# THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

Délivré par **l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale **Sciences chimiques Balard– ed 459**
Et de l'unité de recherche **Institut Charles Gerhardt de Montpellier**

Spécialité : **Chimie et Physicochimie Matériaux**

Présenté par **Arnaud CHAIX**

# Nanoparticules de silicium poreux pour la thérapie photodynamique et la thérapie génique

Soutenue le 17 septembre 2015 devant le jury composé de

| | | | |
|---|---|---|---|
| M. Stéphane ROUX | PR | Université de Franche-Comté | Rapporteur |
| Mme. Sabine SZUNERITS | PR | Université de Lille | Rapporteur |
| Mme. Céline FROCHOT | DR2 | CNRS | Présidente du Jury |
| Mme. Frédérique Cunin | CR1 | CNRS | Co-encadrante |
| M. Jean-Olivier Durand | DR2 | CNRS | Directeur de thèse |

# Table des matières

**Abréviations** ..... **5**

**Introduction** ..... **9**

**Chapitre 1 : La nanomédecine comme traitement du cancer** ..... **15**

1. La thérapie photodynamique (PDT) ..... 18

1.1 Histoire de la PDT ..... 18

1.2 Principe de la PDT ..... 18

1.3 Mécanisme de la PDT ..... 19

1.4 Les mécanismes de photodestruction des cellules cancéreuses ..... 22

1.5 Les photosensibilisateurs pour la thérapie photodynamique ..... 25

*1.5.1 Les propriétés photophysiques d'un bon photosensibilisateur ..... 25*

*1.5.2 Photosensibilisateurs de première génération ..... 27*

*1.5.3 Photosensibilisateur de deuxième génération ..... 28*

*1.5.4 Photosensibilisateurs de troisième génération ..... 31*

1.6 La thérapie photodynamique biphotonique ..... 31

2. La thérapie génique pour le traitement du cancer ..... 34

2.1 La thérapie génique ..... 34

2.2 La thérapie génique comme approche thérapeutique ..... 35

2.3 Vecteurs viraux utilisés en thérapie génique ..... 36

2.4 Vecteurs non viraux utilisés en thérapie génique ..... 38

3. Les nanoparticules pour le traitement du cancer ..... 41

3.1 La nanomédecine ..... 41

3.2 Les générations de nanovecteurs ..... 43

3.3 Nanoparticules pour la vectorisation de photosensibilisateurs ..... 45

*3.3.1 Nanoparticules organiques utilisées pour la PDT ..... 45*

*3.3.2 Nanoparticules inorganiques utilisées pour la PDT ..... 48*

*3.3.3 Nanoparticules aptes à générer de l'$^1O_2$ ..... 50*

3.4 Nanoparticules utilisées pour le transfert de gènes ..... 50

*3.4.1 Vecteurs non viraux chimique pour le transfert de gènes ..... 51*

*3.4.2 Nanoparticules organiques pour le transfert d'acides nucléiques ..... 52*

*3.4.2 Nanoparticules inorganiques pour le transfert d'acides nucléiques ..... 54*

4. Conclusion..... 56

**Chapitre 2 : Le silicium poreux ..... 57**

1 Dissolution anodique..... 60

1.1 Silicium poreux ..... 60

1.2 Montage électrochimique ..... 60

1.3 Mécanisme de gravure électrochimique ..... 61

1.4 Stain etching ..... 63

1.5 Gravure photochimique ..... 64

2. Caractéristiques et propriétés du silicium poreux ..... 65

2.1 Morphologie ..... 65

2.2 Propriétés optique du silicium poreux ..... 66

*2.2.1 Interférométrie optique..... 66*

*2.2.2 Photoluminescence ..... 67*

2.3 Génération d'oxygène singulet par le silicium poreux ..... 69

2.4 Biocompatibilité, biodégradabilité du silicium poreux ..... 69

3. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules de silicium poreux ..... 70

3.1 Hydrosilylation ..... 70

*3.1.1 Fonctionnalisation chimique ou électrochimique ..... 71*

*3.1.2 Réaction de carbonisation thermique..... 72*

3.2 Silanisation ..... 72

3.3 Oxydation ..... 73

*3.3.1 Oxydation thermique ..... 73*

*3.3.2 Oxydation à l'ozone..... 74*

*3.3.3 Oxydation par des espèces organiques ..... 75*

*3.3.4 Oxydation à la vapeur d'eau à haute pression..... 75*

*3.3.6 Oxydation électrochimique en milieux aqueux en présence d'acides minéraux..... 76*

4. Applications biomédicales du silicium poreux ..... 77

4.1 Film de silicium poreux ..... 77

4.2 Microparticules de silicium poreux ..... 77

4.3 Nanoparticules de silicium poreux ..... 79

5. Conclusion ..... 85

**Chapitre 3 : Préparation des nanoparticules de Silicium poreux ..... 87**

1. Préparation des nanoparticules de silicium poreux ..... 89

1.1 Les nanoparticules de silicium poreux ..... 89

1.2 Matériels et méthodes ..... 89

*1.2.1 Nanoparticules de silicium poreux ..... 89*

*1.2.2 Caractérisations des nanoparticules de silicium poreux ..... 92*

1.3 Résultats ..... 94

**Chapitre 4 : Nanoparticules de silicium poreux pour la thérapie photodynamique ..... 99**

Introduction ..... 101

1. Nanoparticules de silicium poreux pour le traitement du cancer du sein (MCF-7) ..... 102

1.1 Résultats et discussion ..... 102

1.2 Matériels et méthodes ..... 123

*1.2.1 Fonctionnalisations des pSiNP avec un photosensibilisateur et deux agents de ciblage ..... 123*

*1.2.2 Caractérisations des nanoparticules greffées ..... 126*

*1.2.3 Imagerie et thérapie photodynamique ..... 127*

2. Nanoparticules de silicium poreux pour le traitement du cancer de la prostate (LNCaP) ..... 129

2.1 Résultats et discussion ..... 130

2.2 Matériels et méthodes ..... 140

*2.2.1 Fonctionnalisation des nanoparticules ..... 140*

3. Fonctionnalisation de complexes de ruthénium (II) sur les pSiNP pour de la thérapie photodynamique ..... 142

3.1 Résultats et discussion ..... 142

3.2 Matériels et méthodes ..... 153

*3.2.1 Fonctionnalisation des pSiNP ..... 153*

4. Décoration de nanoparticules de silicium poreux avec des nanoparticules d'or pour l'imagerie et la thérapie photodynamique biphotonique ..... 154

4.1 Résultats et discussion ..... 154

4.2 Matériels et méthodes ..... 167

*4.2.1 Complexation des nanoparticules d'or et fonctionnalisations de la porphyrine-NCS et du mannose éthyle squarate. ..... 167*

5. Conclusion et perspectives ..... 169

**Chapitre 5 : Nanoparticules de silicium poreux pour la thérapie génique ..... 177**

Introduction ..... 179

1. Nanoparticules de silicium poreux pour le transfert de plasmide d'ADN dans les cellules HEK ..... 180

1.1 Résultats et discussion ..... 181

1.2 Matériels et méthodes ..... 192

*1.2.1 Fonctionnalisations des pSiNP ..... 192*

2. Nanoparticules de silicium poreux pour le transfert de petits interférents d'ARN (siRNA) sous excitation biphotonique ..... 194

2.1 Résultats et discussions ..... 195

2.2 Matériels et méthodes ..... 208

*2.2.1 Préparation des molécules et couplages sur les pSiNP ..... 208*

*2.2.2 Caractérisations des molécules et des nanoparticules greffées. ..... 213*

3. Conclusion ..... 215

**Conclusion générale et perspectives ..... 217**

**Publications ..... 223**

**Références bibliographiques ..... 227**

# Abréviations

ADN : Acide DésoxyRibonucléiques

ADP : Absorption à deux photons

ALA : acide 5-aminolévulinique

APTES : AminoPropylTriEthoxySilane

ARN : Acide RiboNucléique

ATR : Attenuated Total Reflectance, réflexion totale atténuée

AuNP : Nanoparticules d'or

BdB : Broekhoff et de Boer

BET : Brunauer, Emett et Teller

BPD : Benzoporphyrine

CMC : Concentration micellaire critique

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CPT : Camptothécine

DCM : Dichlorométhane

DIPEA : N,N-Diisopropyléthylamine

DLS : Dynamique Light Scattering, Diffusion dynamique de lumière

DMD : Dystrophie Musculaire Duchenne

DMF : diméthylformamide

DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge

DMSO : Diméthylsulfoxide

DRX : Diffraction de rayons X

e6 : Chlorines

EDX : Analyse dispersive en énergie

EPR : Enhanced Permeation and Retention

FDA : Food and Drug Administration

FITC : Fluorescein IsoThioCyanate

FRET : Förster Resonance Energy Transfer

ICPES : 3-Isocyanopropyltriethoxysilane

HEK : Cellules épithélium rénal

HeLa : Cellules cancéreuses du col utérin

HF : Acide fluorhydrique

HpD : Hématoporphyrine

IRM : Imagerie par résonance magnétique

LNCaP : Cancer épithélial de la prostate

RM6P : Récepteur du cation-indépendant mannose-6-phosphate

MCF-7 : Cellules cancéreuses du sein

MEB : Microscopie électronique à balayage

MET : Microscopie électronique en transmission

MOF : Metal Organic Framework

MSN : Mesoporous Silica Nanoparticles, nanoparticules de silice mésoporeuses

m-THPC : m-tétrahydroxyphenylchlorine

Npe6 : Mono-L-aspartyl chlorine

PAA : Polyacrylamide

PACA : Poly-(alkyl cyanoacrylate)

PBS : Phosphate Buffer Saline

pDNA : Plasmide d'ADN

PDT : PhotoDynamic Therapy, thérapie photodynamique

PEG : PolyEthylene Glycol

PEI : polyéthylènimide

PLA : PolyLactic Acid

PLGA : PolyLactic-co-Glycolic Acid

PLL : Poly-L-lysine

PpIX : Protoporphyrine

PSA : Prostate specific antigen, antigène prostatique spécifique

pSi : Silicium poreux

pSiMP : Microparticules de silicium poreux

pSiNP : Nanoparticules de silicium poreux

PS : Photosensibilisateurs

PyBOP : Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate

ROS : Reactive Oxygen Species

SAXS : Small-Angle X-ray Scattering

Si : Silicium

siRNA : Petit ARN interférent

TFA : Trifluoroacetic acid, acide trifluoroacétique

THCPSi : Thermally HydroCarbonized Porous Silicon

THF : Tétrahydrofurane

# Introduction

Ce manuscript de thèse rassemble mes travaux de recherche effectués à l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier (ICGM) au cours de mes trois années de Doctorat, à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier (ENSCM). Ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'une thèse sur la chimie des matériaux pour la santé et se situent dans un environnement multidisciplinaire à l'interface entre la chimie, la physique et la biologie. Ces travaux ont pour objectif d'évaluer le potentiel des nanoparticules de silicium poreux pour la thérapie photodynamique et la thérapie génique dans le traitement du cancer.

Le cancer est une maladie qui se manifeste par une hyperprolifération de cellules anormales à l'origine de mutations d'ordre génétique. Le cancer affiche une des plus grandes causes de décès en France, c'est pourquoi le ministère de la santé sensibilise la population par des campagnes de prévention contre l'alcoolisme, le tabagisme... et de dépistage du cancer (dépistage du cancer de la peau, du sein et colorectal). Une fois le diagnostic posé, le type de cancer et son stade, les oncologues adaptent et proposent un protocole pour traiter le patient. Ils disposent de plusieurs traitements parmi lesquels, nous trouvons l'exérèse (la chirurgie), la chimiothérapie et la radiothérapie. Ce sont des traitements lourds qui entraînent bien souvent des effets secondaires (chute des cheveux, aplasie, anémie…). Grâce aux avancées scientifiques, de nouvelles thérapies comme la thérapie photodynamique, la thérapie génique et l'utilisation d'ultrasons sont porteuses d'espoir pour les patients car ces thérapies sont moins lourdes et entraînent moins d'effets secondaires.

La thérapie photodynamique (PDT) permet le traitement local de petites tumeurs cancéreuses (prostate, sein). La PDT fait intervenir avec l'utilisation d'une molécule photosensibilisatrice (PS), capable sous irradiation et en présence d'oxygène d'induire des réactions photochimiques formant l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène. L'espèce majoritairement produite est l'oxygène singulet $^1O_2$, généré à partir d'oxygène moléculaire triplet. Toutefois, la PDT montre certaines limites dans son application, notamment dans la délivrance spécifique de molécules photosensibilisatrices. C'est pourquoi, l'utilisation des nanoparticules comme vecteurs des molécules photosensibilisatrice se présente comme une approche intéressantes pour transporter et concentrer une plus grande quantité de PS dans la zone tumorale.

Dans le milieu des années 1980, une nouvelle thérapie fait son apparition dans le traitement du cancer. La thérapie génique apparaît comme une nouvelle stratégie pour traiter des maladies d'ordre génétique. Aujourd'hui, grâce à une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires et des gènes impliqués dans l'apparition et le développement de certaines pathologies, la thérapie génique permet de traiter des maladies monogéniques et

polygéniques. En thérapie génique, les vecteurs viraux utilisés pour du transfert de gènes dans les cellules sont pour l'essentiel des virus modifiés. Cependant, ces vecteurs viraux présentent certaines contraintes. C'est pourquoi, aujourd'hui des équipes de chercheurs s'orientent vers l'utilisation de vecteurs non viraux chimiques de types lipides, polymères, liposomes ou nanoparticules inorganiques pour du transfert de gènes.

Les nanoparticules de silicium poreux (pSiNP), obtenues par anodisation électrochimique du silicium cristallin, sont des nanovecteurs prometteurs pour des applications dans le domaine biomédical. Car elles sont biocompatibles et biodégradables *in vivo*. En effet, en milieux aqueux, les pSiNP se dégradent sous forme d'acide orthosilicique, sous-produit non toxique ensuite filtrés par les reins puis éliminés par les urines. La taille des pSiNP est comprise entre 50 et 250 nm avec des propriétés texturales intéressantes et facilement modulables durant leur synthèse. Les pSiNP préparées à partir de silicium semi-conducteur possèdent des propriétés électroniques et optiques intéressantes pour des applications dans le domaine de la nanomédecine et en particulier pour l'imagerie. Elles présentent sous certaines conditions une photoluminescence intrinsèque et peuvent être excitées dans le proche infrarouge par une excitation biphotonique. Les pSiNP ont la capacité sous illumination de générer de l'oxygène singulet ($^1O_2$), espèce active dans le traitement du cancer par thérapie photodynamique. Les pSiNP peuvent être fonctionnalisées chimiquement par le biais de leur groupement silanols, ou bien via les hydrures de surface. Les pSiNP sont des nanomatériaux intéressants pour la vectorisation de molécules photosensibilisatrices, d'acides nucléiques et de principes actifs anticancéreux.

Dans ces travaux de thèse, nous avons préparé des nanoparticules de silicium poreux greffées avec des molécules photosensibilisatrices et des agents de ciblage pour des applications en thérapie photodynamique. D'autre part, nous nous sommes attelés à complexer des d'acides nucléiques sur les pSiNP pour du transfert de gènes. Dans la suite de ce manuscript :

- Le chapitre 1 présente une étude bibliographique portant sur la thérapie photodynamique et la thérapie génique pour le traitement du cancer. Nous décrivons également comment l'utilisation des nanotechnologies peut jouer un rôle dans l'amélioration de l'efficacité des traitements contre le cancer.
- Le chapitre 2 décrit la synthèse de silicium poreux par anodisation électrochimique d'un silicium cristallin de type $p^{++}$. Les propriétés structurales, physiques et chimiques du silicium poreux et les différentes possibilités de greffages sont présentées. Enfin,

les différentes applications du silicium poreux suivant sa forme (films, microparticules et nanoparticules) dans le domaine biomédical, sont également présentées.

- Le chapitre 3 porte sur la fabrication et la caractérisation des nanoparticules de silicium poreux (pSiNP) à partir de films de silicium poreux.
- Le chapitre 4 présente mon travail sur l'utilisation des nanoparticules de silicium poreux pour la thérapie photodynamique. A travers ce chapitre, nous décrivons 4 études utilisées en thérapie photodynamique pour améliorer l'efficacité du traitement du cancer.
    - La première étude porte sur la fonctionnalisation des pSiNP avec une porphyrine (porphyrine-NCS cationique) et deux agents de ciblage (mannose phényle squarate et mannose cétone) pour cibler les cellules de cancer du sein (MCF-7). Ces nanoparticules sont testées *in vitro* en imagerie et en thérapie photodynamique sous irradiation mono et biphotonique.
    - La deuxième étude montre la fonctionnalisation de la porphyrine-NCS et d'un agent de ciblage (mannose-6-carboxylate) sur les pSiNP pour cibler les cellules cancéreuses de la prostate (LNCaP). Ces nanoparticules sont testées en imagerie et en thérapie photodynamique *in vitro* sous irradiation monophotonique et biphotonique.
    - Dans la troisième étude nous avons fonctionnalisé des pSiNP avec deux complexes de ruthénium (II) aux propriétès intéressantes en tant que photosensibilisateurs pour des applications en PDT. Ces nanoparticules sont testées en imagerie et en thérapie photodynamique *in vitro* sous irradiation mono et biphotonique.
    - La quatrième étude porte sur l'utilisation de nanoparticules d'or couplées à des pSiNP greffées avec une porphyrine et un agent de ciblage (mannose éthyle squarate). Ces nanoparticules font l'objet d'étude en imagerie et en thérapie photodynamique *in vitro* sous irradiation biphotonique
- Dans le chapitre 5 nous décrivons deux études sur l'utilisation des pSiNP en thérapie génique dans le but d'améliorer l'efficacité du traitement du cancer.
    - La deuxième étude porte sur un premier couplage entre un 4,4'-diaminoazobenzene et une histidine et un deuxième couplage entre un 4,4'-diaminoazobenzene et une lysine pour obtenir deux complexes (Azo@His et Azo@Lys). Ces nanoparticules sont utilisées pour du transfert de gènes (pDNA) sur des cellules HEK.

- La deuxième étude, il s'agit de synthétiser deux molécules : azobenzene@histidine et azobenzene@lysine. Ces deux molécules sont greffées sur les pSiNP pour du transfert de gènes (siRNA) sous excitation biphotonique et pour traiter le cancer du sein (MCF-7).

Puis dans la conclusion, nous exposons un bilan des résultats obtenus à travers mes travaux de thèse et à l'aide de ces résultats nous projetons des perspectives de travail.

# Chapitre 1 : La nanomédecine comme traitement du cancer

Le cancer est une maladie qui se caractérise par une hyperprolifération anarchique de cellules au sein de l'organisme. Cette prolifération de cellules anormales entraîne la formation d'une masse que l'on nomme tumeur. Elle va peu à peu envahir l'organe et en altérer son fonctionnement. Certaines cellules tumorales peuvent se séparer de la tumeur et circuler dans l'organisme créant de nouvelles tumeurs, c'est ce que l'on appelle les métastases. Le cancer naît de cellules normales qui subissent un ensemble d'altération conduisant à la multiplication incontrôlée de ces cellules cancéreuses. Le cancer peut être lié à des facteurs externes comme le tabagisme, l'excès pondéral, l'abus d'alcool ou à des substances cancérogènes par exemple l'utilisation de produits chimiques, biologiques. Le cancer peut toucher et se développer dans plusieurs organes notamment les poumons, la prostate, la vessie, le pancréas, le côlon, le col de l'utérus, l'œsophage, les os, le sang, le cerveau, etc... Chez l'homme le cancer du poumon représente la plus grande cause de décès après le cancer de la prostate et du côlon. En revanche, chez la femme le cancer du sein est très majoritaire suivi du colon et du col de l'utérus. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer représente la deuxième cause de mortalité dans le monde chez l'homme après les maladies cardiovasculaires. Le cancer à travers le monde à fait plus de 8.2 millions de décès en 2010, soit environ 13% de la mortalité mondiale, un chiffre en constante augmentation et qui pourrait atteindre 13.1 millions de décès en 2030. La lutte contre le cancer est devenue un enjeu mondial.

Au cours des dernières décennies, la recherche scientifique a montré que le cancer était le résultat d'altérations moléculaires, qui avait pour origine une mutation génétique de l'ADN. Afin d'adapter un traitement efficace, il existe plusieurs moyens pour diagnostiquer un cancer : le bilan sanguin, la biopsie, l'endoscopie, la radiologie, la mammographie, la scintigraphie etc…. Ces techniques de diagnostic comportent certaines limitations (le cancer manqué par le dépistage, le sur-diagnostic et les fausses alarmes dues aux faux positifs). Les principales méthodes de traitement du cancer sont la chirurgie (l'exérèse) lorsque cela est possible et que la tumeur est accessible mais aussi la radiothérapie et la chimiothérapie. Malheureusement, ces techniques thérapeutiques peuvent engendrer des complications voir des effets secondaires souvent très lourds pour le patient. Des thérapies faiblement invasives comme la thérapie photodynamique (PDT) et la thérapie génique, actuellement en application clinique, permettent de traiter des cancers pour lesquels une chirurgie lourde ou une chimiothérapie ne se justifient pas. Ces thérapies combinées aux nanotechnologies en particulier avec l'utilisation de nanoparticules comme nanovecteurs des photosensibilisateurs et des acides nucléiques pourraient offrir des solutions pour le traitement du cancer.

# 1. La thérapie photodynamique (PDT)

## 1.1 Histoire de la PDT

L'utilisation de la lumière comme traitement thérapeutique a été rapporté pour la première fois, il y a plus de trois mille ans. Les civilisations égyptiennes, chinoises et indiennes utilisèrent des substances naturelles pour traiter diverses maladies notamment le psoriasis, le vitiligo et le cancer de la peau. Ce n'est qu'au début du 20ième siècle que des chercheurs ont découverts la possibilité de coupler des composés chimiques avec de la lumière pour entraîner la mort cellulaire. En 1900, Oscar Raab un étudiant allemand en médecine a mis en évidence pour la première fois les effets cytotoxiques de l'acridine (hétérocycle azoté) sous irradiation sur des organismes vivants. Cependant, la première application clinique de la thérapie photodynamique (PDT) remonte à 1903, elle a été réalisée par Von Tappeiner et Jesionek qui traitèrent des tumeurs cancéreuses de la peau. Pour cela, ils utilisèrent de l'éosine (un colorant de couleur rose-orangé), exposée à la lumière blanche. Ils ont été les premiers à introduire le terme d'«effet photodynamique ».[1] Il aura fallu attendre presque 60 ans pour démontrer l'intérêt de la PDT pour le traitement du cancer. En effet, en 1960 Richard Lipson et *al.* utilisèrent un nouveau composé, le dérivé de l'hématoporphyrine (HpD). Grâce à la fluorescence de HpD, R. Lipson *et al.* montrérent sa sélectivité et la possibilité de la concentrer en grande quantité dans les zones tumorales. Toutefois, ce n'est qu'en 1975 que Dougherty *et al.* ont rapporté pour la première fois que l'administration de HpD combinée à une lumière rouge pouvait éradiquer la croissance de la tumeur mammaire chez la souris.[2] Depuis cette découverte, des études précliniques et cliniques ont été réalisées avec succès sur des patients atteints du cancer de la vessie et de la peau.[3, 4] A la suite de ces études, la thérapie photodynamique s'est dévelloppée grâce à l'utilisation de nouvelles molécules photosensibilisatrices de plus en plus spécifiques pouvant traiter plusieurs cancers (peau, cou, vessie, prostate, sein).[5-8]

## 1.2 Principe de la PDT

La PDT est reconnue comme un traitement prometteur pour des petites tumeurs solides (prostate[9], pancréas[10] ou œsophage[11]) et superficielles[12] (tumeurs cutanées). La PDT est généralement utilisée en traitement curatif pour des cancers à un stade précoce ou en traitement palliatif pour répondre aux échecs des thérapies anticancéreuses. La PDT suscite un intérêt pour la destruction sélective de tumeurs cancéreuses et montre de nombreux avantages par rapport aux traitements conventionnels du cancer comme la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. En particulier, la PDT permet un traitement local et faiblement invasif. La

PDT nécessite d'administrer une molécule photosensibilisatrice (PS) non-toxique, localisée dans les tissus tumoraux, de l'activer avec une illumination à une longueur d'onde et à une puissance appropriées. En présence d'oxygène, le photosensibilisateur sous irradiation est capable d'induire la formation d'oxygène singulet ($^1O_2$) et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) entraînant un dommage irréversible aux tissus tumoraux.[13, 14]

La thérapie photodynamique comporte de nombreux avantages[15] :

- Traitement non-invasif et non-toxique
- Traitement local qui cible avec précision les tumeurs cancéreuses
- Effets secondaires modérés
- Très peu de scarifications sur la peau
- Traitement qui peut être répété sans que la dose soit limitée

Malheureusement, la PDT présente aussi un certain nombre de limitations comme la faible spécificité des photosensibilisateurs pour la tumeur et leur caractère hydrophobe. De plus la faible pénétration de la lumière visible dans les tissus limite l'usage de la PDT.

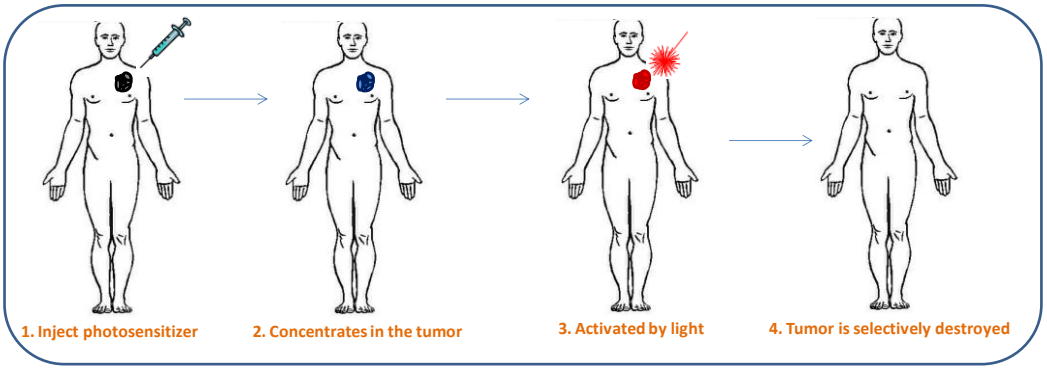



**Figure I.1.** Principe de la thérapie photodynamique.

## 1.3 Mécanisme de la PDT

La photosensibilisation est un phénomène photophysique qui implique l'utilisation d'une molécule photosensibilisatrice (PS) et de la lumière (hν). Lors de ce processus d'irradiation, le PS absorbe l'énergie de la lumière et la transfère au dioxygène environnant présent dans son état fondamental triplet et à d'autres molécules présentes dans les cellules pour former de l'oxygène singulet et des espèces réactives de l'oxygène. L'oxygène singulet et les radicaux libres vont agir en tant qu'agents cytotoxiques et induiront la mort des cellules

par divers mécanismes que nous détaillerons part la suite. Le diagramme de Jablonsky-Perrin présenté ci-dessous permet de mieux comprendre les mécanismes d'excitation et de désexcitation des états électroniques des photosensibilisateurs et la formation d'oxygène singulet et d'espèces réactives de l'oxygène (**Figure I.2**).

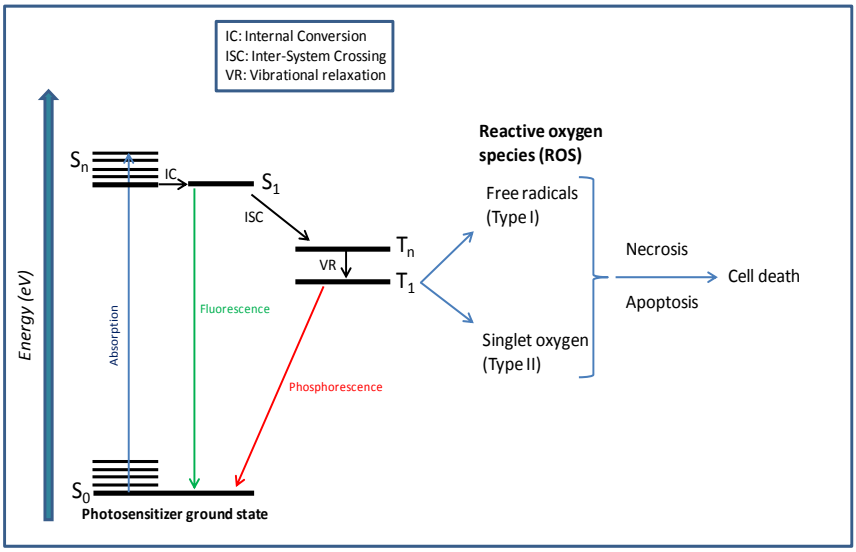



**Figure I.2.** Diagramme de Jablonski-Perrin.[16]

Sous irradiation lumineuse (hv) (d'une très courte durée $10^{-15}$ s) et à une longueur d'onde appropriée, le photosensibilisateur passe de l'état fondamental ($S_0$) à différents états singulets ($S_1$, $S_2$, …, $S_n$) pour ensuite par un mécanisme de conversion interne retourner au niveau d'énergie singulet le plus bas ($S_1$).[17] A partir de l'état $S_1$ (d'une courte durée de vie $10^{-9}$ s) un retour à l'état fondamental $S_0$ peut s'effectuer par émission d'un photon (fluorescence) ou passer par conversion inter-système, c'est-à-dire par transfert d'énergie de l'état $S_1$ à l'état triplet $T_1$. L'état triplet $T_1$ d'une durée de vie plus longue ($10^{-6}$ s à 1s) peut par émission d'une phosphorescence retourner à l'état ($S_0$) ou réagir avec le substrat moléculaire présent dans la cellule afin d'induire de l'oxygène singulet $^1O_2$ et des espèces radicales. Il existe deux mécanismes photochimiques par lesquels l'état triplet $T_1$ peut réagir avec l'environnement biologique et qui sont les mécanismes de photoreactions de type I et II.[14]

**Le mécanisme de photoreaction de type I** génère la production de radicaux libres par transfert d'électrons ou d'atomes d'hydrogène entre le PS à l'état $T_1$ et le substrat moléculaire. Ces espèces radicalaires peuvent par la suite réagir avec l'oxygène moléculaire présent dans le milieu cellulaire et entraîner la formation d'espèces réactives de l'oxygène (superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$) et d'hydroxyle ($^{\cdot}OH$)).

**Le mécanisme de photoreaction de type II,** contrairement à la réaction de type I, l'état triplet $T_1$ du PS réagit directement avec le dioxygène présent dans les cellules. Avec suffisamment d'énergie il entraîne le dioxygène triplet $^3O_2$ à son état singulet $^1O_2$. A noter que la photoreaction de type II peut également former des radicaux induisant une mort cellulaire. L'oxygène singulet va alors réagir avec les molécules biologiques des cellules en formant des hydroperoxides secondaires par rapport à la réaction de type I.

En PDT, il est difficile de distinguer quel mécanisme photoréactionnel prend le dessus sur l'autre. Le ratio entre ces deux processus photochimiques dépend pour l'essentiel du type de photosensibilisateur que l'on utilise mais aussi de la concentration en dioxygène.[18] Une forte concentration en dioxygène favorise la formation d'oxygène singulet alors qu'en condition hypoxique et riche en matière organique la formation de radicaux libres sera favorisée. L'oxygène singulet formé à partir de la réaction de type II possède un temps de demi-vie très court (quelques µs) et une distance de diffusion de l'ordre de 0.01 µm à 0.02 µm dans la cellule.[19] L'oxygène singulet produit est un puissant oxydant qui réagit avec les molécules biologiques de la cellule (acide aminés, lipides, acide gras insaturés, le cholestérol des membranes, les phospholipides et les acides nucléiques) provocant une dégradation des tissus cellulaires et entraînant ainsi la mort des cellules.

### 1.4 Les mécanismes de photodestruction des cellules cancéreuses

Suite au traitement photodynamique, la photodestruction des cellules tumorales résulte de l'action de deux types de mécanismes :

- Les mécanismes directs traduisant la mort des cellules tumorales par nécrose, apoptose ou autophagie.
- Les mécanismes indirects par vascularisation des cellules cancéreuses privées de moyens physiologiques (nutriments, oxygène) ou par une réponse immunitaire.

Mécanismes directs :

L'internalisation des photosensibilisateurs dans les cellules cancéreuses est un mécanisme complexe qui comporte plusieurs étapes et cascades chimiques. L'apoptose et la nécrose cellulaires dépendent de la nature et de la localisation du PS dans les cellules tumorales.[20] Le PS peut se retrouver dans les organes cellulaires comme la mitochondrie, les lysosomes, le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi, le cytoplasme ou la membrane plasmique. En général, après PDT les cellules cancéreuses répondent par un stress aigu suivi par des changements dans le métabolisme (production de calcium et lipides) avec une production accrue de cytokine. Il en résulte, qu'un PS localisé dans la mitochondrie induit l'apoptose cellulaire alors qu'une localisation dans les lysosomes ou sur la membrane plasmique amène à une nécrose cellulaire.[21-23] Toutefois, il a été observé qu'une concentration élevée en PS ou qu'une dose de lumière élevée en PDT conduisent à une mort cellulaire par nécrose, tandis que des concentrations plus faibles en PS ou une dose de lumière plus faible entraîneront une mort cellulaire par apoptose. La **figure I.3** illustre les différents mécanismes de morts cellulaires en PDT. L'oxygène singulet ($^1O_2$) est le résultat produit par le PS sous irradiation avec présence de dioxygène dans la cellule. Ce mécanisme de production d'oxygène singulet conduit à la mort de la tumeur cancéreuse par nécrose et/ou par apoptose mais il peut aussi occasionner à une vascularisation de la tumeur ou une réponse immunitaire (inflammation aiguë). La réponse immunitaire a pour conséquence d'attirer les leucocytes (les cellules dendritiques, cellules neutrophiles) vers la tumeur cancéreuse.[24]

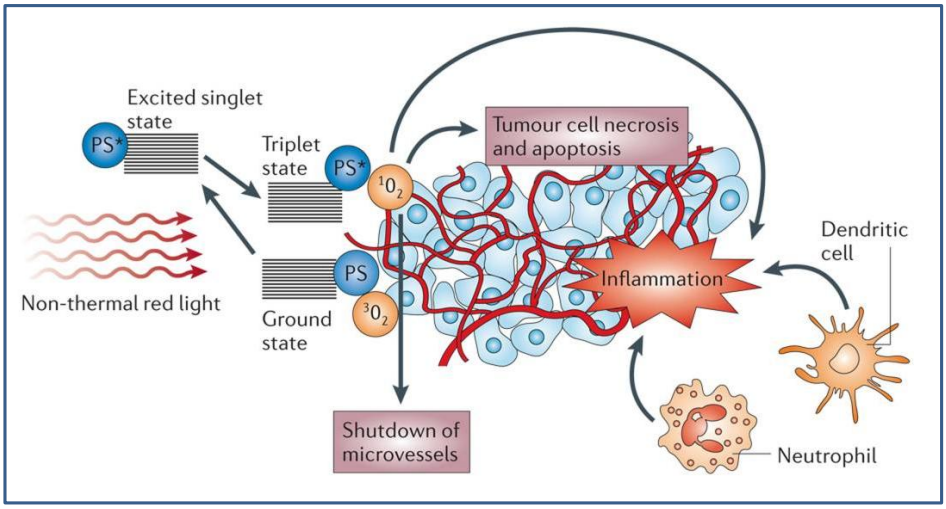



**Figure I.3.** Mécanismes de mort cellulaire en thérapie photodynamique.[24]

**L'apoptose cellulaire** est un mécanisme centré sur la localisation du PS dans la mitochondrie.[25] La mitochondrie joue un rôle essentiel dans l'apoptose grâce à l'activation de cytochrome c dans le cytosol à l'origine de l'activation de la cascade des caspases 3, 6 et 7.[26, 27] Une protéine spécifique appelée Bcl-2 (lymphome à cellule B), supposée empêcher l'apoptose cellulaire, sera endommagée par l'oxygène singulet produit par PDT et aura pour conséquence l'oxydation de la protéine bcl-2.[28]

**La nécrose cellulaire** décrite comme mort rapide et violente d'une cellule tumorale se caractérise par un gonflement cytoplasmique et par une destruction des organites. La nécrose cellulaire a pour conséquence une dégradation des lipides membranaires. La perméabilité de la membrane cellulaire augmente et provoque une fragmentation cellulaire libérant ainsi la matière intracellulaire dans le compartiment extracellulaire (tissu environnant).

La mort d'une cellule tumorale (apoptose, nécrose et autophagie) après PDT n'est pas facile à établir car plusieurs facteurs et paramètres rentrent en jeu :

- Types de cellules cancéreuses
- Localisation intracellulaire du PS
- Dose de lumière
- Caractéristiques du PS (hydrophobe, hydrophile ou amphiphile)
- Pression partielle en $O_2$

Mécanismes indirects :

**La vascularisation tumorale** provoquée par la PDT entraîne un processus d'altération du système vasculaire. En supprimant les apports en nutriments et en oxygène, indispensables pour la survie des cellules, l'effet induit est la mort de la cellule tumorale par asphyxie.

**La réponse immunitaire :** Outre, les mécanismes directs et les dommages sur la vascularisation tumorale, certains travaux, notamment ceux de Canti *et al.* ont permis de mettre en évidence que la PDT déclenche une réponse immunitaire anti-tumorale.[29] Certains travaux scientifiques ont montré que la nécrose cellulaire comme l'apoptose cellulaire peut conduire à une réponse immunitaire mais cette question reste contreversée.[30, 31] Après irradiation, la PDT conduit à une photo-oxydation des lipides membranaires des cellules tumorales entraînant leur destruction et la libération de médiateurs de l'inflammation (cytokines).[32] Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA : cellules dendritiques), accumulées sur le site irradié suite à la réponse inflammatoire, vont alors phagocyter les débris cellulaires et être stimulées par les cytokines. Suite à cette stimulation les cellules dendritiques deviennent matures et migrent dans les organes lymphoïdes pour présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T naïf (LT) et recruter les cellules immunitaires (LT $CD8^+$ et LT $CD4^+$).[32, 33] Les LT activés sont attirés sur le site tumoral par les chémokines et conduisent à la mort des cellules cancéreuses (**Figure I.4**).

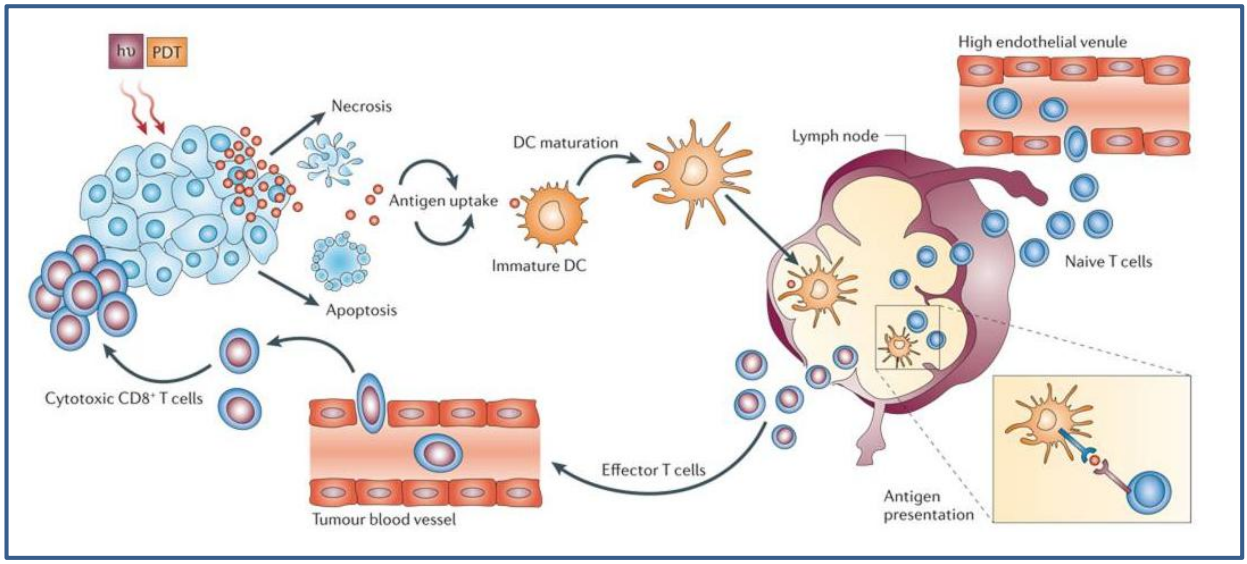



**Figure I.4.** La thérapie photodynamique induit l'activation d'antigènes spécifiques.[24]

## 1.5 Les photosensibilisateurs pour la thérapie photodynamique

### *1.5.1 Les propriétés photophysiques d'un bon photosensibilisateur*

Le photosensibilisateur (PS) idéal en PDT doit remplir certaines conditions[34, 35] :

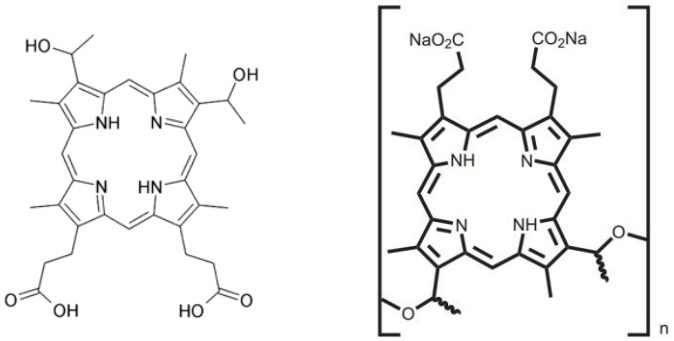
- ne pas être toxique à l'obscurité,
- ne pas se dégrader à la lumière et ne pas former des sous produits toxiques,
- de préférence se concentrer dans les cellules tumorales (présenter une bonne sélectivité tumorale),
- être soluble dans le solvant utilisé pour l'injection,
- être amphiphile (neutre) pour une meilleure pénétration dans les tissus cellulaires,
- avoir un fort coefficient d'extinction molaire,
- ne pas entraîner d'effets secondaires,
- ne pas s'agréger dans le milieu cellulaire (tissus sains),
- être rapidement éliminé de l'organisme,
- être synthétisable de manière reproductible en grande quantité et peu couteuse,
- être activable à une longueur d'onde appropriée,
- avoir un coefficient d'absorption fort dans la région rouge du spectre de la lumière pour une meilleure efficacité en PDT,
- être chimiquement pur,
- être stable vis-à-vis des enzymes circulantes afin d'atteindre les cellules tumorales,
- avoir un fort rendement quantique en oxygène singulet ($^1O_2$).

Depuis la découverte d'Oscar Raab en 1900, la recherche scientifique s'est penchée sur la synthèse de nouvelles molécules photosensibilsatrices (PS). Les PS utilisées en PDT se classent selon trois catégories physicochimiques pouvant expliquer leurs transports dans la circulation sanguine : les PS hydrophobes (cationique), les PS hydrophiles (anionique) et les PS amphiphiles (neutre). Les photosensibilisateurs hydrophobes se lient spécifiquement aux lipoprotéines de basse densité (LBD), responsables du transport du cholestérol vers le foie. Les PS hydrophiles se lient aux albumines, protéines du plasma sanguin produites par le foie. Les PS amphiphiles s'associent aux lipoprotéines de haute densité (LHD), responsables du transport du cholestérol vers les cellules.[36] Nous distinguons trois familles de molécules photosensibilisatrices utilisées en PDT et classées selon leur efficacité thérapeutique [35] :

- Les porphyrines
    - HpD (hématoporphyrine)
    - BPD (benzoporphyrine)
    - ALA (acide 5-aminolévulinique)
    - Texaphyrines
- Les chlorophylles
    - Chlorines
    - Purpurines
    - Bactériochlorines
    - Isobactériochlorines
- Les cyanines
    - Phthalocyanines
    - Naphthalocyanines

### *1.5.2 Photosensibilisateurs de première génération*

La première génération de molécules photosensibilisatrices approuvée en clinique est issue de dérivés d'hématoporphyrine (HpD), un mélange complexe de porphyrine et d'impuretés commercialisé sous le nom de Photofrin® (**Figure I.5**). L'hématoporphyrine (HpD) est un oligomère de porphyrine de 8 unités reliées entre elles par des liaisons éthers et ester.[37] L'HpD est obtenue à partir d'hémoglobine du sang par un traitement chimique associant un mélange d'acide sulfurique et d'acide acétique puis suivi d'un traitement avec une base (NaOH). Ces molécules photosensibilisatrices dîtes de première génération (HpD, Photofrin®) montrent des limites : après injection du photosensibilisateur, le patient doit rester dans l'obscurité pendant 4 à 12 semaines pour éviter un risque de photosensibilisation. [19] Le Photofrin® s'élimine lentement de l'organisme. De plus, ce dernier montre une faible sélectivité pour les cellules tumorales avec un risque d'effets secondaires sévères pour les tissus sains. En outre, le coefficient d'absorption maximal du Photofrin® se situe dans le bleu avec une bande très intense (bande de Soret) et quatre bandes de plus faible intensité allant du vert au rouge (bandes Q). En traitement clinique, la longueur d'onde d'excitation utilisée pour le Photofrin® ($\lambda_{exc}$= 630 nm) à une meilleure pénétration dans les tissus cellulaires (de l'ordre de 5 à 6 mm au lieu de 1à 3 mm pour une $\lambda_{exc}$ dans le bleu) même si le Photofrin® possède un faible coefficient d'absorption dans le rouge. Malgré les limites citées ci-dessus, les tests cliniques du Photofrin® ont été expérimentés entre 1993 et 2000 sur différents types de cancers comme celui de la vessie[38], de la peau[39], des poumons[40], du cerveau[41] et de l'œsophage[23].




hématoporphyrine Photofrin® n > 1

**Figure I.5.** Structure de l'hématoporphyrine (Hp) et du Photofrin®.

### *1.5.3 Photosensibilisateur de deuxième génération*

Aujourd'hui, la majorité des molécules photosensibilisatrices en cours d'étude clinique appartient à la deuxième génération. Elles ont été développées afin de pallier aux limites du Photofrin®. Elles possèdent une meilleure stabilité chimique, une faible toxicité en l'absence de lumière, un meilleur coefficient d'absorption dans le rouge (650 nm) que celles de la première génération de PS. La famille de photosensibilisateurs de deuxième génération utilisée en PDT concerne les porphyrines et ses dérivées comme les chlorines, les bactériochlorines et les cyanines.

Dans la famille des porphyrines, la Verteporfin® est un PS de deuxième génération ayant eu l'approbation de mise sur le marché (AMM) pour être commercialisée en Europe en 2000. La Verteporfin est un dérivé de la benzoporphyrine avec un coefficient d'absorption élevé à 690 nm. C'est un PS qui s'accumule et s'élimine rapidement de l'organisme. La Verteporfin est utilisée en ophtalmologie pour la DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge). Actuellement, elle est en phase II d'essai clinique pour les cancers cutanés.

Parmi les molécules photosensibilisatrices de deuxième génération, nous trouvons l'acide 5-aminolévulinique (ALA) commercialisé sous le nom de Levulan® ou Gliolan ®. En 2000 en France, cette molécule a reçu l'autorisation de l'AMM pour le traitement clinique de gliomes malins, de tumeurs de l'œsophage et de lésions cancéreuses de la peau. La molécule ALA, acide aminé naturel, utilisée seule n'a aucun effet en PDT. Elle est un précurseur de fabrication de la protoporphyrine (PpIX), un PS endogène impliqué dans le traitement par PDT. Le PpIX est l'intermédiaire de la biosynthèse conduisant à l'hème dont l'étape limitant est l'acide 5-aminolévulinique.[42] Afin de bloquer la fabrication de l'hème, une administration d'ALA exogène est ajoutée pour augmenter la fabrication de PpIX. L'utilisation de la molécule ALA comporte quelques inconvénients. Comme c'est une molécule hydrophile, son internalisation dans les cellules tumorales sera plus difficile. Son spectre d'absorption est similaire au Photofrin® et aura donc pour conséquence une faible absorption de la lumière rouge. Toutefois, la PpIX possède plusieurs avantages par rapport au PS de première génération (HpD, Photofrin®) : une clairance de l'organisme plus rapide avec pour conséquance une photosensibilité du patient moins longue (1 à 2 jours) et une meilleure sélectivité. Il existe une forme méthylée d'ALA (Me-ALA) utilisée pour le cancer de la peau par application topique (crème).[43] La **figure I.6** montre une photographie d'une cheville d'un patient atteint de la maladie de Bowen (cancer intra-épidermique). Après deux mois de

traitement avec la molécule ALA, la cheville du patient ne montre plus aucune scarification et une disparition totale des lésions rougeâtres observées.




**Figure I.6.** Patient atteint de la maladie de Bowen (A) avant traitement en PDT, (B) 2 mois après traitement en PDT avec l'acide 5-aminolévulinique.[43]

Dans la famille des cyanines, nous trouvons les Phthalocyanines et les Naphthalocyanines en présence d'ions métalliques comme le cuivre, le zinc ou l'aluminium. Ces PS possèdent de bons rendements quantiques en d'oxygène singulet ($^1O_2$). Les Phthalocyanines[44] et les Naphthalocyanines[45] sont en stade de phase clinique I et ne sont pas encore commercialisées (**Figure I.7**).

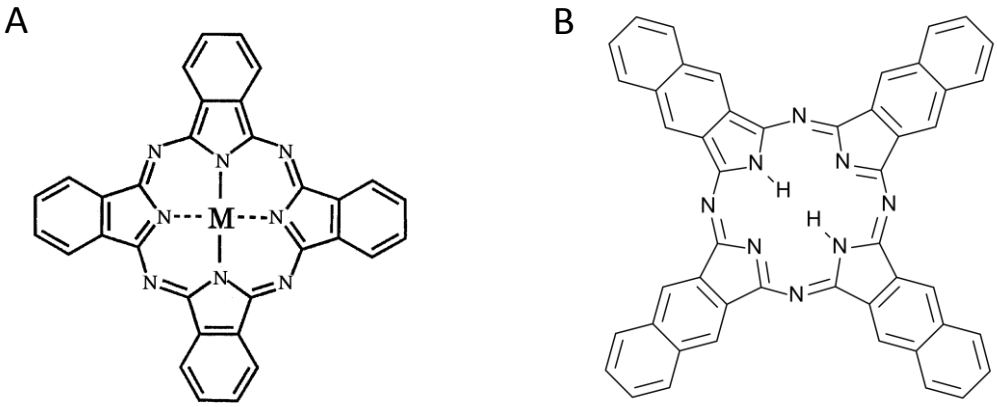
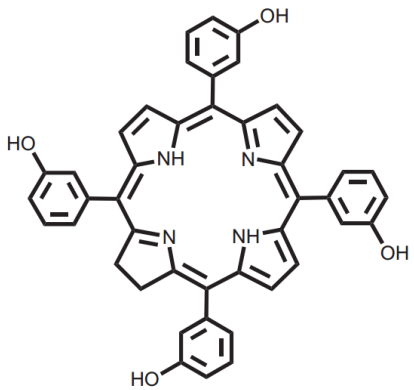



**Figure I.7.** Molécules photosensibilisatrices de deuxième génération, (A) phthalocyanines, (B) naphthalocyanines.

Dans la famille des chlorophylles, les chlorines diffèrent des porphyrines par la réduction d'un cycle pyrrolique. Les chlorines possèdent un fort coefficient d'absorption dans le rouge (650-690nm). Parmi cette famille de molécules, nous trouvons la chlorine e6[46], la mono-L-aspartyl chlorine e6 (Npe6)[47] et la meta-tetra(hydroxyphenyle)chlorine (m-THPC)[48] commercialisée sous le nom de Foscan® (**Figure I.8**) et utilisée en PDT. Le Foscan® est le dernier des photosensibilisateurs approuvé par des tests cliniques en 2001 dans l'Union Européenne. Il est utilisé pour le traitement palliatif des carcinomes épidermoïdes[49] de la tête et du cou[48], du cancer de la prostate[50] et des mélanomes. Le Foscan® est un PS qui présente de nombreux avantages par rapport au HpD ou au Photofrin®. Le Foscan® a un fort rendement quantiques en oxygène singulet ($^1O_2$), il permet de diminuer les doses médicamenteuses et il a une photosensibilité réduite de 2 à 4 semaines. Il est aussi photoactivable à une longueur d'onde de 652 nm comparé à 630 nm pour le Photofrin®, assurant ainsi une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus tumoraux. Cependant, le Foscan® est une molécule de nature hydrophobe très peu soluble en milieux aqueux, ce qui rend son administration difficile. Les purpurines sont le produit de dégradation de la chlorophylle. La purpurine est une molécule lipophile et possède un pic d'absorption UV-visible à 700 nm. Les bactériochlorines sont des molécules photosensibilisatrices avec un fort coefficient d'extinction molaire et qui absorbent la lumière à 740 nm. Ce sont des PS moins stables que les chlorophylles analogues du fait d'une éventuelle dégradation par oxydation et par photochimie.




Foscan®

**Figure I.8.** Structure chimique du Foscan®

### *1.5.4 Photosensibilisateurs de troisième génération*

Aujourd'hui, la recherche scientifique se concentre sur le développement d'une troisième génération de photosensibilisateurs associés à une molécule vectrice permettant de mieux cibler les cellules cancéreuses. Bien que les photosensibilisateurs de première et deuxième génération soient peu spécifiques pour les cellules tumorales, les photosensibilisateurs de troisième génération intègrent des molécules biologiques telles que les peptides[51], les sucres[52], les acides foliques[53], les œstradiols[54] ou les anticorps[55] pour améliorer le ciblage thérapeutique. La surexpression des récepteurs (œstrogènes, lectines) à la surface des cellules tumorales permet d'obtenir une meilleure affinité avec le photosensibilisateur par reconnaissance des molécules biologiques qui lui sont associées. De nombreuses molécules de troisième génération sont publiées dans des revues scientifiques, mais très peu d'entre elles ont reçu l'approbation pour des études cliniques.

## 1.6 La thérapie photodynamique biphotonique

Les photosensibilisateurs de première, deuxième et de troisième générations vus précédemment sont limités par leurs activations avec des longueurs d'onde relativement basses (450 nm) entraînant une faible pénétration de la lumière dans les tissus cellulaires (quelques millimètres) mais aussi un possible photovieillissement des tissus sains. L'utilisation de la lumière proche infrarouge est une approche prometteuse pour la PDT et l'imagerie biomédicale. L'excitation à 2-photons à l'avantage de permettre une résolution spatiale tridimensionnelle avec une résolution typique à l'échelle du micron, tandis que la combinaison avec une excitation dans le proche infrarouge permet une pénétration dans les tissus vivants plus importante, avec un traitement moins invasif qu'un traitement aux UV/ lumière visible.

L'absorption à deux photons (ADP) se caractérise par l'excitation d'une molécule générée par l'absorption simultanée de deux photons d'énergie identique ou différente. Lors du processus d'absorption, la molécule passe de son état fondamental à un état électronique de plus haute énergie. La différence d'énergie entre ces deux états est égale à la somme des énergies des deux photons. L'ADP a été théoriquement validée en 1930 par Maria Goeppert-Mayer, mais ce n'est qu'en 1961 que les premières mesures expérimentales sont réalisées grâce à l'apparition des premiers lasers à deux photons (laser Titane saphir).[56] L'ADP contrairement à l'excitation monophotonique implique l'absorption simultanée de deux photons d'énergie au lieu d'un photon d'énergie (**Figure I.9**).

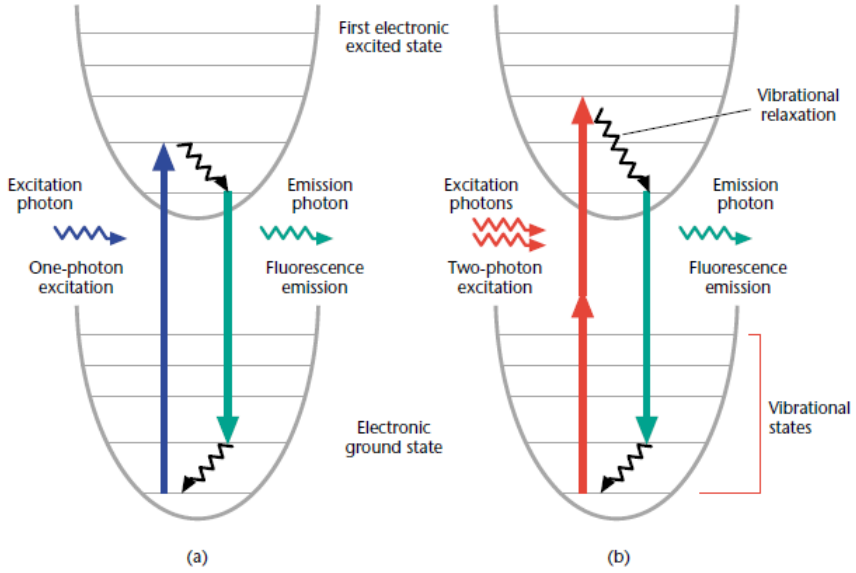



**Figure I.9.** Diagramme de Jablonski schématisant l'excitation mono et bi-photonique.[57]

Les avantages de la thérapie photodynamique biphotonique (**Figure I.10**) :

- Energie utilisée divisée par deux
- Utilisation d'une lumière dans le proche infrarouge (longueur d'onde plus élevée 750-950 nm) permettant une meilleure pénétration dans les tissus cellulaires (1 à 2 cm) (Figure 11.a)
- Meilleure résolution spatiale du faisceau (1 µm$^3$) permettant une irradiation localisée (**Figure I.10.b, 10.c**)

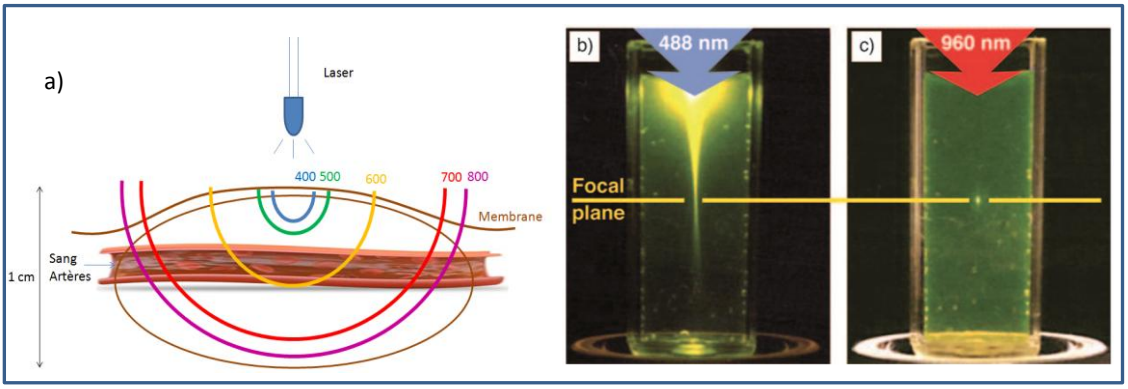



**Figure I.10.** Avantages de la thérapie photodynamique biphotonique. (a) Meilleure pénétration de la lumière dans les tissus suivant la longueur d'onde utilisée. (b, c) Comparaison entre un faisceau de lumière monophotonique (plus diffus) et biphotonique.[58]

Actuellement les recherches s'orientent vers l'élaboration de nouvelles molécules photosensibilisatrices avec des sections efficaces d'absorption à deux photons élevées. La section efficace d'absorption à 2-photons $\sigma_2$ exprimée en Goeppert-Mayer (1GM= $10^{-50}$cm$^4$.s.photon$^{-1}$) est une grandeur qui détermine l'efficacité de l'ADP d'un chromophore. Ces nouvelles molécules à section efficace élevée offrent de nouvelles perspectives pour la thérapie photodynamique. Elles permettront de traiter des tumeurs cancéreuses plus profondes avec l'utilisation de longueur d'onde comprise entre 700 et 950 nm.[59, 60] La première démonstration concluante en PDT biphotonique a été réalisée en 1997 par Watcher *et al.* Cette expérimentation porte sur l'utilisation du psoralène pour tuer des bactéries de la salmonella.[61] Récemment, plusieurs molécules photosensibilisatrices à base de porphyrine ont fait l'objet d'études approfondies en PDT biphotonique *in vitro* et *in vivo* (**Figure I.11**). Les avantages de la PDT biphotonique suscitent un intérêt particulier pour le traitement de cancers, difficiles à traiter, nos accessibles et/ou non opérables comme en neurologie et en ophtalmologie.[58] Ces nouveaux composés à section efficace à deux photons élevée représentent la première génération de molécules photosensibilisatrices pour la PDT biphotonique.[58] Une nouvelle méthode a été développée par Fréchet *et al.* qui consiste à attacher un chromophore à ADP sur un photosensibilisateur. Le chromophore donneur absorbe les deux photons puis transfère l'énergie absorbée par FRET (Förster Resonance Energy Transfer) au PS accepteur qui ensuite, génère de l'$^1O_2$.[62] Depuis cette découverte, de nombreux groupes de recherche ont greffés des chromophores à ADP sur des nanoparticules pour transférer l'énergie à un récepteur de type azobenzene et entraîner des relargages contrôlés de principes actifs.[63-65]

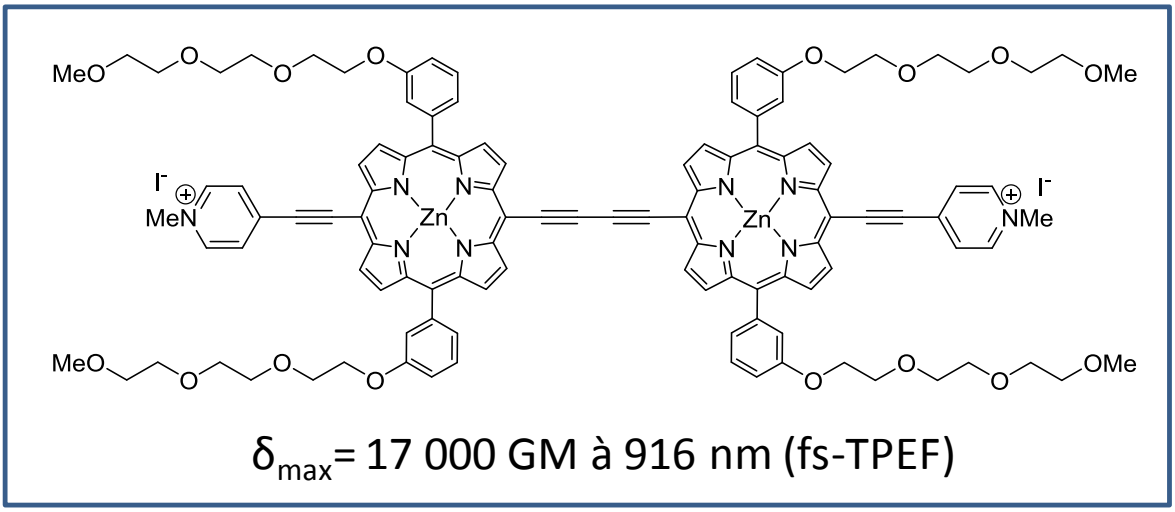



**Figure I.11.** Exemple d'une molécule utilisée en thérapie photodynamique biphotonique *in vitro* et *in vivo*.[66]

# 2. La thérapie génique pour le traitement du cancer

## 2.1 La thérapie génique

La thérapie génique suscite un grand intérêt dus à la multiplication des outils et des approches thérapeutiques. Initialement utilisée pour traiter des désordres génétiques, la thérapie génique permet aujourd'hui de traiter des maladies comme le cancer, l'arthrite, les maladies neurodégénératives et le sida.[67] Le premier essai de thérapie génique a été réalisé en 1990 aux Etats Unis chez une fillette souffrant d'un déficit immunitaire sévère dû à un gène défectueux, empêchant la fabrication d'une protéine normale ; ce défaut génétique a été corrigé en apportant la bonne version du gène. Pour cela, un transporteur était nécessaire, un virus rendu inoffensif et servant de vecteur pour internaliser le matériel génétique afin de réparer le génome. Par ailleurs le développement de la recherche scientifique dans le domaine de la génétique a permis de montrer que des maladies telles que le cancer du côlon, l'hémophilie, le diabète et le rétinoblastome étaient d'origine génétiques.[68] Aujourd'hui, environ 20 000 patients dans le monde ont bénéficié d'une thérapie génique dans le cadre de plus de 2000 essais cliniques. Dans cette partie, nous aborderons la thérapie génique comme autre thérapie prometteuse pour le traitement du cancer. Le cancer résulte d'une mutation ou d'une délétion d'un gène qui entraîne des désordres du métabolisme. En thérapie génique, les maladies sont traitées par l'intégration d'un acide nucléique exogène dans une cellule cible pour réparer l'ADN défectueux d'une cellule.[69] Si il faut toujours du temps, vingt ou trente ans, avant que n'émerge une thérapie innovante, l'avenir de la thérapie génique semble d'autant plus prometteur que de nouveaux outils devraient renforcer son efficacité comme l'étude sur les vecteurs viraux et non viraux. La thérapie génique reste porteuse d'espoir pour de nombreux malades.

Dans la première partie, nous décrivons le principe de la thérapie génique et des différents types de traitements des maladies, puis dans un deuxième temps, nous présentons l'utilisation de vecteurs viraux et non viraux pour la thérapie génique.

## 2.2 La thérapie génique comme approche thérapeutique

La thérapie génique est une stratégie thérapeutique qui consiste à transférer, avec ou sans vecteur, des acides nucléiques dans les cellules pour traiter une maladie d'ordre génétique. Les maladies génétiques sont causées par la mutation de cellules. Les acides nucléiques utilisés en thérapie génique sont souvent des ADNs (Acides DésoxyRibonucléiques) ou des ARNs (Acides Ribonucléiques). Les transferts d'acides nucléiques sont appelés transfection ou transduction. On appelle transfection, le processus de transfert de gènes, c'est-à-dire l'internalisation d'un d'acide nucléique exogène dans les cellules, non-médié par un virus, par opposition à la transduction. Au cours de ces dernières années, les études expérimentales montrent le fort potentiel de la thérapie génique dans le traitement de diverses maladies d'ordre génétique. Les maladies génique peuvent être monogéniques ou polygéniques. Les maladies monogéniques correspondent à l'altération d'un gène. Parmi ces maladies monogéniques, nous trouvons la mucoviscidose et les myopathies telles que la Dystrophie Musculaire Duchenne (DMD), maladie génétique musculaire mortelle provoquée par la mutation d'un gène de la dystrophie empêchant le maintien de la fibre musculaire. La thérapie génique est aussi utilisée pour traiter des maladies polygéniques dues à l'altération de plusieurs gènes. Parmi les maladies polygéniques, nous avons les maladies cardiovasculaires, l'arthrite rhumatoïde, les maladies auto-immunes, les pathologies du système nerveux central et les maladies d'origine virale (VIH).[67] La thérapie génique initialement utilisée pour le traitement de maladies monogéniques et polygéniques est étudiée depuis quelques années pour le traitement du cancer. Plusieurs approches sont développées pour stopper la prolifération de cellules cancéreuses : l'intégration d'un gène suppresseur de tumeur cancéreuse (gène p53) véhiculé par un adénovirus qui conduit à la mort de la cellule tumorale, ou l'utilisation de petits interférents d'ARN (siRNA) pour bloquer l'ARN messager, empêchant la traduction en protéines et stoppant ainsi la prolifération de la tumeur.

En thérapie génique, deux approches distinctes sont développées pour les transferts d'acides nucléiques. La première approche consiste à utiliser des vecteurs viraux parmi lesquels nous trouvons les virus adénoviraux, rétroviraux et adénoviraux associés.[68] Dans la deuxième approche, des vecteurs non-viraux, physiques ou chimiques sont utilisés.

### 2.3 Vecteurs viraux utilisés en thérapie génique

Les vecteurs viraux utilisés en thérapie génique représentent environ 65% des vecteurs utilisés pour les maladies génétiques et sont à l'origine des premiers succès, tandis que, les vecteurs non viraux ne représentent seulement que 22% des vecteurs actuellement utilisés. Afin d'optimiser l'efficacité des traitements les vecteurs viraux doivent remplir certaines conditions :

- être spécifiques des cellules cibles,
- résister aux dégradations (Enzyme DNAses),
- ne pas se disperser dans tout l'organisme,
- être non toxiques,
- ne pas générer d'effet secondaire (oncogenèse / réaction immunitaire)
- exprimer et conduire à une réponse thérapeutique efficace.

Les virus (rétrovirus, adénovirus, adéno-associés) sont parmi les vecteurs viraux les plus utilisés en thérapie génique notamment pour de la transfection cellulaire. Ces vecteurs viraux permettent une pénétration intracellulaire et la délivrance d'acides nucléiques pour soigner des tissus endommagés. La réplication virale naturelle se fait lors d'un processus comprenant plusieurs phases. D'abord la phase d'adsorption du virus à la membrane, suivie d'une phase d'internalisation permet la pénétration du virus. Ensuite, survient la phase de décapsidation qui peut se faire dans le cytoplasme ou dans le noyau et qui correspond à la libération de l'acide nucléique (génome viral), enveloppé dans une capside protéique (enveloppe qui entoure le génome viral). Il s'en suit une phase de réplication, c'est-à-dire l'intégration du génome viral dans la cellule, entrainant ainsi la libération de particules virales (virion). Au préalable, les virus utilisés pour la vectorisation d'acides nucléiques doivent subir des modifications génétiques pour ne pas présenter de risques pathogènes pour l'homme (virus recombinants). Les virus utilisés pour les protocoles cliniques sont rendus inaptes à la réplication grâce à la délétion (perte du matériel génétique sur un chromosome) d'une séquence qui est à l'origine de la virulence du virus. La délétion correspond à la suppression d'une région codante du génome viral sans avoir à toucher aux parties nécessaires pour l'intégration du matériel génétique dans la cellule cible. La cassette d'expression du génome virale (dépend du virus que l'on utilise) est alors intégrée dans le squelette viral à la place des délétions. Ce protocole va permettre la production de protéines d'intérêt thérapeutique. Parmi les vecteurs viraux étudiés dans le domaine de la thérapie génique, nous avons les rétrovirus, les adénovirus et les adénovirus-associés. Les vecteurs viraux sont classés selon deux

catégories : les rétrovirus qui intègrent leur patrimoine génétique à l'ADN de la cellule cible et les adénovirus et adénovirus associés qui n'intègrent pas leur patrimoine génétique à l'ADN de la cellule cible.

- Les rétrovirus sont les premiers virus à avoir été utilisés comme vecteur en thérapie génique. Ce sont des virus d'une taille de 80 à 120 nm, dotés d'une enveloppe contenant deux molécules linéaires d'ARN positif simple brin avec un génome de 7-11 kb.[68] Ils possèdent une enzyme virale la transcriptase inverse (TI), qui rétro-transcrit leur génome d'ARN en ADN pro-viral. Après internalisation du rétrovirus dans la cellule cible, l'ADN pro-viral est transporté dans le noyau.[70] Les rétrovirus ont l'avantage de pouvoir transférer le gène sur une longue période. Cependant, l'utilisation de rétrovirus comporte certaines limites et peuvent entraîner des complications. En effet par voie systémique, les protéines de l'enveloppe du rétrovirus sont capables de se lier à d'autres cellules et d'entraîner une faible spécificité devenant rapidement inefficaces. Mais il existe également des risques d'oncogenèse, c'est-à-dire des catégories de gènes dont l'expression favorise la venue de cancers par exemple dans le cas de la leucémie.
- Les adénovirus découverts et isolés en 1953 sont des virus à ADN linéaire double brin avec un génome de 26 à 40 kb qui ne possèdent pas d'enveloppe.[71, 72] Les adénovirus sont des particules d'un diamètre de 60 à 90 nm et sont parfaitement adaptés pour la thérapie génique. Le cycle viral de l'adénovirus dure entre 30 à 36 heures. Ce cycle viral se divise en deux phases : une première phase précoce qui correspond à l'attachement et à l'entrée du virus par endocytose dans la cellule cible. Puis une deuxième phase qui correspond à une migration du génome viral vers le noyau sans intégrer le patrimoine génétique de la cellule cible. Les adénovirus ont des avantages : ils sont capables de se répliquer et d'avoir une très grande efficacité de transfection cellulaire, ils sont faciles à produire et peu pathogènes, ils ont la capacité de délivrer des fragments d'ADN de 36 kb contrairement à 11 kb pour le rétrovirus et ils peuvent transfecter différents types de cellules. L'utilisation des adénovirus peut conduire à des complications : il existe des risques élevés d'inflammation qui entraînent des réactions immunogènes. De plus, les cellules cibles développent des anticorps anti-adénovirus empêchant ainsi l'administration du vecteur viral.
- Les virus adéno-associés sont des petits virus à ADN avec un génome de 3.5 kb. Ces virus nécessitent l'intervention d'autres virus pour accomplir le cycle de réplication. Les adénovirus-associés ont l'avantage d'être des virus non pathogènes, d'avoir une

bonne capacité d'intégration de leur patrimoine génétique dans la cellule cible et une efficacité pour la transfection cellulaire. Cependant, les adénovirus-associés montrent des limites. Il est difficile d'en produire en grande quantité et de les stocker, de plus ils ne peuvent délivrer qu'un matériel génétique exogène de 5kb.

On constante que le vecteur viral idéal n'existe pas. Malgré des résultats satisfaisants de transfection cellulaire, son utilisation est donc remise en cause car les vecteurs viraux ont montré leurs limites. Les vecteurs viraux peuvent être immunogènes, mutagènes, oncogènes et entraîner des recombinaisons puis il est difficile d'en produire en grande quantité et de les stocker.[73]

### 2.4 Vecteurs non viraux utilisés en thérapie génique

Les techniques de transfert de gènes avec utilisation de vecteurs non viraux ont été développées pour pallier aux inconvénients des vecteurs viraux. Ils existent deux techniques de transfection cellulaire à partir de vecteurs non-viraux: les techniques de transfection cellulaire dîtes physiques et les techniques de transfection cellulaire dîtes chimiques. L'injection hydrodynamique, la microinjection, l'électroporation, la biolistique (gène gun) et les ultrasons (sonoporation) sont des techniques de transfection cellulaire physique. Elles requièrent l'utilisation d'une force physique afin d'augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire et de faciliter l'introduction du matériel génétique dans la cellule cible. Les techniques de transfection cellulaire dites chimiques seront abordées dans la partie 3.3 Nanoparticules (vecteur non viraux) utilisées pour le transfert de gènes.

**Vecteurs non viraux physiques**

- L'injection hydrodynamique est une technique utilisant l'injection d'une solution contenant de l'ADN. Cette injection de solution d'ADN entraîne une pression hydrodynamique et par conséquent la perméabilité de la membrane de la cellule.[74] Elle peut se faire par voie intraveineuse ou par voie intra-artérielle. Des recherches ont été menées sur l'injection hydrodynamique chez la souris pour transporter de l'ADN plasmidique et transfecter des cellules hépatocytes (cellules de foie).[75]
- La microinjection est une technique utilisant une micropipette de verre pour introduire par pression hydrostatique le matériel génétique dans le cytoplasme ou le noyau de la cellule. Cette technique est plutôt facile mais contraignante car elle nécessite de traiter les cellules une par une.

