photochimique à l'intérieur des pores de la silice et sont capables de générer de l'oxygène singulet. Leur efficacité a été testée sur des lignées cellulaires du cancer de sein HeLa.

Il est à noter que ces études n'incluent pas l'utilisation d'un agent de ciblage comme le prévoit notre étude. Cela permettrait de confirmer la sélectivité de l'adressage des particules vers les cellules présentant sur leur surface une surexpression du récepteur d'intérêt, ici, celui du mannose.

4. Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre une revue bibliographique sur la synthèse des nanoparticules mésoporeuses de silice (MSN), la fonctionnalisation de leurs surfaces ainsi que leurs applications dans le domaine de la délivrance contrôlée de principes actifs des médicaments et en thérapie photodynamique. Il ressort de cette étude que:

- la synthèse de ces matériaux par la voie sol-gel permet de préparer des nanoparticules mésoporeuses et ordonnées avec une taille des pores adéquate et une surface spécifique suffisamment élevée pour trouver des applications dans divers domaines.
- la modification de la surface des nanoparticules par voie covalente, et en particulier la fonctionnalisation in situ, permet d'encapsuler dans les pores des nanoparticules des groupements organiques avec une distribution uniforme à la surface du réseau silicaté.
- leurs applications biologiques montrent que les MSN présentent des propriétés particulières dans la vectorisation sélective de médicaments vers les cellules cibles et en thérapie photo dynamique.

Bibliographie

1. V. Chiola, J. E. Leonowicz et C. D. Vanderpool, U S Patent, 1971.
2. F. Di Renzo, H. I. n. Cambon et R. Dutartre, *Microporous Materials*, **1997**, 10, 283-286.
3. J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T. W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard et et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 10834-10843.
4. C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli et J. S. Beck, *Nature*, **1992**, 359, 710-712.
5. Q. Huo, R. Leon, P. M. Petroff et G. D. Stucky, *Science*, **1995**, 268, 1324-1327.
6. F. Chen, L. Huang et Q. Li, *Chem. Mater.*, **1997**, 9, 2685-2686.
7. Q. Huo, D. I. Margolese et G. D. Stucky, *Chem. Mater.*, **1996**, 8, 1147-1160.
8. P. T. Tanev et T. J. Pinnavaia, *Supramolecular Science*, **1998**, 5, 399-404.
9. C.-Y. Chen, H.-X. Li et M. E. Davis, *Microporous Materials*, **1993**, 2, 17-26.
10. J. S. Beck, J. C. Vartuli, G. J. Kennedy, C. T. Kresge, W. J. Roth et S. E. Schramm, *Chemistry of Materials*, **1994**, 6, 1816-1821.
11. J. C. Vartuli, K. D. Schmitt, C. T. Kresge, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, S. B. McCullen, S. D. Hellring, J. S. Beck et J. L. Schlenker, *Chemistry of Materials*, **1994**, 6, 2317-2326.
12. G. D. Stucky, A. Monnier, F. Schuth, Q. Huo, D. Margolese, D. Kumar, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke et B. F. Chmelka, *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Tech. Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1994**, 240, 187-200.
13. A. Monnier, F. Schuth, Q. Huo, D. Kumar, D. Margolese, R. S. Maxwell, G. D. Stucky, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke et B. F. Chmelka, *Science*, **1993**, 261, 1299-1303.
14. F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell et M. Froeba, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2006**, 45, 3216-3251.
15. C. E. Fowler, D. Khushalani, B. Lebeau et S. Mann, *Adv. Mater.*, **2001**, 13, 649-652.
16. S. Sadasivan, C. E. Fowler, D. Khushalani et S. Mann, *Angew Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2151-2153.
17. J. O. Durand et L. Raehm, *Techniques de l'ingénieur*, **2009**, NM 4 050, 1-9.
18. H.-P. Lin et C.-P. Tsai, *Chem. Lett.*, **2003**, 32, 1092-1093.

19. Y.-S. Lin, C.-P. Tsai, H.-Y. Huang, C.-T. Kuo, Y. Hung, D.-M. Huang, Y.-C. Chen et C.-Y. Mou, *Chem. Mater*, **2005**, 17, 4570-4573.
20. I. Slowing, B. G. Trewyn et V. S. Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 14792-14793.
21. J. Lu, M. Liong, J. I. Zink et F. Tammanoi, *Small*, **2007**, 3, 1341-1346.
22. N. Baccile, J. Maquet et F. Babonneau, *Comptes Rendus Chimie*, **2006**, 9, 478-484.
23. M. Manzano, V. Aina, C. O. Arean, F. Balas, V. Cauda, M. Colilla, M. R. Delgado et M. Vallet-Regi, *Chem. Eng. J. (Amsterdam, Neth.)*, **2008**, 137, 30-37.
24. S. L. Burkett, S. D. Sims et S. Mann, *Chemical Communications*, **1996**, 1367-1368.
25. D. J. Macquarrie, *Chemical Communications*, **1996**, 1961-1962.
26. M. H. Lim, C. F. Blanford et A. Stein, *Journal of the American Chemical Society*, **1997**, 119, 4090-4091.
27. M. H. Lim et A. Stein, *Chemistry of Materials*, **1999**, 11, 3285-3295.
28. L. Mercier et T. J. Pinnavaia, *Chemistry of Materials*, **1999**, 12, 188-196.
29. A. Walcarius et C. Delacote, *Chemistry of Materials*, **2003**, 15, 4181-4192.
30. M. Masteri-Farahani, F. Farzaneh et M. Ghandi, *Catalysis Communications*, **2007**, 8, 6-10.
31. S. Shylesh et A. P. Singh, *Journal of Catalysis*, **2004**, 228, 333-346.
32. H. A. Oskooie, M. M. Heravi, N. Karimi et M. H. Monjezy, *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry*, **2011**, 41, 826 - 831.
33. Y. Fazaeli, M. M. Amini, E. Mohajerani, M. Sharbatdaran et N. Torabi, *Journal of Colloid and Interface Science*, **2010**, 346, 384-390.
34. Y. Leydet, F. J. Romero-Salguero, C. s. Jimenez-Sanchidriain, D. M. Bassani et N. D. McClenaghan, *Inorganica Chimica Acta*, **2007**, 360, 987-994.
35. D. Perez-Quintanilla, I. del Hierro, M. Fajardo et I. Sierra, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2006**, 89, 58-68.
36. M. Puanggam et F. Unob, *Journal of Hazardous Materials*, **2008**, 154, 578-587.
37. K. Dimos, P. Stathi, M. A. Karakassides et Y. Deligiannakis, *Microporous and Mesoporous Materials*, **2009**, 126, 65-71.
38. E. Chelebaeva, L. Raehm, J. O. Durand, Y. Guari, J. Larionova, C. Guerin, A. Trifonov, M. Willinger, K. Thangavel, A. Lascialfari, O. Mongin, Y. Mir et M. Blanchard-Desce, *J. Mater. Chem.*, **2010**, 20, 1877-1884.

39. Y. S. Lin, C. P. Tsai, H. Y. Huang, C. T. Kuo, Y. Hung, D. M. Huang, Y. C. Chen et C. Y. Mou, *Chem. Mater.*, **2005**, 17, 4570-4573.
40. D.-M. Huang, Y. Hung, B.-S. Ko, S.-C. Hsu, W.-H. Chen, C.-L. Chien, C.-P. Tsai, C.-T. Kuo, J.-C. Kang, C.-S. Yang, C.-Y. Mou et Y.-C. Chen, *Faseb J.*, **2005**, 19, 2014-2016.
41. S. Kim, T. Y. Ohulchansky, H. E. Pudavar, R. K. Pandey et P. N. Prasad, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 2669-2675.
42. S.-H. Wu, Y.-S. Lin, Y. Hung, Y.-H. Chou, Y.-H. Hsu, C. Chang et C.-Y. Mou, *ChemBioChem*, **2008**, 9, 53-57.
43. H.-M. Liu, S.-H. Wu, C.-W. Lu, M. Yao, J.-K. Hsiao, Y. Hung, Y.-S. Lin, C.-Y. Mou, C.-S. Yang, D.-M. Huang et Y.-C. Chen, *Small*, **2008**, 4, 619-626.
44. D. R. Radu, C.-Y. Lai, K. Jeftinija, E. W. Rowe, S. Jeftinija et V. S. Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 13216-13217.
45. A. D. Bangham, M. M. Standish et J. C. Watkins, *Journal of Molecular Biology*, **1965**, 13, 238-IN227.
46. G. Birrenbach et P. P. Speiser, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1976**, 65, 1763-1766.
47. P. Couvreur, M. Roland et P. P. Speiser, BE 869107, 1979.
48. J. Yang, E.-K. Lim, H. J. Lee, J. Park, S. C. Lee, K. Lee, H.-G. Yoon, J.-S. Suh, Y.-M. Huh et S. Haam, *Biomaterials*, **2008**, 29, 2548-2555.
49. W. Cai, D.-W. Shin, K. Chen, O. Gheysens, Q. Cao, S. X. Wang, S. S. Gambhir et X. Chen, *Nano Letters*, **2006**, 6, 669-676.
50. J. Gao, K. Chen, R. Xie, J. Xie, Y. Yan, Z. Cheng, X. Peng et X. Chen, *Bioconjugate Chemistry*, **2010**, 21, 604-609.
51. J. Peng, K. Wang, W. Tan, X. He, C. He, P. Wu et F. Liu, *Talanta*, **2007**, 71, 833-840.
52. D. Brevet, M. Gary-Bobo, L. Raehm, S. Richeter, O. Hocine, K. Amro, B. Loock, P. Couleaud, C. Frochot, A. Morere, P. Maillard, M. Garcia et J.-O. Durand, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)*, **2009**, 1475-1477.
53. H. Chen, R. Ahn, J. Van den Bossche, D. H. Thompson et T. V. O'Halloran, *Mol. Cancer Ther.*, **2009**, 8, 1955-1963.
54. V. Lebret, L. Raehm, J.-O. Durand, M. Smahhi, M. H. V. Werts, M. Blanchard-Desce, D. Methy-Gonnod et C. Dubernet, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **2008**, 48, 32-39.
55. Z. Zhang, S. Huey Lee et S.-S. Feng, *Biomaterials*, **2007**, 28, 1889-1899.

56. V. Lebret, Thèse de doctorat, Université de Montpellier, 2007, p. 179.
57. I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C.-W. Wu et V. S. Y. Lin, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2008**, 60, 1278-1288.
58. J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, C.-W. Wu et V. S. Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 3462-3463.
59. J. Lu, M. Liong, S. Sherman, T. Xia, M. Kovochich, A. E. Nel, J. I. Zink et F. Tamanoi, *NanoBiotechnology*, **2007**, 3, 89-95.
60. T. Lebold, C. Jung, J. Michaelis et C. Brauchle, *Nano Letters*, **2009**, 9, 2877-2883.
61. J. M. Rosenholm, E. Peuhu, L. T. Bate-Eya, J. E. Eriksson, C. Sahlgren et M. Linden, *Small*, **2010**, 6, 1234-1241.
62. V. Cauda, H. Engelke, A. Sauer, D. Arcizet, C. Brauchle, J. Radler et T. Bein, *Nano Letters*, **2010**, 10, 2484-2492.
63. Y. Zhang, Z. Zhi, T. Jiang, J. Zhang, Z. Wang et S. Wang, *Journal of Controlled Release*, **2010**, 145, 257-263.
64. J. Lu, E. Choi, F. Tamanoi et J. I. Zink, *Small*, **2008**, 4, 421-426.
65. J. Lu, M. Liong, I. Zink Jeffrey et F. Tamanoi, *Small*, **2007**, 3, 1341-1346.
66. M. L. Jie Lu, Jeffrey I. Zink, and et F. Tamanoi, *small*, **2007**, 3, 1341 – 1346.
67. R. Hernandez, H.-R. Tseng, J. W. Wong, J. F. Stoddart et J. I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 3370-3371.
68. S. Angelos, M. Liong, E. Choi et J. I. Zink, *Chemical Engineering Journal*, **2008**, 137, 4-13.
69. S. Angelos, Y.-W. Yang, K. Patel, J. F. Stoddart et J. I. Zink, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2008**, 47, 2222-2226.
70. C.-Y. Lai, B. G. Trewyn, D. M. Jeftinija, K. Jeftinija, S. Xu, S. Jeftinija et V. S. Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 4451-4459.
71. N. Basset-Seguin, *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, **2006**, 133, 421-423.
72. L. El Matri, R. Bouraoui, A. Merdassi, R. Baccouri, F. Mghaieth, S. Ben Rejeb et S. Meddeb, *J Fr Ophtalmol*, **2006**, 29, 765-770.
73. A. P. Guagnini, P. De Potter et L. Levecq, *J Fr Ophtalmol*, **2006**, 29, 1013-1017.
74. V. Maunoury, S. Mordon, P. Bulois, X. Mirabel, B. Hecquet et C. Mariette, *Digestive and Liver Disease*, **2005**, 37, 491-495.

75. O. Raab, *Z. Biolog.*, **1902**, 44, 16-27.
76. W. Hausmann, *Biochem. Z.*, **1909**, 14, 275-278.
77. T. J. Dougherty, G. B. Grindey, R. Fiel, K. R. Weishaupt et D. G. Boyle, *J Natl Cancer Inst*, **1975**, 55, 115-121.
78. T. J. Dougherty, J. E. Kaufman, A. Goldfarb, K. R. Weishaupt, D. Boyle et A. Mittleman, United States, 1978, pp. 2628-2635.
79. H. Messmann, E. Endlicher, C. M. Gelbmann et J. Schölmerich, *Digestive and Liver Disease*, **2002**, 34, 754-761.
80. T. Filbeck, U. Pichlmeier, R. Knuechel, W. F. Wieland et W. Roessler, *The Journal of Urology*, **2002**, 168, 67-71.
81. T. Takemura, N. Ohta, S. Nakajima et I. Sakata, *Photochem. Photobiol.*, **1989**, 50, 339-344.
82. R. W. Redmond et I. E. Kochevar, *Photochem. Photobiol.*, **2006**, 82, 1178-1186.
83. P. Prognon, A. Kasselouri, M. Desrocjes, J. Blais et P. Maillard, *Ann. Pharm. Fr.*, **2008**, 66, 71-76.
84. A. T. Papacidero, L. A. Rocha, B. L. Caetano, E. Molina, H. C. Sacco, E. J. Nassar, Y. Martinelli, C. Mello, S. Nakagaki et K. J. Ciuffi, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2006**, 275, 27-35.
85. A. R. McDonald, N. Franssen, G. P. M. van Klink et G. van Koten, *Journal of Organometallic Chemistry*, **2009**, 694, 2153-2162.
86. E. Fagadar-Cosma, M. C. Mirica, I. Balcu, C. Bucovicean, C. Cretu, I. Armeanu et G. Fagadar-Cosma, *Molecules*, **2009**, 14, 1370-1388.
87. A. Graja, I. Olejniczak, A. Bogucki, D. Bonifazi et F. Diederich, *Chem. Phys.*, **2004**, 300, 227-232.
88. T. Hasobe, S. Hattori, P. V. Kamat, Y. Urano, N. Umezawa, T. Nagano et S. Fukuzumi, *Chem. Phys.*, **2005**, 319, 243-252.
89. H. Imahori, A. Fujimoto, S. Kang, H. Hotta, K. Yoshida, T. Umeyama, Y. Matano, S. Isoda, M. Isosomppi, N. V. Ikachenko et H. Lemmetyinen, *Small*, **2005**, 1, 1147.
90. T. Y. Ohulchanskyy, I. Roy, L. N. Goswami, Y. Chen, E. J. Bergey, R. K. Pandey, A. R. Oseroff et P. N. Prasad, *Nano Lett.*, **2007**, 7, 2835-2842.
91. H. L. Tu, Y. S. Lin, H. Y. Lin, Y. Hung, L. W. Lo, Y. F. Chen et C. Y. Mou, *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)*, **2009**, 21, 172-177.

Chapitre 2

Nanoparticules de silicemésoporeuses pour la thérapie photodynamique

Un photosensibilisateur, pour pouvoir être employé *in vivo* doit posséder plusieurs qualités, et notamment, il doit pouvoir être facilement vectorisé vers les tissus cancéreux et il doit être hydrosoluble. Toutefois, la plupart des molécules appartenant à la catégorie des photosensibilisateurs sont hydrophobes et leur introduction dans l'organisme nécessite d'avoir recours à des formulations particulières, et notamment des formulations sous forme de suspensions colloïdales, de liposomes ou de nanoparticules. Ces formulations permettent de stabiliser les photosensibilisateurs en milieu aqueux et de favoriser leur acheminement vers les tissus cibles, en particulier en utilisant des molécules de ciblage spécifique. Une autre contrainte de ces formulations est de pouvoir conserver l'efficacité des photosensibilisateurs, c'est-à-dire leur capacité à transformer l'oxygène moléculaire qui les entoure en espèces oxygénées réactives. En effet, certaines formulations interagissent avec les états excités du photosensibilisateur et réduisent son efficacité. Cela nous a conduit à synthétiser des nanoparticules mésoporeuses de silice à porosité contrôlée pour la formulation du photosensibilisateur. Le fait d'avoir une structure à porosité organisée facilite le transfert d'énergie des photosensibilisateurs vers l'oxygène et la libération des espèces réactives de l'oxygène, dont l'oxygène singulet, dans les cellules.

Dans ce chapitre, nous décrivons la synthèse de nanoparticules de silice mésoporeuses encapsulant des porphyrines comme photosensibilisateurs par micro-émulsion directe et leur efficacité en photothérapie dynamique *in vitro* sur des cellules cancéreuses humaines. Dans la deuxième partie sera étudiée l'influence du greffage d'un agent de ciblage sur l'efficacité des nanoparticules en PDT et dans la dernière partie, l'internalisation des MSN dans les cellules est suivie par microscopie confocale.

L'ensemble des tests biologiques a été réalisé en collaboration avec le Dr Marcel Garcia et le Dr Magali Gari-Bobo à l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM).

A. Nanoparticules de silice fonctionnalisées par des porphyrines pour la PDT

Dans ce travail, dans le cas de l'encapsulation de photosensibilisateurs dans les matrices siliciques par voie non covalente une porphyrine commerciale a été utilisée (1). Par contre dans le cas de l'encapsulation de photosensibilisateurs par voie covalente, nous avons utilisé, d'une part des porphyrines cationiques (2 et 3) et une porphyrine anionique (4), toutes hydrosolubles grâce à leurs groupements pyridinium et sulfonate en position méso (figure 2.1). En raison de leur hydrosolubilité, elles peuvent être facilement formulées dans des nanoparticules silicées auxquelles elles seront liées de façon covalente. La synthèse de ces nanoparticules peut être réalisée en milieu essentiellement aqueux.

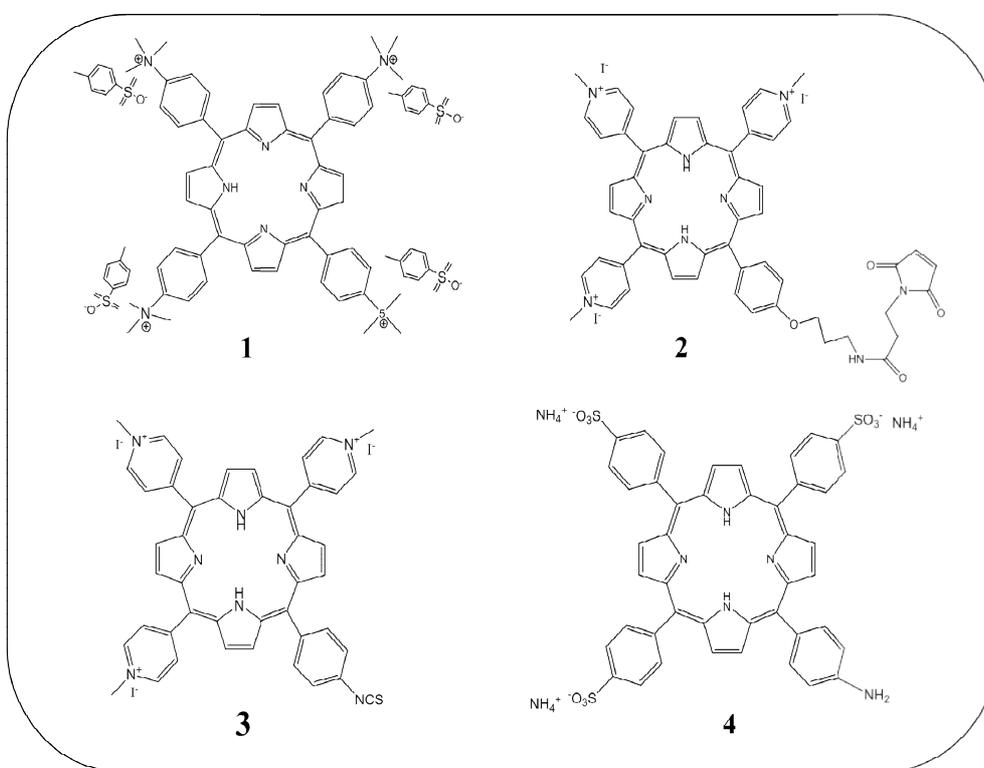


Figure 2.1 : Structure des porphyrines utilisées

1. Synthèse des porphyrines

Les porphyrines utilisées dans ce travail sont synthétisées à l'Institut Curie de l'Université de Paris-Sud (à vérifier). Dans le paragraphe suivant le schéma de synthèse de la porphyrine cationique 2 et de la porphyrine anionique 4 est décrit ¹.

1.1. Porphyrine cationique

La synthèse de la porphyrine (**2**) est représentée par le schéma de la figure 2.5. Le composé **c** (1 équivalent) obtenu par la méthode décrite par Dick et al ², est condensé selon la procédure standard de Adler, avec le pyridinaldéhyde (3 équivalents) et le pyrrole (4 équivalents) pour donner la porphyrine (**d**) avec un rendement de 5,7 %, comme décrit par Martine Perree-Fauvet et al ³ pour le composé analogue méta. Le dérivé (**e**) est obtenu quantitativement à partir du composé (**d**) par traitement avec l'hydrazine dans l'eau à reflux. La réaction de la porphyrine (**e**) et de l'acide 6 peptidique dans le dichlorométhane, en présence de 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBt), de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide chlorhydrate (EDC) et de triéthylamine comme agents de couplage, conduit au composé (**g**) (rendement : 40%) ⁴. Ce dernier composé est traité par un large excès d'iodure de méthyle pour donner quantitativement la porphyrine cationique hydrosoluble (**2**) (figure 2.2).

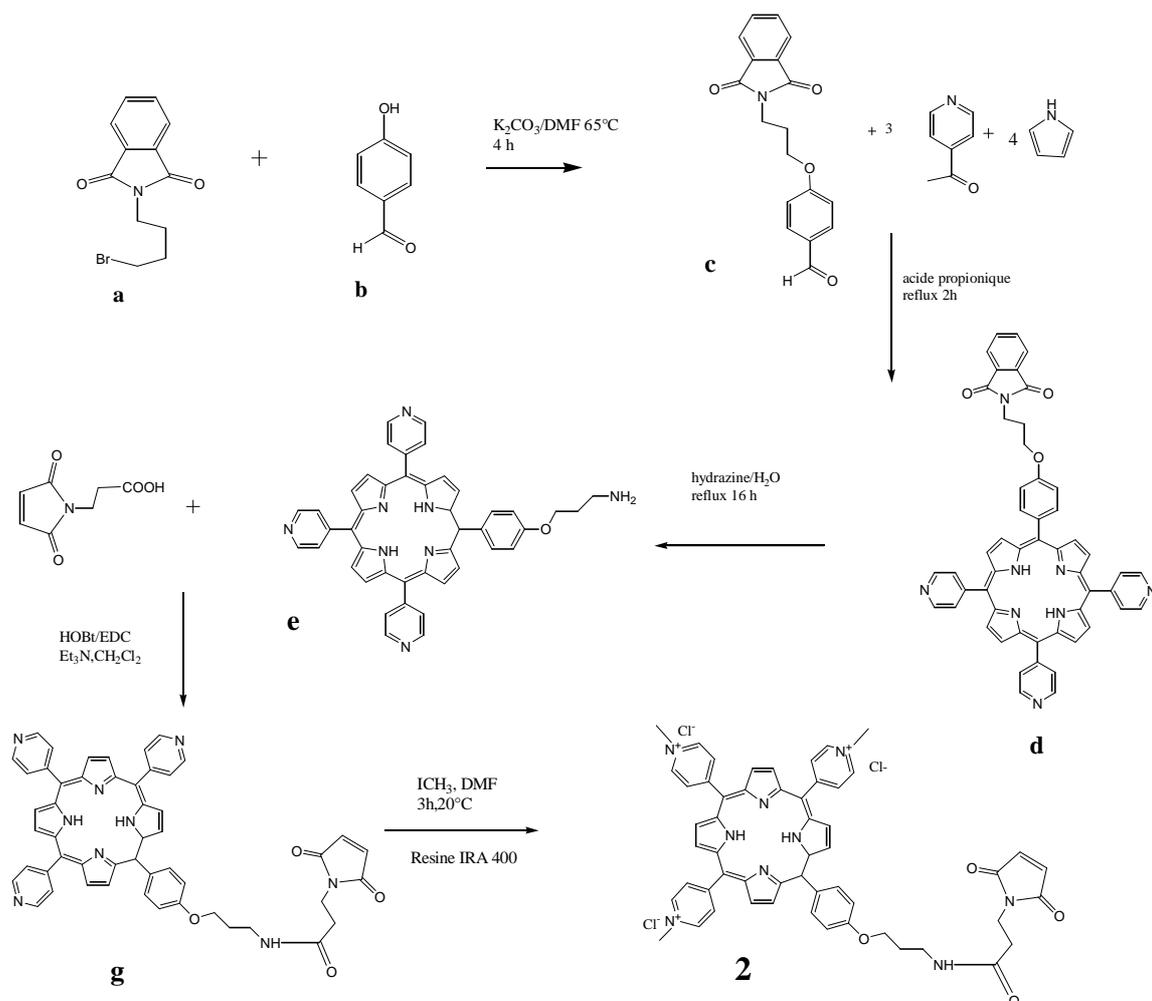


Figure 2.2 : Schéma de synthèse de la porphyrine 2

1.2. Porphyrine anionique

Ce composé est préparé par la méthode décrite par Kuper et al. ⁵ à partir de la 5,10,15,20-tétraphényl porphyrine selon le schéma donné sur la figure 2.6 avec un rendement global de 43 % (figure 2.3).

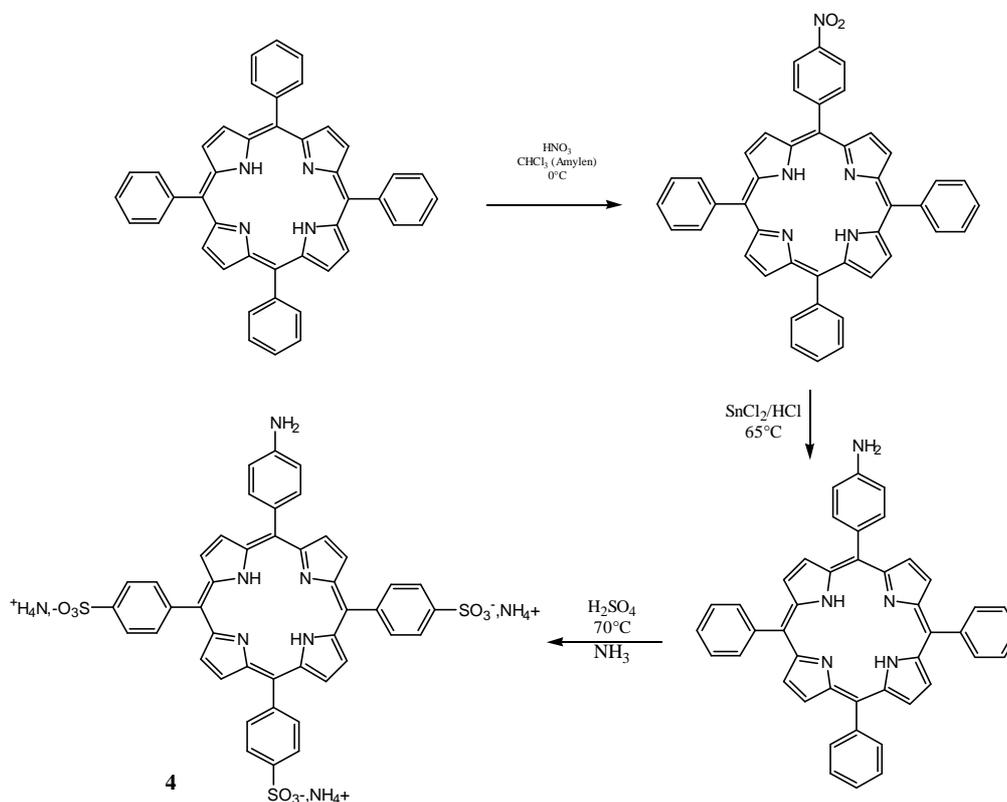
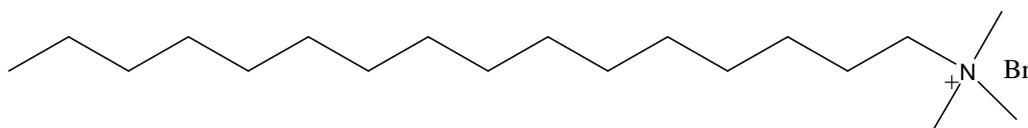


Figure 2.3 : Schéma de synthèse de la porphyrine anionique 4

1.3. Synthèse de nanoparticules de silice sans porphyrines

La microémulsion directe est basée sur l'utilisation d'un surfactant, dans notre cas le cetyltriméthylammonium (CTMABr) capable de créer une microémulsion dans la solution aqueuse de soude utilisée. Après dissolution du tensioactif, le précurseur silicié, le tétra éthoxysilane (TEOS) est additionné à cette microémulsion au goutte à goutte, de l'eau permutée est ensuite ajoutée au système. L'eau ajoutée permet au précurseur silicié de s'hydrolyser puis de se condenser (en milieu basique) autour des micelles formées par le surfactant pour arriver à des nanoparticules poreuses de type MCM-41 (MSN) (figure 2.4).



Structure du cethyltriméthylammonium (CTMABr)

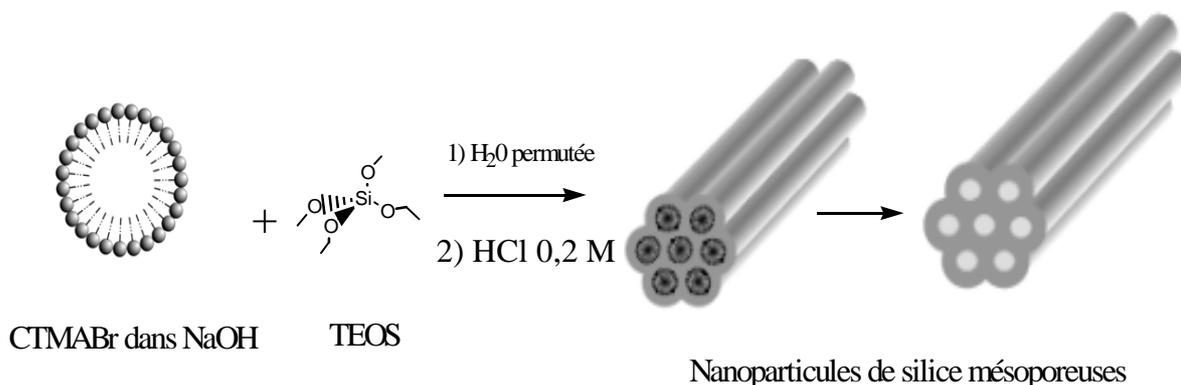


Figure 2.4 : Schéma de synthèse de nanoparticules de silice par microémulsion directe

La morphologie des nanoparticules est influencée significativement par la température et la durée de condensation. La manipulation doit être donc effectuée à température contrôlée (25°C). La croissance des nanoparticules est arrêtée par neutralisation du milieu réactionnel qui permet d'éviter leur floculation ⁶ et l'obtention de nanoparticules de diamètre supérieur à 150 nm. L'extraction des nanoparticules se fait par centrifugation.

1.4. Encapsulation de porphyrines par voie non covalente

L'encapsulation de chromophore dans les nanoparticules de silice se fait au cours de la synthèse qui reste inchangée. Après dissolution du tensio-actif dans la solution aqueuse de soude, 4 mg d'une porphyrine commerciale 5,10,15,20-tétrakis(4-triméthylamino-phenyl)21H,23H porphyrine tetratosylate (**1**) sont dissous dans cette même solution qui prend alors une teinte jaunâtre. La solution colloïdale finale et opaque est neutralisée et les particules sont extraites comme décrit précédemment (MSN-1).