- L'électroporation est une technique de transfection cellulaire physique qui consiste à appliquer un champ électrique pour modifier la perméabilité de la membrane et d'introduire l'ADN dans la cellule. Au préalable, une intervention chirurgicale est nécessaire pour mettre en contact des électrodes avec les tissus à traiter. L'électroporation développée dans les années 1960 est réalisée expérimentalement pour la première fois en 1982 pour la transfection de cellules eucaryotes.[76] Avec des paramètres optimisés, l'électroporation peut être aussi efficace que les vecteurs viraux pour la transfection cellulaire. L'électroporation est une technique invasive et toxique pouvant causer des dommages irréversibles aux tissus dû à un voltage élevé. Il est aussi très difficile de faire des transfections cellulaires d'organes internes et cette technique a souvent recours à la chirurgie.[77]
- La biolistique ou canon à ADN pour « Gene Gun », en anglais est une technique de transfert direct de gènes dans une cellule, utilisée pour la première fois en 1987 pour du transfert de gènes sur des cellules végétales.[78] Le procédé de la biolistique utilise des microparticules d'or, d'argent ou de tungstène enrobées de molécules d'ADN qui sont bombardées à une très grande vitesse sur la cellule cible afin de transpercer la membrane biologique (quelques millimètres) et de délivrer l'acide nucléique.[79] Les microparticules ont une taille de l'ordre de 1 µm. Grâce à leur petite taille elles peuvent facilement pénétrer les cellules. Lors d'expériences, plusieurs paramètres peuvent entrer en ligne de compte : la pression en gaz, la taille et la composition des microparticules mais aussi la fréquence (répétition de l'expérience). La biolistique est une technique utilisée chez l'homme pour le transfert de gènes au niveau de la peau, des muscles et des tumeurs cancéreuses.[79] Les avantages de la technique biolistique sont qu'elle ne nécessite pas l'utilisation de produits toxiques (chimique, biologique), que l'expérience peut être récurrente, que les fragments d'ADN peuvent être de taille variable et qu'elle ne nécessite pas de récepteur.[80] Cette technique biolistique montre une limite : une faible transfection cellulaire.
- La sonoporation est une technique utilisant des ultrasons et des microbulles de gaz. Les microbulles de gaz et l'ADN nu sont injectés dans la cellule cible. Les ultrasons entraînent une oscillation des microbulles de gaz dans la cellule. Ces microbulles de gaz forment des pores dans la membrane, par lesquels l'ADN nu est acheminé dans la cellule. Nahsida *et al.* ont utilisé des microbulles de gaz de phospholipide combinées avec des ultrasons pour délivrer des acides nucléiques.[81]

Les techniques de transfection cellulaire physiques sont faciles à mettre en œuvre et peuvent être récurrentes. Cependant, comme les vecteurs viraux, les techniques de transfection cellulaire physiques souffrent de certains inconvénients : elles peuvent entraîner des dommages aux niveaux des tissus cellulaires, sont faiblement efficaces en transfection cellulaire avec une intégration aléatoire du génome.[82] Nous présentons dans la partie 3.3 le rôle des vecteurs non-viraux chimiques qui consiste à utiliser des nanoparticules pour le transfert de gènes.

# 3. Les nanoparticules pour le traitement du cancer

## 3.1 La nanomédecine

L'utilisation de nanomatériaux, aux propriétés particuliéres, est prometteuse pour des applications thérapeutiques et pour le traitement de différents types de maladies (cancers, VIH, pathologies du système nerveux). Un grand nombre de molécules à des fins thérapeutiques souffrent des limitations suivantes : toxicité, incapacité à franchir les barrières biologiques, instabilité, hydrophobie. L'utilisation des nanomatériaux comme nanovecteurs de molécules thérapeutiques a pour but d'améliorer les efficacités thérapeutiques tout en diminuant les doses administrées et les effets indésirables de certains principes actifs sur les patients.

Une multitude de nanomatériaux a été décrites dans la littérature pour leur utilisation comme vecteurs de molécules thérapeutiques. Idéalement le rôle du nanovecteur est de transporter, protéger et délivrer le principe actif de manière ciblée. Les nanomatériaux développés ont une taille comprise entre 50 et 250 nm, ils peuvent être fabriqués à partir de matériaux organiques ou inorganiques, adoptent différentes formes (sphères, nanobâtonnets, étoiles, cubes). Certains d'entre eux offrent des propriétés physiques intéressantes (conductivité électrique, magnétisme, photoluminescence). Le caractère hydrophobe de certains anticancéreux (camptothécine, doxorubicine, paclitaxel) et de PS empêche leur administration et leur circulation sanguine. Des études démontrent que l'utilisation de nanomatériaux permet de franchir les membranes biologiques (endothélium vasculaire) et d'atteindre les tumeurs cancéreuses, c'est ce qu'on appelle l'effet EPR (Enhanced Permeation Retention) (**Figure I.12**).[83]L'effet EPR se localise au niveau de la zone tumorale. On observe une réaction inflammatoire due à l'arrivée des macrophages et à la libération de cytokines. Cette inflammation entraîne la perméabilité des tumeurs consécutive à un mauvais drainage lymphatique que l'on ne retrouve pas sur des tissus non cancéreux. Alors, par diffusion les nanoparticules vont s'accumuler dans la zone tumorale.

La nanomédecine avec l'utilisation de nanoparticules comme nanovecteurs thérapeutiques offre également l'espoir de pouvoir traiter des maladies pathologiques du système nerveux, tels que les gliomes, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. En particulier, la barrière hémato encéphalique sélective constitue un obstacle considérable pour le passage des principes actifs. L'utilisation de nanoparticules est très étudiées pour favoriser le franchissement de la barrière hémato-encéphalique pour les maladies pathologiques du système nerveux.

Les nanoparticules à usage thérapeutique devront présenter les caractéristiques suivantes : [84]

- être de petite taille (50-250 nm) pour profiter de l'effet EPR,
- être non-toxiques et biodégradables en sous-produits non toxiques,
- avoir une surface spécifique et une capacité de chargement importante,
- offrir des possibilités simples de modification chimique de surface (être fonctionnalisables),
- éventuellement, être détectables par imagerie.

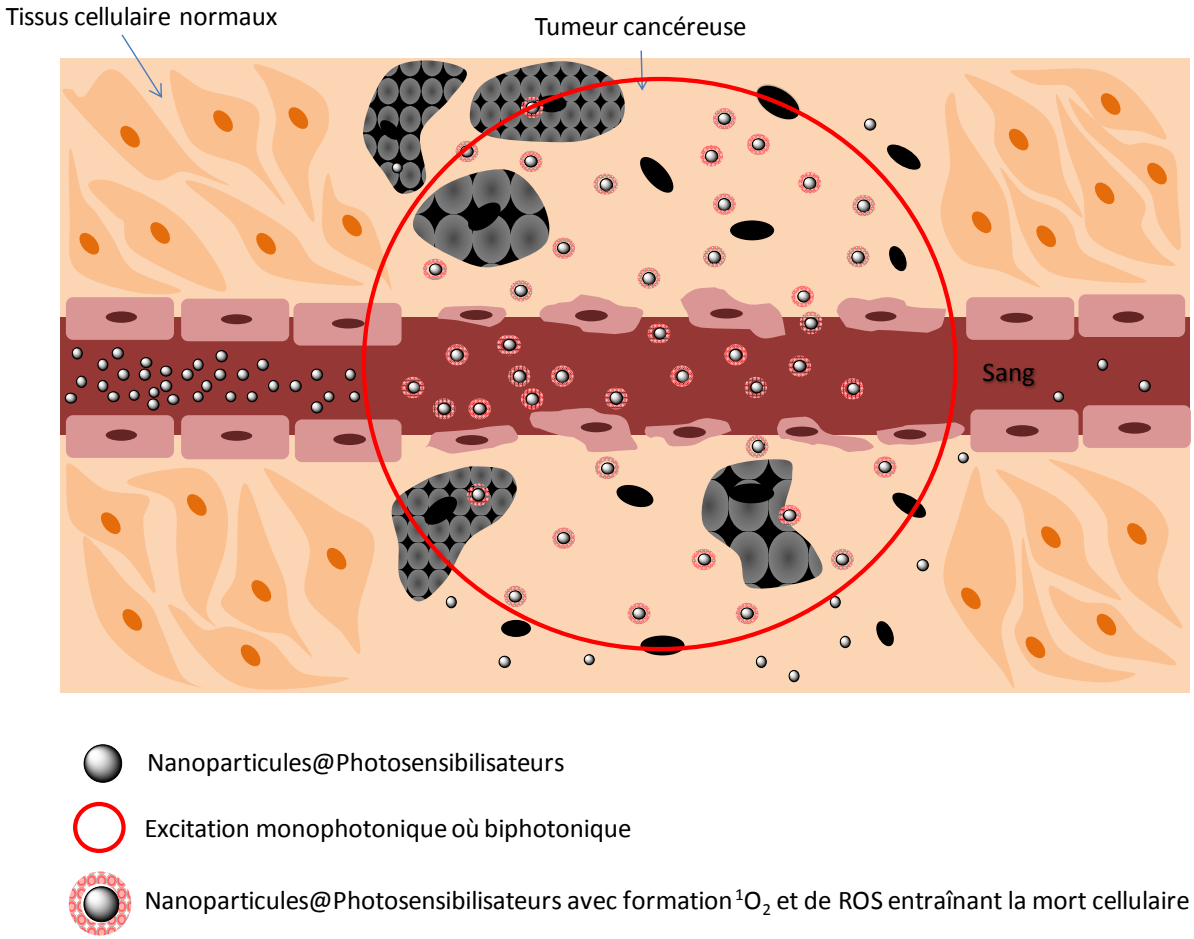



**Figure I.12.** Schéma expliquant l'effet EPR.

### 3.2 Les générations de nanovecteurs

Il existe trois générations de nanovecteurs, classées en fonction de leur niveau de sophistication et de leurs fonctionnalités. (**Figure I.13**).

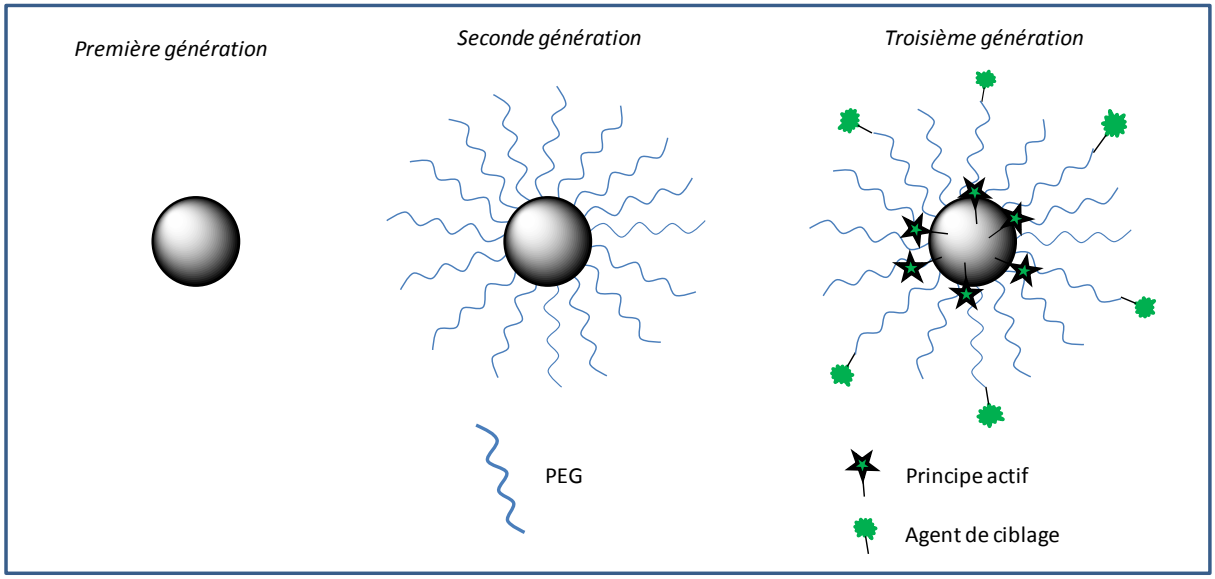



**Figure I.13.** Représentation schématique des trois générations de nanoparticules pour la vectorisation d'anticancéreux.

- ***Nanoparticules de première génération***

Les nanoparticules dites de première génération n'ont aucune molécule greffée à leur surface et ne sont pas capables de cibler spécifiquement une tumeur cancéreuse. Identifiées comme corps étranger dans la circulation sanguine, ces nanoparticules de première génération sont rapidement recouvertes par des opsonines plasmatiques et éliminées de la circulation par le système réticulo-endothélial.

- ***Nanoparticules de deuxième génération***

Les nanoparticules de deuxième génération se distinguent par leurs principes de furtivité. Elles sont recouvertes de polymères (polyéthylènes glycol : PEG) qui forment une couche de protection à la surface des nanoparticules. Elles sont capables de circuler plus longtemps dans le sang sans être détectées par les cellules phagocytaires. La PEGylation des nanoparticules augmente leur temps de demi-vie dans la circulation sanguine donc leurs chances d'atteindre et de s'accumuler dans la tumeur cancéreuse par l'effet EPR. Dans ce cas présent, il s'agit de ciblage passif. Le ciblage actif, quant à lui correspond à la troisième génération de nanoparticules.

- ***Nanoparticules de troisième génération***

Les nanoparticules de troisième génération sont recouvertes d'une couche de polymère et greffées d'une molécule ou d'un agent de ciblage (acide folique[85, 86], anticorps[87], sucres[88] ou peptides[89]). Ces nanoparticules de troisième génération avec leurs agents de ciblage sont capables de reconnaître spécifiquement les récepteurs surexprimés à la surface des tumeurs cancéreuses. Les cellules cancéreuses sont caractérisées par la surexpression de récepteurs membranaires pouvant être différents suivant le type de cancer. Ces récepteurs membranaires sont peu ou pas présents sur les cellules saines. Les nanoparticules de troisième génération ou nanoparticules dites actives sont capables de circuler dans le sang plus longtemps sans être détectées par les macrophages et sont capables de mieux cibler les tumeurs cancéreuses grâce aux agents de ciblage. Elles peuvent délivrer et accumuler une plus grande quantité de principe actif grâce au ciblage et à l'effet EPR.

### 3.3 Nanoparticules pour la vectorisation de photosensibilisateurs

Comme nous l'avons évoqué dans la première partie du chapitre 1, la PDT est un traitement prometteur de certains types de cancers. Toutefois, il existe encore des inconvénients à son utilisation. Malgré l'affinité de certains agents photosensibilisateurs vis-à-vis des tumeurs, une grande majorité des PS est de nature hydrophobe, ce qui rend difficile leur administration par voie intraveineuse. Les molécules photosensibilisatrices, qu'elles soient de première, seconde ou troisième génération s'agrègent dans la circulation sanguine et les tissus sains, ce qui peut avoir pour conséquence de diminuer l'effet thérapeutique sur la tumeur, et de provoquer des effets secondaires sur le patient. Différents types de nanovecteurs ont été décrits dans la littérature pour l'encapsulation des PS.

#### *3.3.1 Nanoparticules organiques utilisées pour la PDT*

Certaines nanoparticules organiques utilisées en thérapie photodynamique, ont l'avantage d'être biodégradables et potentiellement biorésorbables. Parmi ces nanovecteurs, nous trouvons les nanoparticules de polymères naturels (chitosanes[90], alginates[91], cyclodextrines[92], dextran[93], et l'albumine[94]) et les nanoparticules de polymères synthétiques poly (acide glycolique) PGA, poly (acide lactique)[95] PLA, poly (lactide-co-glycolide)[96] PLGA. Certains des photosensibilisateurs de seconde génération sont testés avec des nanoparticules de PGA, PLA et PLGA approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) pour être utilisées sur l'homme.[97] Ces nanoparticules de polymères peuvent se structurer de différentes manières : en micelles, en nanosphères ou en nanocapsules (**Figure I.14**).

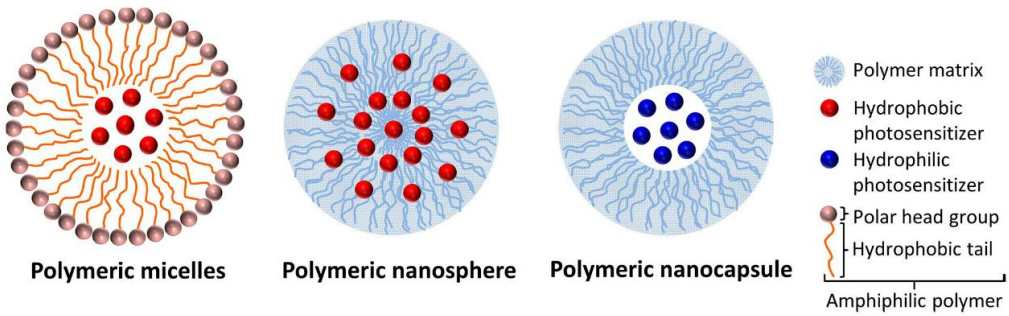



**Figure I.14.** Nanoparticules de polymères biodégradables encapsulant des photosensibilisateurs.[98]

- ***Micelles***

Les micelles sont des nanoparticules auto-assemblées d'une taille de 10 à 100 nm. Elles sont constituées d'une coquille de molécules amphiphiles, d'une tête hydrophile dirigée vers l'extérieur et d'une queue hydrophobe orientée vers le compartiment aqueux. Les micelles se forment en solution si la concentration en molécules amphiphiles dépasse un seuil connu, la concentration micellaire critique (CMC). Les micelles sont des nanoparticules intéressantes car elles sont faciles à synthétiser et il est possible, grâce au compartiment aqueux d'encapsuler des photosensibilisateurs hydrophiles.

- ***Nanosphères***

Les nanosphères polymériques sont des nanoparticules polymériques colloïdales avec une struture solide. Elles forment un réseau poreux ou dense, elles peuvent être synthétisées à partir de polymères ou de copolymères. Les nanosphères polymériques ont été développées pour la premiére fois en 1976 avec du polyacrylamide (PAA).[99] Parmi les nanosphères polymériques les plus connues et utilisées en nanomédecine, nous trouvons les poly-(alkyl cyanoacrylate) (PACA) et PLGA, de compositions chimiques biodégradables et biocompatibles.[100] Ces nanosphères sont utilisées dans différents types d'applications notamment en thérapie photodynamique pour la vectorisation de PS. Des études montrent que le PS peut être incorporé dans la matrice de la nanosphère polymérique durant la synthèse ou greffé à sa surface. Lors de la dégradation de la nanosphère de polymère à l'intérieur de l'organisme, le relargage du PS de la nanosphère se fait par simple diffusion vers l'extérieur. Il peut y avoir aussi relargage par simple diffusion dans la matrice de polymère, sans qu'il y ait dégradation du polymére.

- ***Nanocapsules***

Les nanocapsules sont des nanoparticules de polymères biodégradables. Elles forment une vésicule constituée d'une paroi de polymère dont l'épaisseur ne dépasse pas quelques nanomètres et d'un cœur huileux ou aqueux. Le photosensibilisateur se situe dans le réceptacle huileux de la nanocapsule mais peut aussi se retrouver physisorbé ou lié de manière covalente sur la surface.

Ces différentes structures de nanoparticules polymériques s'accompagnent de l'encapsulation d'une grande quantité de molécules photosensibilisatrices. Elles ont démontré leurs efficacités pour le ciblage de tumeurs cancéreuses et ont confirmé, lors d'expériences *in*

*vivo,* leurs bons profils pharmacocinétiques. Ces bons résultats s'expliquent par leurs petites tailles, leurs charges de surface, leurs morphologies et de leur hydrophobie.[101-103]

- ***Liposomes***

Les liposomes ont été découverts en 1965 par Bangham *et al.* et furent les premiers nanovecteurs à avoir été utilisés en nanomédecine comme vecteurs de principes actifs.[104] Le liposome est une vésicule constituée d'une ou de plusieurs bicouches de phospholipides et de compartiments aqueux. Les liposomes sont des nanoparticules biodégradables qui présentent une bonne affinité allant jusqu'à fusionner avec les membranes cellulaires de même composition. Dans le cas de la PDT, le photosensibilisateur hydrophobe s'insère dans les bicouches phospholipidiques et le photosensibilisateur hydrophile est encapsulé dans le cœur aqueuse de la vésicule.[105] Parmi les nanomédicaments déjà sur le marché en PDT, l'un d'entre eux le visudyne® utilisé en clinique, est le résultat de l'encapsulation dans un liposome d'un photosensibilisateur de deuxième génération le verteporfin®, un dérivé de la benzoporphyrine.[106] Les inconvénients des liposomes sont leur faible capacité d'encapsulation et leur instabilité qui a pour conséquence un relargage prématuré du principe actif.[107]

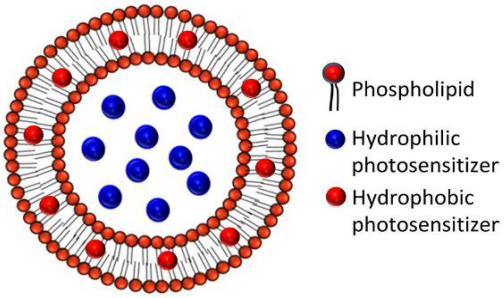



**Figure I.15.** Encapsulations de molécules photosensibilisatrices dans les liposomes.[98]

### *3.3.2 Nanoparticules inorganiques utilisées pour la PDT*

Les nanoparticules inorganiques font l'objet de nombreuses études en thérapie photodynamique. Parmi les nanoparticules inorganiques nous trouvons :

Les nanoparticules de silice mésoporeuses (MSN) qui sont des nanovecteurs produits en quantité et faciles à préparer. Les caracteréristiques physico-chimiques des MSN font d'elles un matériau remarquable. Les MSN sont des nanoparticules de petites tailles comprises entre 50 et 250 nm, constituées d'une porosité structurée en nid d'abeille, d'une surface spécifique importante avec la possibilité de modifier la surface avec différents groupes fonctionnels en y greffant des agents de ciblage ou des photosensibilisateurs. Par exemple les MSN permettent une forte capacité de chargement en anticancéreux grâce à leur porosité. Elles sont actuellement étudiées pour du diagnostic, de l'imagerie et de la thérapie *in vitro* et *in vivo*, délivrance contrôlée de principes actifs, vectorisation de PS, etc...[108-110] Les PS peuvent être encapsulés comme l'ont suggéré Prasad et Kopelman, pionniers dans ce domaine. En 2003, Kopelman et son équipe ont encapsulé le foscan®, un photosensibilisateur de deuxième génération dans des nanoparticules de silice.[111] Mou et son équipe quant à eux, ont greffé aux nanoparticules de silice mésoporeuses, par liaison covalente, un photosensibilisateur, la protoporphyrine (PpIX) pour traiter des cellules cancéreuses du sein (MCF-7).[112] Plus récemment, les travaux de recherche de Hocine *et al.* ont porté sur la fonctionnalisation d'une porphyrine sur des MSN pour traiter des cellules cancéreuses du sein (MCF-7). Les résultats obtenus se sont avérés probants et s'expliquent par la présence d'un agent de ciblage greffé « mannose-phényle-squarate » sur les MSN améliorant l'endocytose et par conséquent aboutissant à une meilleure efficacité du traitement PDT.[65] Par la suite, d'autres travaux ont été réalisés avec l'utilisation de différents photosensibilisateurs.[113, 114] Actuellement, les nanoparticules de silice mésoporeuses font l'objet d'étude en thérapie photodynamique biphotonique avec le greffage de molécules à absorption à deux photons (ADP).[63, 115]

Parmi les nanovecteurs étudiés, nous trouvons également les nanoparticules d'or, qui suscitent un intérêt en particulier pour l'imagerie, la thérapie photothermique et la thérapie photodynamique. En général, les nanoparticules d'or sont utilisées pour la thérapie photothermique car sous irradiation, elles conduisent à une augmentation locale de la température entraînant la mort des cellules cancéreuses.[116] Les nanoparticules d'or peuvent être aussi employées pour la vectorisation de PS en PDT. En 2002 l'équipe de D. Russel a été la première à stabiliser des nanoparticules d'or avec un PS (C11*Pc* phthalocyanine). Ces

nanoparticules d'or ont servi pour des tests *in vitro* sur des mélanomes avant d'être transplantées sur des souris pour des tests *in vivo*.[117] Ces résultats ont mis en évidence que le complexe nanoparticule d'or-C11*Pc* est capable de cibler les cellules cancéreuses du mélanome (cellule B78H1) et de générer plus efficacement la mort des tumeurs cancéreuses que le PS (C11*Pc*) libre. D'autres travaux ont porté sur la fonctionnalisation de différents PS (ALA,[118] phthalocyanine de silicium (*Pc*4),[119] porphyrine-brucine,[120] m-THPC[121]) sur les nanoparticules d'or pour des essais en PDT sur différentes lignées cellulaires.

Les nanoparticules d'oxydes de fer sont constituées de petites particules de maghémite ($Fe_2O_3$) et magnétite ($Fe_2O_4$) de quelques nanomètres de diamètres. Ces nanoparticules d'oxydes de fer ont des propriétés physicochimiques intéressantes (optique, conductivité, magnétisme) et sont utilisées comme agents de contraste pour l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et pour de l'hyperthermie.[122] Elles sont classées en deux catégories : les USPION (Ultrasmall Super Paramagnetic Iron Oxyde Nanoparticle) avec une taille inférieure à 50 nm et les SPION (Super Super Paramagnetic Iron Oxyde Nanoparticle) avec une taille supérieure à 50 nm. Les nanoparticules d'oxyde de fer font l'objet d'étude en PDT et peuvent être encapsulées dans des matrices de silice, de polymères (PAA) ou de polysaccharides facilitant le greffage de PS.[123, 124]

Les nanotubes de carbone sont des structures cylindriques de quelques nanomètres de diamètre à base de graphène. Ils présentent des propriétés physiques et chimiques intéressantes et sont également capables de convertir la lumière absorbée en chaleur. Des études ont proposé l'utilisation de nanotubes de carbone en thérapie photothermique et en PDT.[125, 126]

Les matériaux hybrides métal-organique ou MOF (Metal organic framework) sont des nanovecteurs hybrides, composés d'éléments métalliques et d'une structure organique connectés entre eux. Ils ont une grande porosité offrant une bonne capacité d'encapsulation en photosensibilisateurs. Ils sont actuellement étudiés pour des traitements du cancer en PDT.[127]

### *3.3.3 Nanoparticules aptes à générer de l'$^1O_2$*

Il existe des nanoparticules qui ont la spécificité de se comporter comme des molécules photosensibilisatrices. Certaines d'entre elles, après irradiation transforment l'oxygène triplet en oxygène singulet ($^1O_2$) et en espèces réactives de l'oxygène (ROS) permettant leurs utilisations en PDT. Parmi ces nanoparticules, nous avons les nano-cristaux semi-conducteurs appelés Quantums dots (CdSe, CdTe, CdS et ZnSe) intéressants pour leur fluorescence.[128, 129] Sauf que, ces Quantum dots sont pourvus d'un faible rendement quantique en oxygène singulet et qu'ils sont très toxiques.[130-132] A noter que, des nanoparticules d'oxyde de titane, de zinc ($TiO_2$, ZnO) et de Fullerènes ont par ailleurs l'aptitude à générer de l'$^1O_2$ et des ROS.[98]

D'autre part, les nanoparticules de silicium poreux synthétisées à partir de silicium cristallin sont biorésorbables et étudiées en PDT pour leur capacité à produire de l'$^1O_2$.[133, 134] Dans le chapitre 2 et 3 « Du silicium aux nanoparticules de silicium poreux, Préparation des nanoparticules de silicium poreux », nous présentons la méthode de préparation des nanoparticules de silicium poreux ainsi que les avantages de ces nanoparticules.

## 3.4 Nanoparticules utilisées pour le transfert de gènes

L'utilisation de nanoparticules ou de vecteurs non viraux s'est imposée ces dernières années comme une nouvelle stratégie prometteuse en thérapie génique. Depuis 1995, les vecteurs non viraux chimiques font l'objet de tests cliniques notamment pour le traitement de différents cancers et représentent 10 % des essais en thérapie génique. Un des axes principaux de la recherche en transfert de gènes porte sur la préparation de nanoparticules. L'utilisation de ces nanoparticules permet de véhiculer des acides nucléiques afin de stopper la prolifération des tumeurs cancéreuses. Les nanoparticules confèrent de nombreux avantages en thérapie génique. D'une part, ces nanoparticules faiblement cytotoxiques conduisent rarement à des réactions immunitaires et d'autre part, ces nanoparticules peuvent se produire en grande quantité et à moindre coût contrairement aux vecteurs viraux. Les nanoparticules doivent être des composés chargés positivement (présence d'amines) et former avec l'ADN chargé négativement (groupement phosphate) des complexes électrostatiques. De part leur composition, les nanovecteurs offrent une protection à l'acide nucléique grâce à son encapsulation ou à son adsorption à la surface de la nanoparticule évitant ainsi les dégradations causées par les enzymes (DNAses).[135] Parmi les nanoparticules organiques utilisées en transfection cellulaire, nous avons : les lipoplexes (lipides+ADN), les polyplexes (polymères cationiques+ADN), les dendrimères et les nanoparticules de polymère.

### *3.4.1 Vecteurs non viraux chimique pour le transfert de gènes*

La **figure I.16** représente l'acheminement d'un vecteur non viral chimique cationisé condensé avec un acide nucléique, un siRNA (petit ARN interférent) pour stopper la prolifération des cellules cancéreuses. Le nanovecteur est internalisé dans la cellule cancéreuse par endocytose. Cette nanoparticule complexée avec le siRNA est transportée par un endosome dans le cytosol suivie d'un échappement endosomal.[136] L'échappement endosomal correspond à l'entrée massive de base faible à l'intérieur des endosomes acides. A pH endosomal (pH<6) les amines des polymères cationiques ou acides aminés greffés sur les nanoparticules inorganiques se protonent et neutralisent les protons induits par les endosomes grâce une ATPase spécifique. L'augmentation d'ions $H^+$ au sein des endosomes est contrebalancée par l'influx d'anions chlorure ($Cl^-$) dans les vésicules. Ce phénomène va conduire à une augmentation de la concentration ionique dans l'endosome. Après neutralisation des protons, un phénomène de gonflement osmotique entraîne la déstabilisation de la membrane libérant progressivement le siRNA dans le cytosol.[137] Les siRNA libérés se lient spécifiquement à l'ARNm et bloquent la traduction en protéines et stoppent la prolifération de cellules cancéreuses, c'est ce que l'on appelle le Complexe RISC (pour : RNA-Induced Silencing Complex). L'efficacité d'un nanovecteur en transfection cellulaire dépend essentiellement de sa capacité à s'extraire des endosomes. Pour cela, des nanoparticules ont été greffées avec des acides aminés «histidine» ou des polymères cationiques «PLL, PEI » et « poly-L-arginine» pour donner des nanoparticules cationisées.[138-141] Celles-ci contiennent des amines protonables induisant une déstabilisation de la membrane et facilitant l'échappement endosomal du matériel génétique.[142-144] Ce phénomène s'accroît en présence d'histidine grâce à son noyau imidazole protonable à pH endosomal (pH<6). Les recherches de Midoux *et al.* ont confirmé que le greffage d'histidine sur la PLL favorise l'efficacité de la transfection cellulaire par rapport à la PLL greffée sans histidine.[145]

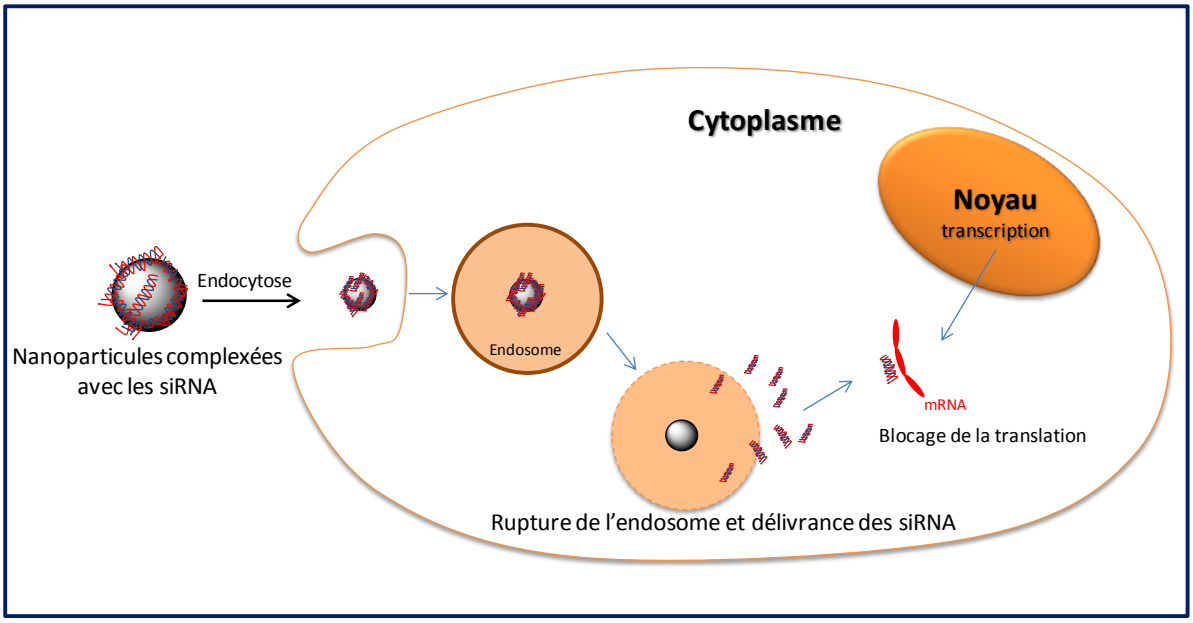



**Figure I.16.** Représentation schématique adaptée de Yezhelyev *et al*. avec l'entrée du complexe nanoparticules$^{+}$@siRNA(@=association) dans la cellule cible, échappement endosomal, capture du siRNA, chargement du siRNA induisant le complexe RISC (pour : RNA-induced silencing complex), destruction de la cellule cible.[137]

Dans le domaine de la thérapie génique, il existe une autre méthode qui emploie des nanoparticules cationisées et qui condense à sa surface un plasmide d'ADN pour le transférer dans le noyau de la cellule. Le passage de l'enveloppe nucléaire est un obstacle difficile à franchir et représente une contrainte en transfection cellulaire. Lors de la division cellulaire, la membrane nucléaire se déchire et laisse les plasmides d'ADN, présents dans le cytoplasme, entrer dans le noyau de la cellule. D'après les travaux de Cohen *et al.* seulement 1 à 10% des plasmides d'ADN, présents dans le cytoplasme, franchissent l'enveloppe nucléaire pour se retrouver dans le noyau.[146] Ces résultats s'avèrent être de faible efficacité pour la transfection cellulaire. Afin d'y remédier, des peptides NLS (signal de localisation nucléaire) ou des séquences d'ADN (DTS nuclear targeting sequence) sont ajoutés aux plasmides d'ADN afin d'améliorer l'efficacité en transfert de gènes.[147, 148]

### *3.4.2 Nanoparticules organiques pour le transfert d'acides nucléiques*

- ***Les lipoplexes***

Les lipoplexes sont des vésicules lipidiques composés d'une ou plusieurs bicouches de lipides polycationiques mélangés à un ADN polyanionique. Le lipoplexe est composé de trois parties, une tête polaire facilitant la complexation avec l'acide nucléique *via* les interactions électrostatiques, d'un groupe espaceur et d'une ou plusieurs chaînes hydrophobes (acides

gras). Radler *et al.* ont été les premiers à observer que les lipoplexes présentent une structure particulière dans laquelle l'ADN s'intercale entre les bicouches lipidiques.[149] Les lipoplexes adoptent différents types d'auto-assemblage (micelles, bicouches, liposomes, phase lamellaire, phase hexagonale, phase éponge, phase cubique) qui dépendent de la concentration, de la température ou des lipides utilisés. Voici une énumération des principaux lipides cationiques utilisés pour la transfection cellulaire d'acides nucléiques *in vitro* et *in vivo* : le 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (DOPE), 2,3-Dioléoylloxypropyl-1-trimethyl ammonium bromide (DOTMA), N-méthyl-4-(dioleyl)méthylpyridinium (SAINT-2) et 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP).[150]

- ***Les polyplexes***

Les polyplexes résultent d'une association entre un acide nucléique et un polymère cationique par interaction électrostatique. Les principaux polymères cationiques utilisés en transfection cellulaire sont : la poly(L-Lysine) (PLL)[151], la polyéthylènimine (PEI)[152], les dendrimères cationiques Poly(amidoamine)[153]. D'après des études, il est constaté que l'augmentation du poids moléculaire de la PLL ou de la PEI favorise une meilleure complexation et transfection cellulaire d'acides nucléiques. En revanche la PLL et la PEI présentent une certaine cytotoxicité.[154, 155]

- ***Les nanoparticules de polymères***

Précédemment vues dans la partie PDT, les nanoparticules de polymères ont donné de bons résultats si bien qu'elles suscitent un certain intérêt pour le transfert de gènes, sachant qu'elles sont également biodégradables et biocompatibles. Leur petite taille comprises entre 50 et 200 nm leur permettent de franchir les barrières biologiques offrant une meilleure internalisation et protection du matériel génétique (acides nucléiques) qu'elles transportent. Les principaux polymères utilisés pour de la transfection cellulaire sont des copolymères d'acide lactique et glycolique (PLGA)[156], les polymères d'acide polylactique (PLA)[157], les polyméthacrylates[158], les poly(β-aminoester) (PBAE)[159]. Le point fort de ces nanoparticules de polymères est de pouvoir encapsuler le matériel génétique ou de le complexer sur la surface des nanoparticules via l'association de molécules cationiques (polymères cationiques ou surfactants cationiques).[160] Plusieurs travaux publiés aux cours de ces dernières années montrent que les nanoparticules de polymères du type PLA ou PLGA associées à des molécules cationiques ou polymères cationiques augmentent la transfection cellulaire *in vitro* comme *in vivo*.[157] Les travaux de recherche de Wong *et al.* et de Kim *et al.* mettent en avant de meilleurs résultats en transfection cellulaire lorsque l'acide nucléique est complexé sur la

surface des nanoparticules que lors d'une encapsulation. Ces résultats s'expliquent par un relargage plus rapide du matériel génétique.[135]

### *3.4.2 Nanoparticules inorganiques pour le transfert d'acides nucléiques*

Les nanoparticules inorganiques servent de vecteurs non viraux pour la transfection cellulaire, c'est-à-dire la vectorisation d'acides nucléiques. Parmi ces nanoparticules inorganiques, nous trouvons les nanoparticules de silice mésoporeuses (MSN), les nanoparticules d'or, les nanoparticules d'oxyde de fer et les Quantums dots. Grâce à leurs propriétés physicochimiques et texturales, elles répondent parfaitement à l'utilisation pour du transfert de gènes. Comme pour les nanoparticules organiques, les acides nucléiques peuvent être encapsulés dans la porosité ou complexés sur la surface des nanoparticules via le greffage de molécules cationiques ou de polymères cationiques.

Les MSN sont des nanoparticules facilement fonctionnalisables avec une forme et une structure variable. Elles s'adaptent parfaitement à l'utilisation en transfection cellulaire. Plusieurs travaux publiés, portent sur le greffage d'acides aminés (Histidine, lysine, arginine….), de dendrimères et de polymères cationiques (PLL, PEI)[139, 141, 161] sur les MSN. Par ailleurs, Radu *et al* pionniers avec l'utilisation des MSN pour la transfection cellulaire, se ont fonctionnalisé celles-ci avec des polyamidoamines de dendrimères, et ensuite complexer un plasmide d'ADN pour transfecter des cellules Hela et neural gliale (cellules qui forment l'environnement des neurones) (**Figure I.17**). Plus tard ce même groupe de recherche a rapporté la transfection de protoplaste.[162]

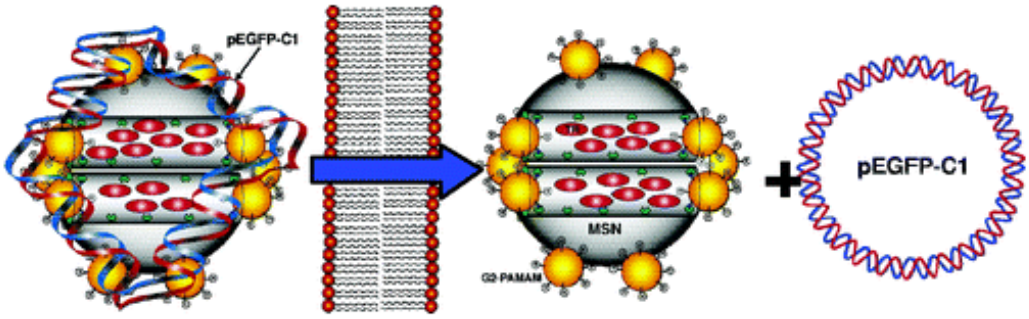



**Figure I.17.** Représentation schématique d'un vecteur non viral (nanoparticules de silice mésoporeuses greffées avec un dendrimère) pour la complexation d'un pDNA.[162]

Brevet *et al.* se sont appuyés sur différents travaux notamment ceux de Radu *et al.* et de Midoux *et al.* Leurs recherches ont porté sur des MSN greffées dans un premier cas avec un aminopropyltrietoxysilane (APTES) « MSN-$NH_2$ » et dans un deuxième cas avec un acide

aminé (L-histidine) lié de manière covalente « MSN-Hist » (**Figure I.18**). Dans les deux cas cités ci-dessus les MSN obtenues possèdent une surface cationisée facilitant la complexation avec un plasmide d'ADN. Ces travaux ont montré que les MSN-Hist avaient une meilleure transfection cellulaire que les MSN-$NH_2$ sur des cellules HEK293T7 (Human embryonic Kidney). Ces résultats s'expliquent par la présence d'un groupe imidazole facilitant l'échappement endosomal des pDNA.

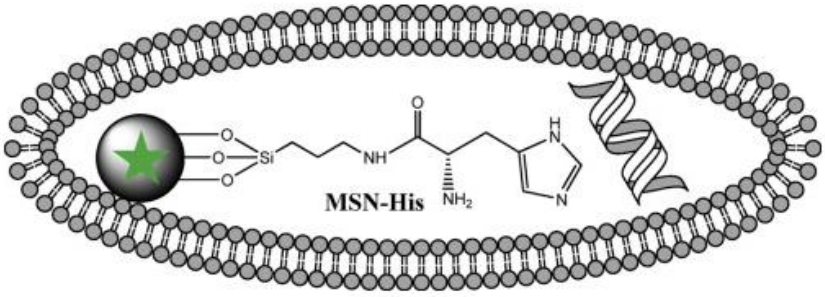



**Figure I.18.** Complexation d'un plasmide d'ADN sur une nanoparticule de silice mésoporeuse fonctionnalisée avec un acide aminé (L-histidine).[138]

D'autres groupes de recherche ont concentré leurs travaux sur l'association entre des MSN et des polymères cationiques (PLL, PEI) formant des complexes et pouvant être liés de manière covalente ou électrostatique. Les résultats obtenus en transfection cellulaire sont positifs mais ces complexes présentent une certaine cytotoxicité. Récemment, des chercheurs ont réussi à incorporer des siRNA ou ADN dans la porosité des MSN et ont mis en évidence une bonne efficacité en transfection cellulaire *in vitro* comme *in vivo*.[163-165] Il existe une multitude de vecteurs non viraux inorganiques comme les nanoparticules d'or[166], les nanoparticules d'oxyde de fer[167] et les Quantums dots[137, 168] qui font l'objet d'étude de recherche en transfection cellulaire.

En résumé, les vecteurs non viraux chimiques ont un futur prometteur de part leur capacité à protéger, à délivrer des acides nucléiques dans les cellules tumorales. Néanmoins ces vecteurs non viraux souffrent d'une limitation liée à une faible transfection cellulaire par rapport aux vecteurs viraux. Une approche pour y remedier est d'utiliser des agents de ciblage (anticorps, sucres, peptides) capables de cibler directement les cellules cancéreuses dans le but de transférer une plus grande quantité d'acides nucléiques pour accroître la transfection cellulaire.

## 4. Conclusion

Dans ce premier chapitre, nous avons exposé une étude bibliographique sur la thérapie photodynamique et la thérapie génique comme traitement du cancer. Puis nous avons vu l'utilisation de la nanomédecine comme approche intéressante pour améliorer l'efficacité des thérapies présentées. Nous aborderons dans les chapitres 2 et 3 le silicium poreux et la préparation des nanoparticules de silicium poreux.

# Chapitre 2 : Le silicium poreux

Le silicium est un élément chimique de la famille des cristallogènes, de symbole Si et de numéro atomique 14. Il dispose de la même configuration électronique de valence que le carbone [Ne] $3s^2$ $3p^2$. C'est un élément tétravalent avec une structure de type diamant ou blende (maille : cristal cubique face (CFC) centré dont quatre des huit sites tétraédriques sont occupés). Le silicium est le principal constituant de l'écorce terrestre en poids (27.8 %) après l'oxygène (46.6 %). Le silicium n'existe pas dans la nature à l'état pur, on le trouve sous forme de silice ($SiO_2$) ou de silicates (Feldspaths, Kaolinite). Dans le corps humain, il est présent sous forme d'acide silicique.

Le silicium est un semi-conducteur intrinsèque de type IV, il présente des propriétés de conduction à des températures élevées ou dans le cas d'un dopage. Le dopage des semi-conducteurs consiste à ajouter des impuretés (atome avec un électron en moins ou en plus dans leur couche de valence) en petites quantités à une substance pure pour modifier ses propriétés de conductivité. Lorsque le silicium est pur ou possède très peu d'impuretés, il dispose des qualités d'un semi-conducteur parfait, c'est-à-dire sans défaut structurel ou sans impureté chimique. Cependant un semi-conducteur réel n'est jamais parfaitement intrinsèque mais il peut s'en rapprocher comme le silicium monocristallin. Le silicium peut être dopé de deux façons : le dopage N (négativement) ou le dopage P (positivement). Le dopage N consiste à augmenter la densité en électrons dans le semi-conducteur, pour cela on y ajoute des atomes riches en électrons. Dans le cas du silicium, les atomes de silicium ont 4 électrons de valence. Pour le dopage de type N, on ajoute des atomes ayant 5 électrons de valence comme le phosphore (P), l'arsenic (As) ou l'antimoine (Sb) dont la conduction est assurée par ces électrons supplémentaires. Le dopage de type P quant à lui consiste à augmenter la densité en trous (lacunes électroniques) dans le semi-conducteur. Pour cela, on inclut un certain nombre d'atomes pauvres en électrons pour créer un excès de trous. Dans le cas du silicium, on introduit un atome trivalent, le bore (B). L'atome de bore avec ses trois électrons de valence forme avec le silicium trois liaisons covalentes avec ses quatre voisins laissant un trou dans la structure. Ce trou est rempli par un électron donné par un atome de silicium voisin, déplaçant ainsi le trou. La conduction est alors assurée par les lacunes électroniques ainsi générées.

Mes travaux de thèse m'ont conduit à travailler et à utiliser des wafers de silicium de type $P^{++}$, silicium dopé avec des atomes de bore (1 atome de bore pour 1000 atomes de silicium) d'une résistivité de 0.8 à 1.2 mΩ.cm et d'une orientation cristalline <100>.

# 1 Dissolution anodique

## 1.1 Silicium poreux

Dans le milieu des années cinquante, dans le laboratoire de Bell, Uhlir découvre accidentellement le silicium poreux, en développant une machine d'usinage électrochimique de wafer de silicium pour des applications en microélectronique. Il découvre qu'en utilisant des conditions électrochimiques appropriées, des pores se forment dans le silicium et se propagent suivant la direction <100> du wafer.[169] Toutefois, ce n'est qu'en 1966 que Memming et Schwandt prouvent la nature poreuse du silicium.[170] Il faudra attendre la fin des années 1980, pour que le silicium poreux connaisse un réel essor. Lorsque deux équipes de recherche indépendantes découvrent simultanément que le silicium poreux présente des propriétés physiques intéressantes. La première équipe, Lehmann et Gosele montrent que le silicium poreux possède des effets de confinement quantique et la deuxième équipe, de L. Canham, montre que le silicium poreux révèle des propriétés de photoluminescence.[171, 172] Dès lors, le silicium poreux a attiré l'attention pour des applications dans différents domaines de recherches comme la microélectronique, l'optoélectronique, la chimie et la biologie. La première étude *in vivo* du silicium poreux est réalisée dans le milieu des années 90 par L. Canham. Cette étude a prouvé la biocompatibilité et la biodégradabilité du silicium poreux.[173] Après la découverte de L. Canham, le silicium poreux a suscité de nombreuses études pour des applications dans le domaine biomédical.

## 1.2 Montage électrochimique

La réaction de dissolution anodique se réalise avec une solution électrolytique d'acide fluorhydrique (HF) dans l'éthanol absolu. Le montage se fait avec une cellule en téflon, matière résistante à l'HF (**Figure II.1**). Le wafer de silicium tient le rôle de l'anode. Le contact électrique se fait grâce à une plaque d'aluminium placée sous le wafer de silicium. Le montage de la cellule terminé, celle-ci est remplie de la solution électrolytique d'HF : EtOH. A ce stade, un fil de platine, la cathode, est immergé dans la solution HF : EtOH. Au moyen d'un générateur, un courant électrique est appliqué et conduit à la dissolution du silicium. L'utilisation de l'éthanol offre une meilleure mouillabilité de la surface du wafer hydrophobe, car cette surface est recouverte d'oxyde quand ils sont stockés à l'air. En présence d'HF l'utilisation de l'éthanol facilite le transport de l'HF au sein des pores et permet d'obtenir une couche poreuse plus uniforme.

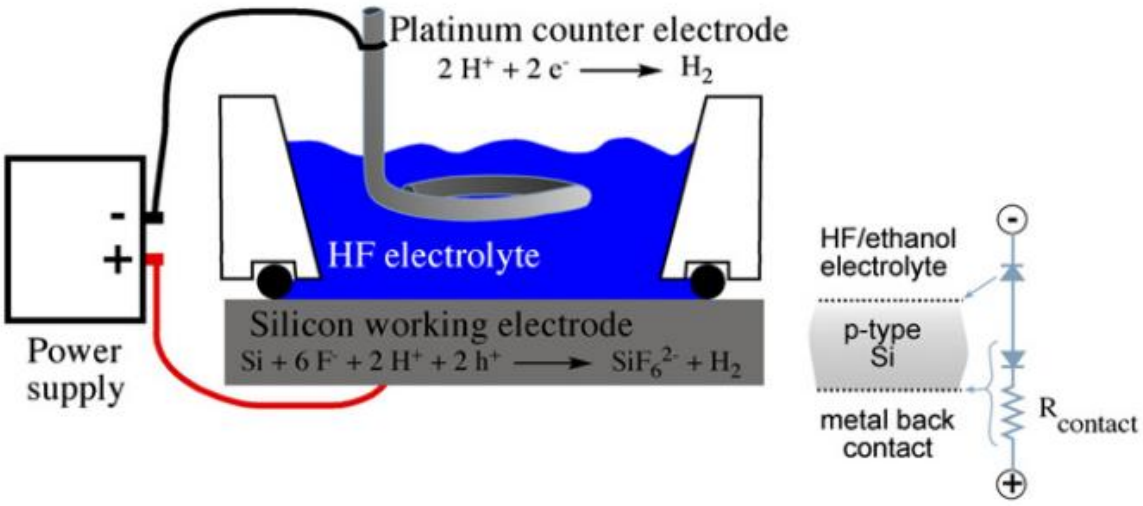



**Figure II.1.** Schéma de la cellule de gravure électrochimique.[174]

## 1.3 Mécanisme de gravure électrochimique

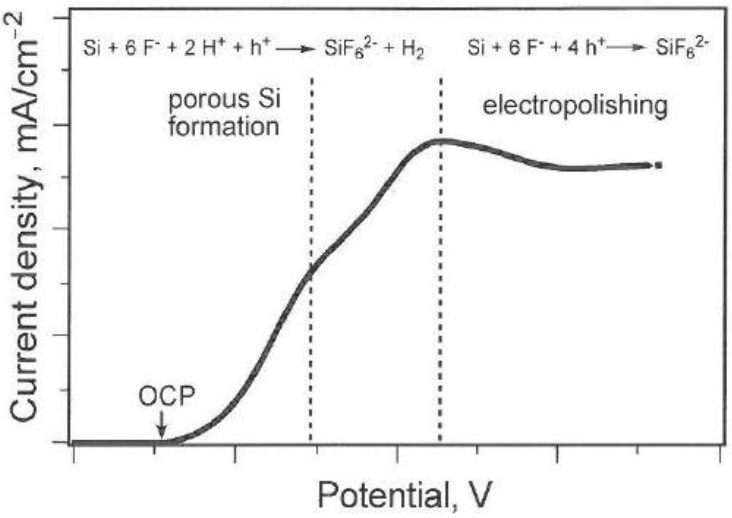



**Figure II.2.** Profil de densité de courant en fonction du potentiel lors de la gravure électrochimique du silicium dans une solution d'acide fluorhydrique. Cette courbe a été réalisée lors de l'anodisation de silicium de type p dans une solution à 1% HF.[175]

Le mécanisme prédominant dans la zone de fabrication du silicium poreux est un mécanisme à deux électrons. La réaction électrochimique se produit à l'interface entre le silicium et la solution électrolytique et elle se définit par l'équation (1) :

(1) $Si + 6F^- + 2H^+ + 2h^+ \longrightarrow SiF_6^{2-} + H_2$

Réaction à l'anode : oxydation du silicium $Si + 6F^- + 2h^+ \longrightarrow SiF_6^{2-} + 2e^-$

Réaction à la cathode : réduction des protons $2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$

Lors de la réaction électrochimique, les $h^+$ représentent les lacunes électroniques. Dans le cas du dopage P, les atomes de bore présents dans la structure assurent la présence des lacunes électroniques. Comme dans le cas du dopage N, la présence du phosphore ne suffit pas, la surface du wafer est éclairée avec une lumière d'énergie suffisante et, à faible courant, les pores se forment par génèration des paires électron-trou.[176] La **figure II.3** représente le mécanisme de formation du silicium poreux par dissolution anodique proposé par Lehmann et Gosele.[171]

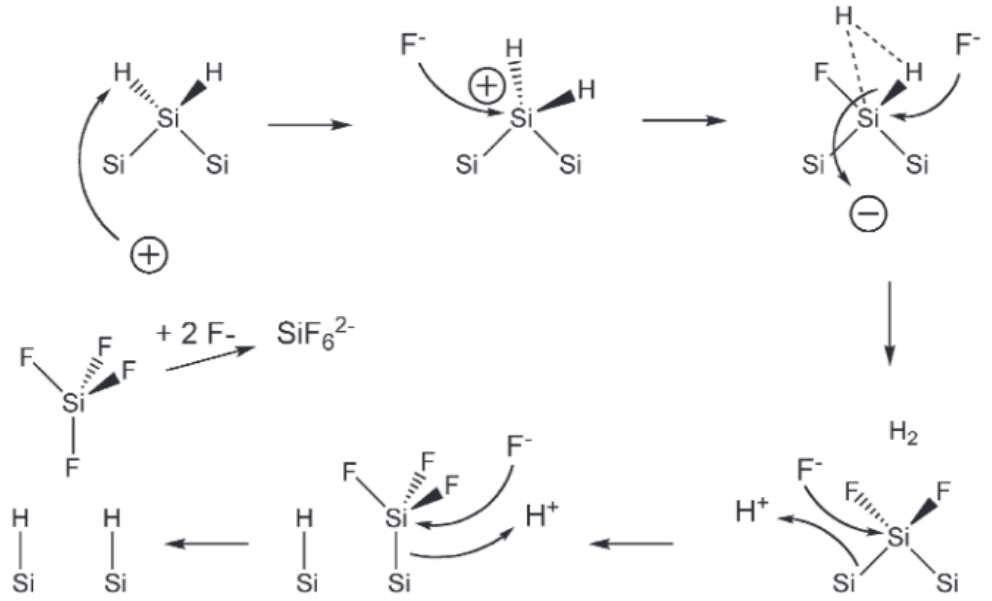



**Figure II.3.** Mécanisme de formation du silicium poreux par dissolution anodique.[171]

Lors de l'application du courant, les ions fluorures de l'acide fluorhydrique attaquent les espèces hydrures du silicium Si-H. Cette réaction forme des liaisons Si-F et libère du dihydrogène. Ces attaques successives de $F^-$ entraînent la formation d'espèces $SiF_4$ et $SiF_6^{2-}$. Ces espèces formées, solubles dans la solution HF : EtOH permettent l'ouverture de la porosité.

Le mécanisme prédominant dans la zone d'électrodissolution est un mécanisme à 4 électrons, défini par l'équation (2) :

(2) $Si + 4h^+ + 6F^- \longrightarrow SiF_6^{2-}$

Ce mécanisme intervient lorsque les ions $F^-$ ne sont plus capables d'atteindre le silicium à la surface du wafer. Ce mécanisme se produit lorsque la concentration de la solution d'acide fluorhydrique est trop faible ou quand le courant appliqué est trop élevé. Les atomes de silicium sont alors rapidement oxydés, leur oxydation empêche toute attaque par les ions fluorures $F^-$ et laissent la place aux molécules d'eau qui agissent en tant que nucléophiles. Il y a donc formation de liaison Si-O par manque de $F^-$. Cet oxyde ne peut être dissout, la couche isolante termine la croissance des pores. Les atomes de silicium sont retirés de façon isotrope et le film de silicium poreux se décolle du substrat du silicium cristallin.

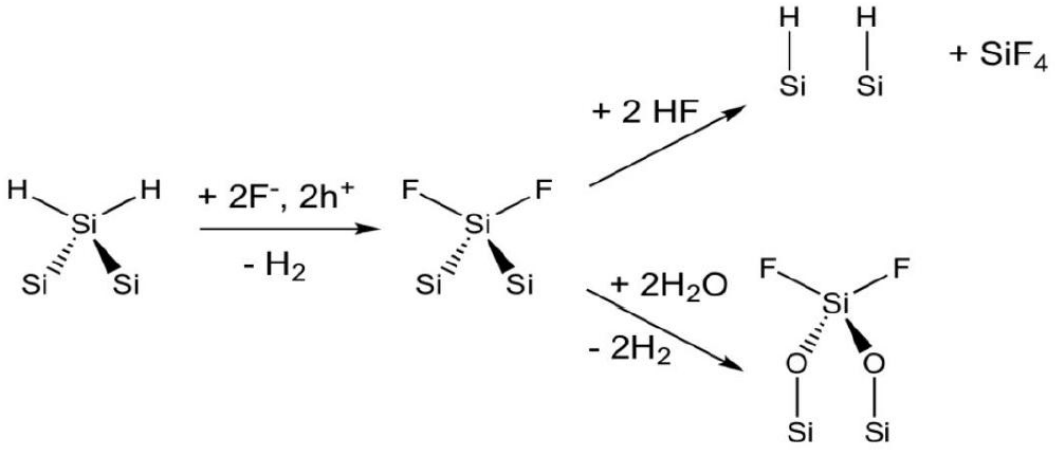



**Figure II.4.** Mécanisme de l'électrodissolution du silicium poreux.[171]

### 1.4 Stain etching

Le stain etching est une technique alternative à la gravure électrochimique. Cette gravure est employée pour la fabrication de poudre de silicium poreux, le courant utilisé pour la gravure électrochimique est remplacé par un oxydant chimique tel que l'acide nitrique $HNO_3$.[177] Pour le stain etching, l'emploi de l'acide fluorhydrique est nécessaire pour former la porosité du matériau. Les porteurs de charges sont apportés par la réduction de l'agent oxydant par le silicium. Le procédé de stain etching s'utilise avec des wafers de silicium de type P ou N. C'est une technique intéressante, car elle représente moins de danger que la gravure électrochimique pour laquelle, des courants élevés sont utilisés. Le stain etching permet de produire une plus grande quantité de matériaux poreux que la gravure électrochimique.

### 1.5 Gravure photochimique

La gravure photochimique est un procédé qui nécessite une irradiation lumineuse. Dans ce procédé, les photons génèrent des paires électrons-trous entraînant la formation d'une porosité dans le silicium cristallin.

# 2. Caractéristiques et propriétés du silicium poreux

## 2.1 Morphologie

Le silicium poreux peut adopter différentes morphologies. La porosité du silicium poreux peut se contrôler en fonction du type de dopage du wafer, de la concentration en acide fluorhydrique et de la densité de courant appliquée.[175] En fonction du temps de gravure, il est possible de faire varier l'épaisseur des films de silicium poreux. Suivant les conditions de gravure, le diamètre des pores du silicium poreux est variable. Il est ainsi possible d'obtenir :

- Des micropores avec une taille inférieure à 2 nm
- Des mésopores d'une taille comprise entre 2 et 50 nm
- Des macropores avec une taille supérieure à 50 nm

Dans ces travaux de thèse, nous avons utilisé du silicium de type $p^{++}$ dopé au Bore avec une résistivité < 1mΩ.cm , orienté dans la direction <100>. Durant l'anodisation électrochimique, les pores se propagent de façon anisotrope dans la direction <100>. Les mésopores sont formés avec des wafers de silicium dopé de type $p^{+}$, $p^{++}$ ou $n^{+}$. Cependant, les wafers de silicium de type $p^{++}$ ou de type n peuvent, suivant les conditions de gravure, former des macropores. Tandis que les micropores sont obtenus avec du silicium de type p peu dopé. A dopage et composition en électrolyte équivalentes la taille des pores augmente lorsque la densité de courant appliquée augmente. Il est également possible de former des structures périodiques multicouches en profondeur dans le silicium poreux en modulant de manière périodique la densité de courant pendant la gravure électrochimique. La porosité périodique obtenue entraîne une modification périodique de l'indice de réfraction en profondeur ce qui confère des propriétés optiques de réflectivité particulières au film de silicium poreux.

## 2.2 Propriétés optique du silicium poreux

### *2.2.1 Interférométrie optique*

Les films de silicium poreux ont des propriétés de réflectivité optique, due à des interférences de Fabry-Pérot. Les interférences sont produites entre les faisceaux de lumière réfléchis à l'interface air/silicium poreux et à l'interface silicium poreux/silicium cristallin. La lumière réfléchie à chaque interface interfère pour former des franges d'interférence dans le spectre de réflectivité optique.

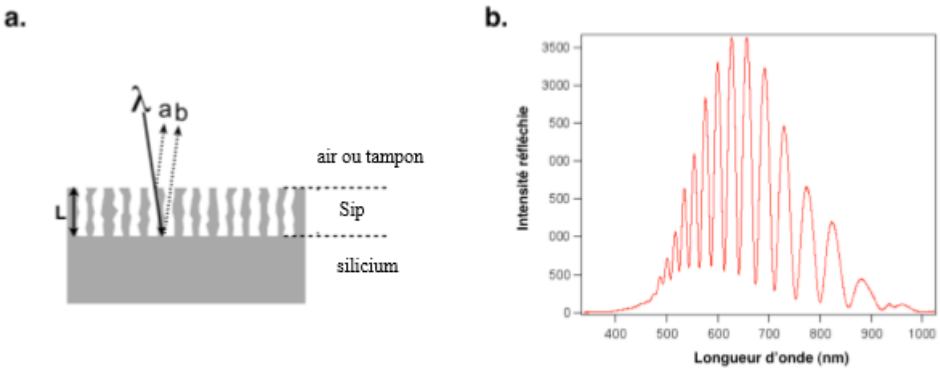



**Figure II.5. a**. Schéma des faisceaux de lumière réfléchis aux deux interfaces air/silicium poreux et silicium poreux/silicium cristallin ; **b**. Spectre d'interférences d'un film de silicium poreux.

La relation de Fabry-Pérot ($m\lambda=2nL$ avec m : ordre spectral, $\lambda$ : longueur d'onde, n : indice de réfraction, L : épaisseur du film poreux) décrit la position des maxima et des minima de réflectivité sur le spectre d'interférence. L'indice de réfraction n est un indice moyen entre l'indice de réfraction du silicium et celui du milieu remplissant les pores. L'encapsulation de molécules dans la porosité du silicium poreux conduit à un changement d'indice de réfraction n détectable par un déplacement des franges d'interférence dans le spectre de réflectivité optique (**Figure II.6**). Ces propriétés optiques du silicium poreux ont été exploitées pour le développement de capteurs et de biocapteurs.

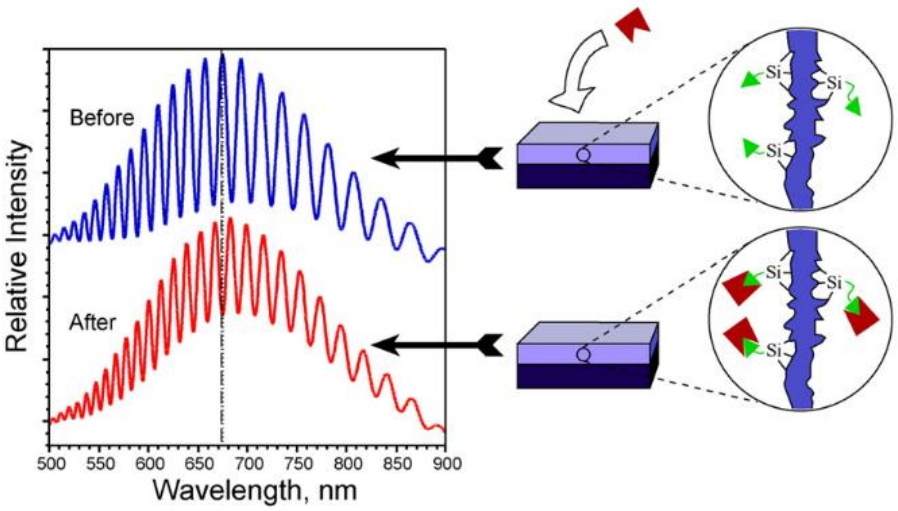



**Figure II.6.** Représentation schématique du changement du spectre de réflectance d'un film de silicium poreux après greffage avec une molécule.

### *2.2.2 Photoluminescence*

Le silicium cristallin pur ne présente qu'une faible photoluminescence dans le rouge en partie due à sa petite bande interdite entre la bande de conduction et la bande de valence. Observé pour la première fois par L. Canham, le silicium poreux présente une forte émission de la lumière dans le domaine du visible. Quatre types de photoluminescence caractérisent le silicium poreux. La première bande de photoluminescence observée est la bande S (pour Slow) vue dans le domaine du visible, proche infrarouge au vert. Pendant la préparation du silicium poreux, nous avons la formation de nanocristaux de silicium cristallin d'une taille de 2 à 5 nm. Ces nanocristaux sont à l'origine de la recombinaison des paires électron-trou confinées quantiquement entraînant une émission de la lumière. La seconde bande de photoluminescence observée est la bande F (pour fast) dans le bleu-vert. Cette luminescence est caractéristique d'un silicium oxydé par voie thermique ou vieillissement. La troisième bande de photoluminescence se trouve dans le domaine du proche infrarouge. Enfin, la dernière bande de photoluminescence est dans le domaine de l'ultra-violet. Cette photoluminescence peut être observée après excitation par rayons X ou par photoexcitation à 200 nm. Une étude à montré que pour obtenir une bonne photoluminescence du silicium celui-ci doit avoir une porosité > 80 % (**Figure II.7**). D'autres facteurs peuvent entrer en jeu comme l'état de surface (oxydation chimique ou thermique) qui peut conduire à une photoluminescence plus importante.

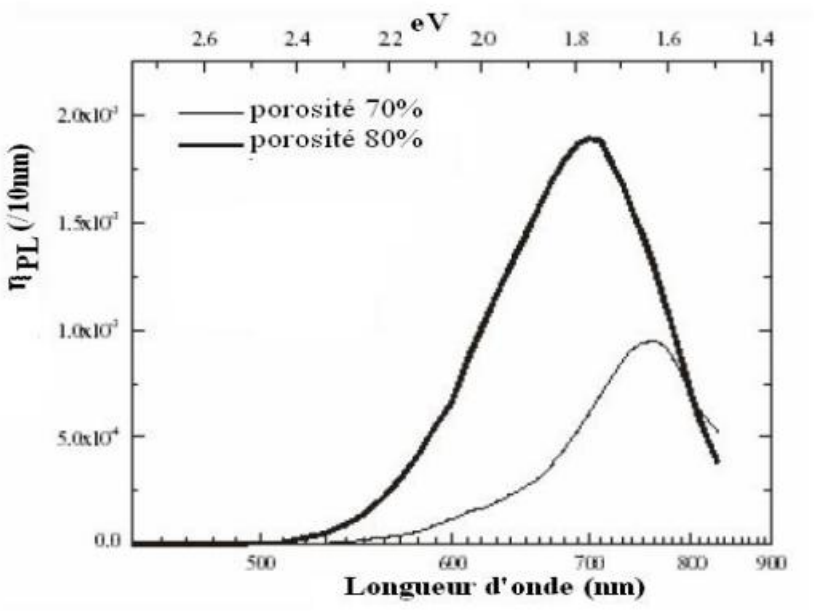



**Figure II.7.** Photoluminescence de deux échantillons de silicium poreux de porosité de 70 % et 80 % sous excitation UV (λ =266 nm).[178]

La photoluminescence du silicium poreux peut être éteinte par diverses molécules,[179] en particulier par des molécules aromatiques[180, 181] que l'on nomme « quenchers ». Cette photoluminescence est éteinte par des mécanismes de transfert d'énergie ou de charge (**Figure II.8**).

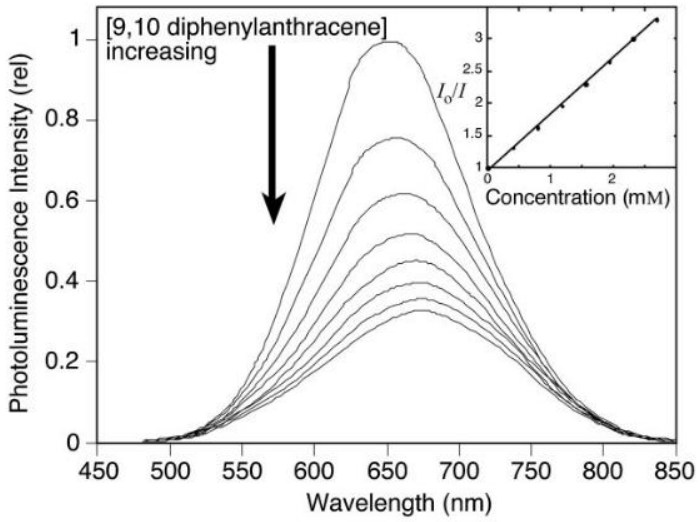



**Figure II.8.** Diminution de la photoluminescence du silicium poreux par titration avec le 9, 10-diphenylanthracene.[182]

### 2.3 Génération d'oxygène singulet par le silicium poreux

Koralev *et al.* ont mis en évidence que les domaines de confinement quantique du silicium poreux génèrent de l'oxygène singlet ($^1O_2$), lorsqu'il est excité par la lumière visible.[183] Ils ont grâce à des expériences de mesure de photoluminescence et de piégeage de l'$^1O_2$ avec du 1,3-diphénylisobenzofurane pu détecter la présence du $^1O_2$. Cette même étude a révélé que le transfert d'énergie est efficace grâce à la longue durée de vie des excitons et la surface spécifique élevée du silicium poreux. Ils ont montré de même que l'oxydation du silicium poreux empêche la génération du $^1O_2$. Une autre étude portée par l'équipe de Ryabchikov *et al.* prouve que la photosensibilité du silicium poreux dépend de la porosité du silicium poreux.[184] Ces résultats font apparaître que plus le silicium est poreux (porosité > 80%), plus la production du $^1O_2$ augmente.

### 2.4 Biocompatibilité, biodégradabilité du silicium poreux

Le silicium poreux suscite un intérêt pour des applications dans le domaine biomédical. En 1995, Leigh Canham est le premier à montrer la biocompatibilité et la biodégradabilité du silicium poreux.[173] Le silicium poreux en milieu aqueux se dégrade en acide orthosilicique $Si(OH)_4$, sous produit non toxique. L'acide orthosilicique retrouvé dans le corps est éliminé par les reins et l'urine. De façon générale le silicium est un élément indispensable pour le bon fonctionnement de l'organisme. Nous le trouvons dans la composition du collagène, de l'élastine et des parois artérielles.[185] Les besoins quotidiens de l'organisme en silicium sont de l'ordre de 25 à 35 mg. La dissolution du silicium poreux en milieu physiologique dépend de sa morphologie c'est-à-dire de sa porosité et de sa taille. Le silicium à porosité élevée (porosité > 70%) a tendance à se dégrader rapidement dans les fluides corporels, le silicium à porosité moyenne (porosité < 70%) est bioactif et lentement biodégradable et le silicium macroporeux ou de faible porosité est bioinerte.[186] Les études sur les microparticules et les nanoparticules de silicium poreux ont permis de révéler leur biocompatibilité. Des études ont mis en avant que les nanoparticules de silicium testées *in vitro* comme *in vivo* ne sont pas toxiques.[134] Ces études prouvent que les pSiNP sont biocompatibles et biorésorbables. Plus récemment, une étude a porté sur l'injection de nanoparticules de silicium poreux par voie intraveineuse chez la souris. Cette étude révèle que les nanoparticules injectées se dégradent et n'entraînent pas d'effets secondaires toxiques.[134] D'autre part le greffage de molécules de type polymère peut ralentir la vitesse de dégradation du silicium poreux et améliorer la stabilité du silicium en milieux aqueux.[187]

# 3. Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules de silicium poreux

La surface du silicium poreux est formée d'hydrure de silicium Si-H et de silanol Si-OH. Ces liaisons peuvent être impliquées dans des réactions chimiques pour permettre le greffage de molécules organiques, qui sont à l'origine de changements des caractéristiques du matériau. La fonctionnalisation du silicium poreux consiste à modifier sa surface avec une molécule contenant un groupement organique, ou une biomolécule. Les réactions impliquées sont l'hydrosilylation, la silanisation et l'oxydation. Cette chimie de surface permet de greffer des molécules d'intérêt thérapeutique comme les photosensibilisateurs ou des molécules capables de complexer des acides nucléiques.

## 3.1 Hydrosilylation

La réaction d'hydrosilylation est une réaction entre les liaisons d'hydrure Si-H du silicium poreux et une double ou triple liaison carbone-carbone (un alcène ou un alcyne). Cette réaction conduit à la formation d'une liaison Si-C. Cette liaison Si-C formée à la suite de la réaction d'hydrosilylation est une liaison stable et de meilleure stabilité cinétique que la liaison Si-O due à la faible électronégativité du carbone.[133]

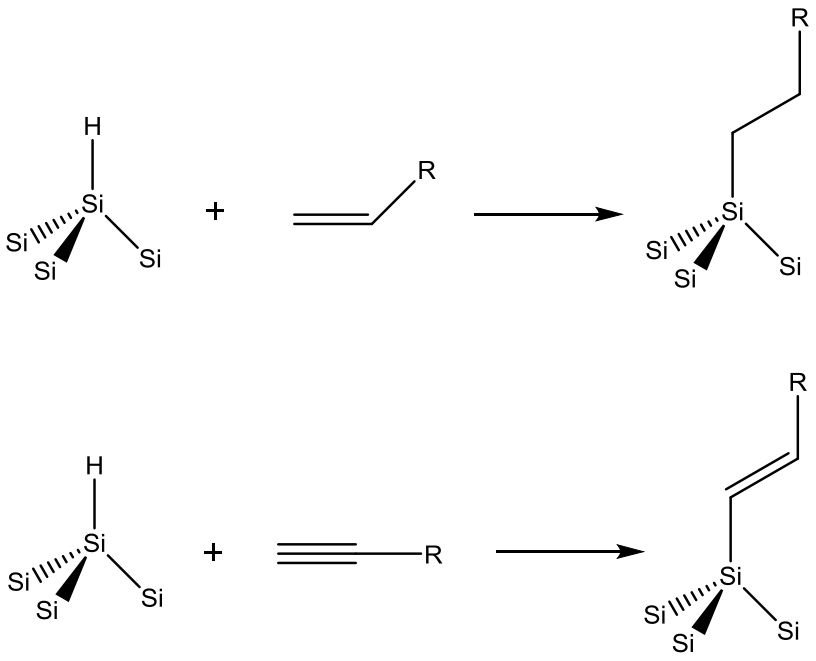


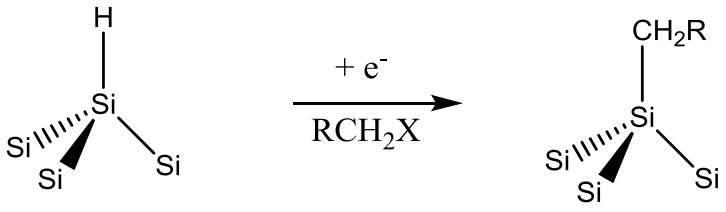

**Figure II.9.** Réaction d'hydrosilylation du silicium poreux avec un alcène et un alcyne.

En 1993, l'équipe de Chidsey *et al.* a mis en évidence pour la première fois la réaction d'hydrosilylation sur silicium.[188] La réaction d'hydrosilylation peut se faire par activation thermique, [5, 87, 189] photochimique [190, 191] ou à l'aide d'un catalyseur de type acide de Lewis.[192, 193] La réaction d'hydrosilylation du silicium poreux fait l'objet d'étude pour le greffage de nombreuses fonctions allylamine, allylisocyanate, acide undécylénique, 1-dodécène, l'acide undécenoique, l'éthyle undécylenate, [5, 189, 194, 195] permettant de conférer au silicium poreux stabilité chimique et nouvelles fonctionnalités (hybrides organique/inorganique).

Lors de mes travaux de thèse, j'ai été amené à travailler sur la réaction d'hydrosilylation pour fonctionnaliser les nanoparticules de silicium poreux. Dans le cas du silicium poreux l'hydrosilylation thermique est une méthode de synthèse pratique et facile à mettre en oeuvre : elle ne nécessite pas l'utilisation de catalyseur, ni d'une source lumineuse. La réaction d'hydrosilylation dure entre 3 et 4 heures à une température inférieure à 100°C pour préserver les molécules organiques que nous souhaitons greffer. La réaction d'hydrosilylation se fait sous atmosphère inerte pour éviter la formation d'une couche d'oxyde qui a pour effet de diminuer la quantité de molécules greffées à la surface du silicium poreux.

### *3.1.1 Fonctionnalisation chimique ou électrochimique*

Des fonctionnalisations chimiques ou électrochimiques avec des molécules organiques sont utilisées comme alternative à l'hydrosilylation pour générer des liaisons Si-C. Pour former ces liaisons covalentes Si-C, il est possible de faire usage des organomagnésiens mixtes R-Mg-X à l'aide d'un courant électrique[196] ou sous condition thermique.[197] Une autre technique existe consistant à employer des organolithiens R-Li par échauffement pour casser les liaisons Si-Si et greffer des molécules organiques à la surface du silicium poreux.[198] Enfin par voie électrochimique, la réduction d'organohalogénures de type RCHX entraîne la formation de liaisons Si-C (**Figure II.10**).[199]




$R = H, (CH_2)_nCH_3, (CH_2)_3CO_2R$
$X = I, Br$

**Figure II.10.** Réaction entre un organohalogénure et le silicium poreux pour former des liaisons Si-C.

### *3.1.2 Réaction de carbonisation thermique*

La réaction de carbonisation thermique est mise au point par l'équipe de Salonen pour former du silicium poreux thermiquement carbonisé (thermally carbonized porous silicon pour TCPSi).[200-203] Le silicium poreux thermiquement carbonisé est formé par réaction mettant en jeu le silicium poreux en présence d'acétylène en phase gaz à haute température. Le composé formé ne présente plus de liaison Si-H, Si-OH et de liaison Si-Si mais uniquement des liaisons Si-C qui lui confère une meilleure stabilité chimique. Ce composé étudié par l'équipe de Salonen pour des applications dans le domaine biomédical intervient pour l'encapsulation et le relargage de principe actif.[200, 204-208]

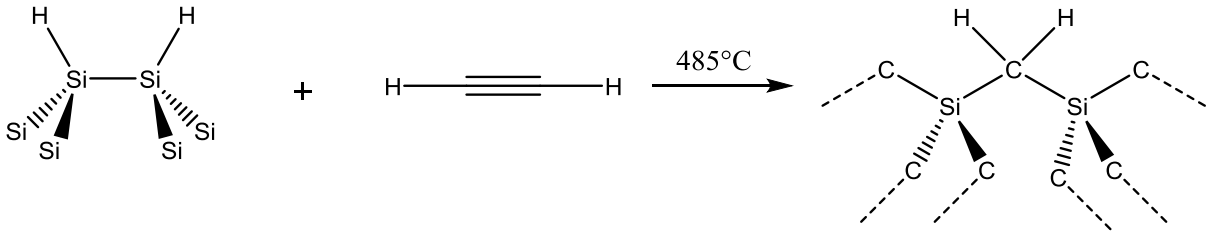



**Figure II.11.** Réaction d'hydrocarbonisation du silicium poreux par l'acétylène.

## 3.2 Silanisation

Mes travaux de thèse ont également porté sur la réaction de silanisation. Les nanoparticules de silicium poreux sont couvertes d'hydrure de silicium (Si-H) et de silanol (Si-OH) à leur surface. Pour la réaction de silanisation, nous avons utilisé les liaisons silanol pour fonctionnaliser le silicium poreux avec des molécules du type alkoxysilanes. Typiquement, dans nos expériences, la réaction de silanisation dure 24 heures, elle se fait à température ambiante ou en chauffant (T<100°C) pour préserver les molécules organiques que nous souhaitons greffer. Nous observons que la silanisation par rapport à l'hydrosilylation permet d'améliorer le taux de greffage de molécules organiques à la surface des nanoparticules de silicium poreux. Cette fonctionnalisation permet de créer de nouveaux matériaux aux propriétés choisies pour des applications en biologie.[209, 210]

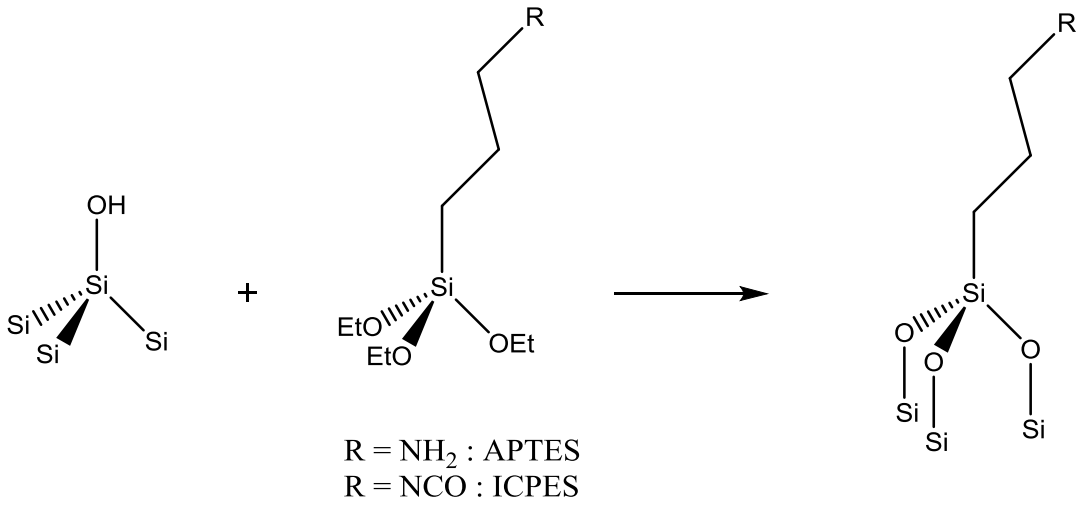



**Figure II.12.** Réaction de silanisation des nanoparticules de silicium poreux avec un aminopropyltriéthoxysilane (APTES) ou un isocyanopropyltriéthoxysilane (ICPES).

## 3.3 Oxydation

Il existe différentes techniques pour oxyder le silicium poreux. Parmi ces techniques nous avons l'oxydation thermique, l'oxydation à l'ozone, l'oxydation par des espèces organiques et l'oxydation à la vapeur d'eau à haute pression. L'oxydation du silicium poreux consiste à insérer des atomes d'oxygène entre les liaisons siliciques Si-Si. L'oxydation du silicium poreux s'accompagne d'un gonflement des murs et d'une diminution du volume poreux.[211]

### *3.3.1 Oxydation thermique*

L'oxydation thermique du silicium poreux se fait sous air ou sous dioxygène. Durant une oxydation thermique, nous observons à la surface du silicium poreux la perte des liaisons hydrures Si-H et une déshydroxylation du matériau formé de liaisons Si-O-Si. A une température inférieure à 200°C, nous observons la formation de fonctions silanols Si-OH à la surface du silicium poreux. Avec une température à 900°C le silicium poreux s'oxyde et se transforme en silice, avec perte des liaisons Si-OH (déshydroxylation).[212]

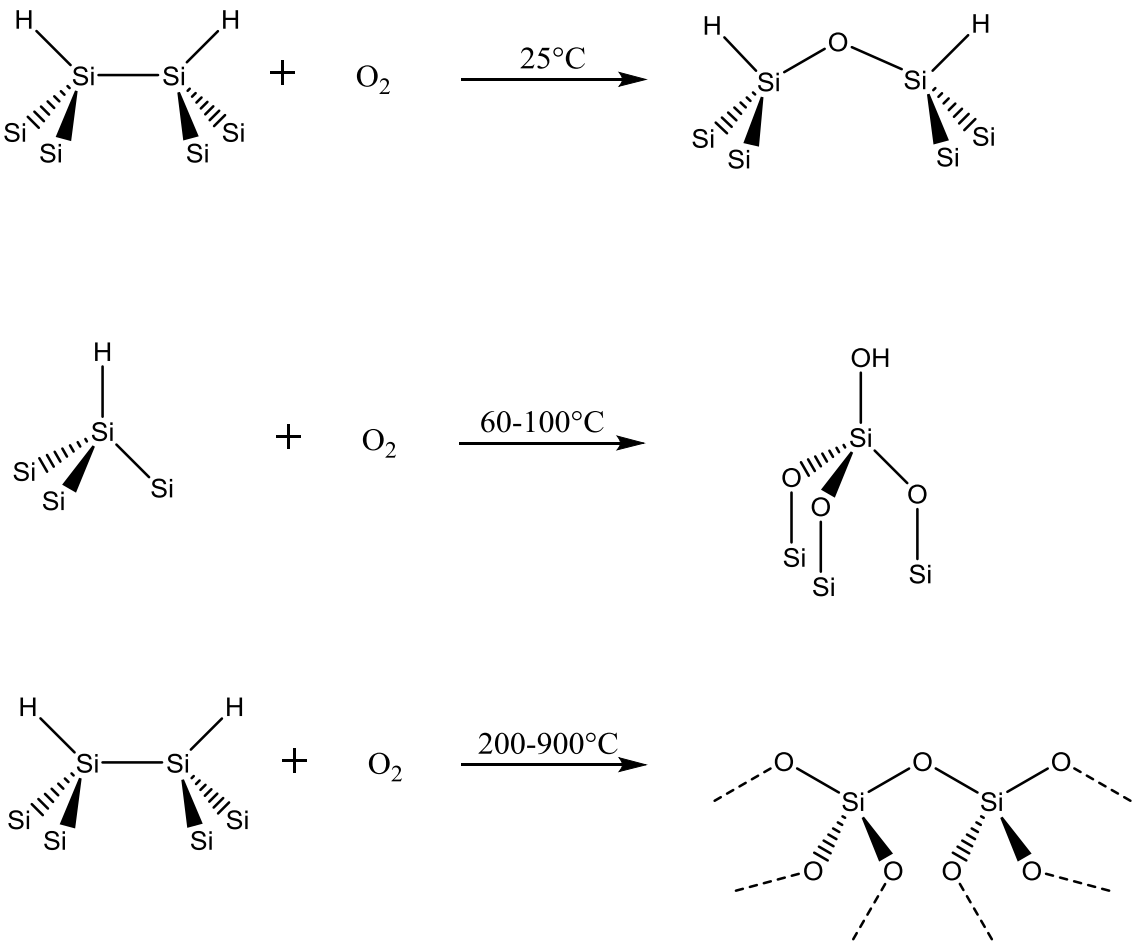



**Figure II.13.** Les différents types d'oxydation thermique du silicium poreux.

### *3.3.2 Oxydation à l'ozone*

L'oxydation à l'ozone se fait à température ambiante avec une exposition au gaz et forme plus rapidement des liaisons silanol Si-OH qu'en milieux aqueux.[209] En revanche, les groupements silanol de surface obtenus par oxydation à l'ozone sont moins stables chimiquement qu'un oxyde obtenu par voie thermique.[209]

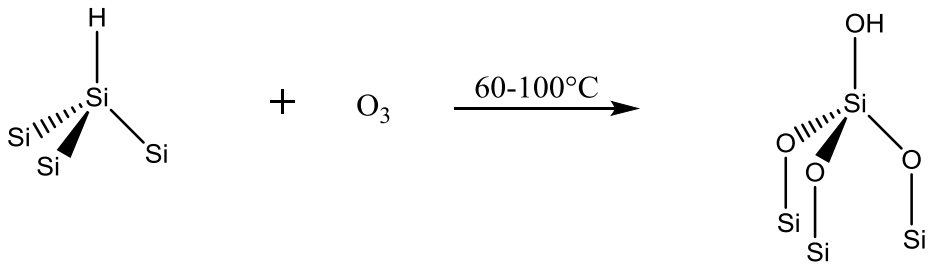



**Figure II.14.** Réaction d'oxydation du silicium poreux par l'ozone.

### *3.3.3 Oxydation par des espèces organiques*

Des agents organiques doux comme la benzoquinone[213] et la pyridine[214] conduisent à l'oxydation du silicium poreux. L'utilisation d'agents organiques est préconisée car ils permettent de garantir la stabilité mécanique du silicium poreux.[133]

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est un oxydant organique doux, également utilisé pour l'oxydation du silicium poreux.[215] Celui-ci oxyde les liaisons Si-Si du silicium poreux en les cassant et en intercalant un atome d'oxygène. Cet oxydant organique forme des liaisons Si-O-Si tout en conservant les liaisons Si-H.

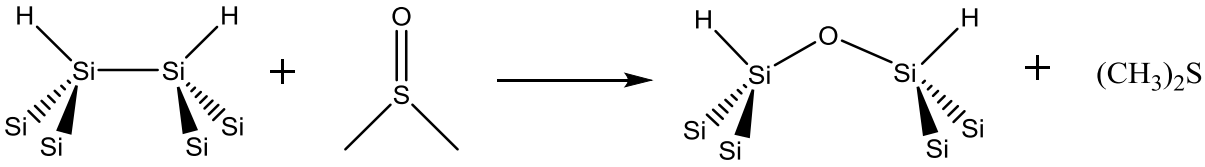



**Figure II.15.** Réaction d'oxydation du silicium poreux avec du DMSO.

### *3.3.4 Oxydation à la vapeur d'eau à haute pression*

L'oxydation à la vapeur d'eau à haute pression consiste à prendre un échantillon de silicium poreux et à le mettre en présence de vapeur d'eau à haute pression pour former un oxyde stable.[216]

$$Si + 2H_2O \longrightarrow SiO_2 + 2H_2$$

La réaction d'oxydation à la vapeur d'eau à haute pression se réalise dans une enceinte hermétique contenant l'échantillon de silicium poreux et de l'eau déionisée. La réaction d'oxydation dure 3 heures, le milieu réactionnel est chauffé à 260°C permettant d'atteindre une pression de 2.7 à 4.1 MPa.

### *3.3.5 Oxydation en solution aqueuse*

L'eau oxyde le silicium poreux avec des cinétiques assez faibles. Par ailleurs, pour accélérer la formation d'oxyde à la surface du silicium poreux sans dissoudre l'oxygène formé, des agents oxydants comme l'acide nitrique ou le peroxyde d'hydrogène sont utilisés.[217]

### *3.3.6 Oxydation électrochimique en milieux aqueux en présence d'acides minéraux*

Le silicium poreux peut être oxydé par voie électrochimique, par anodisation sur  dans une solution d'acide minéral comme l'acide sulfurique $H_2SO_4$.[218] C'est un procédé qui oxyde le silicium poreux et laisse intact les liaisons hydrure Si-H.

# 4. Applications biomédicales du silicium poreux

Le silicium poreux est un matériau qui possède des propriétés physiques, chimiques et texturales intéressantes pour différentes applications. Le silicium poreux est utilisé dans le domaine de la chimie[219, 220] de la biologie[221, 222] de la microélectronique[223-226] mais aussi dans le domaine des capteurs et des dispositifs biomédicaux.[227] Dans cette partie nous traiterons du silicium poreux sous ses différentes formes, c'est-à-dire s'il se présente sous la forme de films, de microparticules ou de nanoparticules.

## 4.1 Film de silicium poreux

Les films de silicium poreux, grâce à leur surface spécifique importante, ont un champ d'applications varié notamment dans le domaine des capteurs chimiques et biologiques.[228] Cette surface de contact permet de favoriser des interactions entre le matériau et la molécule sondée. Les films de silicium poreux ont été développés comme capteurs sensibles pour de la détection de gaz[229], d'explosifs[230], pour des composés organiques[231, 232], pour de l'ADN[221, 233] mais aussi pour des protéines[209, 234], des peptides[235] et des bactéries[236]. Les capteurs et biocapteurs développés sont souvent optiques (moyen de transduction par réflectivité ou par photoluminescence).[237, 238]

D'autre part, les films de silicium poreux sont utilisés pour le développement de surface de culture et de croissance cellulaire. Différents groupes de recherche ont montré que la viabilité cellulaire dépendait de la morphologie, de la topologie et de la surface chimique du film de silicium poreux.[239, 240] Nous trouvons également ces films de silicium poreux en application pour la vectorisation et la délivrance de principes actifs.[241, 242] La porosité des films de silicium poreux offre la possibilité d'encapsuler ou de greffer des molécules à visées thérapeutiques. Cette utilisation connaît un essor considérable dans le domaine biomédical notamment avec l'utilisation de microparticules et de nanoparticules de silicium poreux.

## 4.2 Microparticules de silicium poreux

Les microparticules de silicium poreux (pSiMP) préparées à partir de films de silicium poreux sont obtenues par fracture ultrasonique des films pendant 15 à 30 min. Ces microparticules conservent les propriétés d'origine du film, en particulier les propriétés texturales (diamètre de pores) et les propriétés optiques. Il est possible de contrôler la taille des microparticules en fonction du temps de sonication. Il est également possible de contrôler la cinétique de dégradation des microparticules par le greffage de molécules afin d'en modifier la surface.

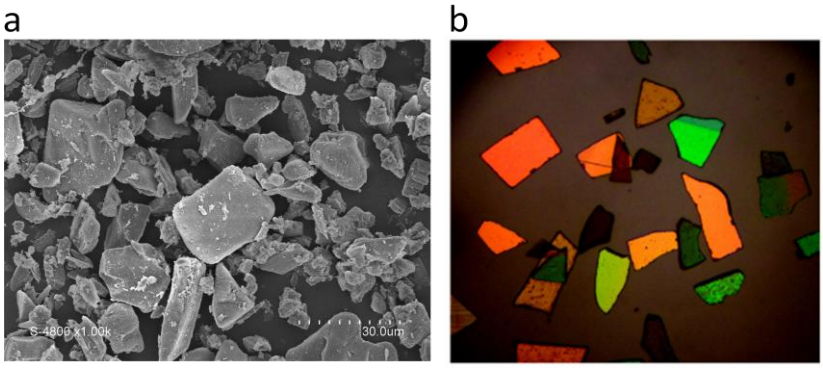



**Figure II.16.** (a) Image de microscope électronique à balayage de microparticules de silicium poreux formées à partir d'un film monocouche de silicium poreux, (b) image de microscopie optique de microparticules de silicium poreux formées à partir d'un film multicouche type filtre rugate de silicium poreux.

Les microparticules de silicium poreux trouvent leurs applications dans le domaine biomédical (**Figure II.16**). Les pSiMP biocompatibles et biodégradables sont employées pour la vectorisation et la délivrance de principes actifs. Les pSiMP sont utilisées pour la vectorisation de molécules anticancéreuses[243], anti-inflammatoires[241], et analgésiques[205]. Elles ont également servi pour la vectorisation de protéines[244], de peptides[244] et d'acides nucléiques[245]. Une étude porte sur une l'injection directe de microparticules de silicium poreux fonctionnalisées dans l'œil d'un lapin et n'a montré aucune toxicité et une stabilité chimique de plusieurs mois.[246] Ces injections de microparticules de silicium poreux visent des applications comme le traitement de maladies comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).[247]

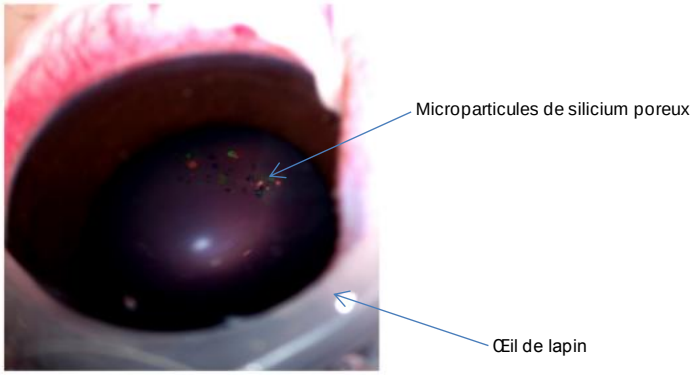



**Figure II.17.** Photographie d'un œil de lapin contenant des microparticules de silicium poreux. Les microparticules sont préparées à partir d'un film multicouche de silicium poreux.[133]

L'incorporation de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique dans les pores des microparticules de silicium poreux fait l'objet d'études en imagerie par résonance magnétique (IRM).[248, 249] Pour le traitement du cancer, l'avancée clinique la plus aboutie est réalisée par le laboratoire pSiMedica, inc. avec le Brachysil, association entre des nanoparticules de silicium poreux (taille 20 µm) et un élément radioactif l'isotope 32 du phosphore $^{32}P$ (agent anticancéreux).[250] Le Brachysil est appliqué de manière percutanée. Toujours dans le domaine du traitement du cancer, l'incorporation d'agents anticancéreux dans les pSiMP est réalisée avec succès et a montré de bons résultats. Par exemple, Vaccari *et al.* ont incorporé de la doxorubicine dans les pSiMP. Après relargage de la doxorubicine, celle-ci a conduit à des effets cytotoxiques sur des lignées de cellules cancéreuses du côlon, plus importantes en présence des pSiNP.[243]

### 4.3 Nanoparticules de silicium poreux

Les nanoparticules de silicium poreux (pSiNP) sont obtenues après 16 heures de sonication de films de silicium poreux. Après différentes étapes de centrifugation, les nanoparticules de silicium poreux ont une taille comprise entre 50 et 250 nm. Actuellement, les nanoparticules de silicium poreux font l'objet d'études dans le domaine biomédical notamment pour l'imagerie et pour la thérapie. L'équipe de M. J. Sailor, pionnière dans la fabrication et l'utilisation des nanoparticules de silicium poreux pour le vivant, a été la première à montrer l'utilisation de pSiNP luminescentes biodégradables pour de l'imagerie *in vivo*.[134] Dans cette étude, ils ont utilisé des nanoparticules de silicium poreux luminescentes d'une taille de 126 nm et ont montré que celles-ci étaient capables de s'accumuler dans les tumeurs par effet EPR, d'être imagées grâce à la photoluminescence intrinsèque du silicium poreux, avant de se dégrader complètement en acide silicique. Une partie de ces particules a été également retrouvée dans le système phagocytique mononucléaire comme la râte et le foie. Les nanoparticules préparées par l'équipe de M. J. Sailor montrent une rapide dégradation *in vitro* comme *in vivo.* Après 4 semaines, ils constatent que celles-ci ont disparu des organes. Par comparaison, les pSiNP en suspension dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) sont dégradées au bout de 8 heures. Les pSiNP se dégradent en sous produit non toxique, en acide orthosilicique, éliminé par les urines. Une solution est envisagée afin de retarder la rapide dégradation des pSiNP, celles-ci sont recouvertes d'un polymère biodégradable le dextran. Aucune toxicité des nanoparticules à une concentration de 0.2 mg/mL n'est observée sur des cellules HeLa, ceci confirme la biocompatibilité et la biodégradabilité des pSiNP. Des pSiNP sont injectées à une concentration de 20 mg/kg chez la souris et confirment les résultats *in vitro* en ne montrant aucune toxicité (**Figure II.18**). Ces

nanoparticules sont employées sous excitation biphotonique, dans le proche infrarouge, pour imager la tumeur et les organes dans lesquels elles s'accumulent. La **figure II.17** révèle que ces pSiNP luminescentes recouvertes de dextran peuvent être utilisées pour imager les organes et les tumeurs.

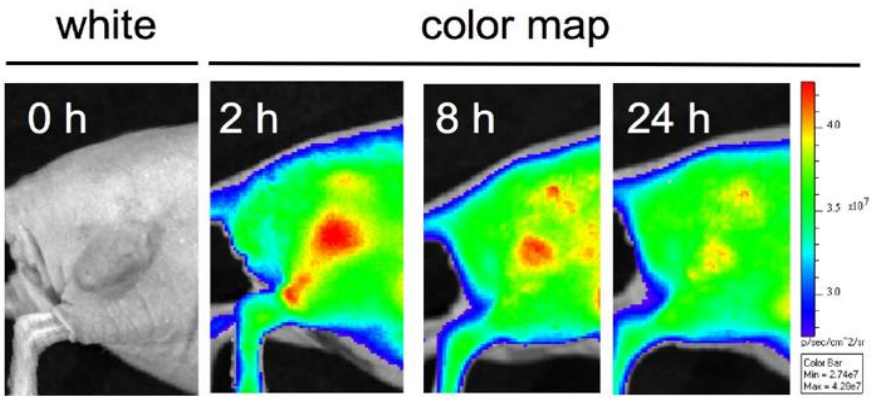



**Figure II.18.** Images représentant la fluorescence chez une souris porteuse d'une tumeur MDA-MB-435, après injection de pSiNP photoluminescentes recouvertes de Dextran à une concentration de 20 mg/kg, après excitation à 850 nm.

Dans une autre étude, l'équipe de Salonen a utilisé des nanoparticules de silicium poreux hydrocarbonisées (THCPsi), nanoparticules ayant subi un traitement à l'acétylène à haute température. Leurs études confirment la biocompatibilité des THCPsi. Dans ces travaux les THCPsi ont été testées chez le rat pour étudier leur biodistribution c'est-à-dire leur localisation dans les organes. Les THCPsi sont administrées par voie sous-cutanée, par voie orale et par voie intraveineuse chez le rat. Par voie sous-cutanée, les THCPsi restent localisées à l'endroit de l'injection. En revanche par voie intraveineuse, les THCPsi sont rapidement retrouvées dans le foie et la râte ce qui confirme que ces nanoparticules sont rapidement éliminées de la circulation sanguine. Enfin par voir orale, les THCPsi ne franchissent pas la paroi de l'estomac et la plupart d'entre-elles au bout de 6 heures se retrouvent dans le côlon pour être ensuite évacuées par voie fécale.[251]

L'équipe de J. I. Zink a également publié une étude sur l'utilisation de nanoparticules de silicium poreux pour le traitement du cancer.[252] Ils ont adapté un système de nanovalves obstruant la sortie des molécules (molécules fluorescentes, agents anticancéreux….) des pores des pSiNP. Généralement ces systèmes de nanovalves sont employés avec des nanoparticules de silice mésoporeuses (MSN).[253, 254] Pour cette étude, les pSiNP sont greffées par silanisation avec un 3-iodopropyltrimethoxysilane couplé à un benzimidazole, l'ensemble formant une

tige sur la surface des pSiNP (**Figure II.19**). Autour de cette tige est ajoutée une cyclodextrine, empêchant la sortie des molécules. Dans ce système les pSiNP chargées en molécules fluorescentes (Hoechst 33342) permet de vérifier le bon fonctionnement du système de relargage des nanovalves. Ce système de relargage est appliqué sur des cellules cancéreuses du pancréas (PANC-1). Le relargage de la molécule fluorescente intervient dans les lysosomes à pH acide. Au pH acide des lysosomes, le benzimidazole se protone et éjecte la cyclodextrine libérant ainsi des pores la molécule fluorescente. Bien que ce système de nanovalves associées aux pSiNP ait démontré son efficacité avec une molécule fluorescente, le système de nanovalves pourrait être utilisé avec des agents anticancéreux comme la doxorubicine ou la camptothécine.

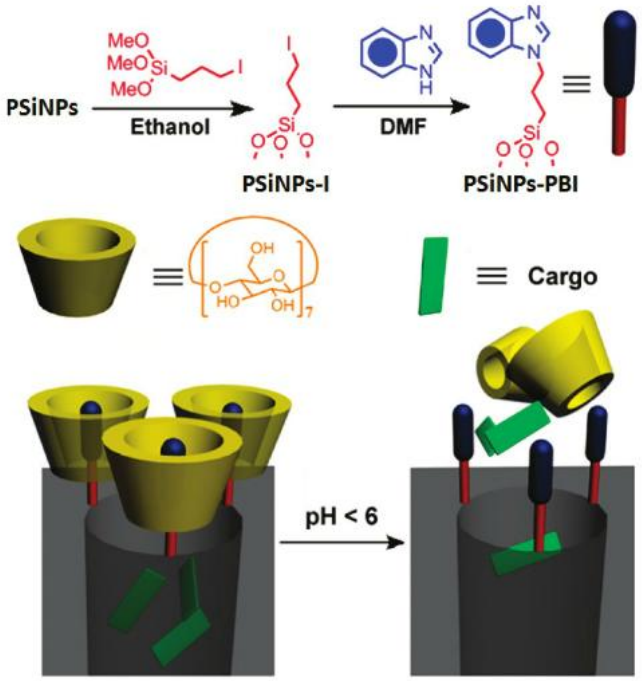



**Figure II.19.** Représentation schématique du mécanisme de nanovalve et du relargage de la molécule fluorescente.[252]

Après avoir mis en évidence la génération de $^1O_2$ par le silicium poreux, deux équipes de recherche M. J. Sailor et de V. Timoshenko se sont penchées sur l'utilisation de pSiNP en thérapie photodynamique. En 2011, Xiao *et al.* ont étudié l'efficacité des pSiNP en thérapie photodynamique *in vitro*, sur deux types de lignées cellulaires (HeLa et NIH-3T3).[255]

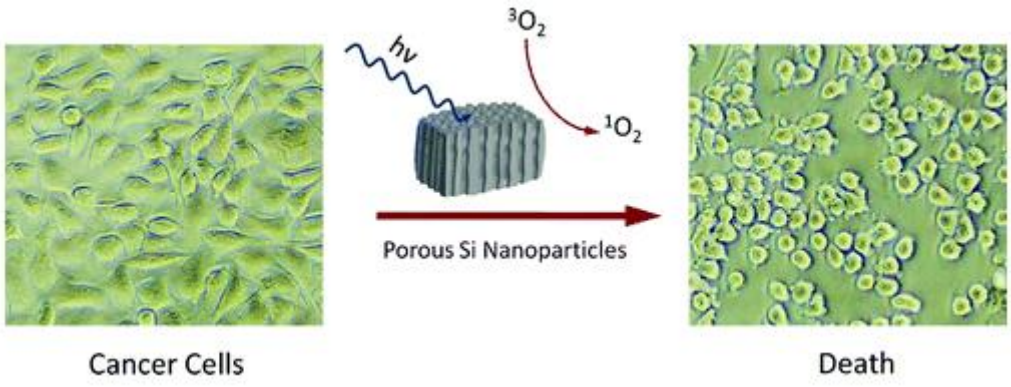



**Figure II.20.** Cellules HeLa incubées avec 100 µg/mL de pSiNP sous irradiation pendant 10 min à une puissance de 60 J/cm$^2$.[255]

Cette étude fait paraître que les pSiNP incubées à une concentration de 100 µg/mL ont une faible toxicité dans l'obscurité car elles représentent moins de 10% de mort cellulaire. En revanche, le taux de mort cellulaire atteint 45% lorsque les pSiNP sont irradiées sous lumière blanche (100 mW/cm$^2$) pendant 10 minutes. Alors que, l'irradiation sans l'utilisation de pSiNP entraîne 10 à 25% de mort cellulaire. Grâce à cette étude, l'équipe de Xao *et al.* atteste que les pSiNP entraînent la mort des cellules par effet PDT, c'est-à-dire que les pSiNP sous irradiation sont capables d'induire du $^1O_2$. Le rendement quantique en génération d'$^1O_2$ obtenu par les pSiNP est de 0.10 dans l'éthanol et de 0.17 dans l'eau. Une autre étude a été réalisée sur l'utilisation de pSiNP sous irradiation dans le proche infrarouge avec des cellules CT-26 (cellules cancéreuses du côlon). Sous irradiation dans le proche infrarouge des pSiNP, il a été constaté que le taux de mort cellulaire s'élevait à 93% dû à une augmentation locale de la température dans les cellules CT-26 incubées. Ce phénomène de hausse de la température est appelé photothermie. Lorsque les pSiNP sont irradiées dans le proche infrarouge, celles-ci produisent suffisamment de chaleur pour entraîner la mort cellulaire.[256] Certaines nanoparticules comme les nanoparticules d'or ou d'oxyde de fer ont la capacité de générer de la photothermie.

Les pSiNP s'appliquent aussi pour la vectorisation de molécules photosensibilisatrices. Secret *et al* ont fonctionnalisé de manière covalente une porphyrine anionique sur les pSiNP. Dans un premier temps, les pSiNP ont été greffées avec l'allylisocyanate par hydrosilylation. Puis dans un deuxième temps, un couplage a été réalisé entre la porphyrine anionique et les pSiNP hydrosylilées. Cette étude porte sur l'excitation monophotonique directe de la porphyrine greffée sur les pSiNP. Ces nanoparticules sont testées sur des cellules cancéreuses du sein MCF-7 (**Figure II.21**).[5]

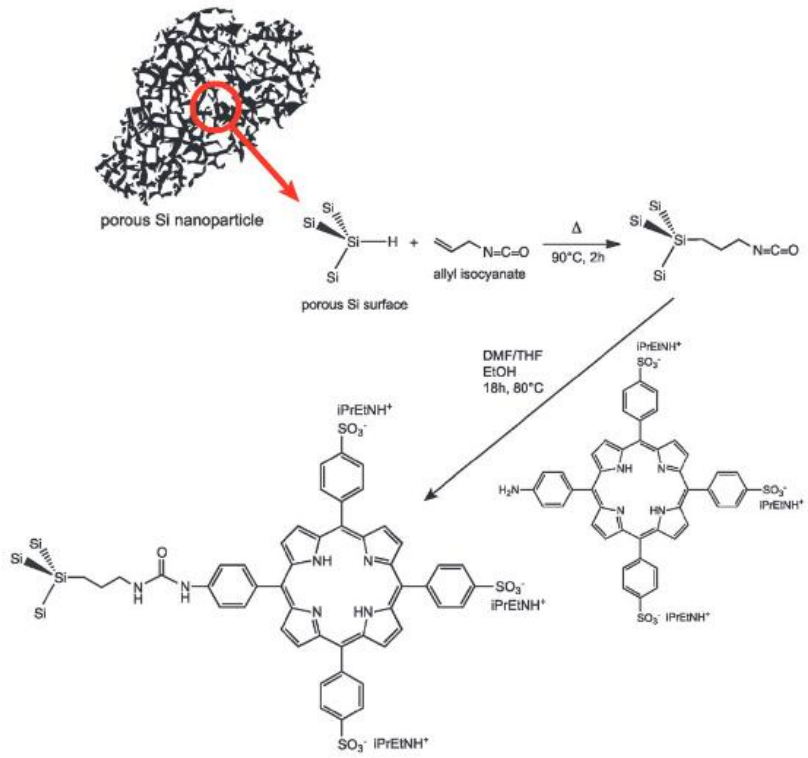



**Figure II.21.** Hydrosilylation de pSiNP avec l'allylisocyanate, couplées avec une porphyrine.[5]

La porphyrine non vectorisée, les pSiNP nues et les pSiNP greffées avec la porphyrine sont incubées pendant 5 heures à une concentration de 0.25 µg/ml et 20 µg/mL respectivement dans les cellules MCF-7. Ces cellules incubées ont été irradiées à une longueur d'onde de 650 nm. Il est important de noter qu'avec ou sans irradiation, les pSiNP nues sont non-toxiques pour les cellules, confirmant la biocompatibilité des pSiNP (**Figure II.22**). En revanche, lorsque les pSiNP greffées avec la porphyrine sont irradiées avec un laser monophotonique, celles-ci génèrent 42% de mort cellulaire. En comparaison, le taux de mort cellulaire s'élève à 16 % pour la porphyrine non vectorisée. Par conséquent, cette étude révèle que l'utilisation de pSiNP aide à transporter et à concentrer une plus grande quantité de porphyrine à l'intérieur des cellules cancéreuses du sein donnant de meilleurs résultats en PDT.[5]

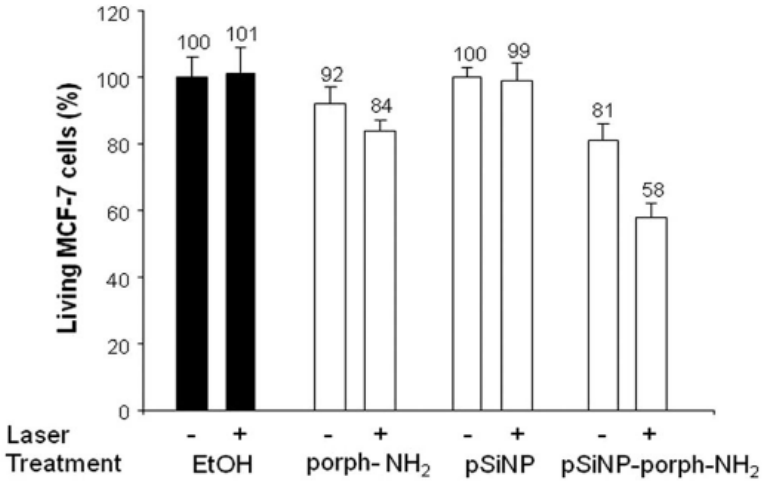



**Figure II.22.** Effet photodynamique sur cellules cancéreuses du sein (MCF-7) avec la porphyrine non vectorisée, les pSiNP nues et les pSiNP greffées avec la porphyrine et à une irradiation à 650 nm. Les échantillons sont incubés pendant 5 heures à une concentration de 20 µg/mL pour pSiNP et pSiNP-Porph et à 0.25 µg/mL pour la porphyrine non vectorisée.[5]

Récemment, en 2013 Secret *et al.* ont publié une étude portant sur la vectorisation de la camptothécine (agent anticancéreux) par le ciblage de différentes lignées cellulaires cancéreuses le neuroblastome, de glioblastome et des cellules du lymphome B (cancer du sang) par l'intermédiaire de greffage d'anticorps.[87] Ils ont par hydrosilylation greffé à la surface des pSiNP un semicarbazide (tert-butyl-2[(allylamino) carbonyl] hydrazine-carboxylate) protégé par un groupement Boc, qu'ils ont ensuite déprotégé (**Figure II.23**). Puis les pSiNP ont été chargées en camptothécine avec un taux de chargement de 315 nmol par mg de pSiNP alors que le taux de chargement pour les MSN est de 1.6 à 29 nmol de camptothécine. A noter que les pSiNP peuvent encapsuler une plus grande quantité de principe actif que les MSN. Cette étude a mis en évidence, la possibilité de greffer des anticorps sur les pSiNP par l'intermédiaire du semicarbazide déprotégé. Ces anticorps (MLR2, mAb528 et Rituximab) ciblent respectivement les trois différentes lignées cellulaires cancéreuses : le glioblastome, le neuroblastome et les cellules du lymphome B. Les succès de greffage de ces anticorps sur les pSiNP sont confirmés par cytométrie en flux et par immunocytochimie. Les résultats obtenus en *in vitro* montrent qu'il est possible d'utiliser des pSiNP pour la vectorisation de molécules anticancéreuses. L'étude révèle que des pSiNP greffées avec des anticorps obtiennent un meilleur taux de mort cellulaire. Ces résultats confirment la spécificité des anticorps pour le ciblage des cellules cancéreuses.

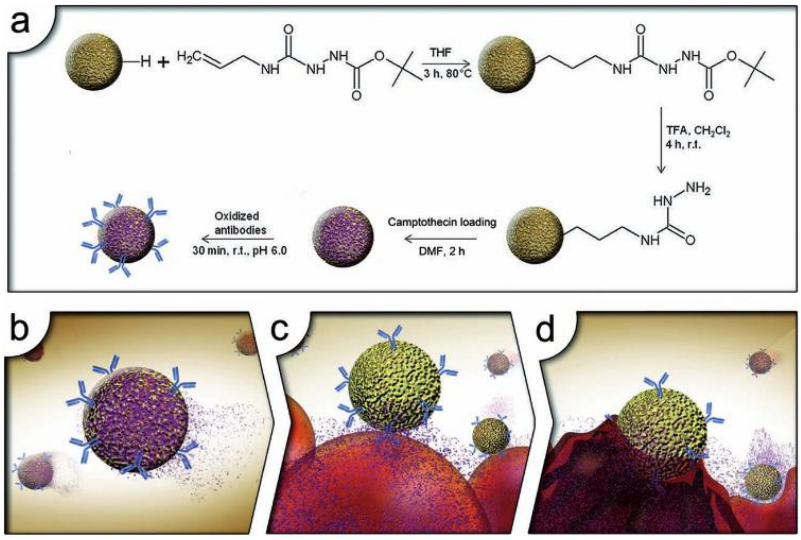



**Figure II.23. (**a) Hydrosilylation de pSiNP avec un semicarbazide, déprotection du semicarbazide, chargement en camptothécine et greffage d'anticorps ; (b-d) Représentation schématique de la vectorisation de pSiNP chargées en camptothécine et greffées avec un anticorps pour le ciblage des cellules cancéreuses.[87]

Enfin, M. J. Sailor et son équipe ont démontré le potentiel des pSiNP pour l'immunothérapie.[257] Pour cela, ils ont chargé les pSiNP en anticorps anti-CD 40, le FGK45 biotinylated (association entre la biotine et l'anticorps). De l'avidine est adsorbée dans la porosité des pSiNP pour former une interaction forte entre la biotine de l'anticorps et l'avidine. Les pSiNP grâce à l'anticorps greffé à la surface se lient spécifiquement aux récepteurs de l'anticorps des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). L'anticorps FGK45 active les lymphocytes B du système immunitaire. Les pSiNP fonctionnalisées à l'anticorps montrent un pouvoir d'activation de 30 à 40 fois plus élevé que l'anticorps libre.

## 5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons exposé une étude bibliographique du silicium poreux. Nous avons décrit ses propriétés physique et les différentes méthodes de fonctionnalisation du silicium poreux. Nous avons également présenté différentes application du silicium poreux (suivant sa forme) dans le domaine biomédical. Dans la suite de ces travaux, nous présentons la fonctionnalisation des nanoparticules de silicium poreux avec des photosensibilisateurs et des agents de ciblages pour des études en thérapie photodynamique (chapitre 4) et leur fonctionnalisation pour être utilisées comme vecteur non viraux pour du transfert de gènes (petit interférent d'ARN ou plasmide d'ADN) (chapitre 5).

# Chapitre 3 : Préparation des nanoparticules de Silicium poreux

# 1. Préparation des nanoparticules de silicium poreux

## 1.1 Les nanoparticules de silicium poreux

Les nanoparticules de silicium poreux font l'objet d'étude en qualité de nanovecteurs pour des applications dans le domaine de la santé.[5, 134, 252, 255, 256, 258] C'est un matériau biodégradable et biocompatible, il présente des caractéristiques physiques intéressantes pour des applications en thérapie.

Pour être mises en application dans le domaine de la nanomédecine, les nanoparticules de silicium poreux doivent remplir certaines conditions :

- une taille comprise entre 50 et 250 nm
- une surface spécifique et un volume poreux important pour faciliter le greffage ou l'encapsulation de molécules d'intérêts thérapeutique. Un diamètre de pores suffisamment grand pour permettre l'encapsulation de grosses molécules (peptides, protéines…) ou d'acides nucléiques (siRNA, pDNA).
- être biodégradables en sous-produits non toxiques
- offrir une surface facilement fonctionnalisable. Les pSiNP doivent avoir de nombreuses fonctions d'hydrures ou silanols à leur surface pour greffer des molécules par hydrosilylation ou par silanisation.

## 1.2 Matériels et méthodes

### *1.2.1 Nanoparticules de silicium poreux*

Pour la préparation des nanoparticules de silicium poreux, nous utilisons un silicium cristallin fabriqué par Siltronix (France). Le silicium cristallin utilisé est de type $P^{++}$, dopé au bore, avec une résistivité comprise entre 0.008 et 0.0012 Ω.cm, une orientation cristalline <100> et d'une épaisseur comprise entre 500 et 550 µm avec un diamètre de 100 mm. Le silicium poreux est obtenu par dissolution anodique dans une cellule en téflon (**Figure III.1**). Le wafer de silicium placé dans la cellule de téflon est gravé avec une solution d'acide fluorhydrique (48% de chez Sigma-Aldrich)/l'éthanol absolu (3:1) en volume. Un courant constant de 167 $mA/cm^2$ est appliqué pendant 150 secondes. Après la gravure électrochimique, l'échantillon poreux est rincé trois fois avec de l'éthanol absolu. La couche poreuse se détache du substrat cristallin par électrodissolution dans une solution d'HF à 3.3% dans l'éthanol absolu. Pour l'électrodissolution le courant constant appliqué est de 4 $mA/cm^2$ pendant 250 secondes. Le silicium poreux est à nouveau rincé trois fois avec de l'éthanol

absolu. Le silicium poreux est récupéré puis mis dans un flacon en verre contenant de l'éthanol absolu.

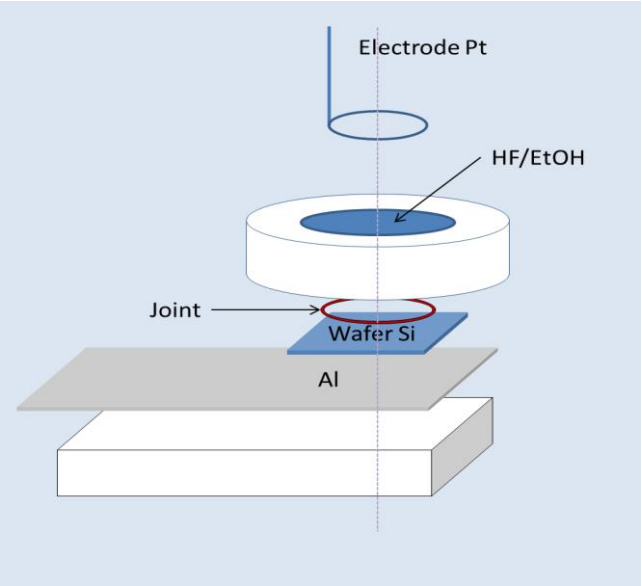



**Figure III.1.** Schéma de la cellule de gravure électrochimique.

Plusieurs gravures sont effectuées sur un même wafer de silicium, (entre 10 et 15 gravures). Les films de silicium poreux récoltés sont mis dans un flacon en verre d'éthanol absolu puis ils sont rincés 4 à 5 fois avec de l'éthanol absolu pour rincer le HF restant. Les échantillons (films de silicium dans le flacon) sont dégazés pendant 20 à 30 minutes en faisant buller de l'azote dans l'éthanol. Ensuite les flacons sont placés dans un bain à ultrasons (Fisher Transsonic TI-H-10) à 25 kHz pendant 16 heures. L'eau du bain à l'ultrason est changée toutes les 4 heures pour éviter un échauffement trop élevé et risquer une oxydation trop importante de nos échantillons. Après 16 heures de sonication, les flacons en verre contenant les microparticules et les nanoparticules sont mis à décanter pendant 30 minutes. Après décantation, le surnageant est récupéré et les microparticules restées au fond du flacon en verre sont mises de coté car trop grosses pour les applications visées. Cependant il reste en général des microparticules dans le surnageant. La première centrifugation à 2700 g pendant 2 minutes (Minispin, Eppendorf) permet de séparer les microparticules restantes des nanoparticules. Le surnageant récupéré après la première centrifugation contenant les nanoparticules est à nouveau centrifugé à 22000 g pendant 30 minutes pour séparer les petites nanoparticules (10 à 50 nm) des nanoparticules désirées (50 à 250 nm). Le culot de l'eppendorf contenant les nanoparticules de taille désirée est alors redispersées dans l'éthanol

absolu. Les nanoparticules de silicium poreux sont ensuite stockées dans l'éthanol à température ambiante.

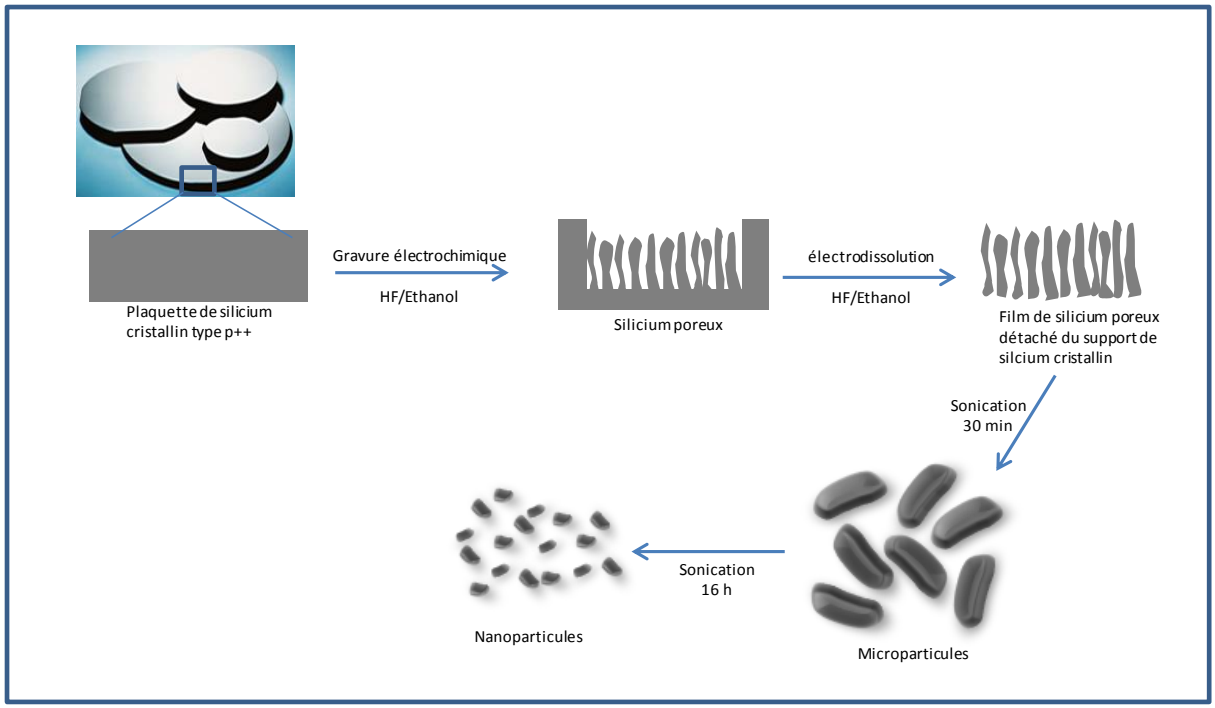



**Figure III.2.** Représentation schématique du procédé de fabrication des nanoparticules de silicium poreux. Adapté de[182].

Mes travaux de thèse m'ont amené à travailler dans un premier temps avec une cellule de gravure électrochimique d'une surface de 7.07 $cm^2$, avec laquelle nous produisons seulement 2 à 3 mg de nanoparticules de silicium poreux par synthèse. Puis je me suis donc occupé de faire usiner une autre cellule de gravure d'une surface de 61 $cm^2$, qui m'a permis de produire entre 80 et 120 mg de nanoparticules de silicium poreux par synthèse (**Figure III.3**). Ce changement de cellule de gravure a nécessité l'utilisation d'un autre générateur plus puissant, capable de délivrer un courant de 10.5 A pour obtenir 167 $mA/cm^2$. Cette production plus importante de nanoparticules, m'a permis de réaliser plus de synthèses, d'analyses et de caractérisations.

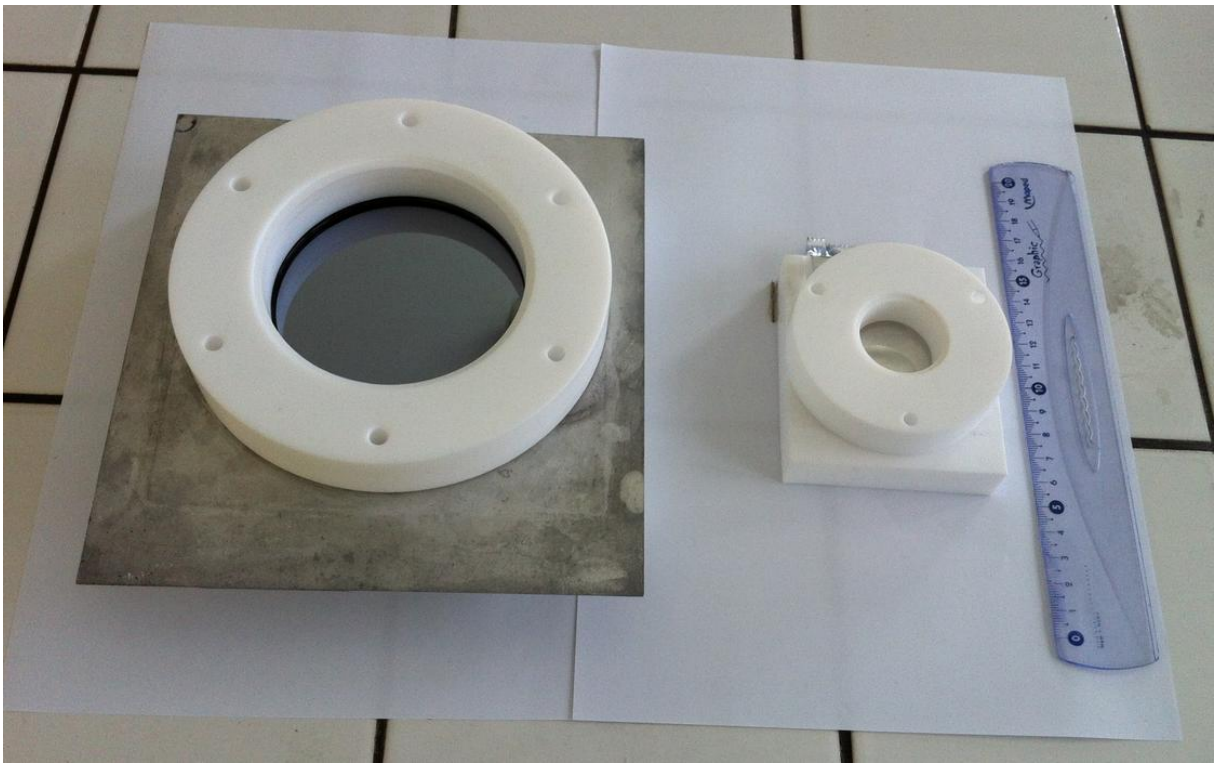


**Figure III.3.** Photographie montrant le changement d'échelle des cellules de gravure utilisées.

### *1.2.2 Caractérisations des nanoparticules de silicium poreux*

***Microscopie électronique en transmission (MET) :***

Les images de MET ont été réalisées sur un microscope Jeol 1200 EX II. Une goutte d'une suspension de nanoparticules dans l'éthanol absolu est déposée sur une grille porte-échantillon, l'éthanol absolu s'évapore pour imager les échantillons.

***Adsorption-désorption d'azote :***

La volumétrie d'adsorption-désorption d'azote a été effectuée sur un instrument ASAP2020 de Micromeritics à 77 K. Avant analyse, les échantillons sont dégazés pendant 8 heures *in situ* à 303 K. Le diamètre des pores des nanoparticules de silicium poreux est déterminé par la méthode BdB (Broekhoff de de Boer),[259] tandis que la surface des échantillons est déterminée par la théorie BET (Brunnauer-Emmett-Teller).[260]

***Diffraction des rayons X :***

Les diffractogrammes de poudre ont été obtenus sur un diffractomètre Brucker D8 Advance équipé d'un détecteur solide Brucker Lynx Eye. Le faisceau de rayons X incidents

correspond à la raie Kαl du cuivre de longueur d'onde λ = 1.5406 Å. La géométrie de type Bragg-Brenteno de l'appareil permet une orientation fixe de l'échantillon par rapport au vecteur de diffraction et la configuration θ-θ permet de conserver l'échantillon en position horizontale alors que la source de rayon X et le détecteur se déplacent simultanément et de manière symétrique d'un angle θ, angle d'incidence du faisceau sur la poudre. Le faisceau diffracté est recueilli à un angle 2θ par rapport au faisceau incident. Les diffractogrammes sont enregistrés dans un intervalle de 0.5 à 6° 2θ et de 20 à 85° 2θ avec un pas de 0.020°.

La taille moyenne des domaines cristallins ou cristallites est calculée à partir de la largeur à mi-hauteur d'un pic de diffraction par la formule de Scherrer :

$$D_{(hkl)} = K\lambda / (\cos(\theta)*(L-s))$$

$D_{(hkl)}$ correspond à la dimension des cristallites pour un pic (hkl) donné, K est le facteur de forme (ici égal à 0.89), λ la longueur d'onde de la raie Kα1 du cuivre soit λ = 1.5406 Å, θ est la position du pic de diffraction, L est la largeur à mi-hauteur du pic et s la largeur à mi-hauteur d'un pic de diffraction étalon pour une valeur de θ similaire. L'échantillon de référence utilisé comme étalon est un monocristal de corindon ($Al_2O_3$ Bruker AXS Korundprobe 51.5 * 8.5 mm).

***Diffusion dynamique de la lumière :***

La diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering) est une technique d'analyse spectroscopique non destructive permettant de déterminer le diamétre hydrodynamique des particules en suspension et soumises au mouvement Brownien, en étudiant la diffusion d'un faisceau lumineux à travers l'échantillon

Les expériences de DLS ont été faites avec une solution de 200 µL de nanoparticules diluées dans l'éthanol absolu sur un appareil Nanozêtasizer (Malvern), équipé d'un laser à 633 nm à une puissance de 4 mW.

***Potentiel zêta :***

Le potentiel zêta représente la charge électrique qu'une particule acquiert à partir des ions qui l'entourent quand elle est en solution. Le potentiel zêta peut être positif ou négatif.

Les expériences de potentiel zêta ont été faites avec une solution de 800 µL de nanoparticules de silicium poreux diluées dans l'éthanol absolu. Les expérimentations ont été faites avec un Nanozêtasizer (Malvern), équipé d'un laser à 633 nm à une puissance de 4 mW.

## 1.3 Résultats

Les films de silicium poreux gravés à 167 mA/cm$^2$ sont détachés de leurs substrats poreux par électrodissolution. Les films poreux détachés sont placés dans un flacon en verre et dégazés sous azote pendant 20 minutes. Le choix du flacon en verre peut être déterminant pour obtenir de meilleurs rendements en nanoparticules. Si le flacon a un verre trop épais, la fracture de l'échantillon est inefficace. Après dégazage, celui-ci est placé dans un bain à ultrasons pendant 16 heures pour fracturer les films poreux en nanoparticules de silicium poreux.

Des nanoparticules de silicium poreux de tailles contrôlées sont obtenues après décantation et différentes étapes de centrifugation. Avant la décantation et les centrifugations, plusieurs populations de tailles de particules sont obtenues. Les particules de taille micrométrique comprise entre 1 à 5 µm, trop grandes pour être internalisées par les cellules, sont retirées après décantation et la première centrifugation. Une deuxième centrifugation à 22000 g pendant 30 minutes permet de séparer les deux populations restantes (centrées à 30 nm et 150 nm). La première population composée de petites nanoparticules se retrouve dans le surnageant, elle est retirée de l'échantillon car trop petite pour nos études en PDT et en thérapie génique. La deuxième population, avec la taille attendue, se retrouve dans le culot de l'échantillon, celle-ci est analysée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) en nombre et en intensité. La distribution moyennée en intensité est centrée en moyenne sur 170 nm. La distribution moyennée en nombre est centrée sur 70 nm. Après la préparation des nanoparticules de silicium poreux, nous observons que les plus nombreuses sont celles de plus petites tailles. Toutefois, ces nanoparticules obtenues après les étapes de centrifugation sont de taille conforme pour des applications biomédicales.

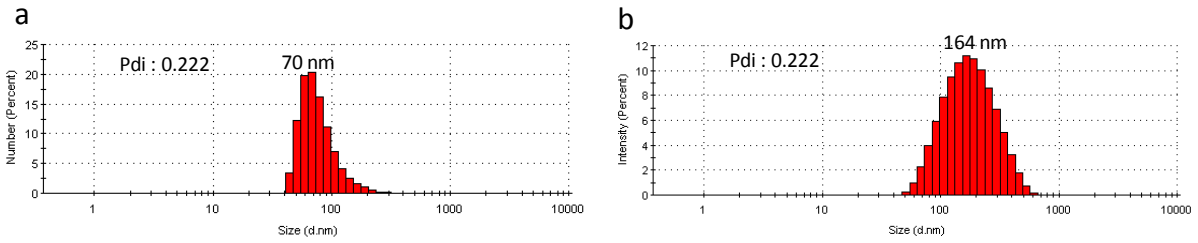



**Figure III.4.** Distribution de tailles de nanoparticules de silicium poreux en diffusion dynamique de lumière après les étapes de centrifugation. (a) En nombre, (b) En intensité.

Les nanoparticules de silicium poreux sont imagées par microscopie électronique en transmission (MET). Ces images sont représentées sur la **figure III.5** La taille des nanoparticules est comprise entre 100 et 300 nm, en accord avec les mesures faites en DLS. Les nanoparticules ont des formes hétérogènes dues à leur mode de fabrication (par fracture du film, voie top-down). Elles possèdent des pores bidimensionnels en forme de canaux parallèles, des murs fins d'une épaisseur de 2 à 3 nm (**Figure II.9.c**) et un diamètre de pores de l'ordre de 15 à 30 nm. Ce diamètre de pores est confirmé par volumétrie d'adsorption et désorption d'azote (**Figure III.6**).

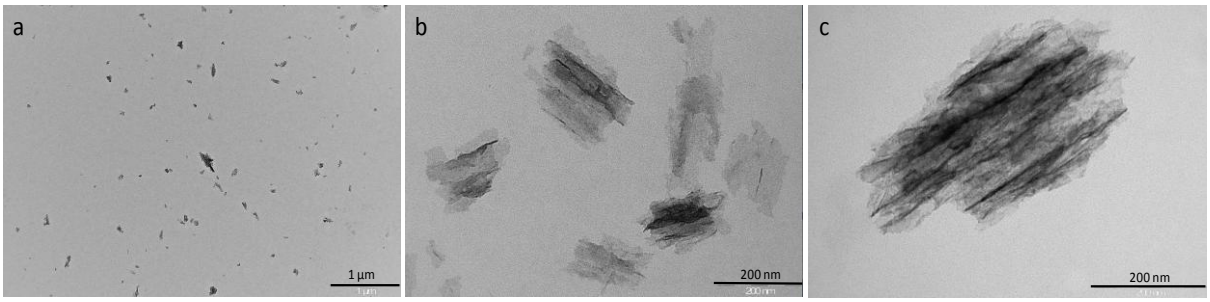



**Figure III.5.** Images de microscopie électronique en transmission de nanoparticules de silicium poreux. (a) et (b) dispersion de nanoparticules sur une grille porte-échantillon, (c) grossissement d'une nanoparticule.

Les nanoparticules de silicium poreux sont caractérisées par volumétrie d'adsorption/désorption d'azote (**Figure III.6**). Le dégazage s'effectue à 80°C pendant 8 heures. Le volume poreux est calculé en prenant en compte le dernier point de l'isotherme à $P/P_0$ = 0.99 comme étant le premier point du palier de saturation. Les caractéristiques texturales des nanoparticules de silicium poreux calculées par les méthodes BdB (diamètre de pore) et BET (surface spécifique) sont données dans le **tableau III.1**. La méthode BET est utilisée pour déterminer la constante BET et la surface spécifique de l'échantillon. La constante $C_{BET}$ exprime l'affinité entre une molécule de diazote polarisable $N_2$ et la surface à analyser. Une valeur élevée du $C_{BET}$ (>80) indique que la surface adsorbante est hydrophile, tandis qu'une valeur faible (<40) correspond à une surface plutôt hydrophobe. Dans notre cas les pSiNP ont une valeur $C_{BET}$ de 30 ce qui indique que les pSiNP sont hydrophobes, une valeur attendue car nous avons la présence de liaisons hydrures Si-H à la surface. La méthode BET nous permet aussi de déterminer la surface spécifique des pSiNP qui est de 493 $m^2/g$. Cette technique d'analyse nécessite 15 mg de nanoparticules pour obtenir une mesure de la surface spécifique et du volume poreux. La condensation capillaire se produit à 77 K et à une pression élevée. A forte pression relative, le palier de la quantité d'azote adsorbée après

condensation capillaire n'est pas atteint. Ceci s'explique par le fait que les pores ne sont pas complètement remplis à pression saturante d'azote. Ces pores se distribuent sur un domaine de taille entre le mésoporeux et le macroporeux.

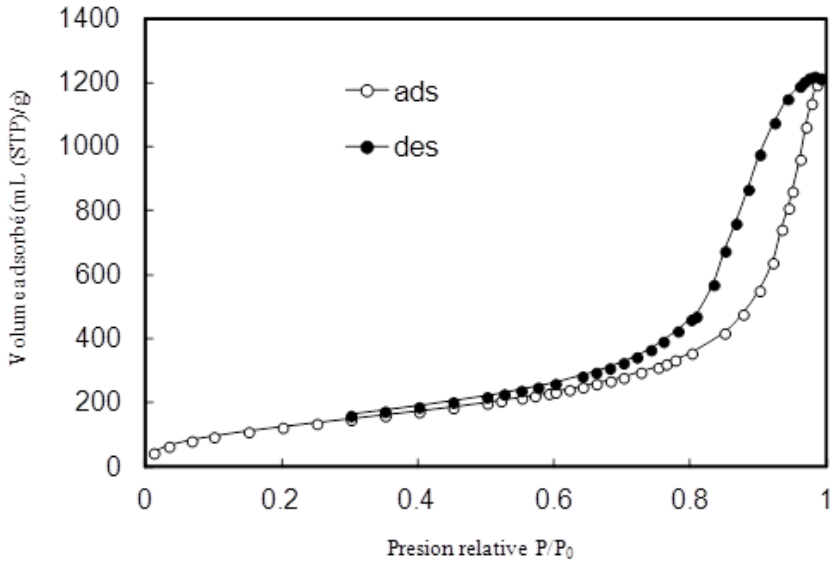



**Figure III.6.** Isotherme d'adsorption/désorption d'azote de nanoparticules de silicium poreux.

Le diamètre moyen des pores obtenus est de 19.5 nm, sous-estimé par l'absence de palier sur l'hystérésis. La surface spécifique et le volume poreux obtenu sont importants pour des objets de cette taille. La volumétrie d'adsorption et désorption d'azote confirme que les nanoparticules sont bien poreuses (**Tableau II.1**).

| Diamètre moyen des pores (nm) | Volume adsorbé (mL(STP)/g) | Volume poreux (mL/g) | $C_{BET}$ | $S_{BET}$ ($m^2$/g) |
|---|---|---|---|---|
| 19.5 | 1221 | 1.89 | 30 | 493 |

**Tableau III.1.** Caractéristiques texturales des nanoparticules de silicium poreux, déterminées à partir de l'isotherme d'adsorption/désorption des nanoparticules de silicium poreux.

Les nanoparticules de silicium poreux sont analysées par diffraction des rayons X sur poudre (DRX). Le diffractogramme aux grands angles des pSiNP est présenté sur la **figure III.7**. Nous observons plusieurs pics de diffraction (111), (220), (311), (400) et (331) sur le diffractogramme de nanoparticules de silicium poreux, révélant qu'après sonication les pSiNP

conservent leur cristallinité. Aux petits angles, aucun pic de diffraction, n'est observé, ce qui indique que la mésoporosité n'est pas ordonnée.

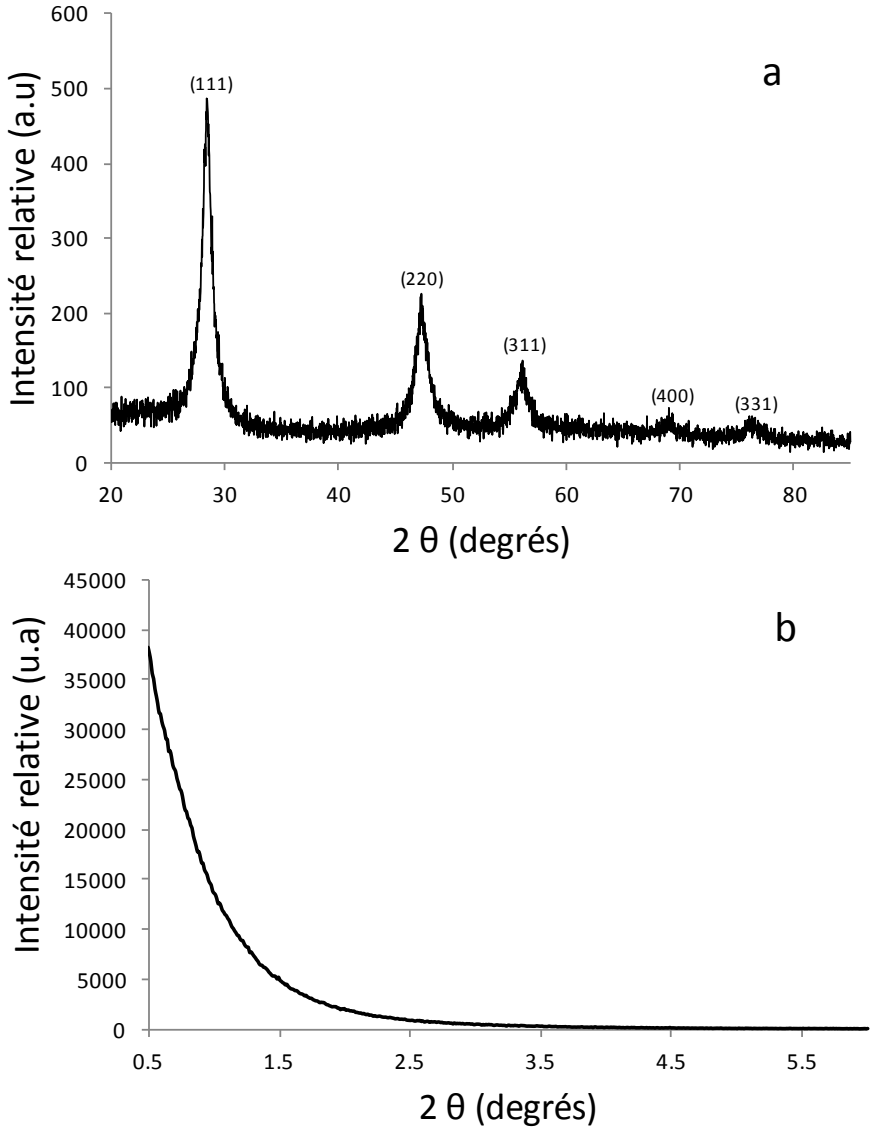



**Figure III.7.** Diffractogrammes de rayons X sur poudre des nanoparticules de silicium poreux : (a) aux grands angles, (b) aux petits angles.

Les nanoparticules de silicium poreux sont caractérisées par spectroscopie de vibration infrarouge. Le spectre infrarouge est présenté sur la **figure III.8**. Nous observons une bande à 2110 $cm^{-1}$, caractéristique de la vibration d'élongation de la liaison Si-H, liaison utilisée pour les réactions d'hydrosilylation. La bande à 881 $cm^{-1}$ correspond à la déformation de cette même liaison Si-H. La bande à 1050 $cm^{-1}$ est due à l'élongation de la liaison Si-O et confirme que ces nanoparticules sont partiellement oxydées. Les liaisons silanols Si-OH sont utilisées pour des réactions de silanisation. Les trois bandes vers 2980 $cm^{-1}$ sont caractéristiques de la

vibration d'élongation des liaisons C-H et sont probablement dues à la présence d'éthanol résiduel après sonication. La bande observée à 1395 $cm^{-1}$ pourrait correspondre à la déformation des liaisons C-H de l'éthanol greffé après ultrasonication.

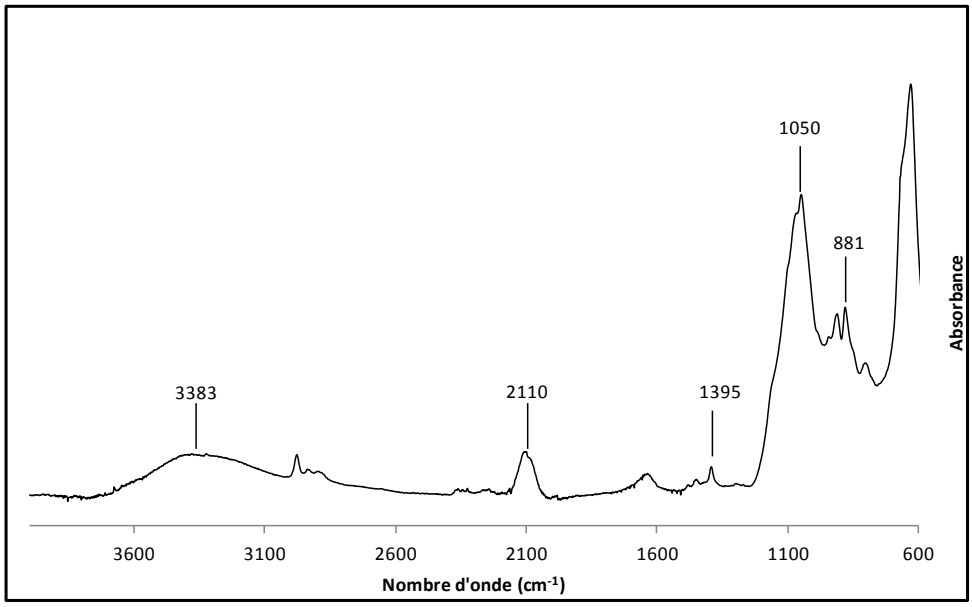



**Figure III.8.** Spectre infrarouge de nanoparticules de silicium poreux.

Les mesures de potentiel zêta, représentant la charge électrique, sont réalisées sur les nanoparticules de silicium poreux avec un Nanozêtasizer (Malvern). Les valeurs des charges électriques des pSiNP se situent entre - 50 mV et – 30 mV quel que soit le solvant employé (eau ou éthanol) (**Figure III.9**). Ceci s'explique par la présence de silanols à la surface des pSiNP.