Dans les nanoparticules ainsi préparées, la porphyrine est bien adsorbée dans la matrice au cours de la synthèse (obtention de nanoparticules colorées après centrifugation), mais elle est ensuite entièrement relarguée au cours des lavages jusqu'à réobtention d'une matrice minérale totalement incolore (figure 2.5). En effet, l'incorporation et le piégeage de la porphyrine dans la matrice siliciée ne sont permis que grâce à l'affinité électronique (interactions électrostatiques) de leur structure avec la silice. Il est donc apparu nécessaire de trouver des moyens pour éviter ce relargage prématuré. La solution proposée a été d'élaborer des nanoparticules auxquelles le photosensibilisateur est lié de façon covalente.

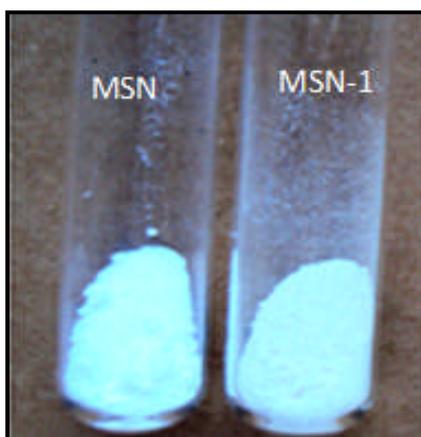


Figure 2.5 : Poudre de nanoparticules de silice MSN et nanoparticules encapsulant la porphyrine 1 (MSN-1)

1.5. Encapsulation de porphyrines par voie covalente

Pour pouvoir les lier de manière covalente avec les matrices minérales, les porphyrines utilisées dans ce travail sont conjuguées avec des groupements silylés selon le schéma de la figure 2.6.

- Porphyrine 2

La réaction de couplage avec le groupement silylé (3-mercaptopropyltriméthoxysilane) est basée sur la réactivité entre les maléimides et les thiols. La réaction a été effectuée dans le méthanol à température ambiante et conduit à la formation d'une liaison covalente entre la porphyrine porteuse du groupe maléimide et le silane présentant une fonction thiol.

• Porphyrine **3** et **4**

La silylation de ces deux porphyrines est basée sur la réaction du groupement isocyanate (ou thioisocyanate), électrophile, avec les nucléophiles de type amines. La porphyrine **3** contenant le groupement isocyanate est couplée avec un silane contenant une fonction amine (3-aminopropyltriéthoxysilane) et la porphyrine **4** possédant une fonction amine est conjuguée avec l'isocyanatopropyltriéthoxysilane. Les réactions sont réalisées dans l'éthanol à température ambiante.

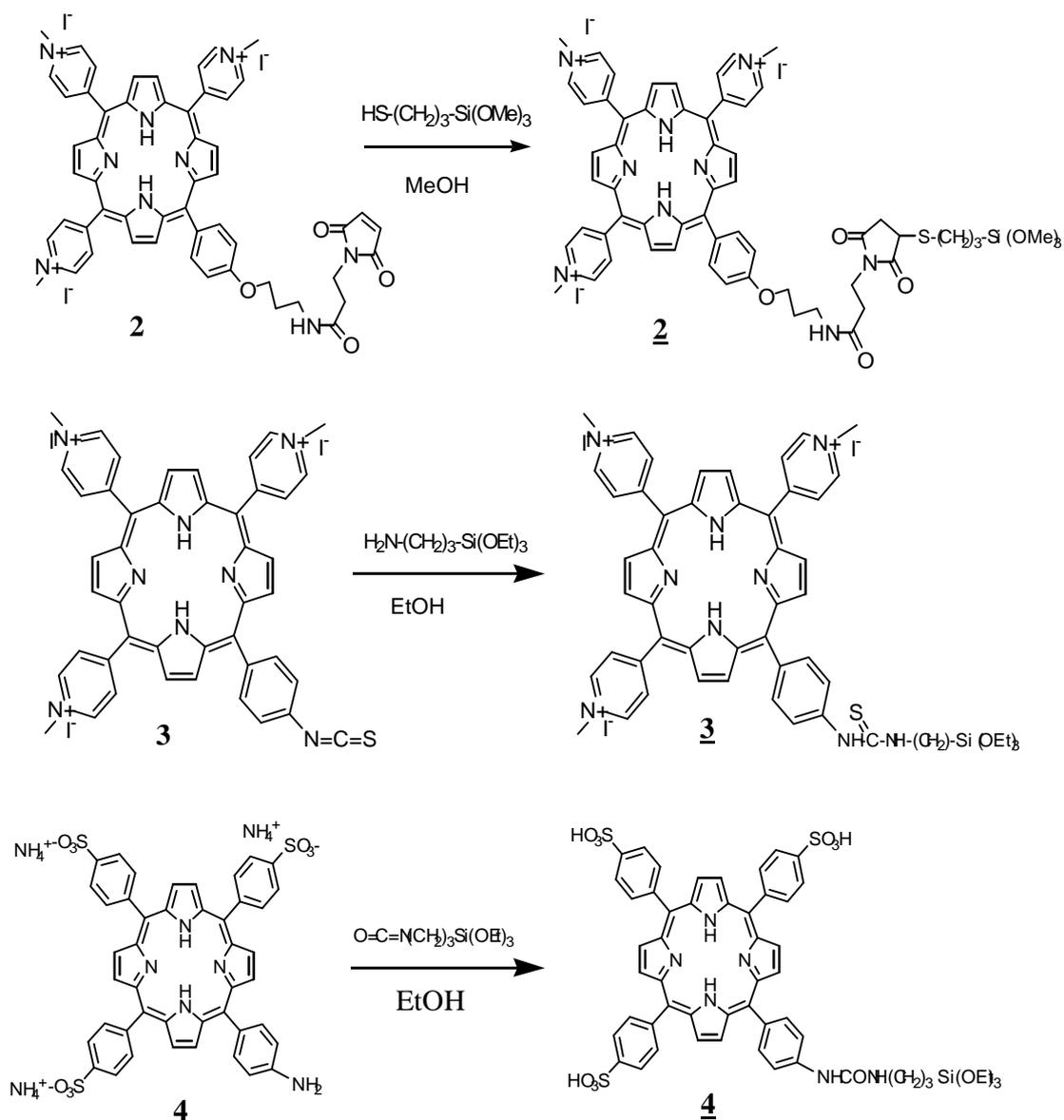


Figure 2.6 : Silylation des porphyrines

La synthèse des nanoparticules encapsulant les porphyrines de manière covalente se fait suivant le procédé décrit précédemment (figure 2.4) en incorporant les porphyrines préconjuguées dans le surfactant dissous. Les porphyrines siliciées seront ainsi liées par des liaisons covalentes avec la matrice de silice au cours de la co-condensation des groupements siliciés présents sur les porphyrines avec le TEOS. Les différentes nanoparticules synthétisées par liaison covalente sont définies dans le tableau 2.1.

Echantillons synthétisés	
MSN-2.4	Nanoparticules encapsulant 4 mg de la porphyrine 2
MSN-2.8	Nanoparticules encapsulant 8 mg de la porphyrine 2
MSN-3.4	Nanoparticules encapsulant 4 mg de la porphyrine 3
MSN-3.12	Nanoparticules encapsulant 8 mg de la porphyrine 3
MSN-4	Nanoparticules encapsulant 10 mg de la porphyrine 4

Tableau 2.1 : Nanoparticules synthétisées

✓ Elimination du tensioactif

La voie de synthèse que nous avons exploitée dans notre étude met en jeu des interactions électrostatiques du type S^+I^- , c'est-à-dire un tensioactif cationique (S^+) et des silicates chargés négativement (I^-) en milieu basique. Le tensioactif est en forte interaction avec la partie inorganique. Le lavage des nanoparticules au soxhlet s'est avéré insuffisant. Les pics caractéristiques du CTMABr sont observables aux environs de 2921, 2851 et 1478 cm^{-1} sur les spectres infra-rouge avant et après extraction du tensioactif au soxhlet (figure 2.7).

Compte tenu des contraintes dues à la cytotoxicité de l'agent structurant CTMABr, une procédure supplémentaire a été utilisée. L'extraction au soxhlet est suivie d'un lavage à reflux d'un mélange EtOH/HCl (4 /1) pendant 2 heures à 60°C. Après centrifugation, l'opération est répétée deux fois. L'analyse FTIR a permis de confirmer la disparition quasi-totale des résidus de surfactant.

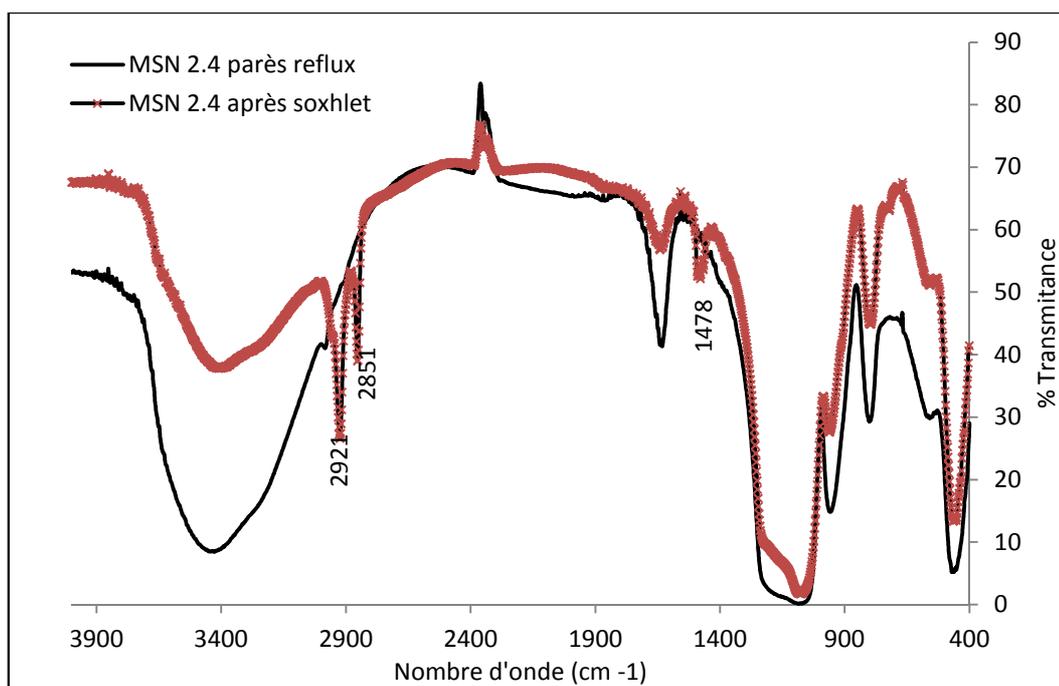


Figure 2.7 : Spectre FTIR de nanoparticules avant et après élimination du tensio-actif (exemple MSN-2-4)

L'élimination du tensioactif permet d'obtenir des nanoparticules mésoporeuses dont les pores peuvent servir d'hôtes pour des médicaments ou des biomolécules et dont la surface est rendue accessible aux réactifs de greffage intervenant au cours des étapes ultérieures.

2. Caractérisation des nanoparticules de silice

2.1. Caractérisation de l'encapsulation des porphyrines par spectroscopie UV/Visible

La spectroscopie UV/Vis permet de suivre l'incorporation des chromophores à l'intérieur de la matrice siliciée. Les spectres correspondant aux nanoparticules synthétisées de formulation MSN-2.4, MSN-2.8, MSN-3.4, MSN-3.12 et MSN-4 (tableau 2.1) sont représentés sur la figure 2.8. Les spectres obtenus dans l'éthanol pour les MSN-porphyrines synthétisées par voie covalente montrent la présence des bandes d'absorption caractéristiques des porphyrines et se distinguent du spectre de diffusion des nanoparticules de silice sans porphyrine. La couleur des nanoparticules caractéristiques des porphyrines présentes dans la matrice silicique confirme bien l'encapsulation de ces dernières contrairement aux nanoparticules encapsulant la porphyrine par voie non covalente.

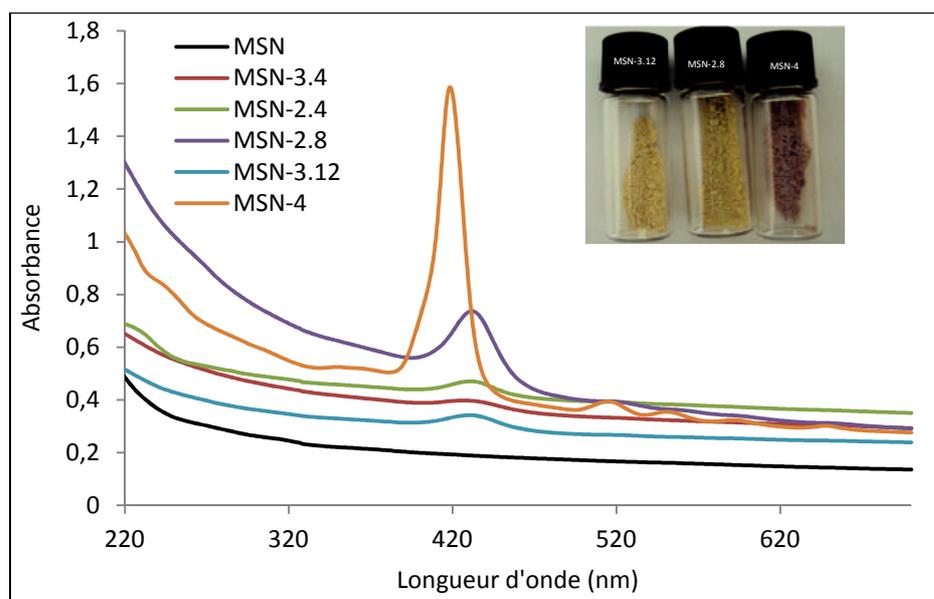


Figure 2.8 : Spectre UV/Vis de nanoparticules encapsulant les porphyrines par voie covalente

Compte tenu de la faible quantité de porphyrines encapsulées dans les nanoparticules MSN-2.4 et MSN-3.4, la quantité de porphyrines incorporées a été déterminée uniquement pour les nanoparticules MSN-2.8, MSN-3.12 et MSN-4 par spectroscopie UV/ Vis, les bandes maximales d'absorption de ces nanoparticules sont rassemblées dans le tableau 2.2.

Echantillon	Soret	Q ^{IV}	Q ^{III}	Q ^{II}	Q ^I
MSN-2.8	428	520	557	593	653
MSN-3.12	428	518	556	592	650
MSN-4	418	514	550	591	640

Tableau 2.2 : Pics d'absorbance des porphyrines dans les nanoparticules

Pour tenir compte du fond de diffusion dans les spectres d'absorption de nanoparticules de silice l'absorbance des échantillons a été corrigée. La soustraction du fond lié à la diffusion de la lumière permet d'obtenir le spectre d'absorption seul des porphyrines encapsulées. Un exemple de correction du spectre UV-visible est présenté sur la figure 2.19. Une courbe de tendance exponentielle a été utilisée pour corriger le spectre brut. Les quantités de porphyrines encapsulées dans les nanoparticules sont reportées dans le tableau 2.3.

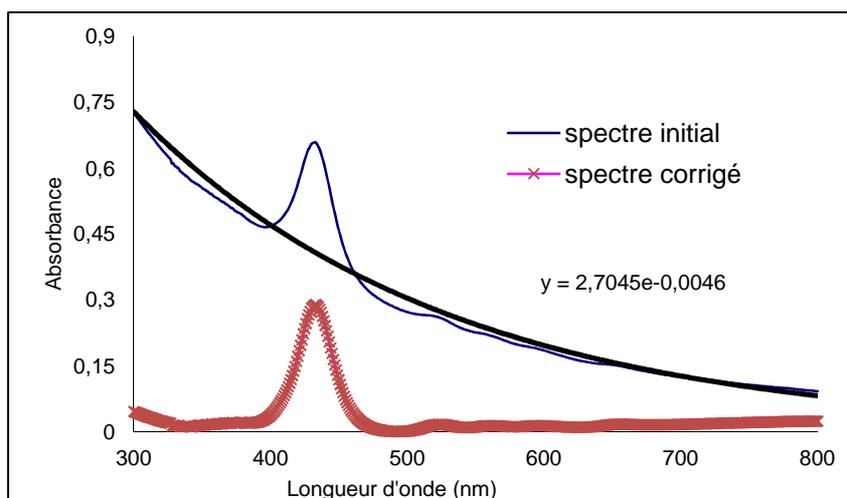


Figure 2.9 : Exemple de correction de spectre d'absorption (MSN-2.8)

<i>Echantillon</i>	<i>Quantité de porphyrine encapsulée ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)</i>
<i>MSN-2-8</i>	<i>4,43</i>
<i>MSN-3-12</i>	<i>0,97</i>
<i>MSN-4</i>	<i>9,00</i>

Tableau 2.3 : Quantités de porphyrines encapsulées dans les nanoparticules

2.2. Microscopie Electronique à Transmission et à Balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) permet d'obtenir des images de l'échantillon étudié en trois dimensions. Elle permet en effet d'avoir assez rapidement accès à la taille, à la forme, à la polydispersité, Cette technique de microscopie permet également de vérifier que les particules sont bien individualisées, qu'aucun agglomérat ne s'est formé au cours des phases de lavage et de séchage. Les particules apparaissent ellipsoïdales ayant la forme de « grains de riz » (figure 2.10).

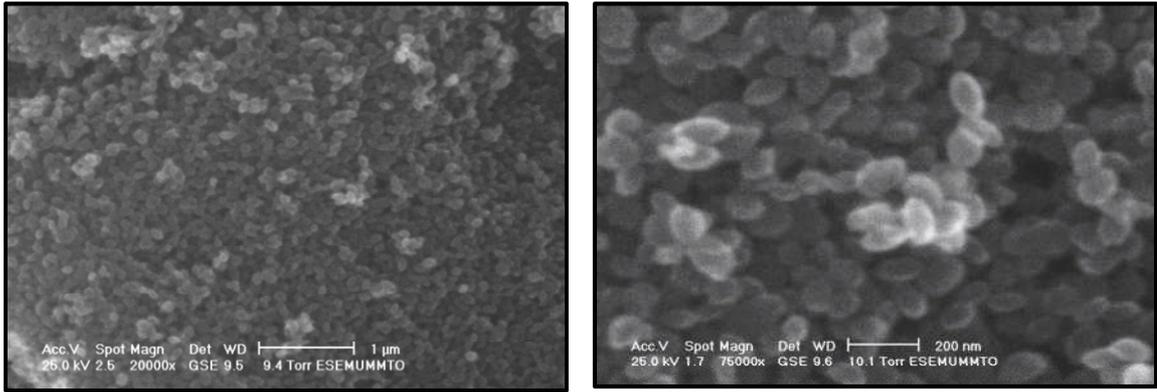


Figure 1.10 : image MEB des nanoparticules MSN à différents grossissements

La microscopie électronique à transmission, grâce à son grand pouvoir de résolution (au dixième de nanomètre) permet d’obtenir une vue en coupe de l’échantillon observé. Elle apporte des informations sur l’aspect général des particules, sur leur morphologie et éventuellement sur leur structure. Les images des nanoparticules observées en coupe transversale (figure 2.11) montrent qu’elles sont de forme sphérique avec des contours légèrement irréguliers, et sont structurellement organisées de façon hexagonale (réseau en nid d’abeille). Leur diamètre est de l’ordre de 150 nm. D’autre part, de plus faibles grossissements confirment que les nanoparticules sont parfaitement bien individualisées et dispersées.

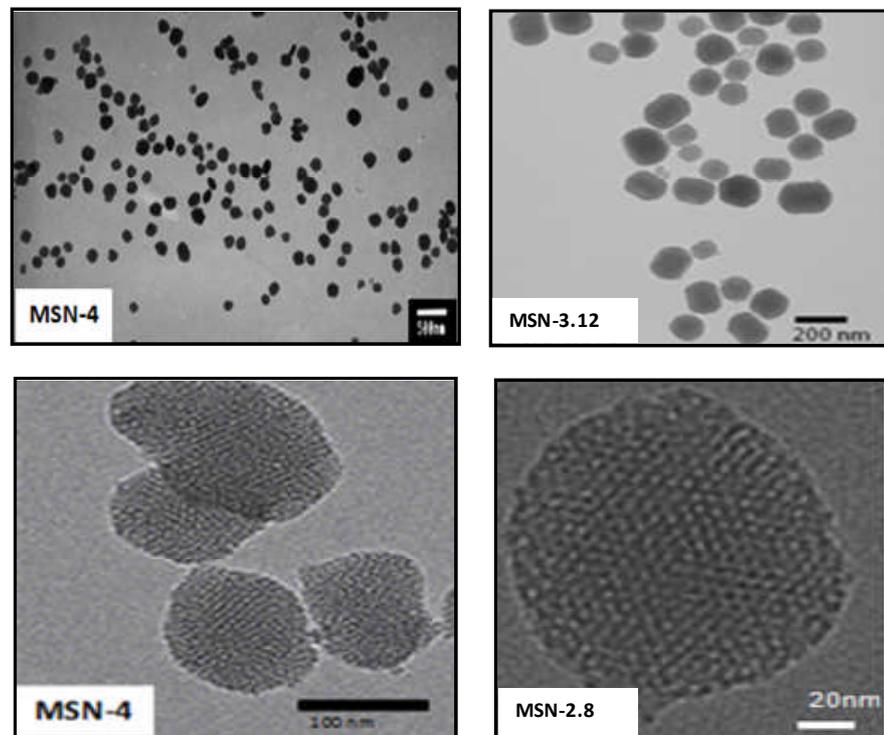


Figure 2.11 : Cliché TEM des nanoparticules encapsulant les porphyrines à différents grossissements

2.3. Diffusion dynamique de la lumière DDL

La diffusion dynamique de la lumière (DDL) permet de déterminer la taille et la polydispersité des particules d'une dispersion. Elle est basée sur la technique de spectroscopie de corrélation photonique ⁷. En effet, les particules sont constamment en mouvement brownien, par conséquent l'intensité de la lumière qu'elles diffusent change avec le temps. Les particules les plus grandes se déplacent plus lentement que les particules les plus petites et la fluctuation de la lumière qui leur est due est lente aussi. La spectroscopie de corrélation photonique utilise ces fluctuations de lumière pour déterminer la taille des particules. Cela peut être déterminé par un système optique convenable et un photomultiplicateur (figure 2.12). La fonction d'auto-corrélation obtenue suit une loi exponentielle décroissante avec le temps.

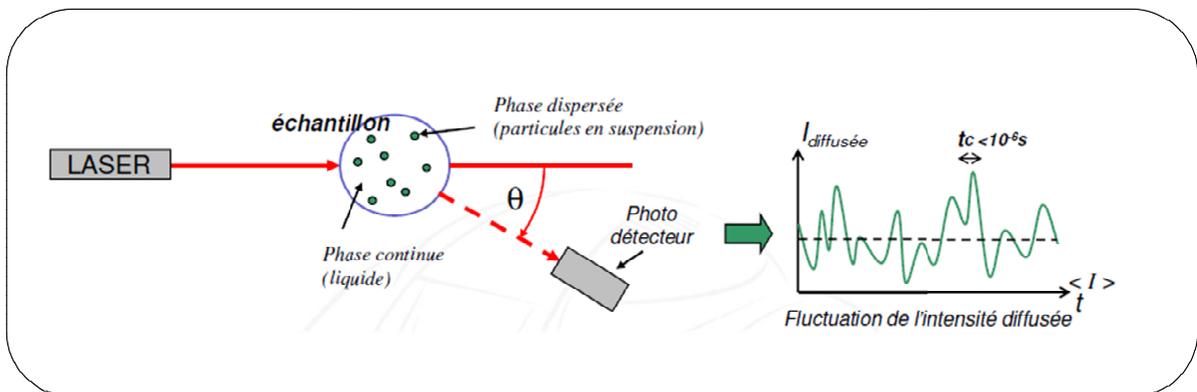


Figure 2.12 : Schéma du principe de fonctionnement de la technique de la diffusion dynamique de la lumière ⁸.

L'analyse de la fonction d'auto corrélation sur un intervalle de temps suffisamment long permet de calculer le coefficient de diffusion des particules en mouvement brownien. A partir de ce coefficient on peut calculer la taille des particules en utilisant la loi de diffusion de Stokes et de l'équation d'Einstein pour le mouvement brownien.

$$D = \frac{K_b}{6\pi\eta R_h} \quad \text{d'où} \quad R_h = \frac{K_b}{6\pi\eta D} \quad ; \text{ avec}$$

K_b : constante de Boltzmann , η : viscosité du solvant , D : coefficient de diffusion et R_h : rayon hydrodynamique.

Le rayon hydrodynamique comprend à la fois la taille de la particule mais aussi l'épaisseur de la couche de solvation.

Les analyses sont effectuées en dispersant 4 mg de nanoparticules avec ou sans chromophores dans 5 ml d'éthanol. Les échantillons sont plongés dans un bain à ultrasons pendant 30 minutes, les solutions obtenues présentent, même après plusieurs heures de repos, une stabilité colloïdale satisfaisante.

Les mesures de la taille des nanoparticules effectuées par DDL permettent de confirmer leur monodispersité (figure 2.13) avec des valeurs de diamètre hydrodynamique comprises entre 200 et 246 nm (tableau 2.4). Les tailles obtenues sont compatibles pour une application biologique.

Echantillon	Diamètre hydrodynamique nm (méthode de Padé-Laplace)
MSN	210
MSN-2-8	246
MSN-3-12	202
MSN-4	242

Tableau 2.4 : Rayon hydrodynamique des nanoparticules

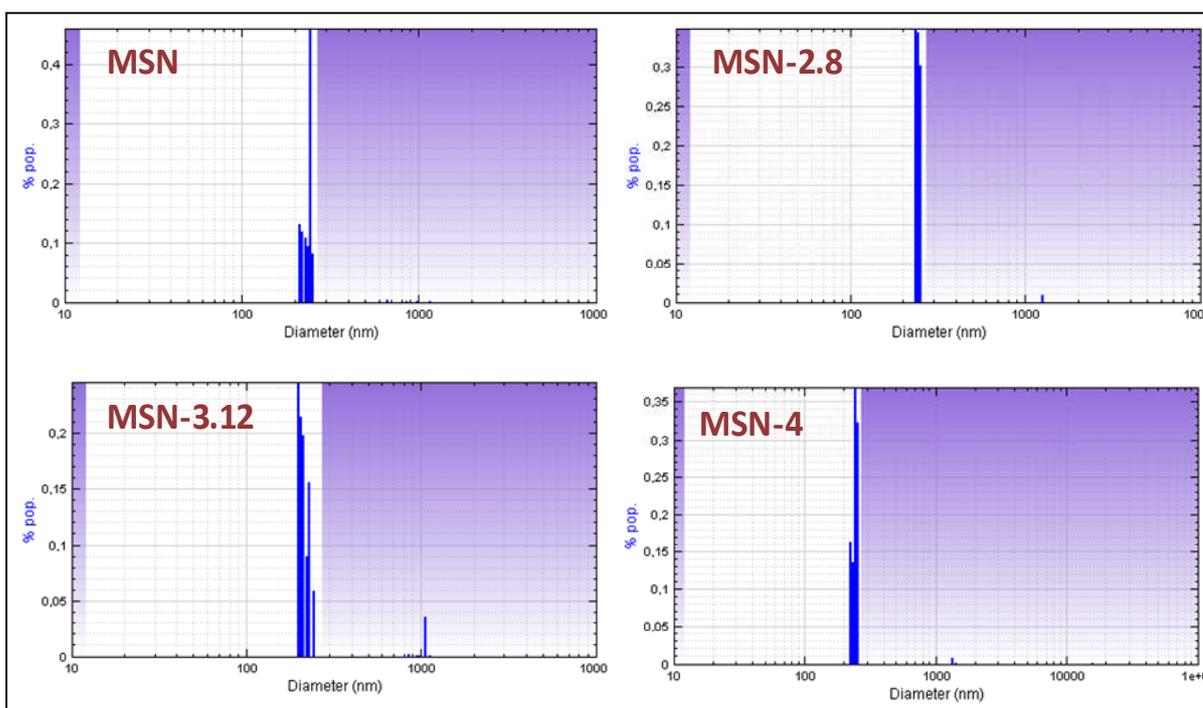


Figure 2.13 : Distribution de taille des nanoparticules

2.4. Adsorption et désorption de gaz BET

Les différents procédés utilisant l'adsorption physique de gaz à basse température reposent sur les travaux datant de 1938 de Brunauer, Emmett et Teller, plus connus généralement sous l'acronyme BET. L'interprétation des isothermes d'adsorption-désorption est riche en information sur la texture de l'adsorbant. Parmi les principaux paramètres qui peuvent être évalués, signalons la surface spécifique, mais aussi des informations sur la structure (forme des pores, interconnexion). La technique est bien adaptée à l'étude des échantillons dont la taille des pores est comprise entre 2 et 50 nm environ, ce qui correspond au domaine mésoporeux.

La répartition poreuse s'obtient en traçant la courbe dV/dD_p en fonction de D (V étant le volume des pores et D leur diamètre). Différentes méthodes de calcul ont été proposées dans la littérature, la méthode « BJH » du nom de ses auteurs Barrett, Joyner et Halenda⁹ étant la plus simple et de loin la plus fréquemment employée.

Avant d'effectuer les mesures, les échantillons sont dégazés à 80° C pendant une nuit. Les isothermes de sorption, représentant le volume d'azote adsorbé puis désorbé en fonction de la pression relative sont visibles sur la figure 2.14. Selon la classification de l'IUPAC, ces isothermes appartiennent au type IV¹⁰, type caractéristique des matériaux mésoporeux. Les échantillons présentent une première condensation capillaire pour des pressions relatives allant de 0,2 à 0,5 liée à la présence des mésopores. Dans notre cas cette condensation est totalement réversible. L'absence des hystérésis habituellement observés dans les isothermes de type IV est liée à une distribution de taille étroite des nanoparticules (figure 2.15). En effet les nanoparticules synthétisées présentent une taille de pores allant de 2 à 2,7 nm et développent une surface spécifique importante, jusqu'à 1192 m²/g pour MSN-2-8 (tableau 2.5).

La seconde condensation capillaire observée pour $P/P_0 > 0,9$ est due à l'adsorption de N₂ dans l'espace vide entre les particules sphériques. Par conséquent, ce type de pores ne peut pas être considéré comme une porosité intrinsèque au matériau et ne fournit pas d'information supplémentaire sur la morphologie des nanoparticules synthétisées¹¹.