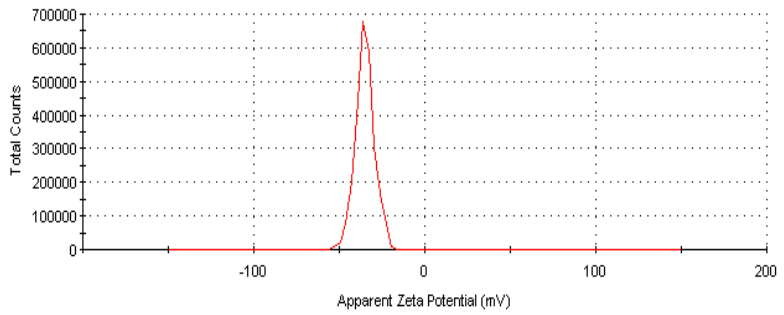



**Figure III.9.** Potentiel zêta de nanoparticules de silicium poreux fraichement préparées dans l'eau. La valeur négative obtenue ici est due à la présence de silanols à la surface

# Chapitre 4 : Nanoparticules de silicium poreux pour la thérapie photodynamique

# Introduction

Comme nous l'avons exposé dans le chapitre 1, la PDT est un traitement prometteur pour de petites tumeurs cancéreuses superficielles. La PDT fait intervenir trois facteurs : la lumière, un photosensibilisateur et l'oxygène. Aujourd'hui, la PDT est utilisée en clinique pour traiter des patients, mais nous savons que les photosensibilisateurs les exposent à des effets secondaires ce qui limitent leur utilisation. Les PS se retrouvent dans les tissus sains qui environnent la tumeur et entraînent une photosensibilité chez le patient. De plus, certaines molécules photosensibilisatrices sont hydrophobes et elles ont tendance à s'agréger en milieux aqueux et à modifier leurs propriétés photophysiques. C'est pourquoi, il est nécessaire d'encapsuler les PS dans les nanoparticules pour limiter les effets secondaires chez les patients.

Dans le chapitre 2, nous décrivons les avantages de l'utilisation des pSiNP dans le traitement du cancer. Nous montrons que les nanoparticules de silicium poreux absorbent la lumière biphotonique dans le proche infrarouge et se comportent comme un PS, en générant du $^1O_2$. Toutefois, le rendement quantique en $^1O_2$ est relativement faible. Dans ce chapitre 3, nous abordons la fonctionnalisation de différents photosensibilisateurs et d'agents de ciblage pour le traitement du cancer et c'est dans cette optique que s'inscrit l'objectif de nos travaux de recherche, pour élaborer un nanovecteurs pour la thérapie photodynamique.

- La première partie présente le greffage des pSiNP avec une porphyrine-NCS cationique et deux agents de ciblage (le mannose phényle squarate et le mannose cétone). Ces nanoparticules sont testées en imagerie et en thérapie monophotonique et biphotonique sur des cellules du cancer du sein (MCF-7).
- La deuxième partie traite du greffage des pSiNP avec la porphyrine-NCS et d'un agent de ciblage (mannose-6-carboxylate) pour cibler les cellules cancéreuses de la prostate (LNCaP). Ces nanoparticules sont testées en imagerie et en thérapie biphotonique.
- La troisième partie porte sur le greffage de deux complexes de ruthénium (II) sur les pSiNP pour des testes en imagerie et en thérapie monophotonique et biphotonique sur des cellules du cancer du sein (MCF-7).
- La quatrième partie expose la complexation de nanoparticules d'or sur des pSiNP greffées avec une porphyrine et un agent de ciblage (mannose éthyle squarate). Ces nanoparticules sont testées en imagerie et en thérapie biphotonique sur des cellules du cancer du sein (MCF-7).

# 1. Nanoparticules de silicium poreux pour le traitement du cancer du sein (MCF-7)

## 1.1 Résultats et discussion

Sept formulations de nanoparticules de silicium poreux ont été préparées pour une étude *in vitro* en imagerie et en thérapie photodynamique est testées sur des cellules du cancer du sein (MCF-7). Les sept formulations sont des pSiNP non greffées (**pSiNP**), deux formulations greffées avec un mannose avec un bras chimique différent (un mannose phényle squarate **pSiNP-Man** et un mannose cétone **pSiNP-NHNH$_2$Man**), deux formulations de pSiNP greffées avec la porphyrine-NCS (**pSiNP-Porph** et **pSiNP-NHNH$_2$Porph**), et deux formulations greffées avec la porphyrine-NCS et les deux mannoses différents (**pSiNP-Porph-Man** et **pSiNP-NHNH$_2$Porph-Man**) (**Figure IV.1)**.

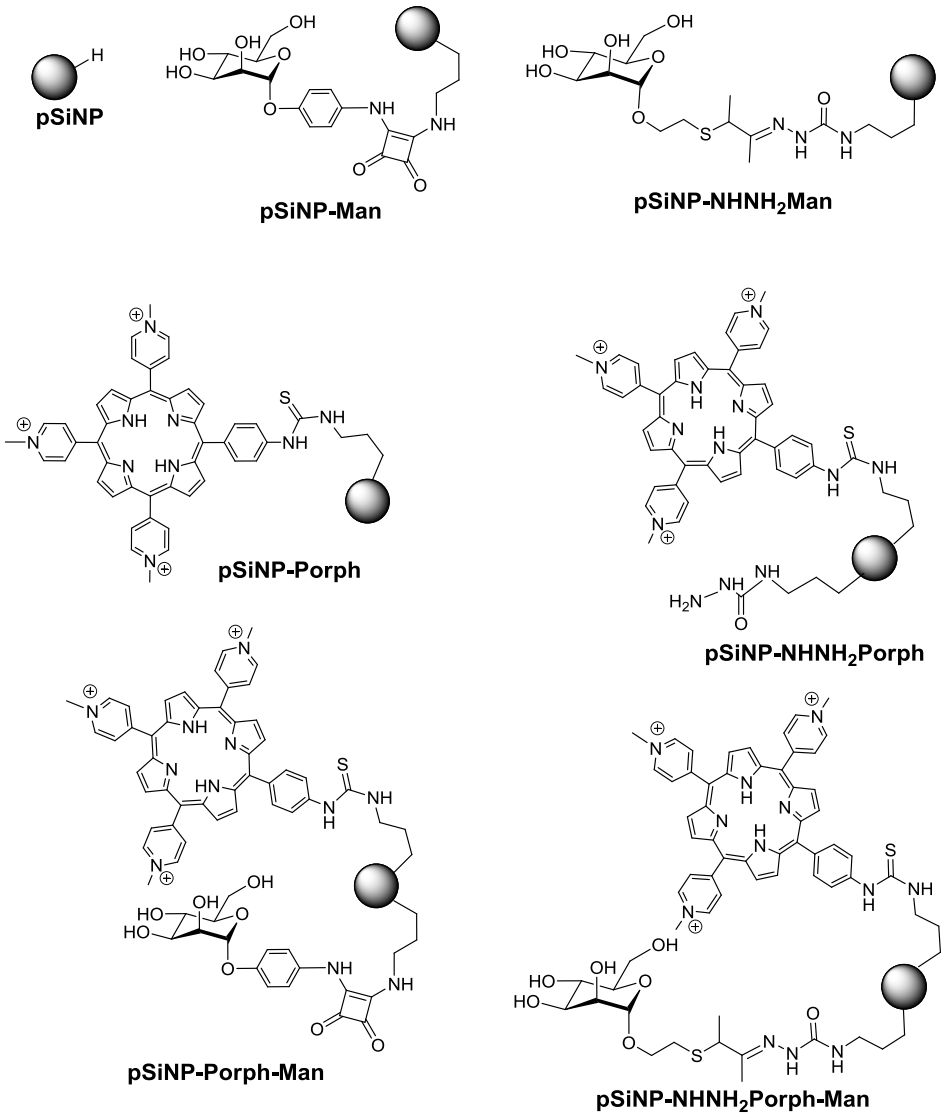



**Figure IV.1** Représentation schématique des 7 formulations.

La porphyrine, 5- (4-iso-thiocyanatophenyl) -10,15,20-tris (4-N-methylpyridiniumyl) porphyrine trichlorure, a été préparée par l'équipe de Philippe Maillard. Deux bras chimiques du mannose différents ont été testés, le premier mannose contient un groupement phényle squarate et le deuxième mannose un groupement cétone. Ces deux mannoses ont été préparés par l'équipe d'Alain Morère.

Dans un premier temps, les pSiNP ont été modifiées par hydrosilylation avec l'allylamine. Le greffage de l'allylamine permet d'introduire une fonction amine réactive sur les pSiNP pour le greffage de la porphyrine-NCS et du mannose phényle squarate (**Figure IV.2**).

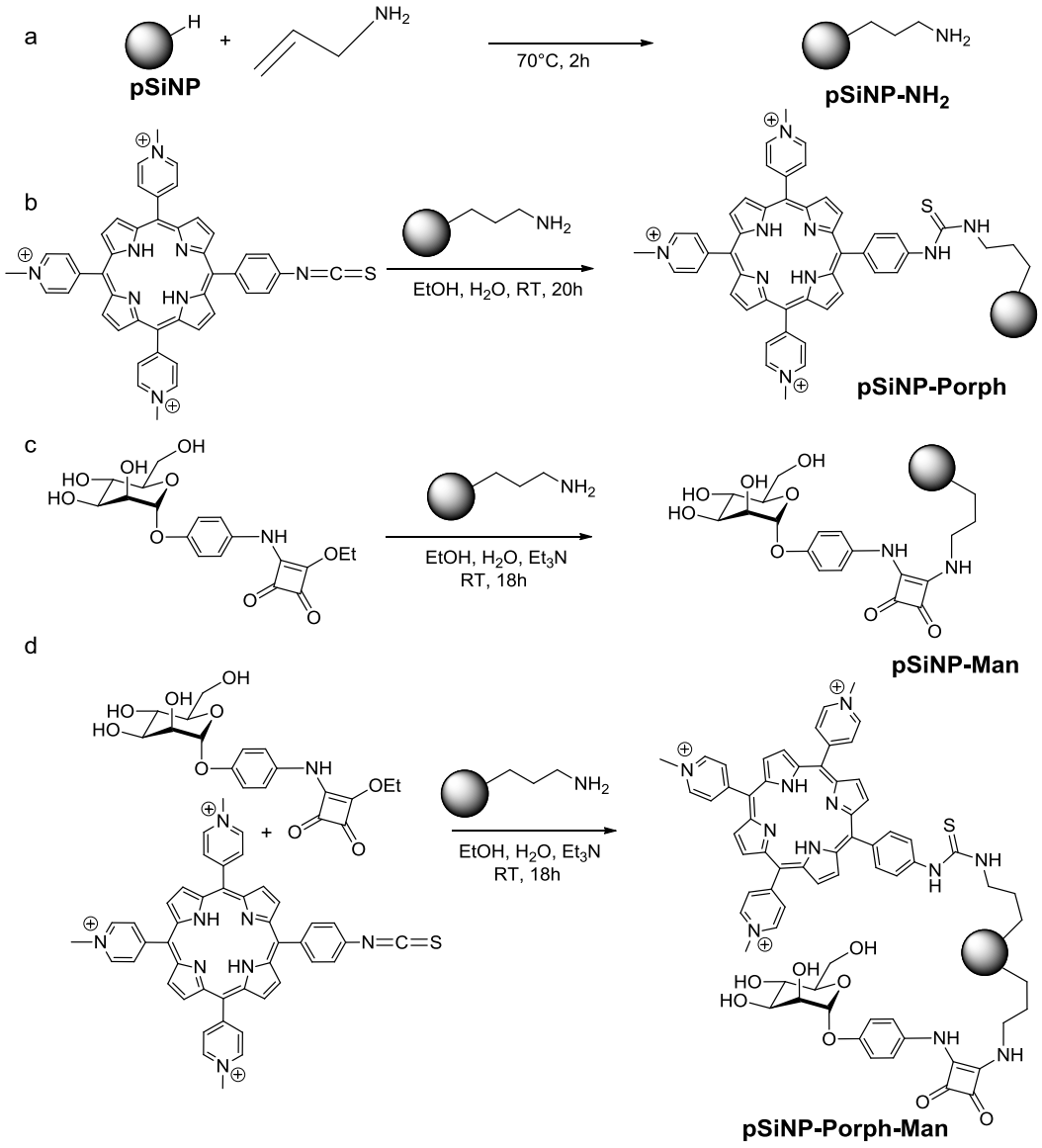



**Figure IV.2.** Schéma réactionnel : **a**: hydrosilylation de l'allylamine sur les pSiNP. **b**: réaction entre la porphyrine-NCS et l'amine. **c**: réaction entre le mannose phényle squarate et l'amine, **d**: réaction entre la porphyrine, mannose phényle squarate et l'amine.

Les formulations **pSiNP-Porph** et **pSiNP-Man** ont été préparées par greffage covalent de la porphyrine-NCS et du mannose phényle squarate sur les **pSiNP-$NH_2$**. La porphyrine a été greffée par réaction des amines libres des **pSiNP-$NH_2$**, avec le groupement isothiocyanate de la porphyrine. La formulation **pSiNP-Porph-Man** est préparée en une seule étape par greffage simultané de la porphyrine-NCS et du mannose phényle squarate sur les pSiNP-$NH_2$. Afin de greffer la porphyrine et le mannose cétone sur les pSiNP, il a été nécessaire de réaliser deux étapes d'hydrosilylation. La première étape d'hydrosilylation consiste à greffer l'allylamine sur les pSiNP et la deuxième étape de greffer un semicarbazide pour générer les **pSiNP-$NHNH_2$** (**Figure IV.3**).

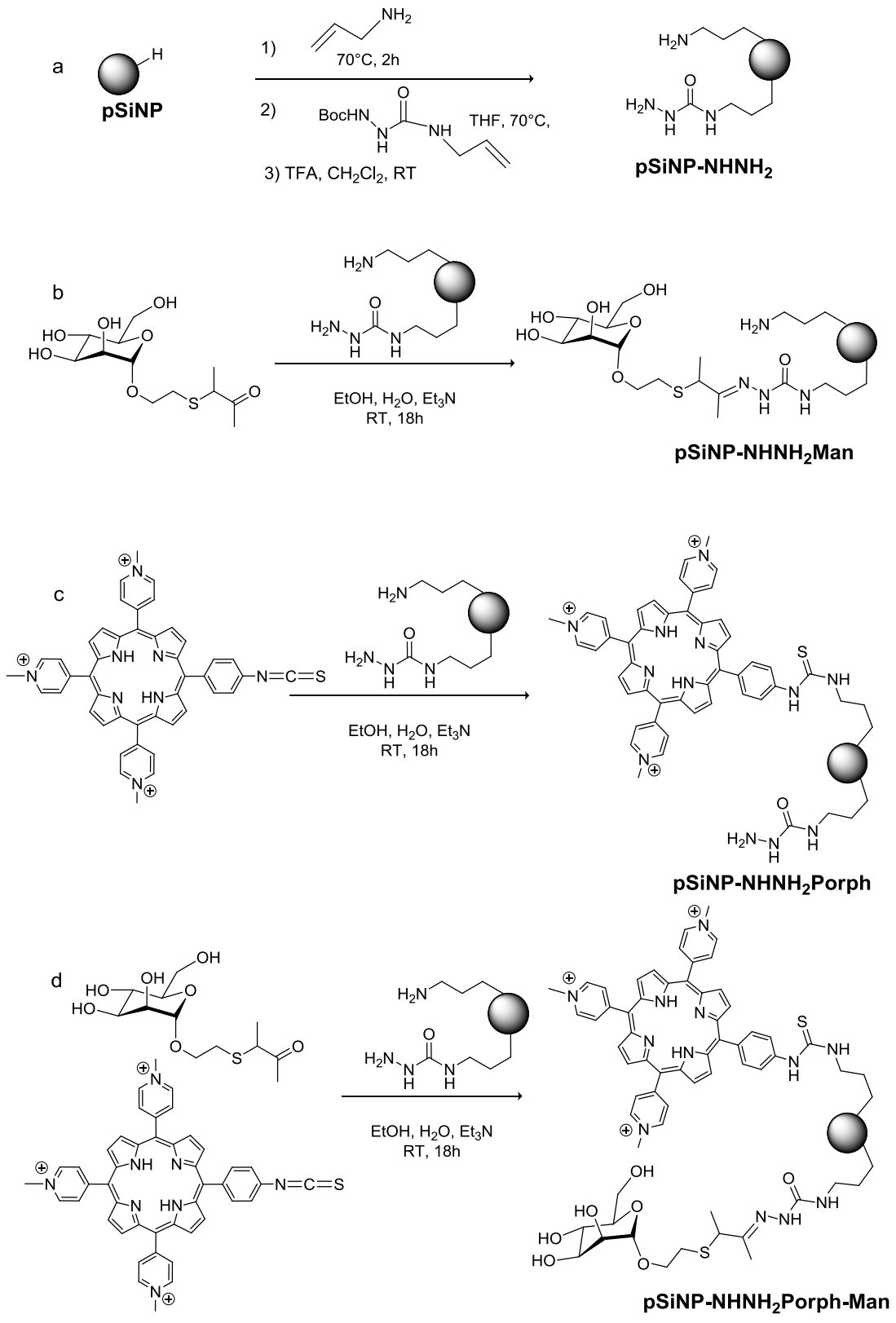



**Figure IV.3.** Schéma réactionnel : **a**: hydrosilylation de l'allylamine et du semicarbazide sur les pSiNP. **b** : réaction entre le mannose cétone et le semicarbazide. **c**: réaction entre la porphyrine-NCS et l'amine. **d**: réaction entre la porphyrine et l'amine et réaction entre le mannose cétone et le semicarbazide.

Le greffage de la porphyrine se fait avec l'amine libre de l'allylamine et le greffage du mannose cétone avec le semicarbazide pour former une liaison semicarbazone. Les formulations **pSiNP-NHNH$_2$-Porph** et **pSiNP-NHNH$_2$-Porph-Man** sont obtenues par greffage de la porphyrine puis du mannose cétone sur la surface des **pSiNP-NHNH$_2$** (**Figure IV.3**). Le greffage covalent de la porphyrine et des mannoses est confirmé par spectroscopie de vibration infrarouge (**Figure IV.4**).

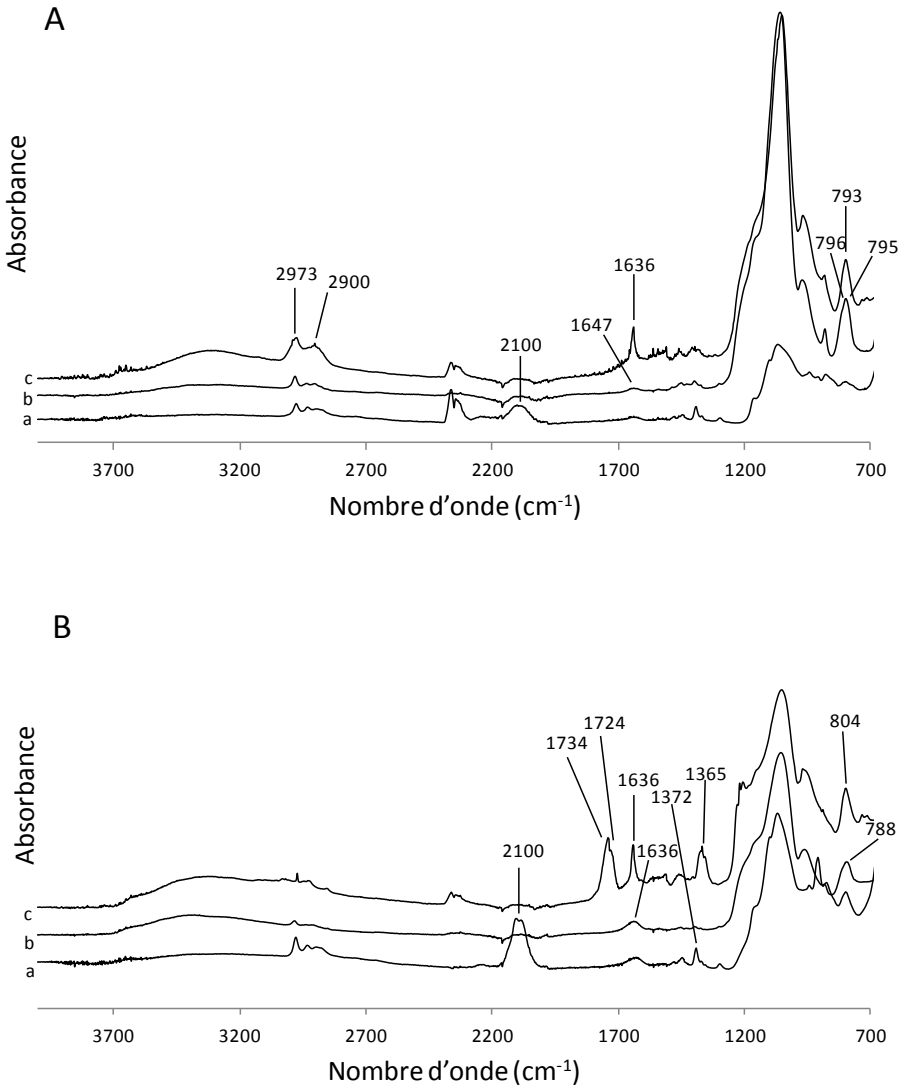



**Figure IV.4.** Spectre IR des nanoparticules greffées. **A**) a : pSiNP. b : après hydrosilylation des pSiNP avec l'allylamine. c : après greffage de la porphyrine-NCS et du mannose phényle squarate sur les pSiNP. **B**) a : pSiNP. b : après hydrosilylation des pSiNP avec l'allylamine. c : après greffage de la porphyrine-NCS et du mannose cétone sur les pSiNP.

**Spectre A:** Après l'hydrosilylation des pSiNP avec l'allylamine, la bande observée à 2100 $cm^{-1}$ caractéristique de la vibration d'élongation Si-H disparaît (**Figure IV.4.A.b**). La bande intense observée à 795 $cm^{-1}$ est attribuée à la vibration d'élongation de la liaison Si-C. Cette bande confirme la liaison covalente entre l'alcène de l'allylamine et l'hydrure du silicium. Ces bandes indiquent que, malgré le caractère nucléophile de l'amine, la réaction d'hydrosilylation a eu lieu. De plus, la bande intense observée à 1647$cm^{-1}$ est caractéristique de la vibration de déformation angulaire de la liaison N-H.

Après la fonctionnalisation des **pSiNP-$NH_2$** avec la porphyrine-NCS et le mannose phényle squarate (**Figure IV.4.A.c**), trois bandes intenses, correspondant aux vibrations d'élongations des liaisons C-H présentes dans la porphyrne et le mannose, sont observées entre 2850 $cm^{-1}$ et 2973 $cm^{-1}$. De plus, entre 1400 $cm^{-1}$ et 1600 $cm^{-1}$, on note la présence des liaisons C=C aromatiques de la porphyrine et du mannose phényle squarate. La bande intense à 1636 $cm^{-1}$ est caractéristique de la liaison thiourée indiquant le greffage covalent entre la porphyrine-NCS et l'amine de l'allylamine. Enfin, la bande observée à 793 $cm^{-1}$ est attribuée à la vibration d'élongation des liaisons Si-C. La bande large et intense observée à 1080 $cm^{-1}$ peut éventuellement masquer d'autres vibrations d'élongation comme C-O et C-N.

**Spectre B:** Après l'hydrosilylation des pSiNP avec l'allylamine et le semicarbazide, un spectre similaire est obtenu pour **pSiNP-$NHNH_2$** (**Figure IV.4.B.b**) avec des bandes de vibration à 795 cm-1 et à 1636 cm-1 caractéristique de la vibration d'élongation de la liaison Si-C et de la vibration de déformation angulaire de la liaison N-H, respectivement.

Après la fonctionnalisation des **pSiNP-$NHNH_2$** avec la porphyrine-NCS et le mannose cétone (**Figure IV.4.B.c**), une bande intense à 1636 $cm^{-1}$ caractéristique de la liaison thiourée est observée, ce qui confirme le greffage covalent de la porphyrine-NCS via sa fonction thiocyanate. La bande à 1734 $cm^{-1}$ est attribuée à la liaison semicarbazone formé par la réaction entre le mannose cétone et le semi-carbazide. La bande confirme le greffage covalent du mannose sur les nanoparticules.

Le potentiel zêta qui mesure la charge de surface des nanoparticules confirme le succès de la fonctionnalisation de la porphyrine sur les nanoparticules (**Tableau IV.1**).

| Echantillons | Potentiel Zêta (mV) |
|---|---|
| pSiNP | -29.3 ± 0.8 |
| pSiNP-$NH_2$ | -25.9 ± 1.35 |
| pSiNP-Porph | 22.9 ± 0.96 |
| pSiNP-Man | -26.9 ± 1.5 |
| pSiNP-Porph-Man | 25.6 ± 0.5 |
| pSiNP-$NHNH_2$Porph | 17.5 ± 0.66 |
| pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man | 9.79 ± 0.8 |

**Tableau IV.1.** Potentiel zêta des 7 formulations.

La valeur de la charge négative des pSiNP est due à l'oxydation partielle des nanoparticules (présence de liaisons silanols à la surface des nanoparticules). Après le greffage de la porphyrine-NCS cationique, la charge des formulations suivantes (pSiNP-Porph, pSiNP-Porph-Man, pSiNP-$NHNH_2$Porph, pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man) est positive.

Les quantités de porphyrine et de mannose greffés sont déterminées par spectroscopie UV-vis (**Tableau IV.2**).

| | Quantité de Porph (µg par mg de pSiNP) | Quantité de Porph (mmol par g de pSiNP) | Quantité de Man (µg par mg de pSiNP) | Quantité de Man (mmol par g de pSiNP) |
|---|---|---|---|---|
| pSiNP-Porph | 67 | 0.093 | | |
| pSiNP-Man | | | 124 | 0.69 |
| pSiNP-Porph-Man | 67 | 0.093 | 84 | 0.47 |
| pSiNP-$NHNH_2$Porph | 49 | 0.068 | | |
| pSiNP-$NHNH_2$Man | | | 18 | 0.1 |
| pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man | 43 | 0.060 | 18 | 0.1 |

**Tableau IV.2.** Résultats des quantifications de porphyrine et de mannoses (mannose phényle squarate et mannose cétone) greffés sur les pSiNP.

Une quantité de 67 µg (0,093 mmol) de porphyrine par mg de pSiNP est obtenue pour les formulations pSiNP-Porph et pSiNP-Porph-Man. Dans cette réaction, la présence de la triéthylamine catalyse la réaction de fonctionnalisation de la porphyrine et du mannose sur les pSiNP-$NH_2$. Une quantité proche de porphyrine est obtenue avec les formulations pSiNP-$NHNH_2$Porph et pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man, soit 0,060 mmol et 0,068 mmol par mg de pSiNP, respectivement. Une quantité de 0,69 mmol de mannose phényle squarate par mg de pSiNP est obtenue pour la formulation pSiNP-Man. Une plus faible quantité de mannose phényle squarate est greffée pour la formulation pSiNP-Porph-Man avec 0,47 mmol par mg de pSiNP. Une plus faible quantité de mannose cétone est greffée sur la formulation pSiNPNHNH$_2$ (0,1 mmol par mg de pSiNP) car nous utilisons la fonction semicarbazide.

L'internalisation cellulaire des 7 formulations de pSiNP a été étudiée par microscopie de fluorescence confocale et par microscopie de fluorescence à 2-photons. Les images de microscopie de fluorescence confocale ($\lambda_{exc}$=405 nm) de cellules du cancer du sein (MCF-7) sont présentées sur la (**Figure IV.5**). Pour ces expériences, les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) ont été incubées pendant 5 heures à une concentration de 40 µg/mL avec les formulations suivantes : **pSiNP nues**, **pSiNP + porphyrine libre**, **pSiNP-Porph**, **pSiNP-Porph-Man**, **pSiNP-Porph-Man + Mannose libre**, **pSiNP-$NHNH_2$Porph**, **pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man** et **pSiNP-Porph-Man + Mannose libre**. Lorsque les cellules MCF-7 sont incubées avec les **pSiNP** et les **pSiNP + Porph libre** aucune fluorescence n'est détectée en imagerie monophotonique. Par comparaison, la photoluminescence de la porphyrine greffée sur les nanoparticules (**pSiNP-Porph** et **pSiNP-$NHNH_2$-Porph**) est détectée à l'intérieur des cellules MCF-7 et met en évidence l'internalisation de la porphyrine dans le cas où elle est greffée sur les pSiNP.[5] Nous observons une internalisation des nanoparticules plus efficace, lorsqu'elles sont fonctionnalisées avec du mannose (**pSiNP-Porph-Man** et **pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man**), avec la présence d'agrégats fortement luminescents, comparé aux systémes **pSiNP-Porph** et **pSiNP-$NHNH_2$-Porh**. Ceci montre que le mannose joue un rôle important dans l'internalisation cellulaire des nanoparticules. Afin de montrer l'implication des récepteurs au mannose dans le processus d'endocytose, nous avons saturé ces récepteurs avec un excès de mannose libre (10 mM) 10 min avant l'incubation des cellules avec les formulations **pSiNP-Porph-Man** et **pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man**. Cette expérience appelée réversion au mannose a montré qu'aucun agrégat luminescent n'est détecté à l'intérieur des cellules, ce qui de nouveau confirme le rôle du mannose dans le mécanisme d'internalisation cellulaire (**pSiNP-Porph-Man** + **Man libre** et **pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man** + **Man libre**) (**Figure IV.5**).

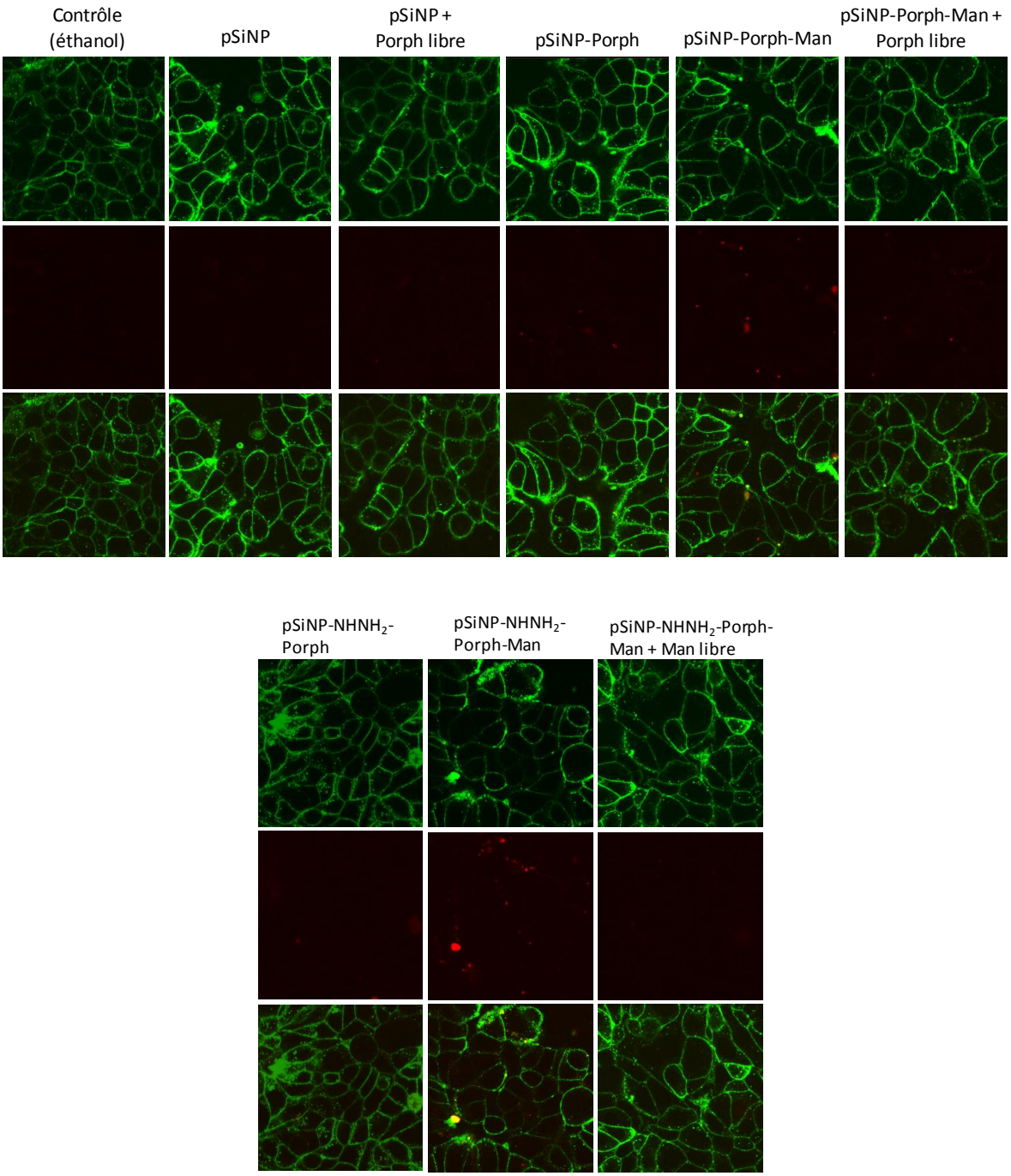
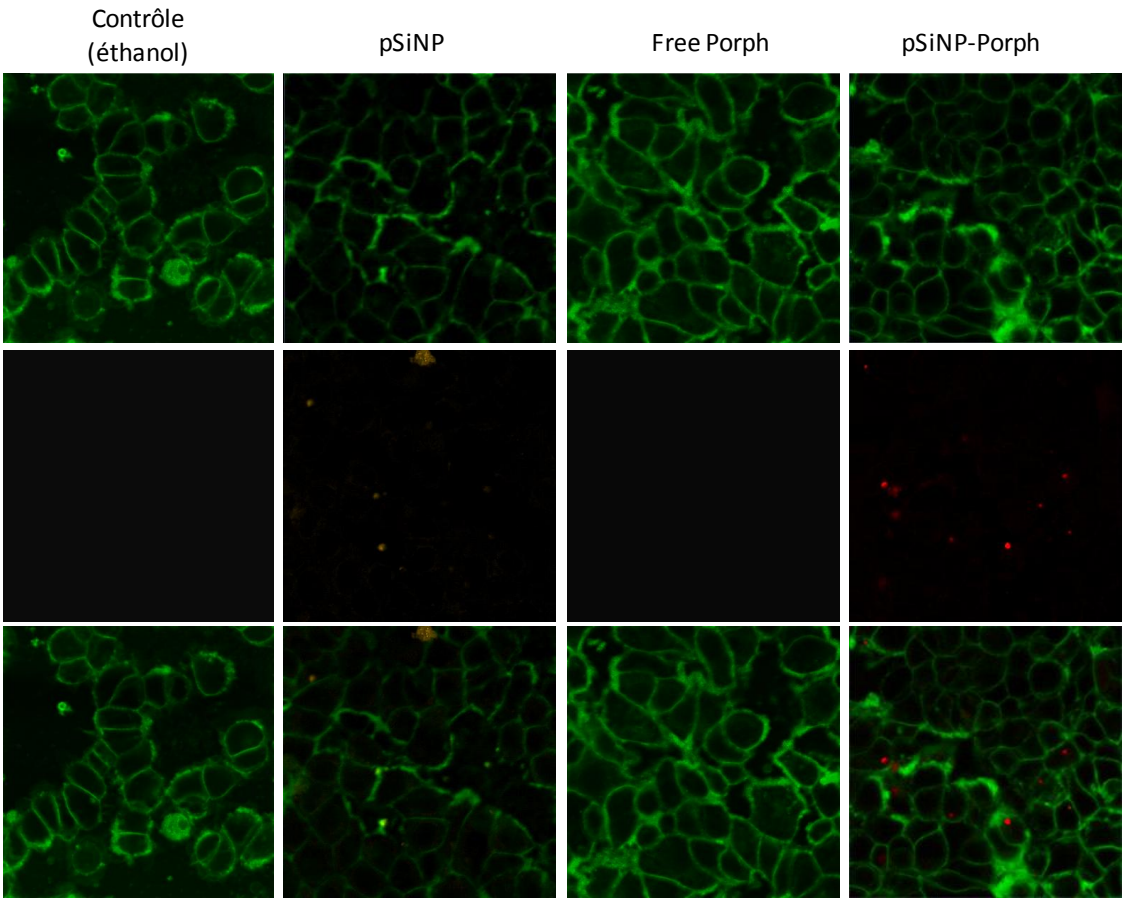



**Figure IV.5.** Images de microscopie de fluorescence confocale monophotonique ($\lambda_{exc}$=405 nm) de cellules MCF-7. Les cellules sont incubées pendant 5 heures à 40 µg.mL$^{-1}$ avec les formulations (pSiNP, pSiNP + Porph libre, pSiNP-Porph, pSiNP-Porph-Man, pSiNP-Porph-Man + Man libre, pSiNP-NHNH$_2$-Porph, pSiNP-NHNH$_2$Porph-Man et pSiNP-NHNH$_2$Porph-Man + Man libre). La membrane cellulaire est colorée avec un marqueur (vert). En haut : fluorescence du marqueur membranaire visualisé à 488 nm. Au milieu : nanoparticules visualisées. En bas : superposition d'images montrant la fluorescence du marqueur membranaire et celles des nanoparticules.

Nous avons également étudié l'internalisation cellulaire des formulations par microscopie de fluorescence à 2-photon. Les expériences d'imagerie de fluorescence à 2-photons sont présentées sur la (**Figure IV.6**). Dans ces expériences, les cellules du cancer du sein MCF-7 ont été incubées pendant 5 heures à 40 µg/mL avec les différentes formulations suivantes : **pSiNP**, **pSiNP-Man**, **pSiNP-Porph**, **pSiNP-Porph-Man**, **pSiNP-Porph-Man + Man libre**, ainsi qu'une concentration équivalente en porphyrine libre. Les cellules incubées ont été rincées puis excitées avec un laser pulsé à 750 nm pour être imagées.



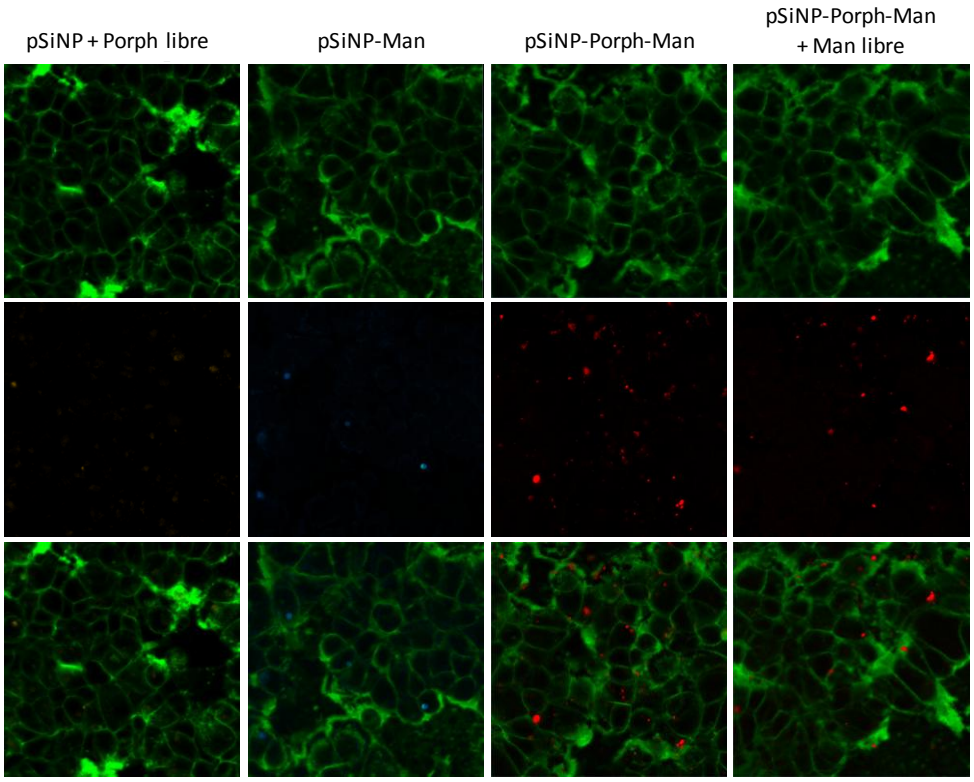



**Figure IV.6.** Images de microscopie de fluorescence multiphotonique de cellules du cancer du sein MCF-7. Les cellules sont incubées 5 heures à 40 µg.mL$^{-1}$ avec les nanoparticules (pSiNP, Porph libre, pSiNP-Porph, pSiNP + Porph libre, pSiNP-Man, pSiNP-Porph-Man et pSiNP-Porph-Man + Man libre). La membrane cellulaire est colorée avec un marqueur (vert). Les images de fluorescence sont capturées avec un détecteur spectral pendant une excitation biphotonique à 750 nm. Ces photos représentent au moins 3 expériences indépendantes. En haut: coloration de la membrane cellulaire. Au milieu: fluorescence émise entre 620 et 700. En bas: superposition de deux images de fluorescence.

Les représentations de tâches fluorescentes jaunes brunes détectées correspondent aux pSiNP. L'observation de cette fluorescence confirme que les pSiNP absorbent la lumière biphotonique, comme précédemment décrit par Park *et al.*[134] Il est intéressant de noter que les pSiNP-Man révèlent une fluorescence bleue-verte (480-560 nm **Figure IV.6**). Cette luminescence bleue-verte des **pSiNP-Man** peut s'expliquer par une oxydation partielle de la surface des pSiNP alors que l'émission rouge des pSiNP est attribuée au confinement quantique du silicium poreux. [261, 262] Nous avons trouvé que les pSiNP greffées avec le mannose s'oxydaient plus rapidement en milieu aqueux que les pSiNP nues. Ceci s'explique par l'augmentation de l'hydrophilie de la surface des nanoparticules greffées avec le mannose. En comparaison, aucune fluorescence n'apparaît avec la **Porph libre** en concentration équivalente sous excitation biphotonique. Lorsque les cellules MCF-7 sont incubées avec les formulations **pSiNP-Porph** ou **pSiNP-Porph-Man** et exposées à une excitation

biphotonique, les nanoparticules présentent une émission de fluorescence rouge (principalement dans le domaine spectral 600-670 nm), pouvant être attribuée à la porphyrine (**Figure IV.7**).

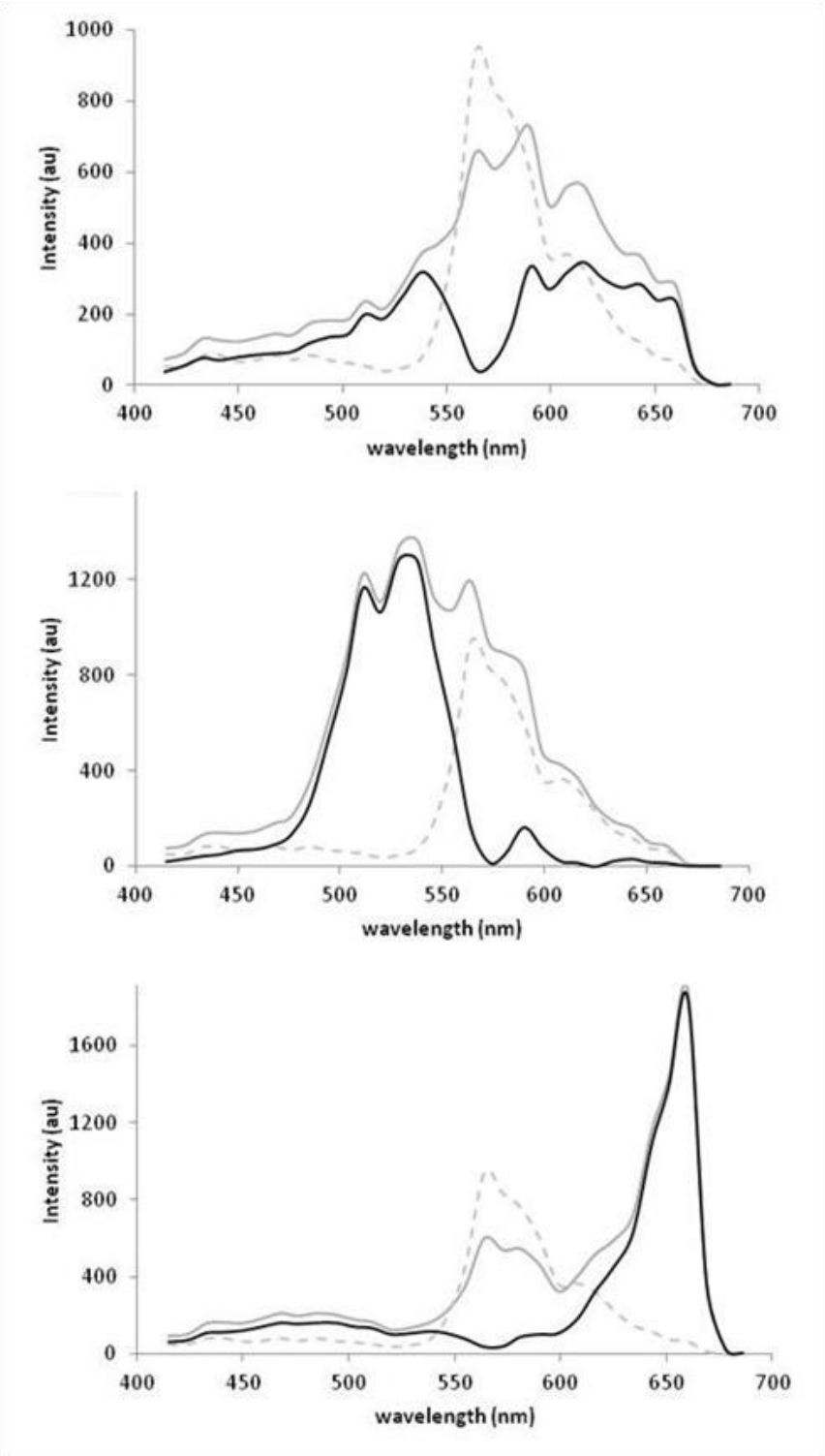



**Figure VI.7.** Spectre de l'émission biphotonique des différentes formulations de pSiNP.

La **figure V.7** correspond aux spectres d'émissions des pSiNP (a), pSiNP-Man (b) et pSiNP-Porph-Man (c)sous excitation biphotonique (760 nm). Ces spectres d'émissions ont été enregistrés avec un microscope confocal LSM 780 LIVE, équipé d'un détecteur GaAsP. La courbe (c) correspond à l'émission de la formulation **pSiNP-Porph-Man** avec une intense fluorescence intense caractéristique de la porphyrine alors qu'aucune fluorescence rouge n'est détectée pour la formulation **pSiNP-Man** courbe (b).

Ce résultat de fluorescence rouge suggère que la porphyrine est indirectement excitée sous irradiation biphotonique par un mécanisme de transfert d'énergie entre les pSiNP et la porphyrine. En effet, la possibilité d'un transfert d'énergie entre le silicium poreux est un marqueur absorbé dans ses pores a été rapportée par Létant *et al*.[263] La **figure IV.8** représente le spectre d'émission de fluorescence de la formulation **pSiNP-Porph-Man** sous excitation monophotonique (434 nm OPEF) et biphotonique (800nm TPEF).

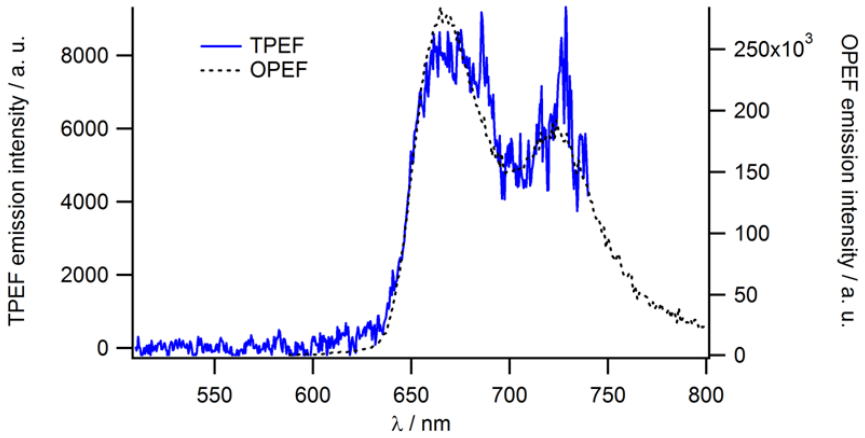



**Figure IV.8.** Fluorescence de pSiNP-Porph-Man en suspension dans l'éthanol absolu sous excitation biphotonique à 800 nm et fluorescence de pSiNP-Porph-Man sous excitation monophotonique à 434 nm.

Sous irradiation biphotonique (800 nm), on constate aussi que **pSiNP-Porph-Man** présente une émission de fluorescence bien caractéristique de la porphyrine. (**Figure IV.8**). De plus, la section efficace à 2-photons ($\sigma_2$) a été mesurée pour les formulations **pSiNP-Porph** et **pSiNP-Porph-Man** avec respectivement des valeurs de 300 GM et 360 GM (**Figure IV.9**). Ces valeurs de $\sigma_2$ obtenues pour les porphyrines greffées aux nanoparticules excédent largement la valeur de $\sigma_2$ de la porphyrine seule ($\sigma_2$ = 55 GM à 800 nm).

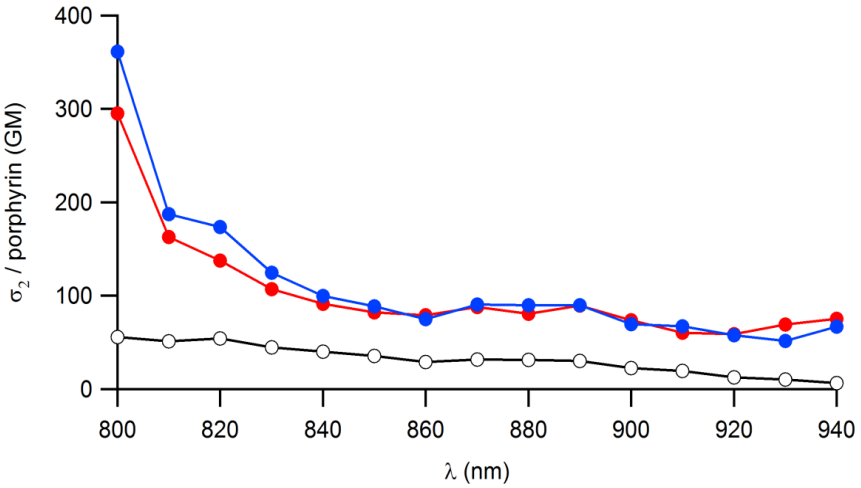



**Figure IV.9.** Spectre d'absorption à deux photons de pSiNP-Porph (rouge), de pSiNP-Porph-Man (bleu) et de la porphyrine seule en suspension dans de l'éthanol absolu.

Les images *in vitro* révèlent aussi que toutes les formulations de nanoparticules étudiées sont internalisées par les cellules MCF-7, les nanoparticules greffées étant internalisées plus efficacement que les autres types de nanoparticules et elles semblent se localiser dans les lysosomes (**Figure IV.10**).

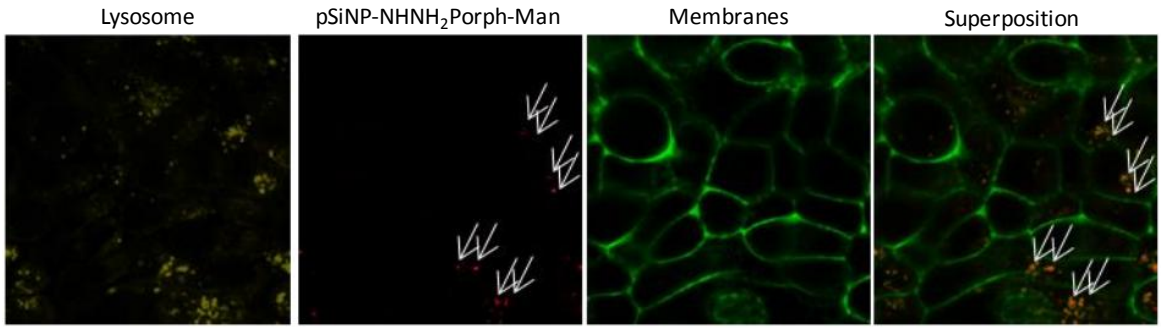



**Figure IV.10.** Localisation des pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man avec les lysosomes. Les cellules MCF-7 sont incubées pendant 5h avec 40 µg/mL de pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man puis imagées avec un microscope confocal multiphotonique. Les images de fluorescence sont capturées avec un détecteur spectral pendant l'excitation biphotonique à 750 nm. Les images montrent que les **pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man** sont localisées dans les lysosomes.

Enfin, ici l'expérience, réalisée avec un excès de mannose (réversion au mannose) dans le milieu de culture, montre une inhibition de l'internalisation des nanoparticules. L'inhibition de l'internalisation se caractérise par une fluorescence localisée plutôt sur la membrane cellulaire que dans le domaine intracellulaire (**Figure IV.6)**. Ceci confirme le rôle

du mannose dans l'internalisation des nanoparticules par les cellules MCF-7 observé dans les expériences d'imagerie à un photon (**Figure IV.5)**.

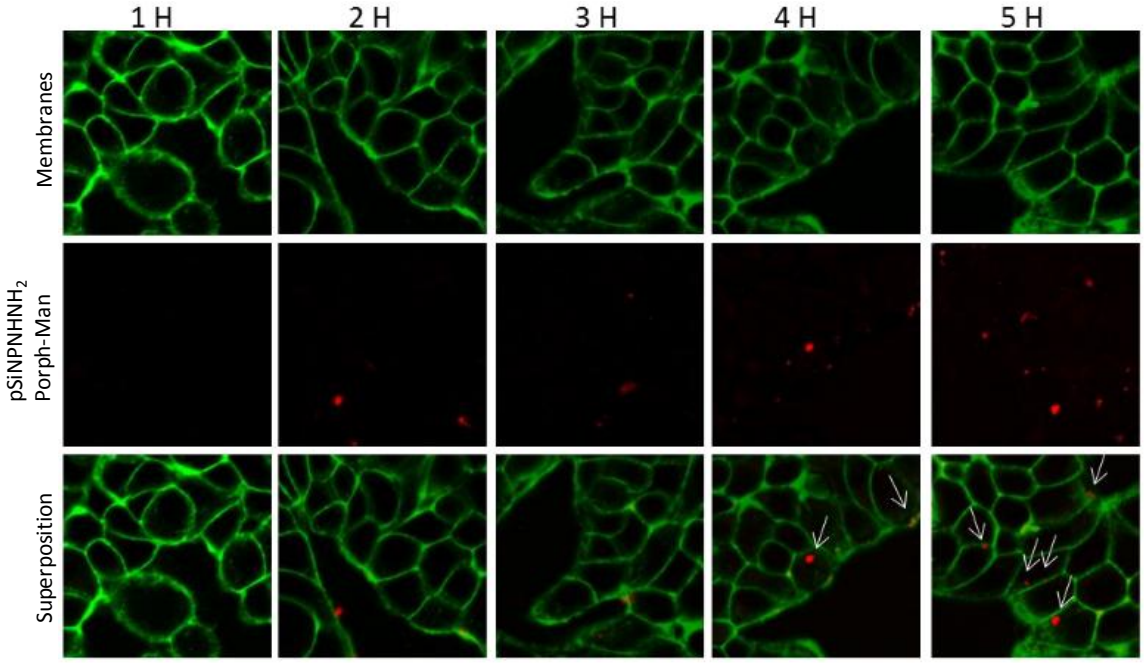



**Figure IV.11.** Accumulation des pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man dans les cellules cancéreuses du sein MCF-7. Les cellules sont incubées pendant 1, 2, 3, 4 et 5 h avec 40 µg/mL puis imagées avec un microscope confocal multiphotonique. Les images de fluorescence sont capturées avec un détecteur spectral pendant l'excitation biphotonique à 750 nm. Les flèches indiquent la présence des nanoparticules dans les cellules MCF-7. Les images montrent une meilleure accumulation des **pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man** après 5 heures d'incubation.

Après avoir mis en évidence le potentiel d'internalisation des formulations des nanoparticules par imagerie, l'efficacité photodynamique de ces différentes formulations a ensuite été évaluée en *in vitro* sous excitation monophotonique et biphotonique (**Figure IV.12**).

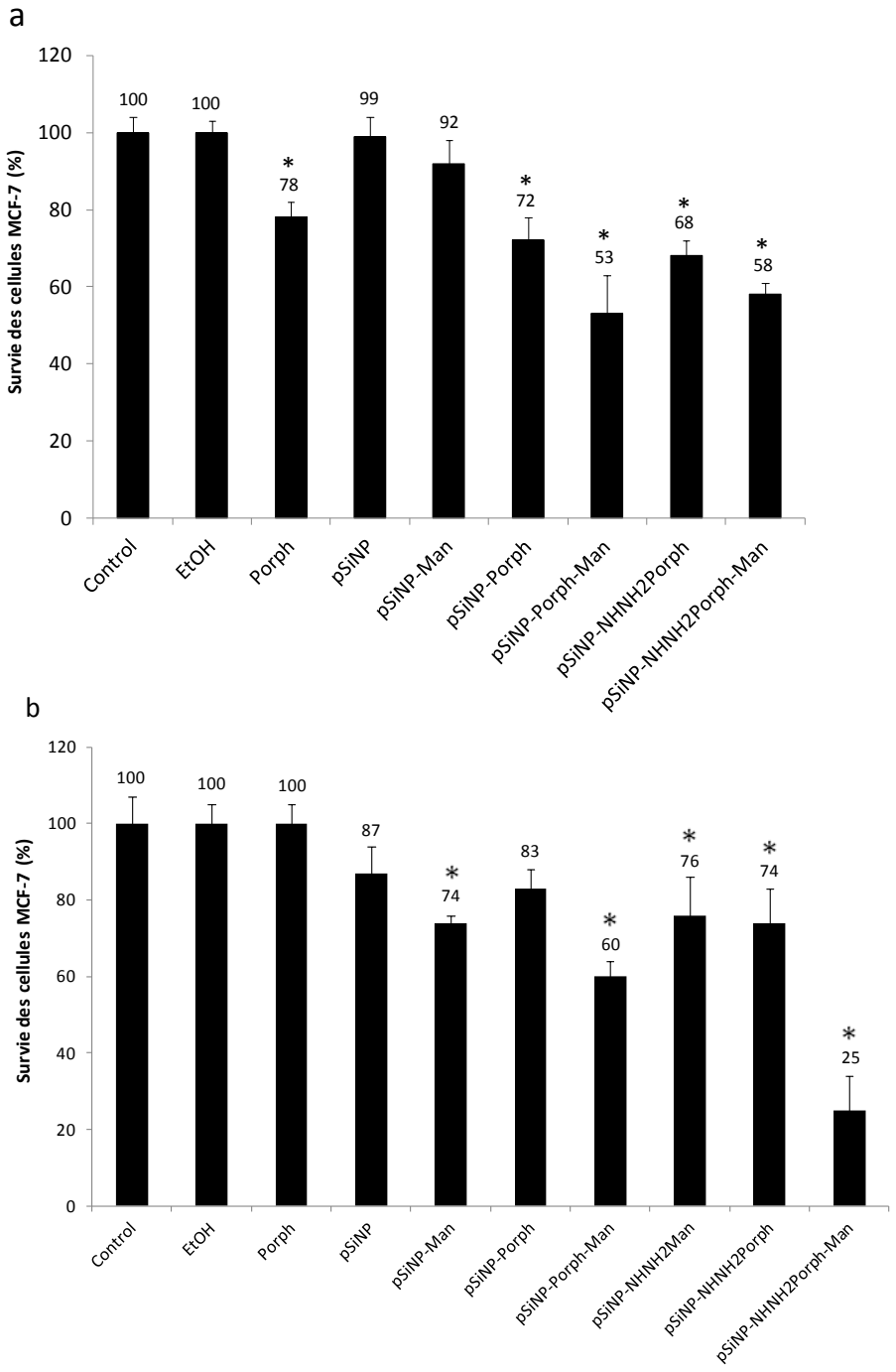



**Figure IV.12.** Efficacité photodynamique *in vitro* sous excitation monophotonique et biphotonique sur des cellules MCF-7 incubées avec : du milieu de culture contrôle contenant 4% d'éthanol (EtOH, expérience de contrôle), Porph, pSiNP, pSiNP-Man, pSiNP-Porph, pSiNP-Porph-Man, pSiNP-$NHNH_2$Porph et pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man. **a** : Irradiation à 650 nm, 7 mW/cm$^2$, 40 min. Le décompte des cellules vivantes réalisé par un test MTS 2 jours après l'irradiation. **b** : Irradiations à 800 nm, 3 scans de 1.57 s. Décompte des cellules vivantes est réalisé par un test MTS 2 jours après l'irradiation. Les barres graphiques représentent les moyennes de trois expériences ± écart-type. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le Student t test.*: P <0,05 et considérée comme statistiquement différente des valeurs de contrôle.

Les cellules MCF-7 ont été incubées pendant 5 heures à une concentration de 40 µg/mL avec les formulations suivantes : **pSiNP**, **pSiNP-Man**, **pSiNP-Porph**, **pSiNP-Porph-Man**, **pSiNP-NHNH$_2$Porph** et **pSiNP-NHNH$_2$Porph-Man**. Les cellules MCF-7 ont également été incubées pendant 5 heures avec une concentration équivalente en porphyrine libre **Porph libre**. Les cultures cellulaires ont été exposées à une irradiation monophotonique (650 nm, 14 J cm$^{-2}$) pendant 40 min (Les détails expérimentaux sont donnés dans la partie matériels et méthodes ci-après). Après deux jours d'incubation, un test MTS a été effectué pour déterminer la phototoxicité (**Figure IV.12.a**). La toxicité des formulations **pSiNP-NHNH$_2$Porph** et **pSiNP-NHNH$_2$Porph-Man** à différentes concentrations a également été évaluée en l'absence d'irradiation. Ces expériences ont montré que les nanoparticules fonctionnalisées sont non toxiques à des concentrations allant jusqu'à 125 µg/mL (**Figure IV.13**).

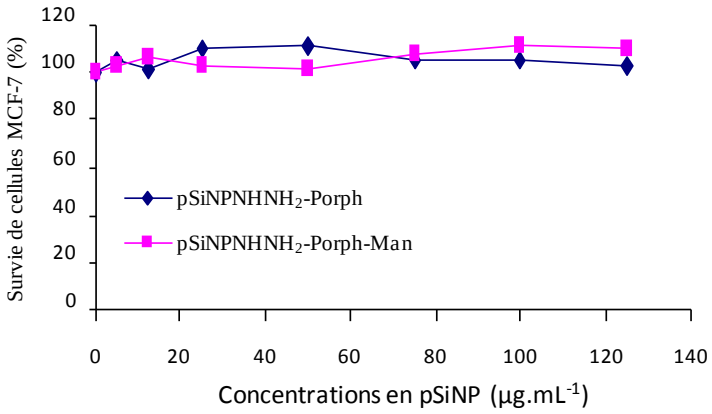



Figure 6

**Figure IV.13.** Absence de cytotoxicité de pSiNP-NHNH$_2$Porph et pSiNP-NHNH$_2$Porph-Man dans l'obscurité. Les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) sont traitées avec des concentrations croissantes (de 5 à 125 µg.mL-1) de pSiNP. Un test MTT est effectué 72 h après le traitement et révèle une absence d'altération cellulaire.

Le test de cytotoxicité révèle que sous irradiation monophotonique, les formulations **pSiNP** et **pSiNP-Man** sont non toxiques pour les cellules MCF-7 (**Figure IV.4.a**) ceci est dû à la faible absorbance à 650 nm des pSiNP (**Figure IV.14**).

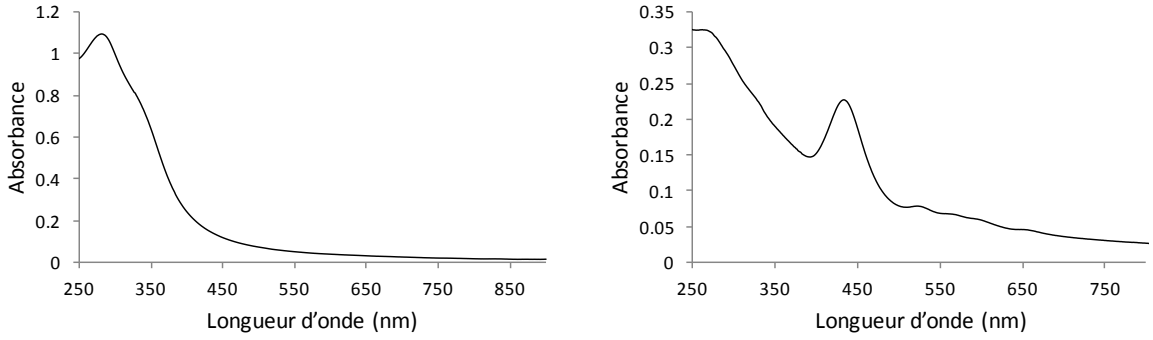



**Figure IV.14.** Spectre UV-vis des pSiNP et des pSiNP greffées avec la porphyrine-NCS, bande de soret à 449 nm et bandes Q entre 550 et 775 nm.

En revanche, la porphyrine libre induit une toxicité importante avec 22% de mort cellulaire. Ce résultat s'explique par le fait que la porphyrine est cationique et en raison de sa charge, il est probable que la porphyrine libre soit liée à la membrane cellulaire et/ou internalisée dans les cellules, même si celle-ci n'est pas détectée en imagerie monophotonique dans les conditions que nous avons utilisées (**Figure IV.5**). Les cellules MCF-7 traitées avec les formulations suivantes **pSiNP-Porph** et **pSiNP-NHNH$_2$Porph**, où la porphyrine est greffée aux nanoparticules, montrent une légère augmentation de leurs toxicités par rapport à la porphyrine libre (28% et 32% respectivement). Ces résultats révèlent un meilleur taux de toxicité et confirment l'utilité des nanoparticules pour la vectorisation de PS. En outre, lorsqu'elles sont fonctionnalisées avec le mannose, les nanoparticules **pSiNP-Porph-Man** et **pSiNP-NHNH$_2$Porph-Man** génèrent une phototoxicité importante de 47% et de 42% respectivement. L'augmentation de la cytotoxicité est attribuée à une capture plus efficace par les cellules MCF-7 lorsque les nanoparticules contiennent du mannose. Ces résultats sont en accord avec les expériences d'imagerie. Les formulations **pSiNP-Porph-Man** et **pSiNP-NHNH$_2$Porph-Man** contiennent des quantités comparables en porphyrine (67 µg et 43 µg par mg de pSiNP, respectivement), mais des quantités de mannose différentes (84 µg et 18 µg par mg de pSiNP, respectivement) et elles induisent une toxicité similaire aux cellules. Nous supposons que l'internalisation cellulaire dépend plus du nombre de récepteurs disponibles sur la surface de la membrane cellulaire que du nombre de mannoses greffés sur les nanoparticules.[264]

Ces formulations ont ensuite été testées *in vitro* en PDT sous excitation biphotonique sur des cellules de cancer du sein MCF-7(**Figure IV.12.b**). L'irradiation biphotonique réalisée au moyen d'un laser pulsé en utilisant un microscope confocal à une longueur d'onde d'irradiation de 800 nm. Les cellules ont été exposées à 3 impulsions laser d'une durée de 1,57 s chacune (Les détails expérimentaux sont donnés dans la partie matériels et méthodes). Deux jours après l'irradiation, le pourcentage de cellules vivantes a été déterminé par dosage MTS. Dans ces expériences, la porphyrine seule sous excitation biphotonique, s'est révélée non toxique. En revanche, les pSiNP nues génèrent une toxicité significative sous excitation biphotonique avec 13% de mort cellulaire. Ce résultat confirme que les pSiNP sous irradiation biphotonique sont capables de produire du $^1O_2$ et des ROS, alors que les pSiNP n'étaient pas toxiques sous excitation monophotonique. Ici, l'effet modéré observé avec les pSiNP nues peut être attribué à un faible rendement de génération en $^1O_2$ du silicium poreux,[255] ainsi qu'à un faible taux d'internalisation des pSiNP nues dans les cellules, comme observé avec les expériences d'imagerie (**Figure IV.4**). En comparaison, l'effet photodynamique des formulations **pSiNP-Man** et **pSiNP-NHNH$_2$Man** c'est révélé plus important et avec environ 25% de mort cellulaire, confirmant de nouveau l'implication du mannose dans l'internalisation des nanoparticules dans les cellules MCF-7. Les pSiNP fonctionnalisées avec les mannoses et la porphyrine **pSiNP-Porph-Man** et **pSiNP-NHNH$_2$Porph-Man** induisent des taux de morts cellulaires encore plus important avec 40% et 75% respectivement (**Figure III.12.b**). La mort cellulaire observée est attribuée à un transfert d'énergie entre les pSiNP et la porphyrine entrainant ainsi une augmentation de la production de $^1O_2$ et de ROS. Dans cette étude, la plus grande phototoxicité sous excitation biphotonique a été observée pour la formulation **pSiNP-NHNH$_2$Porph-Man** avec 75% de mort cellulaire. Cette phototoxicité est plus importante que celle observée pour les **pSiNP-Porph-Man**, une formulation similaire mais pour laquelle le mannose est greffé via un ligand squarate. Cette toxicité est aussi plus importante que celle observée sous excitation monophotonique. Ici la faible toxicité de **pSiNP-Porph-Man** comparée à celle de **pSiNPNHNH$_2$Porph-Man** peut être expliquée par un quenching de l'émission des pSiNP par les phényle squarate (désactivation de l'état excité des pSiNP par les phényle squarate). En effet les groupements aromatiques sont connus pour quencher l'émission et la photoluminescence du silicium poreux. [180] Dans les deux cas, le taux de mort cellulaire semble être la conséquence d'un transfert d'énergie entre les pSiNP et la porphyrine. Ce transfert d'énergie favorise une augmentation de la production du $^1O_2$ et/ou des ROS. Ce processus de transfert d'énergie est caractérisé par l'augmentation de la section efficace ($\sigma_2$) à deux photons de la porphyrine greffée sur les pSiNP (**Figure IV.9**). De plus

une l'étude de Stern-Volmer (**Figure IV.14**) est une indication du quenching des pSiNP en présence de porphyrine.

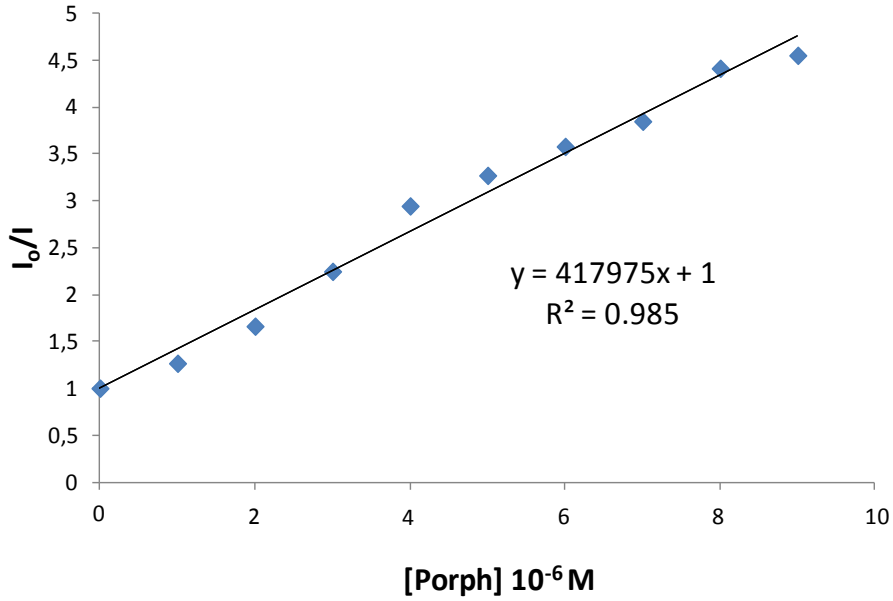



**Figure IV.15.** Courbe Stern-Volmer du quenching de la photoluminescence des pSiNP en suspension dans l'eau (0.3 mg/mL) par additions successives d'une solution de porphyrine dans de l'eau à une concentration comprise entre (0.001 mM à 0.009 mM).

Dans l'expérience présentée sur la **figure IV.15**, les pSiNP sont immergées dans un flacon en verre contenant 1 ml d'eau déionisée. Des ajouts d'une solution aqueuse de porphyrine à différentes concentrations (0,001 mM à 0,11 mM) sont ajoutés à la suspension de pSiNP à l'aide d'une seringue. Le mélange est agité pendant 1 min. Les spectres de photoluminescence sont obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre Ocean Optics Pro QE65 équipé d'un filtre à 500 nm. La source d'excitation est une LED UV fonctionnant à 375 nm de puissance de sortie nominale de 5 mW.

En résumé, dans cette étude, nous avons préparé des systèmes **pSiNP/photosensibilisateur/agents de ciblage**. La porphyrine et les agents de ciblage ont été liés de manière covalente aux pSiNP. Ces nanoparticules fonctionnalisées ont été testées en imagerie et en PDT *in vitro* sur des cellules du cancer du sein MCF-7. Elles ont été utilisées sous excitation monophotonique et biphotonique en imagerie et en PDT. Ces travaux mettent en évidence que l'effet observé en PDT sous excitation biphotonique est le résultat d'un transfert d'énergie entre les pSiNP et la porphyrine-NCS. Par comparaison, dans le cas d'une excitation monophotonique, la porphyrine absorbe directement la lumière. Nous remarquons que les deux types d'excitation, l'excitation monophotonique et l'excitation biphotonique, conduisent à la mort des cellules du cancer du sein MCF-7 par différentes voies d'excitation (**Figure IV.16**). Les pSiNP d'une taille comprise entre 50 et 250 nm ont une surface spécifique importante et peuvent contenir des agents de ciblage. En effet, ces agents de ciblage (mannose phényle squarate et mannose cétone) permettent l'endocytose des nanoparticules par un mécanisme de transport actif qui augmente l'efficacité des formulations en PDT. A travers ces travaux, nous présentons deux mannoses chacun possédant un bras chimique différent (mannose phényle squarate et mannose cétone). Nous montrerons que ces deux bras chimiques jouent un rôle important dans l'efficacité photodynamique de ces formulations en PDT. Ce résultat constitue le premier exemple de système non toxique pSiNP/porphyrine/Man utilisé en imagerie et en PDT sous excitation biphotonique pour cibler les cellules du cancer du sein MCF-7.