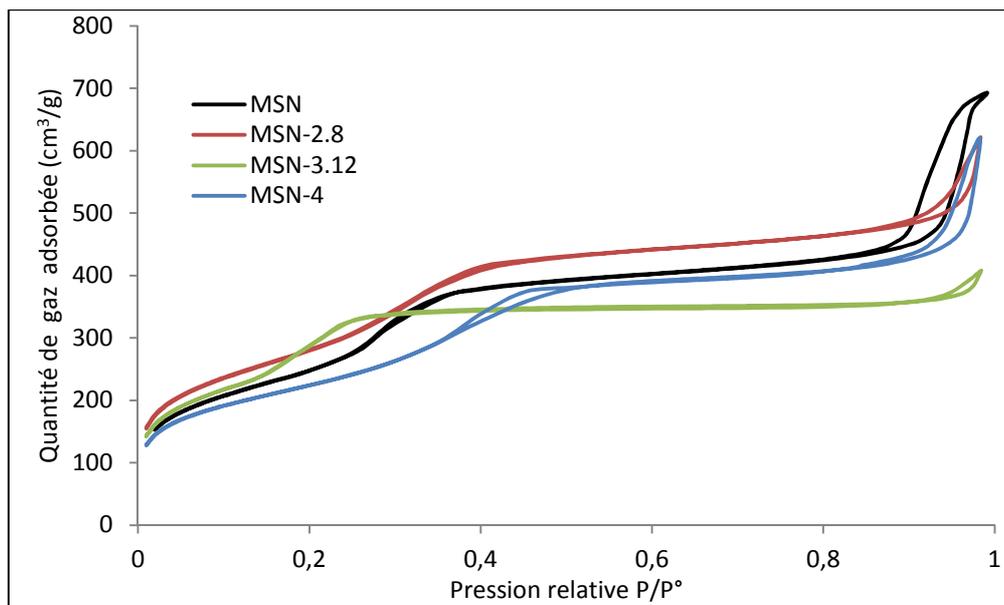


Figure 2.14 : Courbes d'adsorption et de désorption de gaz BET de nanoparticules encapsulant les porphyrines

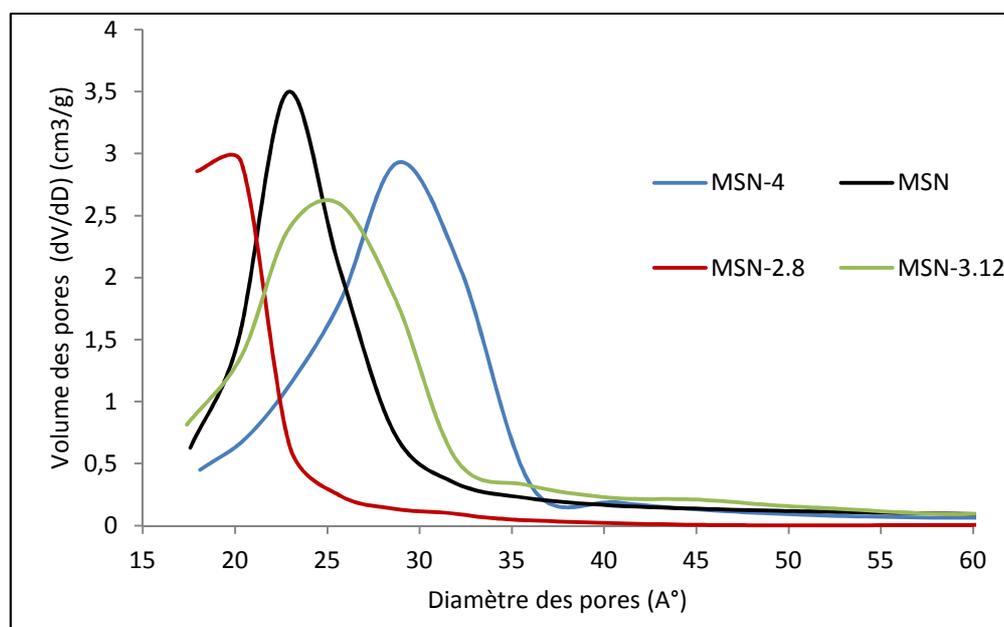


Figure 2.15 : Distribution poreuse à la désorption

Echantillon	Surfaces spécifiques BET ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Volume poreux BJH désorption ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Diamètre moyen de pores BJH (nm)
MSN	936	0,50	2,4
MSN-2-8	1192	0,37	2,0
MSN-3-12	1031	0,57	2,5
MSN-4	809	0,5	2,7

Tableau 2.5 : Caractéristiques BET des matériaux synthésés

2.5. Diffraction des rayons X sur poudre

Le diffractogramme de rayons X d'un matériau mésoporeux de symétrie hexagonale peut présenter un nombre de raies de diffraction variable selon l'organisation du matériau et la qualité de l'appareillage. Typiquement, dans le cas des MCM-41, il apparaît 4 raies correspondant aux familles de plans (100), (110), (200) et (210) aux faibles angles entre 1,8 et 5°¹².

Les diffractogrammes de DRX aux petits angles des nanoparticules synthétisées sont donnés sur la figure 2.16. La raie (100) est intense et correspond à des pics à $2\theta = 2,2, 2,4, 1,7$ et $1,77$ pour MSN, MSN-2-8, MSN-3-12 et MSN-4, elle indique une symétrie hexagonale des échantillons. Par contre, la non apparition des deux raies (110) et (200) pour MSN-3.12 et MSN-4 habituellement observées pour les MCM-41 indique une symétrie moins organisée pour ces échantillons¹³.

Ce type de structuration, permet de calculer, par approximation, la distance entre les plans réticulaires (100) notée d_{100} par la relation de Bragg : $d_{100} = \lambda / 2 \sin \theta$ en prenant $\lambda = 1,54051 \text{ \AA}$ (raie $K\alpha$ du cuivre) et estimer le paramètre de maille « a » pour un réseau hexagonal par la relation suivante : $a = 2 d_{100} / \sqrt{3}$.

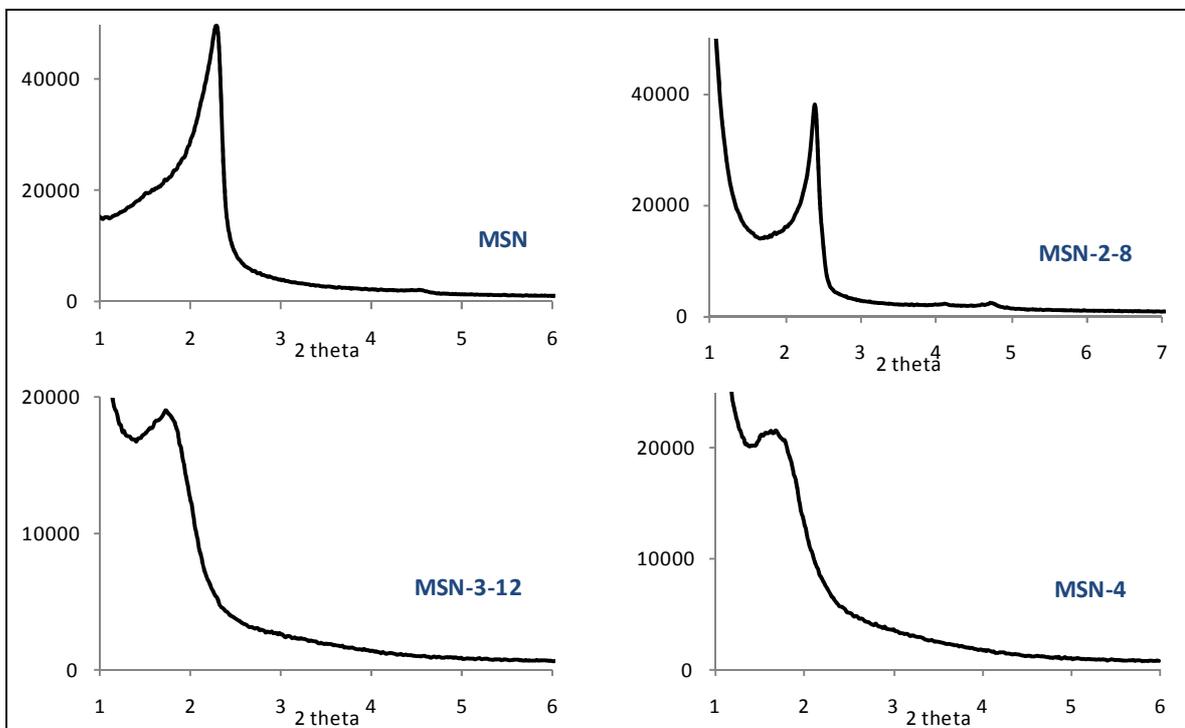


Figure 2.16 : Diffractogrammes de DRX des nanoparticules synthétisées

En soustrayant le paramètre de maille « a » du solide à son diamètre de pore calculé à partir des mesures de porosité, on peut déterminer l'épaisseur des murs « e » de la matrice inorganique (figure 2.17). Les valeurs de d_{100} et des paramètres de maille « a » calculés sont rapportés dans le tableau 2.6. Nous obtenons des épaisseurs de murs allant de 2,3 à 3 nm. Ces valeurs sont plus grandes que la moyenne habituellement estimée à 1 nm conférant ainsi une grande stabilité aux nanoparticules synthétisées.

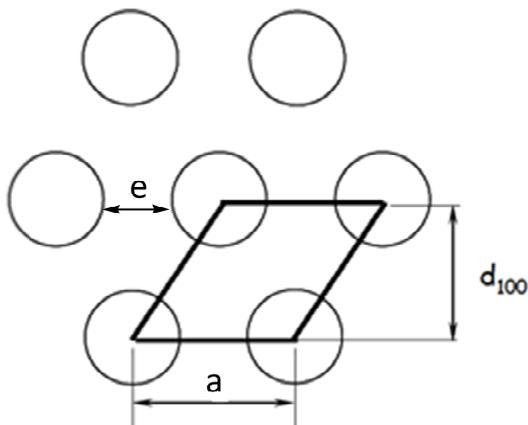


Figure 2.17 : Représentation schématique du réseau hexagonal des nanoparticules

Echantillon	d_{100} (nm)	a (nm)	e (nm)
MSN	3,84	4,43	2,03
MSN-2.8	3,7	4,27	2,27
MSN-3.12	4,83	5,57	3,07
MSN-4	4.96	5.72	3,02

Tableau 2.6 : Paramètres DRX des nanoparticules

3. Activité biologique des MSN

3.1. Production de l'oxygène singlet

L'oxygène singlet est l'agent toxique principal en PDT. Nous avons donc évalué l'aptitude des nanoparticules à produire de l'oxygène singlet. La capacité des nanoparticules à générer l'oxygène singlet est évaluée par phosphorescence de celui-ci après irradiation à 431 nm de 3 mg de nanoparticules dans 5 ml d'éthanol. Les résultats obtenus sont comparés à ceux du rose bengale qui est un indicateur d'oxygène singlet connu (figure 2.18) ¹⁴. Le rendement quantique de formation de l'oxygène singlet est de 58% pour MSN-2-8 et 60 % pour MSN-3.12. Ces résultats montrent que les porphyrines encapsulées sont de bons générateurs d'oxygène singlet et les nanoparticules ainsi synthétisées constituent des candidats potentiels pour l'utilisation en PDT.

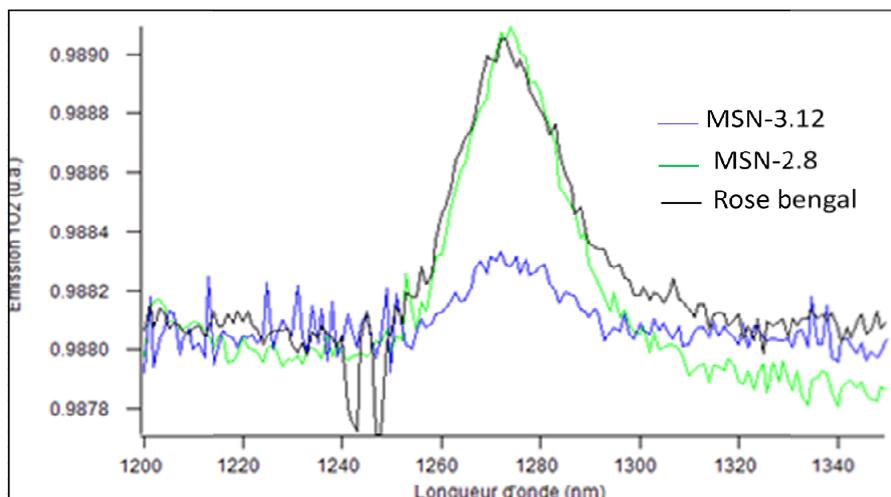


Figure 2.18 : Rendement quantique de formation d' 1O_2

4.2. Activité PDT des nanoparticules

4.2.1. Lignée cellulaire

Des tests sur les MSN que nous avons préparées ont été réalisés sur des lignées cellulaires humaines. Une lignée cellulaire est une population homogène de cellules stables après un certain nombre de mitose (divisions cellulaires) successives et ayant théoriquement une capacité illimitée de divisions. Il s'agit en général de cellules cancéreuses prélevées chez un patient (comme les cellules HeLa) ou transformées artificiellement par un oncogène (gène immortalisant).

Deux lignées cellulaires ont été choisies pour l'étude biologique des nanoparticules synthétisées. Il s'agit des lignées cellulaires humaines MDA-MB-231 (cellules de cancer de sein) et POE 14 (cellules du cancer de l'ovaire). Ces deux lignées cellulaires expriment le récepteur du mannose.

4.2.2. Milieu de culture

Toutes les manipulations sur cellules sont effectuées sous hotte à flux laminaire vertical pour assurer la protection des cultures en empêchant l'entrée dans la zone de travail d'agents contaminants. Ce genre de hotte ne peut être utilisé que dans le cas où la protection de l'opérateur n'est pas requise.

Les cellules MDA-MB-231 sont cultivées dans un milieu nutritif favorisant leur croissance. Il se compose d'un milieu de culture standard DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), contenant principalement des acides aminés, des vitamines et des sels minéraux) auquel est ajouté 10 % de sérum de veau fœtal, 5 % d'un mélange de pénicilline et de streptomycine ainsi que du rouge de phénol. Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37 °C, dans une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO₂.

4.2.3. Test de viabilité cellulaire au MTT

Le test MTT est une méthode rapide de numération des cellules vivantes. Il sert à évaluer la prolifération et la viabilité cellulaire et est généralement utilisé pour déterminer la cytotoxicité de médicaments potentiels ou autres produits toxiques ¹⁵. Il consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes par dosage colorimétrique. Cette enzyme, par coupure du cycle tétrazolium, transforme le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium), de couleur jaune, en cristaux de formazan bleu violacé (figure 2.19) ¹⁶. Cette conversion se produit uniquement dans les cellules vivantes. Les cristaux de formazan sont solubilisés dans le diméthylsulfoxyde et la solution colorée résultante est quantifiée au spectrophotomètre par mesure de l'absorbance à 550 nm. La quantité de formazan formée est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.



Figure 2.19 : Principe chimique du test MTT

4.2.4. Phototoxicité

Des tests de cytotoxicité ont permis de déterminer la quantité de nanoparticules de silice fonctionnalisées à utiliser sans préjudice pour les cellules saines ⁶. Les cellules sont donc incubées pendant 24 heures en présence ou en absence de 20 µg/ml de nanoparticules. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont soumises à une irradiation au laser de longueur d'onde de 650 nm pendant 40 minutes. La mort cellulaire est mesurée 48 heures après l'irradiation par le test MTT.

Les résultats obtenus permettent de comparer l'efficacité des nanoparticules contenant soit les porphyrines cationiques, soit la porphyrine anionique. La figure 2.20 montre l'ensemble des résultats obtenus pour des nanoparticules irradiées testées sur les cellules MDA-MB-231. Les cellules non traitées sont des cellules incubées dans du milieu de culture sans nanoparticules, soumise ou non à l'irradiation. Ces cellules ne présentent pas de mortalité. Les cellules incubées avec les différentes nanoparticules synthétisées présentent en absence d'irradiation une toxicité faible, des taux de 14 et 17 % de mort cellulaire sont obtenues dans le cas des nanoparticules MSN-2.8 et MSN-3.12 respectivement. La toxicité dans ce cas est due aux nanoparticules elles-mêmes.

Dans le cas où ces cellules sont irradiées, on observe une augmentation notable de la toxicité pour les trois types de nanoparticules, la phototoxicité induite atteint respectivement des taux de 47, 52 et 57 % de mort cellulaire pour les MSN-2.8, MSN-3.12 et MSN-4.

L'efficacité de la PDT des nanoparticules contenant les porphyrines est également testée sur les cellules de colon POE 14, les cellules sont incubées avec les nanoparticules MSN-2.8. Les nanoparticules non irradiées présentent une faible toxicité, 15 % de mortalité cellulaire est observée (figure 2.21). Les cellules irradiées par contre, induisent dans ce cas une mort cellulaire très importante, un taux de 80 % est obtenu.

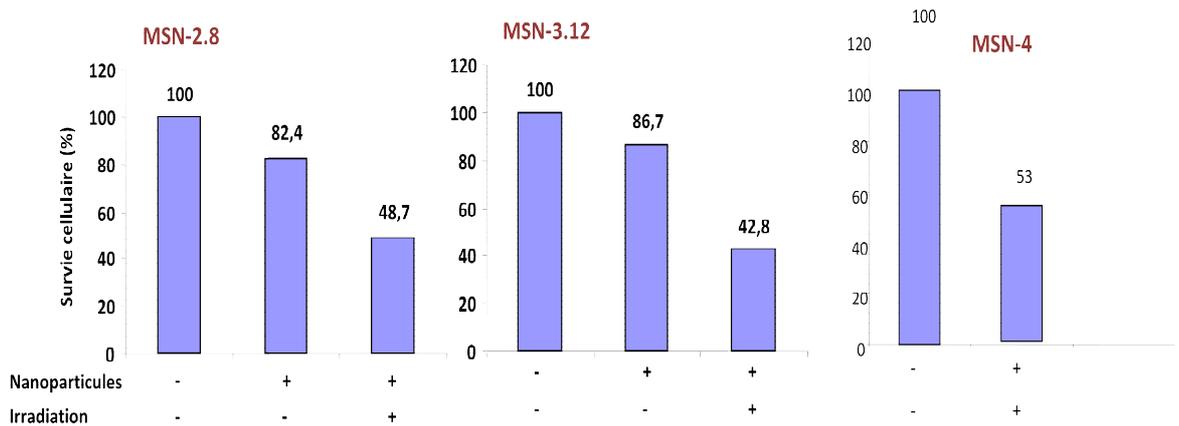


Figure 2.20 : Mort cellulaire induite par la PDT avec les nanoparticules encapsulant les porphyrines sur les cellules MDA-MB-231

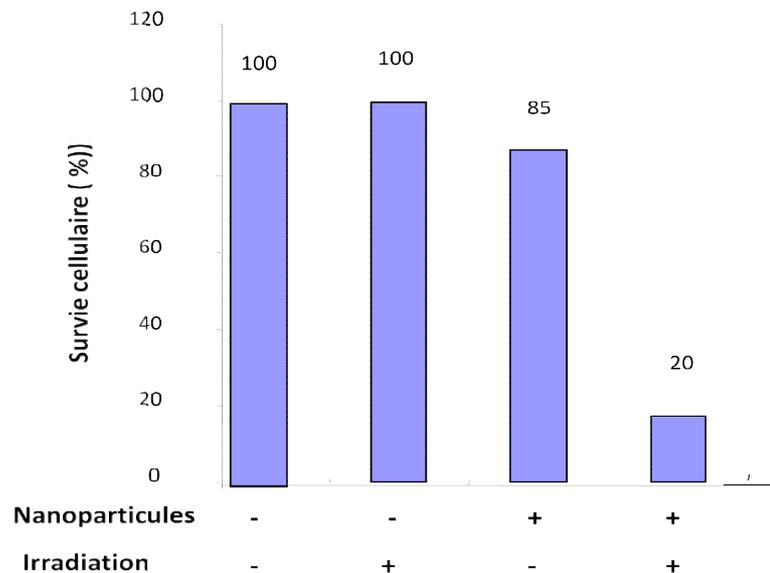


Figure 2.21 : Mort cellulaire induite par la PDT avec les nanoparticules MSN-2.8 sur les cellules POE 14

➤ Observation des cellules traitées par microscopie à fluorescence

Les cellules traitées avec les nanoparticules MSN-2.8 sont visualisées par un marquage fluorescent des noyaux au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole). Le DAPI est une molécule fluorescente capable de se lier fortement à l'ADN. Quand le DAPI absorbe la lumière UV elle émet une fluorescence bleue brillante, ce qui permet de détecter et quantifier l'ADN grâce à un microscope à fluorescence.

Les clichés obtenus montrent la spécificité de la thérapie photodynamique à l'aide des nanoparticules. La mort cellulaire est évidente et de façon exclusive dans la zone irradiée et en présence de nanoparticules (figure 2.22). En effet, la zone d'irradiation des cellules non traitées ne montre pas un changement de fluorescence de la couleur bleue émise, par contre, dans la zone des cellules traitées avec les nanoparticules et irradiées, on observe une diminution importante de la fluorescence liée au DAPI montrant que dans cette zone le nombre de cellules vivantes a considérablement diminué.

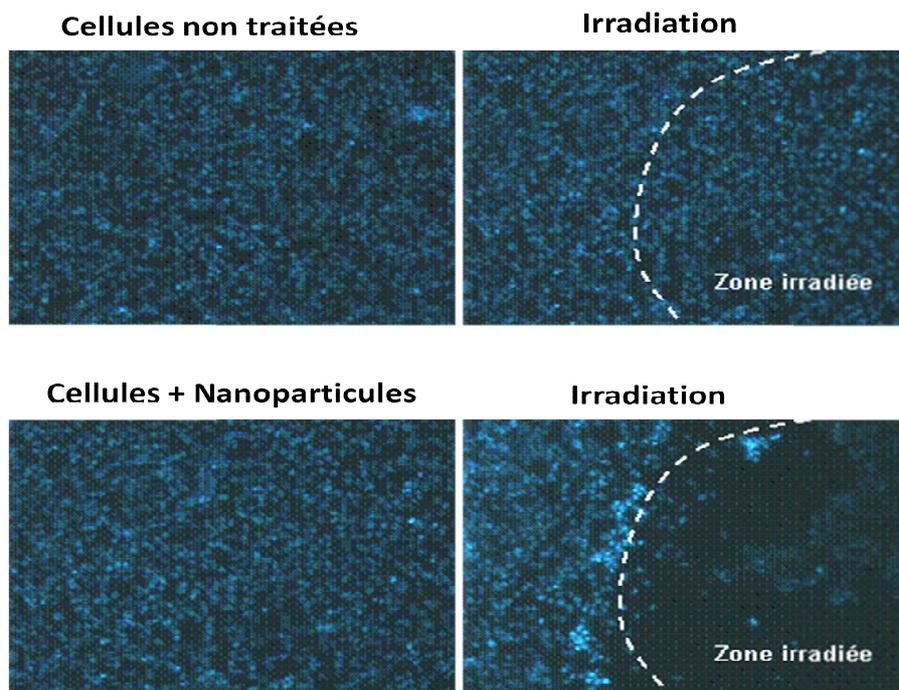


Figure 2.22 : Image des cellules MDA-MB-231 observées par microscope à fluorescence

L'ensemble des résultats obtenus montre bien l'efficacité du traitement avec la photothérapie dynamique en utilisant les nanoparticules encapsulant les porphyrines synthétisées. Cependant, les nanoparticules même non irradiées présentent une certaine toxicité, faible mais significative vis-à-vis des cellules. Il est donc primordial de préserver les cellules saines et d'améliorer leur efficacité en développant un moyen de ciblage des cellules cancéreuses.

B. Ciblage et thérapie photodynamique

Le ciblage actif des cellules tumorales en PDT consiste à modifier les photosensibilisateurs (PSs) ou les systèmes vecteur-PSs en les conjuguant à des molécules possédant une forte affinité pour des marqueurs spécifiques des cellules tumorales. L'adressage de PSs permet de limiter leur activité photodynamique aux cellules cancéreuses en modifiant leur biodistribution. Ainsi, l'efficacité de la PDT peut être améliorée et la phototoxicité des cellules saines diminuée.

Les cellules tumorales utilisées dans cette partie sont les MDA-MB-231 qui surexpriment à leur surface des lectines, récepteurs membranaires de type glycoprotéines reconnaissant spécifiquement les groupements osidiques. Elles guident les ligands glycosylés vers différents compartiments cellulaires tels que les lysosomes, les endosomes ou l'appareil de Golgi.

Les nanoparticules de silice préparées par microémulsion directe ne présentent en surface que des fonctions silanol et ne peuvent pas être l'objet d'un adressage spécifique vers les cellules cibles. Sans modifications supplémentaires, ces particules sont détectées par le système immunitaire humain comme corps étrangers, puis accumulées dans les tissus hépatiques. La surface des particules doit donc être modifiée chimiquement par un ligand afin d'être reconnue par les récepteurs de ces cellules. Le ligand que nous avons choisi d'utiliser est le mannose. La suite de ce chapitre décrit les étapes successives de la modification des nanoparticules.

1. Amination des nanoparticules

Pour pouvoir greffer la molécule ciblant sur les nanoparticules, ces dernières doivent être fonctionnalisées par un agent de couplage. Dans notre cas c'est l'aminotriéthoxysilane (APTS)¹⁷. En effet l'amine de l'APTS permet de maintenir la surface hydrophile et présente un grand choix de réactions chimiques mettant en jeu des liaisons covalentes. La réaction de greffage est réalisée en additionnant une solution alcoolique d'APTS goutte à goutte à une suspension aqueuse de nanoparticules (MSN-3-12). Pour éviter la condensation de la silice, le pH de la solution est ajusté à environ 7. Le mélange réactionnel est ensuite laissé réagir sous agitation pendant 20 heures à température ambiante. Les nanoparticules MSN-3-12-APTS sont extraites par centrifugation, lavées à l'éthanol et séchées sous vide d'air (figure 2.23).

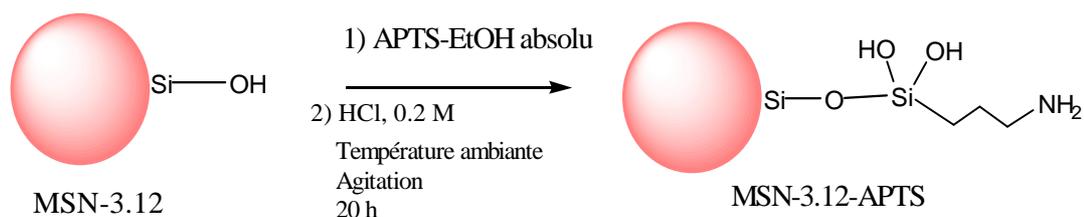


Figure 2.23 : Greffage de l'APTS sur MSN-3.12

3.2. Caractérisation

Le greffage de l'aminotriéthoxysilane est d'abord caractérisé qualitativement par le test à la ninhydrine, ensuite par RMN en phase solide du ^{29}Si et par adsorption et désorption de gaz (BET).

1.1.1. Test à la ninhydrine

La ninhydrine est le nom commercial de la 2,2-dihydroxy-1,3-indanedione. Cette molécule a été synthétisée la première fois en 1910 par S. Ruhemann¹⁸. Ce chimiste avait attiré l'attention sur la coloration bleu-violet intense qui apparaît lorsque la ninhydrine réagit avec les acides α -aminés et les amines primaires. La ninhydrine est ainsi devenue un réactif classique du groupement $-\text{NH}_2$ et est couramment utilisé en biologie¹⁹.

Cette réaction est due à l'oxydation de la fonction amino-acide par la ninhydrine (hydrate de tricétohydrindène) avec une perte de CO_2 et de NH_3 et la formation d'un aldéhyde en C (n-1) par rapport à l'acide. La ninhydrine réduite se condense alors avec une autre molécule de NH_3 et une molécule de ninhydrine non réduite pour donner un composé d'un bleu violet intense (dicétohydrindylène dicétohydrindamine) appelé pourpre de Ruhemann (figure 2.24).

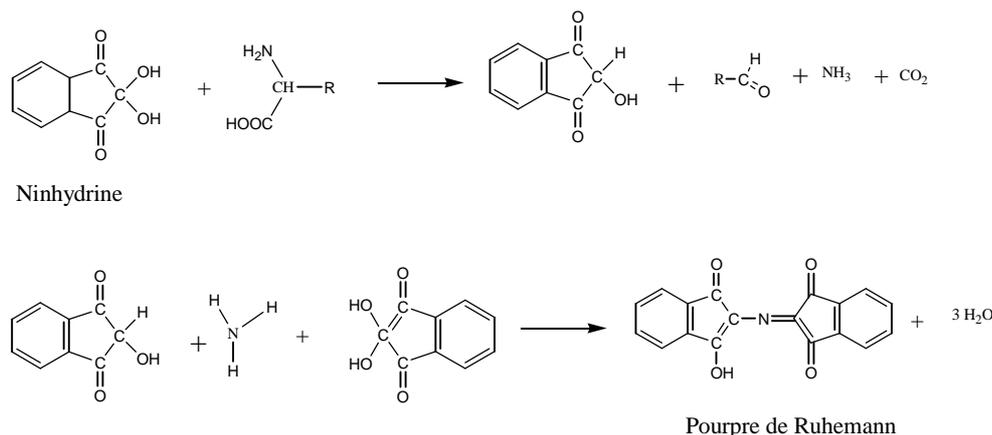


Figure 2.24 : Mécanisme de formation du pourpre de Ruhemann

Les amines primaires donnent une réaction analogue. Le test se déroule en ajoutant quelques millilitres d'une solution alcoolique de ninhydrine initialement de couleur jaune clair à une solution colloïdale de nanoparticules fonctionnalisées avec l'APTS. La solution obtenue prend une coloration bleue. Ce test est utilisé en routine après chaque greffage d'APTS sur la surface de silice.

1.1.2. Caractérisation par la RMN CP-MAS du ^{29}Si

La RMN en phase solide du ^{29}Si permet d'identifier l'environnement proche de Si. En fonction de la nature et du nombre de liaisons autour de l'atome de Si, son déplacement chimique est différent²⁰ (tableau 2.7).

Dans notre cas la silice MSN-3-12 et l'APTS n'apportent respectivement que des structures Q et T. Celles-ci permettent d'identifier les différentes espèces condensées (figures 2.25).

Structure		Déplacement chimique (ppm)
<i>M</i>	$\text{Si}(\text{OX})\text{C}_3$ (*)	+10 à -10
<i>D</i>	$\text{Si}(\text{OX})_2\text{C}_2$ (*)	-10 à -40
<i>T</i>	$\text{Si}(\text{OX})_3\text{C}$ (*)	-40 à -80
<i>Q</i>	$\text{Si}(\text{OX})_4$ (*)	-80 à -120

(*) avec X=H, R ou Si

Tableau 2.7 : Définition de l'environnement des différentes espèces du silicium et de leur déplacement chimique en RMN du ^{29}Si

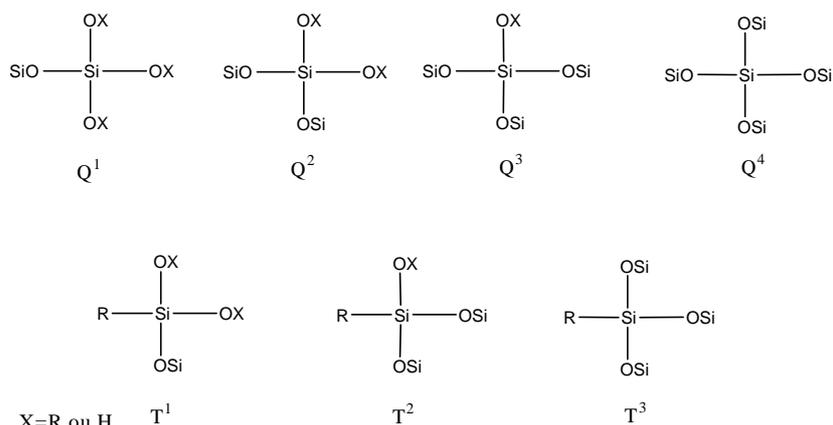


Figure 2.25 : Sous structures T^i et Q^i en RMN du ^{29}Si

Les spectre RMN solide du ^{29}Si des nanoparticules greffées et non greffées à l'APTS sont représentés sur la figure 2.26. Nous observons, sur les deux spectres, trois résonances situées à -91,96 ; -102,37 et -110,65 ppm. Ces résonances, caractéristiques d'unités tétrafonctionnelles, sont attribuées à des sites Q, correspondant à des unités Q², Q³ et Q⁴ du réseau silicique.

Les unités structurales Q⁴ représentent les tétraèdres SiO₄ liés du solide mésoporeux alors que les unités Q² et Q³ sont associées avec les groupements silanols. De même, on remarque que les déplacements chimiques et la quantité relative des unités Qⁿ sont similaires dans les nanoparticules greffées ou non greffées (MSN-3-12 et MSN-3-12-APTS). Ce résultat montre que le greffage de l'APTS n'a pas modifié la structure hexagonale de MSN-3-12.

Le spectre RMN de MSN-3-12-APTS, contrairement aux MSN-3.12, présente deux nouveaux pics à -55,28 et -68,74 ppm assignés aux espèces organosilylées T² et T³ respectivement. La présence de ces pics illustre bien que l'APTS a été bien greffé sur la surface des nanoparticules.

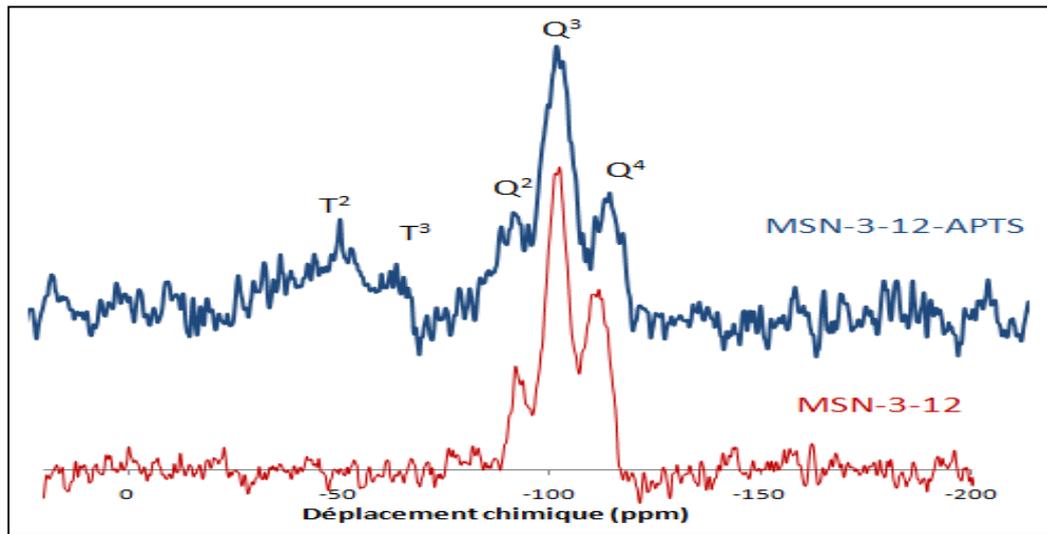


Figure 2.26 : Spectre RMN CP-MAS du ^{29}Si de a) MSN-3.12 et b) MSN-3.12-APTS

1.1.3. Caractérisation par adsorption de gaz BET

L'analyse BET des nanoparticules de silice sur lesquelles ont été greffées des molécules d'APTS met en évidence la mésoporosité de ces structures, les isothermes sont toujours de type IV (figure 2.27). Le greffage de l'APTS n'a pas modifié la structure de nos matériaux.

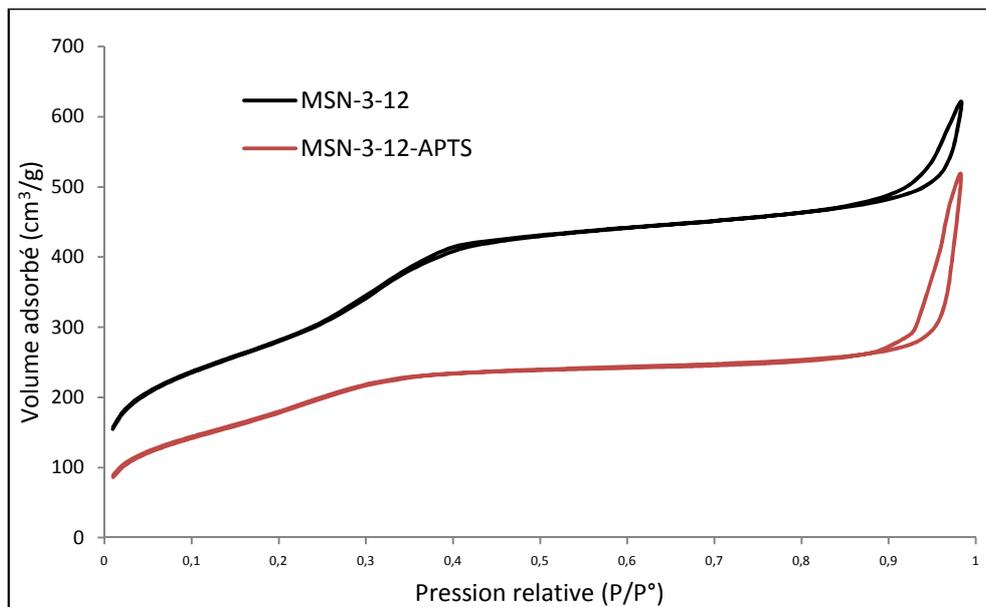


Figure 2.27 : Courbes d'adsorption et de désorption de gaz BET de nanoparticules greffées par de l'aminopropyltriéthoxysilane

Les surfaces spécifiques qu'elles développent sont inférieures à celles que développent les nanoparticules sans greffage. La taille des pores et le volume poreux obtenu sont également plus faibles (tableau 2.8). Cela résulte du recouvrement partiel des surfaces et de l'entrée des pores par l'APTS.

Echantillon	Surface spécifique BET ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Volume poreux BJH désorption ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Diamètre moyen de pores (nm)
MSN-3-12	1031	0,57	2,5
MSN-3-12-APTS	692	0,23	2,2

Tableau 2.8 : Caractéristiques BET des matériaux greffés par de l'APTS

2. Greffage de la molécule ciblante sur les nanoparticules aminées

Dans cette partie, la synthèse et le greffage de la molécule de ciblage sur les nanoparticules MSN-3.12 sont décrits.

3.3. Synthèse de la molécule ciblante (réaction de couplage)

Pour être greffée sur les nanoparticules fonctionnalisées par l'APTS, la molécule ciblante (4-nitrophenyl- α -D-manopyranoside) a été conjuguée avec le squarate (3,4-diethoxy-3-cyclobutene-1,2-dione). Cette molécule joue le rôle d'un agent de couplage entre le sucre et la surface fonctionnalisée des nanoparticules grâce à la présence des deux groupements partants qui seront éliminés durant les réactions de couplage et de greffage²¹. La réaction de réduction du groupement nitro présent dans le 4-nitrophenyl- α -D-manopyranoside a été d'abord effectuée. Cette réduction permet l'obtention d'un groupement amine, nécessaire pour la réaction de couplage qui se fait ensuite, entre le groupement amine et le carbone porteur du groupement éthoxy du squarate (figure 2.28), pour donner une liaison amine en libérant de l'éthanol.

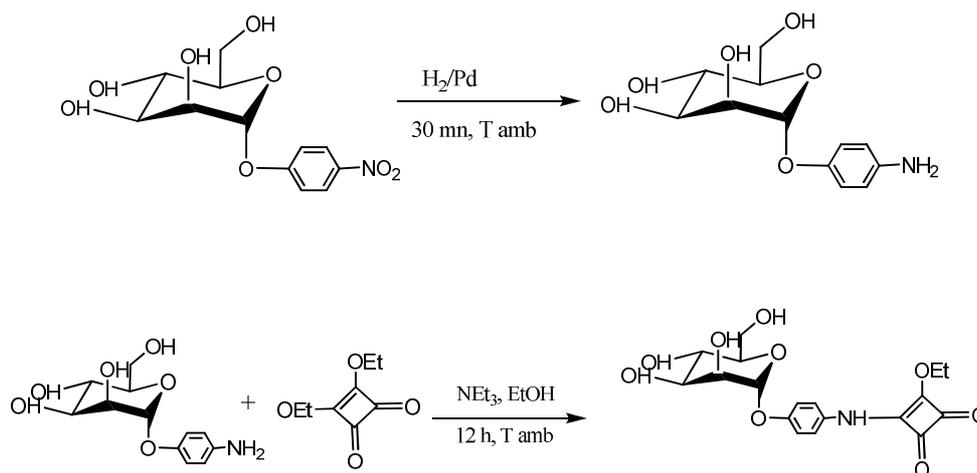


Figure 2.28 : Réaction de couplage squarate-mannose

3.4. Greffage du squarate-mannose

Après fonctionnalisation des particules de silice par des fonctions amine, il est possible de greffer les molécules ciblantes (figure 2.29). Le greffage se réalise après addition d'une solution alcoolique de la molécule ciblante sur une suspension des nanoparticules aminées en présence de triéthylamine (Et_3N). Les nanoparticules ainsi obtenues sont purifiées puis séchées sous vide.

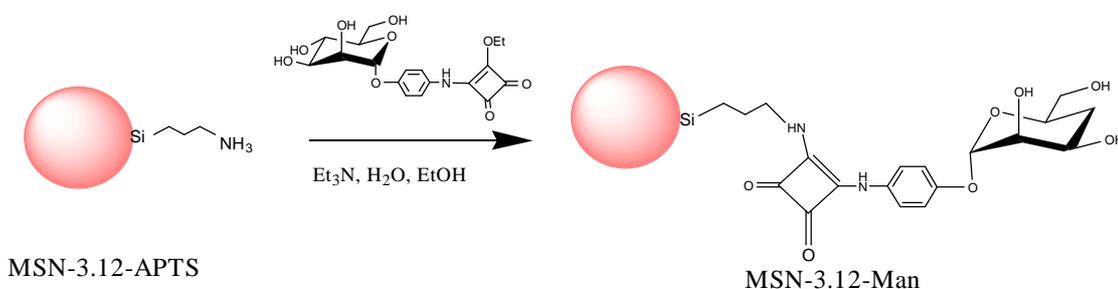


Figure 2.29 : Greffage du squarate mannose sur les nanoparticules MSN-3.12-APTS

Le greffage de la molécule ciblante a été mis en évidence par spectroscopie UV/Vis (figure 2.30). Le spectre des nanoparticules greffées montre deux bandes d'absorption caractéristiques du squarate mannose à 298 et 337 nm. On observe cependant, un déplacement bathochrome du spectre caractéristique du squarate-mannose lorsque celui-ci est greffé sur de la silice. La modification du spectre d'absorbance traduit bien le

changement d'environnement de la molécule squarate-mannose entre son état libre en solution aqueuse et celui après greffage.

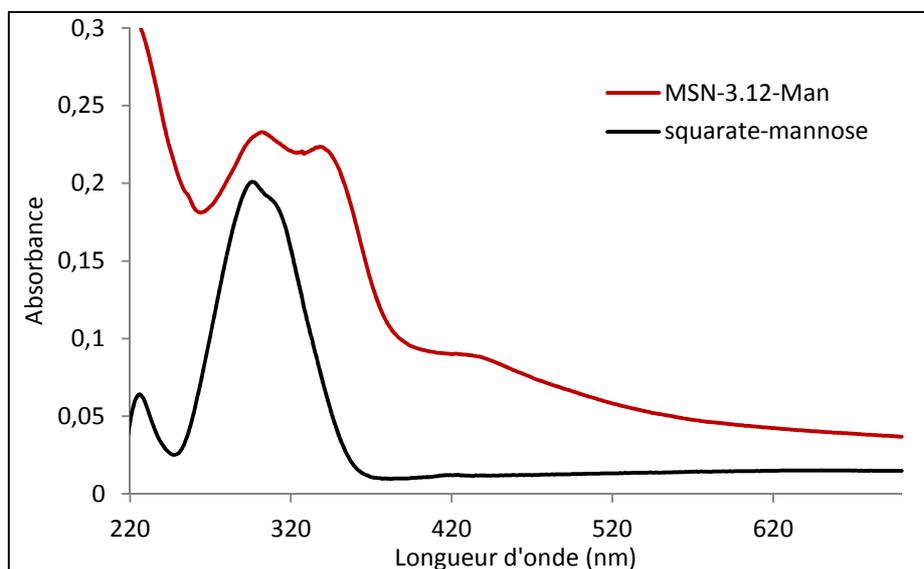


Figure 2.30 : Spectre UV-Visible des nanoparticules greffées avec du squarate-mannose

3.5. Dosage du squarate-mannose dans les nanoparticules

Le dosage du mannose greffé sur les nanoparticules a été effectué suivant le mode opératoire décrit par Monsigny et al ²². Le dosage est basé sur la réaction des sucres avec les hydroxyles des composés phénolés qui donne lieu à des acétals ou héli-acétals de couleur rougeâtre qui absorbent dans le visible (figure 2.31). Cette méthode nous a permis de déterminer la quantité de squarate-mannose greffée sur les nanoparticules.

La réaction se fait en préparant une suspension de nanoparticules dans l'acide acétique à laquelle est ajoutée du résorcinol (1,3-dihydroxybenzène) et de l'acide sulfurique. Le mélange réactionnel est agité vigoureusement avant d'être chauffé à 90° C pendant 30 min.

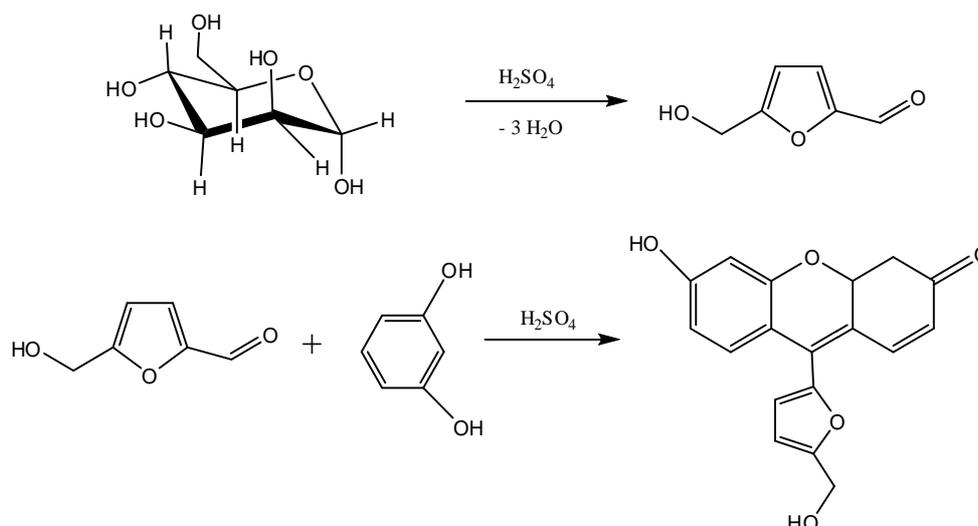


Figure 2.31 : Réaction du résorcinol avec les sucres

Le spectre UV/Vis obtenu (figure 2.32) montre la formation du produit de la réaction qui absorbe aux longueurs d'onde de 422 et de 480 nm. Afin d'éviter l'influence de l'absorption de la porphyrine sur la densité optique du produit, nous avons utilisé la longueur d'onde à 422 nm pour déterminer la quantité du sucre greffé. En effet la longueur d'onde correspondant à la bande Soret de la porphyrine **3** passe de 420 nm à 450 nm en milieu acide. La concentration du mannose greffée sur les nanoparticules a été trouvée égale à 4 mmol/g.

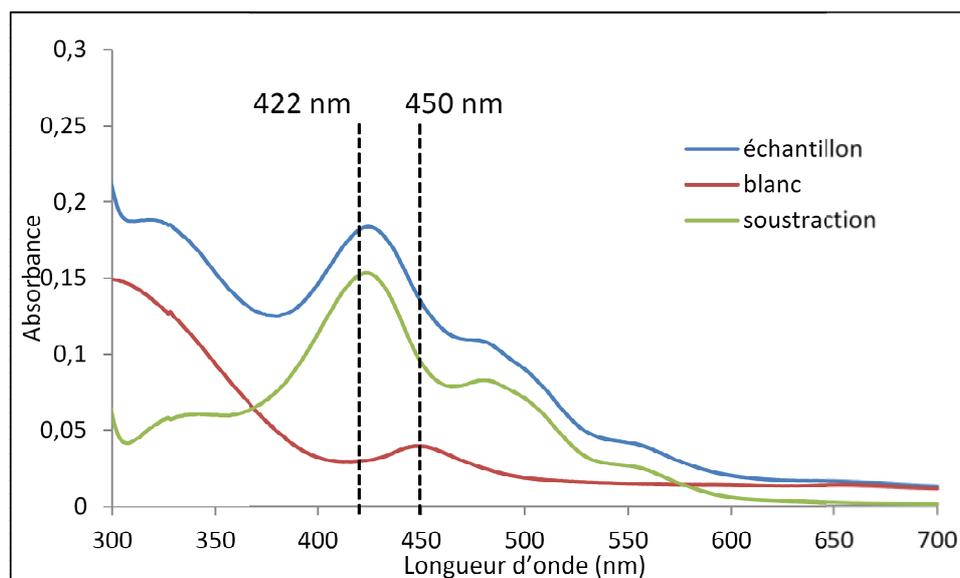


Figure 2.32 : Spectre UV-visible représentant le dosage du mannose de MSN-3.12-Man (Le blanc correspond au spectre UV-Vis des nanoparticules non traitées avec du résorcinol)

3. Activité PDT des nanoparticules greffées par des molécules ciblantes

L'efficacité des nanoparticules greffées avec la molécule de ciblage (squarate-mannose) en photothérapie dynamique a été testée sur la lignée cellulaire MDA-MB-231. Les résultats obtenus permettent de comparer l'efficacité des nanoparticules contenant la porphyrine cationique 3, recouverte ou non de mannose (figure 2.33). Comme on peut le voir sur la figure les cellules non traitées ne présentent pas de mort cellulaire. Les nanoparticules non greffées au mannose induisent 63 % de mort cellulaire. Par contre, dans le cas des nanoparticules greffées avec le mannose, on observe une augmentation significative de la mort cellulaire, le taux de mortalité atteint 100 %. Ce résultat met en évidence l'augmentation de l'efficacité photocytotoxique des nanoparticules par le ciblage provenant du mannose.

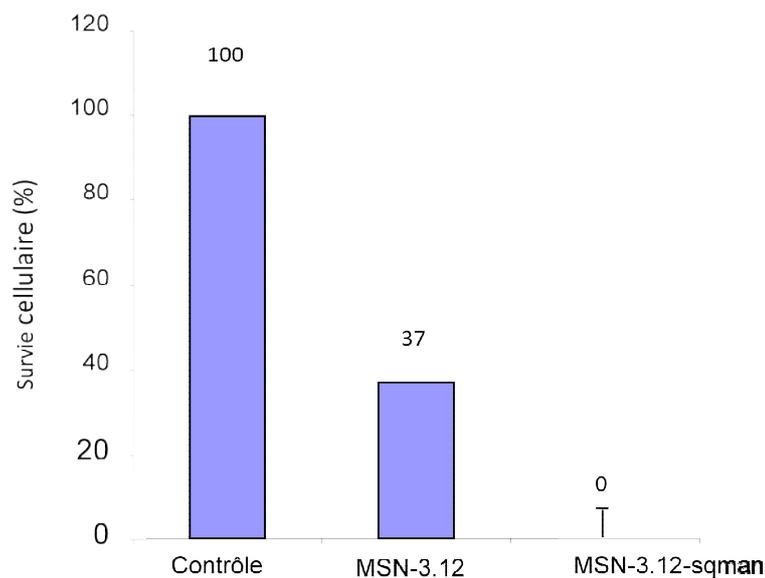


Figure 2.33 : Mort cellulaire induite par la PDT avec les nanoparticules greffées avec le mannose sur les cellules MDA-MB-231

La surexpression du récepteur du mannose dans les membranes des cellules cancéreuses permet la reconnaissance des nanoparticules fonctionnalisées, elles s'accumulent au voisinage des cellules atteintes grâce à la présence des résidus de mannose à leur surface. De ce fait un nombre plus important de ces nanoparticules sont internalisées par rapport aux nanoparticules non greffées. Ce qui explique l'augmentation de l'efficacité PDT des nanoparticules fonctionnalisées avec le mannose.

C. Internalisation des nanoparticules

L'oxygène singulet, principale espèce réactive en PDT, possède un temps de demi-vie très court ($\approx 4 \mu\text{s}$) et peut migrer d'une distance de moins de $0,02 \mu\text{m}$ après sa formation. De ce fait, les dommages induits par PDT seront localisés au voisinage du site de sa formation²³. En conséquence, la localisation intracellulaire du photosensibilisateur influe grandement sur la phototoxicité de ce dernier. En effet, un photosensibilisateur peut montrer une toxicité faible s'il est localisé dans la membrane plasmique que dans d'autres compartiments intracellulaires comme la mitochondrie ou les lysosomes²⁴.

Dans cette partie la localisation des nanoparticules de silice dans les cellules a été suivie par spectroscopie de fluorescence. Leur observation par microscopie confocale permet de déterminer leur localisation dans les différents compartiments cellulaires. Pour cela l'isothiocyanate de fluoresceine, un marqueur couramment utilisé en biologie, a été incorporé à la place des porphyrines dans les nanoparticules de manière covalente.

1. Rappel sur la spectroscopie de fluorescence

Une molécule fluorescente (fluorophore ou fluorochrome) possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). Une fois l'énergie du photon absorbée, la molécule se trouve alors généralement dans un état électroniquement excité, souvent un état singulet, que l'on note S^1 . Le retour à l'état fondamental peut alors se faire de différentes manières : soit par fluorescence (figure 2.34), soit par phosphorescence. La fluorescence se distingue de la phosphorescence en ce que la production de lumière intervient immédiatement ou rapidement après l'excitation.

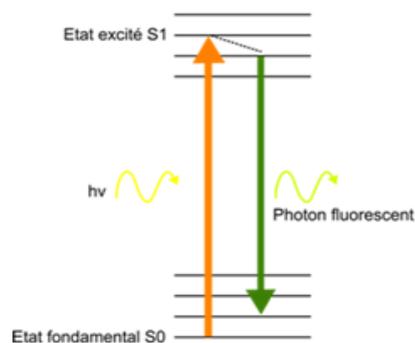


Figure 2.34 : Principe de la fluorescence

Les fluorochromes commerciaux les plus utilisés pour le marquage biologique sont la fluorescéine isothiocyanate (FITC) ^{25, 26}, la rhodamine B (RhB) ^{27, 28}, la protéine fluorescente verte (green fluorescent protein, GFP) (figure 2.35) ^{29, 30}.

La microscopie en fluorescence (ou en *épifluorescence*) est une technique utilisant un microscope optique en tirant profit du phénomène de fluorescence. On peut ainsi observer divers objets, substances (organiques ou inorganiques) ou échantillons d'organismes morts ou vivants.

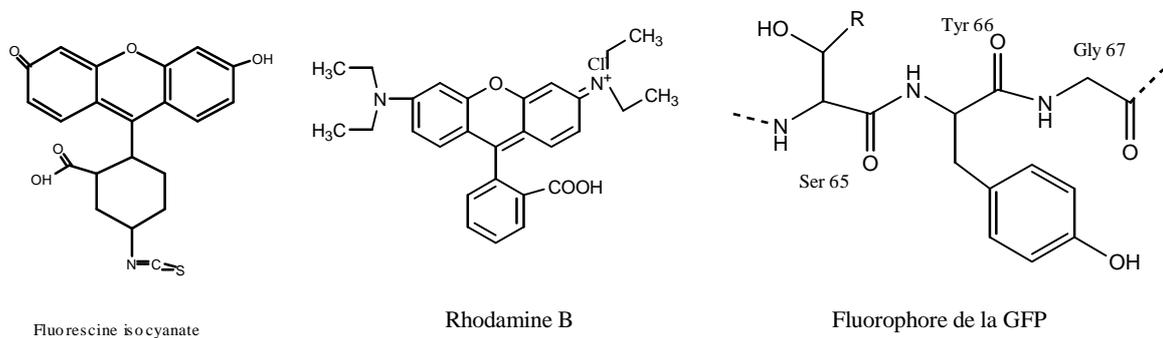


Figure 2.35 : Fluorochromes utilisés en fluorescence

2. Principe de la microscopie confocale

La microscopie confocale a été mise au point en 1955 par Marvin Minsky pour étudier le parenchyme cérébral. Elle présente de nombreux avantages par rapport à la microscopie conventionnelle ³¹. Les images obtenues par microscopie à fluorescence classique ont une perte de résolution de l'image due à l'excitation des fluorochromes se situant hors du plan focal. En effet, les fluorochromes sont excités par le laser sur toute l'épaisseur de la préparation, ce qui se traduit par une image contaminée par un bruit de fond et donc une perte de résolution axiale. Basée sur l'élimination des signaux de fluorescence provenant des régions situées en dehors du plan focal (figure 2.36) ³², la technique d'imagerie confocale de fluorescence représente une avancée technologique importante puisqu'elle permet d'obtenir des images de grande résolution qui sont couramment appelées coupes « optiques ». De plus, en positionnant le plan focal à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, il est possible de réaliser des séries d'images en deux dimensions à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle de l'objet ³³.

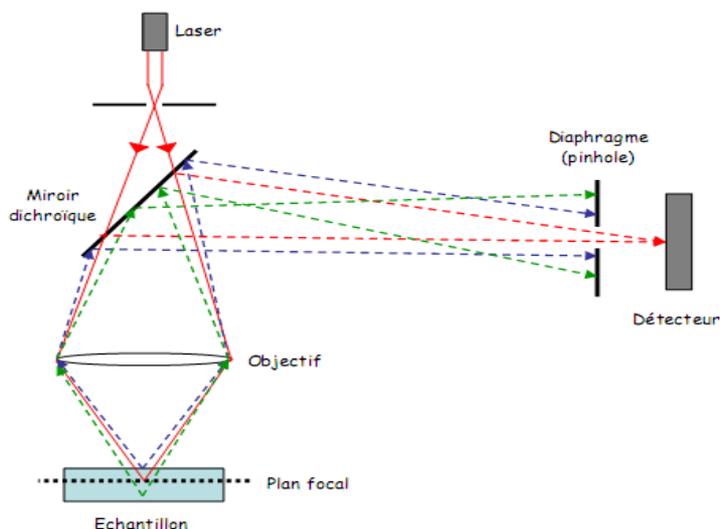


Figure 2.36 : Principe du microscope confocal

Le rayon laser excitateur pénètre dans l'échantillon marqué avec des fluorochromes, il y a alors émission des rayons fluorescents provenant de différents plans de la préparation. Grâce à un diaphragme variable ou « pinhole » qui élimine le signal fluorescent provenant d'autres plans, il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de la préparation. Ces rayons passent alors à travers un bloc de filtrage des longueurs d'onde, puis arrivent à un système de détection par photomultiplicateur.

3. Synthèse de nanoparticules encapsulant la fluorescéine isothiocyanate

Pour suivre l'internalisation des nanoparticules dans les cellules, nous avons synthétisé des nanoparticules de silice encapsulant l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) par voie covalente. La molécule est préalablement mise en réaction avec le 3-aminopropyltriéthoxysilane, puis la molécule formée est condensée avec le TEOS en présence du CTMABr (Figure 2.37).

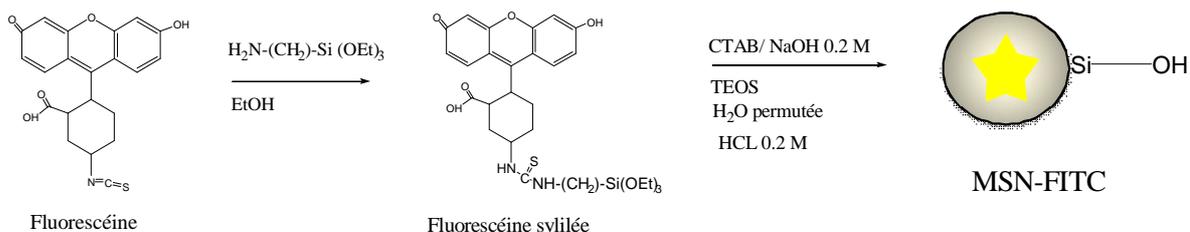


Figure 2.37 : Synthèse des nanoparticules MSN-FITC

L'élimination du tensio-actif se fait suivant le procédé décrit par Lang et al ³⁴, une méthode simple, rapide et efficace comparée au traitement au soxhlet et lavage au reflux pendant 2 heures. Les nanoparticules de silice sont traitées avec une solution de nitrate d'ammonium dans l'éthanol 95% sous agitation pendant 15 mn à 60°C. Le protocole d'extraction est répété deux fois. Le spectre IR obtenu pour ces nanoparticules montre la disparition des pics caractérisant le tensio-actif, confirmant l'efficacité de cette méthode.

La quantité de FITC encapsulée dans la matrice de silice a été déterminée par spectroscopie UV/Vis suivant le protocole décrit pour les nanoparticules encapsulant les porphyrines (figure 2.38). Le spectre montre bien l'encapsulation de la FITC, les bandes d'absorption maximales principales apparaissent à 457 et 485 nm. La quantité encapsulée est de 1,97 μmol par g de nanoparticules.

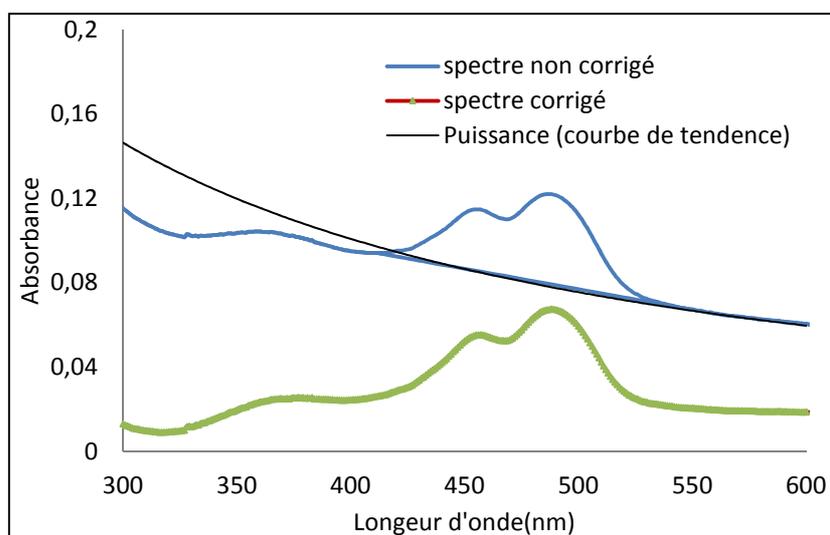


Figure 2.38 : Spectre UV-Visible de nanoparticules encapsulant la FITC

3.6. Amination des nanoparticules MSN-FITC

Le greffage de l'aminotriéthoxysilane sur la surface des nanoparticules fluorescentes s'est effectué suivant le protocole expérimental décrit pour les nanoparticules encapsulant les porphyrines.

3.7. Greffage de la molécule ciblante sur les nanoparticules aminées

Afin de mettre en évidence le ciblage spécifique des nanoparticules nous avons greffé à la surface de celle-ci du squarate mannose suivant le même protocole décrit dans la partie B (§ 2.2). Des quantités de 0,1 et 0,5 équivalents ont été utilisées, conduisant aux particules MSN-FITC-0,1 et MSN-FITC-0,5 respectivement et ce afin de suivre l'influence de la concentration de la molécule de ciblage greffée à la surface des nanoparticules sur le phénomène d'endocytose des cellules.

Le spectre UV/Vis obtenu (figure 2.39) montre la formation du produit de réaction qui absorbe à 422 et 480 nm confirmant le greffage du squarate mannose. Dans ce cas également, afin d'éviter l'influence des bandes d'absorption de l'isothiocyanate de fluorescéine sur la densité optique du produit, nous avons utilisé la longueur d'onde à 422 nm. Nous avons obtenu une concentration de 0,035 mmol/g et 0,087 mmol/g de nanoparticules pour MSN-FITC-0,1 et MSN-FITC-0,5 respectivement.

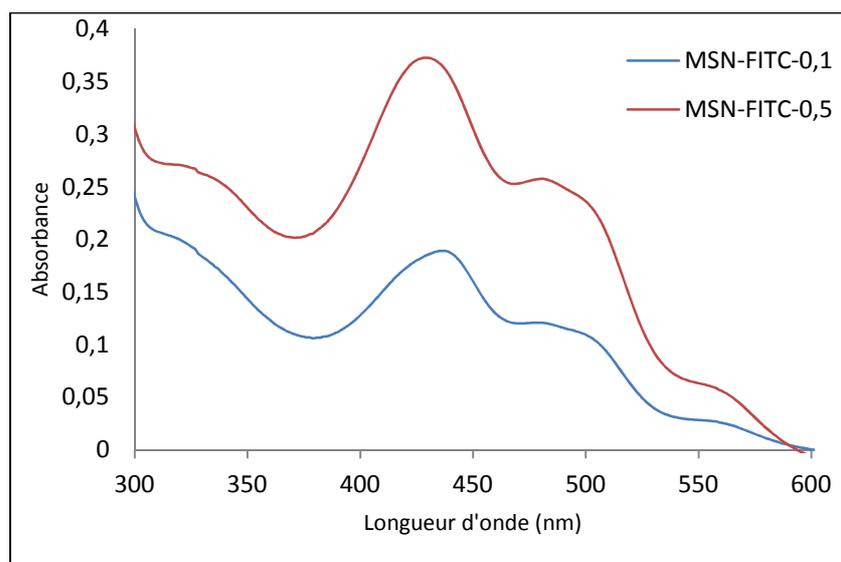


Figure 2.39 : Dosage du squarate mannose greffé sur les nanoparticules aminées

4. Fluorescence des échantillons

L'étude de la fluorescence des nanoparticules greffées ou non au mannose permet de déterminer si la FITC est toujours présente dans la matrice de silice et si elle n'a pas été dégradée au cours des différents traitements et greffages. L'excitation a été réalisée dans l'éthanol à la longueur d'absorption maximale de la FITC (490 nm). A cette longueur d'onde, un pic de fluorescence d'intensité maximale à 530 nm est observé sur le spectre

d'émission des nanoparticules (figure 2.40). Une diminution de l'intensité de fluorescence des nanoparticules est constatée dans le cas des nanoparticules greffées avec le mannose, cependant le signal est suffisant pour être détecté en microscopie confocale.