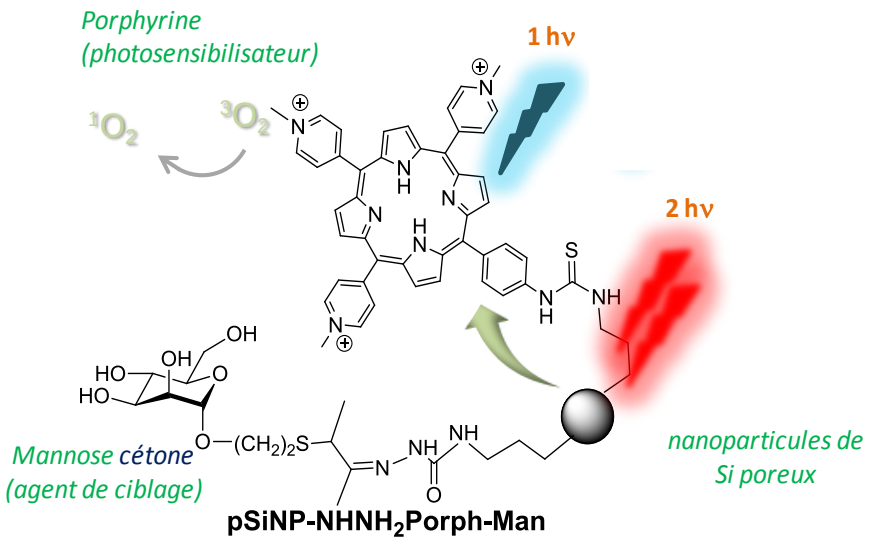



**Figure IV.16.** Représentation schématique des mécanismes d'excitation du système **pSiNP-NHNH$_2$-Porph-Man**.

## 1.2 Matériels et méthodes

### *1.2.1 Fonctionnalisations des pSiNP avec un photosensibilisateur et deux agents de ciblage*

***a. Greffage de l'allylamine sur les pSiNP par hydrosilylation :***

Les nanoparticules de silicium poreux fraîchement préparées sont centrifugées à 14 000 rpm pendant 10 min, puis rincées avec de l'allylamine. Les pSiNP sont ensuite redispersées dans 10 ml d'allylamine à 70°C sous reflux d'azote pendant 2h. Les nanoparticules sont ensuite rincées 5 fois à l'éthanol absolu en les centrifugeant à chaque fois 10 minutes à 14 000 rpm afin de retirer l'allylamine adsorbé à la surface.

***b. Greffage de la porphyrine-NCS sur les pSiNP :***

La porphyrine-NCS est greffée sur les pSiNP aminées après hydrosilylation avec l'allylamine. Après la réaction d'hydrosilylation, les nanoparticules sont redispersées dans 2 mL d'éthanol absolu, 1 mL d'une solution de porphyrine-NCS à 1 mg/mL et 2.5 mL d'un mélange éthanol/eau 1:1. Puis 250 µL de triéthylamine sont ajoutées à la suspension pour catalyser la réaction. La réaction de couplage entre la porphyrine-NCS et l'amine a lieu sous agitation à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 18 h. Les nanoparticules obtenues sont alors rincées entre 5 et 7 fois avec de l'éthanol absolu et de l'eau distillée.

***c. Greffage du mannose phényle squarate sur les pSiNP :***

Le *p*-[N-(2-ethoxy-3,4-dioxocyclobut-1-enyl) amino] phenyl-α-D-mannopyranoside (phenyl-squarate-mannose)[265] est greffé sur les pSiNP après hydrosilylation avec l'allylamine. Après la réaction d'hydrosilylation, les nanoparticules sont redispersées dans 2 mL d'éthanol absolu, 2.5 mL d'n mélange éthanol/eau (1:1) contenant le mannose phényle squarate à 16 mM et 250 µL de triéthylamine. La réaction de couplage entre le mannose phényle squarate et l'amine a lieu sous agitation à température ambiante pendant 18 h. Les nanoparticules obtenues sont alors rincées entre 5 et 7 fois avec de l'éthanol absolu et de l'eau distillée.

***d. Greffage de la porphyrine-NCS et du mannose phényle squarate sur les pSiNP :***

Après hydrosilylation des pSiNP avec l'allylamine, celles-ci sont redispersées dans 2 mL d'éthanol absolu, 1 mL d'une solution de porphyrine-NCS à 1mg/mL dans l'éthanol, 2.5 mL d'une solution de mannose phényle squarate à 16 mM dans un mélange éthanol/eau 1:1 et 250 µL de triéthylamine. La réaction de couplage a lieu sous agitation à température ambiante pendant 18 h. Les nanoparticules obtenues sont alors rincées entre 5 et 7 fois avec de l'éthanol absolu et de l'eau distillée.

***a. Greffage du semi-carbazide sur les pSiNP-$NH_2$ par hydrosilylation :***

Les pSiNP préalablement hydrosilylées avec l'allylamine donnent des pSiNP-$NH_2$. Les pSiNP-$NH_2$ sont centrifugées et rincées 2 fois avec du THF à 14 000 rpm pendant 10 min. Les pSiNP-$NH_2$ sont dispersées dans 10 ml d'une solution de tert-butyl-2-[allylamino] carbonyl) hydrazine-carboxylate à $10^{-1}$ M dans le THF. La réaction d'hydrosilylation est réalisée à 85 °C sous reflux d'azote pendant 3 h. Après la réaction les pSiNP-$NHNH_2$ sont rincées deux fois avec du THF et 2 fois avec de l'éthanol absolu. Afin d'enlever le groupement boc du semicarbazide, les nanoparticules sont centrifugées une fois avec de l'éthanol pour être ensuite redispersées dans une solution de 10 mL (TFA:$CH_2CL_2$, 40%:60%) pour une durée de 4 h. Après la réaction, les nanoparticules sont centrifugées et rincées plusieurs fois avec de l'éthanol absolu.

***b. Greffage de la porphyrine sur les pSiNP-$NHNH_2$ :***

Après les réactions d'hydrosilylation de l'allylamine et du semicarbazide, les pSiNP-$NHNH_2$ sont redispersées dans 2 mL d'éthanol 1 mL d'une solution de porphyrine-NCS à 1 mg/mL et 2.5 mL d'un mélange éthanol/eau (1:1). Puis 250 µL de triéthylamine sont ajoutées à la suspension pour catalyser la réaction. La réaction entre l'allylamine et l'isothiocyanate de la porphyrine-NCS a lieu sous agitation et à température ambiante pendant 16 h. Les pSiNP-$NHNH_2$Porph sont centrifugées et rincées 7 à 8 fois avec de l'eau distillée et de l'éthanol absolu pour retirer la porphyrine-NCS adsorbée sur la surface des nanoparticules.

***c. Greffage du mannose cétone sur les pSiNP-$NHNH_2$ :***

Après les réactions d'hydrosilylation de l'allylamine et du semicarbazide, les pSiNP-$NHNH_2$ sont redispersées dans 2 mL d'éthanol absolu, 2.5 mL d'une solution de mannose cétone (2-((3-oxobutan-2-yl)thio)ethyl-α,D-mannopyranoside à 16 mM dans un mélange éthanol/eau (1:1). Puis 250 µL de triéthylamine est ajoutée à la suspension pour catalyser la réaction. La réaction a lieu sous agitation et à température ambiante pour 16h. Les pSiNP-$NHNH_2$ greffées avec le mannose cétone sont centrifugées et rincées 7 à 8 fois avec de l'eau distillée et de l'éthanol absolu pour retirer le mannose adsorbé sur la surface des nanoparticules.

***d. Greffage simultané de la porphyrine-NCS et du mannose cétone sur les pSiNP-$NHNH_2$ :***

Après les réactions d'hydrosilylation de l'allylamine et du semicarbazide, les pSiNP-$NHNH_2$ sont redispersées dans 2 mL d'éthanol, 2.5 mL d'une solution de mannose cétone à

16 mM avec un mélange éthanol/eau 1:1, 500 µL d'une solution de porphyrine-NCS et 250 µL de triéthylamine. La réaction a lieu sous agitation et à température ambiante pendant 16h. Les pSiNP-$NHNH_2$Porh-Man sont centrifugées et rincées 7 à 8 fois avec de l'eau distillée et de l'éthanol absolu pour retirer la porphyrine et le mannose absorbés sur la surface des nanoparticules.

### *1.2.2 Caractérisations des nanoparticules greffées*

***Potentiel zêta :***

Deux gouttes de nanoparticules de silicium poreux fonctionnalisées sont diluées dans de l'éthanol absolu. Les mesures de potentiel zêta des pSiNP fonctionnalisées sont effectuées sur un Malvern Nanozetasizer.

***Quantification de la porphyrine-NCS et des mannoses par spectroscopie UV-visible :***

Les mesures d'absorption UV-Vis sont effectuées avec un spectromètre UV/visible Lambda 35 de Perkin Elmer pour doser la porphyrine et les mannoses. Pour quantifier la porphyrine greffée sur les pSiNP, une quantité connue de nanoparticules greffées (pSiNP-Porph, pSiNP-Porph-Man, pSiNP-$NHNH_2$Porph, pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man) est dissoute dans une solution d'hydroxyde de potassium KOH à 1M. L'absorbance de la solution est enregistrée entre 350 et 550 nm. Au préalable, nous mesurons l'absorbance de solutions étalons de porphyrine de concentrations connues dans le KOH à 1M, afin de tracer la droite d'étalonnage donnant l'absorbance en fonction de la concentration et de déterminer le coefficient d'absorption molaire de la porphyrine.

La teneur en mannose se détermine par réaction calorimétrique. Le coefficient d'absorption molaire du mannose est déterminé en utilisant des solutions de mannose dans l'acide sulfurique et le résorcinol (1,3-dihydroxybenzène) à différentes concentrations.[266] Les quantités de mannoses de 1 à 4 mg sont ajoutées à 20 ml d'une solution d'acide acétique à 0,01 M. 200 µl de chaque solution sont ajoutés à la solution contenant 200 µl de résorcinol et 1 ml d'acide sulfurique à 75%. Les échantillons sont agités et chauffés à 90 ° C dans un bain d'eau pendant 30 min. Ensuite les échantillons sont placés dans un bain d'eau froide pendant 30 min et dans l'obscurité. L'absorbance de la solution est enregistrée entre 350 et 600 nm. L'acide sulfurique à 75% (1 ml) et le résorcinol (200 µL) sont utilisés comme solution de référence. Pour quantifier le mannose greffé sur les pSiNP, nous utilisons le même protocole décrit ci-dessus.

### *1.2.3 Imagerie et thérapie photodynamique*

Les expériences ont été réalisées par Marie Maynadier, Magali Gary-Bobo et Audrey Gallud de l'équipe Glyco et Nanovecteur pour le ciblage thérapeutique, équipe dirigée par Marcel Garcia de l'institut des biomolécules Max Mousseron (UMR 5247).

***Culture cellulaire :***

Les cellules MCF-7, cellules humaines du cancer du sein sont achetées chez ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Ces cellules sont cultivées dans du milieu de culture DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémentées de 10 % de FBS et 50 µg/mL de gemtamycin. La croissance des cellules a lieu dans une atmosphère humide à 37°C sous 5% de $CO_2$.

***Imagerie cellulaire :***

Les cellules cancéreuses MCF-7 sont ensemencées dans des cupules à fond de verre, à la densité de $10^6$ cellules/$cm^2$. Après 24h, les cellules sont rincées puis incubées dans 1 mL de milieu de culture blanc contenant 40 µg/mL de nanoparticules et une concentration équivalente de porphyrine libre pendant 5 h. 15 min avant la fin de l'incubation, les membranes des cellules sont marquées avec du Cell Mask Orange (Invitrogen, Cergy pontoise, France) à une concentration finale de 5 µg/mL. Avant la visualisation, les cellules sont rincées avec du milieu de culture blanc puis imagées.

*Imagerie monophotonique* : Les images sont réalisés avec un microscope confocal LSM 780 LIVE (Carl Zeiss, Le Pecq, France). L'excitation de la fluorescence est effectuée à 405 nm, à une profondeur de coupe de 0.62 µm (épaisseur en Z). L'émission est recueillie entre 620 et 700 nm.

*Imagerie biphotonique :* Les cellules sont scannées avec un microscope confocal LSM (Carl Zeiss, France), sous excitation biphotonique à 750 nm (fournie par un laser pulsé (fentoseconde)). Un détecteur spectral est utilisé pour collecter les images.

***Thérapie photodynamique in vitro à 1 photon :***

Les cellules du cancer du sein (MCF-7) sont ensemencées dans une plaque de 96 puits, à la densité de $10^6$ cellules/$cm^2$. Après 24 h les cellules sont incubées avec les formulations suivantes pSiNP, pSiNP-Man, pSiNP-Porph, pSiNP-Porph-Man, pSiNP-$NHNH_2$Porph, pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man à une concentration de 40 µg/mL et avec la porphyrine-NCS libre à une concentration équivalente pendant 5 h. Après l'incubation, les cellules sont rincées avec

du PBS puis maintenues dans 100 µL de milieu de culture. Les cellules sont alors irradiées pendant 40 min avec un laser à 650 nm de puissance 7 mW/cm$^2$ (soit 16.8 J/cm$^2$). Après 48 h d'incubation, un test MTS (3-(4,5-dimthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium) est réalisé pour quantifier les cellules vivantes. Pour le test MTS, les cellules sont incubées pendant 2 h dans du milieu de culture additionné de 0.5 mg/mL de MTS. L'absorbance de la solution est lue directement à 490 nm.

***Thérapie photodynamique in vitro à 2 photons :***

Les cellules du cancer du sein (MCF-7) sont ensemencées dans une plaque de 384 puits, à la densité de $10^6$ cellules/cm$^2$. Après 24 h les cellules sont incubées avec les formulations suivantes pSiNP, pSiNP-Man, pSiNP-Porph, pSiNP-Porph-Man, pSiNP-$NHNH_2$Man, pSiNP-$NHNH_2$Porph, pSiNP-$NHNH_2$Porph-Man à une concentration de 40 µg/mL et avec la porphyrine-NCS libre à une concentration équivalente pendant 5 h. Les cellules sont rincées et irradiées avec un laser biphotonique en 3 scans de 1.57 s à 800 nm. Après 48 h d'incubation un test MTS est réalisé pour quantifier les cellules vivantes.

## 2. Nanoparticules de silicium poreux pour le traitement du cancer de la prostate (LNCaP)

Dans ces travaux nous avons étudié, l'utilisation de nanoparticules de silicium poreux pour le traitement du cancer de la prostate par l'intermédiaire du ciblage RM6P. Afin de cibler le RM6P, un mannose-6-carboxylate (M6C), analogue du mannose-6-phosphate, est préparé et greffé sur la surface des nanoparticules de silicium poreux (pSiNP). L'effet photodynamique des pSiNP a ensuite été testé *in vitro* sous excitation monophotonique et biphotonique. L'internalisation des pSiNP fonctionnalisées a été testée par imagerie de fluorescence sous excitation biphotonique sur des cellules du cancer de la prostate et sur des cellules fibroblastes dépourvues de récepteurs RM6P.

Le cancer de la prostate représente la deuxième cause de décès pour les hommes après le cancer du poumon.[267] Le cancer de la prostate se manifeste par une évolution lente et indolore pouvant dégénérer en lésions agressives et métastatiques. Les cellules cancéreuses de la prostate peuvent migrer et former des métastases osseuses. Actuellement, il existe plusieurs protocoles pour traiter le cancer de la prostate : la prostatectomie, la thérapie hormonale, la radiothérapie et la chimiothérapie. Cependant, ces thérapies s'accompagnent d'effets secondaires sévères pour les patients.[268] Le développement de nouveaux systèmes qui combine l'utilisation de nanoparticules, d'agents de ciblage avec la thérapie photodynamique représente une réelle opportunité dans le traitement du cancer de la prostate. Dans la littérature, il est décrit que dans le domaine extracellulaire, l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA), biomarqueur le plus répandu sur les cellules du cancer de la prostate, peut être ciblé par l'utilisation de certains peptides,[269] aptamers[270, 271] ou anticorps.[272] D'autre part, la surexpression des récepteurs des cations indépendants mannose-6-phosphate (RM6P) a été mise en évidence dans les lignées cellulaires du cancer de la prostate.[6] Par conséquent, le récepteur des cations indépendants mannose-6-phosphate (RM6P), identifié comme un nouveau récepteur efficace dans le cancer de la prostate apparaît comme une alternative au biomarqueur PSMA. Une des fonctions principales de ce récepteur est de reconnaître les enzymes contenant des M6P à la membrane cellulaire et de les conduire aux lysosomes.[273] Dans ces travaux, nous avons préparé un nouveau type de nanovecteur composé de nanoparticules de silicium poreux fonctionnalisées avec un mannose-6-carboxylate (M6C), analogue du M6P pour un ciblage actif, et avec une porphyrine-NCS. L'efficacité photodynamique de ce nanovecteur a été testée *in vitro* sous excitation mono et biphotonique sur des cellules du cancer de la prostate (LNCaP).

## 2.1 Résultats et discussion

Nous avons préparé quatre formulations de nanoparticules à base de silicium poreux : les pSiNP non fonctionnalisées (**pSiNP**), les pSiNP greffées avec le mannose-6-carboxylate (**pSiNP-M6C**), les pSiNP greffées avec la porphyrine-NCS (**pSiNP-Porph**) et les pSiNP greffées à la fois avec le mannose-6-carboxylate et la porphyrine-NCS (**pSiNP-Porph-M6C**) (**Figure IV.17**). Le mannose M6C a été préparé par l'équipe d'Alain Morère de l'Institut des Biomolécules Max Moussseron.

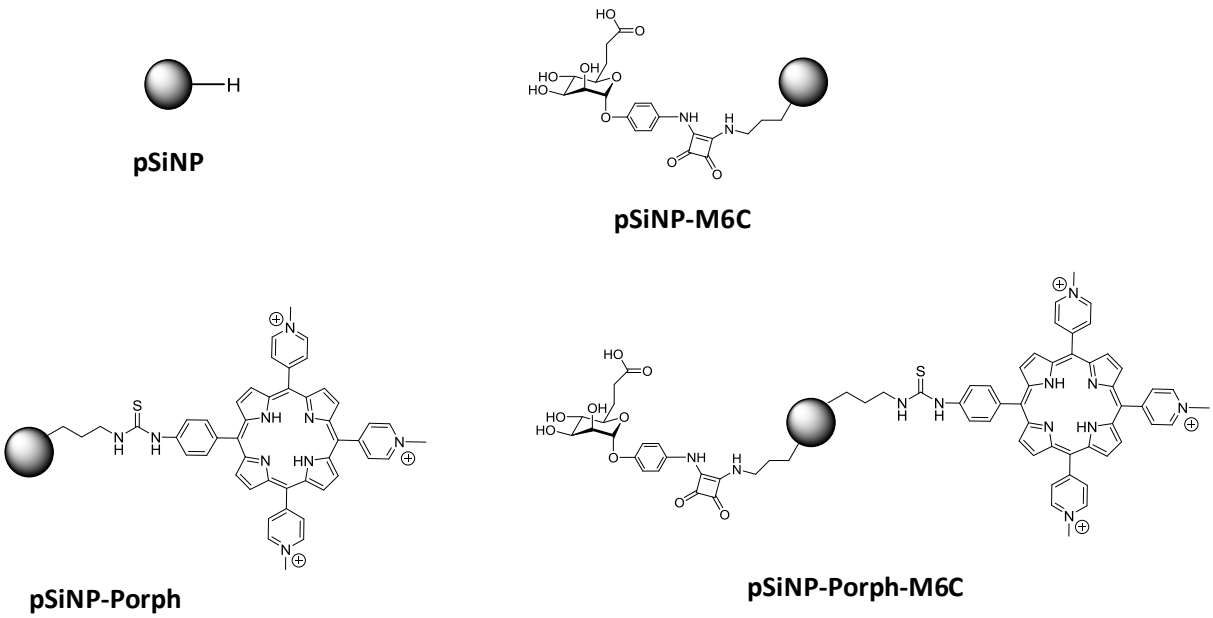



**Figure IV.17** Représentation schématique des formulations (**pSiNP**, **pSiNP-M6C**, **pSiNP-Porph** et **pSiNP-Porph-M6C**).

Pour cela, l'allylamine à d'abord été greffée aux pSiNP par hydrosilylation. Ensuite la formulation **pSiNP-NH$_2$** à été greffée avec la porphyrine et le M6C (**pSiNP-Porph**, **pSiNP-M6C** et **pSiNP-Porph-M6C**)

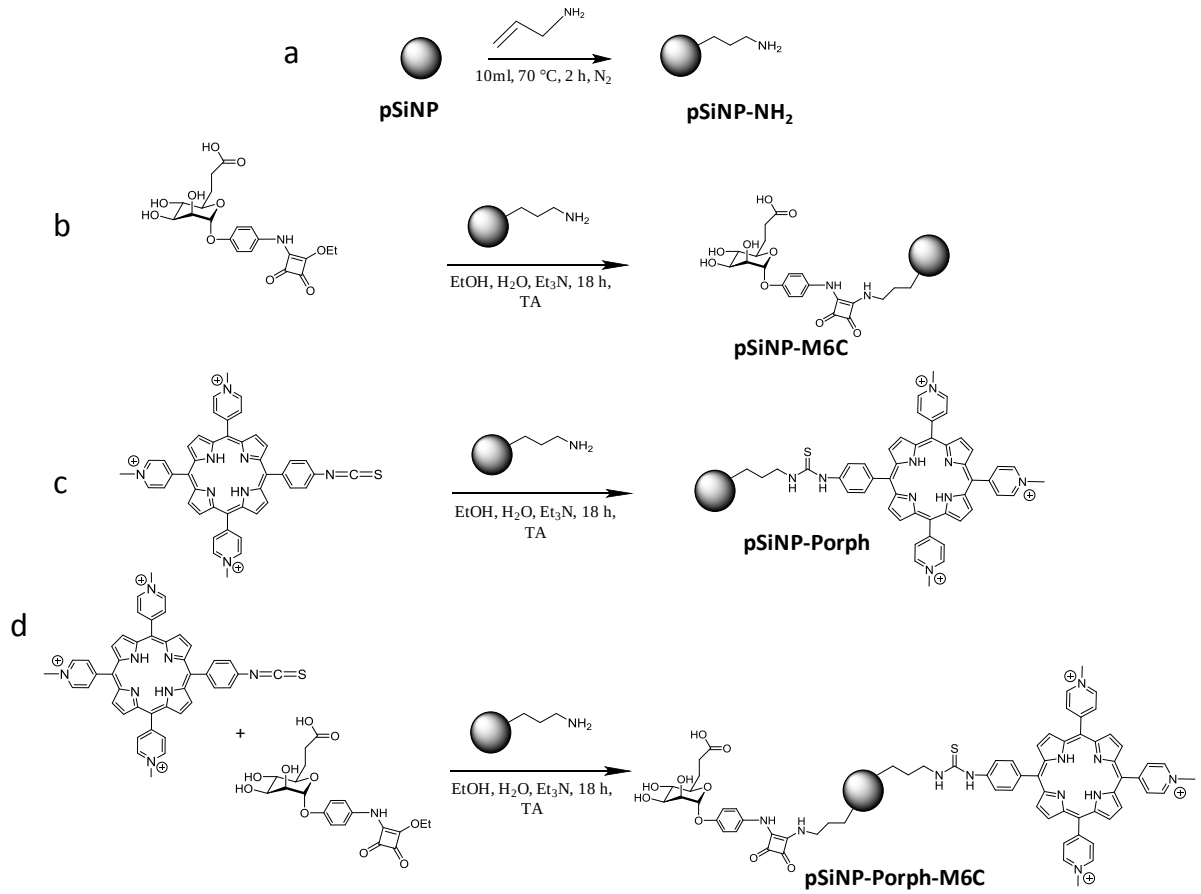



**Figure IV.18.** Schéma réactionnel. **a** : hydrosilylation de l'allylamine sur les pSiNP. **b** : Couplage du mannose M6C sur les pSiNP-NH$_2$. **c** : couplage de la porphyrine-NCS sur les **pSiNP-NH$_2$**. **d** : Couplage simultané de la porphyrine-NCS et du mannose M6C sur les **pSiNP-NH$_2$**.

Immédiatement après, les **pSiNP-NH$_2$** ont été mises en réaction avec l'isothiocyanate de la porphyrine et avec le mannose M6C. Ici le dérivé M6C est fonctionnalisé dans sa position anomérique avec un bras espaceur éthyle squarate, accessible pour une réaction covalente sélective avec les fonctions amines des **pSiNP-NH$_2$**. Le greffage de la porphyrine et du M6C a été confirmé par spectroscopie de vibration infrarouge (**Figure IV.19**).

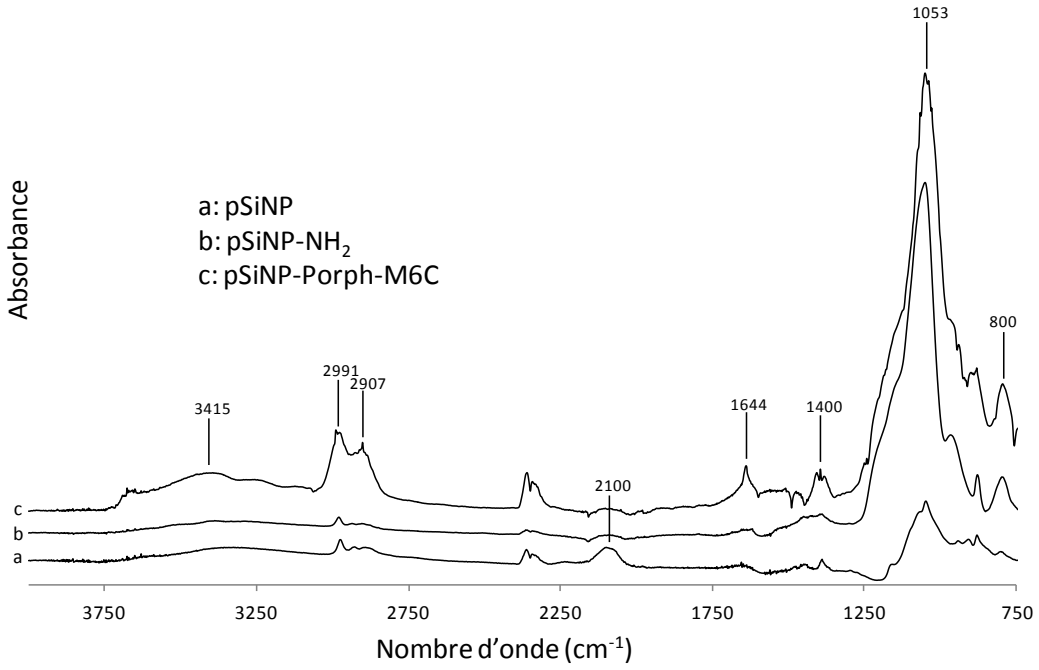



**Figure IV.19.** Spectre infrarouge DRIFT (pour : Diffuse reflectance Infrared Spectroscopy). a : pSiNP b : pSiNP hydrosylilées avec l'allylamine c : pSiNP-$NH_2$ greffées avec la porphyrine et le mannose M6C.

**Spectre A:** Après l'hydrosilylation des pSiNP avec l'allylamine, la bande observée à 2100 $cm^{-1}$ caractéristique de la vibration d'élongation Si-H disparaît (**Figure IV.19.b**). La bande intense observée à 800 $cm^{-1}$ est attribuée à la vibration d'élongation de la liaison Si-C. Cette bande confirme la liaison covalente entre l'alcène de l'allylamine et l'hydrure du silicium. Ces bandes indiquent que, malgré le caractère nucléophile de l'amine, la réaction d'hydrosilylation a eu lieu. De plus, la bande intense observée à 1644$cm^{-1}$ est caractéristique de la vibration de déformation angulaire de la liaison N-H. Après la fonctionnalisation des **pSiNP-$NH_2$** avec la porphyrine-NCS et le M6C (**Figure IV.19.c**), trois bandes intenses, correspondant aux vibrations d'élongations des liaisons C-H présentes dans la porphyrine et le mannose, sont observées entre 2907 $cm^{-1}$ et 2991 $cm^{-1}$. De plus, entre 1400 $cm^{-1}$ et 1600 $cm^{-1}$, on note la présence des liaisons C=C aromatiques de la porphyrine et du mannose phényle squarate. La bande intense à 1644 $cm^{-1}$ est caractéristique de la liaison thiourée indiquant le greffage covalent entre la porphyrine-NCS et l'amine de l'allylamine. La bande large et intense observée à 1053 $cm^{-1}$ peut éventuellement masquer d'autres vibrations d'élongation comme C-O et C-N.

Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules greffées a été mesuré en diffusion dynamique de la lumière (**Figure IV.20**). On observe que le diamètre des objets **pSiNP-M6C** **pSiNP-Porph** et **pSiNP-Porph-M6C** est plus important que celui des pSiNP. Ceci pourrait être dû aux un greffage réussi de la porphyrine et du mannose à la surface des pSiNP.

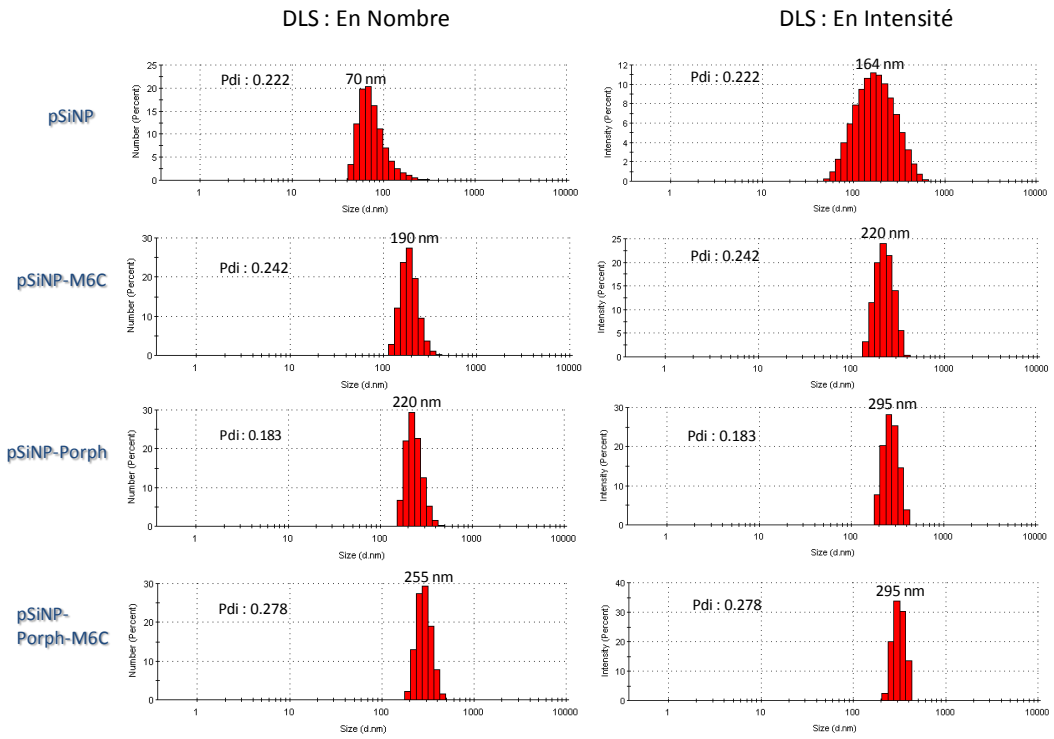



**Figure IV.20.** Diffusion dynamique de la lumière (DLS) des 4 formulations.

Et par mesure de potentiel zêta (**Tableau IV.3**).

| Echantillons | Potentiel zêta en (mV) |
|---|---|
| pSiNP | -37.3 ± 2.08 mV |
| pSiNP-M6C | -31.5 ± 5.47 mV |
| pSiNP-Porph | 18.9 ± 0.586 mV |
| pSiNP-Porph-M6C | 12.3 ± 0.569 mV |

**Tableau IV.3.** Potentiel zêta des 4 formulations.

La valeur de la charge négative des pSiNP est due à l'oxydation partielle des nanoparticules (présence de liaisons silanols à la surface des nanoparticules). Après le greffage de la porphyrine-NCS cationique, la charge des formulations suivantes (pSiNP-Porph, pSiNP-Porph-M6C) est positive.

La quantité de porphyrine et de mannose M6C greffée sur les pSiNP est déterminée par spectroscopie UV-vis (**Tableau IV.4**), en utilisant les mêmes protocoles que ceux détaillés dans la **partie IV.1** : « matériels et méthodes » (1.2.2).

| Echantillons | Quantité de Porph (µg par mg de pSiNP) | Quantité de Porph (mmol par g de pSiNP) | Quantité de Mannose M6C (µg par mg de pSiNP) | Quantité de Mannose M6C (mmol par g de pSiNP) |
|---|---|---|---|---|
| pSiNP-M6C | | | 35 | 0.194 |
| pSiNP-Porph | 25.1 | 0.035 | | |
| pSiNP-Porph-M6C | 20 | 0.028 | 70 | 0.389 |

**Tableau IV.4.** Résultats des quantités de porphyrine et de mannose M6C greffés sur les pSiNP.

De plus, une étude de cytotoxicité a été effectuée pour les formulations **pSiNP**, **pSiNP-Porph**, **pSiNP-M6C** et **pSiNP-Porph-M6C**. Ces formulations avec une concentration croissante (20 à 160 µg/mL) ont été incubées avec les cellules LNCaP. Pas ou peu de cytotoxicité a été observée après 72 heures et sans irradiation. Ces résultats mettent en évidence la biocompatibilité de ces formulations pour le traitement du cancer de la prostate (**Figure IV.21**).

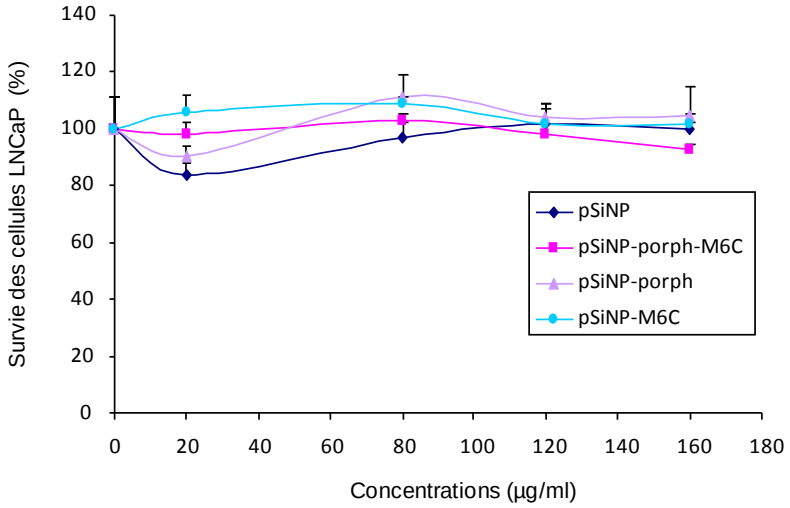



**Figure IV.21.** Absence de cytotoxicité des pSiNP, pSiNP-M6C, pSiNP-Porph et pSiNP-Porph-Man dans l'obscurité. Les cellules cancéreuses de la prostate (LNCaP) sont traitées avec des concentrations croissantes en pSiNP fonctionnalisées (de 20 à 160 µg/mL). Un test MTT est effectué 72 h après le traitement et révèle une absence d'altération cellulaire.

Nous avons étudié le ciblage et l'internalisation des nanoparticules fonctionnalisées sur des cellules de cancer de la prostate (LNCaP) et sur des cellules fibroblastes par microscopie de fluorescence à 2-photons.

Les expériences ont été réalisées par Vanja Stojanovic, Marie Maynadier et Magali Gary-Bobo de l'équipe Glyco et Nanovecteur pour le ciblage thérapeutique, équipe dirigée par Marcel Garcia de l'institut des biomolécules Max Mousseron (UMR 5247).

Les cellules de cancer de la prostate expriment le récepteur RM6P, alors que les cellules fibroblastes en sont dépourvues et servent donc de contrôle pour le ciblage, dans notre étude. Dans ces expériences, les cellules du cancer de la prostate (LNCaP) et les cellules fibroblastes ont été incubées pendant 5 heures à une concentration de 80 µg/mL avec les **pSiNP-Porph-M6C**. Les deux types de lignées cellulaires ont été rincés puis excités au moyen d'un laser pulsé Carl Zeiss ($\lambda_{exc}$= 800 nm) puis imagés. Un colorant membranaire a été ajouté pour discerner les cellules. La mise au point a été réalisée en mode confocal. Les images obtenues sont présentées sur la (**Figure IV.22**). Nous observons une fluorescence rouge importante des nanoparticules **pSiNP-Porph-M6C** dans le cas des cellules LNCaP. D'après l'étude menée dans la **partie IV.1**, cette fluorescence est certainement due à la porphyrine greffée sur les pSiNP. Les particules semblent en partie localisées à la membrane et aussi internalisées. En comparaison, une faible fluorescence des nanoparticules est observée sur les cellules fibroblastes dépourvues de récepteur RM6P et l'imagerie montre également une faible internalisation des nanoparticules. Les expériences d'imagerie réalisées montrent

que les récepteurs membranaires RM6P des cellules LNCaP reconnaissent le mannose M6C greffé sur les pSiNP et que le M6C permet l'internalisation d'une plus grande quantité de nanoparticules.

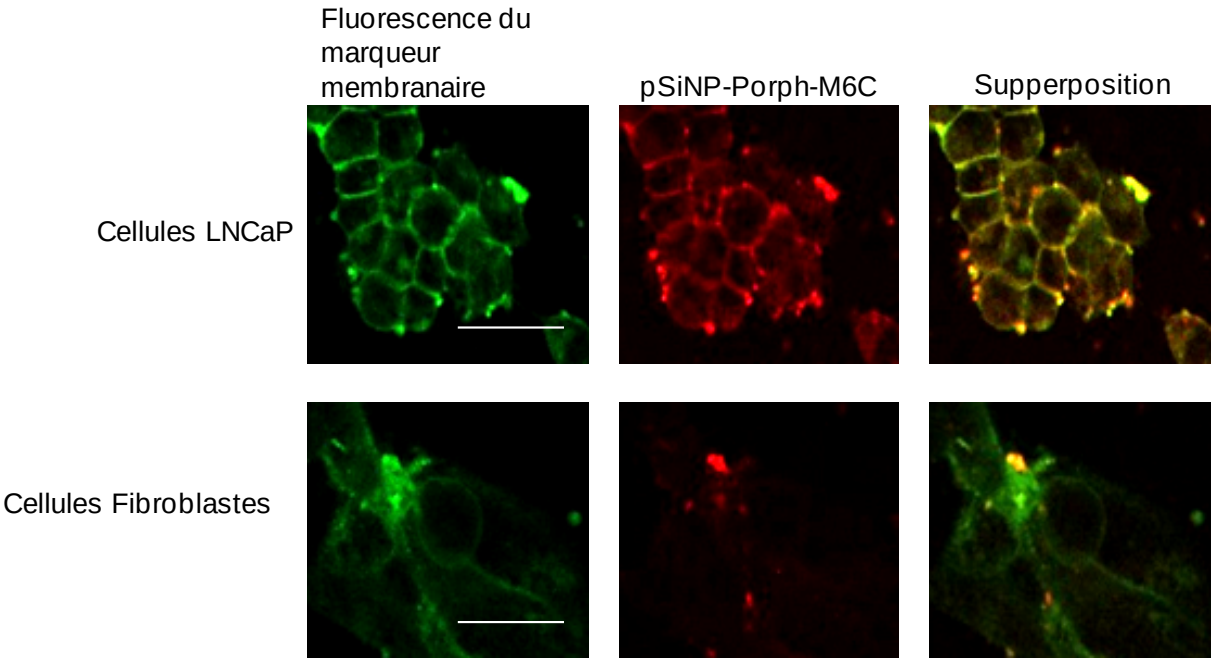



**Figure IV.22.** Imagerie en microscopie confocale sous excitation biphotonique de cellules cancéreuses de la prostate (LNCaP) et de cellules fibroblastes. Les cellules sont incubées pendant 5 h avec 80 µg/mL avec la formulation **pSiNP-Porph-M6C**. Les membranes cellulaires sont visualisées en vert à 561 nm et les pSiNP-Porph-M6C sont observées à 800 nm. La barre d'échelle représente 10 µm.

L'efficacité photodynamique des nanoparticules fonctionnalisées a été testée *in vitro* sous excitation mono et biphotonique. Dans les deux cas les cellules du cancer de la prostate LNCaP ont été incubées pendant 5 heures à une concentration de 80 µg/mL avec les formulations suivantes : **pSiNP**, **pSiNP-M6C**, **pSiNP-Porph** et **pSiNP-Porph-M6C** (**Figure IV.23**). Les cellules LNCaP ont d'abord été exposées à une irradiation monophotonique (650 nm, 14 $J.cm^{-2}$) pendant 40 minutes. Après deux jours nous avons réalisé un test MTS afin de déterminer la phototoxicité des formulations (**Figure IV.23.a**). Comme attendu d'après les résultats obtenus est décrits dans la **partie IV.1** aucune cytotoxicité a été observée pour les LNCaP exposées aux **pSiNP** et aux **pSiNP-M6C** en raison de la faible absorbance de la lumière à 650 nm (**Figure IV.14**). Par contre, les nanoparticules encapsulant la porphyrine **pSiNP-Porph** ont montré une toxicité pour les cellules avec 19 % de mort cellulaire. Cette valeur de (19 %) de mort cellulaire n'est pas très élevée et un peu inférieure à celle qui avait

été obtenue pour le même type d'expérience dans la **partie IV.1** (**Figure IV.12.a**) avec 28 % de mort cellulaire. Ici, la quantité de porphyrine greffée dans ces formulations est inférieure à celle greffée dans les formulations du paragraphe IV.1 (**Tableau IV.2**). Lorsqu'elles sont fonctionnalisées avec le mannose M6C, les nanoparticules **pSiNP-Porph-M6C** présentent une toxicité légèrement accrue avec 25 % de mort cellulaire. Dans cette expérience, on s'attendait, en présence de M6C à la surface des nanoparticules, à une augmentation de la cytotoxicité des **pSiNP-Porph-M6C** plus importante comparée à celle des **pSiNP-Porph**, sachant que les expériences d'imagerie ont montré que les nanoparticules sont localisées aussi bien dans les cellules qu'a leur surface. Dans une deuxième expérience, nous avons réalisé l'irradiation à deux photons au moyen d'un laser pulsé, en utilisant un microscope confocal Carl Zeiss à deux photons. Deux jours après l'irradiation, le pourcentage de cellules vivantes a été déterminé par dosage MTS. Sans irradiation, aucune cytotoxicité des formulations **pSiNP**, **pSiNP-M6C**, **pSiNP-Porph** et **pSiNP-Porph-M6C** n'a été observée. En comparaison, les pSiNP sous excitation biphotonique ont induit 16 % de mort cellulaire. Ce résultat remet en évidence la capacité du silicium poreux à générer du $^1O_2$ et des ROS sous excitation biphotonique. Ce résultat a été précédemment observé et exposé dans la **partie IV.1** du manuscrit. Lorsqu'elles sont fonctionnalisées avec le mannose M6C, les nanoparticules **pSiNP-M6C** ont montré une augmentation importante de la cytotoxicité, avec 44 % de mort cellulaire. Ce résultat indique que le récepteur CI-RM6P est impliqué dans l'endocytose des pSiNP décorées avec le M6C. Les cellules LNCaP traitées avec la formulation **pSiNP-Porph** montrent également une toxicité importante (40 % de mort cellulaire) sous irradiation biphotonique comparé à l'irradiation monophotonique. Ce résultat s'expliquerait par un transfert d'énergie entre le silicium et la porphyrine. De plus l'endocytose des **pSiNP-Porph** est probablement due à des interactions électrostatiques entre les charges cationiques des fonctions amines des nanoparticules et les charges anioniques de la membrane cellulaire, alors que l'endocytose des **pSiNP-M6C** est récepteur-dépendante dans la mesure où il ne reste plus de fonctions amine libre à la surface des nanoparticules. Nous avons observé que les pSiNP greffées avec la porphyrine-NCS et le mannose M6C **pSiNP-Porph-Man** donnent aussi une cytotoxicité importante avec 50% de mort cellulaire. Cette augmentation de mort cellulaire s'explique par la présence du photosensibilisateur et de l'agent de ciblage à la surface des pSiNP. On pourrait s'attendre ici aussi à une augmentation de la toxicité des **pSiNP-Porph-M6C** plus importante comparée à celle des **pSiNP-Porph**. Il est possible, tout comme dans l'étude précédente (**partie IV.1**) que la présence du bras espaceur phényle squarate inhibe en partie le transfert d'énergie entre le silicium poreux et la porphyrine. Ici, le résultat marquant

de cette étude est aussi que l'efficacité photodynamique et le ciblage des RM6P sous excitation à 2-photons n'implique pas la nécessité de la porphyrine.

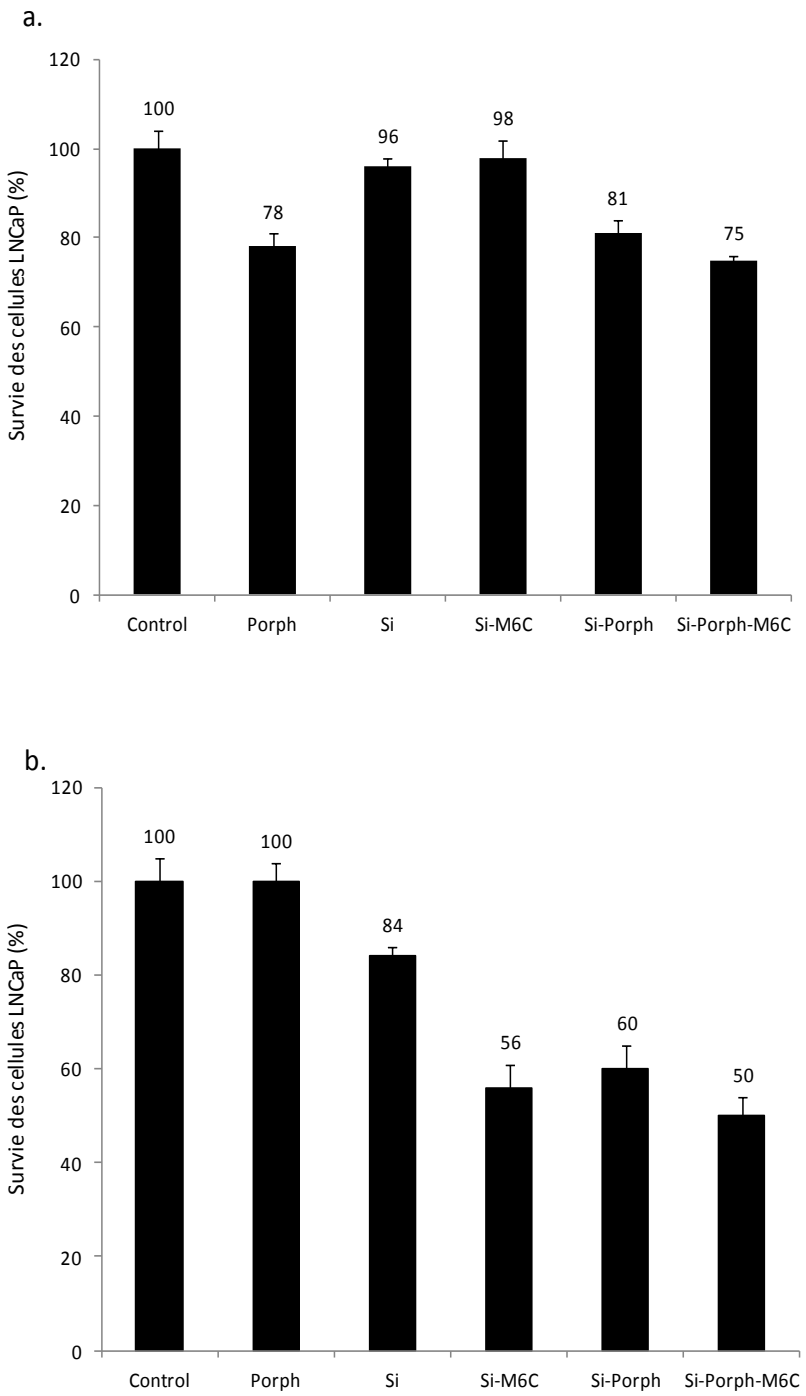



**Figure IV.23.** Efficacité photodynamique *in vitro* sous excitation biphotonique sur des cellules LNCaP incubées pendant 5 h à une concentration de 80 µg/mL avec pSiNP, pSiNP-M6C, pSiNP-Porph et pSiNP-Porph-M6C. **a** : irradiation à 650 nm, 7 mW/cm$^2$, 40 min. Le décompte des cellules vivantes est réalisé par un test MTS 2 jours après l'irradiation. **b** : Irradiation à 800 nm, 3 scans de 1.57 s. Le décompte des cellules vivantes est réalisé par un test MTS 2 jours après l'irradiation. Les barres représentent les moyennes de trois expériences ± écart-type. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le Student t test.*: $P<0,05$ et considérée comme statistiquement différente des valeurs de contrôle.

En résumé, nous avons préparé, caractérisé et testé un nouveau nanovecteur fonctionnalisé avec un mannose-6-carboxylate et une porphyrine-NCS pour son efficacité photodynamique sous excitation mono et biphotonique et sa capacité à cibler des cellules du cancer de la prostate (LNCaP). Cette étude montre que le mannose M6C greffé sur les pSiNP améliore l'efficacité du ciblage du récepteur RM6P présent sur les cellules cancéreuses de la prostate et que les RM6P sont impliqués dans l'endocytose des nanoparticules fonctionnalisées. Nous avons préparé des formulations qui génèrent des toxicités importantes (entre 40 et 50 %) sous irradiation biphotonique, bien plus élevées que sous irradiation monophotonique. Un résultat intéressant de cette étude est l'efficacité photodynamique des **pSiNP-M6C**, qui ne contiennent pas de porphyrine, grâce à un ciblage des RM6P.

## 2.2 Matériels et méthodes

### *2.2.1 Fonctionnalisation des nanoparticules*

***a. Greffage de l'allylamine sur les pSiNP par hydrosilylation :***

Les nanoparticules de silicium poreux fraîchement préparées sont centrifugées à 14 000 rpm pendant 10 min puis rincées avec de l'allylamine. Les pSiNP sont ensuite redispersées dans 10 ml d'allylamine à 70°C sous reflux d'azote pendant 2h. Les nanoparticules sont ensuite rincées 5 fois avec de l'éthanol absolu puis centrifugées 10 min à 14 000 rpm pour retirer l'allylamine adsorbée à la surface.

***b. Greffage de la porphyrine-NCS sur les pSiNP-$NH_2$ :***

La porphyrine-NCS est greffée sur les pSiNP-$NH_2$ après hydrosilylation avec l'allylamine. Après réaction d'hydrosilylation, les pSiNP-$NH_2$ sont redispersées dans 2 mL d'éthanol absolu, 1 mL d'une solution de porphyrine-NCS à 1 mg/mL et 2.5 mL dans une mélange éthanol/eau (1:1). Puis 250 µL de triéthylamine sont ajoutées à la suspension pour catalyser la réaction. La réaction de couplage entre la porphyrine-NCS et l'amine à lieu sous agitation à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 18 h. Les nanoparticules obtenues sont alors rincées entre 5 et 7 fois avec de l'éthanol absolu et de l'eau distillée.

***c. Greffage du mannose-6-carboxylate sur les pSiNP-$NH_2$ :***

Après réaction d'hydrosilylation avec l'allylamine, les pSiNP-$NH_2$ sont redispersées dans 2 mL d'éthanol absolu, 2.5 mL d'une solution de mannose-6-carboxylate à 16 mM dans un mélange éthanol/eau (1:1) et 250 µL de triéthylamine. La réaction de couplage entre le mannose M6C et l'amine à lieu sous agitation et à température ambiante pendant 18 h. Les nanoparticules obtenues sont alors rincées entre 5 et 7 fois avec de l'éthanol absolu et de l'eau distillée.

***d. Greffage de la porphyrine-NCS et du mannose-6-carboxylate sur les pSiNP-$NH_2$ :***

Après hydrosilylation des pSiNP avec l'allylamine, celles-ci sont redispersées dans 2 mL d'éthanol absolu. Pour le greffage simultané de la porphyrine-NCS et du mannose-6-carboxylate sur les pSiNP-$NH_2$, 1 mL d'une solution de porphyrine-NCS à 1mg/mL dans l'éthanol, 2.5 mL d'une solution de mannose phényle squarate à 16 mM dans un mélange éthanol/eau (1:1) et 250 µL de triéthylamine sont ajoutées à la suspension de pSiNP-$NH_2$. La réaction de couplage à lieu sous agitation à température ambiante pendant 18 h. Les

nanoparticules obtenues sont alors rincées entre 5 et 7 fois avec de l'éthanol absolu et de l'eau distillée.

# 3. Fonctionnalisation de complexes de ruthénium (II) sur les pSiNP pour de la thérapie photodynamique

La recherche pour le développement de la PDT à 2-photons s'oriente aussi vers l'utilisation de nouvelles molécules photosensibilisatrices à fortes absorption à deux photons. L'utilisation de métaux de transition comme les complexes de ruthénium (II), qui possèdent des propriétés d'absorption à deux photons, peut être intéressante pour des applications en PDT.[274, 275] Les complexes de ruthéniums (II) de par leurs propriétés photophysiques et leurs faible cytotoxicité se révèlent être des candidats intéressants pour de nombreuses applications, telles que l'imagerie cellulaire,[276] comme sonde d'acides nucléiques (fragment d'ADN ou d'ARN marqué radioactivement ou chimiquement),[277] comme vecteurs non viraux pour du transfert de gènes[278] et en thérapie anti cancéreuse.[279] Dans ce travail, nous avons étudié deux approches différentes de greffage de deux complexes de ruthénium (II) (GLR 38 et GLR 35) sur des nanoparticules de silicium poreux (pSiNP) afin d'étudier le potentiel des complexes de ruthénium (II) comme photosensibilisateur sous excitation mono et biphotonique.

## 3.1 Résultats et discussion

Dans ces travaux, nous avons utilisé deux complexes de ruthénium (II), chacun ayant un bras chimique différent. Le premier complexe (**GLR 35**) possède une fonction amine, et est greffé par réaction de silanisation sur les pSiNP. Le deuxième complexe (**GLR 38**) possède une fonction alcyne, et est greffé par réaction d'hydrosilylation sur les pSiNP (**Figure IV.24**). Les complexes de ruthénium ont été préparés par Gilles Lemercier de l'Institut de chimie moléculaire de Reims.

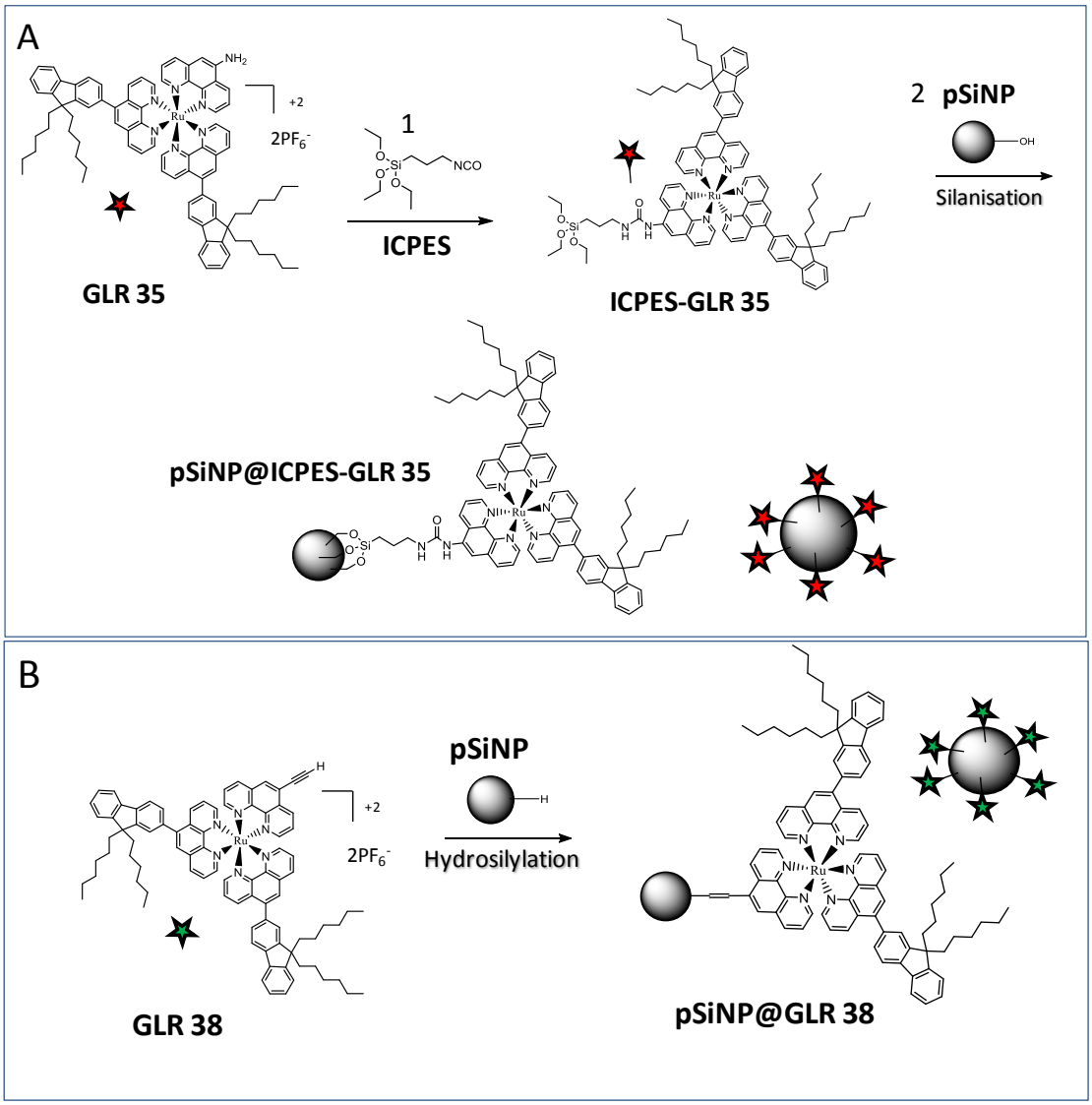



**Figure IV.24. A**) 1 : Couplage entre le 3-(triethoxysilyl) propyl isocyanate (ICPES) et le GLR 35, 2 : silanisation de ICPES-GLR 35 sur les pSiNP. **B**) Hydrosilylation des pSiNP avec le GLR 38.

Les deux complexes de ruthénium (II) (**GLR 35** et **GLR 38**) ont été greffés de manière covalente sur la surface des nanoparticules de silicium poreux. Pour greffer le complexe **GLR 35** sur les pSiNP, il a été nécessaire de faire au préalable un couplage entre le 3-(triethoxysilyl) propyl isocyanate (ICPES) et la fonction amine du GLR 35 (**Figure IV.24.A1**). Immédiatement après l'**ICPES-GLR 35** a été greffé sur les pSiNP par silanisation (**Figure IV.24.A2**). Ici les fonctions siloxane réagissent avec les silanols natifs présents à la surface des nanoparticules de silicium poreux. Aucun prétraitement oxydant des pSiNP n'a été réalisé avant la silanisation. Pour greffer le complexe **GLR 38** sur les pSiNP, nous avons réalisé une réaction d'hydrosilylation entre les liaisons hydrures du silicium et l'alcyne du

complexe **GLR 38**. La réaction d'hydrosilylation se réalise en une seule étape (**Figure IV.24.B**). Après greffage des complexes de ruthénium (II), les pSiNP fonctionnalisées (**pSiNP@ICPES-GLR35** et **pSiNP@GLR38**) ont été lavées à l'éthanol absolu pour enlever les complexes de ruthénium (II) physisorbés sur la surface des pSiNP.

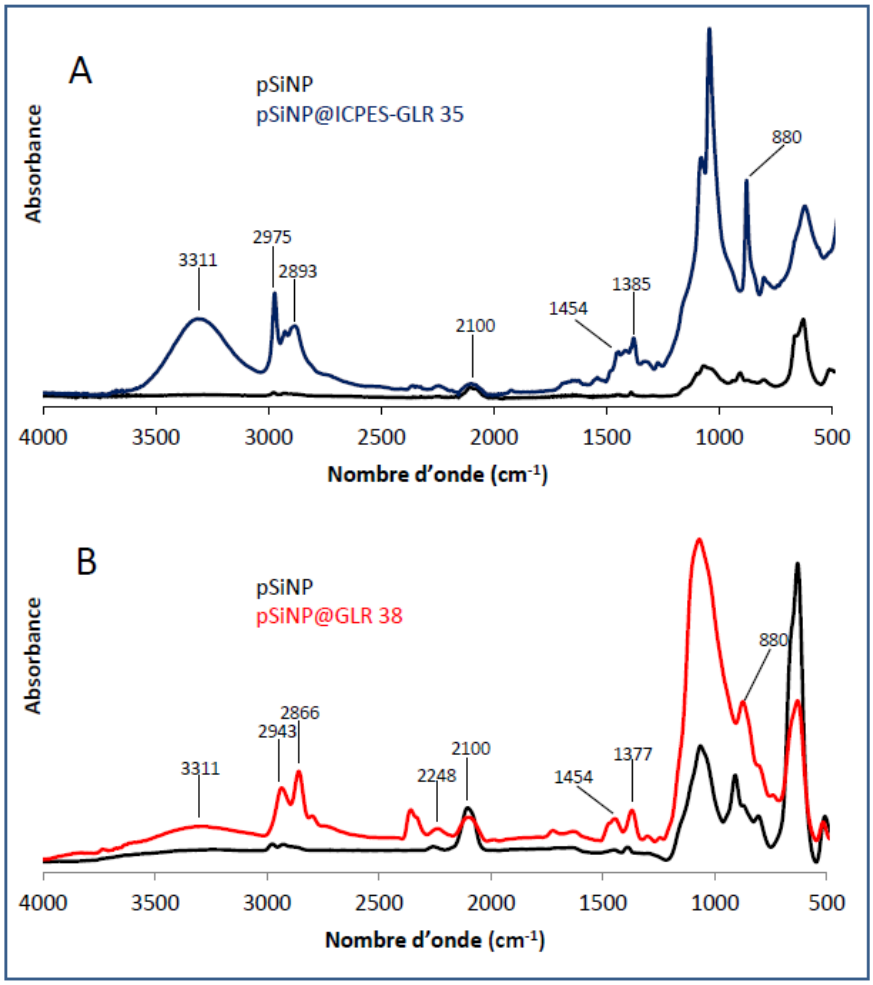



**Figure IV.25.** Spectre infrarouge. A) **pSiNP**, pSiNP fonctionnalisées avec ICPES-GLR 35 par silanisation (**pSiNP@ICPES-GLR 35**). B) **pSiNP**, pSiNP fonctionnalisées avec GLR 38 par hydrosilylation (**pSiNP@GLR 38**).

Les surfaces des pSiNP ont été caractérisées par spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier FTIR (**Figure IV.25**). Sur le spectre **A** on observe qu'après réaction de silanisation de la molécule ICPES@GLR 35 sur les pSiNP la bande d'élongation de la liaison Si-H à 2100 $cm^{-1}$ ne disparait pas. La présence des bandes de vibration intenses à 880 $cm^{-1}$ et entre 1000 et 1100 $cm^{-1}$ qui correspondent aux vibrations d'élongations de la liaison Si-O peut être due à la condensation entre les Si-OH des pSiNP et les Si-O-R présent sur les complexes de ruthénium (II). Il est possible ici aussi que la surface des pSiNP se soit partiellement oxydée pendant le

traitement chimique, même sous conditions inertes. La bande centrée à 1454 $cm^{-1}$ est attribuée à la déformation des liaisons C-H des $CH_2$. On observe trois bandes entre 2890 et 3000 $cm^{-1}$ qui correspondent aux vibrations d'élongations des liaisons C-H. Elles sont dues aux nombreuses liaisons C-H apportées par le complexe de ruthénium (II) GLR 35. La vibration d'élongation de la liaison C-N devrait être située entre 1020 et 1250$cm^{-1}$ mais elle est masquée par la bande intense due à la liaison Si-O. La bande large observée à 3311 $cm^{-1}$ pourrait correspondre aux vibrations d'élongations des liaisons C-H des aromatiques ou bien aux vibrations d'élongation des N-H du complexe de ruthénium (II). La bande observée à 1385 $cm^{-1}$ pourrait correspondre à la déformation des liaisons C-H du complexe de ruthénium.

Sur le spectre **B** (**Figure IV.25.B**), on observe qu'après réaction d'hydrosilylation avec le GLR 38, la bande d'élongation de la liaison Si-H à 2100 $cm^{-1}$ a presque disparu. Généralement la réaction d'hydrosilylation n'entraîne pas la disparition totale de cette bande laissant des liaisons Si-H intouchées. En revanche la diminution de l'intensité de cette bande indique que le greffage covalent entre les liaisons hydrures des pSiNP est de l'alcyne du GLR 38 a été réalisé. Après réaction d'hydrosilylation on observe aussi une augmentation de l'intensité des bandes à 880 $cm^{-1}$ et entre 1000 et 1200 $cm^{-1}$ qui correspondent aux vibrations d'élongations de la liaison Si-O et qui indiquent une oxydation de la surface des pSiNP. La bande centrée à 1454 $cm^{-1}$ est attribué à la déformation des liaisons C-H des $CH_2$. On observe deux bandes entre 2870 et 2950 $cm^{-1}$ qui correspondent aux vibrations d'élongations des liaisons C-H. Comme précédemment, ceci est dû aux nombreuses liaisons C-H apportées par le complexe de ruthénium (II) GLR 38. La large bande observée à 3311 $cm^{-1}$ peut correspondre aux vibrations d'élongations des liaisons C-H. La bande observée à 1377 $cm^{-1}$ pourrait correspondre à la déformation des liaisons C-H du complexe de ruthénium.

Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules greffées a été mesuré en diffusion dynamique de la lumière (**Figure IV.26**). On observe que le diamètre des objets **pSiNP@ICPES-GLR35** et **pSiNP@GLR38** est plus important que celui des pSiNP. Ceci pourrait être dû à un greffage réussi des complexes de ruthénium (II) à la surface des pSiNP.

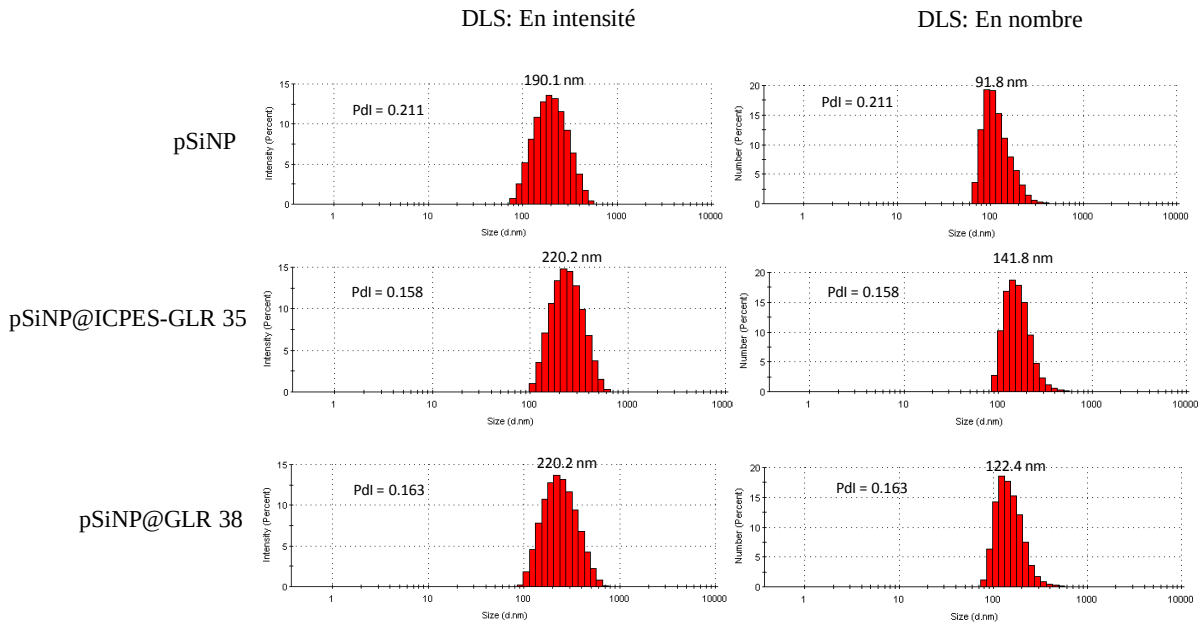



**Figure IV.26.** Diffusion dynamique de la lumière des 3 formulations.

Des mesures de potentiel zêta pour les trois systèmes **pSiNP**, **pSiNP@ICPES-GLR 35** et **pSiNP@GLR 38** montrent une charge négative pour les trois systèmes (**Tableau IV.5**).

| Echantillons | Potentiel zêta en (mV) |
|---|---|
| pSiNP | - 51.5 ± 0.2 |
| pSiNP@ICPES-GLR 35 | - 33.1 ± 1.23 |
| pSiNP@GLR 38 | - 28.9 ± 1.05 |

**Tableau IV.5.** Potentiel zêta des 3 formulations.

La charge négative des systèmes est due à la présence de silanols de surface Si-OH (surface oxydée), comme observé sur les spectres infrarouges. La charge plus faiblement négative pour **pSiNP@ICPES-GLR 35** et **pSiNP@GLR 38** est due à la présence des complexes de ruthénium (II) qui sont cationiques.

La quantité de complexes de ruthénium (II) greffés sur les pSiNP a été déterminé en dissolvant les pSiNP fonctionnalisées dans une solution basique d'hydroxyde de potassium (KOH) à 1M (**Tableau IV.6**). Les nanoparticules greffées **pSiNP@ICPES-GLR 35** et **pSiNP@GLR 38** contiennent une quantité comparable en complexes de ruthénium (II) soit 49 µg d'ICPES-GLR 35 par mg de pSiNP et 55 µg de GLR 38 par mg de pSiNP. Si nous nous référons aux deux études précédentes, nous constatons que la quantité de complexes de ruthénium (II) greffée est comparable à la quantité de porphyrine greffée **partie IV.1**.[88]

| Echantillons | Quantité de GLR (µg par mg de pSiNP) | Quantité de GLR (mmol par g de pSiNP) |
|---|---|---|
| pSiNP@ICPES-GLR 35 | 55 | 0.034 |
| pSiNP@GLR 38 | 49 | 0.03 |

**Tableau IV.6.** Quantités de complexes de ruthénium (II) greffés sur les pSiNP.

Ces formulations avec une concentration croissante (20 à 160 µg/mL) ont été incubées avec les cellules MCF-7. Après 72 heures et sans irradiation, une absence de cytotoxicité est observée avec les **pSiNP** et le **GLR 38.** Par contre les deux autres formulations, révèlent ici une légère cytotoxicité (**Figure IV.26**).

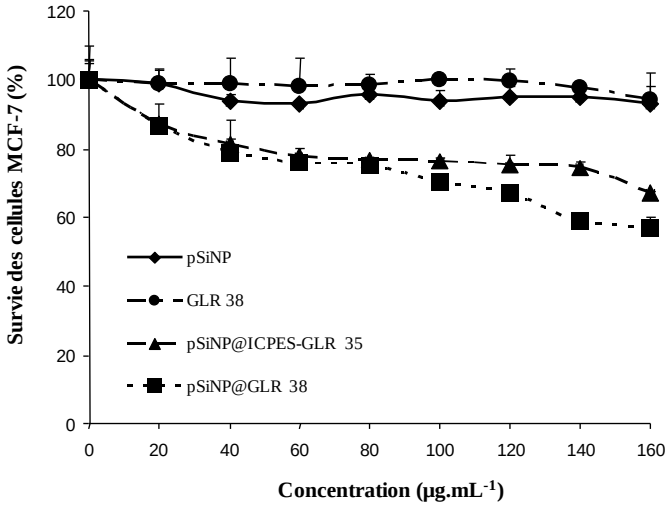



**Figure IV.27.** Absence de cytotoxicité des **pSiNP** et **GLR 38** dans l'obscurité. Légère cytotoxicité des **pSiNP@ICPES-GLR 35** et **pSiNP@GLR 38** dans l'obscurité. Les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) sont traitées avec des concentrations croissantes en pSiNP fonctionnalisées (de 20 à 160 µg/mL). Un test MTT est effectué 72 h après le traitement et révèle une absence d'altération cellulaire pour pSiNP et GLR 38.

Des expériences d'imagerie de fluorescence à 2-photons ont été réalisées pour étudier l'internalisation des différents systèmes à base de nanoparticules de silicium poreux par les cellules MCF-7. Dans ces expériences, les cellules du cancer du sein (MCF-7) ont été incubées 5 heures à une concentration de 40 µg/mL avec les formulations **pSiNP pSiNP@ICPES-GLR35** et **pSiNP@GLR38**. Les cellules MCF-7 ont également été incubées 5 heures avec le complexe **GLR 38** libre à une concentration de 2.1 µg/mL (concentration équivalente à la quantité totale de complexe de ruthénium (II) greffés sur les pSiNP). Les cellules ont ensuite été rincées puis imagées par microscopie confocale multiphotonique (Carl Zeiss) avec un laser pulsé à 750 nm.

Les expériences suivantes ont été réalisées par Vanja Stojanovic et Magali Gary-Bobo de l'équipe Glyco et Nanovecteur pour le ciblage thérapeutique, équipe dirigée par Marcel Garcia de l'institut des biomolécules Max Mousseron (UMR 5247).

Un colorant membranaire est ajouté pour distinguer les cellules. Les images de microscopie confocale sont présentées sur la (**Figure IV.28**). Lorsque les cellules MCF-7 sont incubées avec les **pSiNP** nues, nous n'observons pas de zone fluorescente. Dans l'étude présentée à la **partie IV.1** (**Figure IV.5 et Figure IV.6**) nous avions pu imager des pSiNP nues sous formes d'agrégats jaune-marrons sous excitation biphotonique à 750 nm. Ici la fluorescence des pSiNP nues n'est pas détectable, ou bien elles sont très peu internalisées

dans les cellules. Par comparaison, lorsque les cellules MCF-7 sont incubées avec le complexe **GLR 38** nous remarquons quelques zones fluorescentes rouges à l'intérieur des cellules MCF-7. Cette image montre l'internalisation cellulaire du complexe **GLR 38** après une incubation de 5 heures et indique ici que le complexe **GLR 38** peut être excité par une irradiation biphotonique à 750 nm. Ici le GLR 38 semble être sous forme d'agrégats. Lorsque les cellules MCF-7 sont incubées avec les formulations **pSiNP@ICPES-GLR 35** et **pSiNP@GLR 38**, nous distinguons une fluorescence plus importante apparaissant sous forme d'agrégats de nanoparticules. Les agrégats de pSiNP@ICPES-GLR35 semblent être essentiellement localisés à la surface de la membrane cellulaire. Dans le cas des agrégats de pSiNP@GLR38, ils se localisent sur la membrane cellulaire mais aussi dans la zone intracellulaire. Le greffage des complexes de ruthénium (II) à la surface des pSiNP améliore la visualisation des agrégats de particules des formulations par rapport au complexe **GLR 38** libre. Par conséquent, cette étude d'imagerie confirme la capacité des pSiNP à augmenter la concentration en photosensibilisateurs dans les cellules MCF-7.