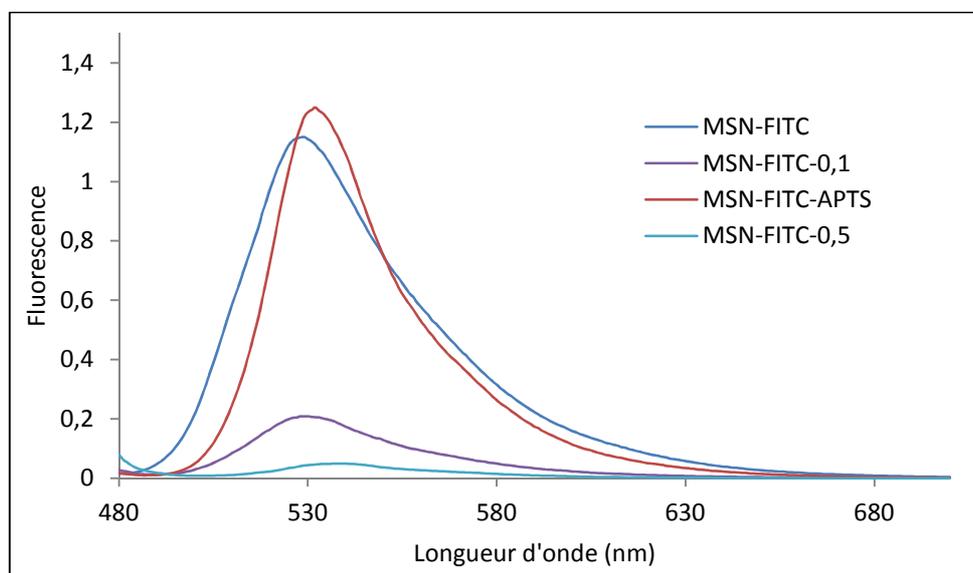


Figure 2.40 : Spectre de fluorescence dans l'éthanol des nanoparticules (1,5 mg de nanoparticules dans 5 ml d'EtOH, excitation à 490 nm)

5. Observation en microscopie confocale

Les nanoparticules fonctionnalisées ou non avec du mannose sont incubées pendant 24 heures avec les cellules MDA-MB-231. Le marquage des différents compartiments permet leur distinction sur les images de la figure 2.41 A. On peut voir les noyaux émettant dans le bleu, les lysosomes dans le rouge et la FITC incorporée dans les nanoparticules dans le vert.

Les images superposées montrent que les nanoparticules internalisées se trouvent dans les lysosomes, les nanoparticules colorées en vert apparaissent en jaune avec la superposition de la couleur rouge des lysosomes. Le nombre de nanoparticules fonctionnalisées au manose internalisées est plus important que celui des nanoparticules non greffées.

En outre, les nanoparticules MSN-FITC-0,5 sont moins internalisées que les MSN-FITC-0,1 confirmant qu'une forte concentration de mannose greffé à la surface des nanoparticules entraîne une inhibition de l'internalisation de ces dernière dans les cellules.

Afin de vérifier que l'incorporation des nanoparticules dans les cellules implique le récepteur au mannose, une expérience de compétition en présence d'un excès de mannose dans le milieu d'incubation a été réalisée. Ainsi, les résultats donnés sur la figure 2.41 B que lorsque la concentration du mannose augmente le nombre de nanoparticules internalisées diminue. L'inhibition de l'internalisation des nanoparticules par le mannose démontre que ce processus se fait par endocytose activée par le récepteur au mannose.

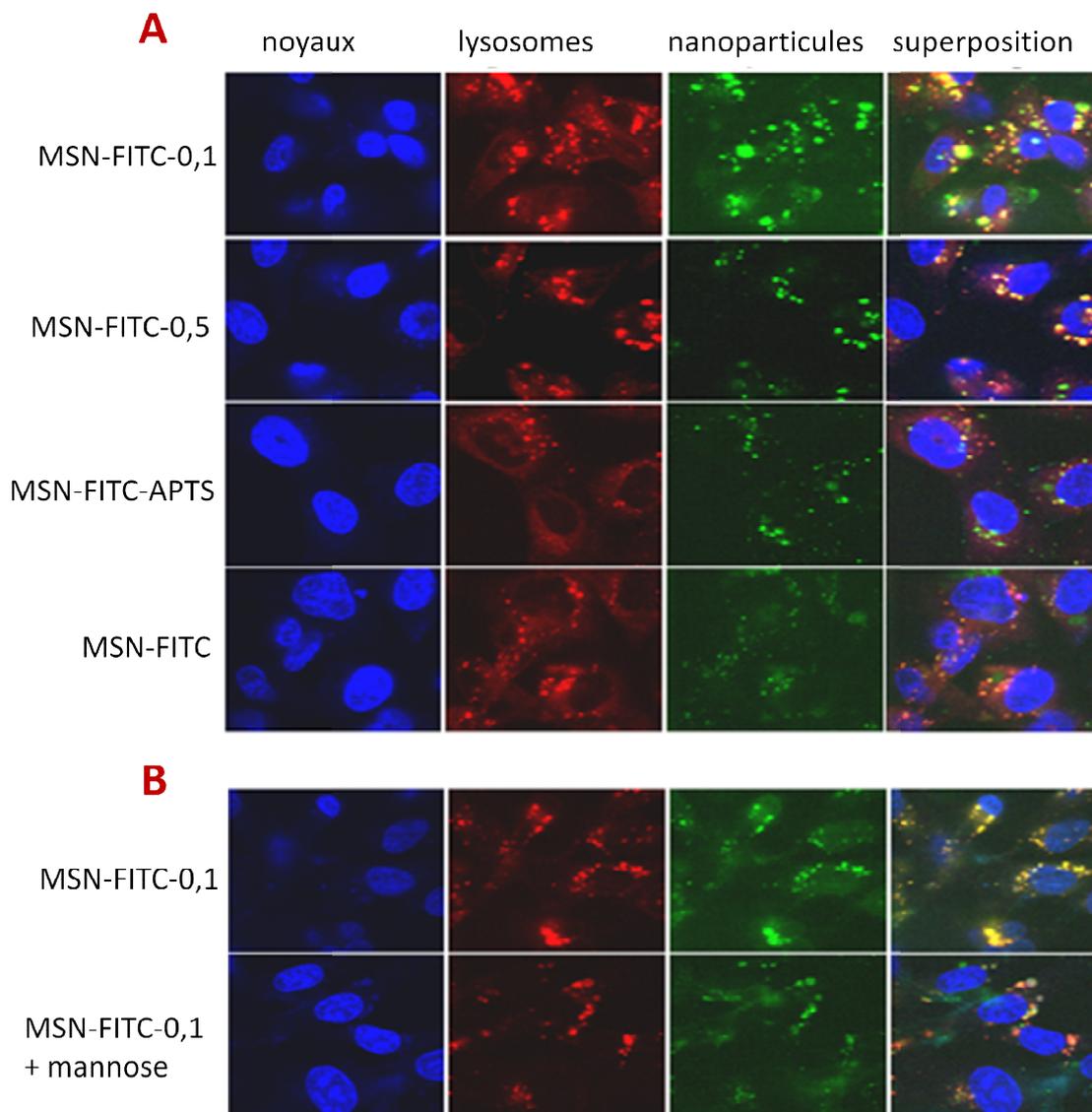


Figure 2.41 : Images obtenues par microscopie confocale des cellules MDA-MB-231 après 24 heures d'incubation avec les nanoparticules. A) Co-localisation des nanoparticules fonctionnalisées ou non avec le mannose avec les lysosomes. B) Co-localisation des nanoparticules fonctionnalisées avec le mannose en absence ou en présence d'un excès de mannose

Pour évaluer le degré de localisation des nanoparticules dans les lysosomes, le coefficient de co-localisation qui représente le niveau relatif des nanoparticules dans les lysosomes par rapport à la surface totale des lysosomes et le coefficient Manders qui nous renseigne sur le degré de co-localisation (vert/jaune) des nanoparticules dans les lysosomes ont été calculés, une valeur de 1 du coefficient de Manders indique une entière co-localisation des nanoparticules dans les lysosomes. Dans le tableau 2.9, nous avons rassemblé les valeurs calculées pour les nanoparticules. Les valeurs trouvées pour les deux coefficients sont plus élevées dans le cas des nanoparticules fonctionnalisées avec du mannose (MSN-FITC-0.1) et sont en accord avec les images observées.

Nanoparticules	MSN-FITC	MSN-FITC- APTS	MSN-FITC-0.5	MSN-FITC-0.1
Coefficient de Manders	0,94	0,85	0,91	0,98
Coefficient de co-localisation	0,29	0,46	0,69	0,82

Tableau 2.9 : Quantification de la localisation des nanoparticules dans les lysosomes

D. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons synthétisé des nanoparticules de silice mésoporeuses dans lesquelles le photosensibilisateur est encapsulé par liaison covalente. La caractérisation des nanoparticules par les différentes techniques d'analyse a permis de confirmer la structure mésoporeuse de ces dernières et l'incorporation des photosensibilisateur dans la matrice de silice. Les nanoparticules ainsi obtenues ont montré leur efficacité en PDT sur les cellules tumorale étudiées. Le greffage du mannose en surface confère aux nanoparticules des propriétés de reconnaissance substrat-récepteur intéressantes permettant ainsi une meilleure internalisation dans les cellules et une nette amélioration de la phototoxicité.

Partie expérimentale

Synthèse de nanoparticules de silice sans porphyrines : MSN

Dans un erlenmeyer de 500 mL, 686 mg (0,12 éq) de tensio-actif (CTMABr) sont dissous dans 39 ml (7,8 mmol, 0,5 éq) de soude 0,2 M, l'erlenmeyer est placé dans un bain thermostaté à 25°C sous agitation magnétique. Après dissolution du tensio-actif, 3,5 ml de tétraéthoxysilane (TEOS) sont ajoutés goutte à goutte à la solution. Après 40 secondes d'agitation, 250 ml d'eau permutée sont additionnées rapidement. Au bout de 6 minutes, la condensation est déclenchée (la solution devient opaque). La suspension est alors neutralisée rapidement par une solution d'acide chlorhydrique 0,2 M jusqu'à un pH voisinant 7.

La suspension obtenue est centrifugée à 20000 tr/mn pendant 10 mn pour extraire les nanoparticules. Ces dernières sont lavées à l'éthanol absolu (3 cycles de traitement).

Synthèse de nanoparticules de silice encapsulant les porphyrines par voie non covalente : MSN-1

La synthèse de ces nanoparticules s'effectue selon le même protocole expérimental en ajoutant 4 mg de la porphyrine **1** dans le surfactant dissous.

Synthèse de nanoparticules de silice encapsulant les porphyrines par voie covalente.

- **MSN-2.4**

Sylilation : 4 mg de porphyrine **2** ($3,15 \cdot 10^{-3}$ mmol) sont dissous dans 1 ml de méthanol. 2 μ l de mercaptopropyltriméthoxysilane (2 éq, $6,3 \cdot 10^{-3}$ mmol) sont additionnés et la réaction est maintenue à température ambiante pendant une nuit.

La synthèse des nanoparticules se poursuit de la même manière décrite précédemment en ajoutant la porphyrine préconjuguée au tensio-actif dissous.

- **MSN-2.8**

8 mg de porphyrine **2** ($6,3 \cdot 10^{-3}$ mmol) et 4,3 μ l de mercaptotriméthoxysilane ($21,78 \cdot 10^{-3}$ mmol). La préparation des nanoparticules se fait en prenant 343 mg ($0,9 \cdot 10^{-3}$ mmol) de CTABr dissous dans 20 ml de soude 0,2 M, 1,75 ml ($0,8 \cdot 10^{-2}$ mmol) de tétraéthoxysilane et 128 ml d'eau permutée.

- **MSN-3.4**

Silylation : 4 mg de la porphyrine **3** ($3,66 \cdot 10^{-3}$ mmol) sont dissous dans 1 ml d'éthanol. 1,28 μ l d'aminopropyltriméthoxysilane APTS ($5,45 \cdot 10^{-3}$ mmol) sont ajoutés à la solution. La réaction est maintenue à température ambiante pendant une nuit.

- **MSN-3.12**

12 mg de porphyrine **3** dissous dans 1 ml de méthanol auxquels 4,8 μ l d'APTS ($2,72 \cdot 10^{-2}$ mmol) sont additionnés. La solution est agitée à température ambiante pendant une nuit. Les nanoparticules sont synthétisées et traitées de la même manière que MSN-3-4.

- **MSN-4**

Dans un ballon de 25 ml, 10 mg ($10,8 \cdot 10^{-6}$ moles) de porphyrine **4** sont dissous dans 1 ml d'éthanol absolu, 13,57 μ l (5 éq., $54 \cdot 10^{-6}$ moles) de isocyanatopropyltriéthoxysilane sont additionnés. 7,52 μ l (4 éq, $43,2 \cdot 10^{-6}$ moles) de diisoprpylamine sont ensuite ajoutés à la solution. Le mélange ainsi obtenu est laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Les nanoparticules sont préparées dans les mêmes conditions décrites précédemment.

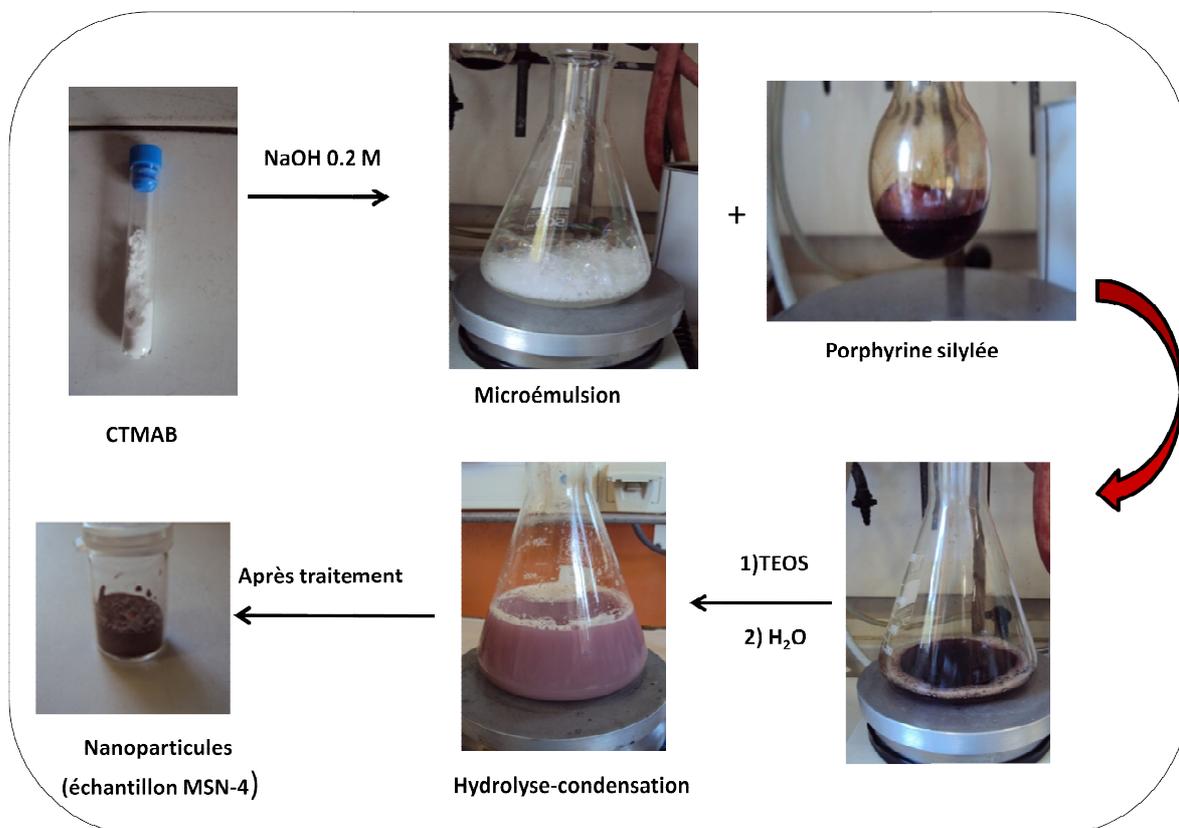


Schéma de synthèse de MSN encapsulant une porphyrine par voie covalente

Traitement des nanoparticules

Les nanoparticules récupérées par centrifugation sont lavées avec de l'éthanol puis traitées au soxhlet pour extraire les résidus du tensioactif. Le traitement se poursuit par mise en suspension des nanoparticules dans une solution EtOH/HCl 12 N (4/1) sous reflux durant 2 h à 60°C. Après centrifugation, l'opération est répétée deux fois, puis les nanoparticules sont remises en suspension dans l'eau et centrifugées jusqu'à obtention un pH de l'ordre de 6 (l'opération de lavage est répétée 6 fois), Les nanoparticules sont ensuite séchées sous vide. La purification des nanoparticules est suivie par spectroscopie infra-rouge. Après purification et séchage, une moyenne de 700 mg de nanoparticules est obtenue.

Caractérisation :

- FTIR (KBr, ν cm^{-1}) : $\nu_{\text{Si-OH (élongation)}} = 3374 \text{ cm}^{-1}$
 $\nu_{\text{Si-O-Si (élongation)}} = 1050 \text{ cm}^{-1}$
 $\nu_{\text{Si-O (déformation)}} = 791 \text{ cm}^{-1}$
- Analyse élémentaire :

Echantillon	C%	H%	N%
MSN	3,07	1,62	0,16
MSN-1	19,45	4,41	1,04
MSN-2-4	5,51	2,16	0,18
MSN-2-8	1,80	1,10	0,17
MSN-3-4	2,69	1,72	0,08
MSN-12	6,85	2,21	0,22
MSN-4	3,61	3,95	0,47

- Spectroscopie UV-Visible

Le dosage des porphyrines encapsulées est réalisé en dispersant 2 mg de nanoparticules dans 10 ml d'éthanol. La suspension est ensuite analysée par UV-Visible à 418 nm dans le cas de MSN-4 et à 428 nm dans le cas de MSN-2.8 et MSN-3.12. Une droite d'étalonnage est préalablement effectuée pour les trois porphyrines

Greffage de l'aminopropyltriéthoxysilane (APTS) : MSN-3.12-APTS

**Les quantités de réactifs sont calculées à partir d'une évaluation du nombre de Si de surface accessibles et susceptibles de réagir avec les molécules d'APTS. Le calcul permet de déduire que 1/5 des unités SiO₂ d'une nanoparticule sont des unités de surface. Cette évaluation nous permet de travailler dans des conditions et proportions réalistes de molécules à greffer⁶.*

100 mg de nanoparticules (MSN-4) sont mises en suspension dans 5 ml d'eau permutée aux ultrasons pendant 10 mn. Une solution d'APTS (155 µl d'APTS dans 5 ml d'EtOH) est ajoutée goutte à goutte à la suspension de nanoparticules sous agitation. Le pH de la solution est ajusté à 7 avec HCl 0,2 M (environ 14 ml). La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 20 h, centrifugées pendant 10 mn à 20000 tr/min. Les nanoparticules sont lavées à l'éthanol absolu et séchées sous vide. Une masse de 57 mg est récupérée.

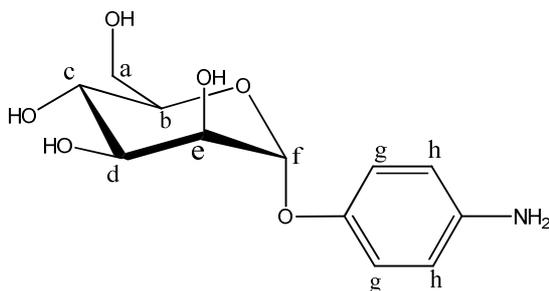
Caractérisation

- Test à la ninhydrine

Le test se déroule en ajoutant quelques millilitres de solution de ninhydrine à 0,5% en masse préparée dans de l'éthanol à 65 % à une solution colloïdale de nanoparticules. En présence d'acide aminés ou d'amine primaires, la solution prend une couleur bleu en quelques minutes.

- Analyse élémentaire : %C : 7,42 ; %H : 2,69 ; % N: 2,17, correspondant à une quantité de 1,55 mmol de fonctions amines greffées par gramme de nanoparticules.

Réduction du 4-nitrophenyl- α -manopyranoside.



Dans un ballon bicol de 100 ml, 1g ($3,32 \cdot 10^{-3}$ moles) de 4-nitrophenyl- α -manopyranoside est dissous dans 125 ml de méthanol. Après avoir mis le montage sous argon, 550 mg ($5,2 \cdot 10^{-4}$ moles) de palladium sur charbon (Pd/C 10%) sont ajoutés. Le milieu est ensuite placé sous atmosphère d'hydrogène à l'aide d'un ballon. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/MeOH 7/3 v/v) et est terminée au bout de 90 minutes. Le produit ainsi obtenu est filtré sur célite pour éliminer le palladium et le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant AcOE/ MeOH 80/20), après évaporation du solvant le produit final est un solide de couleur jaunâtre.

Rdt = 75 %

Caractérisation :

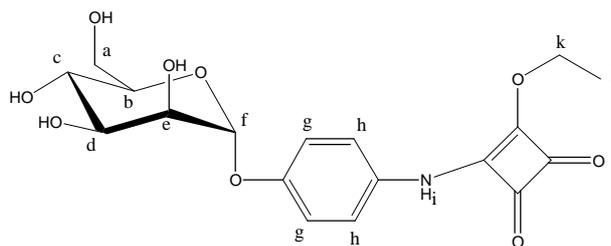
RMN ^1H (δ ppm, D_2O): $\text{H}_{\text{d,e,f}}$ 3,5-3,76 (m, 3H) ; H_{c} 3,90 (dd, 1H) ; H_{b} 4,06 (td, 1H) ; H_{a} 5,36 (d, 2H) ; H_{g} 6,71(d, 2H) ; H_{h} 6,90 (d, 2H).

UV/Visible

Pics d'absorbance maximale:

$$\lambda_1 = 224, \lambda_2 = 298, \lambda_3 = 337 \text{ nm.}$$

Couplage du 4-nitrophenyl- α -mannopyranoside avec le 3,4-diéthoxy-3-cyclobutène-1,2-dione (squarate)



Dans un ballon de 100 ml on dissout 1,44 g ($5,31 \cdot 10^{-3}$ moles) de mannose réduit dans 25 ml d'une solution EtOH/H₂O (5/3 v/v) sous atmosphère d'argon. 865 μ l ($5,84 \cdot 10^{-3}$ moles) de squarate sont introduits dans le milieu réactionnel. Le ballon est laissé sous agitation et à température ambiante pendant 12 heures et la réaction est suivie par CCM (AcOEt/MeOH 7/3). Les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant AcOEt / MeOH 80/20).

Rdt = 62 %

Caractérisation :

RMN ¹H (δ ppm, D₂O): H_l 1,37 (t, 3H) ; H_k 4,46 (m, 2H) ; H_i 5,50 (s, 1H)

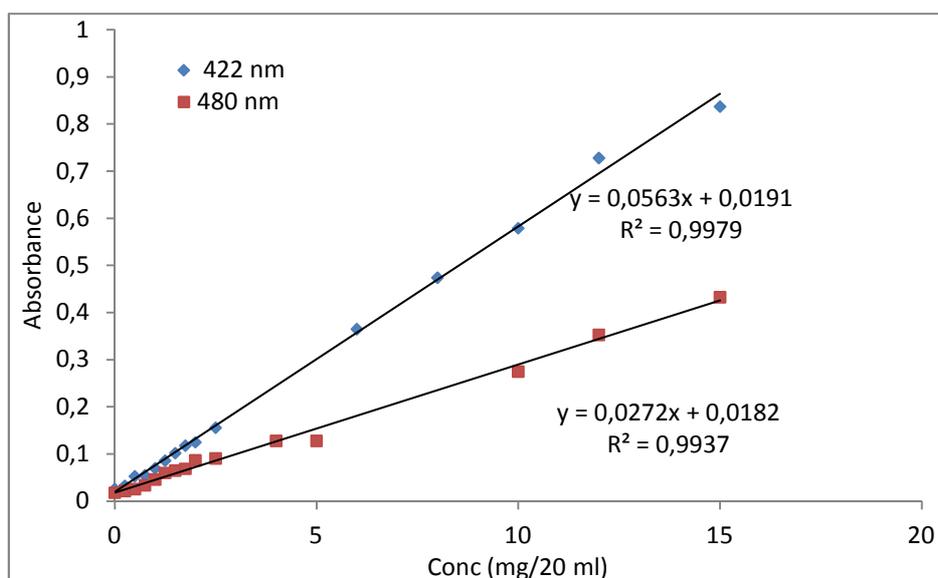
MSN-3.12-APTS-SqMan

Dans un ballon de 25 ml, 30 mg (1,5 mmol de NH₂) de nanoparticules aminées (MSN-3-12-NH₂) sont mises en suspension dans 2,5 ml d'éthanol absolu. 2 mg (0,1 μ eq, $4,5 \cdot 10^{-3}$ mol) de squarate-mannose (p-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxy-cyclobut-1-enyl) amino]phenyl- α -D-mannopyranoside) sont dissous dans 5 ml d'un mélange EtOH/H₂O 3/2. La solution est ajoutée ensuite goutte à goutte à la suspension de nanoparticules. 500 μ l de triéthylamine (Et₃N) sont additionnés au mélange réactionnel. La réaction est maintenue sous agitation pendant 20 h. Les nanoparticules greffées sont récupérées par centrifugation (20000 tr pendant 10 mn), lavées avec de l'eau permutée (trois fois) et de l'éthanol (deux fois).

Dosage du squarate-mannose

- Etalonnage

L'étalonnage du squarate-mannose a été effectué comme suit : une gamme d'échantillons de mannose est préparée en pesant de 1 à 15 mg dissous dans 20 ml d'acide acétique (0,05 M). 200 µl sont prélevés de chaque échantillon et mis dans des tubes eppendorf auxquels sont ajoutés respectivement 200 µl de résorcinol à 6 g/l (0,054 M) préalablement préparés et conservé à 4°C et 1 ml d'H₂SO₄ à 75% (100 ml H₂SO₄ concentré + 24 ml de H₂O distillée). Les tubes sont agités vigoureusement au vortex puis placés dans un bain-marie à 90°C pendant 30 minutes. On observe alors un changement de couleur dont l'intensité est proportionnelle à la concentration du mannose. Les échantillons sont ensuite placés dans le noir pendant 30 minutes et ensuite analysés par UV-Vis. Afin de déterminer la longueur d'onde maximale pour l'étalonnage, un spectre UV-Vis est réalisé pour un échantillon (12 mg/ml). Deux bandes d'absorption situées à 422 et 480 nm sont observées. Les droites d'étalonnage sont tracées à ces deux longueurs d'ondes.



- Dosage

Le dosage du mannose dans l'échantillon MSN-3.12 s'effectue selon le même protocole que précédemment où la solution du mannose est remplacée ici par une solution de nanoparticules. 5 mg de nanoparticules sont mis en suspension dans 1 ml d'acide acétique

Synthèse de nanoparticules encapsulant la FITC

La silylation de la FITC s'effectue par mise en réaction de 10 mg de FITC ($2,57 \cdot 10^{-5}$ mmol) dissous dans 1,5 ml d'EtOH avec 5,33 μ l d'APTS ($2,55 \cdot 10^{-2}$ mmol). La réaction est maintenue à température ambiante pendant une nuit. Les nanoparticules MSN-FITC sont préparées en ajoutant cette solution au tensio-actif dissous.

L'élimination du tensio-actif se fait par traitement des nanoparticules avec une solution de nitrate d'ammonium dans l'éthanol 95%. La solution est préparée avec un rapport $\text{NH}_4^+/\text{CTMA}^+ = 5$. 0,752 mg de NH_4NO_3 sont dissous dans 150 ml d'éthanol 95%.

Les nanoparticules sont mises en suspension dans cette solution et traitées aux ultrasons pendant 15 mn, puis la solution est laissée sous agitation magnétique à 60°C pendant 15 mn. Les nanoparticules sont récupérées par centrifugation. Le protocole d'extraction du tensio-actif est répété deux fois

Caractérisation :

UV-Visible : pics d'absorbance de la FITC : $\lambda_{\text{max}1} = 226$ nm, $\lambda_{\text{max}2} = 278$ nm, $\lambda_{\text{max}3} = 457$ nm, $\lambda_{\text{max}4} = 487$ nm. Le dosage de la FITC est réalisé à 457 nm.

MSN-FITC-APTS

L'APTS est greffé de la même manière que pour MSN-3.12.

Analyse élémentaire : %C : 5,78 ; %H : 3,29 ; %N : 1,58 correspondant à une quantité de 1,13 mmol d'APTS par gramme de nanoparticules.

MSN-FITC-0.1

Le même protocole expérimental que pour MSN-3.12-APTS-SqMan a été suivi. Les quantités de réactifs utilisées sont: 100 mg de nanoparticule MSN-APTS, 7,11 mg ($1,8 \cdot 10^{-2}$ mmol, 0,1 eq.) de p-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxycyclobut-1-enyl) amino]phenyl- α -D-mannopyranoside,

MSN-FITC-0.5

Pour ces nanoparticules 35,5 mg ($0,9 \cdot 10^{-4}$ mol) de squarate mannose sont utilisés.

Phototoxicité

Les cellules tumorales, maintenues en milieu de culture DMEM (milieu essentiel minimum de Eagle modifié par Dulbecco), sontensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 30000 cellules par puits, dans 100 μ l de milieu. Les cellules sont incubées pendant 24 heures en présence ou en absence de 20 μ g/ml de nanoparticules. Après 24 heures

d'incubation, le milieu est écarté, les cellules sont rincées deux fois et mises en culture dans 100 μl de milieu frais. Les cellules sont alors soumises à une irradiation au laser de longueur d'onde de 650 nm, avec une puissance de 7 mW/cm^2 , pendant 40 minutes.

Test MTT

48 heures après l'irradiation, Les cellules sont incubées pendant 4 heures en présence de 0,5 mg/ml de réactif MTT dans la même plaque. Les puits témoins sont des puits dans lesquels aucune nanoparticule n'a été ajoutée et des puits non irradiés. A la fin de l'incubation, le surnageant est délicatement éliminé des puits par aspiration, les cristaux de formazan violets formés sont dissous avec 150 μl d'un mélange EtOH/ DMSO (1 :1), les plaques d'ensemencement sont ensuite placées sous agitation pendant 5 à 10 minutes avant d'être lues sous excitation lumineuse à 540 nm.

Microscopie confocale

Les cellules MDA-MB-231 sont d'abord ensemencées à une densité de 10^6 cellules. cm^{-2} pendant 24 heures. elles sont ensuite lavées puis incubées dans 1 ml de milieu de culture contenant les nanoparticules fluorescentes à une concentration de 20 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ pendant 24 h. 30 minute avant la fin de l'incubation, les noyaux des cellules sont marqués avec du *Hoechst 33342* (Invitrogen) à une concentration de 5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Les membranes cellulaires sont marquées avec un kit *vybrant lipid-raft* (Invitrogen). Pour le marquage des lysosomes, 3 heures avant l'analyse, 50 nM de *lysotracker* rouge DND-99 (Invitrogen) sont ajoutées au milieu. Avant la visualisation, les cellules sont lavées avec le milieu DMEM sans rouge de phénol, les cellules sont ensuite analysées avec un microscope confocal à balayage (Carl Zeiss, Le Pecq, France) à une profondeur de coupe de 0,97 μm .

Bibliographie

1. D. Brevet, O. Hocine, J. O. Durand, P. Maillard, A. Morere, M. Garcia, M. Smaïhi et M. Gary Bobo, (Centre National de la Recherche Scientifique, Fr.). Application: FR, 2010, p. 45pp.
2. D. L. Dick, T. V. S. Rao, D. Sukumaran et D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 2664-2669.
3. M. Perree-Fauvet, C. Verchere-Beaur, E. Tarnaud, G. Anneheim-Herbelin, N. Bone et A. Gaudemer, *tetrahedron*, **1996**, 52, 13569-13588.
4. D. H. Rich, P. D. Gesellchen, A. Tong, A. Cheung et C. K. Buckner, *Journal of Medicinal Chemistry*, **1975**, 18, 1004-1010.
5. W. J. Kruper, Jr., T. A. Chamberlin et M. Kochanny, *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 2753-2756.
6. V. Lebret, Thèse de doctorat, Université de Montpellier, 2007, p. 179.
7. B. J. Berne et R. Pecora, *Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology and Physics*(Dover Publication, INC.) 2000.
8. B. Maxit, *Topics in Chemistry and Material Science,Advanced Micro- and Mesoporous Materials-09,Heron Press ltd* **2010**, 4, 159-166.
9. P. Barrett, L. G. Joyner et P. P. Halenda, *J. Am. chem. Soc*, **1951**, 73, 373-380.
10. K. S. W. Sing, D. H. Everett, R. A. W. Haul, L. Moscou, R. A. Pierotti, J. Rouquerol et T. Siemieniowska, *Pure Appl. Chem.*, **1985**, 57, 603-619.
11. M.-C. Chao, H.-P. Lin, C.-Y. Mou, B.-W. Cheng et C.-F. Cheng, *Catalysis Today*, **2004**, 97, 81-87.
12. J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T. W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard et et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 10834-10843.
13. F. Qu, G. Zhu, H. Lin, W. Zhang, J. Sun, S. Li et S. Qiu, *Journal of Solid State Chemistry*, **2006**, 179, 2027-2035.
14. M. C. DeRosa et R. J. Crutchley, *Coord. Chem. Rev*, **2002**, 233, 351-371
15. G. Diaz, M. Melis, A. Musin, M. Piludu, M. Piras et A. M. Falchi, *Eur J Histochem*, **2007**, 51, 213-218.
16. Y. Liu, D. A. Peterson, H. Kimura et D. Schubert, *J. Neurochem.*, **1997**, 69, 581-593.
17. M. Smaïhi, E. Gavilan, J.-O. Durand et V. P. Valtchev, *J. Mater. Chem*, **2004**, 14, 1347 - 1351.

18. E. Neuzil, J. C. Breton et H. Jensen, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **2000**, 139, 45-70.
19. M. Friedman, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 385-406.
20. H. Marsmann, *²⁹Si NMR, Spectroscopy Results NMR*, 1981.
21. A. Jeanjean, Thèse, Université Montpellier, 2005.
22. M. Monsigny, C. Petit et A.-C. Roche, *Analytical Biochemistry*, **1988**, 175, 525-530.
23. A. C. E. Moor, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2000**, 57, 1-13.
24. Y. N. Konan, J. Chevallier, R. Gurny et E. Allemann, *Photochem. Photobiol.*, **2003**, 77, 638-644.
25. S. Santra, D. Dutta et B. M. Moudgil, *World Congr. Chem. Eng., 7th*, **2005**, 86577/86571-86577/86510.
26. G. Toffoli, A. Russo, A. Gallo, C. Cernigoi, S. Miotti, R. Sorio, S. Tumolo et M. Boiocchi, *Int J Cancer*, **1998**, 79, 121-126.
27. N. Csaba, A. Sánchez et M. J. Alonso, *Journal of Controlled Release*, **2006**, 113, 164-172.
28. M. Garcia-Fuentes, C. Prego, D. Torres et M. J. Alonso, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2005**, 25, 133-143.
29. O. Shimomura, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, 48, 5590-5602.
30. M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward et D. C. Prasher, *Science*, **1994**, 263, 802-805.
31. J. G. White, W. B. Amos et M. Fordham, *J Cell Biol*, **1987**, 105, 41-48.
32. D. Shotton et N. White, *Trends in Biochemical Sciences*, **1989**, 14, 435-439.
33. F. Dubreuil, M. Ullern, P. Lozato, S. Rodrigues-Grillon et C. Baudouin, *Journal Français d'Ophtalmologie*, **2005**, 28, 19-29.
34. N. Lang et A. Tuel, *Chem. Mater.*, **2004**, 16, 1961-1966.

Chapitre 3

Nanoparticules de silice mésoporeuses pour la vectorisation

La délivrance de molécules biologiquement actives pose encore des problèmes scientifiques mal ou incomplètement résolus ; c'est le cas de molécules anti cancéreuses qui sont souvent hydrophobes et dont la mise en forme et la délivrance restent délicates. L'administration de ce type de molécules sous forme libre présente des effets secondaires importants et une toxicité même pour les cellules saines.

Les effets secondaires peuvent être réduits en encapsulant le médicament dans un vecteur, qui protège le corps contre les principes actifs toxiques et empêche la décomposition de celui-ci avant d'atteindre les cellules cibles. De nombreux systèmes de délivrance de molécules actives (DDS : drug delivery systems), possédant des propriétés spécifiques avantageuses pour des applications dans le domaine de la vectorisation, ont été élaborés depuis une vingtaine d'années.

De par leurs propriétés physiques et chimiques, les nanoparticules de silice mésoporeuses (MSN) sont de bonnes candidates pour la délivrance de principes actifs. En effet, en plus d'être biocompatibles, les MSN présentent une porosité organisée en réseau hexagonal leur permettant d'encapsuler une grande quantité de principes actifs.

Dans ce chapitre, sera étudiée d'abord la cytotoxicité de nanoparticules de silice mésoporeuses encapsulant une molécule anticancéreuse. Ensuite, des MSN encapsulant un photosensibilisateur et contenant la camptothécine sont utilisées pour évaluer l'efficacité simultanée de toxicité et la phototoxicité des nanoparticules sur des cellules tumorales humaines. Dans la dernière partie, un système de délivrance répondant à un stimulus externe constitué de MSN sur lesquelles sont greffés un groupement photolabile et une molécule jouant le rôle de portier.

A. Nanoparticules de silice pour la délivrance de principes actifs

L'objectif visé dans cette partie du travail est la vectorisation d'un principe actif hydrophobe (camptothécine) et tester son efficacité sur des cellules cancéreuses humaines. L'utilisation de nanoparticules de silice mésoporeuses fonctionnalisées avec du mannose permet le ciblage des cellules tumorales.

1. Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules de silice

➤ Greffage de l'aminopropyltriéthoxysilane

Les nanoparticules sont synthétisées selon le mode opératoire décrit dans le chapitre 2. Dans cette partie le greffage de l'aminopropyltriéthoxysilane sur les nanoparticules a été effectué avant l'élimination du tensioactif suivant la méthode développée par Bein¹. En effet, la présence du tensio-actif à l'intérieur des pores ralentit la diffusion des molécules de l'APTS à l'intérieur des pores favorisant ainsi la fonctionnalisation de la surface externe des nanoparticules. Cette méthode permet d'éviter d'éventuelles interactions entre les molécules greffées et les molécules de principe actif qui seront encapsulées ultérieurement.

Le protocole opératoire consiste à disperser les nanoparticules dans du toluène sec, l'APTS est incorporé à la suspension sous atmosphère d'argon à température ambiante. Le temps de réaction est relativement faible (4 heures) par rapport au greffage effectué en milieu aqueux (20 heures). Les nanoparticules sont ensuite centrifugées et lavées avec de l'éthanol et séchées sous vide d'air. Cependant, la masse de nanoparticules récupérée a considérablement diminué montrant qu'une partie du tensio-actif est éliminée au cours du greffage de l'APTS et lors du traitement des nanoparticules. Une quantité de l'APTS a pu donc diffuser à l'intérieur des pores.

➤ Greffage du squarate-mannose

Le greffage de la molécule de ciblage (squarate-mannose) a été effectué suivant le protocole décrit dans le chapitre 2 en utilisant 0,1 équivalent de squarate mannose. La figure 3.1 représente le spectre UV-visible des nanoparticules après réaction avec le résorcinol, la quantité de mannose greffée est dosée à 422 nm, après correction de la courbe on obtient 0,063 mmole de mannose par gramme de nanoparticules.

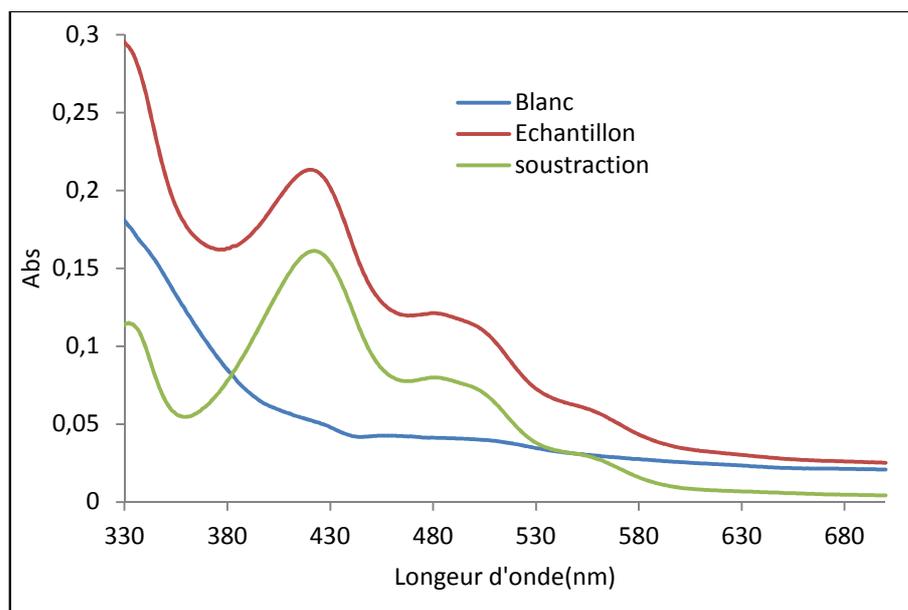


Figure 3.1 : Spectre UV-Vis caractérisant le dosage du mannose greffé sur les nanoparticules

2. Caractérisation des nanoparticules

La caractérisation des nanoparticules par adsorption et désorption de gaz (BET) et par diffusion dynamique de la lumière (DDL) est effectuée systématiquement après chaque synthèse et greffage par les différentes molécules.

2.1. Diffusion dynamique de la lumière DDL

Le rayon hydrodynamique obtenu pour les nanoparticules est compatible avec l'application de ces nanoparticules comme vecteur de principe actif, les valeurs trouvées montrent un diamètre légèrement supérieur pour les nanoparticules greffées avec du mannose.

Echantillon	Diamètre hydrodynamique nm (méthode de Padé-Laplace)
NP-APTS	171
NP-Man	240

Tableau 3.1 : Rayon hydrodynamique des nanoparticules greffées avec du mannose

2.2. Adsorption et désorption de gaz BET

Nous avons effectué les mesures d'adsorption/désorption à 77 K des nanoparticules MSN-APTS et MSN-Man, les isothermes sont présentées dans la figure 3.2. Nous pouvons remarquer que les isothermes de ces nanoparticules sont de type IV confirmant la mésoporosité des échantillons ainsi qu'une distribution poreuse étroite. Dans le tableau 3.2 sont reportées les caractéristiques texturales obtenues pour ces matériaux. On peut remarquer que la surface spécifique diminue légèrement après greffage du squarate-mannose sur les nanoparticules aminées.

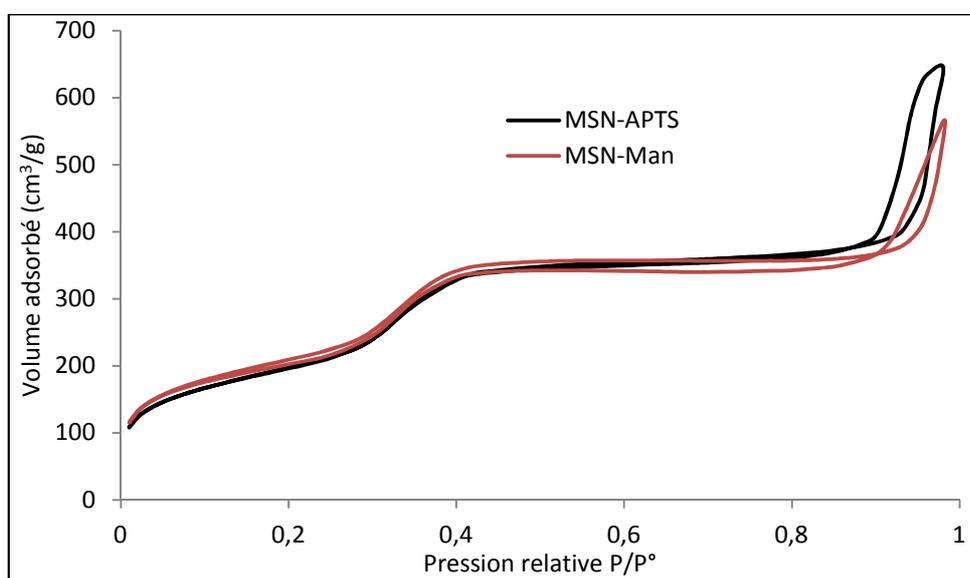


Figure 3.2 : Courbes d'adsorption et de désorption de gaz BET des nanoparticules

Echantillon	Surfaces spécifiques BET ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Volume poreux BJH désorption ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Diamètre moyen de pores BJH (nm)
MSN-APTS	772	0,44	2,42
MSN-Man	751	0,41	2,47

Tableau 3.2 : Caractéristiques BET des nanoparticules synthétisées greffées avec le mannose

3. Encapsulation de la camptothécine

3.1. Définition

La camptothécine (CPT) (4-ethyl-4hydroxy-1,12-dihydro-4h-2-oxa-6,12a-diaa-dibenzo[b,h]fluorene-3,13-dione) est un alcaloïde anticancéreux ², extrait de l'arbre chinois *camptotheca acuminata* ³. La structure de la camptothécine se compose de cinq cycles (A-E) déclinés en trois éléments adjacents, la partie quinoline A-B reliée au chaînon lactone E par l'intermédiaire d'un fragment indolizine C-D (figure 3.3).

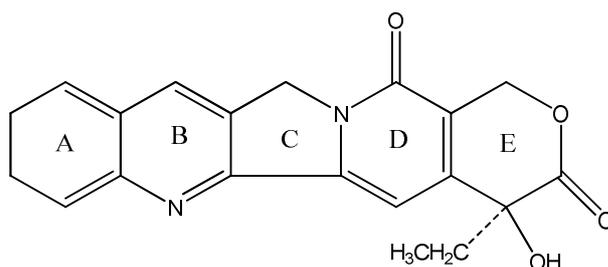


Figure 3.3 : Structure de la CPT

3.2. Propriétés pharmacologiques

La CPT est entrée en clinique dès les années 70, mais ce n'est que vers 1985 qu'elle suscita un intérêt considérable à la suite de la découverte de sa cible moléculaire essentielle, voire unique, la topoisomérase type I (TOPI), une enzyme qui participe à la division cellulaire, et est surexprimée dans les cellules cancéreuses.

Deux dérivés de CPT ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) pour l'utilisation en clinique : le topotecan, utilisé pour le traitement des cancers ovariens et pulmonaires, et l'irinotecan (CPT-11), pro-drogue convertie en métabolite actif SN-38, qui est approuvé pour le traitement des carcinomes métastatiques coliques et colorectaux ⁴.

La cytotoxicité de la CPT est liée aux lésions des brins d'ADN générées par les topoisomérases I. En piégeant ces complexes de clivage ADN/TOPI, la CPT permet la formation d'un complexe ternaire et inhibe la religation du brin d'ADN préalablement clivé. Les clivages provoqués enclenchent les phénomènes de mort cellulaire.

3.3. Choix de cette molécule comme principe actif

Notre choix s'est porté sur cette molécule car elle est bien documentée et présente des dimensions compatibles avec une incorporation dans un matériau mésoporeux dont les diamètres de pores sont compris entre 20 et 50 Å (figure 3.4a). De plus, elle présente des propriétés spectrales permettant de la détecter et de la doser facilement en spectroscopie UV/visible. Son spectre d'absorption est constitué principalement de deux pics d'absorbance à 367 et 384 nm (figure 3.5).

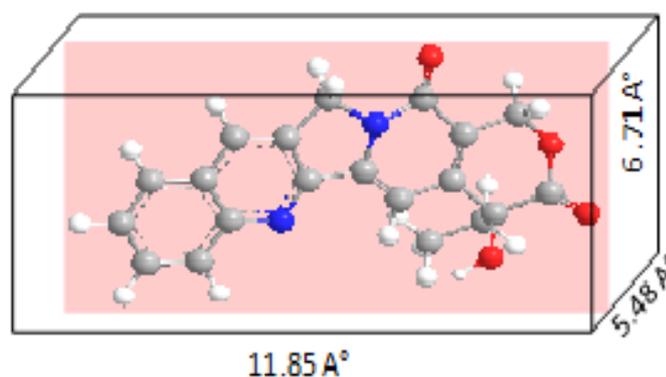


Figure 3.4 : a) dimensions de la molécule de CPT calculées par le logiciel Chem Draw,

3.4. Incorporation de la CPT dans les nanoparticules

Les MCM-41 et par extension les différents matériaux mésoporeux offrent un large éventail de possibilités pour l'inclusion de molécules hôtes au sein de leur réseau mésoporeux ⁵. Parmi ces techniques, l'adsorption de molécules à partir d'une solution est largement utilisée car elle est simple à mettre en œuvre. Les molécules présentes dans la solution diffusent à l'intérieur des pores, puis le solvant est éliminé par évaporation ou centrifugation en laissant les molécules hôtes se déposer.

Les conditions opératoires que nous avons utilisées pour l'incorporation de la CPT sont celles développées par Zink et Tamanoi ⁶. La taille de la molécule de CPT étant suffisamment petite pour qu'elle soit incorporée dans les pores des nanoparticules, ces dernières sont mises en suspension dans une solution de CPT dissoute dans le DMSO pendant 24 heures à température ambiante. Le solvant est éliminé par centrifugation, les nanoparticules sont ensuite lavées avec de l'éthanol et séchées sous vide. La spectroscopie UV-Visible permet de déterminer la quantité de CPT encapsulée, 12 µmoles de CPT par gramme de nanoparticules ont été trouvées (figure 3.5).

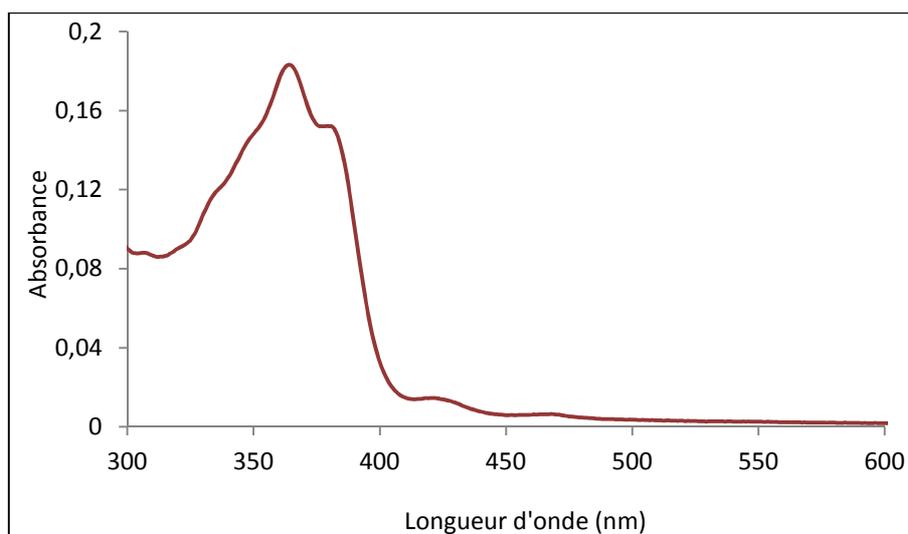


Figure 3.5 : Spectre UV-Visible du surnageant après relargage de la CPT dans le DMSO

4. Tests de cytotoxicité

La cytotoxicité des nanoparticules contenant la CPT a été testée sur les cellules humaines cancéreuses, cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 et du colon HCT-116.

➤ MDA-MB-231

Les nanoparticules contenant ou non la camptothécine sont mises en suspension dans une solution d'éthanol, les cellules sont ensuite incubées en présence ou en absence de 20 et 40 $\mu\text{g/ml}$ de nanoparticules contenant ou non la CPT pendant 48 heures.

Les résultats obtenus montrent qu'après 48 heures d'incubation, la viabilité des cellules non traitées n'a pas diminué (figure 3.6). Les cellules incubées dans l'éthanol et incubées avec les nanoparticules ne contenant pas de la CPT présentent une toxicité faible, un pourcentage de 10 % seulement est obtenu. Par contre, les nanoparticules contenant la CPT induisent une mort cellulaire de 35%. Ce résultat montre bien que la présence de la CPT dans les pores des nanoparticules est responsable de la mort cellulaire.

En augmentant la concentration des nanoparticules à 40 $\mu\text{g/ml}$, on observe une augmentation de la mort cellulaire dans le cas où les cellules sont traitées avec les deux types de nanoparticules, des taux 23% et 50% de mort cellulaire sont obtenus pour les nanoparticules MSN et MSN-Man-CPT respectivement. Cette augmentation est liée à la cytotoxicité intrinsèque des nanoparticules et non seulement à la présence de la CPT.

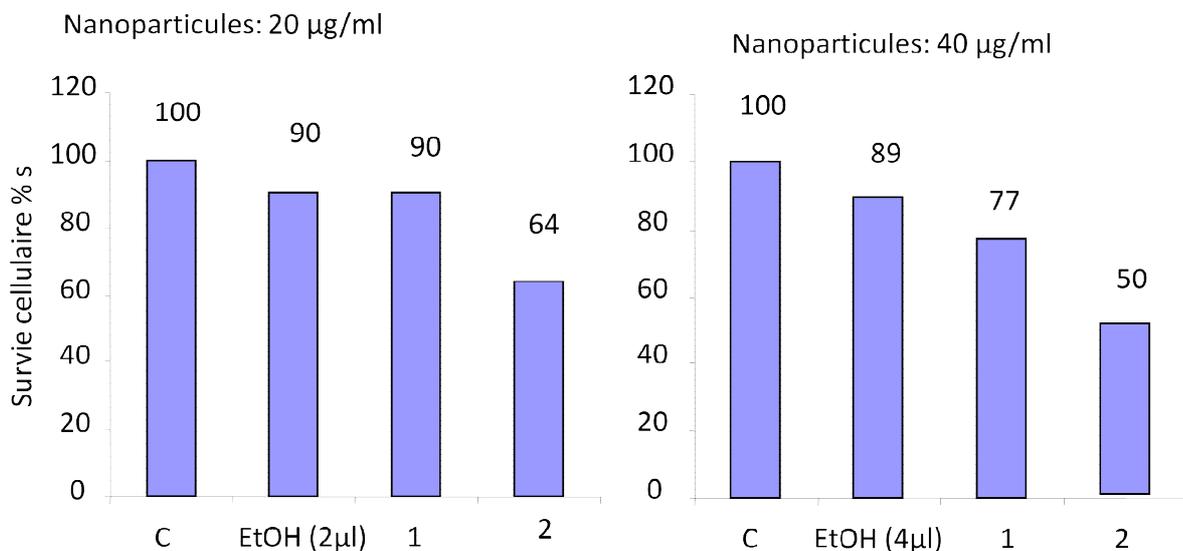


Figure 3.6 : Cytotoxicité des nanoparticules sur cellules de cancer du sein MDA-MB-231 ; C : contrôle (cellules non traitées), EtOH : cellules incubées dans l'éthanol, 1: MSN-APTS, 2: MSN-Man-CPT

➤ HCT-116

Dans ce cas, la cytotoxicité des nanoparticules fonctionnalisées avec du mannose et contenant de la CPT (MSN-Man-CPT) est comparée à celle des nanoparticules non greffées (MSN-CPT). Les cellules sont incubées en présence ou en absence de 20 µg/ml de nanoparticules contenant la CPT à des temps d'incubation de 5, 24 et 48 heures. La mort cellulaire induite par les nanoparticules greffées au mannose ou non est mesurée par le test MTT. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3.7. Après 5 heures d'incubation, la mort cellulaire induite par les deux types de nanoparticules est faible. Un taux de 12 % est obtenu pour les nanoparticules greffées avec le mannose et 8 % seulement pour les nanoparticules non greffées au mannose. Par contre, après 48 heures d'incubation, nous observons une augmentation notable de la mort cellulaire. Le pourcentage de mort cellulaire voisin de 25 % est induit par les nanoparticules non greffées par le mannose et 32 % pour les nanoparticules greffées. Le greffage du mannose en surface des nanoparticules a permis d'améliorer la cytotoxicité induite par ces dernières en permettant une internalisation des nanoparticules via les récepteurs du mannose.

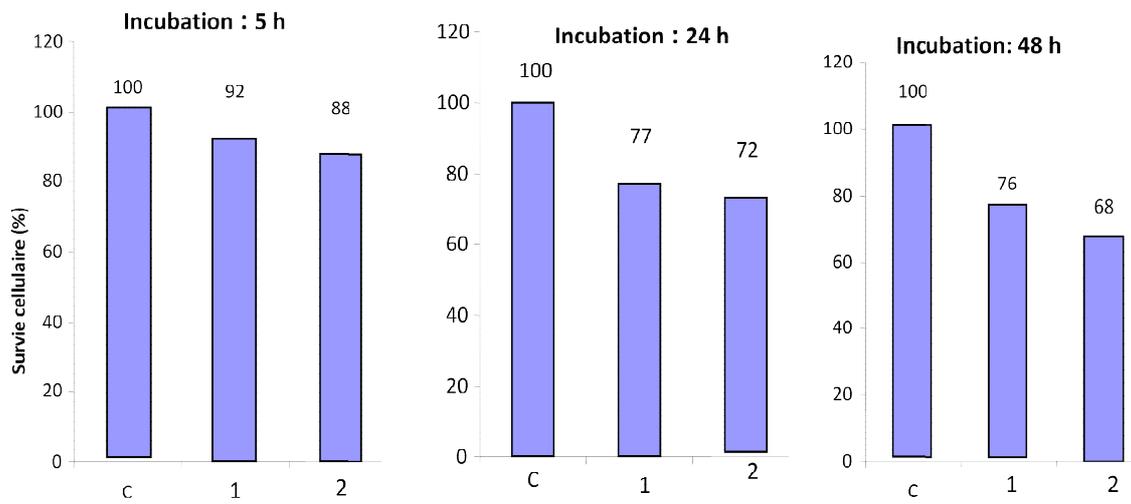


Figure 3.7 : Cytotoxicité des nanoparticules sur cellules de cancer colon HCT-116 ; C : contrôle (cellules non traitées), 1: MSN-CPT, 2: MSN-Man-CPT

B. Couplage photothérapie dynamique - délivrance de principe actif

Les nanoparticules de silice mésoporeuses synthétisées encapsulant la camptothécine présentent une cytotoxicité certaine sur les différentes cellules tumorales étudiées. Cependant, les taux de mortalité obtenus restent relativement faibles et n'atteignent pas 50 % de mort cellulaire dans les cas présentés précédemment. Afin d'améliorer le traitement anticancéreux des nanoparticules, nous avons étudié dans cette partie la combinaison de la thérapie photodynamique et de la délivrance d'un principe actif sur les cellules tumorales. Pour ce faire, des nanoparticules de silice mésoporeuses contenant un photosensibilisateur (MSN-4) greffé avec du galactose (MSN-4-Gal) ont été utilisées pour le ciblage et dans lesquelles est incorporée la CPT.

Le greffage du galactose sur les nanoparticules MSN-4 s'est effectué suivant les conditions opératoires décrites lors du greffage du mannose (chapitre 2). Une quantité de 0,258 mmoles de galactose par gramme de nanoparticules est greffée et 7 μ moles de CPT ont été encapsulés dans les pores des nanoparticules MSN-4-Gal-CPT.

1. Cytotoxicité des nanoparticules

Dans un premier temps, la capacité des nanoparticules contenant la porphyrine **4** comme photosensibilisateur et greffées avec du galactose à délivrer la CPT a été étudiée. La cytotoxicité a été testée sur les cellules du cancer de colon (HCT-116), du cancer de sein (MDA-MB-231) et du pancréas (Capan-1).

Les cellules sont traitées avec 20 μ g/ml de nanoparticules à des temps d'incubation allant de 10 minutes à 72 heures. Les résultats obtenus dans le cas des cellules HCT-116 montrent que la cytotoxicité augmente avec le temps d'incubation jusqu'à atteindre un taux de 40 % de mort cellulaire (figure 3.8). Les tests effectués sur les cellules MDA-MB-231 donnent des résultats équivalents (figure 3.9).

Les tests de cytotoxicité des nanoparticules contenant le photosensibilisateur ont été également effectués sur les cellules de cancer du pancréas (Capan-1). La figure 3.10 montre les résultats obtenus après 24 heures d'incubation. Les cellules non traitées et les cellules incubées dans l'éthanol ne présentent aucune mort cellulaire. Les nanoparticules MSN-4-Gal ne présentent pas de toxicité sur les cellules. Par contre, les nanoparticules MSN-4-Gal-CPT induisent une toxicité avec un taux de 38 % de mort cellulaire. Ces

résultats montrent aussi dans ce cas que la mort cellulaire est due à la présence des molécules de CPT.

2. Phototoxicité

Après les tests de cytotoxicité des nanoparticules liée à la présence de la CPT dans les nanoparticules, des tests de phototoxicité sont réalisés pour l'étude de l'effet cytotoxique dû à la présence du photosensibilisateur et du principe actif en même temps.

Les cellules sont incubées pendant 24 heures avec 20 µg/ml de nanoparticules encapsulant la porphyrine et fonctionnalisées avec du galactose contenant ou non la CPT (MSN-4-Gal et MSN-4-Gal-CPT). Les cellules sont ensuite mises dans un milieu de culture frais et irradiées à 650 nm pendant 40 minutes. Le test de viabilité MTT est réalisé 48 heures après l'irradiation.

Les résultats obtenus pour les cellules HCT-116 sont présentés sur la figure 3.9. Après irradiation, les nanoparticules MSN-4-Gal induisent une mort cellulaire de 44 % contrairement aux nanoparticules contenant à la fois le photosensibilisateur et la CPT qui induisent une toxicité atteignant un taux de 83 % (figure 3.11). Des résultats similaires ont été trouvés dans le cas des cellules MDA-MB-231. Des taux de 43 et 79 % sont observés avec les nanoparticules MSN-4-Gal et MSN-4-Gal-CPT respectivement (figure 3.12).

Dans le cas des cellules Capan-1, comme le montre la figure 3.13, les nanoparticules MSN-4-Gal induisent une mortalité de 45 % et les nanoparticules MSN-4-Gal-CPT présentent un taux de 100 % de mort cellulaire.

Ces résultats montrent que la phototoxicité des nanoparticules apparaît après 24 heures d'incubation avec les cellules. Pendant ce temps, la CPT semble déjà diffuser à l'intérieur des cellules. Ces deux thérapies agissent en synergie, la toxicité liée à la présence du photosensibilisateur est complémentaire à la toxicité liée à la CPT. L'utilisation de la thérapie photodynamique et l'administration d'un principe actif avec les mêmes nanoparticules représente une stratégie alternative dans le cas de tumeurs présentant une résistance thérapeutique.