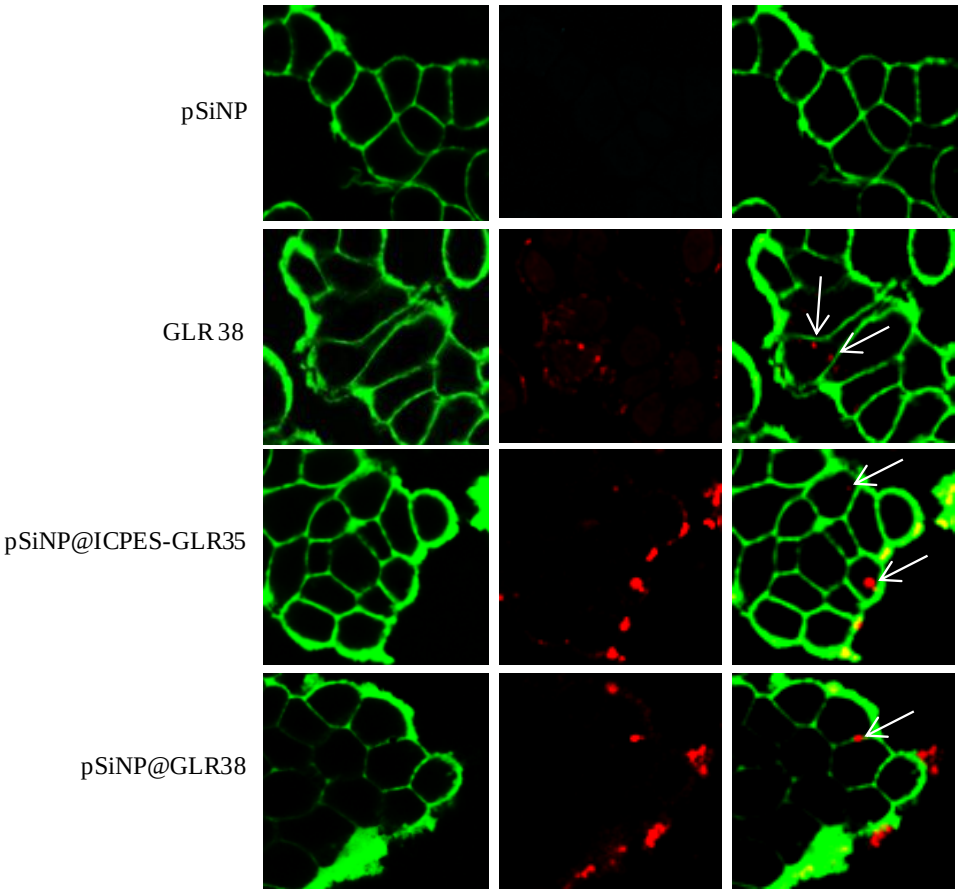



**Figure IV.28.** Images de microscopie confocale multiphotonique à 750 nm de cellules MCF-7 incubées pendant 5h à 40 µg/mL avec **pSiNP**, **pSiNP@ICPES-GLR 35**, **pSiNP@GLR 38** et avec le complexe **GLR 38** à 2.1 µg/mL. A gauche : fluorescence du marqueur membranaire. Au milieu : fluorescence émise par le complexe GLR 38 et les formulations. A droite : superposition des deux images.

L'efficacité photodynamique a été testée *in vitro* sous excitation monophotonique. Les cellules MCF-7 ont été incubées pendant 5 heures à une concentration de 80 µg/mL avec les formulations suivantes : **pSiNP**, **pSiNP@ICPES-GLR 35** et **pSiNP@GLR 38**. Les cellules MCF-7 sont rincées puis irradiées (405 nm, 14 J $cm^{-2}$) pendant 40 min. Deux jours après l'irradiation, le pourcentage de cellules vivantes a été déterminé par dosage MTS. Les résultats sont présentés sur la **Figure IV.29.a**. Nous notons que sans irradiation, aucune cytotoxicité des formulations **pSiNP**, **pSiNP@ICPES-GLR 35** et **pSiNP@GLR 38** n'est constatée. Ces résultats démontrent la biocompatibilité des formulations. Ici, les **pSiNP** sous excitation monophotonique induisent 15 % de mort cellulaire. Environ 30 % de mort cellulaire sont générés avec le **pSiNP@ ICPES-GLR 35**, mais c'est le système **pSiNP@GLR 38** qui est le plus toxique avec 71 % de mort cellulaire. Les systèmes **pSiNP@ICPES-GLR35** et **pSiNP@GLR38** diffèrent par leur mode de greffage du complexe de ruthénium sur les pSiNP. Les quantités de GLR greffées sur les pSiNP sont équivalentes dans les deux systèmes. Ici on peut tenter d'expliquer la différence entre les deux systémes par le fait que les **pSiNP@GLR38** semblent être mieux internalisées dans les cellules d'après les expériences d'imagerie (**Figure IV.28**) alors que les **pSiNP@ICPES-GLR 35** semblent essentiellement localisées à la surface membranaire.

Nous avons également étudié l'efficacité photodynamique des formulations *in vitro* sous excitation biphotonique. Les cellules MCF-7 ont incubées 5 heures à une concentration de 80 µg/mL avec les formulations suivantes **pSiNP**, **pSiNP@ICPES-GLR 35** et **pSiNP@GLR 38**. Les cellules MCF-7 ont été rincées puis exposées à une irradiation à 800 nm (microscope confocal Carl Zeiss, 3 scans de 1.57 s). Deux jours après l'irradiation, le pourcentage de cellules vivantes a été déterminé par dosage MTS. Les résultats PDT sont présentés sur la (**Figure IV.29.b**). Nous notons que sans irradiation, aucune cytotoxicité des formulations **pSiNP**, **pSiNP@ICPES-GLR 35** et **pSiNP@GLR 38** n'est constatée. Après irradiation à 800 nm, les **pSiNP** génèrent 28% de mort cellulaire. Les systèmes **pSiNP@ICPES-GLR 35** et **pSiNP@GLR 38** génèrent respectivement 35% et 42% de mort cellulaire. Ces résultats sont intéressants car ils montrent l'efficacité des complexes de ruthénium et leur potentiel pour la PDT. Les résultats sont assez similaires dans le cas d'une excitation monophotonique et biphotonique et le potentiel des complexes de ruthénium à être utilisé comme photosensibilisateur à 2-photons n'est pas mis en évidence. Ici les systèmes pSiNP@GLR38, obtenus par hydrosilylation, sont les plus cytotoxiques, sous irradiation monophotonique et biphotonique et semblent être les systèmes les plus performants. Les efficacités photodynamique des systèmes **pSiNP@ICPES-GLR35** et **pSiNP@GLR 38**

pourraient être améliorées en les fonctionnalisant avec des agents de ciblage des cellules cancéreuses, comme nous l'avons présenté dans la **partie IV.1 et 2**. Les résultats PDT et d'imagerie confirment le rôle important des pSiNP dans le transport et la libération des complexes de ruthénium dans les cellules MCF-7. Une nouvelle étude incluant également des tests photodynamique avec les GLR 38 est actuellement en cours.

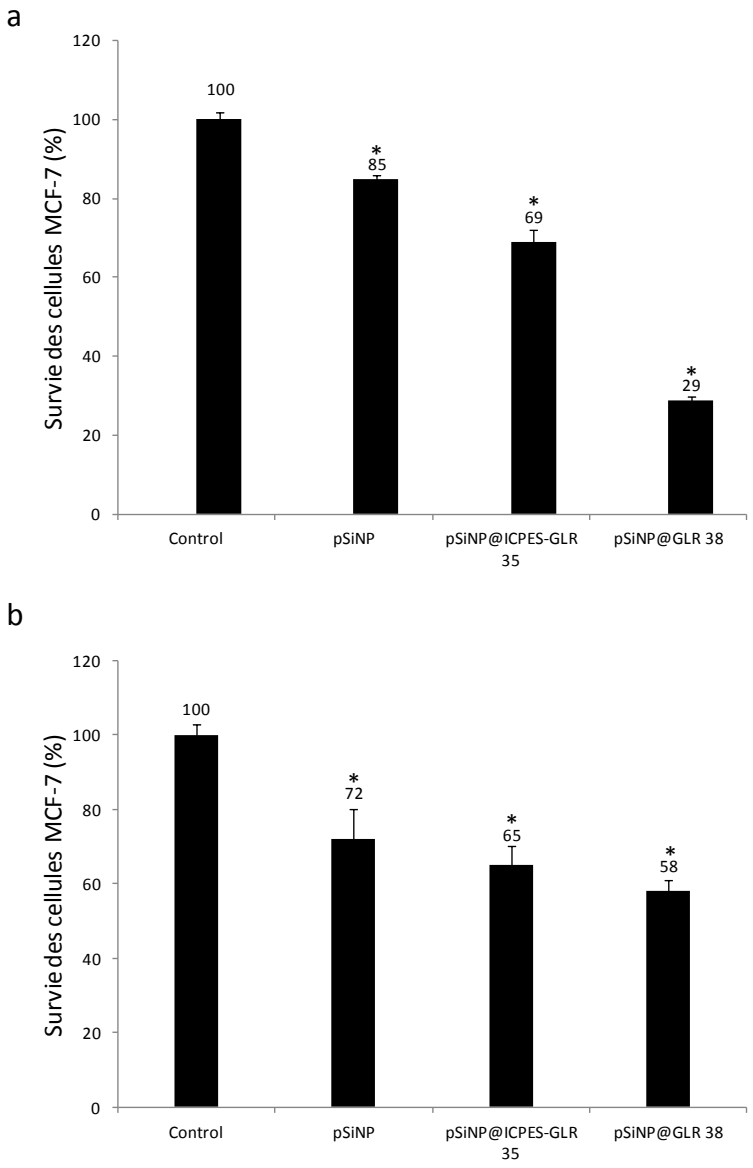



**Figure IV.29.** Efficacité photodynamique *in vitro* sous excitation monophotonique et biphotonique avec des cellules MCF-7 incubées pendant 5 h à 80 µg/mL avec **pSiNP**, les nanoparticules de silicium poreux greffées avec l'ICPES-GLR 35 (**pSiNP@ICPES-GLR35**), des nanoparticules de silicium poreux greffées avec le GLR 38 (**pSiNP@GLR 38**). **a** : Irradiation à 405 nm, 7 mW/cm$^2$, 20 min. Le décompte des cellules vivantes est réalisé par un test MTS 2 jours après l'irradiation. **b** : Irradiation à 800 nm, 3 scans de 1.57 s. Le décompte des cellules vivantes est réalisé par un test MTS 2 jours après l'irradiation. Les barres graphiques représentent les moyennes de trois exemplaires ± écart-type. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le student t test.*: $P<0,05$ et considérée comme statistiquement différente des valeurs de contrôle.

Dans cette partie 3, nous avons décrit le greffage de deux complexes de ruthénium (II) sur les pSiNP par deux approches différentes. Les formulations confirment de bons résultats en imagerie et en PDT. La non cytotoxicité des formulations sans irradiation a également été démontré. Actuellement des travaux sont en cours pour améliorer l'efficacité de ces formulations en PDT sous excitation monophotonique et biphotonique avec le greffage d'un agent de ciblage.

## 3.2 Matériels et méthodes

### *3.2.1 Fonctionnalisation des pSiNP*

***Greffage du complexe de ruthénium (II) par silanisation :***

Un mélange de GLR 35 (4,5 mg), de 3 ml de THF anhydre et de 2 µl de 3-(triethoxysilyl) propyl isocyanate (ICPES) est préparé dans un ballon de 25 mL. Le mélange est agité pendant une nuit sous reflux d'azote à température ambiante. Le produit obtenu est séché sous vide pour donner ICPES-GLR 35. Les pSiNP sont centrifugées à 14 000 rpm pendant 30 minutes dans de l'éthanol absolu puis avec du toluène anhydre. Les pSiNP (12 mg) sont redispersées dans une solution de toluène anhydre (3 ml) avec le produit ICPES-GLR 35. Le mélange est agité pendant 24 heures sous reflux d'azote à 50 ° C. Enfin les pSiNP@ICPES-GLR 35 sont centrifugées à 14 000 rpm et lavées avec de l'éthanol absolu pour éliminer le produit ICPES-GLR 35 physisorbé sur la surface des pSiNP. Le greffage est caractérisé par infrarouge, DLS, potentiel zêta et quantifié par spectroscopie UV-vis dans une solution de 2 ml de (KOH (1 M): EtOH) (1:1).

***Greffage du complexe de ruthénium (II) par hydrosilylation :***

Les pSiNP sont centrifugées à 14 000 rpm pendant 30 minutes dans de l'éthanol absolu, puis avec du THF anhydre. Les pSiNP (12 mg) sont redispersées dans une solution de THF anhydre (3 ml) avec 5 mg de GLR 38. Le mélange est agité pendant une nuit sous reflux d'azote à 50 ° C. Enfin la formulation pSiNP@GLR 38 est centrifugée à 14 000 rpm puis lavée deux fois avec du THF et 5 fois avec de l'éthanol absolu pour enlever le GLR 38 physisorbé sur la surface des pSiNP. Le greffage du GLR 38 est caractérisé par infrarouge, DLS, potentiel zêta et quantifié par spectroscopie UV-vis dans une solution de 2 mL de (KOH (1 M): EtOH) (1 :1).

# 4. Décoration de nanoparticules de silicium poreux avec des nanoparticules d'or pour l'imagerie et la thérapie photodynamique biphotonique

Dans cette étude, nous avons élaboré des nanostructures à partir de nanoparticules de silicium poreux décorées avec des nanoparticules d'or et/ou de porphyrine-NCS et/ou du mannose éthyle squarate pour des applications en imagerie et en thérapie photodynamique à 2-photons. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Frédéric Favier et Khalil Rajoua au laboratoire ICGM-équipe AIME de Montpellier, pour la synthèse des nanoparticules d'or. Les nanoparticules de silicium poreux (pSiNP) ont été préparées selon le protocole décrit au chapitre 3, par gravure électrochimique de silicium cristallin dans une solution d'acide fluorhydrique et d'éthanol absolu, suivie d'une fracture ultrasonique. Les nanoparticules d'or (AuNP) ont été préparées selon la méthode de Turkevich-Frens. Elles possèdent un diamètre de taille compris entre 11 et 13 nm. Leur synthèse et leur caractérisation sont décrites dans la suite de ce paragraphe et dans la partie « matériels et méthodes ».

## 4.1 Résultats et discussion

Dans ces travaux, nous avons préparé des nanoparticules de silicium poreux décorées avec des nanoparticules d'or et/ou de porphyrine-NCS et/ou du mannose éthyle squarate. Pour cela, nous avons envisagé deux voies d'immobilisation des nanoparticules d'or à la surface des pSiNP. La première voie consiste à adsorber les nanoparticules d'or sur les pSiNP par simple imprégnation sous agitation d'une suspension de nanoparticules d'or avec les pSiNP. La deuxième voie consiste à complexer les nanoparticules d'or sur des nanoparticules de silicium poreux aminées **pSiNP-$NH_2$**. Cette voie d'immobilisation implique au préalable une amination des pSiNP par réaction d'hydrosilylation avec l'allylamine. Nous avons préparé quatre formulations de nanoparticules à base de silicium poreux : les pSiNP non fonctionnalisées (**pSiNP**), les pSiNP complexées avec les nanoparticules d'or (**pSiNP@AuNP**), les pSiNP greffées avec la porphyrine-NCS (**pSiNP@AuNP-Porph**) et les pSiNP greffées à la fois la porphyrine-NCS avec le mannose éthyle squarate (**pSiNP@AuNP-Porph-Man**) (**Figure IV.30**). La préparation de ces systèmes est détaillée ci-après dans la partie matériels et méthodes et représentée sur la (**figure IV.32**).

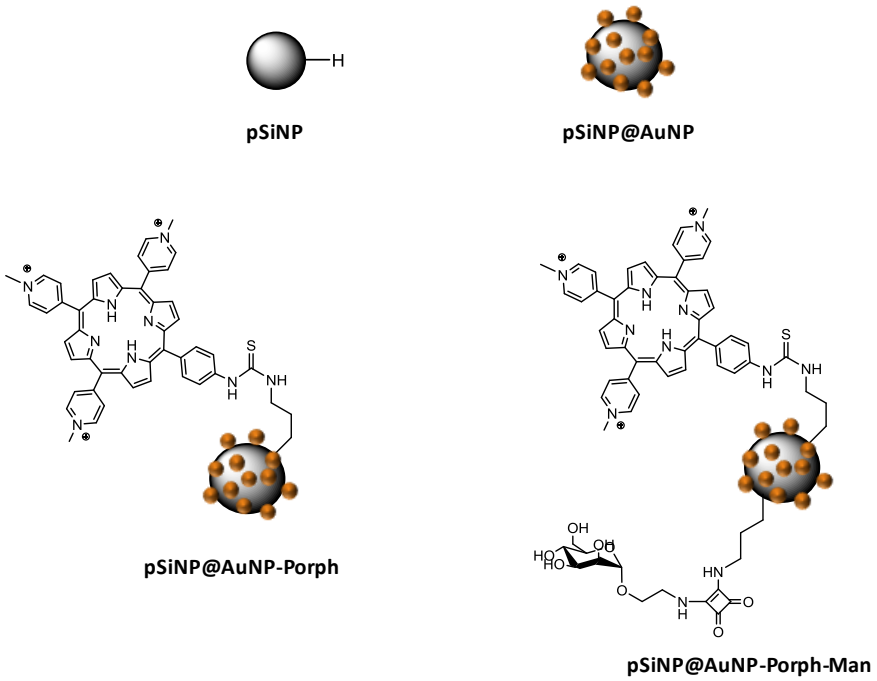



**Figure IV.30.** Représentation schématique des 4 formulations : **pSiNP**, **pSiNP@AuNP**, **pSiNP@AuNP-Porph** et **pSiNP@AuNP-Porph-Man**.

L'immobilisation des AuNP sur les nanoparticules de silicium poreux aminées est décrites sur la **Figure IV.31**.

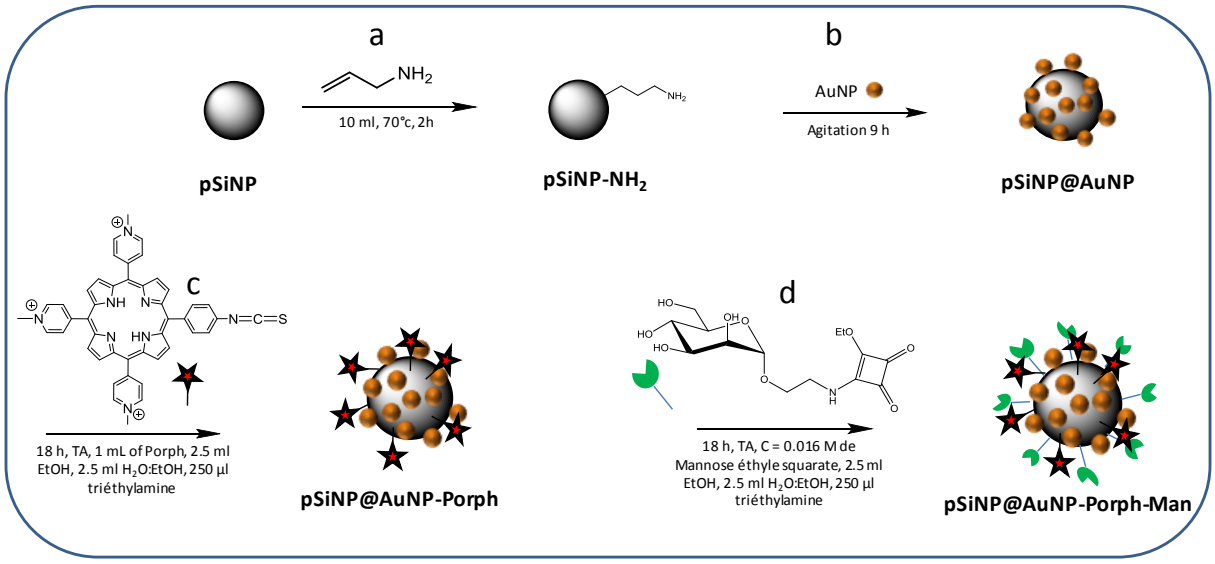



**Figure IV.31.** Représentation schématique des différentes étapes d'immobilisation et de greffages à la surface des pSiNP. **a** : hydrosilylation des pSiNP avec l'allylamine, **b** : complexation des nanoparticules d'or sur les amines, **c** : couplage de la porphyrine-NCS sur les amines des **pSiNP-$NH_2$**, **d** : greffage du mannose éthyle squarate sur les pSiNP.

Dans ce travail, les nanosystèmes obtenus par la première voie d'immobilisation, c'est-à-dire par simple imprégnation des nanoparticules d'or sur les pSiNP n'ont pas donné de bons résultats en PDT, c'est pourquoi dans la suite de ce manuscrit nous ne présentons que les caractérisations et les études sur les systèmes préparés par la deuxième voie. Les **pSiNP** et les **pSiNP@AuNP** ont été caractérisées par microscopie à transmission électronique (MET) et par tomographie 3D (**Figure IV.30.A-C**).

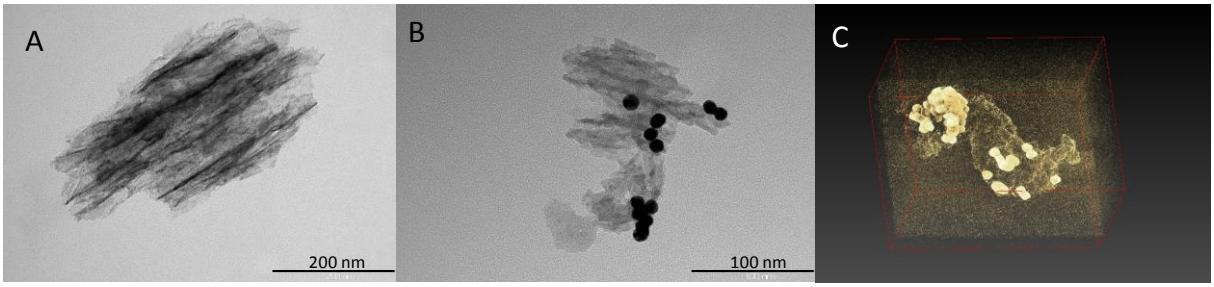



**Figure IV.32.** A : Image MET d'une **pSiNP**. B : Image MEB d'un assemblage **pSiNP@AuNP**. C : Tomographie 3D de **pSiNP@AuNP**.

Les images montrent la complexation des nanoparticules d'or sur les **pSiNP-$NH_2$**. Les nanoparticules d'or semblent être localisées plutôt à la surface externe des pSiNP que dans les pores, même si le diamètre des pores évalué par adsorption-désorption d'azote (19.5 nm) (**Chapitre 3**) est supérieur au diamètre des AuNP (11-13 nm). Les systèmes **AuNP**, **pSiNP**, **pSiNP@AuNP** et **pSiNP@AuNP-Porph** ont été caractérisés par spectroscopie UV-visible (**Figure IV.33.A**). La bande de résonnance plasmonique caractéristique des nanoparticules d'or (de taille de 13 nm) est observée à 524 nm pour la suspension AuNP dans l'eau et comme attendu, les AuNP dans l'eau sont de couleur rouge (**Figure IV.33.B**). On retrouve cette bande plasmonique mais avec une très faible intensité sur le spectre d'absorption UV-vis des **pSiNP@AuNP**, ce qui confirme la présence des nanoparticules de AuNP sur les pSiNP. Enfin, les bandes d'absorption typiques de la porphyrine sont observées à 430 nm (bande de soret) et à 528 nm, 571 nm et 659 nm (bandes Q) sur la courbe verte (**Figure IV.33.A**). La coloration verte de la suspension est due à la présence de la porphyrine NCS.

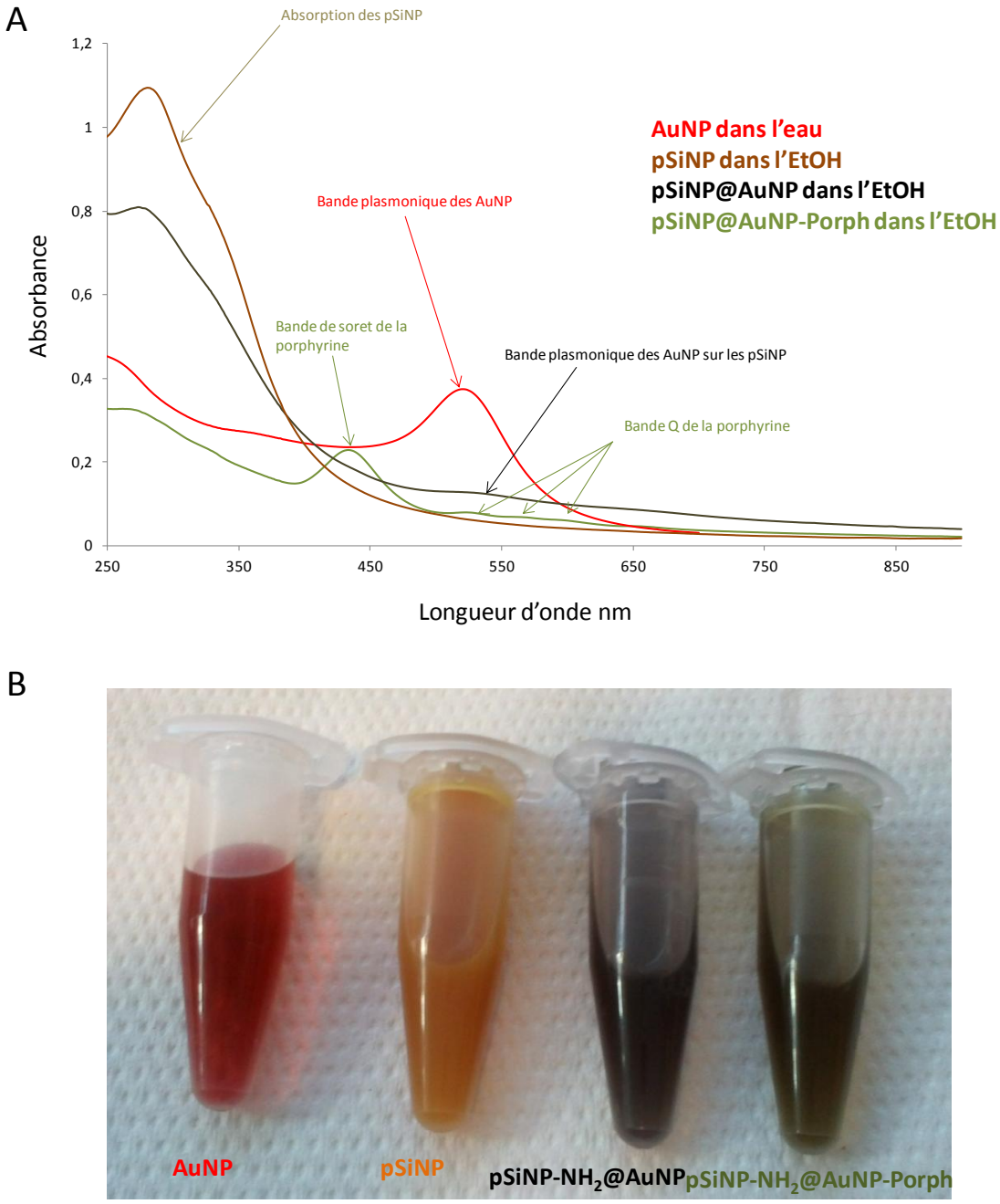



**Figure IV.33. A** : Spectre d'absorption des systèmes : **AuNP**, **pSiNP**, **pSiNP@AuNP** et **pSiNP@AuNP-Porph**, **B** : Photographie des préparations **AuNP**, **pSiNP**, **pSiNP@AuNP** et **pSiNP@AuNP-Porph**, en suspension dans l'éthanol.

Nous avons également caractérisé les systèmes **AuNP**, **pSiNP** et **pSiNP@AuNP** par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Les données montrent un accroissement du diamètre hydrodynamique en nombre pour le système pSiNP@AuNP par rapport au système pSiNP, qui est certainement dû à la présence des AuNP à la surface des pSiNP. (**Figure IV.35.35**).

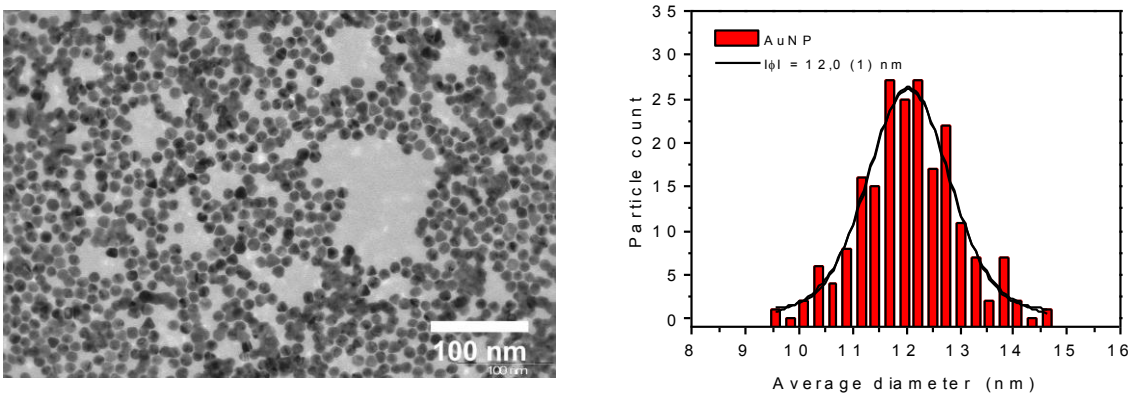



**Figure IV.34.** A gauche : image TEM de nanoparticules d'or. A droite : Spectre de DLS des nanoparticules d'or.

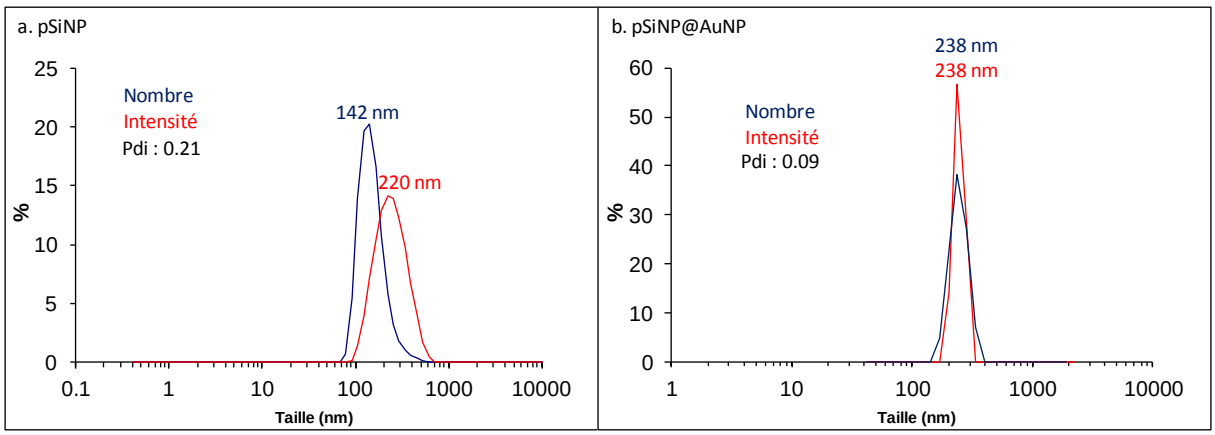



**Figure IV.35.** **a** : Diffusion dynamique de la lumière (DLS) des pSiNP en nombre et en intensité avec son Pdi, **b** : DLS des pSiNP@AuNP en nombre et en intensité avec son Pdi.

Des mesures de potentiel zêta réalisées sur chaque formulation, montrent que les pSiNP et les AuNP ont une charge négative. Après greffage avec la porphyrine-NCS cationique, les nanoparticules fonctionnalisées (**pSiNP@AuNP-Porph** et **pSiNP@AuNP-Porph-Man**) deviennent positives, indiquant la présence de la porphyrine sur les nanoparticules de silicium poreux (**Tableau IV.7**).

| Echantillons | Potentiel zêta(mV) |
|---|---|
| pSiNP | -29.3 ±0.794 dans l'EtOH |
| AuNP | - 40.3 ±0.833 dans l'eau |
| pSiNP-$NH_2$ | -25.9 ± 1.35 dans l'EtOH |
| pSiNP@AuNP | -25.1 ±0.979 dans l'EtOH |
| pSiNP@AuNP-Porph | 26.5 ±0.643 dans l'EtOH |
| pSiNP@AuNP-Porph-Man | 30.2 ±0.557 dans l'EtOH |

**Tableau IV.7.** Potentiel zêta des formulations **pSiNP**, **AuNP**, **pSiNP-$NH_2$**, **pSiNP@AuNP**, **pSiNP@AuNP-Porph** et **pSiNP@AuNP-Porph-Man**.

Les images de microscopie électronique à balayage MEB du système **pSiNP@AuNP** montrant une répartition homogène des AuNP sur les pSiNP (**Figure IV.36**). L'analyse dispersive en énergie (EDX) permet d'évaluer le rapport atomique entre les **pSiNP** (32 %) et les **AuNP** (68 %) (**Figure IV.37.38**).

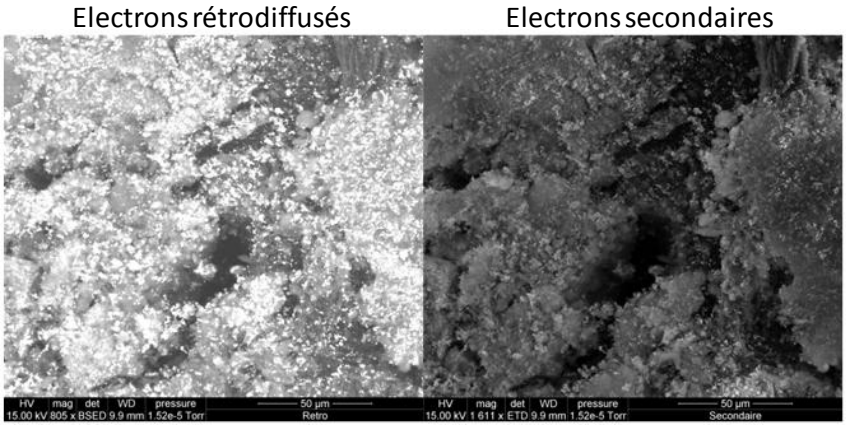



**Figure IV.36.** Images de microscopie électronique à balayage en mode électrons rétrodiffusés et secondaires.

| Spectrum | Si | Au | Total |
|---|---|---|---|
| Spectrum 1 | 29.61 | 70.39 | 100.00 |
| Spectrum 2 | 30.62 | 69.38 | 100.00 |
| Spectrum 3 | 35.71 | 64.29 | 100.00 |
| **Mean** | **31.98** | **68.02** | **100.00** |
| Std. deviation | 3.27 | 3.27 | |
| Max. | 35.71 | 70.39 | |
| Min. | 29.61 | 64.29 | |

**Figure IV.37.** Analyse dispersive en énergie de **pSiNP@AuNP** avec la détermination de la composition en AuNP et en pSiNP.

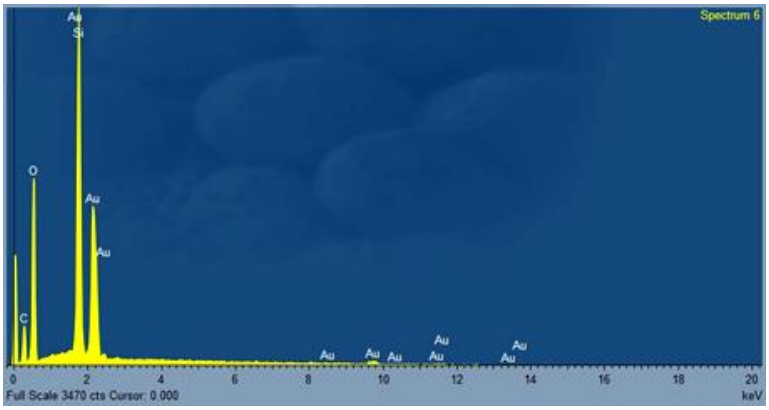



**Figure III.38.** Spectre de l'analyse dispersive en énergie de l'échantillon pSiNP@AuNP

La quantité de porphyrine-NCS et de mannose éthyle squarate greffée sur les pSiNP a été déterminée par spectroscopie UV-vis (**Tableau IV.8**), en utilisant les mêmes protocoles que ceux détaillés dans la partie **matériels et méthodes** (1.2.2). 32 µg de porphyrine par mg de pSiNP et 7.7 µg de mannose par mg de pSiNP ont été greffés. Nous constatons que ces quantités sont moins importantes que les quantités greffées, par des méthodes similaires, de porphyrines et de mannose dans les premières études (**partie IV.1.2**). Cette différence dans ces résultats s'explique par la présence de nanoparticules d'or complexées sur les amines qui empêche le greffage de la porphyrine et du mannose.

| Echantillons | Quantité de Porph (µg par mg de pSiNP) | Quantité de Porph (mmol par g de pSiNP) | Quantité de mannose éthyle squarate (µg par mg de pSiNP) | Quantité de mannose éthyle squarate (mmol par g de pSiNP) |
|---|---|---|---|---|
| pSiNP@AuNP-Porph | 32 | 0.045 | | |
| pSiNP@AuNP-Porph-Man | | | 7.7 | 0.0431 |

**Tableau IV.8.** Quantités de porphyrine et de mannose éthyle squarate greffés dans les pSiNP.

Les expériences suivantes ont été réalisées par Marie Maynadier, Magali Gary-Bobo et Audrey Gallud de l'équipe Glyco et Nanovecteur pour le ciblage thérapeutique, équipe dirigée par Marcel Garcia de l'institut des biomolécules Max Mousseron (UMR 5247).

Des expériences d'imagerie de fluorescence à 2-photons ont été réalisées pour étudier l'internalisation des nanoparticules de silicium poreux par les cellules MCF-7. Pour cela, les cellules du cancer du sein (MCF-7) ont été incubées pendant 4 heures à une concentration de 40 µg/mL avec les formulations suivantes **AuNP**, **pSiNP@AuNP**, **pSiNP@AuNP-Porph** et **pSiNP@Porph-Man**. Les cellules ont ensuite été rincées puis imagées par microscopie de fluorescence multiphotonique (microscope : Carl Zeiss) avec un laser pulsé à 850 nm. Un colorant membranaire a été ajouté pour révéler les cellules. Les images de microscopie confocale sous excitation biphotonique sont représentées sur la (**Figure IV.39**). Après 5 heures d'incubation des cellules MCF-7 avec les nanoparticules d'or, nous distinguons des zones fluorescentes bleues. Ces taches fluorescentes bleues correspondent aux AuNP. [280] D'après la littérature les nanoparticules d'or d'un diamètre de 10-50 nm émettent à 420-450 nm sous excitation UV (308 nm). Les images ici montrent que les AuNP sont bien internalisées. Lorsque les cellules MCF-7 sont incubées avec les **pSiNP@AuNP**, nous constatons toujours la présence l'agrégats fluorescents bleus qui correspondent aux **pSiNP@AuNP** et dont la fluorescence bleue observée est celle des AuNP immobilisées sur les pSiNP. Une petite partie des pSiNP@AuNP est bien internalisée et une bonne partie semble aussi localisées sur les membranes cellulaires. Dans le cas de cellules MCF-7 incubées avec les **pSiNP@AuNP-Porph**, nous observons des petits agrégats bleus dont la fluorescence provient des AuNP dans le système, mais nous observons surtout des petits agrégats rouges dont la fluorescence provient de la porphyrine. La présence de la porphyrine-NCS à la surface des pSiNP améliore la visualisation des nanoparticules par rapport au **pSiNP@AuNP**. Il est difficile de dire ici si les agrégats fluorescents bleus sont des nanoparticules d'or agrégées (en

effet ces agrégats sont gros pour être des AuNP) ou bien si ce sont des **pSiNP@AuNP-Porph** pour lesquels la fluorescence prépondérante est celle des AuNP et non de la porphyrine. Lorsque les cellules MCF-7 sont incubées avec la formulation **pSiNP@AuNP-Porph-Man**, la fluorescence rouge observée est plus importante dans la zone intracellulaire. La présence du mannose éthyle squarate greffé à la surface des pSiNP semble améliorer l'internalisation des nanoparticules.

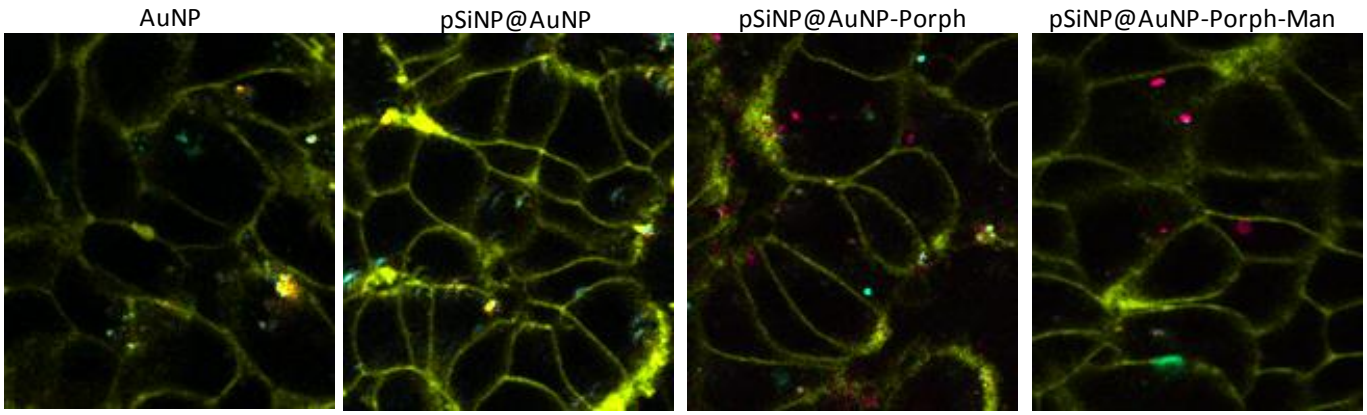



**Figure IV.39.** Images de microscopie confocale sous excitation biphotonique à 850 nm de cellules MCF-7 incubées pendant 4 h à 40 µg/mL avec les formulations AuNP, pSiNP@AuNP, pSiNP@AuNP-Porph et pSiNP@AuNP-Porph-Man.

Nous avons ensuite testé l'efficacité photodynamique des formulations *in vitro* sous excitation biphotonique. Les cellules MCF-7 ont été incubées pendant 5 heures à une concentration de 40 µg/mL avec les formulations suivantes **pSiNP**, **pSiNP@AuNP**, **pSiNP@AuNP-Porph** et **pSiNP@AuNP-Porph-Man**. Les cellules MCF-7 ont été rincées puis irradiées (850 nm, 3scans de 1.57s, microscope confocal (Carl Zeiss). Deux jours après l'irradiation, le pourcentage de cellules vivantes a été déterminé par dosage MTS. Les résultats PDT sont présentés sur la **Figure III.40**.

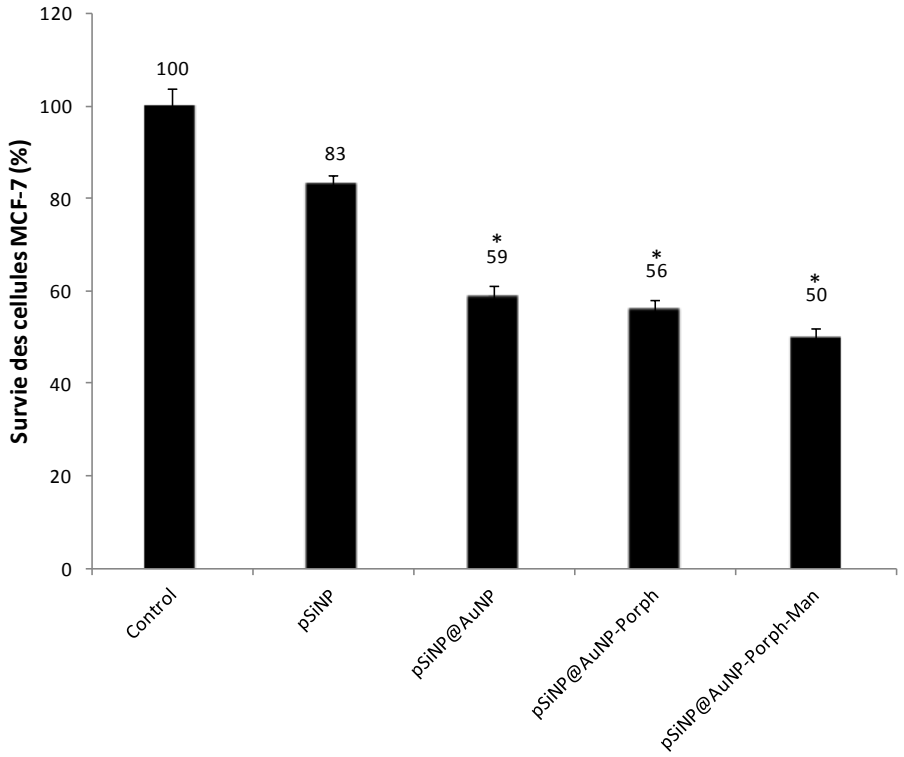



**Figure IV.40.** Efficacité photodynamique *in vitro* sous excitation biphotonique sur des cellules MCF-7 incubées pendant 5 h à une concentration de 40 µg/mL avec : du milieu de culture contrôle contenant 4% d'éthanol contrôle et avec les formulations **pSiNP**, **pSiNP@AuNP**, **pSiNP@AuNP-Porph** et **pSiNP@AuNP-Porph-Man**. Irradiation à 800 nm, 3 scans de 1.57 s. Le décompte des cellules vivantes est réalisé par un test MTS 2 jours après l'irradiation. Les barres graphiques représentent les moyennes sur trois expériences ± écart-type. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le Student t test.*: $P<0,05$ et considérée comme statistiquement différente des valeurs de contrôle.

Aucune cytotoxicité n'est observée pour les formulations **pSiNP**, **pSiNP@AuNP, pSiNP@AuNP-Porph** et **pSiNP@AuNP-Porph-Man** en l'absence d'irradiation. Après irradiation, les **pSiNP** génèrent 17 % de mort cellulaire. Ce résultat est identique aux résultats que nous avons précédemment commentés **partie IV.1.2**. Après incubation des cellules MCF-7 avec les **pSiNP@AuNP** on obtient 41 % de mort cellulaire. Deux hypothèses peuvent expliquer l'augmentation importante du taux de mort cellulaire. La première hypothèse, connue de la littérature est que les nanoparticules d'or agrégées sont capables, sous excitation biphotonique, de se comporter comme des nanobâtonnets d'or c'est-à-dire comme des PS.[281] La **figure IV.41** montre que les ajouts successifs de nanoparticules d'or aux pSiNP en suspension dans l'éthanol déplacent la bande plasmonique d'absorption des AuNP dans le rouge, caractéristique d'une agrégation de nanoparticules d'or sur les pSiNP. Le déplacement

de la bande plasmonique des AuNP dans le rouge, suppose une meilleure absorption de l'excitation biphotonique et pourrait expliquer les résultats en PDT.

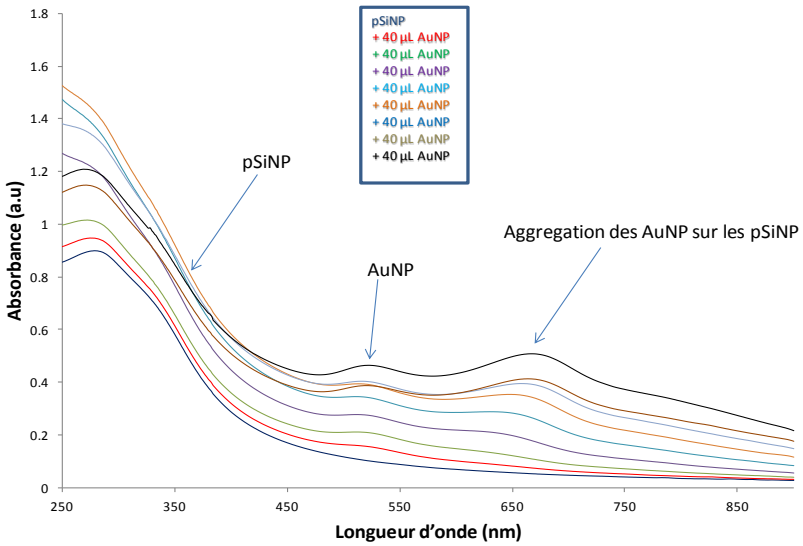



**Figure IV.41.** Spectre d'absorption des nanoparticules de silicium poreux avec des ajouts successifs de nanoparticules d'or. Déplacement de la bande plasmonique des AuNP dans le rouge.

La deuxième hypothèse, également connue de la littérature est basée sur les propriétés photothermique des nanoparticules d'or. La photothermie est un mécanisme qui produit une augmentation locale de la température dans la cellule et provoque la mort cellulaire (**Figure IV.42**).

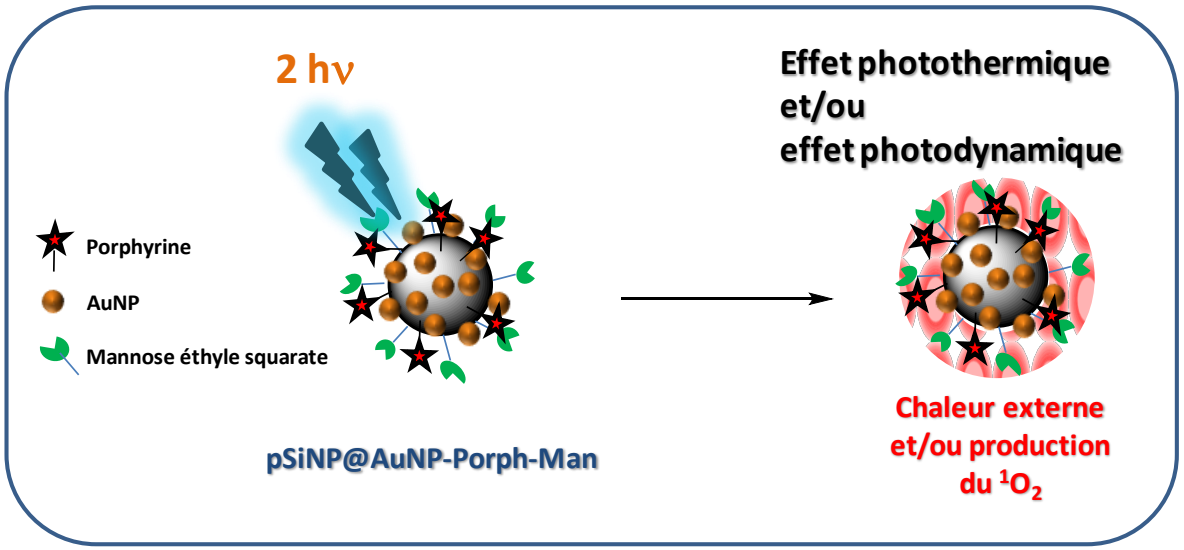



**Figure IV.42.** Représentation schématique des deux mécanismes proposés, par effet photothermique et/ou photodynamique.

Dans le cas des formulations **pSiNP@AuNP-Porph** et **pSiNP@AuNP-Porph-Man** nous constatons une légère augmentation de morts cellulaires 44 % et 50 % respectivement par rapport à la formulation **pSiNP@AuNP** (41%). Cette faible augmentation de toxicité peut s'expliquer par une quantité insuffisante de porphyrine-NCS, mais peut être également des mannoses éthyle squarate greffés sur les pSiNP. En effet ici, on s'attendait à un effet photodynamique accru par la présence de la porphyrine et également des mannoses dont le rôle dans l'internalisation des nanoparticules dans les cellules a été démontré.

A l'analyse de ces résultats, nous réalisons également qu'il n'est pas forcément nécessaire de réaliser un système sophistiqué à base de **pSiNP/AuNP/Porph**. En effet le système simple **pSiNP/AuNP** génère quasiment la même toxicité que les 2 systèmes comportant la porphyrine. Ici, il serait intéressant de tester simplement le système **pSiNP@AuNP-Man**. Nous avons réalisé ces tests sur une nouvelle série (**pSiNP**, **pSiNP@AuNP** et **pSiNP@AuNP-Man**) qui a montré que les **pSiNP@AuNP-Man** génèrent plus de toxicité (~40 %) que les pSiNP@AuNP (~25%), mais cette expérience a également montré que cette série de nanoparticules (**pSiNP**, **pSiNP@AuNP** et **pSiNP@AuNP-Man**) était toxique pour les cellules en l'absence d'irradiation. C'est une expérience qu'il faudra donc refaire.

Dans cette partie 4, nous avons montré que la complexation des AuNP sur les pSiNP-$NH_2$ est plus efficace que les pSiNP seule en PDT. Nous confirmons le succès de la complexation des AuNP et des greffages de la porphyrine et du mannose. Nous constatons que l'étude en imagerie révèle une fluorescence bleue caractéristique des AuNP et une fluorescence rouge caractéristique de la porphyrine. Enfin, nous avons mis en évidence en PDT que les nanoparticules de silicium poreux décorées avec des nanoparticules d'or améliorent la mort cellulaire.

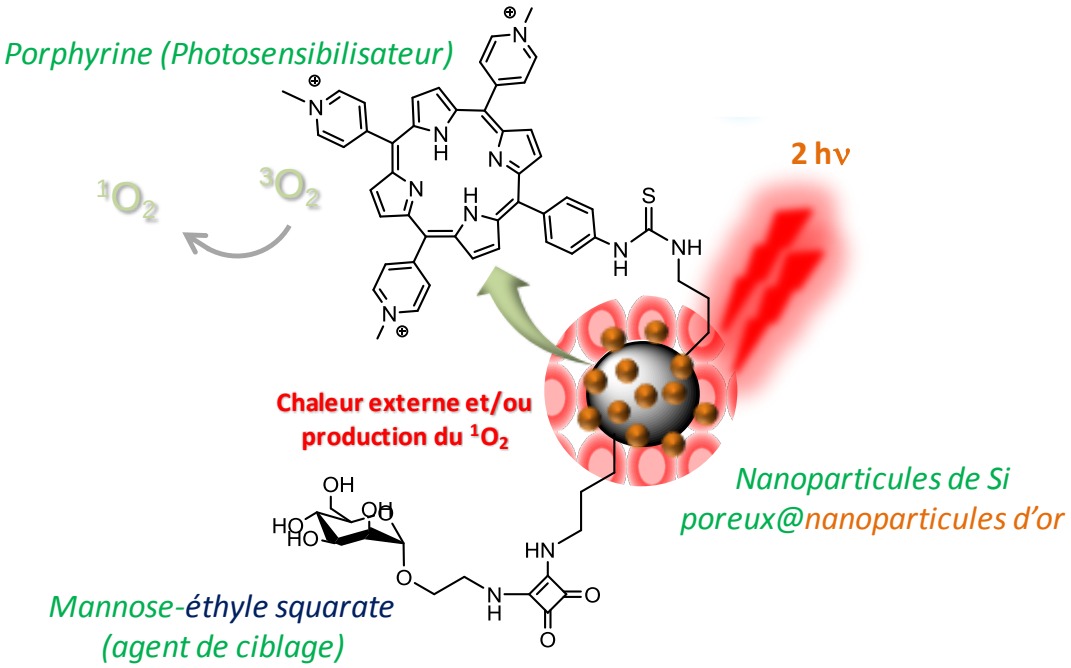



**Figure IV.43.** Représentation schématique du mécanisme d'excitation du système pSiNP@AuNP-Porph-Man.

## 4.2 Matériels et méthodes

### *4.2.1 Complexation des nanoparticules d'or et fonctionnalisations de la porphyrine-NCS et du mannose éthyle squarate.*

***Préparation des nanoparticules d'or :***

Toutes les solutions sont préparées dans l'eau distillée. Les nanoparticules d'or sont préparées par la méthode de Frens-Turkevich. Pour cela, 5 ml d'une solution tribasique déshydraté de citrate de sodium, $C_6H_5Na_3O_7,2H_2O$, (Sigma-Aldrich) 38,8 mmol/L en solution aqueuse sont ajoutées à une solution aqueuse bouillante de 50 ml à 1,0 mmol/L, une solution de tétrachloroaurate de sodium (III) déshydratée, $NaAuCl_4,2H_2O$ (99,99%, Alfa Aesar) sous agitation. L'agitation dure 20 min et la couleur de la solution vire du jaune au bleu foncé puis au rouge. Ensuite, la solution est refroidie jusqu'à température ambiante et l'agitation est prolongée de 20 min. Le diamètre de taille des nanoparticules d'or est déterminé par analyse de microscopie électronique à transmission (MET) et les diamètres moyens des particules sont observés dans la gamme de 11-13 nm.

***a. Greffage de l'allylamine sur les pSiNP par hydrosilylation :***

Les nanoparticules de silicium poreux fraîchement préparées sont centrifugées à 14 000 rpm pendant 10 min, puis rincées avec de l'allylamine. Les pSiNP sont ensuite redispersées dans 10 ml d'allylamine à 70°C sous reflux d'azote pendant 2h. Les nanoparticules sont ensuite rincées 5 fois avec de l'éthanol absolu puis centrifugées 10 minutes à 14 000 rpm pour retirer l'allylamine adsorbée à la surface.

***b. Complexation des nanoparticules d'or sur les pSiNP-$NH_2$ :***

Les pSiNP-$NH_2$ lavées à deux reprises avec de l'eau distillée sont ajoutées à 8 ml d'une solution d'AuNP puis agitées pendant 9h. La formulation pSiNP@AuNP est lavée par deux fois à l'eau distillée puis à nouveau lavée trois fois avec de l'éthanol absolu.

***c. Greffage de la porphyrine-NCS sur les pSiNP@AuNP :***

La porphyrine-NCS est greffée sur les pSiNP après hydrosilylation de l'allylamine et complexation des AuNP. Après la réaction de complexation, les nanoparticules pSiNP@AuNP sont redispersées dans 2 mL d'éthanol absolu, 1 mL d'une solution de porphyrine-NCS à 1 mg/mL et 2.5 mL d'une solution éthanol/eau (1:1). Puis 250 µL de triéthylamine sont ajoutées à la suspension pour catalyser la réaction. La réaction de couplage entre la porphyrine-NCS et l'amine à lieu sous agitation à température ambiante et à l'abri de

la lumière pendant 18 h. Les nanoparticules obtenues sont alors rincées entre 5 et 7 fois avec de l'éthanol absolu et de l'eau distillée.

***d. Greffage du mannose éthyle squarate sur les pSiNP@AuNP-Porph-Man :***

Après greffage de la porphyrine, les nanoparticules pSiNP@AuNP-Porph sont redispersées dans 2 mL d'éthanol absolu, 2.5 mL d'une solution de mannose éthyle squarate à 16 mM dans un mélange éthanol/eau (1:1) et 250 µL de triéthylamine. La réaction de couplage entre le mannose éthyle squarate et l'amine a lieu sous agitation à température ambiante pendant 18 h. Les nanoparticules obtenues sont alors rincées entre 5 et 7 fois avec de l'éthanol absolu et de l'eau distillée.

# 5. Conclusion et perspectives

Dans le chapitre 4, nous avons montré que les pSiNP peuvent être greffées avec différents photosensibilisateurs, une porphyrine-NCS cationique et deux complexes de ruthénium (II). Les nanoparticules de silicium poreux ont également été greffées avec différents agents de ciblage : le mannose phényle squarate, le mannose cétone et le mannose éthyle squarate pour le ciblage des cellules cancéreuse du sein (MCF-7) et le mannose-6-carboxylate pour le ciblage des cellules cancéreuses de la prostate (LNCaP). Les caractérisations et les quantifications des différents photosensibilisateurs et agents de ciblage greffés à la surface des pSiNP ont été réalisées. Les photosensibilisateurs ont été greffés à la surface des pSiNP avec des concentrations importantes par des couplages originaux.

Les nanoparticules obtenues ont été testées en imagerie et en PDT *in vitro* sur des cellules du cancer du sein (MCF-7) et de la prostate (LNCaP) sous excitation monophotonique et biphotonique. Ces études faites dans ce chapitre 4 confirment que la présence du mannose qui permet d'internaliser une plus grande quantité de nanoparticules dans les cellules cancéreuses. D'autre part, nous avons montré deux mécanismes de photoactivation avec les pSiNP greffées avec la porphyrine. Dans le cas d'une excitation monophotonique, le mécanisme correspond à une excitation directe de la porphyrine qui permet de générer du $^1O_2$ et des ROS. Dans le cas d'une excitation biphotonique, un mécanisme de transfert d'énergie intervient entre les pSiNP et la porphyrine, conduisant aussi à la formation du $^1O_2$ et des ROS. Ce mécanisme de transfert d'énergie est démontré à travers des mesures de sections efficaces d'absorption à 2-photons et d'une étude des propriétés de fluorescence des nanoparticules.

## Perspectives

Le projet PDT offre plusieurs perspectives, en particulier l'étape suivante va concerner l'étude *in vivo* des systèmes **pSiNP/Porph/Man**. Pour cela, l'objectif est de greffer un polymère de type PEG aux formulations **pSiNP/Porph/Man** les plus performantes *in vitro*. Le rôle du PEG est de protéger le silicium poreux d'une rapide dégradation *in vivo* et de rendre le nanovecteur furtif afin d'échapper aux macrophages vis-à-vis des mécanismes de détoxification de l'organisme. Au cours de ma thèse, nous avons commencé à travailler sur ces préparations. Nous avons voulu reprendre le système qui avait donné les meilleurs résultats *in vitro* **partie IV.1** et qui est composé de pSiNP, de la porphyrine-NCS (cationique)

et du mannose cétone. Pour cela nous avons modifié notre méthode de synthèse, en couplant le PEG au mannose préalablement au greffage sur les pSiNP.

Ce travail de synthèse s'est fait en collaboration avec le Pr. Alain Morère et avec le Dr. Elise Bouffard, équipe dirigée par Marcel Garcia de l'Institut des biomolécules Max Mousseron (UMR 5247).

Dans un premier temps, nous avons fait réagir le PEG 644 MW avec l'allylisocyanate puis purifié le produit de la réaction par chromatographie sur colonne (acétate d'éthyle : cyclohexane) (**Figure IV.P.4**). La molécule a été caractérisée par RMN du proton et par spectrométrie de masse. Après avoir introduit la fonction allyl sur le PEG, nous avons réalisé la déprotection du groupement Boc, présent sur le PEG, dans une solution de TFA : dichlorométhane (1:1). Ensuite, nous avons couplé le mannose cétone sur l'**allyl-PEG** par amination réductrice en présence d'un réducteur ($NaBH_4$). Ce couplage s'est soldé par un échec. Nous avons alors opté pour la réaction entre le **mannose phényle squarate** et l'allyl-PEG (**Figure IV.P.4**). Cette réaction a fonctionné et a donné un rendement élevé. La molécule **Man-PEG-allyl** a été caractérisée par RMN du proton et par spectrométrie de masse.

Quatre formulations de nanoparticules de silicium poreux ont été préparées : les pSiNP non fonctionnalisées (**pSiNP**), les pSiNP greffées par hydrosilylation avec l'allyl-PEG-Man (**pSiNP-PEG-Man PS**) et les **pSiNP-PEG-Man PS** greffées par silanisation avec la molécule ICPES-Porph dont nous avons fait précédement le couplage entre l'APTES et la Porphyrine-NCS. (**pSiNP-PEG-Man-Porph**) (**Figure IV.P.1**).

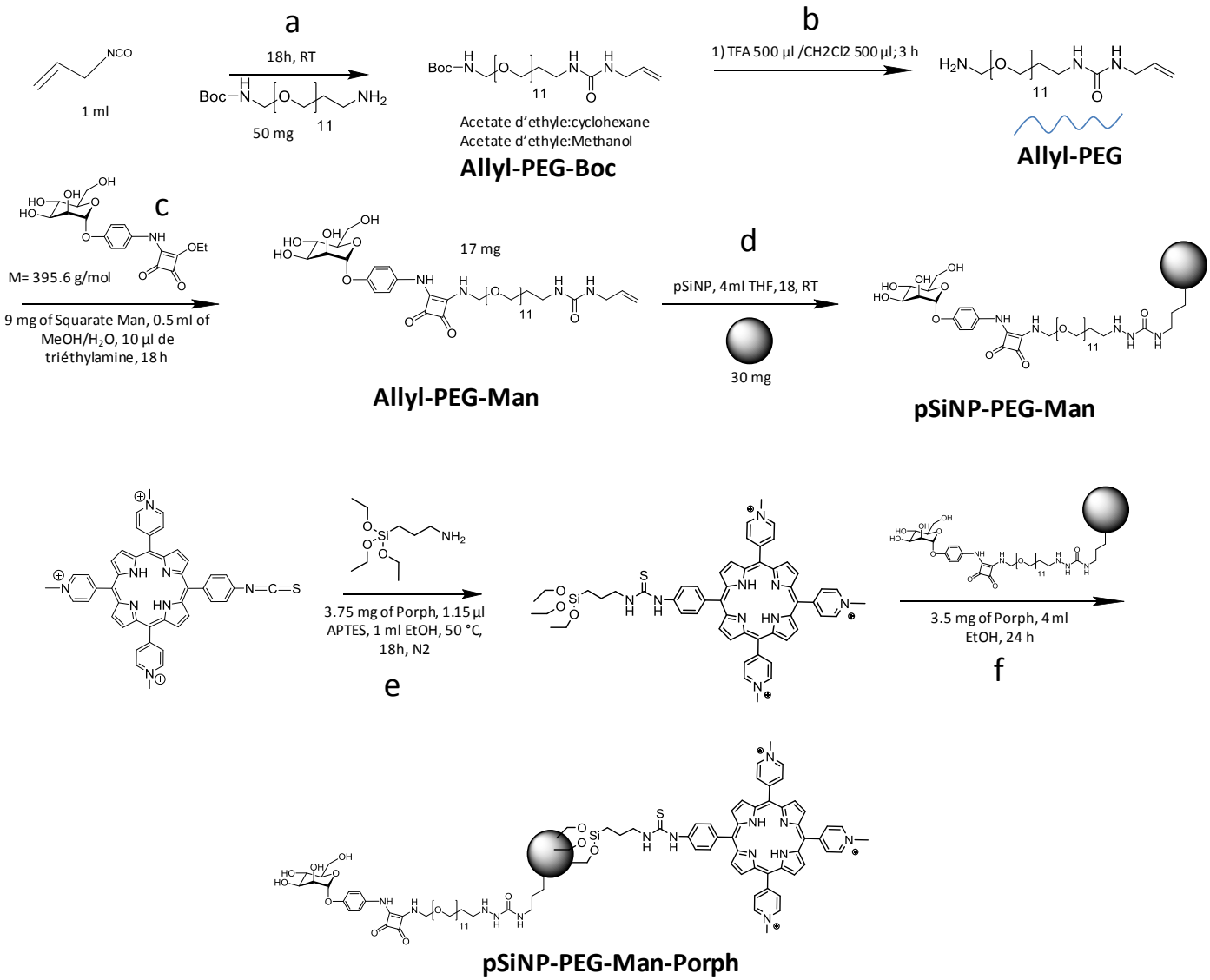



**Figure IV.P.1.** Schéma réactionnel. **a** : Couplage entre le PEG et l'allylisocyanate. **b** : déprotection du groupement Boc de l'allyl-PEG. **c** : couplage entre le mannose phényle squarate et l'allyl-PEG. **d** : Hydrosilylation de l'allyl-PEG sur les pSiNP. **e** : couplage entre l'APTES et la porphyrine-NCS. **f** : silanisation de l'ICPES-Porph sur les pSiNP.

L'efficacité photodynamique de ces formulations a ensuite été évaluée *in vitro* sous excitation biphotonique sur des cellules de cancer du sein MCF-7. Ces formulations n'ont pas donné les résultats escomptés. Ceci s'explique par la faible quantité de porphyrine greffée sur les pSiNP 6.3 µg par mg de pSiNP contre 20 à 67 µg par mg pour les études précédentes **partie IV.1.2.4**. Le faible taux de greffage de la porphyrine s'explique car il intervient après l'hydrosilylation de l'allyl-PEG sur les pSiNP qui empêche du coup la silanisation de la porphyrine. En perspective, nos prochains travaux porteront sur la silanisation de la

porphyrine sur les pSiNP avant l'hydrosilylation de l'allyl-PEG pour mener une étude *in vitro* sous irradiation à 2-photons, puis de projeter une étude *in vivo*.

Nous avons aussi essayé deux nouvelles porphyrines, une porphyrine anionique et une porphyrine neutre, un poly (éthylène glycol) bis(amine) de masse molaire 1500 MW et deux mannoses. Ici, neuf formulations de nanoparticules de silicium poreux ont été préparées, d'abord pour des tests sur des cellules du cancer du sein (MCF-7). Les neuf formulations sont : des nanoparticules pSiNP non greffées (**pSiNP**), des nanoparticules greffées avec une porphyrine anionique et avec une porphyrine neutre (**pSiNP-Porph A** et **pSiNP-Porph N**), des nanoparticules pSiNP greffées avec un poly(éthylène glycol) bis(amine) de masse molaire 1500 MW (**pSiNP-Porph A-PEG** et **pSiNP-Porph N-PEG**) et quatre formulations greffées avec un mannose ayant un bras chimique différent, le mannose phényle squarate et le mannose éthyle squarate (**pSiNP-Porph A-Man PS**, **pSiNP-Porph A-Man ES** et **pSiNP-Porph N-Man PS**, **pSiNP-Porph N-Man ES**) (**Figure IV.P.1)**.

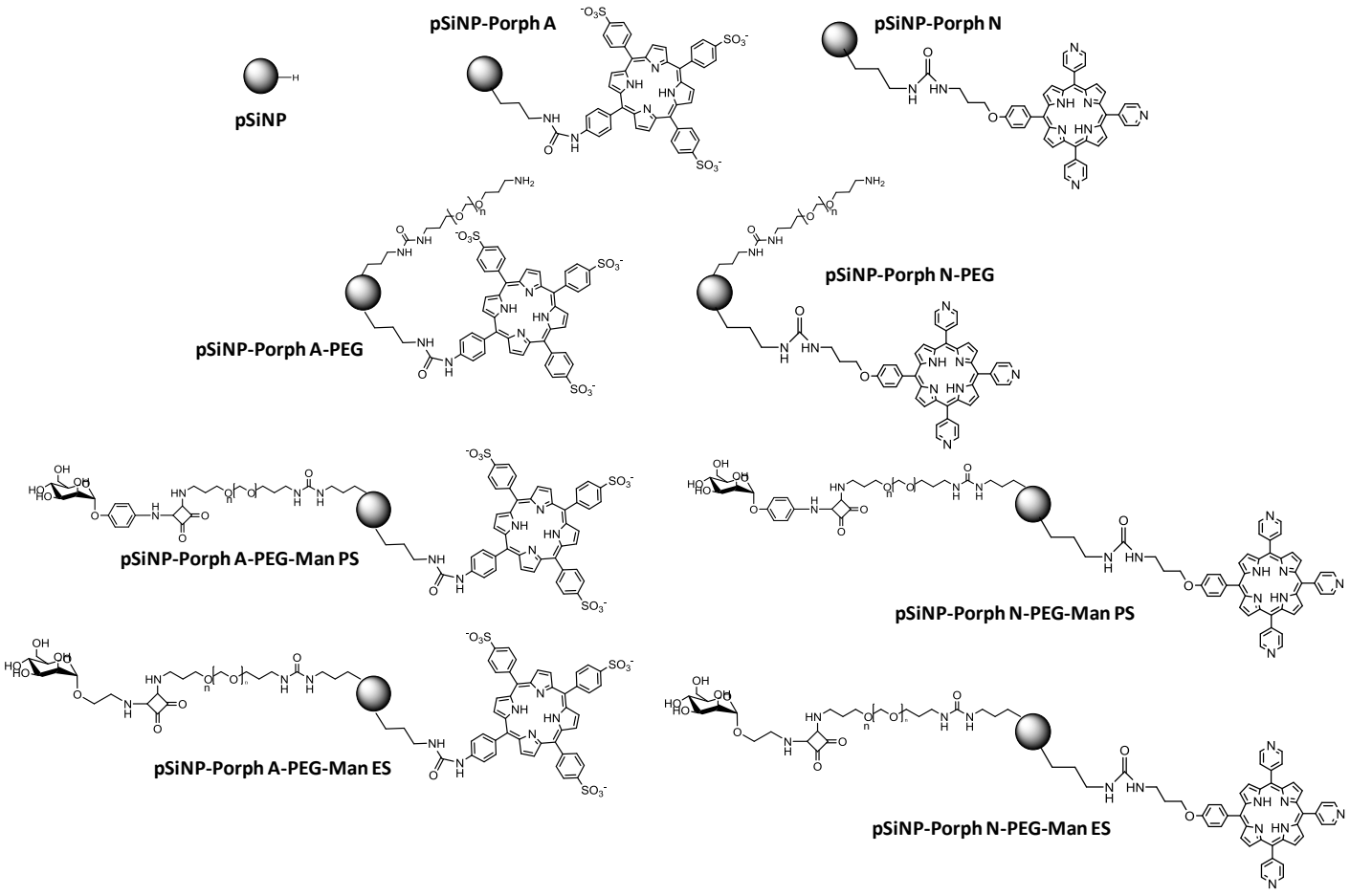
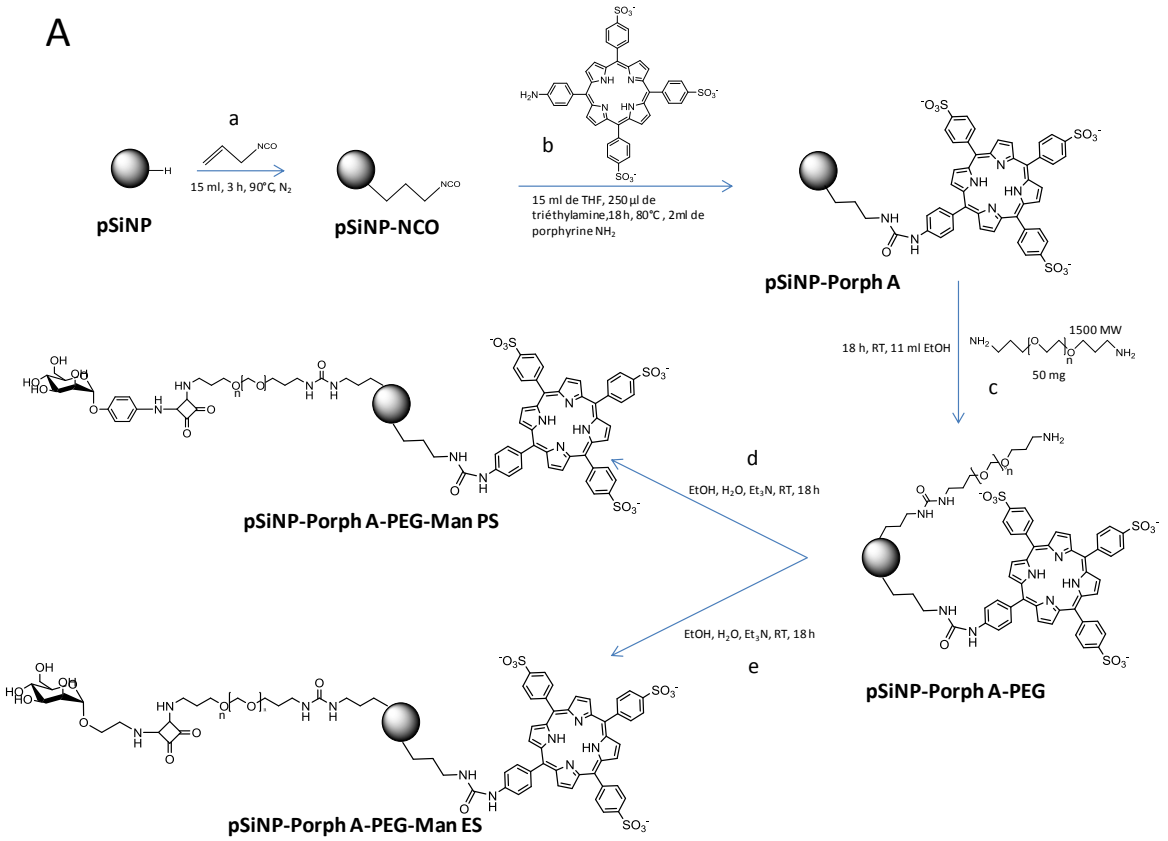



**Figure IV.P.2.** Représentation schématique des 9 formulations.

Dans un premier temps, les pSiNP ont été modifiées par hydrosilylation avec l'allylisocyanate. Le greffage de l'allylisocyanate permet d'introduire une fonction isocyanate réactive sur les pSiNP pour le greffage du PEG et des porphyrines. Les mannoses sont ensuite greffés sur les amines libres du PEG (**Figure IV.P.2.A.B**).