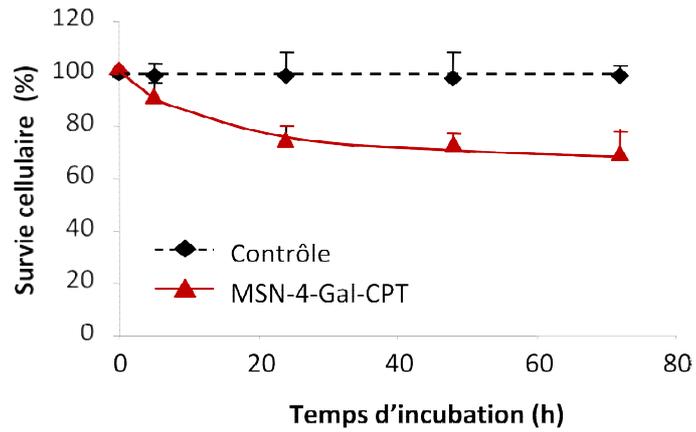


Figure 3.8 : Cytotoxicité des nanoparticules MSN-4-Gal-CPT sur les cellules MDA-MB-231

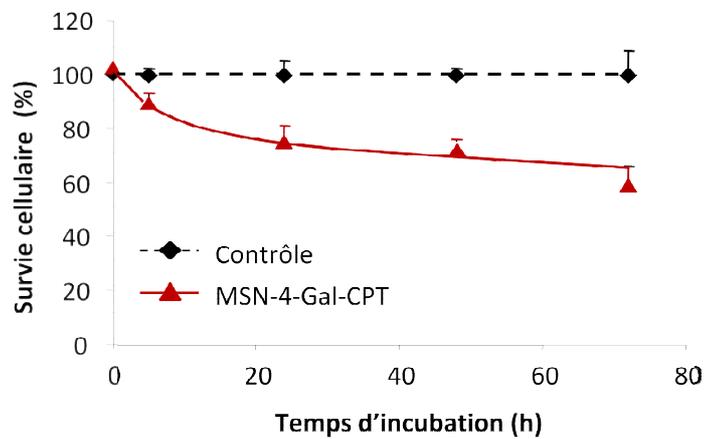


Figure 3.9 : Cytotoxicité des nanoparticules MSN-4-Gal-CPT sur cellules HCT-116

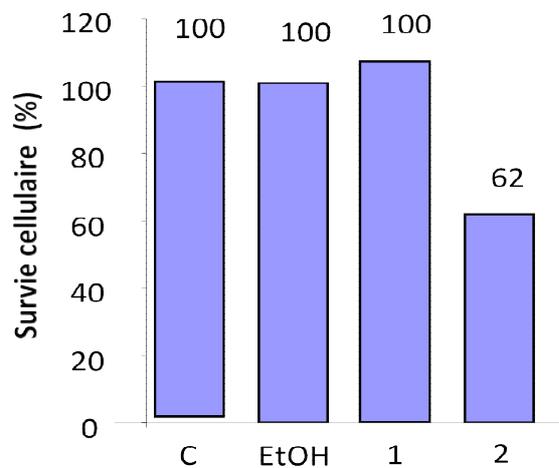


Figure 3.10 : Cytotoxicité des nanoparticules MSN-4-Gal (1) et MSN-4-Gal-CPT (2) sur cellules Capan-1

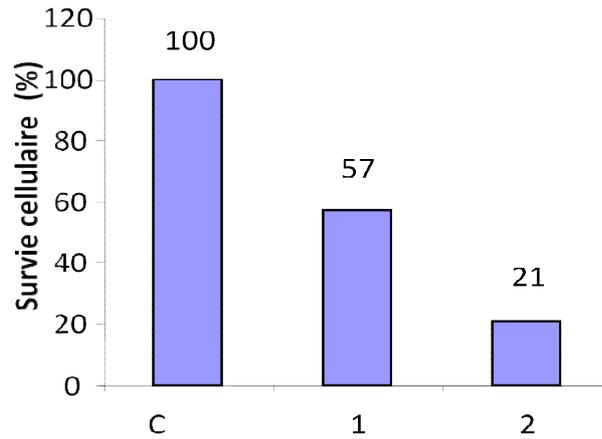


Figure 3.11 : Effet du couplage de la PDT et délivrance de la CPT sur les cellules MDA-MB-231 ; C : Contrôle, 1 : MSN-4-Gal, 2 : MSN-4-Gal-CPT

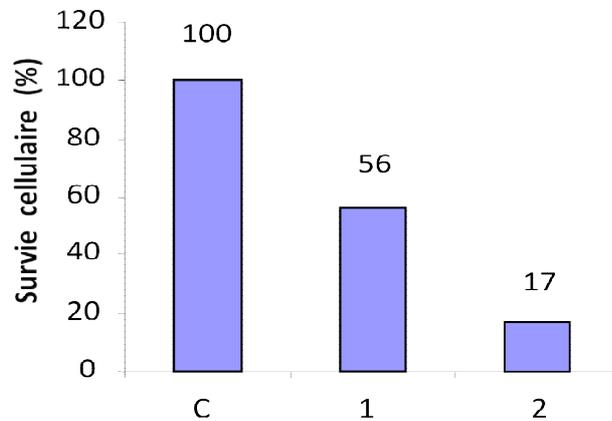


Figure 3.12 : Effet du couplage de la PDT et délivrance de la CPT sur les cellules HCT-116; C : Contrôle, 1 : MSN-4-Gal, 2 : MSN-4-Gal-CPT

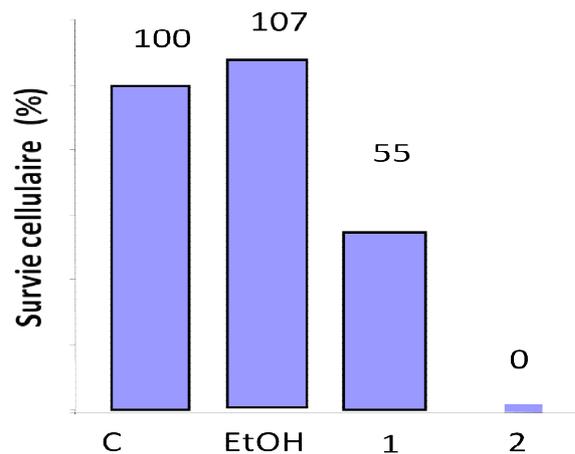


Figure 3.13 : Effet du couplage de la PDT et délivrance de la CPT sur les cellules Capan-1 ; C : Contrôle (cellules non traitées), EtOH : Cellules incubées dans l'éthanol, 1 : MSN-4-Gal, 2 : MSN-4-Gal-CPT

C. Nanoparticules de silice pour la délivrance contrôlée de médicaments

La délivrance contrôlée d'un principe actif a lieu lorsqu'un vecteur est combiné avec le principe actif de telle sorte qu'il soit délivré de manière pré-établie. Le but est de contrôler la délivrance afin d'améliorer l'efficacité des traitements et d'éviter les problèmes de sous ou surdosage. Ce système d'administration contrôlée permet d'imaginer des systèmes utilisant au mieux les médicaments. Ces dernières années, les recherches se sont orientées vers le développement de nouveaux matériaux pouvant répondre à des stimuli externes tels que le pH, le champ magnétique, la température ou la lumière.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'activation photoinduite. Le système de délivrance de médicaments consiste en des nanoparticules mésoporeuses et un composé photolabile excitable par un processus d'absorption mono ou bi-photonique. Les pores de la nanoparticule sont chargés de molécules de médicament et bloqués par un dendrimère fixé à la nanoparticule au moyen d'un groupe intercalant photoactivable. La libération du médicament est déclenchée par photolyse du groupe intercalant après excitation à un ou deux photons : après irradiation par la lumière, la liaison entre le groupe intercalant et le dendrimère est coupée, ce qui libérera les pores et la nanoparticule sera ainsi capable de délivrer le médicament (figure 3.14).

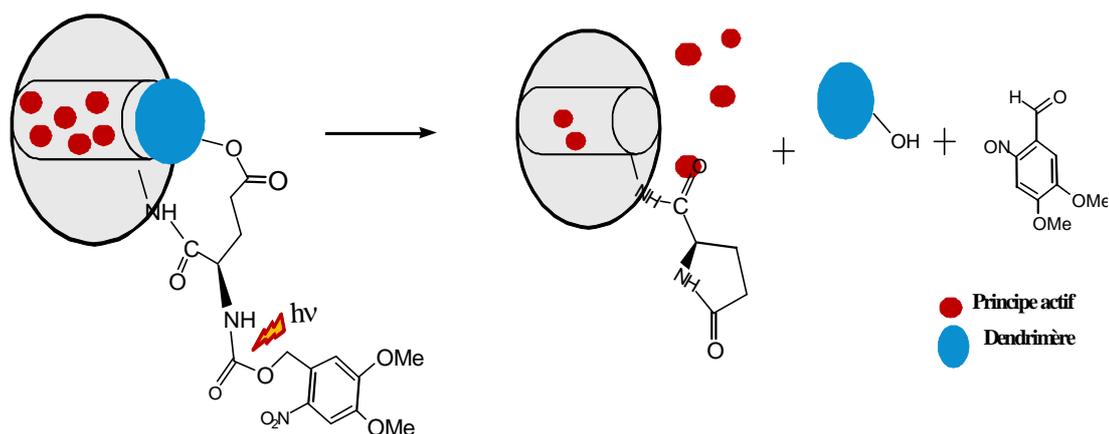


Figure 3.14 : Représentation schématique du nanovecteur (Nanoparticule de silice + groupement photoactivable + dendrimère)

Le groupe intercalant que nous avons choisi est un acide aminé (l'acide γ -glutamique) qui donne lieu à une réaction de cyclisation intramoléculaire entre la fonction amine et la fonction carboxylique en γ pour former une liaison amide et donner un lactame (figure 3.15). Cette propriété est mise à profit dans ce système.

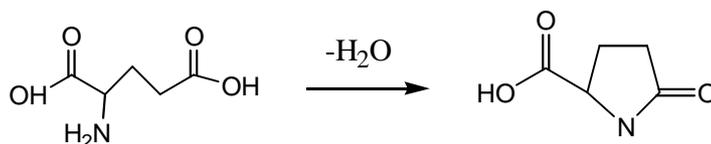


Figure 3.15 : Réaction de cyclisation intramoléculaire de l'acide γ -glutamique

En effet, après protection de la fonction amine par le groupement photolabile (NVOC), l'acide aminé protégé est greffé aux nanoparticules mésoporeuses. Le dendrimère est ensuite greffé à ces nanoparticules via la fonction carboxylique en γ de l'acide glutamique préalablement déprotégée. L'irradiation du groupement photolabile permet de rompre la liaison entre ce groupe et l'acide aminé conduisant à la réaction de cyclisation intramoléculaire et à la libération du dendrimère laissant ainsi les pores des nanoparticules ouverts.

Dans la suite de ce chapitre nous décrivons les différentes réactions de protection, greffage des groupements photoactivables et dendrimères. Les premiers essais de photodéprotections seront présentés.

1. Protection photolabile

Dans la synthèse de molécules complexes, les groupements protecteurs tiennent un rôle important. En effet un des points clés de la synthèse organique est la réaction sélective de groupes fonctionnels en présence d'autres groupes. Cependant, la différence de réactivité entre différents groupes fonctionnels vis à vis d'une même réaction est souvent trop faible pour obtenir un processus sélectif. C'est pourquoi la protection de groupes fonctionnels est très souvent nécessaire. Les groupements protecteurs doivent donc, d'une part, être stables dans les conditions de réactions des autres groupements fonctionnels de la molécule et d'autre part, ils doivent être labiles de manière sélective, pour qu'on puisse libérer facilement les groupes fonctionnels protégés une fois la transformation effectuée.

La photochimie correspond à l'étude des transformations physico-chimiques provoquées par la lumière et présente une méthode de choix pour l'élaboration de groupements protecteurs hautement sélectifs. En effet l'avantage majeur des réactions photochimiques est qu'elles ne font intervenir, la plupart du temps, aucun réactif chimique et de plus, ces réactions sont rapides et propres.

Pillai fut le premier à établir une revue complète des groupements protecteurs photolabiles connus jusqu'à l'année 1980 ⁷. Il y décrit l'utilisation de plusieurs groupes dans la synthèse de molécules polyfonctionnels. Des applications dans la chimie des sucres, des nucléotides et des peptides sont présentées. Ce domaine a connu un développement important durant les 20 années qui ont suivi avec l'apparition de nouvelles familles de groupements protecteurs photolabiles. La revue de Christian Bochet rassemble les exemples les plus marquants qui sont répartis selon leurs mécanismes de clivage ⁸.

Parmi tous les groupements photolabiles répertoriés nous avons choisi d'en étudier le 6-nirovématroyloxy-carbonyl (NVOC) appartenant au groupe des nitrobenzyle (figure 3.16) introduit pour la première fois par Patchornik ⁹, il est depuis utilisé pour la protection de fonction OH, COOH, et NH₂ dans le cadre de synthèse séquentielle supportée de peptides ¹⁰, en photolithographie ^{11, 12} et dans la synthèse de composés cagés ^{13, 14}.

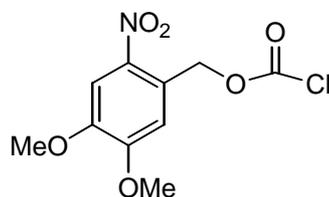


Figure 3.16 : Structure du NVOC-Cl

2. Protection de la fonction amine par le groupement NVOC

La protection de la fonction amine de l'acide aminé γ glutamique avec le groupement protecteur photolabile NVOC est réalisée suivant la méthode développée par Bushan et al ¹⁵. L'acide aminé est dissous dans un mélange eau/dioxane, le groupement protecteur NVOC-Cl dissous dans un mélange dioxane/THF est ajouté à la solution d'acide aminé. La réaction de protection de la fonction amine de l'acide aminé consiste à former une liaison carbamate et s'accompagne de la formation d'un acide (HCl). Ce dernier est neutralisé par l'addition du carbonate de sodium (Na₂CO₃) dans le milieu réactionnel, la réaction est

réalisée à température ambiante en présence de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) comme catalyseur (figure 3.17). Le produit final est obtenu avec un rendement de 80 %.

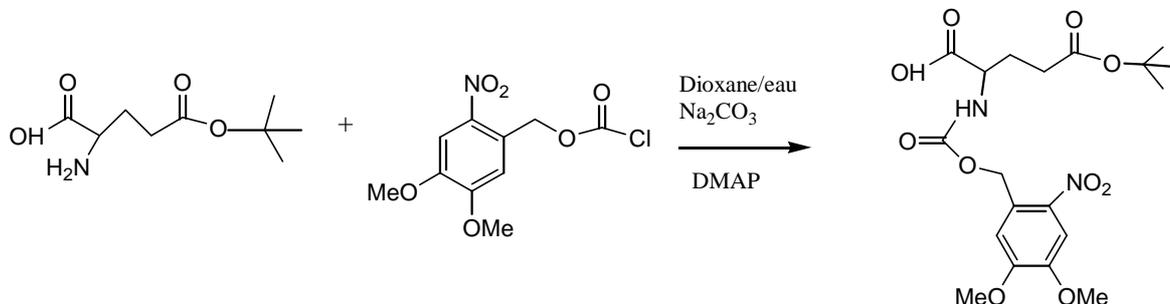


Figure 3.17 : Schéma de protection de la fonction amine de l'acide aminé

3. Greffage du groupement NVOC- α Glu sur les nanoparticules aminées

La réaction du greffage de l'acide aminé protégé sur les nanoparticules de silice se fait par formation d'une liaison amide entre la fonction amine des nanoparticules et la fonction acide carboxylique libre du NVOC-Glu (figure 3.18). Cette réaction nécessite l'activation de la fonction carboxylique, il s'agit de remplacer le proton de la fonction carboxylique par un groupement partant. Il est donc nécessaire de faire appel à des réactifs particuliers pour activer la fonction acide, le plus universel de ces réactifs est, sans conteste, le dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Le rôle du DCC est d'activer le groupe carbonyle de l'acide vis-à-vis de l'attaque nucléophile de la part de l'amine. Dans un premier temps de la réaction, il y a formation d'une O-acylurée, suivie dans un second temps de l'attaque nucléophile de l'amine conduisant à la formation de l'amide. Pendant le processus d'activation et d'acylation, il y a précipitation de la dicyclohexylurée. Cette dernière est éliminée lors du lavage et centrifugation des nanoparticules.

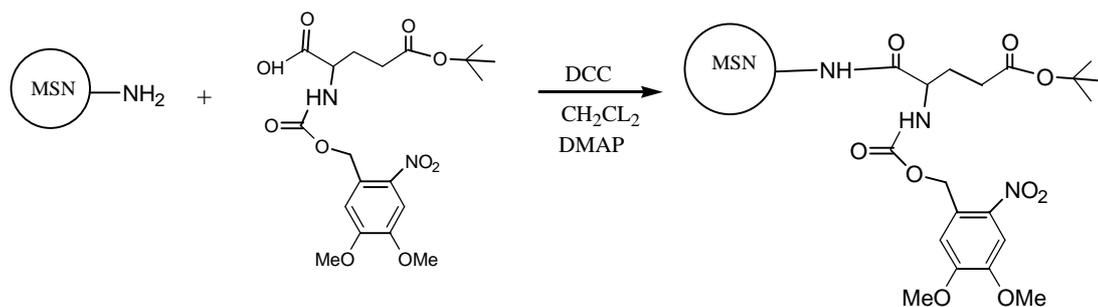


Figure 3.18 : Schéma de greffage du groupement NVOV-Glu

Sur la figure 3.19, sont comparés les spectres UV-Visible du NVOC-Glu en solution dans l'éthanol et greffé sur les nanoparticules aminées. La courbe rouge correspondant au spectre du NVOC-Glu en solution présente des maximales d'absorbance à 300 nm et 341 nm, qui sont caractéristiques du groupement photolabile NVOC. Sur la courbe correspondant au NVOC-Glu greffé, on retrouve ces mêmes bandes mettant bien en évidence que le greffage du NVOC-Glu sur les nanoparticules est effectif. Le déplacement observé au niveau de ces bandes lors du passage de la solution à la surface peut s'expliquer par une modification environnementale des molécules. La quantité de NVOC-Glu greffée sur les nanoparticules a été déterminée par UV-Visible et est égale à 0,197 mmole / g.

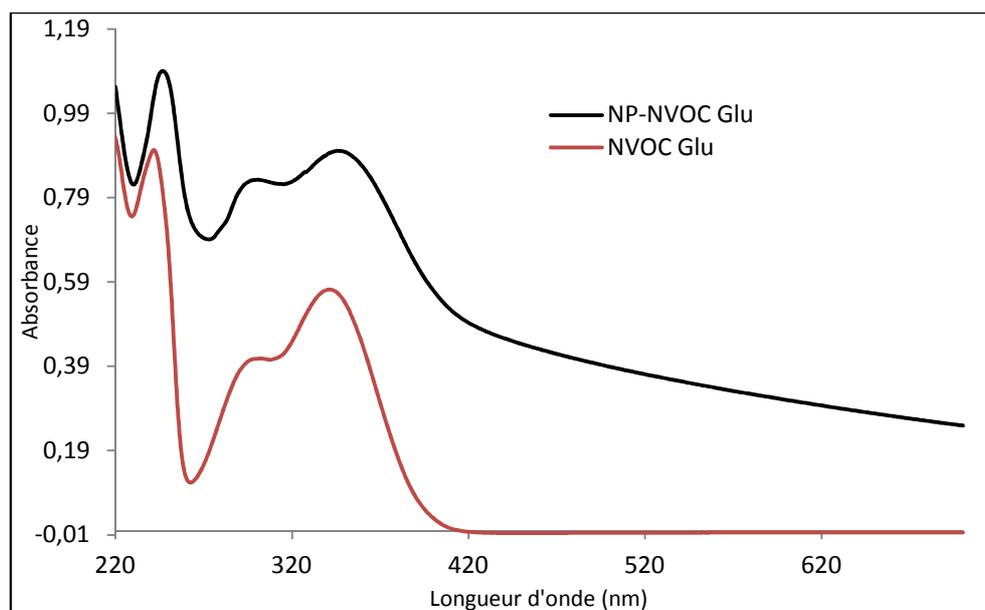


Figure 3.19 : Spectre UV-visible de nanoparticules greffées avec du NVOC-Glu

4. Déprotection de la fonction carboxylique de MSN-NVOC- α Glu

Afin de coupler le dendrimère au système MSN-NVOC-Glu, il faut libérer la fonction carboxylique protégée par le groupe tertibutyle. La réaction de déprotection a été effectuée avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) à température ambiante (figure 3.20). L'élimination du groupement tertibutyle a été mise en évidence par spectroscopie RMN du ^{13}C . Le spectre obtenu montre la disparition du déplacement chimique correspondant au groupement tertibutyle.

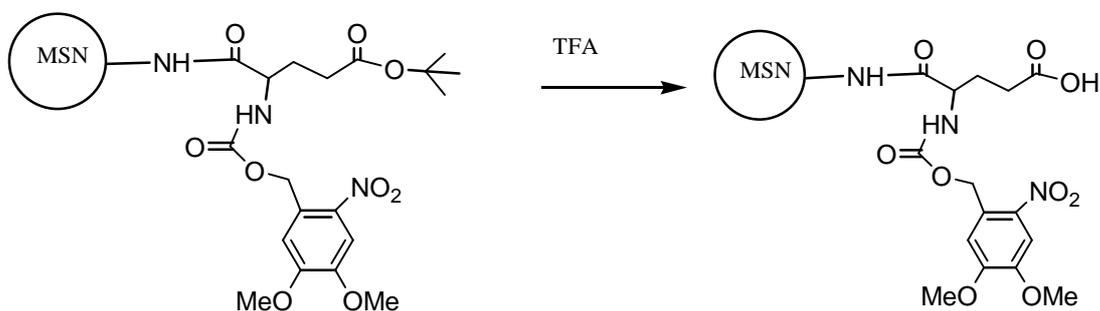


Figure 3.20 : Déprotection de la fonction carboxylique de MSNNVOC- α Glu

Pour montrer que le groupement NVOC n'a pas été dégradé au cours de la déprotection de la fonction carboxylique, les nanoparticules ont été caractérisées par UV-visible. Le spectre obtenu montre bien que la fonction amine de l'acide glutamique est encore protégée. Les bandes caractéristiques du groupement NVOC sont visibles sur le spectre des nanoparticules (figure 3.21).

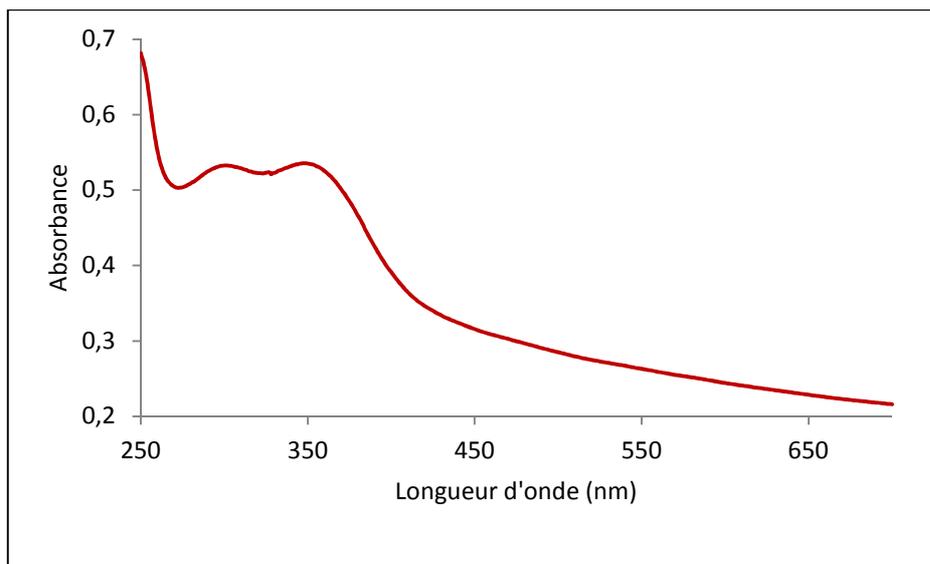


Figure 3.21 : Spectre UV-Visible de MSN-NVOC Glu après déprotection de la fonction carboxylique

5. Greffage du groupement pyrène-méthanol sur MSN-NVOC- α Glu

Comme preuve de concept, nous avons tout d'abord couplé le pyrène-méthanol avant le dendrimère qui est un produit à haute valeur ajoutée. La cyclisation de l'acide aminé peut ainsi être suivie grâce aux propriétés spectroscopiques du pyrène. La réaction de couplage est présentée sur la figure 3.22. La réaction a été effectuée dans les mêmes conditions opératoires que lors du greffage du NVOC- γ Glu.

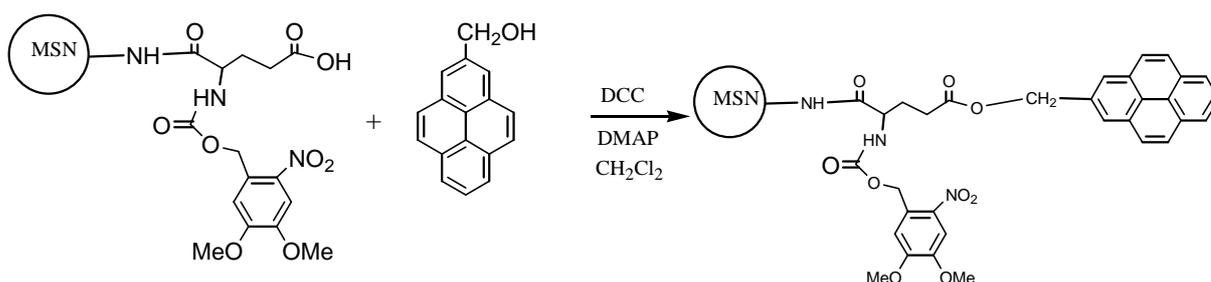


Figure 3.22 : Schéma de greffage du pyrène-méthanol

La figure 3.23 représente les spectres UV-Visible des nanoparticules greffées au pyrène méthanol et le pyrène en solution. Les bandes d'absorption maximales caractéristiques du pyrène apparaissant entre 200 et 350 nm sont présentes sur le spectre des nanoparticules. Ces dernières se trouvent superposées aux bandes d'absorption du groupe NVOC-Glu confirmant bien le greffage du pyrène méthanol sur les nanoparticules. La quantité de pyrène a été déterminée par spectroscopie UV-visible. Le dosage a été effectué à 275 nm afin d'éviter l'influence des bandes d'absorption du groupe NVOC-Glu. Une quantité de 9 μ mole par gramme de nanoparticules a été trouvée.

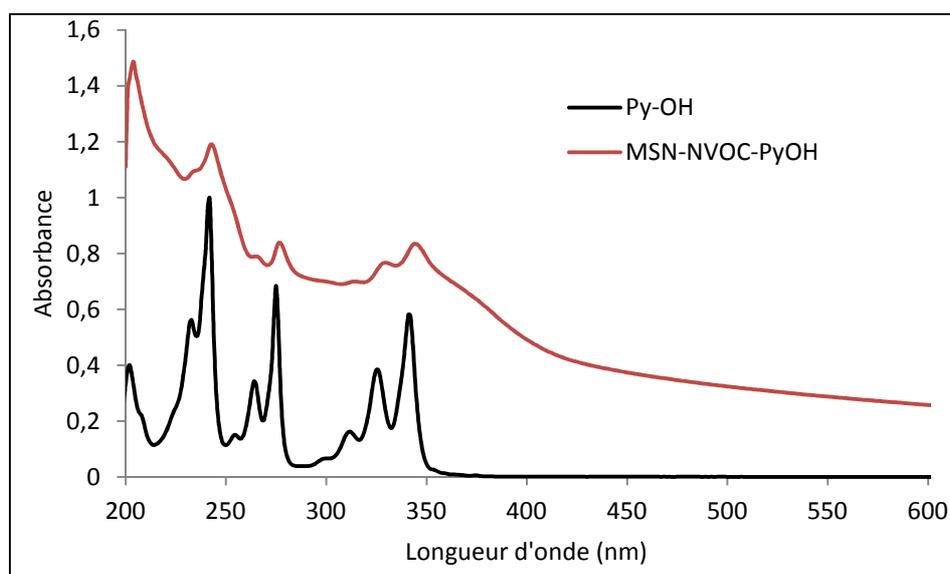


Figure 3.23 : Spectre UV-Vis des nanoparticules greffées avec le pyrène méthanol

6. Caractérisation

a. Adsorption et désorption de gaz BET

Les nanoparticules greffées avec l'acide aminé protégé et le pyrène méthanol ont été caractérisées par adsorption et désorption du gaz BET, la figure 3.24 représente les isothermes d'adsorption-désorption obtenues pour ces échantillons. Elles sont de type IV caractéristiques des matériaux mésoporeux. Les caractéristiques structurales des nanoparticules greffées sont regroupées dans le tableau 3. Une forte diminution de la surface spécifique indique le greffage.

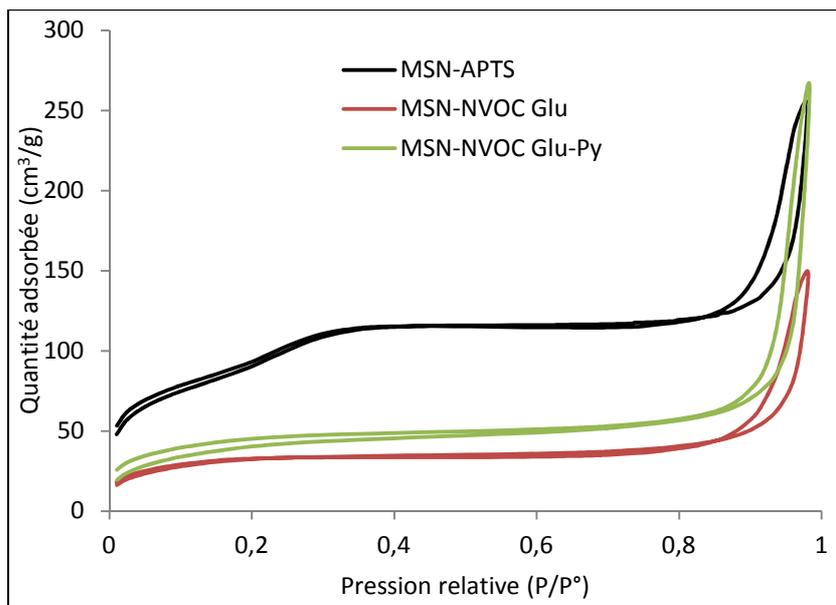


Figure 3.24 : Isothermes d'adsorption et désorption de gaz BET des nanoparticules greffées au pyrène méthanol

Echantillon	Surfaces spécifiques BET ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Volume poreux BJH désorption ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Diamètre moyen de pores (nm)
NP-APTS	772	0,44	2,42
NP-NVOC-Glu	116	0,014	2,87
NP-NVOCGlu-Py	143	0,01	2,17

Tableau 3.3 : Caractéristiques BET des nanoparticules greffées avec le NVOC-Glu et le pyrène méthanol

b. Diffusion dynamique de la lumière

Les mesures DDL du diamètre hydrodynamique des nanoparticules greffées par le NVOC-Glu et le pyrène méthanol ne révèle pas de différence majeure avec celui des nanoparticules greffées avec de l'APTS. La taille de ces molécules ne semble pas influencer sur le rayon hydrodynamique des nanoparticules (tableau 3.4).

Echantillon	Rayon hydrodynamique (nm)
MSN-APTS	171
MSN-NVOC-Glu	181
MSN-NVOC-Glu-Py	166

Tableau 3.4 : Rayon hydrodynamique déterminé par DDL des nanoparticules greffées avec le NVOC-Glu et le pyrène méthanol

7. Photodéprotection de la fonction amine

a. Mécanisme de déprotection

Le mécanisme détaillé de la photodéprotection des groupements o-nitrobenzyle a été largement étudié ^{8, 16-20}. Au cours de l'irradiation, l'élimination de ces protections s'effectue bien souvent par un mécanisme radicalaire complexe, propre à chaque groupement, qui se finalise par la restitution de la fonction. Le mécanisme mis en jeu lors de la photodéprotection du groupement NVOC a été d'abord présenté dans la revue de Pillai⁷, ensuite réactualisé en 2002 dans la revue de Bochet ⁸.

En bref, ce processus photochimique débute par le passage à l'état excité du groupement nitro (composé (A)) après absorption d'un photon. le mécanisme se poursuit par migration intramoléculaire d'un proton du CH₂ en α du cycle aromatique sur le groupement nitro excité, conduisant ainsi au composé (B). Il s'en suit alors une redistribution électronique menant à la formation d'un intermédiaire réactionnel (C), qui se cyclise en donnant un intermédiaire hémicétal (D). Ce dernier peu stable conduit, par élimination concertée, au composé final nitrosobenzaldéhyde (E), avec départ de CO₂ et libération du produit fonctionnel H-X attendu (figure 3.25).

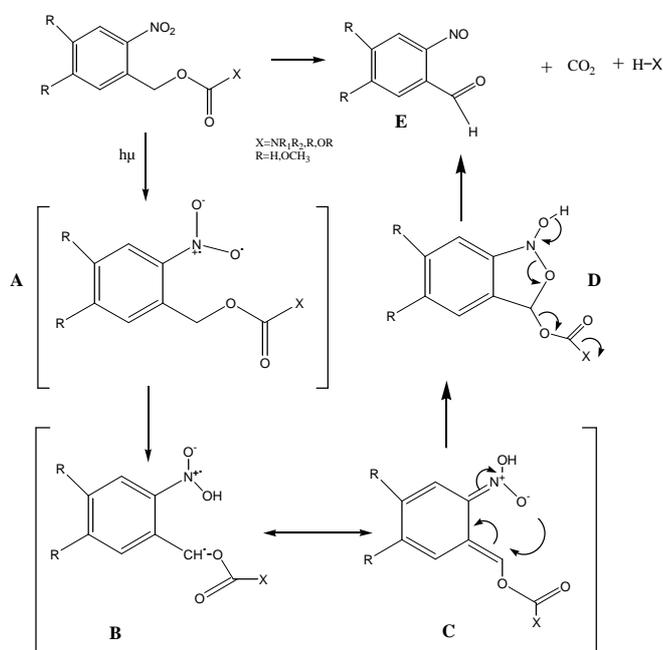


Figure 3.25 : Mécanisme de photodéprotection

➤ Réactions secondaires issues de la déprotection

Lors de l'irradiation, la formation inévitable d'un sous-produit aldéhyde n'est pas sans conséquence suivant le type de fonction.

Prenons le cas d'une fonction X à déprotéger qui soit un acide carboxylique ou un alcool, le risque de réactions secondaires, liées à la formation de l'aldéhyde au fur et à mesure de l'irradiation, est limité. En effet, le nitrosobenzaldéhyde apparaît comme peu réactif vis-à-vis des fonctions COOH et OH.

Par contre, dans le cas où la fonction X est une amine, l'obtention d'un sous-produit aldéhyde s'avère indésirable puisqu'une réaction parasite peut avoir lieu entre l'amine déprotégée et l'aldéhyde photoproduit conduisant à la formation d'une imine. Ce problème déjà observé et identifié par différents groupes de chercheurs ne permet de restituer que la moitié des fonctions amines attendues. Afin d'éviter cette réaction secondaire sur la surface, plusieurs solutions ont été mises au point, parmi ces solutions on peut citer :

- Irradiation en présence d'un agent de piégeage

L'idée consiste à irradier les nanoparticules en présence d'une solution contenant un agent de piégeage aminé. De cette façon, une fois le nitrosobenzaldéhyde photogénéré, il réagit rapidement en solution avec la fonction amine de l'agent de piégeage pour former un composé imine stable, qui reste en solution, empêchant ainsi toute formation potentielle de liaison imine avec les amines libres de surface. L'agent de piégeage le plus couramment utilisé est le chlorhydrate de semicarbazide^{8,21} (figure 3.26).

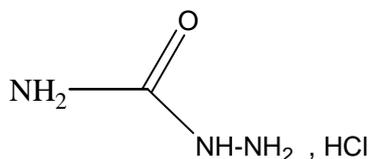


Figure 3.26 : Structure de l'hydrochlorate de semicarbazide

b. Photodéprotection à 365 nm

Le protocole expérimental utilisé consiste à disperser les nanoparticules dans une solution d'hydrochlorate de semicarbazide dissous dans du méthanol. Dans un premier temps, les nanoparticules sont irradiées à 365 nm avec un temps variable (de 1 à 6 heures). La déprotection de la fonction amine a été suivie par spectroscopie UV-Visible et par spectroscopie de fluorescence.

La figure 3.27 représente les spectres UV-Visible du surnageant après irradiation des nanoparticules. Les spectres montrent qu'après une heure d'irradiation la liaison entre le NVOC et l'acide glutamique est rompue. Les bandes caractéristiques du NVOC apparaissent sur le spectre, par contre, l'intensité des bandes caractéristiques du pyrène méthanol est très faible, la cyclisation intramoléculaire de l'acide aminé ne semble pas avoir débuté. A partir de 2 heures d'irradiation les bandes caractéristiques du pyrène méthanol sont visibles sur les spectres montrant bien la libération du pyrène en solution.

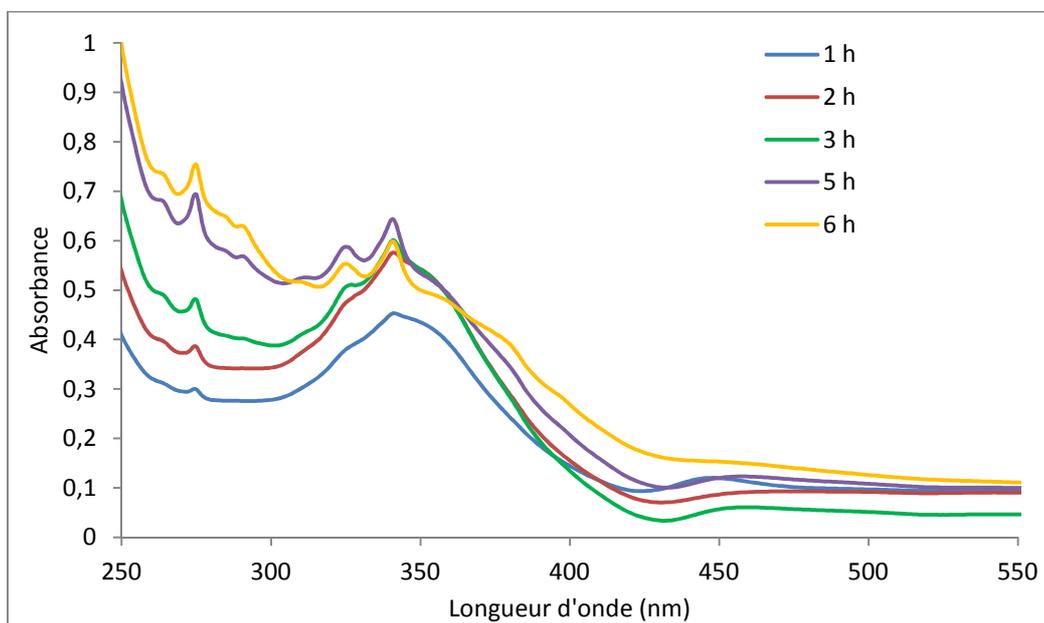


Figure 3.27 : Suivi de la photodéprotection par UV-Visible à 365 nm

Le pyrène méthanol possède des propriétés de fluorescence intéressantes, sa libération a donc pu également être confirmée par spectroscopie de fluorescence. Les spectres d'émission des surnageants à différents temps d'irradiation sont présentés sur la figure 3.28. Les spectres montrent principalement trois bandes de transition électronique situées entre 370 et 450 caractéristiques du pyrène méthanol. L'intensité des bandes augmentent avec le temps d'irradiation

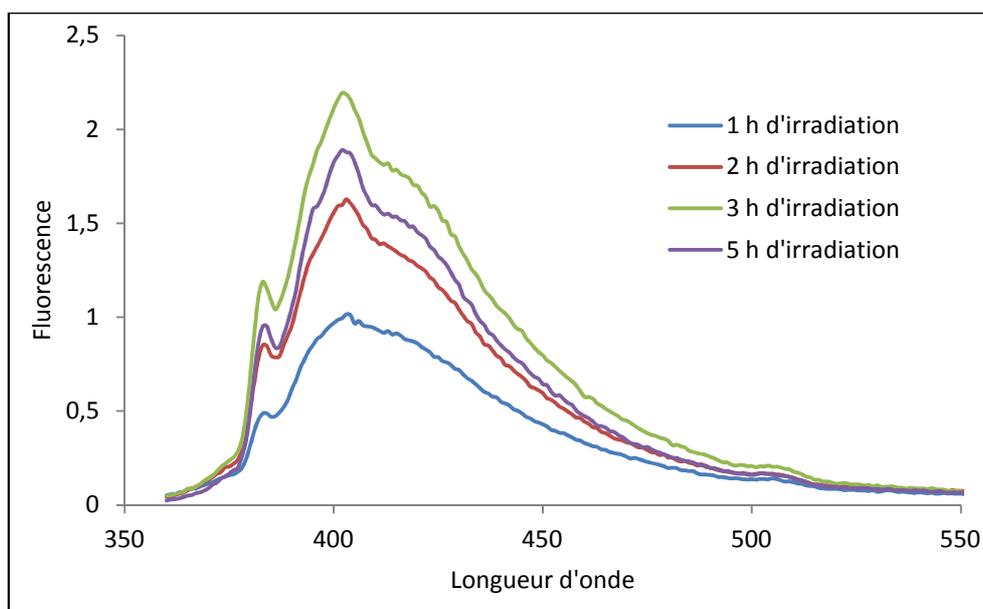


Figure 3.28 : Suivi de la photodéprotection par spectroscopie de fluorescence

c. Photodéprotection à 420 nm

Dans cette partie, nous avons choisi d'irradier les nanoparticules à 420 nm, à cette longueur d'onde, l'absorbance du pyrène méthanol n'influe pas sur la photolyse du NVOC. Les nanoparticules sont mises en suspension dans l'acétonitrile sous agitation. Les nanoparticules sont ensuite irradiées à 420 nm pendant 36,5 heures. La déprotection est suivie par spectroscopie UV-Visible, des spectres sont pris au surnageant après un temps d'irradiation de 4, 16,5 et 36,5 heures.

Les résultats d'irradiation sont présentés sur la figure 3.29, on peut voir sur les spectres que l'intensité des pics d'absorbance du pyrène méthanol à 240, 275 et 340 nm augmente par rapport au spectre correspondant au surnageant avant irradiation. Par contre, après 36 heures d'irradiation, l'intensité de ces bandes diminue, cette diminution serait due à la dégradation du pyrène méthanol.

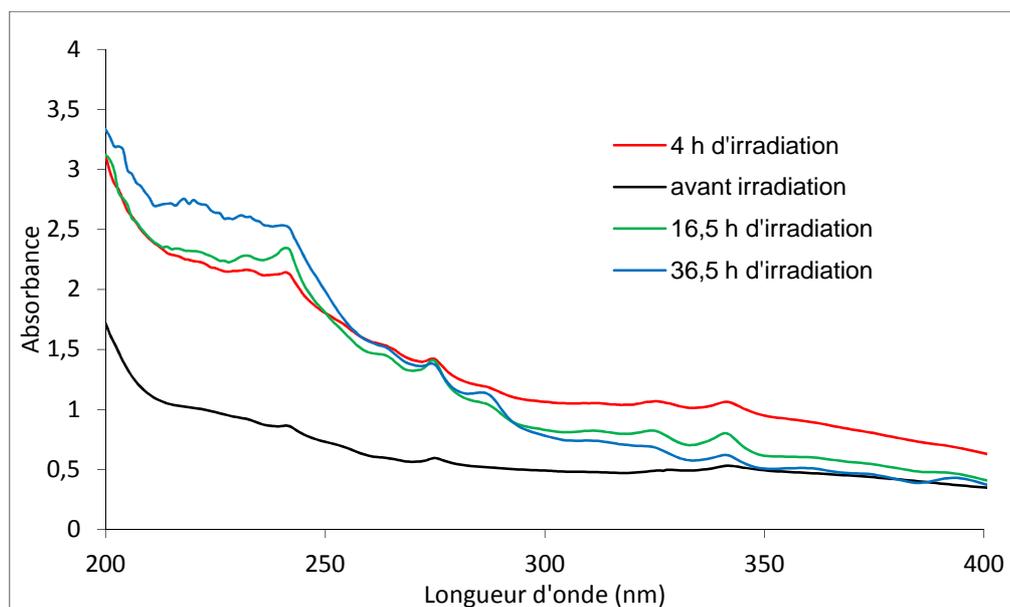


Figure 3.29 : Suivi de la photodéprotection par UV-Visible à 420 nm

8. Greffage du dendrimère sur nanoparticules aminées

Suite aux résultats intéressants obtenus dans le cas du pyrène-méthanol, nous avons essayé de coupler aux nanoparticules à la place du pyrène méthanol un dendrimère de type polyamidoamine (PAMAM-OH) de 2^{ème} génération (figure 3.30). Le dendrimère est une macromolécule biocompatible possédant une taille voisine de celle des pores des MSN (1,5-14,5 nm)^{22, 23}. Le PAMAM-OH pourrait ainsi boucher les pores des MSN et servir de *gatekeeper* une fois que le principe actif est incorporé.

Le procédé de greffage du dendrimère a été effectuée suivant le protocole décrit par Gruenhagen et al²⁴. Les nanoparticules greffées avec le NVOC-Glu sont d'abord mise en suspension dans une solution de rhodamine G, un chromophore qui joue le rôle de molécule hôte ou de principe actif. Après 24 heures de réaction, le dendrimère est additionné à la suspension et laissée ensuite sous agitation. Après centrifugation de la suspension, les nanoparticules étaient de couleur orange mais après le lavage des nanoparticules avec l'éthanol, les nanoparticules reprennent leur couleur initiale. Ceci montre que la rhodamine est relarguée des pores laissant supposer que le dendrimère n'a pas pu être greffé aux nanoparticules dans les conditions utilisées.

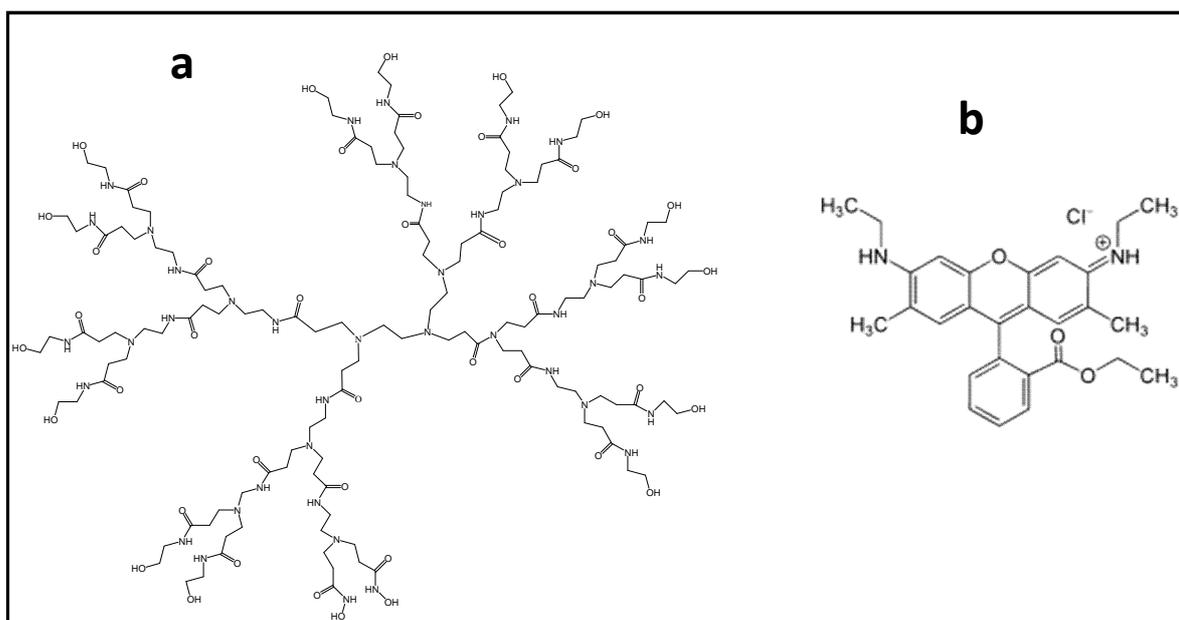


Figure 3.30 : Structure du dendrimère PAMAM-OH

D. Conclusion

La synthèse de nanoparticules de silice mésoporeuses comprenant du mannose-squarate greffé et du camptothécine comme principe actif encapsulé notées (MSN-Man-CPT) ont été préparées puis testées sur des cellules tumorales. Les résultats ont montré que la mort cellulaire est observée lorsque les nanoparticules contiennent de la CPT, ce qui montre que la présence de la CPT dans la nanoparticule est responsable de la mort cellulaire. Le taux de mort cellulaire est plus élevé avec les nanoparticules contenant le mannose et le CPT. Le couplage des MSN contenant des porphyrines anioniques du galactose et de la camptothécine (MSN-Gal-CPT) améliore sensiblement la cytotoxicité des nanoparticules, le taux de mort cellulaire atteint dans ce cas les 100%.

La possibilité de la délivrance contrôlée de principe actif de médicaments des pores des MSN par un dendrimère fixé à la MSN par un groupement intercalant photo activable a été également envisagée. Des MSN sur lesquelles sont greffés des groupements pyrène-méthanol couplés à un système MSN-NVOC- γ Glu ont d'abord été préparées. La

quantité des produits fixés sur les nanoparticules et la taille de ces dernières ont été déterminées par les techniques d'analyses UV-Visible, BET et DDL.

Le mécanisme de départ du pyrène-méthanol permettant l'ouverture des pores des nanoparticules sensées contenir le principe actif des médicaments à libérer a été également élucidé. Des tests de fixation d'un dendrimène à la place du pyrène-méthanol réalisés dans les mêmes conditions expérimentales ont montré que ce dernier n'est pas liés aux MSN, une étude complémentaire est nécessaire pour optimiser le greffage.

Partie expérimentale

Synthèse de nanoparticules de silice sans chromophore

Les nanoparticules sont préparées suivant le mode opératoire décrit dans le chapitre 2. Le tensioactif n'est pas éliminé et les nanoparticules sont séchées sous vide d'air.

Greffage de l'APTS

500 mg de nanoparticules sont mis dans un schlenk, 10 ml de toluène sec sont ajoutés aux nanoparticules sous argon. La suspension est dispersée sous ultra sons pendant 15 minutes, 2 mmole (465,6 μ l) d'APTS sont additionnés à la suspension de nanoparticules à l'aide d'une seringue, le mélange est mis sous agitation magnétique pendant 4 heures à température ambiante. Après centrifugation, les nanoparticules sont lavées 3 fois avec de l'éthanol absolu et séchées sous vide. Le tensio-actif est ensuite éliminé par 3 cycles de traitement avec $\text{NH}_4\text{NO}_3/\text{EtOH}$. Une masse de 354 mg est récupérée après séchage des nanoparticules.

Analyse élémentaire : C% : 6,73 ; H% : 3,44 ; N% : 3,81 correspondant à 2,72 mmoles d'APTS par gramme de nanoparticules.

Encapsulation de la CPT dans les MSN-Man

Dans un ballon de 25 ml, 5 mg de Camptothécine sont dissous dans 3 ml de DMSO. 50 mg de MSN-Man sont dispersés dans cette solution sous ultra sons. La suspension est ensuite laissée sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Les nanoparticules sont lavées deux fois à l'eau permutée. Les nanoparticules sont récupérées par centrifugation (10 min, 21000 tr/min) et séchées sous vide d'air.

Dosage de la CPT : Un étalonnage a été préalablement effectué à la longueur d'onde de 367 nm pour des concentrations comprises entre 1 et 26 mg/l. 4 mg de nanoparticules sont dispersés dans 5 ml de DMSO sous ultra sons pendant 15 min. La quantité encapsulée est relarguée dans le DMSO, le surnageant est alors dosé pour déterminer la quantité de CPT incorporée dans les nanoparticules.

MSN-4-Gal-CPT

- MSN-4-APTS

100 mg de nanoparticules (MSN-4) sont mises en suspension dans 5 ml d'eau permutée aux ultrasons pendant 10 mn. Une solution d'APTS (155 µl, 0,5 éq) dans 5 ml d'EtOH est ajoutée goutte à goutte à la suspension de nanoparticules sous agitation. Le pH de la solution est ajusté à 7 avec HCl 0,2 M (environs 14 ml). La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 20 h, la suspension est ensuite centrifugée pendant 10 mn à 20000 tr/min. Les nanoparticules sont lavées à l'éthanol absolu et séchées sous vide.

Analyse élémentaire : % C : 7,42 ; % H : 2,69 ; % N: 2,17, correspondant à une quantité de 1,22 mmol de fonctions amines greffées par gramme de nanoparticules.

- Greffage du squarate-galactose : MSN-4-Gal

Dans un ballon de 25 ml, 100 mg de nanoparticules aminées (MSN-4-APTS) sont mises en suspension dans 5 ml d'éthanol absolu. 35,5 mg (0,5 éq, $22,5 \cdot 10^{-3}$ mol) de squarate-galactose (p-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxycyclobut-1-enyl) amino] phenyl- α -D-galactopyranoside) sont dissous dans 5 ml d'un mélange EtOH/H₂O 3/2, la solution est ajoutée ensuite goutte à goutte à la suspension de nanoparticules. 500 µl de triéthylamine (Et₃N) sont additionnés au mélange réactionnel. La réaction est laissée sous agitation pendant 20 h. Les nanoparticules greffées sont récupérées par centrifugation (20000 tr pendant 10 mn), lavées avec de l'eau permutée (trois fois) et à l'éthanol (deux fois).

- Encapsulation de la CPT

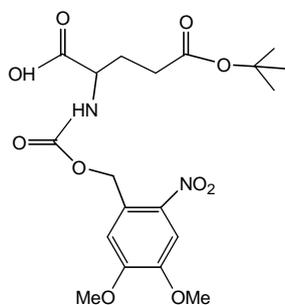
L'encapsulation de la CPT s'est effectuée suivant le même mode opératoire que pour les MSN-Man-CPT. Les quantités de réactif utilisées sont : 25 mg de nanoparticules (MSN-4-Gal), 2,5 mg de CPT dissous dans 1,5 ml de DMSO.

Cytotoxicité

Les différents types de cellules sontensemencés dans des plaques 96 puits à une densité de 20000 cellules par puits, dans 100 µl de milieu DMEM pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite incubées à différents temps d'incubation avec ou sans nanoparticules. Après incubation, le milieu est écarté, les cellules sont alors lavées et mises en culture dans du

milieu frais. La mort cellulaire induite par les nanoparticules est mesurée par le test MTT après 48 heures.

Protection de la fonction amine de l'acide glutamique avec le groupement photolabile (NVOC- α Glu)

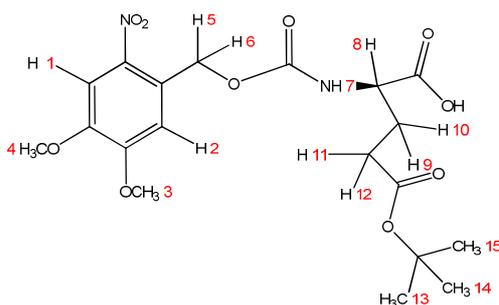


M=442,12

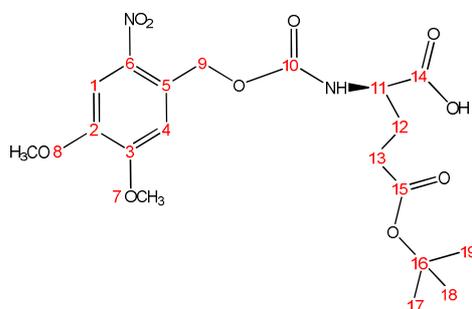
Dans un ballon de 100 ml, sont dissous 1,016 g (5 mmol) d'acide aminé H-Glu-(OtBu)-OH dans 50 ml d'un mélange dioxane /eau (1 :1). 1,16 g (11 mmol) de Na₂CO₃ sont additionnés à la solution à 0°C. 1,37 g (5 mmol) de NVOC-Cl () dissous dans 10 ml d'un mélange dioxane/THF (1 :1) sont additionnés à la solution. La réaction s'effectue en présence de 30,5 mg (0,25 mmol) de catalyseur DMAP (4-diméthylaminopyridine). La solution est agitée pendant 24 h à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Le solvant est évaporé au rotavapor. Le produit obtenu est redissous dans l'eau (30 ml) et lavé à l'acétate d'éthyle (2 x 20 ml). Les phases organique et aqueuse sont séparées par décantation. La phase aqueuse est acidifié jusqu'à pH 2 avec quelques gouttes de HCl 5%. Le produit alors précipite, la solution est lavée une deuxième fois à l'acétate d'éthyle (2 x 50 ml). Les phases organique et aqueuse sont séparées par décantation. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium anhydre, filtrée sur Büchner et concentrée par rotavapor. Le produit est séché sous vide d'air. Le produit obtenu se présente sous forme d'une poudre jaune, un rendement de 80% est obtenu.

Caractérisation



RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : $\delta(\text{ppm}) = 7,76$ (s, H-1); $7,04$ (s, H-2); $5,81$ (d, $J_3=8\text{Hz}$, H-7); $5,65$ (d, $J_2=14\text{Hz}$, H-6), $5,50$ (d, $J_2=14\text{Hz}$, H-5); $4,43$ (m, H-8); $4,07$ (s, H-3); $4,01$ (s, H-4); $2,50$ - $2,35$ (m, H-11 et H-12); $2,35$ - $2,09$ (m, H-9 et H-10); $1,46$ (s, H-13, H-14 et H-15).



RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) : $\delta(\text{ppm}) = 175,70$ (C-14); $173,22$ (C-15); $156,15$ (C-10); $154,12$ (C-2); $148,49$ (C-3); $139,95$ (C-5); $128,46$ (C-4); $110,03$ (C-6); $108,56$ (C-1); $81,99$ (C-16); $64,43$ (C-9); $56,90$ - $56,83$ (C-7 et C-8); $53,93$ (C-11); $32,17$ (C-13); $28,43$ (C-17, C-18 et C-19); $27,25$ (C-12).

Spectroscopie UV-Vis: pics d'absorbance du NVOC-Cl, $\lambda_{\text{max } 1} = 297,24 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{max } 2} = 341,08 \text{ nm}$

Greffage du groupement NVOC- α Glu sur les nanoparticules aminées

200 mg de nanoparticules (MSN-APTS) sont dispersés dans 5 ml de dichlorométhane sous ultrasons pendant 15 minutes. 170,17 mg (0,385 mmol) de NVOC- α Glu et 180,5 mg (0,875 mmol) de DCC sont additionnés à la suspension de nanoparticules. La solution est agitée pendant 24 h à température ambiante. Après centrifugation (10 min, 2000 tours/min), les nanoparticules sont lavées à l'éthanol (3 cycles de lavage). Les nanoparticules séchées sous vide d'air sont de couleur jaunâtre.

Spectroscopie UV-Vis : présence des pics d'absorbance maximum du NVOC-xGlu, $\lambda_1 = 297$ nm; $\lambda_2 = 341$ nm

Déprotection de la fonction carboxylique de MSN-NVOC- xGlu :

150 mg de nanoparticules sont dispersées dans 5 ml de TFA, la suspension est agitée pendant 30 minutes à température ambiante. Les nanoparticules sont récupérées par centrifugation et lavées trois fois à l'éthanol. Les nanoparticules sont séchées sous vide d'air.

Greffage du groupement pyrène-méthanol sur NP-NVOC-xGlu

40 mg de nanoparticules sont mis en suspension dans 3 ml de dichlorométhane sous ultrasons pendant 15 minutes. 6,82 mg (29,4 μ mol) de pyrène-méthanol et 6,06 mg (29,4 μ mol) de DCC sont additionnés à la suspension de nanoparticules. La réaction s'effectue en présence de 0,71 mg (0,588 μ mol) de catalyseur DMAP. La réaction est agitée pendant 24 h à température ambiante. Les nanoparticules récupérées sont lavées au dichlorométhane (6 cycles de lavage).

Spectroscopie UV-Visible : présence des pics d'absorbance du pyrène méthanol : $\lambda_1 = 233$ nm; $\lambda_2 = 241$ nm; $\lambda_3 = 264$ nm; $\lambda_4 = 275$ nm; $\lambda_5 = 312$ nm; $\lambda_6 = 326$ nm; $\lambda_7 = 342$ nm.

Photodéprotection

- 365 nm

Une solution de chlorhydrate de semicarbazide à 0,5 % est préparée dans le méthanol. Dans un ballon de 50 ml, 10 mg de nanoparticules sont dispersés dans 5 ml de cette solution. La suspension est mise sous agitation et soumise à irradiation à une longueur d'onde de 365 nm. Des prélèvements sont effectués après 1, 3, 3, 5 et 6 heures d'irradiation. Après centrifugation de ces prélèvements. Le surnageant est caractérisé par spectroscopie UV-Visible et par CCM avec un mélange pentane/éther (35/65) comme éluant.

- 420 nm

5 mg de nanoparticules (MSN-NVOC-Glu-Py) sont dispersés dans 3 ml d'acétonitrile, la suspension est ensuite irradiée à 420 nm. Des spectres UV-Visibles sont réalisés pour le surnageant après 4, 16,5 et 36,5 heures d'irradiation.

Encapsulation de la rhodamine G

Une solution de rhodamine G à 1 M est préparée, 2,4 mg dissous dans 5 ml de dichlorométhane. 50 mg de nanoparticules (MSN-NVOC- α Glu) sont mis en suspension dans 1 ml de la solution de rhodamine sous agitation pendant 24 heures. La suspension obtenue est de couleur orangée.

Greffage du dendrimère PAMAM-OH

Le PAMAM-OH est fourni à 20 % en poids dans le méthanol, le méthanol est d'abord évaporé sous rotavapor en prenant 2 ml de la solution, le dendrimère récupéré est ensuite dissous dans 2 ml dichlorométhane. Le PAMAM dissous est ajouté à la suspension de nanoparticules précédente. 50 mg de DCC sont additionnés à la suspension. La réaction s'effectue en présence de 1,5 mg de catalyseur DMAP. L'agitation de la suspension se poursuit pendant 48 heures. Les nanoparticules, récupérées et lavées à l'éthanol, sont de couleur jaunâtre.

Bibliographie

1. J. Kecht, A. Schlossbauer et T. Bein, *Chem. Mater.*, **2008**, 20, 7207-7214.
2. M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail et G. A. Sim, *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, 88, 3888-3890.
3. Y. Pommier, *Biochimie*, **1998**, 80, 255-270.
4. A. Lansiaux et C. Bailly, *Bull Cancer*, **2003**, 90, 239-245.
5. K. Moller et T. Bein, *Chem. Mater.*, **1998**, 10, 2950-2963.
6. J. Lu, M. Liong, I. Zink Jeffrey et F. Tamanoi, *Small*, **2007**, 3, 1341-1346.
7. V. N. R. Pillai, *Synthesis*, **1980**, 1, 1-26.
8. C. G. Bochet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, 125-142.
9. A. Patchornik, B. Amit et R. B. Woodward, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 6333-6335.
10. M. Kessler, R. Glatthar, B. Giese et C. G. Bochet, *Org. Lett.*, **2003**, 5, 1179-1181.
11. P. F. Driscoll, E. Milkani, C. R. Lambert et W. G. McGimpsey, *Langmuir*, **2009**, 26, 3731-3738.
12. D. Ryan, B. A. Parviz, V. Linder, V. Semetey, S. K. Sia, J. Su, M. Mrksich et G. M. Whitesides, *Langmuir*, **2004**, 20, 9080-9088.
13. S. Loudwig, R. A. Sachleben et M. Goeldner, *Actualité Chimique*, **2002**, 7-12.
14. C. Dinkel et C. Schultz, *Tetrahedron Letters*, **2003**, 44, 1157-1159.
15. K. R. Bhushan, C. DeLisi et R. A. Laursen, *Tetrahedron Letters*, **2003**, 44, 8585-8588.
16. J. E. T. Corrie, A. Barth, V. R. N. Munasinghe, D. R. Trentham et M. C. Hutter, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 8546-8554.
17. Y. V. Il'ichev et J. Wirz, *J. Phys. Chem. A*, **2000**, 104, 7856-7870.
18. Y. V. Il'ichev, M. A. Schwoerer et J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 4581-4595.
19. M. Schwörer et J. Wirz, *Helvetica Chimica Acta*, **2001**, 84, 1441-1458.
20. J. W. Walker, G. P. Reid, J. A. McCray et D. R. Trentham, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 7170-7177.
21. A. del Campo, D. Boos, H. W. Spiess et U. Jonas, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2005**, 44, 4707-4712.
22. K. Winnicka, K. Bielawski, M. Rusak et A. Bielawska, *Journal of Health Science*, **2009**, 55, 169-177.
23. H. Y. Nam, K. Nam, H. J. Hahn, B. H. Kim, H. J. Lim, H. J. Kim, J. S. Choi et J.-S. Park, *Biomaterials*, **2009**, 30, 665-673.

24. J. A. Gruenhagen, C.-Y. Lai, D. R. Radu, V. S. Y. Lin et E. S. Yeung, *Applied Spectroscopy*, **2005**, 59, 424-431.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le but de ce travail de thèse était la synthèse et la fonctionnalisation de nanoparticules de silice mésoporeuses pour la vectorisation d'un photosensibilisateur (porphyrines) et d'une molécule anticancéreuse pour le traitement de cellules tumorales.

Dans un premier temps, des nanoparticules de silice mésoporeuses ont été synthétisées par microémulsion directe. L'incorporation des porphyrines dans les matrices minérales a été effectuée directement au cours de leur synthèse par liaison covalente pour éviter leur élimination au cours des différents lavages. Les nanoparticules ainsi obtenues ont été caractérisées par différentes méthodes d'analyse physicochimique (BET, DRX, MET et l'UV-Visible). Les analyses montrent que les nanoparticules présentent une grande surface spécifique, elles sont sphériques, monodisperses et possèdent un diamètre moyen de 150 nm. Les résultats montrent également que les porphyrines étaient bien incorporées dans la matrice minérale.

L'activité photodynamique de ces nanoparticules a été testée *in vitro* sur des cellules tumorales humaines, les tests de phototoxicité montrent que ces nanoparticules possèdent des propriétés antitumorales très intéressantes.

Afin de préserver les cellules saines de la phototoxicité des nanoparticules. Ces dernières ont été dotées d'un agent de reconnaissance biologique, sachant que certaines cellules cancéreuses surexpriment sur leur surface le récepteur du mannose. Nous avons dû alors modifier la nature chimique de la surface des particules pour y faciliter le greffage du mannose. Les nanoparticules fonctionnalisées obtenues ont été testées sur les mêmes cellules. Les résultats obtenus montrent une nette amélioration de ces dernières montrant ainsi la spécificité du ciblage.

Dans le troisième Chapitre, les nanoparticules ont été d'abord utilisées pour la vectorisation du principe actif (camptothécine) en les fonctionnalisant avec du mannose pour le ciblage des cellules tumorales. La camptothécine a été ensuite incorporée dans les pores de ces dernières. Les résultats obtenus montrent que la cytotoxicité est due à la diffusion des molécules de camptothécine à l'intérieur des cellules. D'autre part, l'encapsulation de la porphyrine anionique par liaison covalente et l'incorporation de la camptothécine dans les pores des nanoparticules permet d'améliorer l'efficacité des MSN en couplant l'effet de la thérapie photodynamique liée à la présence du photosensibilisateur et la cytotoxicité liée à la présence de la camptothécine.

Dans la dernière partie de ce chapitre, un système de délivrance photocontrôlé a été mis au point. Le système consiste en l'utilisation des nanoparticules dont les pores ont été bouchés par du pyrène méthanol fixé aux nanoparticules au moyen d'un groupe intercalant photolabile. Après irradiation par la lumière, la liaison entre le groupe intercalant et le pyrène est rompue et les pores sont ainsi ouverts pour libérer le principe actif. L'ouverture des pores a pu être suivie par la spectroscopie UV-visible et fluorescence. Le concept de délivrance photocontrôlé a été ainsi démontré, cependant la libération d'un principe actif restent à vérifier.

Plusieurs perspectives découlent de ce travail :

- des études plus exhaustives de la délivrance photocontrôlée de principe actif sont envisagées.

- la synthèse de nanoparticules de silice fonctionnalisées par des molécules à propriétés complexantes et leur application comme capteurs et détecteurs hautement sensibles de métaux lourds constitueraient un moyen innovant pour produire, à grande échelle, une eau potable claire et non polluée.