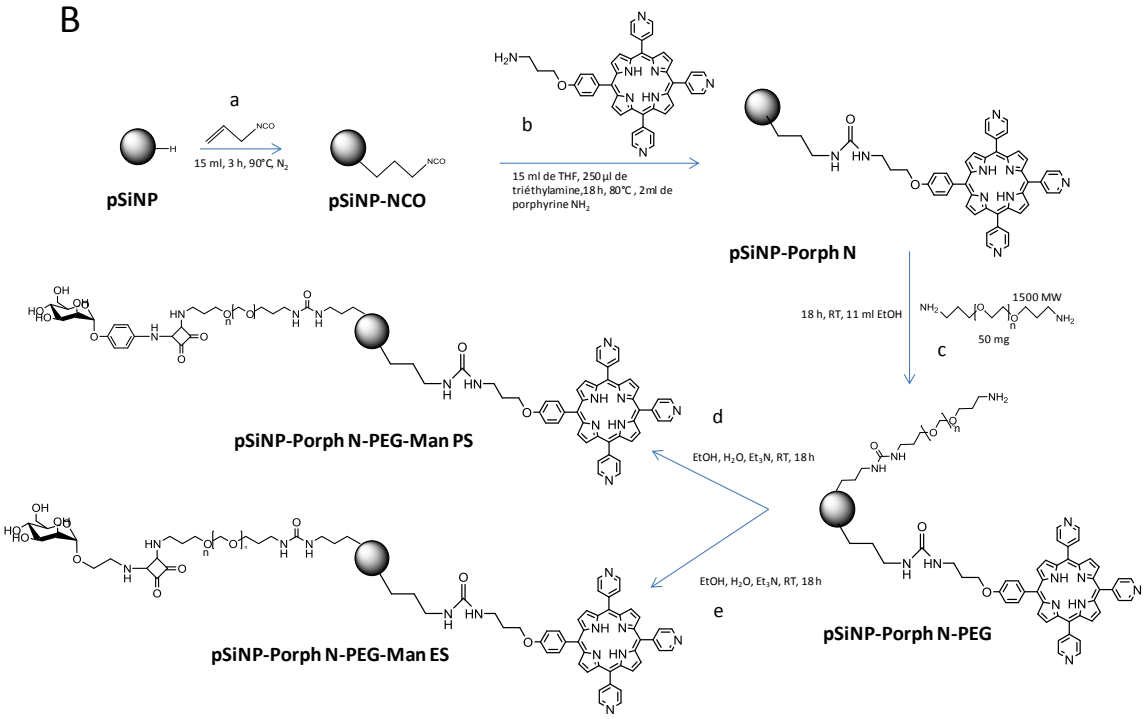



**Figure VI.P.2.** Schéma réactionnel : **A** : **a**: hydrosilylation de l'allylisocyanate sur les pSiNP. **b**: réaction entre la porphyrine anionique et l'isocyanate. **c**: réaction entre le PEG et l'isocyanate. **d, e**: réaction entre le PEG et le mannose phényle squarate et le mannose éthyle squarate. **B** : **a**: hydrosilylation de l'allylisocyanate sur les pSiNP. **b**: réaction entre la porphyrine neutre et l'isocyanate. **c**: réaction entre le PEG et l'isocyanate. **d, e**: réaction entre le PEG et le mannose phényle squarate et le mannose éthyle squarate.

L'efficacité photodynamique de ces formulations a été testée *in vitro* sous excitation biphotonique sur des cellules de cancer du sein MCF-7(**Figure IV.P.3**). L'irradiation biphotonique a été réalisée au moyen d'un laser pulsé en utilisant un microscope confocal à une longueur d'onde d'irradiation de 800 nm. Les cellules ont été exposées à 3 impulsions laser d'une durée de 1,57 s chacunes. Deux jours après l'irradiation, le pourcentage de cellules vivantes a été déterminé par dosage MTS.

Ces expériences ont été réalisées par Marie Maynadier, Magali Gary-Bobo et Audrey Gallud de l'équipe Glyco et Nanovecteur pour le ciblage thérapeutique, équipe dirigée par Marcel Garcia de l'Institut des biomolécules Max Mousseron (UMR 5247).

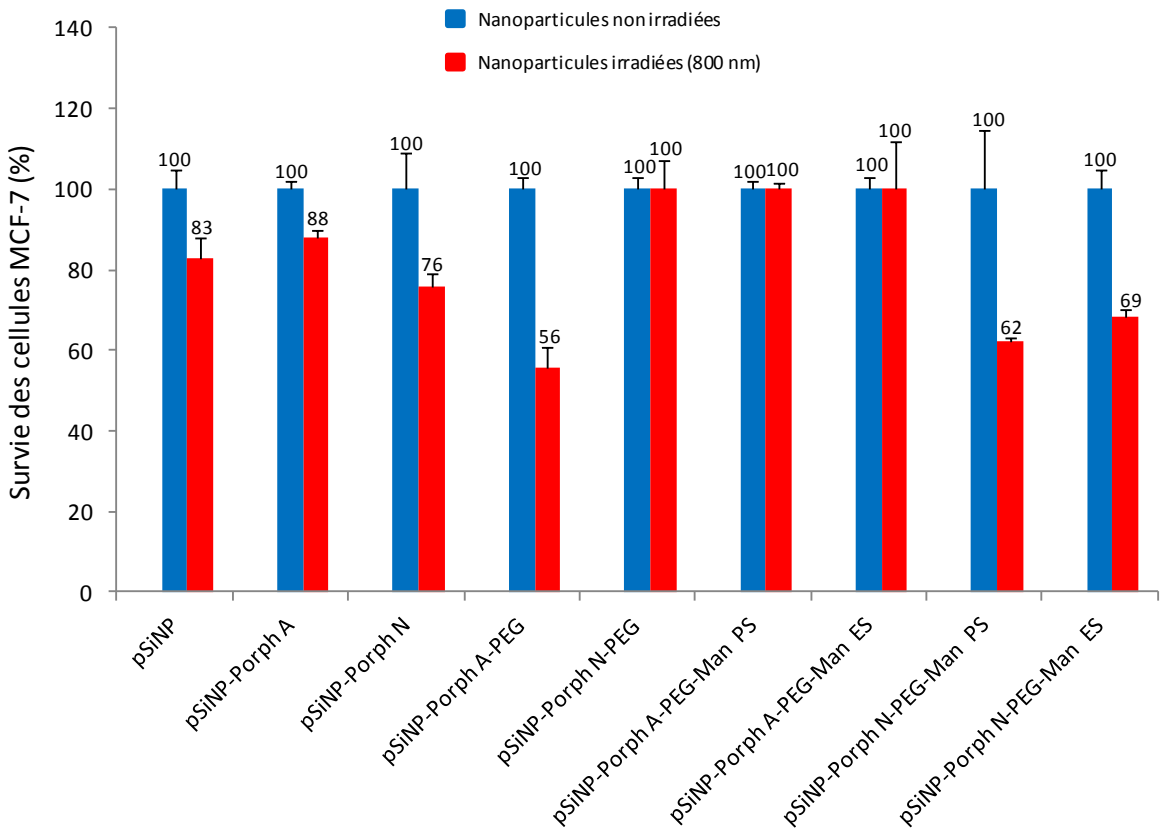



**Figure IV.P.3.** Efficacité photodynamique *in vitro* sous excitation biphotonique sur des cellules MCF-7 incubées pendant 5 h à une concentration de 40 µg/mL avec : du milieu de culture contrôle contenant 4% d'éthanol (EtOH, expérience de contrôle) et avec les neuf formulations. Irradiation à 800 nm, 3 scans de 1.57 s. Le décompte des cellules vivantes est réalisé par un test MTS 2 jours après l'irradiation. Les barres graphiques représentent les moyennes de trois exemplaires ± écart-type. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le Student t test.*: $P<0,05$ et considérée comme statistiquement différente des valeurs de contrôle.

Nous pouvons remarquer que certaines formulations ont révélé de bons résultats en PDT (**pSiNP-Porph N**, **pSiNP-Porph A-PEG**, **pSiNP-Porph N-PEG-Man PS**, **pSiNP-Porph N-PEG-Man ES**). C'est le cas en particulier des systèmes à base de porphyrine neutre et un mannose de ciblage. En revanche d'autres formulations n'ont donné aucun résultat satisfaisant (**pSiNP-Porph A**, **pSiNP-Porph N-PEG**, **pSiNP-Porph A-PEG-Man PS** et **pSiNP-Porph A-PEG-Man ES**). Les résultats non concluants s'expliquent par le fait que les nanoparticules préparées avec le PEG 1500 MW ici sont certainement beaucoup trop grosses pour être internalisées par les cellules du cancer du sein. Nous envisageons donc l'utilisation d'un PEG de plus petite taille 644 MW (le *O*-(2-aminoéthyle)-*O'*-[2-(Boc-amino) éthyle] decaéthyléne glycol).

# Chapitre 5 : Nanoparticules de silicium poreux pour la thérapie génique

# Introduction

Comme nous l'avons développé dans le chapitre 1, la thérapie génique suscite un intérêt grandissant dus à la multiplication des outils et des approches thérapeutiques. A ses débuts la thérapie génique était utilisée pour traiter des désordres génétiques mais aujourd'hui elle permet de traiter d'autres pathologies comme le cancer. La thérapie génique est une alternative aux autres méthodes de traitement du cancer comme la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. La thérapie génique sollicite un dispositif de vecteurs viraux ou non viraux pour assurer le transport d'un acide nucléique du milieu extracellulaire jusqu'au génome. Dans un premier temps, la recherche scientifique s'est portée sur l'utilisation de vecteurs viraux car ces vecteurs possèdent un pouvoir infectieux naturel mais ils ont des effets secondaires. Ces effets secondaires poussent les chercheurs à s'orienter et à développer de nouveaux vecteurs non viraux. L'objectif du projet est d'utiliser un vecteur non viral, les nanoparticules de silicium poreux greffées, avec différentes molécules cationiques pour complexer des acides nucléiques chargés négativement pour du transfert de gènes.

- La première partie de ce chapitre présente le greffage de molécule de types acides aminés (histidine, lysine et Poly-L-lysine) sur les pSiNP dans le but de favoriser la complexation d'un plasmide d'ADN et permettre la transfection cellulaire. Ces expériences ont été réalisées sur des cellules HEK.
- La deuxième partie de ce chapitre porte sur la fonctionnalisation des pSiNP avec les acides aminés par l'intermédiaire d'un 4,4-diaminoazobenzene (Azo@hist, Azo@lys). Le but de cette étude est de permettre le transfert de gènes (petits interférent d'ARN) de manière photocontrôlée, sous excitation biphotonique.

# 1. Nanoparticules de silicium poreux pour le transfert de plasmide d'ADN dans les cellules HEK

Les vecteurs non viraux chimiques alimentent de nouveaux espoirs pour la thérapie génique car ils sont moins de toxicité que les vecteurs viraux. L'objectif des vecteurs non viraux est de transporter des acides nucléiques pour stopper la prolifération des tumeurs cancéreuses. Les nanoparticules apportent de nombreux avantages en thérapie génique. D'une part, elles sont faiblement toxiques et conduisent rarement à des réactions immunitaires et d'autre part, ces nanoparticules se fabriquent en grande quantité et sont peu onéreuses, contrairement aux virus. Parmi ces vecteurs non viraux chimiques utilisés en thérapie génique, nous trouvons les lipoplexes, polyplexes, polymères et nanoparticules inorganiques. Ces nanoparticules démontrent leurs potentiels à entraîner des taux de transfection cellulaire plus importants. Parmi les nanovecteurs cités précédemment, les pSiNP apparaissent comme des nanovecteurs intéressants pour de la transfection cellulaire grâce à leur biodégradabilité, biocompatibilité et leur faible toxicité *in vivo*.[134] De plus les pSiNP offrent de nombreux avantages dont une grande porosité, une surface spécifique importante, une grande capacité de chargement en molécules et la possibilité de modifications chimique de leur surface. En résumé, les pSiNP sont des nanovecteurs attractifs pour des applications en thérapie génique. La suite de nos travaux, nous amène à utiliser des pSiNP greffées avec des acides aminés pour de la transfection cellulaire de cellules HEK.

## 1.1 Résultats et discussion

Les pSiNP préparées selon le protocole décrit au chapitre 3 ont été greffées avec des acides aminés et la poly-L-Lysine (**Figure V.1**).

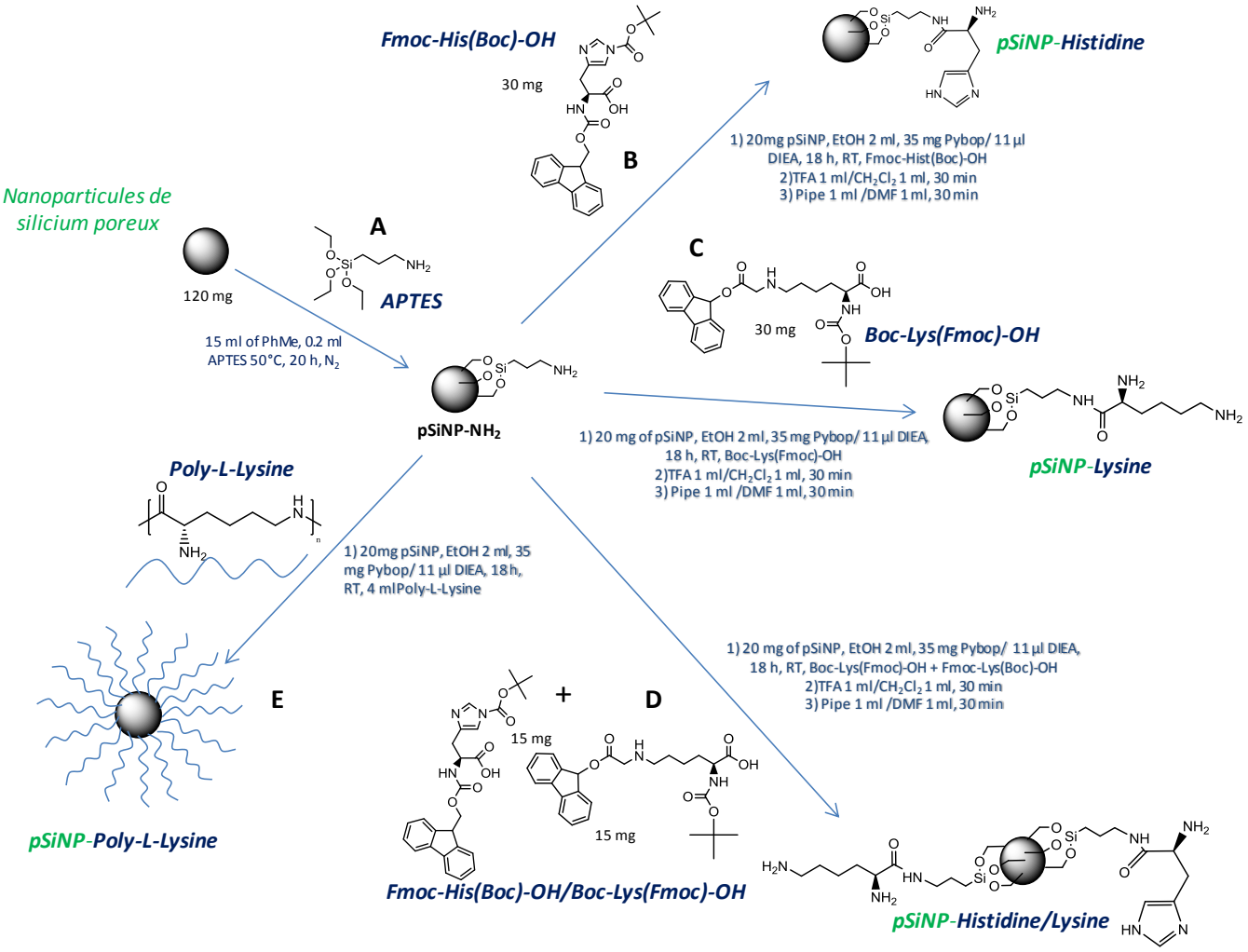



**Figure V.1.** Représentation schématique des greffages des acides aminés sur les pSiNP. **A** : Réaction de silanisation des pSiNP avec l'APTES. **B** : Greffage de l'histidine sur les pSiNP aminées. **C** : Greffage de la lysine sur les pSiNP aminées. **D** : Greffage simultané de l'histidine et de la lysine sur les pSiNP aminées. **E** : Greffage de la Poly-L-Lysine sur les pSiNP aminées.

La quantification de l'APTES sur les pSiNP a été réalisée par analyse élémentaire. Les pourcentages détectés sont de 1.96 % pour l'azote et de 10.36 % pour le carbone. La microanalyse révèle la présence de 1,16 mmol d'APTES par gramme de nanoparticules.

Après silanisation de l'APTES, les acides aminés Fmoc-his(Boc)-OH, Boc-lys(Fmoc)-OH) et le polymère (la poly-l-lysine) ont été couplés aux **pSiNP-$NH_2$** par réaction peptidique sur l'amine de l'APTES. Les acides aminés greffés sur les pSiNP ont été ensuite déprotégés.

Les groupements Boc et Fmoc ont été successivement enlevés des acides aminés. Le groupement Fmoc permet de doser la quantité d'acides aminés greffés sur les pSiNP par analyse spectroscopie UV-vis à 290 nm. La quantité d'histidine greffée sur les pSiNP est de 0.045 mmol par mg de pSiNP (**pSiNP-Histidine**). Dans le cas de la lysine, nous obtenons une valeur plus importante de 0.575 mmol par mg de pSiNP (**pSiNP-Lysine**) (**Figure IV.2**).

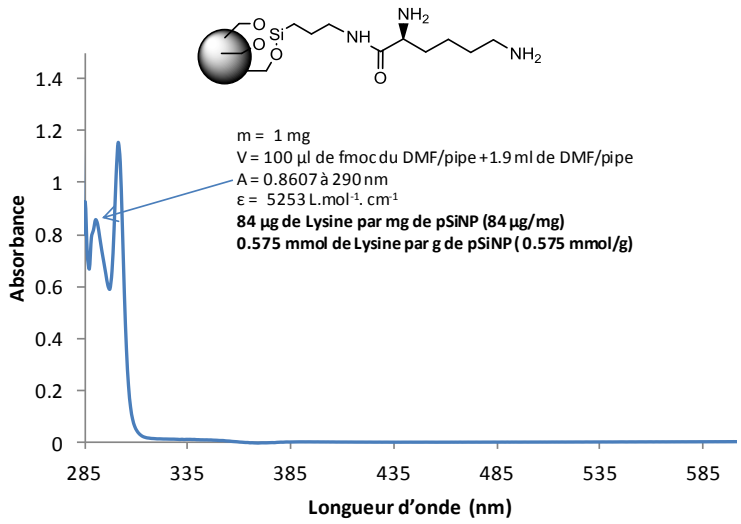



**Figure V.2.** Exemple de quantification d'un acide aminé greffé sur les pSiNP par le dosage du groupement Fmoc.

Il semble que la différence des résultats s'explique par un encombrement stérique de l'histidine plus important que la lysine. Dans le cas du greffage simultané des deux acides aminés sur les **pSiNP-NH$_2$**, 0.482 mmol d'histidine/lysine par mg de pSiNP ont été mesurées (**pSiNP-Hist/Lys**). La quantité de poly-l-lysine, n'a pas pu être mesurée, car elle ne présente pas de groupement Fmoc. Cependant le spectre de vibration infrarouge conforte sur la présence de la poly-l-lysine sur les pSiNP (**pSiNP-Poly-l-lysine**) (**Figure V.4**). Néanmoins, il est difficile d'affirmer si la poly-l-lysine a été greffée de manière covalente ou bien physisorbée à la surface des **pSiNP-NH$_2$**

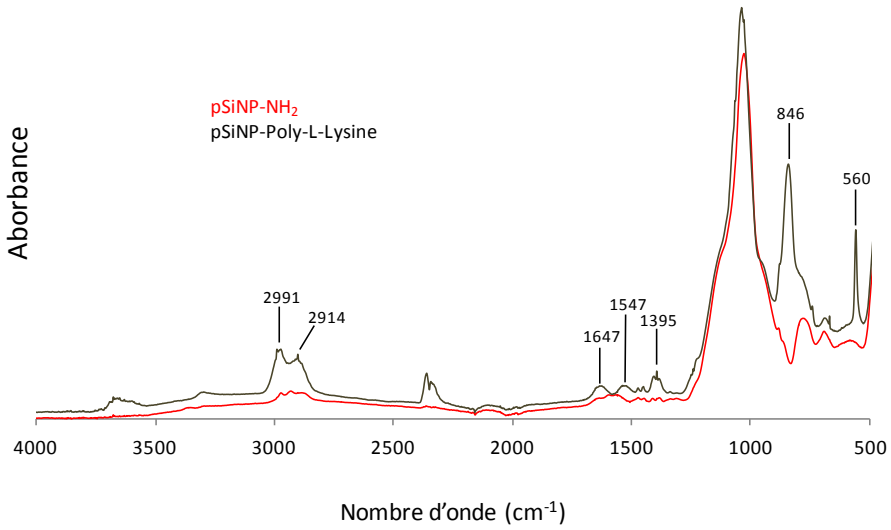



**Figure V.3.** Spectre Infrarouge des **pSiNP-$NH_2$** et **pSiNP-Poly-l-lysine**

Sur le spectre de la **figure V.3** on observe deux bandes intenses entre 2870 et 2950 $cm^{-1}$ qui correspondent aux vibrations d'élongations des liaisons C-H des $CH_2$ aliphatique. Ceci est dû aux nombreuses liaisons C-H apportées par la poly-l-lysine. D'autre part deux bandes d'intensités moyennes sont observées à 1547 $cm^{-1}$ et 1647 $cm^{-1}$ qui correspondent aux déformations angulaires des liaisons N-H de l'amine primaire et secondaire de la poly-l-lysine. Les infrarouges ont aussi été réalisés avec les nanoparticules **pSiNP-Hist**, **pSiNP-Lys** et **pSiNP-Hist/Lys** et ont donné les mêmes informations que la **figure V.4** à savoir la présence des déformations angulaires des liaisons N-H de l'amine primaire et secondaire.

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) révèle un diamètre hydrodynamique de 190 nm pour les pSiNP nues et de 295 nm en intensité pour les pSiNP greffées avec l'APTES (**Figure V.4**). La diffusion dynamique de la lumière montre aussi une augmentation du diamètre hydrodynamique après greffage de l'histidine, de la lysine et de la poly-l-lysine sur les pSiNP (**Figure V.4**). Ces systèmes **pSiNP-$NH_2$**, **pSiNP-Histidine**, **pSiNP-Lysine**, **pSiNP-Hist/Lys** et **pSiNP-Poly-L-lysine** fonctionnalisés avec des molécules cationiques devraient permettre une meilleure complexation avec les acides nucléiques.

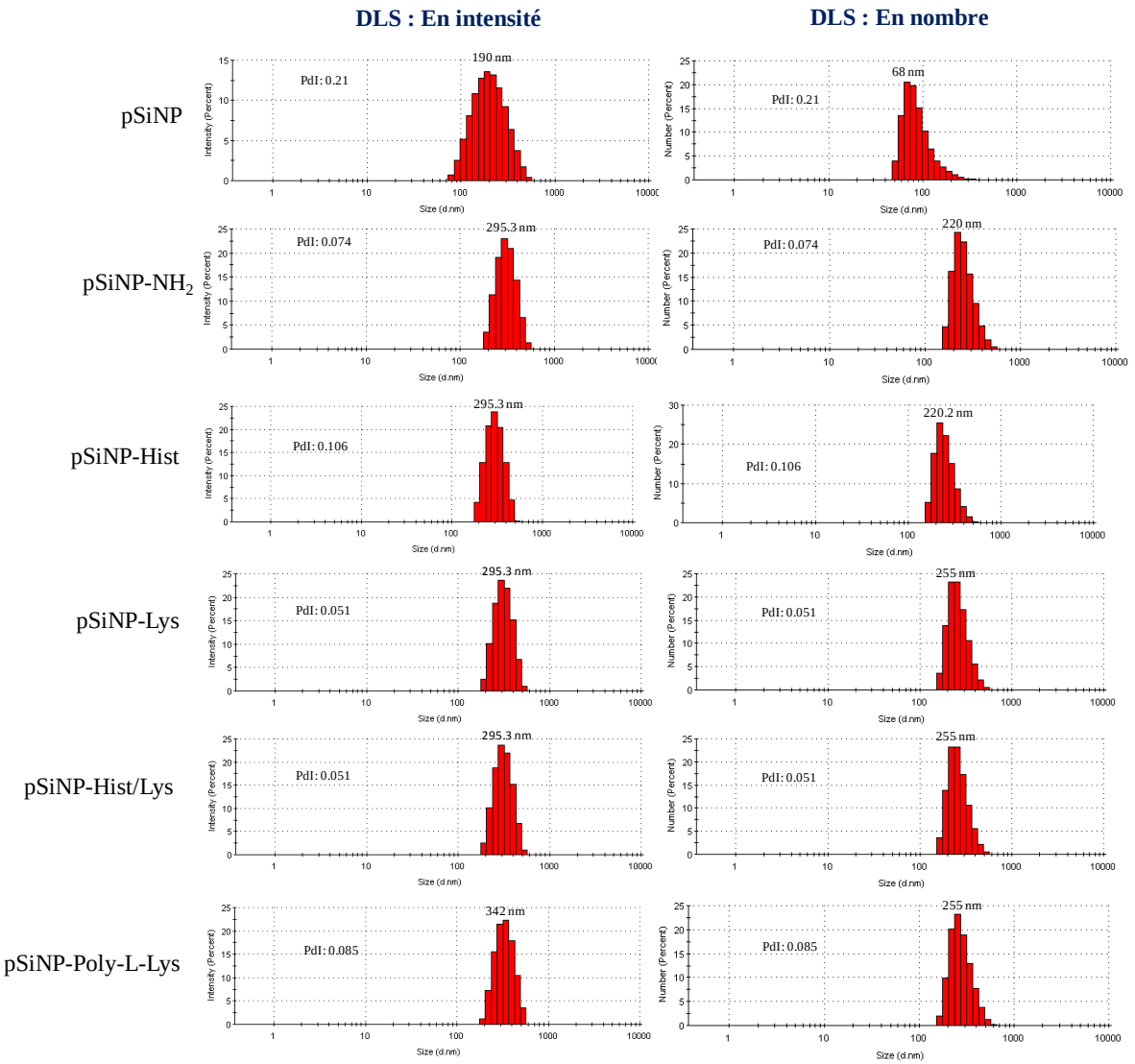



**Figure V.4.** Diffusion dynamique de la lumière en intensité et en nombre pour les 6 formulations.

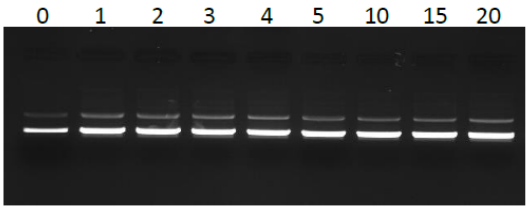
Le greffage de l'APTES et des acides aminés a été caractérisé par mesure du potentiel zêta des nanoparticules. La charge de surface des pSiNP nues avant le greffage de l'APTES est de -26.1 mV. Après greffage de l'APTES la charge de surface des **pSiNP-$NH_2$** est de +50.2 mV ce qui confirme le succès du greffage (**Tableau V.1**). Comme espéré, après couplage des différents acides aminés avec les **pSiNP-$NH_2$**, les systèmes fonctionnalisés obtenus (pSiNP-Hist, pSiNP-Lys, pSiNP-hist/lys et pSiNP-Poly-L-Lysine), présentent tous une surface chargée positivement.

| Echantillons | Potentiel zêta (en mV) dans l'éthanol |
|---|---|
| pSiNP | -26.1 ± 1.23 |
| pSiNP-$NH_2$ | 50.2 ± 1.08 |
| pSiNP-Histidine | 46.7 ± 2.12 |
| pSiNP-Lysine | 44.6 ± 1.55 |
| pSiNP-Histidine/Lysine | 48.4 ± 1.52 |
| pSiNP-Poly-L-Lysine | 48 ± 0.7 |

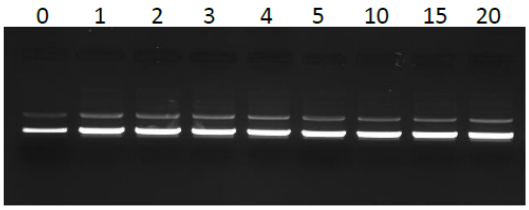
**Tableau V.1.** Mesure du potentiel zêta des 6 formulations.

Afin de démontrer la complexation des plasmide d'ADN sur les nanoparticules fonctionnalisées, la migration sur gel d'agarose a été réalisée pour les formulations suivantes **pSiNP**, **pSiNP-$NH_2$**, **pSiNP-Histidine**, **pSiNP-Lysine**, **pSiNP-Hist/Lys**, **pSiNP-Poly-L-lysine**, complexées avec du plasmide d'ADN (pADN : pTG11033) à différents ratios (pSiNP/pADN : 1 à 20) et à 2 pH différents, pH physiologique (7.4) et pH endosomal (6) (**Figure V.5**). Ces expériences ont été réalisées à Orléans par l'équipe de Chantal Pichon du Centre de Biophysique Moléculaire. Si le pDNA interagit avec une formulation alors le complexe correspondant (pSiNP/pADN) ne migre pas à l'intérieur du gel d'agarose. La **figure V.5** ne montre aucune interaction entre les pDNA chargés négativement et les pSiNP non greffées. D'après les mesures de potentiel zêta, les **pSiNP** nues sont chargées négativement et ne peuvent pas former de complexes avec le pDNA. Nous observons par contre que les autres systèmes **pSiNP-$NH_2$**, **pSiNP-Histidine**, **pSiNP-Lysine**, **pSiNP-Hist/Lys** et **pSiNP-Poly-L-lysine**, chargés positivement, sont capables de complexer efficacement le pDNA aux deux pH testés (pH 7.4 et pH 6), avec de meilleurs résultats obtenus pour les formulations **pSiNP-Histidine**, **pSiNP-Lysine** pour une complexation à un ratio de 1/5.

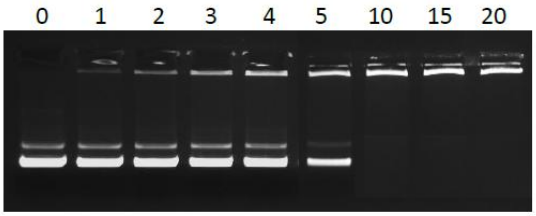
## Hepes 10 mM pH 7.4

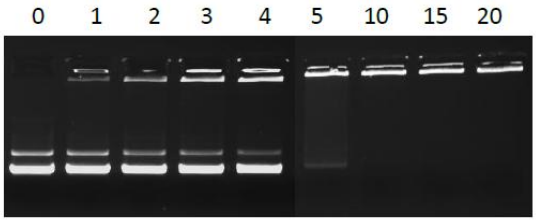



## Hepes 10 mM pH 6

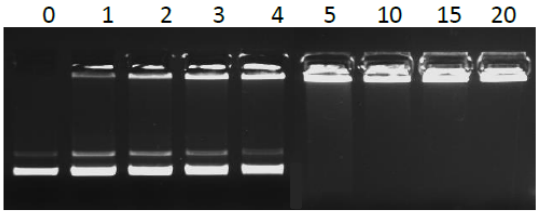


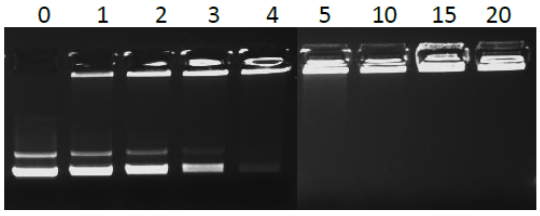

**pSiNP**
1µg d'AND complexé avec une quantité croissante de particules (rapport de charge)
**Pas de complexation visible (contrôle négatif)**



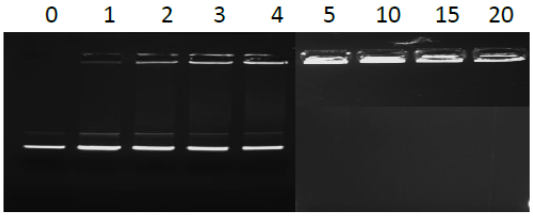



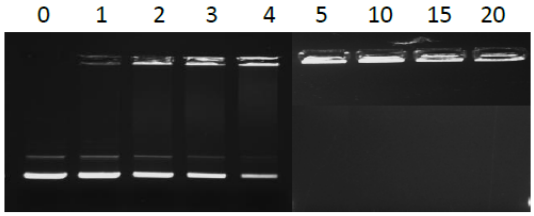

**pSiNP-$NH_2$**
1µg d'AND complexé avec une quantité croissante de particules (rapport de charge)
**Complexation complète à ratio 1/10**




**pSiNP-Histidine**
1µg d'AND complexé avec une quantité croissante de particules (rapport de charge)
**Complexation complète à ratio 1/5**




**pSiNP-Lysine**
1µg d'AND complexé avec une quantité croissante de particules (rapport de charge)
**Complexation complète à ratio 1/5**

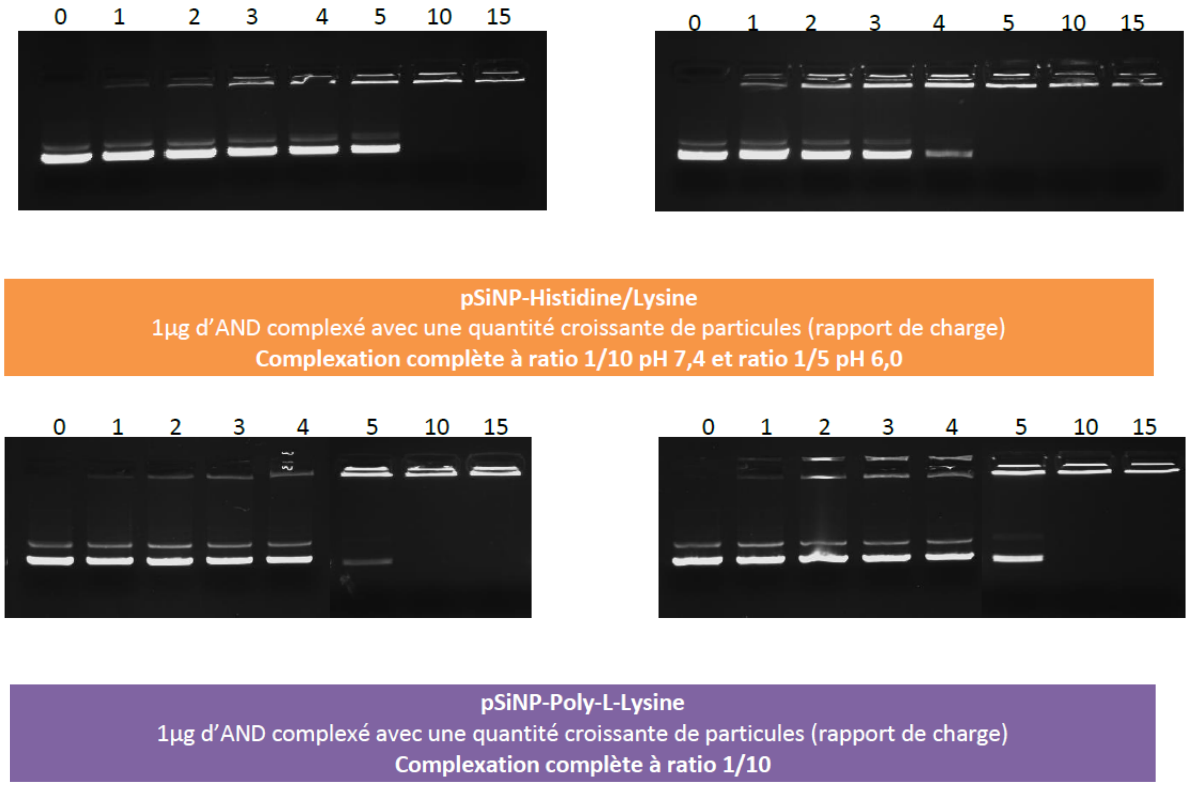
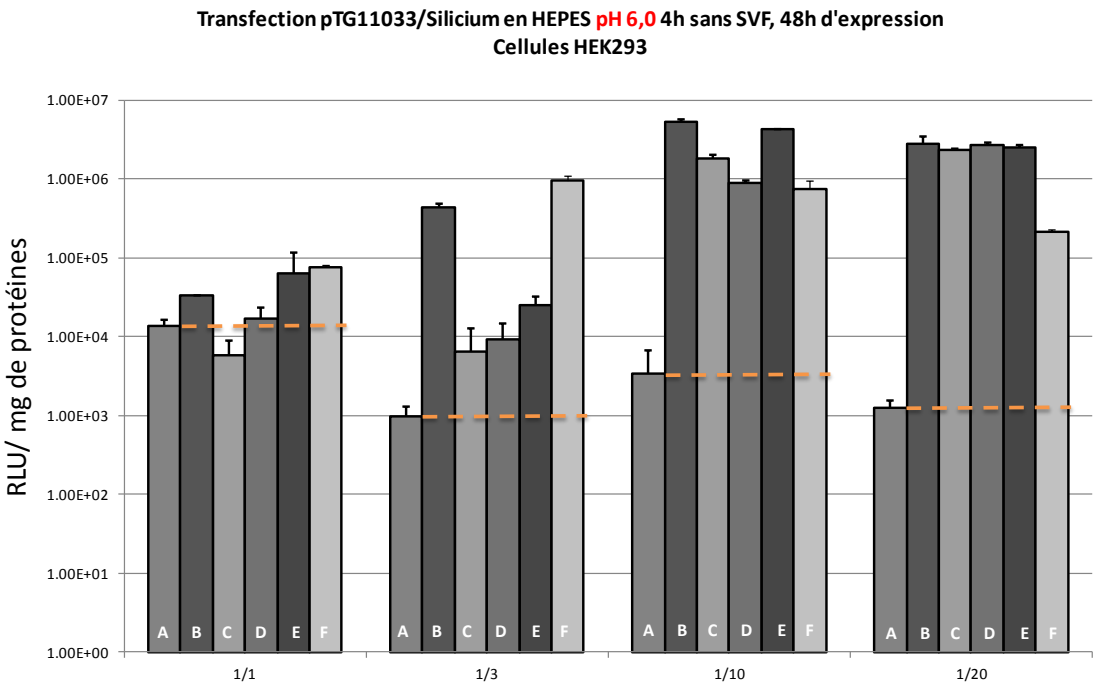


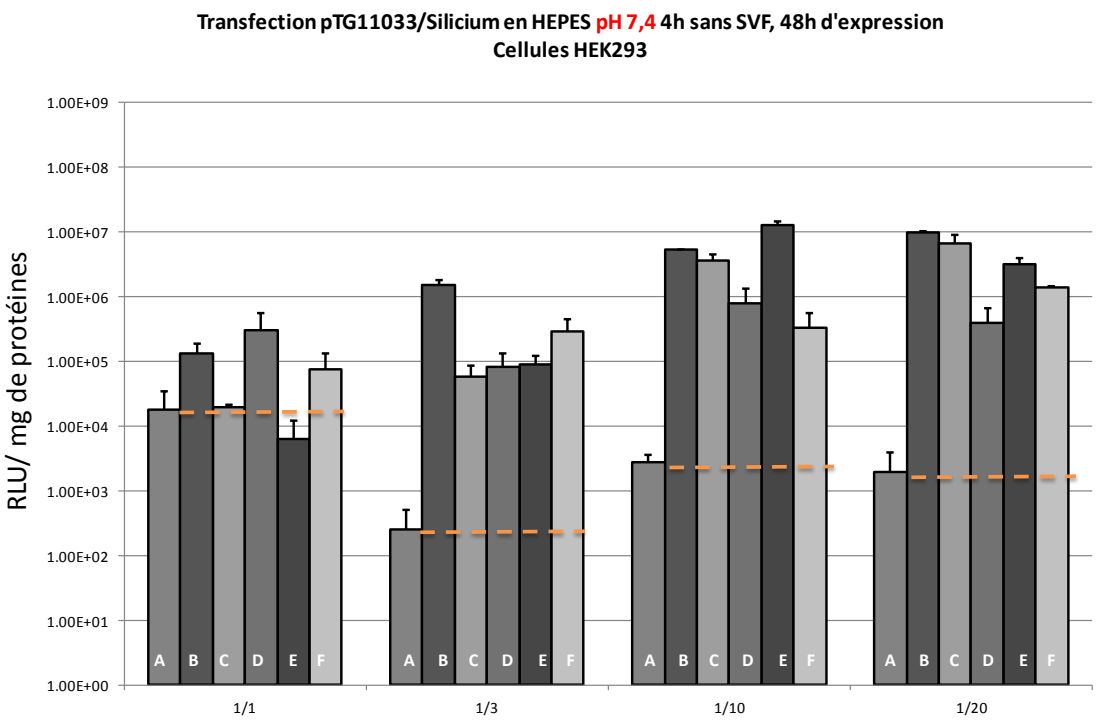

**Figure V.5.** Migration sur gel d'agarose des formulations pSiNP/pDNA.

L'efficacité de transfert d'acides nucléiques (pDNA) a été testée sur des cellules HEK293T7 (cellules Humaine Embryonnaire du Rein) avec les formulations **pSiNP**, **pSiNP-$NH_2$**, **pSiNP-Hist**, **pSiNP-Lys**, **pSiNP-Hist/Lys** et **pSiNP-poly-l-lysine**. Les cellules HEK ont été incubées pendant 4 heures à 37 °C avec les nanoparticules. Les **figures V.6.A.B.C** montrent l'expression de la luciférase 48 heures après l'incubation avec les nanoparticules à différents pH (pH 6 et pH 7.4). Les formulations **pSiNP**, **pSiNP-$NH_2$**, **pSiNP-Hist**, **pSiNP-Lys**, **pSiNP-Hist/Lys** et **pSiNP-poly-l-lysine** sont complexées avec le pDNA à différents ratios (1/1, 1/3, 1/10 et 1/20). Les nanoparticules de silicium poreux sont prises pour référence car celles-ci ne sont pas capables de complexer le pDNA à leur surface. Cette étude révèle que les formulations **pSiNP-$NH_2$**, **pSiNP-Hist**, **pSiNP-Lys**, **pSiNP-Hist/Lys** et **pSiNP-poly-l-lysine** sont capables de transfecter efficacement les cellules HEK aux deux pH testés. Sans pouvoir l'expliquer, nous observons que la formulation **pSiNP-$NH_2$** semble donner de meilleurs résultats en transfection cellulaire que les autres formulations (**Figure V.6.A.B)**. D'autre part la **figure V.6.C** montre que la présence de chloroquine permet des taux de transfection cellulaire plus importants notamment avec les formulations **pSiNP-Hist** et **pSiNP-Lys/Hist**. Ainsi l'utilisation d'agents endosomolytiques comme la chloroquine permet de favoriser l'échappement endosomal et obtenir une transfection cellulaire plus efficace.[282]

a


Transfection pTG11033/Silicium en HEPES pH 6,0 4h sans SVF, 48h d'expression
Cellules HEK293
RLU/ mg de protéines
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
A B C D E F
1/1
1/3
1/10
1/20

b


Transfection pTG11033/Silicium en HEPES pH 7,4 4h sans SVF, 48h d'expression
Cellules HEK293
RLU/ mg de protéines
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
1.00E+01
1.00E+00
A B C D E F
1/1
1/3
1/10
1/20

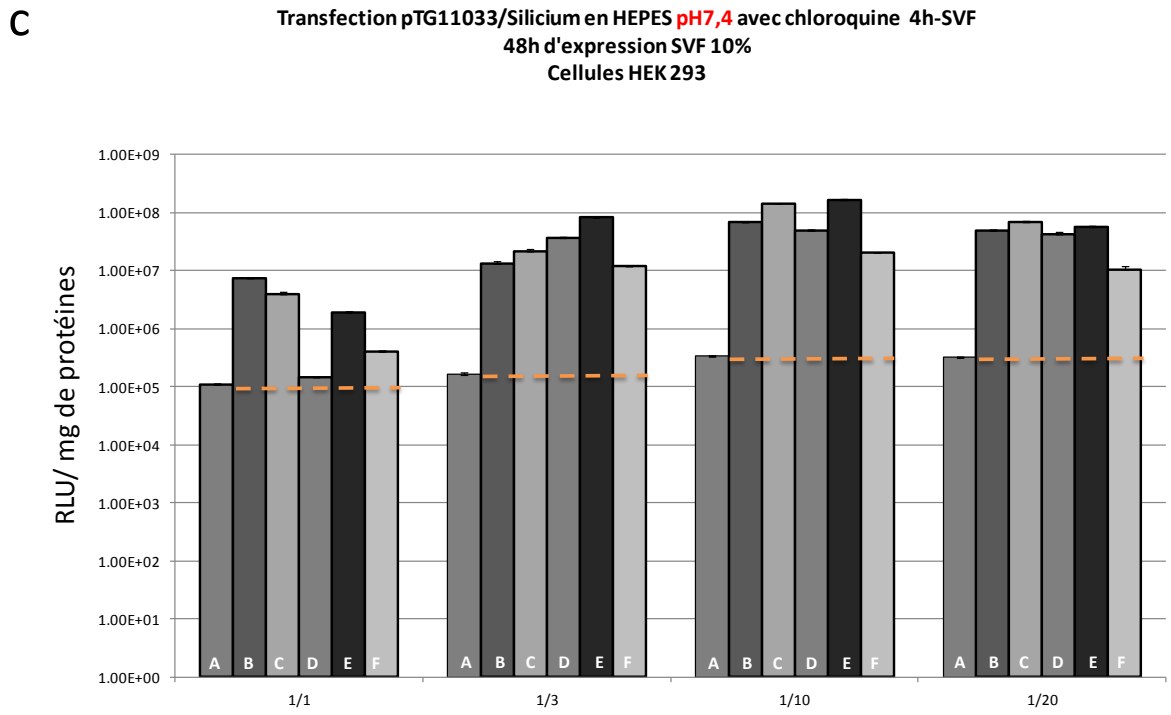



**Figure V.6.** L'efficacité de transfection *in vitro.* (**a**) : Cellules HEK293T7 transfectées pour 4 h avec 2.5 µg pDNA-luc complexée avec les formulations (**pSiNP** (A), **pSiNP-$NH_2$** (B), **pSiNP-Hist** (C), **pSiNP-Lys** (D), **pSiNP-Hist/Lys** (E) et **pSiNP-Poly-L-lysine** (F)) avec des ratios de 1:1, 1:3, 1:10 et 1:20 en HEPES à **pH 6** et sans sérum de veau fœtal (SVF). (**b**) : Cellules HEK293T7 transfectées pour 4 h avec 2.5 µg pDNA-luc complexée avec les formulations (**pSiNP** (A), **pSiNP-$NH_2$** (B), **pSiNP-Hist** (C), **pSiNP-Lys** (D), **pSiNP-Hist/Lys** (E) et **pSiNP-Poly-L-lysine** (F)) avec des ratios de 1:1, 1:3, 1:10 et 1:20 en HEPES à **pH 7.4** et sans SVF. (**c**) : Cellules HEK293T7 transfectées pour 4 h avec 2.5 µg pDNA-luc complexée avec les formulations (**pSiNP** (A), **pSiNP-$NH_2$** (B), **pSiNP-Hist** (C), **pSiNP-Lys** (D), **pSiNP-Hist/Lys** (E) et **pSiNP-Poly-L-lysine** (F)) avec des ratios de 1:1, 1:3, 1:10 et 1:20 en HEPES à **pH 7.4** avec présence de chloroquine. L'activité de la luciférase est mesurée après 48 h, et exprimée par unité de lumière par mg de protéines (RLU/mg de protéines).

La **figure V.7** décrit une représentation schématique du parcours d'une nanoparticule complexée avec un pDNA. Les nanoparticules sont internalisées par la cellule et se retrouvent dans l'endosome. La rupture de la paroi de l'endosome libère progressivement les pDNA dans le cytoplasme. Les pDNA libérés entrent dans le noyau de la cellule et la transfectent. La **figure V.8** porte sur l'étude de la viabilité des cellules HEK avec les formulations **pSiNP**, **pSiNP-$NH_2$**, **pSiNP-Hist**, **pSiNP-Lys**, **pSiNP-Hist/Lys** et **pSiNP-poly-l-lysine** à différents pH (pH 6 et pH 7,4), à différents ratios (1/1, 1/3, 1/5, 1/10) et avec ou sans chloroquine. Nous observons qu'à pH 6, les formulations sont peu toxiques voir non toxiques alors qu'à pH physiologique (pH 7,4), nous constatons une certaine toxicité des formulations. Seule les nanoparticules **pSiNP-Lys** semblent peu toxiques à pH 7.4. L'hypothèse avancée est que les

pSiNP à pH faiblement basique ou physiologique se dissolvent et relarguent les pDNA qui entrainerait de la toxicité.

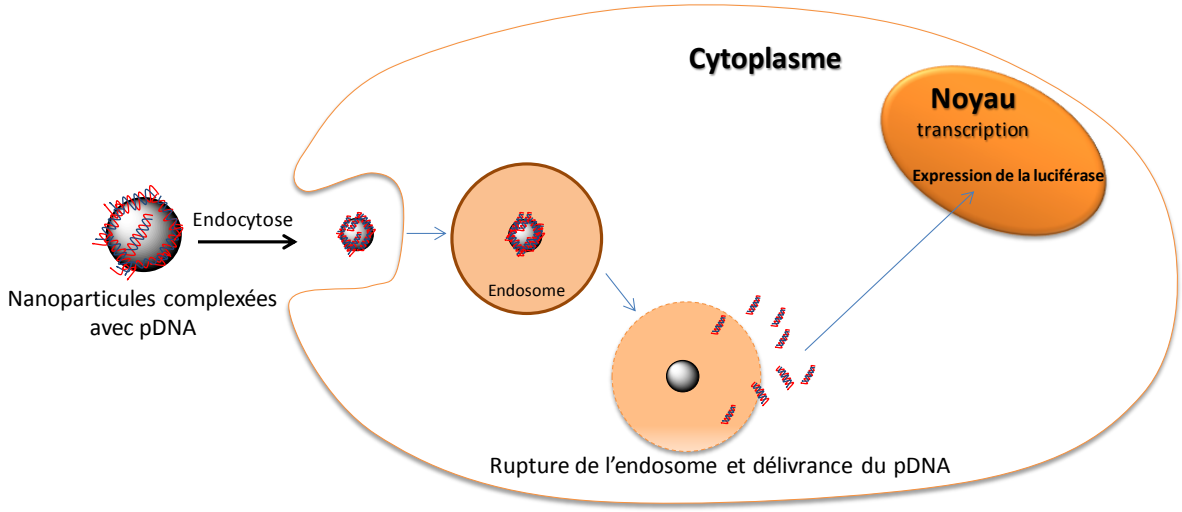



**Figure V.7.** Représentation schématique d'une nanoparticule complexée avec un pDNA pour la transfection de cellules HEK.

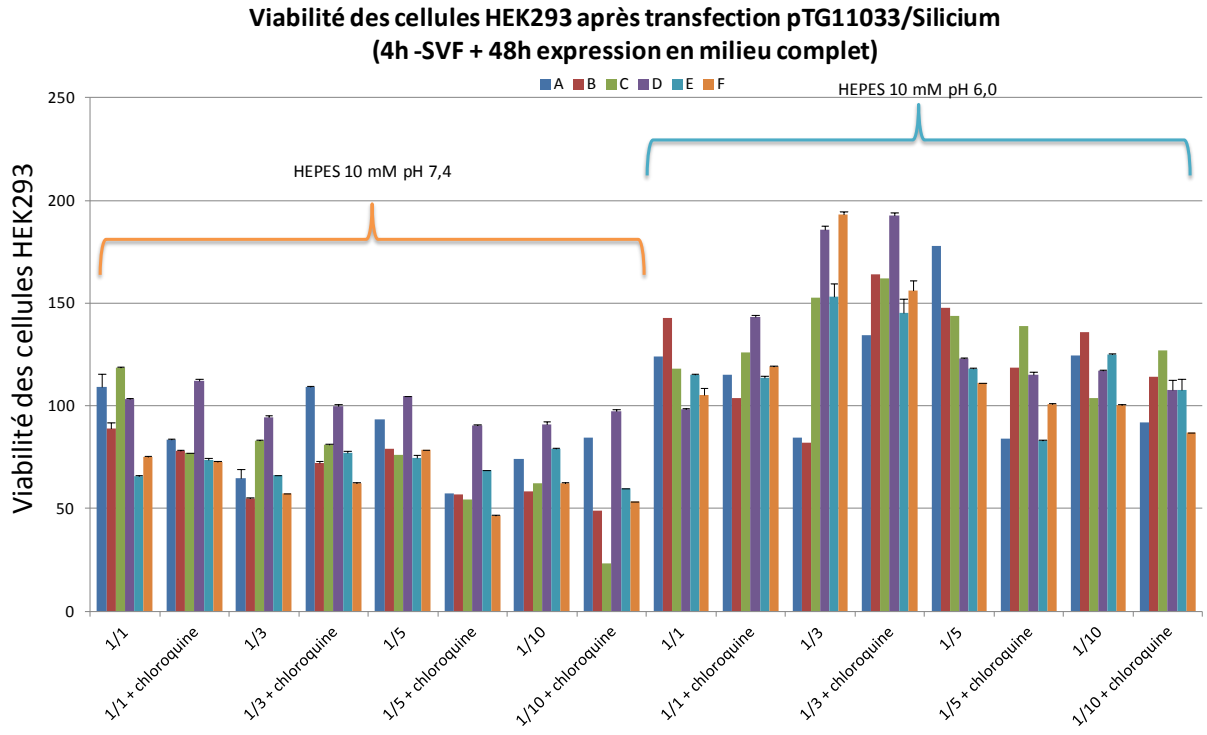



**Figure V.8.** Viabilité des cellules HEK incubées avec les formulations **pSiNP** (A), **pSiNP-$NH_2$** (B), **pSiNP-Hist** (C), **pSiNP-Lys** (D), **pSiNP-Hist/Lys** (E) et **pSiNP-Poly-L-lysine** (F)) et après transfection.

L'étude du trafic complexe (**Figure V.9.A**) montre que les formulations pDNA/pSiNP se retrouvent internalisées dans les cellules HEK. Ces résultats de trafic complexe confirment les résultats obtenus en transfection cellulaire, à savoir l'internalisation des formulations pDNA/pSiNP dans les cellules et l'entrée des pDNA dans le noyau de la cellule. Une étude supplémentaire est réalisée qui consiste à traiter les cellules HEK avec de la monensine (**Figure V.9.B**). Après le traitement avec la monensine, les compartiments cellulaires se retrouvent à pH neutre notamment les lysosomes. Cette étude révèle que l'internalisation des formulations pDNA/pSiNP ne s'effectue pas par les compartiments acides de la cellule. Ceci est une expérience concluante car en général, il est difficile pour les nanoparticules de sortir des lysosomes et de délivrer le pDNA dans le noyau de la cellule pour la transfecter.

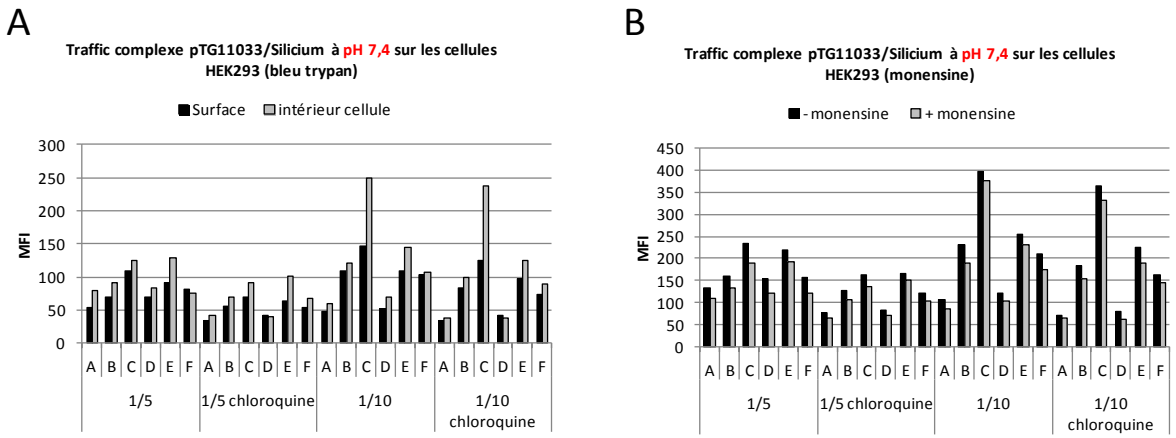



**Figure V.9. A** : Traffic complexe pDNA/pSiNP à pH 7.4 sur les cellules HEK. **B** : Traffic complexe pDNA/pSiNP à pH 7.4 avec les cellules HEK en présence ou non de monensine

A travers ces travaux, nous avons montré les succès des greffages des acides aminés sur les pSiNP. Puis ces formulations ont été caractérisées par adsorption/désorption d'azote, DLS et quantifiées par spectroscopie UV-vis. Nous avons ensuite confirmé la complexation des pDNA sur les formulations **pSiNP-$NH_2$, pSiNP-Hist, pSiNP-Lys, pSiNP-Hist/Lys et pSiNP-poly-l-lysine** avec le gel retard. Enfin ces formulations révèlent des résultats encourageants en transfection cellulaire sur des cellules HEK.

## 1.2 Matériels et méthodes

### *1.2.1 Fonctionnalisations des pSiNP*

***a. Préparation des pSiNP greffées avec le (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES) :***

Les pSiNP (120 mg) sont mises en suspension dans 15 ml de toluène anhydre, puis 200 µL de (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES) sont ajoutés à la suspension. Le mélange réactionnel est agité sous reflux d'azote à 50 ° C pendant 20 heures. Après la réaction, les nanoparticules sont centrifugées 15 min à 14 000 rpm puis lavées 5 fois avec de l'éthanol absolu. La microanalyse: C 10,36%. H 2,31%. N 1,96%. Chargement: 1,16 mmol d'APTES par gramme de pSiNP.

***b. Préparation des pSiNP greffées avec l'histidine :***

Après la réaction de silanisation avec l'APTES, les pSiNP-$NH_2$ (20 mg) sont redispersées dans de l'éthanol absolu (2 ml) avec des ajouts successifs de Fmoc-Hist(Boc)-OH (30 mg; 0,063 mmol; 1,1 éq), de Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) (35 mg; 0,067 mmol; 1,1 éq) et de N,N-Diisopropyléthylamine (DIPEA) (11µL; 0,064 mmol; 1,1 éq). La réaction est agitée à température ambiante pendant 18 heures. Ensuite, les nanoparticules sont centrifugées et lavées avec de l'éthanol absolu. Le groupement Boc est éliminé de l'histidine avec une solution de $CH_2Cl_2$ (1 mL) et de TFA (1 ml) sous agitation pendant 30 min à température ambiante. Puis les nanoparticules sont lavées trois fois avec de l'éthanol absolu. Le groupe Fmoc est éliminé par traitement aux ultrasons pendant 30 min dans du DMF (1 ml) et la pipéridine (1 ml). Après centrifugation de 15 min à 14 000 rpm, le surnageant est recueilli puis utilisé pour le dosage par spectroscopie UV-vis. Une quantité de 0,045 mmol d'histidine est greffée par gramme de nanoparticules.

***c. Préparation des pSiNP greffées avec la lysine :***

Après la réaction de silanisation avec l'APTES, les pSiNP-$NH_2$ (20 mg) sont redispersées dans de l'éthanol absolu (2 ml) avec des ajouts successifs de Boc-Lys(Fmoc)-OH (30 mg; 0,063 mmol; 1,1 éq), de PyBOP (35 mg; 0,067 mmol; 1,1 éq) et de DIPEA (11µL; 0,064 mmol; 1,1 éq). La réaction est agitée à température ambiante pendant 18 heures. Ensuite, les nanoparticules sont centrifugées et lavées avec de l'éthanol absolu. Le groupement Boc est éliminé de l'histidine avec une solution de $CH_2Cl_2$ (1 mL) et de TFA (1 ml) sous agitation pendant 30 min à température ambiante. Puis les nanoparticules sont lavées trois fois avec de l'éthanol absolu. Le groupe Fmoc est éliminé par traitement aux ultrasons pendant 30 min dans du DMF (1 ml) et la pipéridine (1 ml). Après centrifugation de 15 min à

14 000 rpm, le surnageant est recueilli puis utilisé pour le dosage par spectroscopie UV-vis. Une quantité de 0,575 mmol de lysine est greffée par gramme de nanoparticules.

***d. Préparation des pSiNP greffées avec l'histidine/lysine :***

Après la réaction de silanisation avec l'APTES, les pSiNP-NH2 (20 mg) sont redispersées dans de l'éthanol absolu (2 ml) avec des ajouts successifs de Boc-Lys(Fmoc)-OH (15 mg; 0,032 mmol; 0,55 éq) Boc-Hist(Fmoc)-OH (15 mg; 0,0315 mmol; 0,55 éq), de PyBOP (35 mg; 0,067 mmol; 1,1 éq) et de DIPEA (11µL; 0,064 mmol; 1,1 éq). La réaction est agitée à température ambiante pendant 18 heures. Ensuite, les nanoparticules sont centrifugées et lavées avec de l'éthanol absolu. Le groupement Boc est éliminé de l'histidine avec une solution de $CH_2Cl_2$ (1 mL) et de TFA (1 ml) sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante. Puis les nanoparticules sont lavées trois fois avec de l'éthanol absolu. Le groupe Fmoc est éliminé par traitement aux ultrasons pendant 30 min dans du DMF (1 ml) et la pipéridine (1 ml). Après centrifugation de 15 min à 14 000 rpm, le surnageant est recueilli puis utilisé pour le dosage par spectroscopie UV-vis. Une quantité de 0,482 mmol d'histidine/lysine est greffée par gramme de nanoparticules.

***e. Préparation des pSiNP greffées avec la Poly-L-lysine :***

Après la réaction de silanisation avec l'APTES, les pSiNP-$NH_2$ (20 mg) sont redispersées dans de l'éthanol absolu (2 ml) avec des ajouts successifs de Poly-L-Lysine (4 ml), de PyBOP (35 mg; 0,067 mmol; 1,1 éq) et de DIPEA (11µL; 0,064 mmol; 1,1 éq). La réaction est agitée à température ambiante pendant 18 heures. Ensuite, les nanoparticules sont centrifugées et lavées avec de l'éthanol absolu.

## 2. Nanoparticules de silicium poreux pour le transfert de petits interférents d'ARN (siRNA) sous excitation biphotonique

Les petits interférents d'ARN (siRNA) offrent de nouveaux outils thérapeutiques et suscitent l'attention pour des applications dans le domaine thérapeutique. Les siRNA sont synthétisés pour éteindre l'expression d'une grande variété de gènes (gene silencing). Leur recours est nécessaire dans le cas de certaines pathologies comme les infections virales, les désordres génétiques et les cancers. Cependant la délivrance de siRNA nécessite l'utilisation de vecteurs non viraux chimiques. Ces siRNA sont instables dans la circulation sanguine, sont immunogènes et leur taille et leur hydrophilie empêchent de franchir les membranes cellulaires. Parmi ces nanovecteurs organiques utilisés pour de la délivrance de siRNA, nous trouvons les lipides,[283, 284] les polymères,[285] les peptides,[286] les aptamers[287]. En ce qui concerne les nanoparticules inorganiques,[288] nous savons qu'elles font preuve de succès dans la délivrance de siRNA via le greffage de PEI[141] et PLL[139] à la surface des MSN. Dans ce travail nous avons étudié le relargage de siRNA complexés sur les pSiNP sous excitation biphotonique dans le proche infrarouge dans les cellules cancéreuses du sein (MCF-7). L'excitation biphotonique dans le proche infrarouge offre une meilleure résolution spatiale du faisceau qui irradie les cellules cancéreuses sans toucher aux tissus sains environnants et une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus biologiques.

Pour cela deux types d'acides aminés (histidine, lysine) ont été immobilisés sur les pSiNP par l'intermédiaire d'un groupement Azobenzene. L'azobenzene est utilisé ici comme ligand photosensible entre les pSiNP et les acides aminés. Sous illumination UV (365 nm), la molécule d'azobenzene est capable de subir une isomérisation *Trans-cis* réversible. Le changement de conformation (*trans-cis*) de la molécule d'azobenzene irradiée s'accompagne d'un changement d'affinité pour l'acide nucléique (**Figure V.10**).[289] Ce changement d'affinité pour l'acide nucléique directement contrôlée par la lumière doit permettre de contrôler le relargage de l'acide nucléique. Dans cette étude, nous avons fait l'hypothèse que les pSiNP sous irradiation biphotonique dans le proche infrarouge sont capables de transférer leur énergie à la molécule d'azobenzene greffée de manière covalente, entrainant ainsi le changement de conformation *Trans-cis* attendu et, par agitation moléculaire, la libération progressive des siRNA. Les siRNA libérés dans le cytoplasme se lient ensuite spécifiquement à l'ARMm bloquent la traduction en protéines et stoppent la prolifération de cellules cancéreuses, c'est ce que l'on appelle le complexe RISC

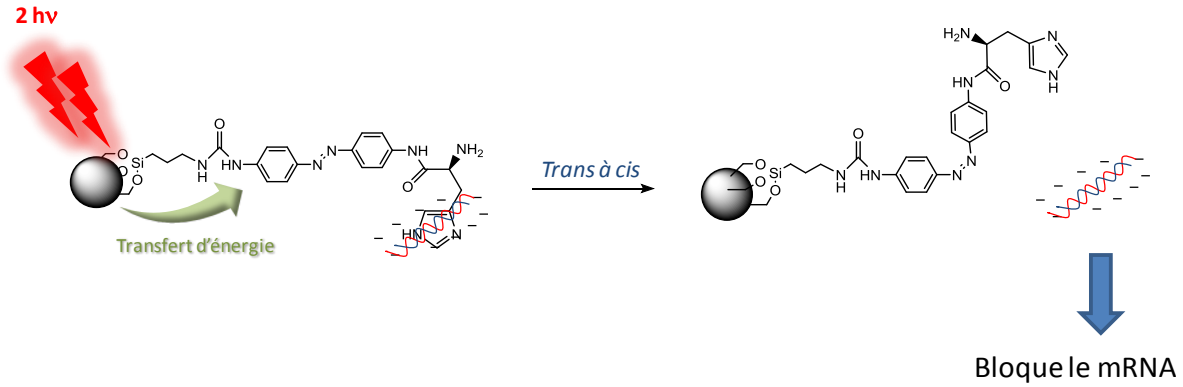



**Figure V.10.** Représentation schématique des mécanismes de relargage du siRNA.

## 2.1 Résultats et discussions

Dans un premier temps, nous avons procédé à la réaction entre le **4,4-diaminoazobenzene**[290] et deux acides aminés le **Boc-hist(Boc)-OH** et le **Boc-lys(Boc)-OH**.[291] Les deux produits formés **Azo@hist** et **Azo@lys** ont été caractérisés par RMN du proton résultats présentés dans la partie (**Matériels et méthodes**) et par spectrométrie de masse à haute résolution (**Figure V.22 V.23 V.24 V.25**). Nous avons ensuite greffé l'allylisocyanate sur les pSiNP par hydrosilylation puis couplé les molécules **Azo@hist** et **Azo@lys** sur les pSiNP, ce couplage s'est soldé par un échec. Puis nous avons tenté une autre approche qui consiste à greffer le 3-isocyanopropyltriethoxysilane (**ICPES**) sur les pSiNP par silanisation et à coupler les molécules **Azo@hist** et **Azo@lys** sur les pSiNP fonctionnalisées, ce couplage s'est aussi soldé par un échec. Nous supposons que ces deux méthodes n'ont pas fonctionné car le groupement NCO de l'allylisocyanate et de l'ICPES a subi une décomposition empêchant le greffage des deux molécules **Azo@hist** et **Azo@lys**. Ensuite nous avons opté pour une autre méthode en réalisant d'abord le couplage entre l'ICPES et les molécules **Azo@hist** et **Azo@lys**, puis en greffant par silanisation les molécules **ICPES-Azo@hist** et **ICPES-Azo@ly**s sur les pSiNP. Enfin ce couplage s'est révélé concluant. Deux autres formulations ont été préparées, les pSiNP non greffées (**pSiNP**) et les pSiNP greffées avec un 4-aminoazobenzene sans acide aminé (**pSiNP@ICPES-Azo**). Ces deux formulations ont été comparées aux formulations **pSiNP@ICPES-Azo@hist** et **pSiNP@ICPES-Azo@lys (Figure V.11)**.

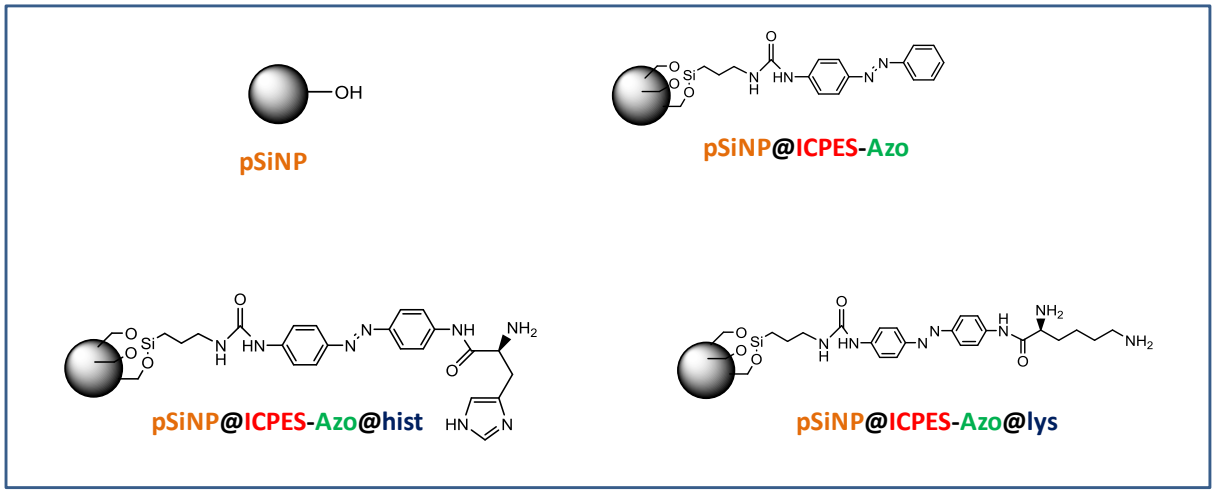



**Figure V.11.** Représentation schématique des 4 formulations pSiNP, pSiNP@ICPES-Azo, pSiNP@ICPES-Azo@hist et pSiNP@ICPES-Azo@lys.

Les nanoparticules obtenues **pSiNP**, **pSiNP@ICPES-Azo**, **pSiNP@ICPES-Azo@hist** et **pSiNP@ICPES-Azo@lys** ont été caractérisées par mesure du potentiel zêta, diffusion dynamique de la lumière (DLS), spectroscopie de vibration infrarouge. Les **pSiNP** nues possèdent une valeur de potentiel zêta négative de -51.4 mV. Une valeur négative qui se justifie par une oxydation partielle de leur surface due à la présence de liaisons silanols à la surface des pSiNP (**Tableau V.2**). En ce qui concerne la formulation **pSiNP@ICPES-Azo**, la valeur du potentiel zêta négative de -35.8 mV s'explique par l'absence d'acide aminé (**Tableau V.2**). En revanche pour les formulations **pSiNP@ICPES-Azo@hist** et **pSiNP@ICPES-Azo@lys** les valeurs de potentiel zêta sont positives avec respectivement +26.9 mV et +30.5 mV (**Tableau V.2**). Ces valeurs positives de potentiel zêta indiquent la présence des acides aminés. Des valeurs de potentiel zêta positives sont nécessaires pour une bonne complexation du siRNA sur les nanoparticules.

| Echantillons | Potentiel zêta dans l'EtOH |
|---|---|
| pSiNP | - 51.4 ± 1.17 mV |
| pSiNP@ICPES-Azo | - 35.8 ± 0.55 mV |
| pSiNP@ICPES-Azo@Lys | +30.5 ± 1.06 mV |
| pSiNP@ICPES-Azo@Hist | + 26.9 ± 0.208 mV |

**Tableau V.2.** Potentiel zêta des 4 formulations.

Les nanoparticules après greffage ont été caractérisées par DLS (**Figure V.25**). Pour les **pSiNP** nues, nous observons une taille de 164.2 nm en nombre et pour les formulations **pSiNP@ICPES-Azo**, **pSiNP@ICPES-Azo@hist** et **pSiNP@ICPES-Azo@lys**, nous obtenons respectivement des tailles de 295.3 nm, 396.1 nm et 255 nm en nombre (**Figure IV.12**).

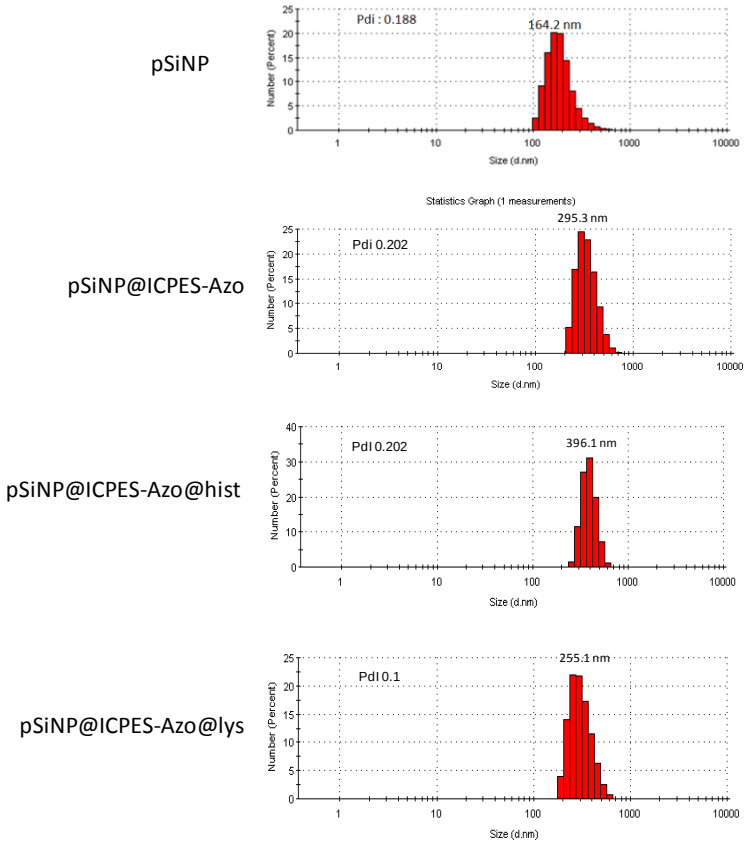
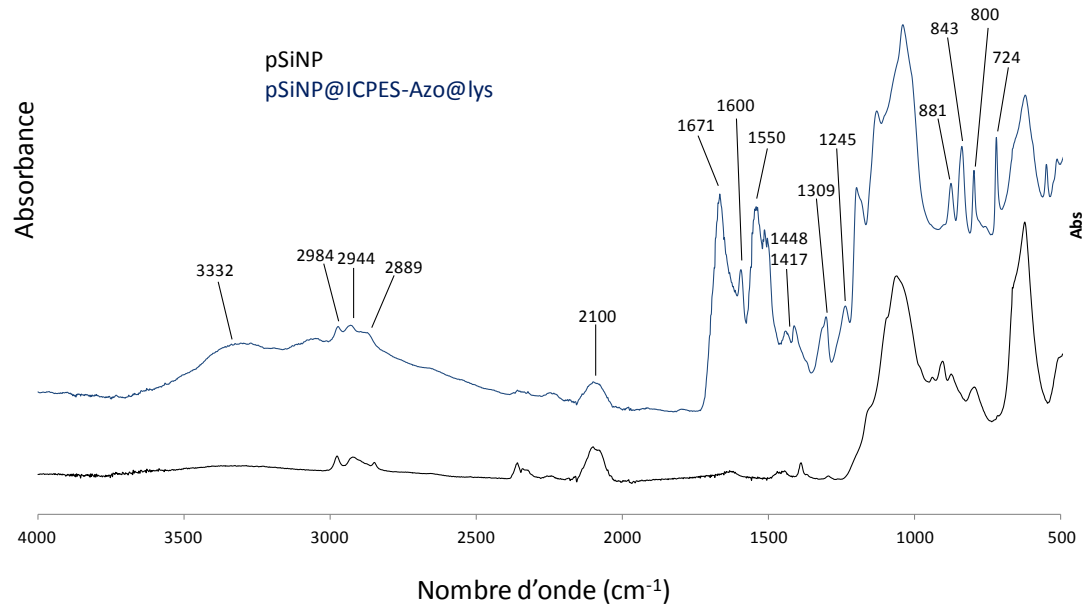


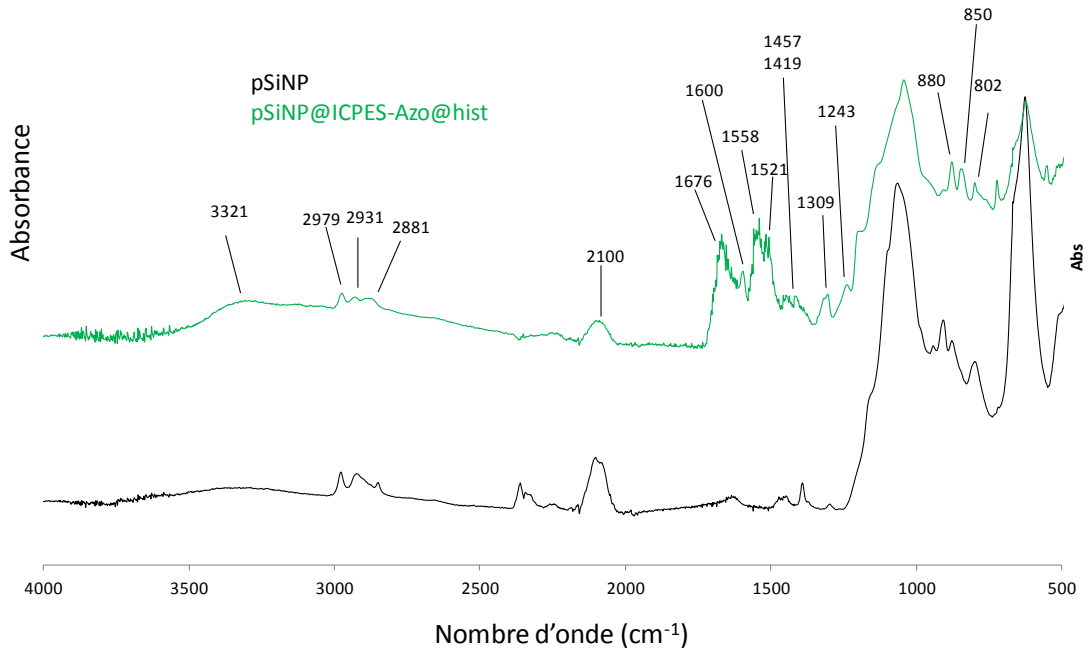

**Figure V.12.** Diffusion dynamique de la lumière en nombre des pSiNP, pSiNP@ICPES-Azo, pSiNP@ICPES-Azo@hist et pSiNP@ICPES-Azo@lys.

Les greffages des molécules sur les nanoparticules ont également été caractérisés par spectroscopie de vibration infrarouge (FTIR) (**Figure V.13**).

A




B



C

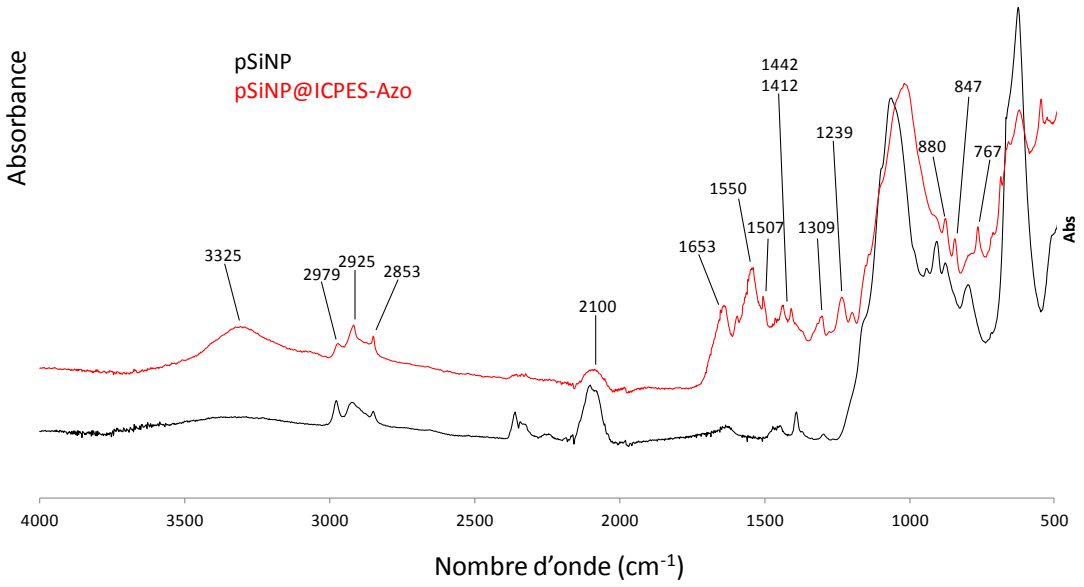



**Figure V.13.** Spectre infrarouge, A : pSiNP et pSiNP@ICPES-Azo@lys, B : pSiNP et pSiNP@ICPES-Azo@hist, C : pSiNP et pSiNP@ICPES-Azo.

Les surfaces des pSiNP greffées ont été caractérisées par spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier FTIR. Sur le spectre **A** on observe deux bandes caractéristiques de la liaison urée à 1671 $cm^{-1}$ et 1550 $cm^{-1}$, attribuées respectivement à la vibration d'élongation de la liaison C=O et à la déformation angulaire de la liaison N-H de l'amine primaire. La présence de ces deux bandes confirme le succès du greffage entre les silanols des pSiNP et la molécule ICPES-Azo@lys. A noter que la bande observée à 1448 $cm^{-1}$ correspond à la vibration d'élongation de la liaison N=N de l'azobenzene et confirme la présence de l'azobenzene sur les pSiNP. La bande observée à 1245 $cm^{-1}$ est attribuée à la vibration d'élongation de la liaison C-N que l'on retrouve dans la molécule ICPES-Azo@lys. Les trois bandes observées entre 2880 et 2980 $cm^{-1}$ sont caractéristiques de la vibration d'élongation des liaisons C-H de la lysine. La bande large observée à 3332 $cm^{-1}$ peut être attribuée aux liaisons vibrations d'élongation des amines primaire ou secondaire. La bande intense entre 1000 et 1250 $cm^{-1}$ est attribuée à la vibration d'élongation des liaisons Si-OH indiquant que la surface des pSiNP pendant la réaction de silanisation s'est partiellement oxydée. Le spectre **B** qui correspond à la réaction de silanisation entre les pSiNP et la molécule ICPES-Azo@hist est similaire au spectre **A**. Nous trouvons les mêmes bandes caractéristiques de la liaison urée

à 1676 $cm^{-1}$ et 1558 $cm^{-1}$, attribuées respectivement à la vibration d'élongation de la liaison C=O et à la déformation angulaire de la liaison N-H de l'amine primaire. La présence de ces deux bandes confirme le succès du greffage entre les silanols des pSiNP et la molécule ICPES-Azo@hist. A noter que la bande observée à 1457 $cm^{-1}$ correspond à la vibration d'élongation de la liaison N=N de l'azobenzene et confirme la présence de l'azobenzene sur les pSiNP. La bande observée à 1243 $cm^{-1}$ est attribuée à la vibration d'élongation de la liaison C-N que l'on retrouve dans la molécule ICPES-Azo@hist. Les trois bandes observées entre 2880 et 2980 $cm^{-1}$ sont caractéristique de la vibration d'élongation des liaisons C-H de la lysine. La large bande observée à 3321 $cm^{-1}$ peut être attribuée aux liaisons vibrations d'élongation des amines primaire ou secondaire. La bande intense entre 1000 et 1250 $cm^{-1}$ est attribuée à la vibration d'élongation des liaisons Si-OH indiquant que la surface des pSiNP pendant la réaction de silanisation s'est partiellement oxydée.

Le spectre **C** correspond à la réaction de silanisation entre les pSiNP est la molécule azobenzene. Nous obtenons les mêmes bandes que les deux spectres précédemment décrits (**A**, **B**). Nous retrouvons les mêmes liaisons à savoir : C=O, N-H, C-N, N=N, Si-C, C-H et Si-O.

La quantification des molécules ICPES-Azo ICPES-Azo@hist et ICPES-Azo@lys greffées sur les pSiNP a été effectuée par dissolution des formulations dans une solution basique KOH 1M. Nous avons obtenu une quantité de 48 µg d'ICPES-Azo par mg de nanoparticules, 27 µg de ICPES-Azo@hist par mg de nanoparticules et 92 µg de l'ICPES-Azo@Lys par mg de nanoparticules (**Tableau V.3**). Ici, l'ICPES-Azo@hist et l'ICPES-Azo@lys ne sont pas greffées en même quantité, Il semble de nouveau que la différence des résultats s'explique par un encombrement stérique de l'histidine plus important que la lysine

| Formulations | µg de molécules / mg de pSiNP | mmol de molécules / g de pSiNP | Nombres de molécules / $nm^2$ de pSiNP |
|---|---|---|---|
| pSiNP@ICPES-Azo@hist | 27 | 0.049 | 0.083 |
| pSiNP@ICPES-Azo@lys | 92 | 0.171 | 0.29 |
| pSiNP@ICPES-Azo | 48 | 0.246 | 0.41 |

**Tableau V.3.** Résultats des quantités de molécules greffées sur les pSiNP.

Les mesures d'absorption UV-Vis sont effectuées avec un spectromètre UV/visible Lambda 35 de Perkin Elmer pour doser l'azo@lys, l'azo@hist et l'azobenzene greffées sur les pSiNP. Pour quantifier les molécules greffées sur les pSiNP, une quantité connue de nanoparticules greffées (**pSiNP@ICPES-Azo**, **pSiNP@ICPES-Azo@hist** et **pSiNP@ICPES-Azo@lys**) est dissoute dans une solution d'hydroxyde de potassium KOH à 1M. L'absorbance de la solution est enregistré à 379 nm. Au préalable, nous avons mesuré l'absorbance de solutions étalons de l'azobenzene avec des concentrations connues dans le KOH à 1M, afin de tracer la droite d'étalonnage donnant l'absorbance en fonction de la concentration et de déterminer le coefficient d'absorption molaire de l'azobenzene ε= 17025 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$.

Nous avons ensuite étudié la délivrance d'acides nucléiques sous excitation biphotonique via l'utilisation des nanoparticules de silicium poreux greffées avec les molécules **azobenzene@acides aminés** préparées précédemment. Notre approche pour cela est présentée dans la (**Figure V.14**).

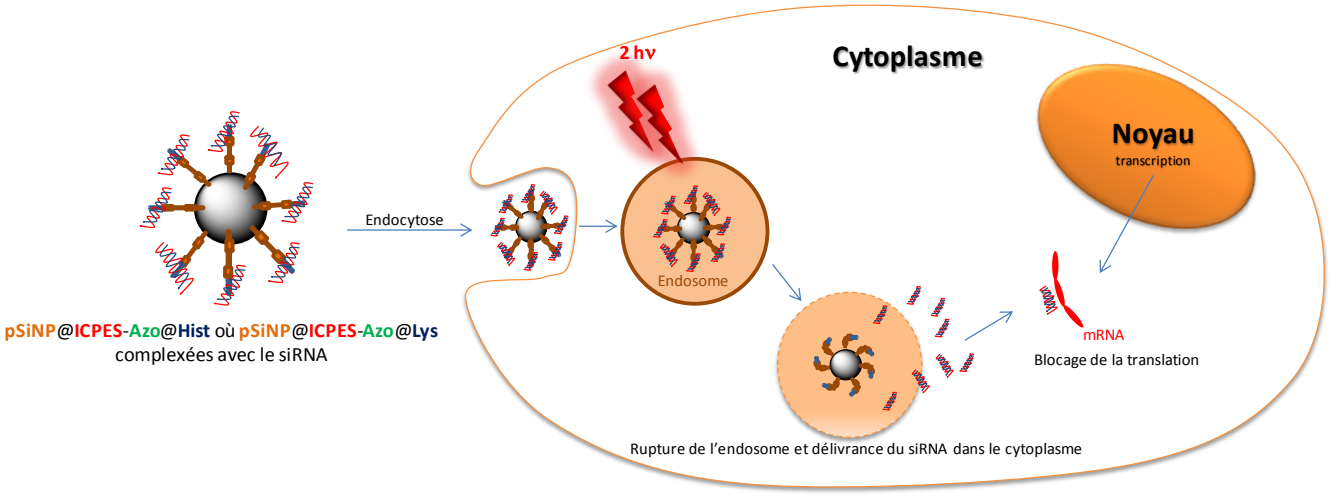



**Figure V.14.** Mécanisme d'internalisation des formulations est délivrance du siRNA. les pSiNP absorbent l'excitation biphotonique (800 nm) et transfèrent l'énergie à l'azobenzene. L'azobenzene passe sous irradiation de la conformation *trans* à la conformation *cis* et par agitation moléculaire libère le siRNA dans le cytoplasme de la cellule cancéreuse (MCF-7). Une fois le siRNA libéré, celui-ci se lie à l'ARNm pour bloquer la prolifération de protéines.

Dans ce projet, les expériences ont été réalisées par Marie Maynadier et Magali Gary-Bobo de l'équipe Glyco et Nanovecteur pour le ciblage thérapeutique, équipe dirigée par Marcel Garcia de l'institut des biomolécules Max Mousseron (UMR 5247).

La délivrance du siRNA sous irradiation biphotonique a été étudiée sur des cellules cancéreuses du sein (MCF-7) sous irradiation biphotonique ($\lambda_{exc}$= 800 nm). Le siRNA cible le gène de la luciférase (si*Luc* 5'-AACGTACGCGGAATACTTCGA-3'). L'extinction de gènes sa été réalise avec des cellules cancéreuses du sein (MCF-7) à expression de la luciférase. Le siRNA a été mélangé pendant 30 minutes à température ambiante et à différents ratios avec les nanoparticules **pSiNP**, **pSiNP@ICPES-Azo**, **pSiNP@ICPES-Azo@hist** et **pSiNP@ICPES-Azo@lys**. Lesx formulations suivantes **pSiNP + siRNA, pSiNP@ICPES-Azo + siRNA, pSiNP@ICPES-Azo@hist + siRNA, pSiNP@ICPES-Azo@lys + siRNA** ont été obtenues. Ces formulations complexées avec le siRNA ont été incubées pendant 5 heures à une concentration de 40 µg/mL avec les cellules MCF-7 ensemencées avec 10% de luciférase. L'irradiation biphotonique des formulations pSiNP-siRNA a été réalisée avec un microscope confocal à une longueur d'onde d'irradiation de 800 nm. Les cellules ont reçu 3 impulsions laser d'une durée de 1,57 s.

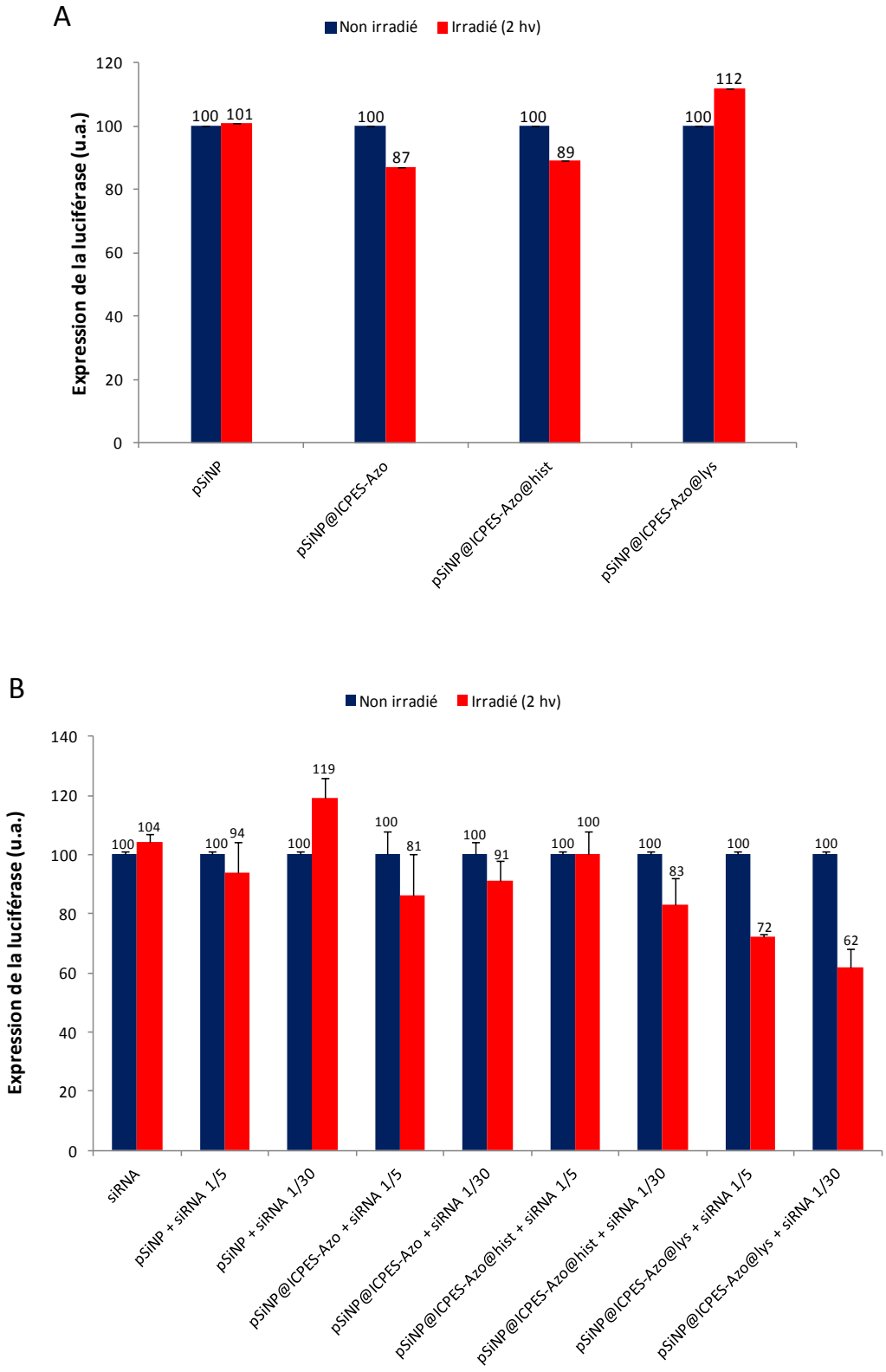



**Figure V.15.** Cellules du cancer du sein MCF-7 ensemencées à 10% avec de la luciférase. Les cellules MCF-7 ont été incubées pendant 5 h avec les nanoparticules et ensuite irradié à 800 nm. A : Nanoparticules non complexées avec le siRNA et lecture de l'expression de la luciférase, B : Nanoparticules complexées avec le siRNA et lecture de l'expression de la luciférase.

Les 4 formulations **pSiNP**, **pSiNP@ICPES-Azo**, **pSiNP@ICPES-Azo@hist** et **pSiNP@ICPES-Azo@lys** en l'absence du siRNA avec ou sans irradiation, ne génèrent pas ou peu d'extinction du gène de la luciférase (**Figure V.15.A**). Les formulations **pSiNP**, **pSiNP@ICPES-Azo**, **pSiNP@ICPES-Azo@hist** et **pSiNP@ICPES-Azo@lys** en présence de siRNA à différents ratios 1/5 et 1/30 et sans excitation biphotonique, les formulations n'entraînent pas l'extinction du gène de la luciférase. Nous observons aussi aucune extinction du gène de la luciférase pour le siRNA libre avec ou sans excitation biphotonique. Pour ces études, nous nous attendions à ces résultats. En revanche, nous remarquons que les formulations en présence d'acides aminés **pSiNP@ICPES-Azo@hist + siRNA** et **pSiNP@ICPES-Azo@lys + siRNA** sous excitation biphotonique génèrent d'une manière génerale de meilleurs résultats en terme d'extinction du gène de la luciférase, que les formulations **pSiNP + siRNA**, **pSiNP@ICPES-Azo + siRNA** (**Figure V.16.b**). Nous notons que les formulations **pSiNP@ICPES-Azo + siRNA**, **pSiNP@ICPES-Azo@hist + siRNA** n'entraînent que 19 % et 17 % d'extinction du gène de la luciférase. Une valeur qui se justifie car nous avons greffé moins de molécules **ICPES-Azo**, **ICPES-Azo@hist** que de molécules **ICPES-Azo@lys**. Les meilleurs résultats obtenus sont pour les formulations **pSiNP@ICPES-Azo@lys + siRNA 1/5 et 1/30** avec 28 % et 38 % d'extinction du gène de la luciférase respectivement (**Figure V.15.B**). Ces résultats satisfaisants s'expliquent par le greffage d'une quantité de molécules **ICPES-Azo@lys** plus importantes sur les pSiNP mais aussi par la présence d'une amine primaire supplémentaire dans le cas de la lysine. De plus, une étude de cytotoxicité des formulations en présence ou non de siRNA et avec ou sans irradiation biphotonique a été réalisée et prouvent que les formulations sont non toxiques pour les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) (**Figure IV.16**).

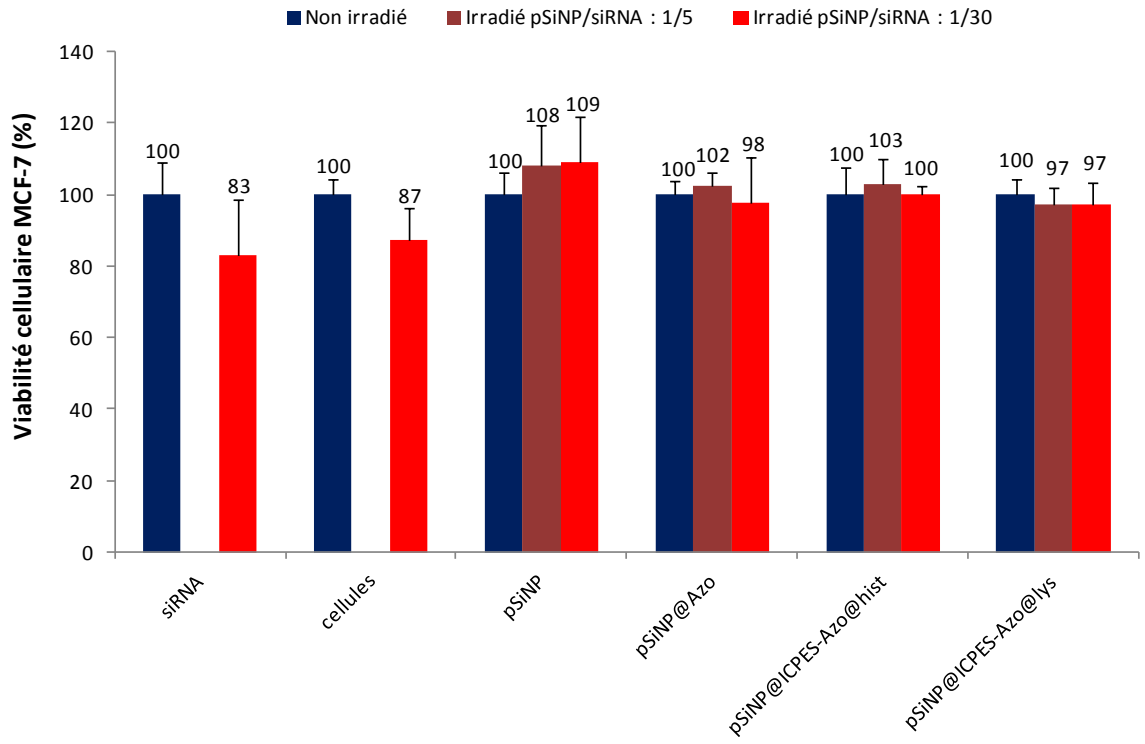



**Figure V.16.** Survie des cellules MCF-7 incubées 5 h avec et sans irradiation

A travers ces travaux, nous démontrons que sous excitation biphotonique, il est possible de stimuler l'isomérisation et le changement de conformation de l'azobenzene, probablement par transfert d'énergie entre les pSiNP et l'azobenzene. Ce transfert d'énergie est conforté par une étude de photoluminescence (Stern-Volmer) où nous montrons le quenching des pSiNP par l'azobenzene (**Figure V.17**). Cependant, nous ne pouvons pas exclure, sous excitation biphotonique, un effet photothermique entraînant l'isomérisation de l'azobenzene et le relargage du siRNA comme une étude récemment publiée l'atteste.[292]

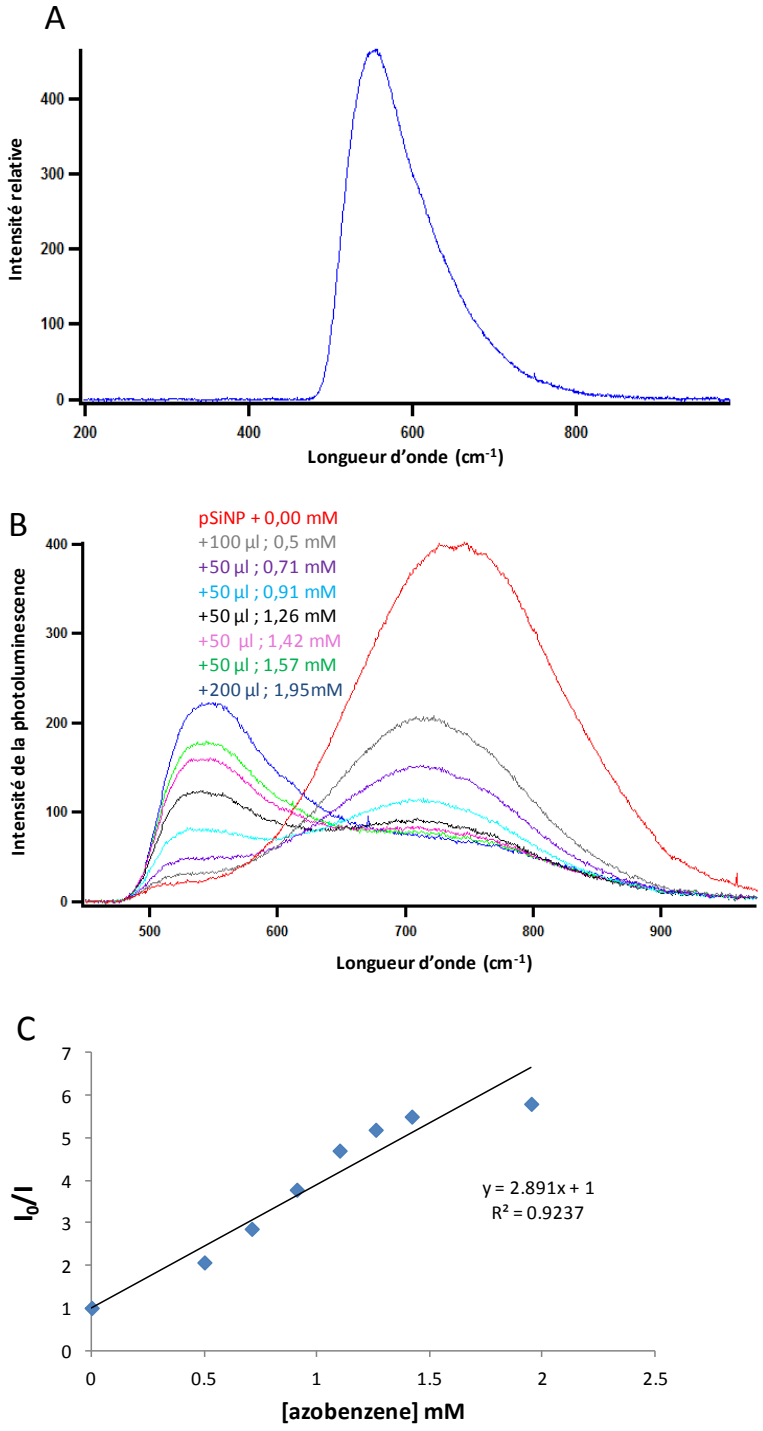



**Figure V.17.** A : Emission de l'azobenzene ($\lambda_{exc}$=375 nm), B : décroissance de la photoluminescence des pSiNP après ajouts successifs d'azobenzene, C : Courbe Stern-Volmer du quenching de la photoluminescence des pSiNP en suspension dans l'eau (0.3 mg/mL) et lors de l'addition successive d'aliquotes d'une solution d'azobenzene dans l'eau déionisée à une concentration comprise entre (0.5 mM à 1.95 mM).

En conclusion nous avons dans cette étude montré le succès du couplage entre le 4'4-diaminoazobenzene et deux acides aminés puis des greffages sur les pSiNP. Ensuite nous avons mis en évidence l'efficacité de l'excitation biphotonique sur l'azobenzene permettant le relargage du siRNA. Un mécanisme de transfert d'énergie entre les pSiNP et l'azobenzene est envisagé. Ce mécanisme de transfert d'énergie est conforté par l'appui d'une étude de photoluminescence. Enfin, nous montrons que la meilleure formulation, **pSiNP@ICPES-Azo@Lys**, permet de générer 40 % d'extinction du gène de la luciférase, ce qui est un résultat satisfaisant. Ce système de relargage de siRNA sous excitation biphotonique s'avère prometteur pour des applications en thérapie génique.

## 2.2 Matériels et méthodes

### *2.2.1 Préparation des molécules et couplages sur les pSiNP*

***Préparation du 4.4'-diaminoazobenzene :***

Dans un ballon tricol de 1 L équipé d'un agitateur, d'un système de reflux et d'un thermomètre, nous incorporons 500 ml d'acide acétique glacial, 29,0 g. (0,19 mol) de p-aminoacétanilide, 40 g (0,26 mol) de perborate de sodium tétrahydraté et 10 g (0,16 mol) d'acide borique. Le mélange est chauffé à 50-60° C sous agitation et maintenu à cette température pendant 6 h. En fin de réaction, le mélange est refroidi à température ambiante et le produit jaune est recueilli sur Büchner. Le produit est lavé à l'eau jusqu'à obtenir un pH neutre et séché dans une étuve à 110 °C. Le rendement obtenu en 4,4'-bis (acétamide) azobenzene est de 16,5 g soit 57,7 %. Il est utilisé tel quel pour l'étape d'hydrolyse. Dans un ballon de 500 ml équipé d'un système de reflux et d'un agitateur, nous ajoutons 150 ml de méthanol, 150 ml d'acide chlorhydrique à 6N et le produit 4,4'-bis (acétamide) azobenzene. Le mélange est chauffé sous reflux pendant 90 min. Après 90 min le mélange réactionnel est refroidi et le solide violet est recueilli sur Büchner. Le produit humide est mis en suspension dans 500 ml d'eau dans un bêcher équipé d'un agitateur, le mélange est lentement neutralisé par l'addition d'hydroxyde de sodium 2,5 N. Au cours de la neutralisation, le sel se dissout et se sépare de la base libre. Le 4,4'-diaminoazobenzene est récupéré sur Büchner, lavé à l'eau et séché sous pression réduite. Le rendement du produit jaune est de 11-12 g. RMN $^{1}H$ (400 MHz, $CDCI_3$) : 4.02 (br, 2H), 6.76 (d, 2H), 7.76 (d, 2H).

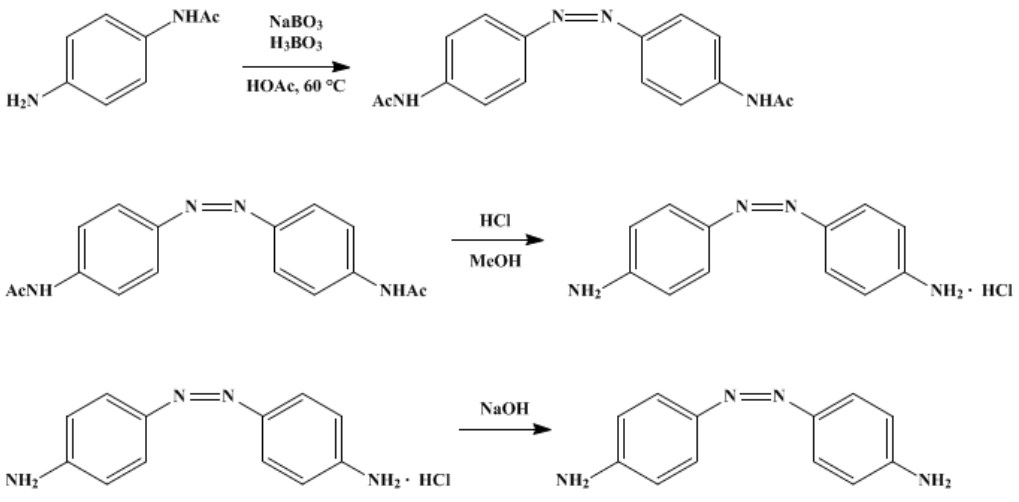



**Figure V.18.** Schéma réactionnel de la synthèse du 4.4'diaminoazobenzene.

***Réaction entre le Boc-histidine(Boc)-OH et le 4,4'-diaminoazobenzene couplés à le 3-isocyanopropyltriethoxysilane et greffage sur les pSiNP :***

L'hydroxybenzotriazole (115 mg, 0,851 mmol) et le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (175 mg, 0,848 mmol) sont ajoutés à une solution de Boc-His(Boc)-OH (308 mg, 0,574 mmol) dans du DMF anhydre (5 ml) à température ambiante sous reflux d'azote. Après 1 h, le 4,4'-diaminoazobenzene (150 mg, 0,707 mmol) est ajouté au mélange puis agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est ensuite dilué dans une solution de saumure et extrait avec de l'acétate d'éthyle (EtOAc). Le produit récupéré est séché avec du ($MgSO_4$). Le solvant est éliminé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne (éluant: DCM: EtOAc). **Rendement**: 38%. **RMN $^1$H** (400 MHz, $CDCI_3$): 1.50 (d, 9H), 1.62 (d, 9H), 3.04-3.21 (q, 2H), 4.05 (br, 2H), 4.58 (m, 1H), 6.03 (br, 1H), 6.76 (d, 2H), 7.26 (s, 1H) 7.67 (d, 2H), 7.81 (d, 2H), 7.84 (d, 2H), 8.09 (s, 1H), 9.55 (br, 1H).. **MS (MALDI)**: calculé pour $C_{28}H_{35}N_7O_5$ [M + H] + m/z 550,27; trouvée m/z 550,28 et **HRMS** trouvée m/z 550,2779.

Le 3-isocyanopropyltriethoxysilane (ICPES) (4,6 µL, 0,018 mmol) est ajouté à une solution de THF anhydre (3 ml) et au produit obtenu **aminoazobenzene@Boc-Hist(Boc)-OH** (10 mg, 0,018 mmol). Le mélange est agité sous reflux d'azote pendant 24 h. Après élimination du solvant, 25 mg de pSiNP dans 3,5 ml de toluène sont ajoutés au produit **ICPES-aminoazobenzene@Boc-Hist(Boc)-OH : (ICPES-Azo@hist)**. Le mélange est agité puis chauffé sous reflux d'azote à 50 ° C pendant 24 h. Les nanoparticules sont centrifugées pendant 15 min à 14 krpm puis recueillies et lavées trois fois à l'éthanol absolu. Pour éliminer les groupements Boc de l'histidine, les nanoparticules sont redispersées dans une solution à 2 ml de TFA : $CH_2Cl_2$ (40% : 60%) pendant 30 min. Le rendement du greffage **ICPES-Azo@hist** sur les pSiNP est déterminé par UV-visible.

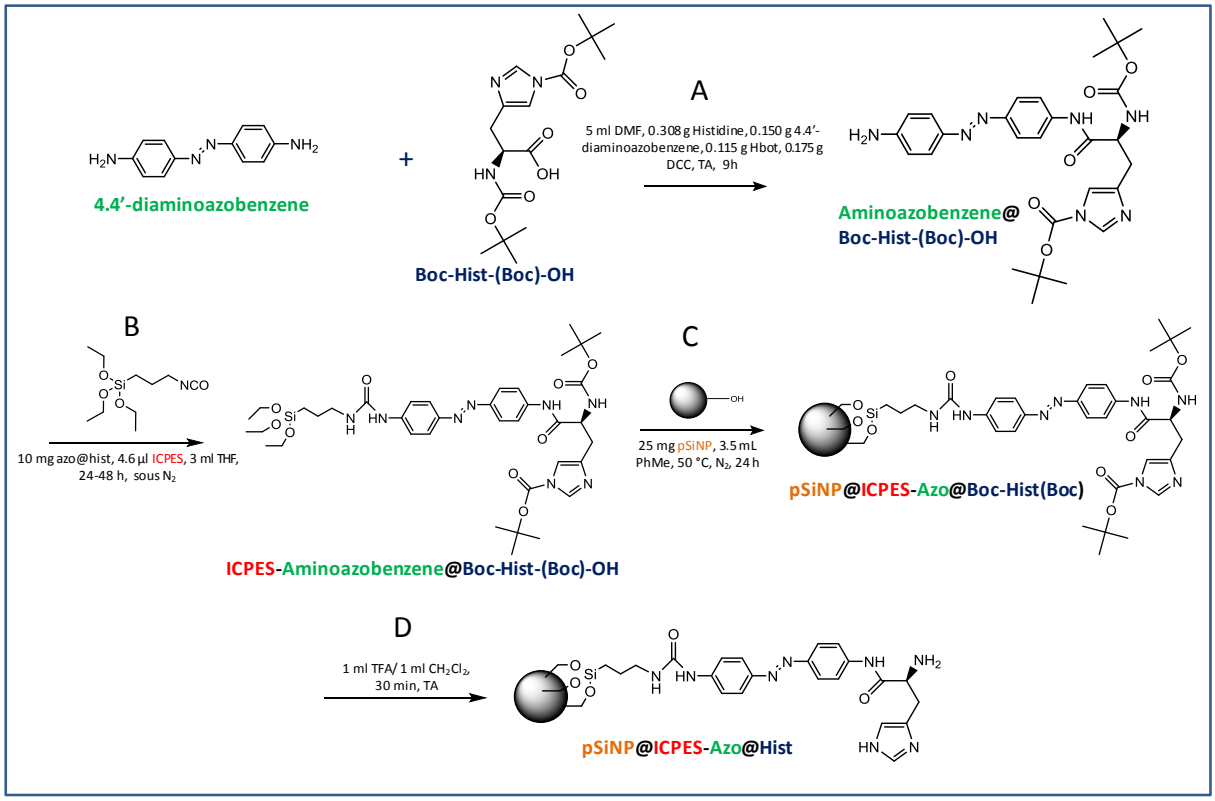



**Figure V.19.** Schéma réactionnel. A : couplage peptidique entre le 4,4'diaminoazobenzene et le Boc-Hist(Boc)-OH. B : Couplage entre l'ICPES et le aminoazobenzène@Boc-Hist(Boc)-OH. C : Greffage de la molécule ICPES-Azo@hist sur les pSiNP par silanisation.

***Réaction entre le Boc-Lysine(Boc)-OH et le 4,4'-diaminoazobenzene ensuite couplés à le 3-isocyanopropyltriethoxysilane et greffage sur les pSiNP :***

L'hydroxybenzotriazole (115 mg, 0,851 mmol) et le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (175 mg, 0,848 mmol) sont ajoutés à une solution de Boc-Lys(Boc)-OH (264 mg, 0,5 mmol) dans du DMF anhydre (5 ml) à température ambiante sous reflux d'azote. Après 1 h, le 4,4'-diaminoazobenzene (150 mg, 0,707 mmol) est ajouté au mélange puis agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est ensuite dilué dans une solution de saumure et extrait avec de l'acétate d'éthyle (EtOAc). Le produit récupéré est séché avec du ($MgSO_4$) et le solvant est éliminé sous pression réduite. Le résidu a été purifié par Chromatographie sur colonne (éluant: DCM : EtOAc (70 % : 30 %)). **Rendement**: 35 %. **RMN $^1$H** (400 MHz, CDCI3): 1.26 (m, 2H), 1.46 (d, 18H), 1.55 (m, 2H), 1.95 (m, 2H), 3.15 (q, 2 H), 4.02 (br, 1H), 4.20 (br, 1H), 4.63 (m, 1H), 5.21 (br, 1H), 6.74 (d, 2H), 7.67 (d, 2H), 7.78 (d, 2H), 7.83 (d, 2H), 8.63 (br, 1H). **MS (MALDI)**: calculée pour $C_{28}H_{40}N_6O_5$ [M + H] + m/z 541,31; trouvée m/z 541,31 et **HRMS** trouvée m/z 541,3140.

Le 3-isocyanopropyltriethoxysilane (ICPES) (4,6 µL, 0,018 mmol) est ajouté à une solution de THF anhydre (3 ml) et au produit obtenu **aminoazobenzene@Boc-Lys(Boc)-OH** (10 mg, 0,018 mmol). Le mélange est agité sous reflux d'azote pendant 24 h. Après élimination du solvant, 25 mg de pSiNP dans 3,5 ml de toluène sont ajoutés au produit **ICPES-aminoazobenzene@Boc-Lys(Boc)-OH : (ICPES-Azo@lys)**. Le mélange est agité puis chauffé sous reflux d'azote à 50 ° C pendant 24 h. Les nanoparticules sont centrifugées pendant 15 min à 14 krpm puis recueillies et lavées trois fois à l'éthanol absolu. Pour éliminer les groupements Boc de l'histidine, les nanoparticules sont redispersées dans une solution à 2 ml de TFA : $CH_2Cl_2$ (40% : 60%) pendant 30 min. Le rendement du greffage **ICPES-Azo@lys** sur les pSiNP est déterminé par UV-visible.

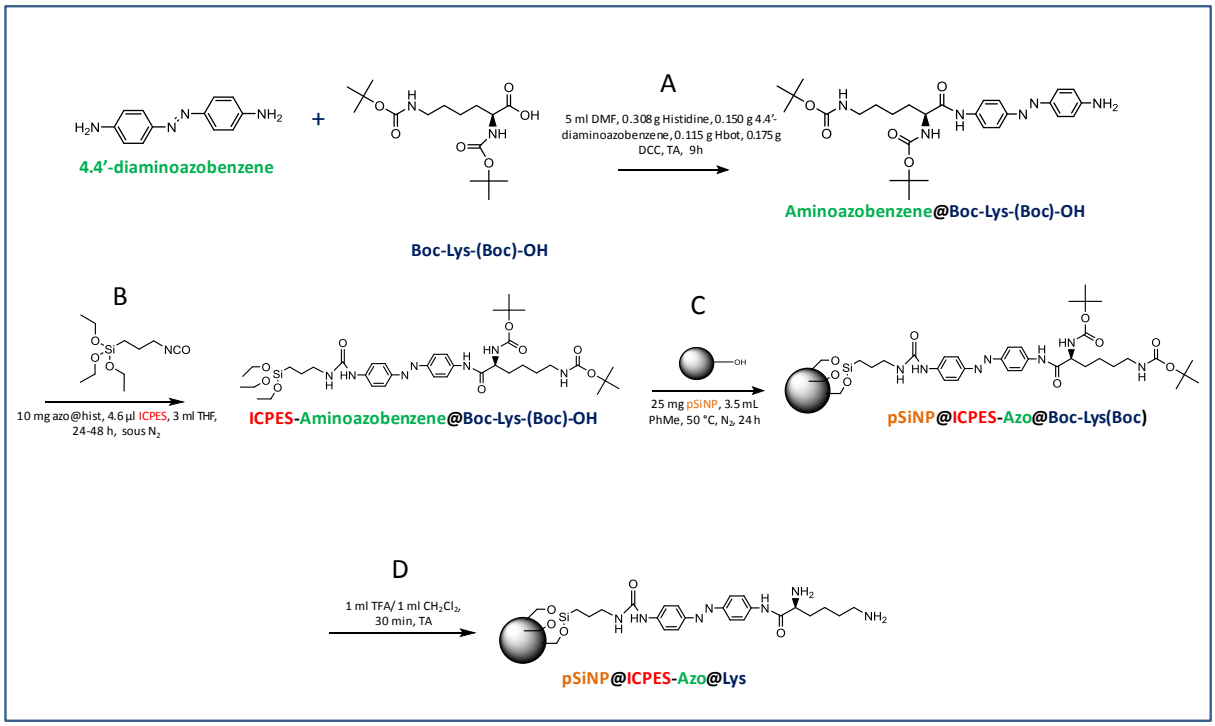



**Figure V.20.** Schéma réactionnel. A : couplage peptidique entre le 4,4'diaminoazobenzene et le Boc-Lys(Boc)-OH. B : Couplage entre l'ICPES et l'aminoazobenzène@Boc-Lys(Boc)-OH. C : Greffage de la molécule ICPES-Azo@lys sur les pSiNP par silanisation.

***Réaction entre le 3-isocyanopropyltriethoxysilane et le 4-aminoazobenzene puis greffés sur les pSiNP :***

Dans un ballon contenant 3mL de THF anhydre, nous ajoutons 20 mg de 4-aminoazobenzene et 25 µL d'ICPES. Le mélange est agité sous flux d'azote pendant 24 h. Le produit est ensuite séché et ajouté à 25 mg de pSiNP dans 3.5 ml de toluène anhydre. La réaction dure 24 h sous reflux d'azote à 45 °C. Le rendement du greffage **ICPES-Azo** sur les pSiNP est déterminé par UV-visible.

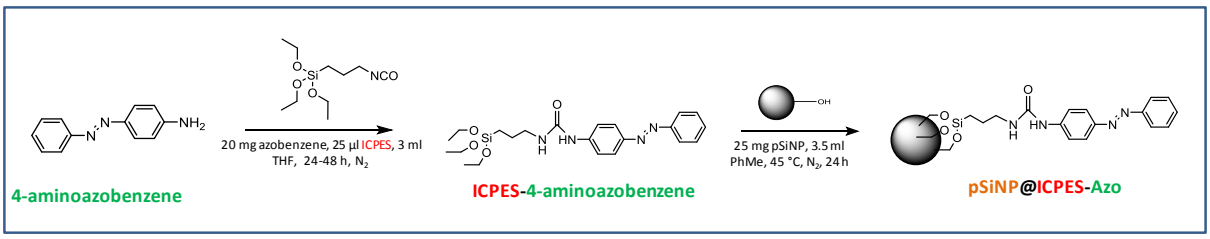



**Figure V.21.** Schéma réactionnel entre le 4-aminoazobenzene et l'ICPES et silanisation d'ICPES-Azo sur les pSiNP.

*Etude Stern-Volmer :*

Les pSiNP sont immergées dans 1 ml d'eau déionisée dans un flacon en verre. Des ajouts d'une solution aqueuse d'azobenzene à différentes concentrations (0,5 mM à 1.95 mM) sont ajoutés à la suspension de pSiNP à l'aide d'une seringue. Le mélange est agité pendant 1 min. Les spectres de photoluminescence sont obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre Ocean Optics Pro QE65 équipé d'un filtre à 500 nm. La source d'excitation est une LED UV fonctionnant à 375 nm de puissance de sortie nominale de 5 mW.

### *2.2.2 Caractérisations des molécules et des nanoparticules greffées.*

***Spectrométrie de masse haute résolution :***

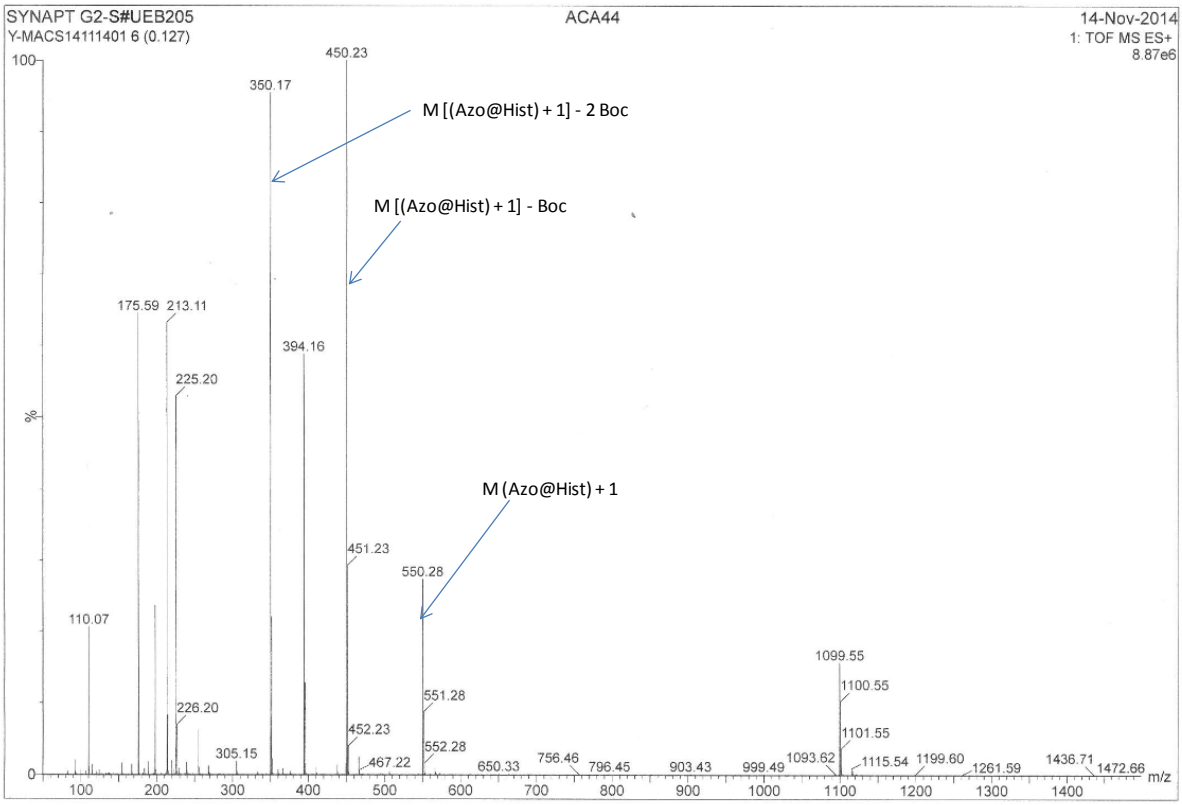



**Figure V.22.** Spectrométrie de masse haute résolution du composé d'Azo@hist.

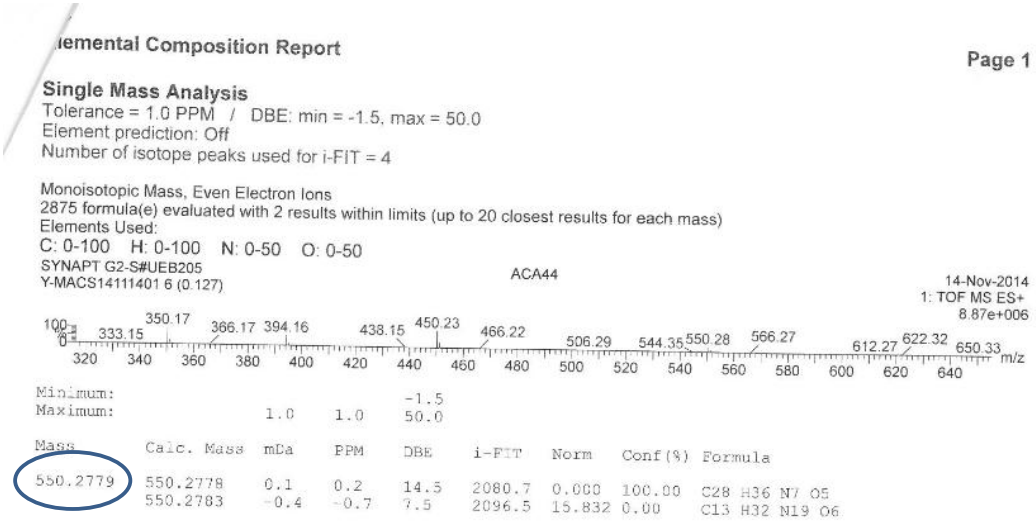



**Figure V.23.** Spectrométrie de masse haute résolution du composé Azo@hist.

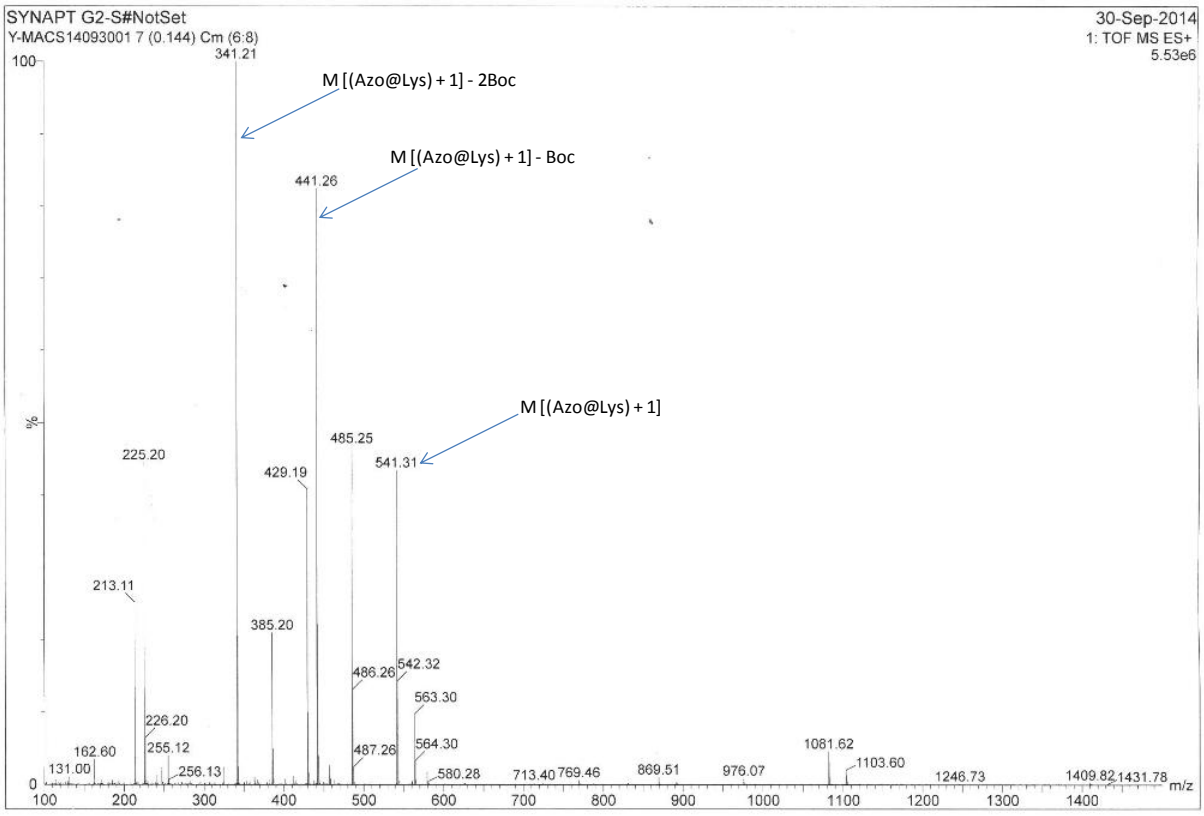



**Figure V.24.** Spectrométrie de masse haute résolution du composé Azo@lys.

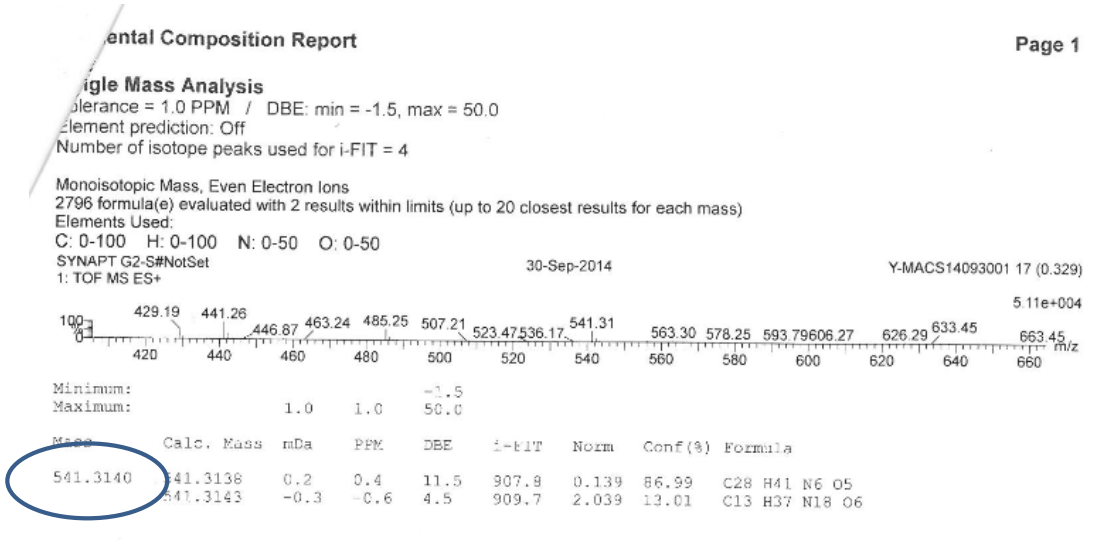



**Figure V.25.** Spectrométrie de masse haute résolution du composé Azo@lys.

## 3. Conclusion

Dans ce chapitre 4 ces travaux menés démontrent la capacité des pSiNP à être utilisées en thérapie génique. Tout d'abord nous avons mis en évidence, le greffage d'acides aminés sur les pSiNP et réalisé de la transfection cellulaire sur des cellules HEK. Ensuite nous avons à nouveau prouvé que les pSiNP sous excitation biphotonique étaient capables d'absorber la lumière et par un mécanisme de transfert d'énergie relarguer du siRNA.

# Conclusion générale et perspectives

Mes travaux de thèse ont porté sur l'utilisation de nanoparticules de silicium poreux pour des applications en thérapie photodynamique et en thérapie génique pour le traitement du cancer.

Dans le chapitre 1, nous avons décrit les principes des deux thérapies, la thérapie photodynamique et la thérapie génique, et les développements récents dans l'état de l'art, en particulier lorsqu'elles sont associées aux nanotechnologies pour le traitement du cancer.

Dans le chapitre 2, nous avons décrit la méthode de préparation du silicium poreux à partir d'un silicium cristallin de type P++. Nous avons présenté les propriétés structurales physiques et chimiques du matériau et les différentes possibilités de greffage avec le silicium poreux. Nous avons également montré ses applications dans le domaine biomédical.

Dans le chapitre 3, nous avons présenté le procédé de fabrication des pSiNP. Les nanoparticules sont obtenues par gravure électrochimique de wafer de silicium cristallin de type $P^{++}$ suivie d'une électrodissolution du film poreux et un traitement ultrasonique. Nous avons montré que les étapes de centrifugations permettent de contrôler la taille des nanoparticules comprises entre 50 et 250 nm. Cette taille est compatible avec des applications en nanomédecine. Les nanoparticules ont été caractérisées par DLS, MET, potentiel zêta, adsorption/désorption d'azote, DRX et spectroscopie de vibration infrarouge. Nous avons augmenté l'échelle de production des nanoparticules en utilisant une cellule de gravure plus grande de 64 $cm^2$. Grâce à cette production plus importante de nanoparticules, nous avons pu augmenter le nombre de synthèses et multiplier les caractérisations.

Dans le chapitre 4, nous avons décrit notre travail sur l'utilisation des nanoparticules de silicium poreux pour la thérapie photodynamique :

Dans la première étude, les nanoparticules ont été greffées avec deux agents de ciblage différents (mannose phényle squarate et mannose cétone) et un photosensibilisateur (porphyrine-NCS cationique). Ces nanoparticules ont été testées *in vitro* sur des cellules du cancer du sein (MCF-7) pour des études en imagerie et en thérapie photodynamique sous irradiation monophotonique et biphotonique. Nous avons montré par imagerie de fluorescence à 2-photons que les nanoparticules étaient internalisées par les cellules plus efficacement lorsq'elles étaient fonctionnalisées avec le mannose. Dans cette étude, nous avons mis en évidence deux mécanismes différents d'excitation de la porphyrine.

- Dans le cas d'une excitation monophotonique, la porphyrine est directement excitée avec une longueur d'onde appropriée.

- Dans le cas d'une excitation biphotonique, un mécanisme de transfert d'énergie intervient entre les pSiNP et la porphyrine pour former de l'oxygène singulet.

Dans cette étude, nous avons suggéré que sous excitation biphotonique, le groupement phényle du mannose phényle squarate greffé sur les pSiNP inhibe le transfert d'énergie entre les pSiNP et la porphyrine, afin d'expliquer la plus faible efficacité photodynamique des formulations à base de mannose phényle squarate, comparées aux formulations à base de mannose cétone. Nous avons également montré que des mannoses jouent un rôle majeur dans l'internalisation des nanoparticules, permettant ainsi l'endocytose à travers un mécanisme de transport actif et une augmentation de l'efficacité PDT des formulations. Ces résultats constituent le premier exemple de nanosystème silicium poreux/porphyrine pour l'imagerie et la PDT ciblée à 2-photons et a fait l'objet d'une publication.[88]

La deuxième étude porte sur la fonctionnalisation des pSiNP avec la porphyrine-NCS et un mannose-6-carboxylate analogue du mannose-6-phosphate. Ces nanoparticules ont été testées *in vitro* sur des cellules du cancer de la prostate (LNCaP) pour des études en imagerie et en thérapie photodynamique monophotonique et biphotonique. Dans cette étude, nous avons constaté un meilleur taux de mort cellulaire grâce à la présence de l'agent de ciblage. A travers les résultats obtenus, nous avons montré l'efficacité du mannose M6C pour cibler les cellules cancéreuses de la prostate.

La troisième étude présente le greffage de deux photosensibilisateurs à base de ruthénium sur les pSiNP. Les deux complexes de ruthénium utilisés disposent de deux bras chimiques différents greffés de manière covalente aux pSiNP, l'un greffé par silanisation et l'autre greffé par hydrosilylation. Les deux photosensibilisateurs ont été greffés avec succès sur les pSiNP avec un taux de chargement élevé. Ces nanoparticules fonctionnelles ont été testées *in vitro* sur des cellules du cancer du sein (MCF-7) pour des études en imagerie et en thérapie photodynamique sous irradiation monophotonique et biphotonique. A travers cette étude, nous avons montré que les complexes de ruthéniums sont capables de produire du $^1O_2$ et d'entraîner la mort des cellules cancéreuses. Nous avons obtenu pour les complexes de ruthénium de meilleurs résultats sous irradiation monophotonique que biphotonique.

La quatrième étude porte sur la préparation de nanostructures à base de nanoparticules de silicium poreux décorées avec des nanoparticules d'or et/ou de porphyrine et/ou de mannose éthyle squarate afin d'améliorer les effets cytotoxiques. Ces nanoparticules ont été testées *in vitro* sur des cellules du cancer du sein (MCF-7) pour des études en imagerie et en thérapie photodynamique sous irradiation biphotonique. Cette étude a mis en évidence que,

lorsque les nanoparticules d'or s'agrègent sur les nanoparticules de silicium poreux, celles-ci se comportent comme des nanobâtonnets d'or c'est à dire qu'elles produisent du $^1O_2$ sous irradiation biphotonique. Il n'est pas à exclure que les nanoparticules d'or entraînent aussi de la photothermie.

Le projet PDT offre plusieurs perspectives :

- Transposer les formulations pSiNP/Porph/Man, décrite dans mon travail de thèse, qui ont révélé de bons résultats en PDT à des études *in vivo*. Nous avons vu que ceci va nécessiter la fonctionnalisation des nanoparticules avec un polymère de type PEG. Le PEG permettra de protéger le silicium poreux d'une rapide dégradation *in vivo* mais aussi de rendre le nanovecteur furtif pour échapper aux macrophages.
- Fonctionnaliser les systèmes à base de complexes de ruthénium avec un agent de ciblage et un polymère afin d'améliorer l'efficacité photodynamique *in vitro* sous excitation biphotonique. Si cela est pertinent, une étude *in vivo* pourra être envisagée aussi.
- Fonctionnaliser le système simple à base de pSiNP et nanoparticules d'or avec un agent de couplage afin d'optimiser son efficacité photodynamique et/ou photothermique. Elucider le mécanisme provocant la mort cellulaire (photodynamique/photothermique) sous irradiation à 2-photons.

Dans le chapitre 5, nous présentons l'utilisation des nanoparticules de silicium poreux pour le transfert de gènes.

La première étude consiste à greffer des acides aminés (histidine, lysine) et un polymère (la poly-L-lysine) sur les pSiNP pour être ensuite complexés avec un pDNA pour du transfert de gènes. Dans cette étude, pour la première fois nous avons réalisé le transfert de gènes (pDNA) dans les cellules HEK au moyen des nanoparticules de silicium poreux.

La deuxième étude porte sur un premier couplage entre un 4,4'-diaminoazobenzene et une histidine et un deuxième couplage entre un 4,4'-diaminoazobenzene et une lysine pour obtenir deux complexes (Azo@His et Azo@Lys). Ces deux complexes ont été greffés avec succès sur les pSiNP par silanisation et ont permis la complexation des siRNA. Les nanoparticules fonctionnalisées avec le siRNA ont été testées *in vitro* sur des cellules du cancer du sein (MCF-7) sous irradiation biphotonique. Comme dans la première étude PDT,

ici après irradiation sous excitation biphotonique nous avons suggéré que les pSiNP transférent leur énergie à la molécule d'azobenzene photosensible dont l'isomérisation permet de décomplexer le siRNA et d'inhiber l'expression du gène de la luciférase.

Le projet thérapie génique n'en est qu'a ses débuts. Les résultats obtenus pendant ma thèse sont très encourageants et permettent d'envisager un certain nombre de perspectives :

- Nous envisageons d'étudier de cette manière la délivrance de siRNA, pDNA et microRNA *in vitro*. Des tests de gel-retard permettront d'évaluer la complexation et le relargage des acides nucléiques avant et après irradiation. Les formulations les plus efficaces en termes de complexation et de relargage post-irradiation seront testées sur plusieurs lignées cellulaires telles que les MCF-7 (cellules de cancer du sein) et les B16F10 (cellules de mélanome), ensuite elles seront appliquées sur des souris xénogreffées avec des cellules de mélanome.

D'une manière générale, dans le "projet PDT" et pour les projets thérapie du cancer par libération d'acide nucléique, nous continuerons à nous intéresser à :

1/ la triple approche de ciblage thérapeutique que nous avons envisagée depuis le début de ces études, qui impliquera l'effet EPR *in vivo*, l'action des agents de ciblage greffé à la surface des nanoparticules de silicium poreux et l'application d'une irradiation locale à 2-photons.

2/ la validité d'utiliser une excitation lumineuse en 2-photons plus pénétrante des tissus biologiques pour l'activation de photosensibilisateurs, mais aussi à la validité de la combiner au relargage d'acides nucléiques, approche qui n'a jamais été développée.

# Publications

1. E. Secret, M. Maynadier, A. Gallud, M. Gary-Bobo, A. Chaix, E. Belamie, P. Maillard, M. J. Sailor, M. Garcia, J. O. Durand and F. Cunin, **Anionic porphyrin-grafted porous silicon nanoparticles for photodynamic therapy** *Chem Commun*, 2013, **49**, 4202-4204.

2. E. Secret, M. Maynadier, A. Gallud, A. Chaix, E. Bouffard, M. Gary-Bobo, N. Marcotte, O. Mongin, K. El Cheikh, V. Hugues, M. Auffan, C. Frochot, A. Morere, P. Maillard, M. Blanchard-Desce, M. J. Sailor, M. Garcia, J. O. Durand and F. Cunin, **Two-Photon Excitation of Porphyrin-Functionalized Porous Silicon Nanoparticles for Photodynamic Therapy** *Adv Mater*, 2014, **26**, 7643-7648.

3. J. Croissant, A. Chaix, O. Mongin, M. Wang, S. Clement, L. Raehm, J. O. Durand, V. Hugues, M. Blanchard-Desce, M. Maynadier, A. Gallud, M. Gary-Bobo, M. Garcia, J. Lu, F. Tamanoi, D. P. Ferris, D. Tarn and J. I. Zink, **Two-Photon-Triggered Drug Delivery via Fluorescent Nanovalves** *Small*, 2014, **10**, 1752-1755.

4. H. Alhmoud, B. Delalat, R. Elnathan, A. Cifuentes-Rius, A. Chaix, M. L. Rogers, J. O. Durand and N. H. Voelcker, **Porous Silicon Nanodiscs for Targeted Drug Delivery** *Adv Funct Mater*, 2015, **25**, 1137-1145.

5. J. Croissant, M. Maynadier, O. Mongin, V. Hugues, M. Blanchard-Desce, A. Chaix, X. Cattoen, M. W. C. Man, A. Gallud, M. Gary-Bobo, M. Garcia, L. Raehm and J. O. Durand, **Enhanced Two-Photon Fluorescence Imaging and Therapy of Cancer cells via Gold@Bridged Silsesquioxane** *Small*, 2015, **11**, 295-299.

6. Emilie Secret, Arnaud Chaix, Anne Galarneau, Philippe Gonzalez, Didier Cot, Michael J. Sailor, Jacques Jestin, Jean-Marc Zanotti, Frederique Cunin, and Benoit Coasne, **Control of the Pore Texture in Nanoporous Silicon via Chemical Dissolution** *Langmuir*, 2015.

# Références bibliographiques

1. J. A. von tappeimer H, **Die sensibilisierende wirkung fluorescierender substanzen** *Gesammelte untersuchungen uber die photodynamische erscheinung*, 1907, 1-210.
2. A. Dahlman, A. G. Wile, R. G. Burns, G. R. Mason, F. M. Johnson and M. W. Berns, **Laser Photoradiation Therapy of Cancer** *Cancer Research*, 1983, **43**, 430-434.
3. J. E. K. T. J. Dougherty, A. Goldfarb *et al* **Photoreaction therapy for the treatment of malignant tumors** *Cancer Research*, 1978, **38**, 2628-2635.
4. J. F. Kelly and M. E. Snell, **Hematoporphyrin Derivative - Possible Aid in Diagnosis and Therapy of Carcinoma of Bladder** *J Urology*, 1976, **115**, 150-151.
5. E. Secret, M. Maynadier, A. Gallud, M. Gary-Bobo, A. Chaix, E. Belamie, P. Maillard, M. J. Sailor, M. Garcia, J. O. Durand and F. Cunin, **Anionic porphyrin-grafted porous silicon nanoparticles for photodynamic therapy** *Chem Commun*, 2013, **49**, 4202-4204.
6. O. Vaillant, K. El Cheikh, D. Warther, D. Brevet, M. Maynadier, E. Bouffard, F. Salgues, A. Jeanjean, P. Puche, C. Mazerolles, P. Maillard, O. Mongin, M. Blanchard-Desce, L. Raehm, X. Rebillard, J. O. Durand, M. Gary-Bobo, A. Morere and M. Garcia, **Mannose-6-Phosphate Receptor: A Target for Theranostics of Prostate Cancer** *Angew Chem Int Edit*, 2015, **54**, 5952-5956.
7. B. Z. Zhao and Y. Y. He, **Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy** *Expert Rev Anticanc*, 2010, **10**, 1797-1809.
8. V. G. Schweitzer, **Photodynamic therapy for treatment of head and neck cancer** *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1990, **102**, 225-232.
9. T. R. Nathan, D. E. Whitelaw, S. C. Chang, W. R. Lees, P. M. Ripley, H. Payne, L. Jones, M. C. Parkinson, M. Emberton, A. R. Gillams, A. R. Mundy and S. G. Bown, **Photodynamic therapy for prostate cancer recurrence after radiotherapy: A phase I study** *J Urology*, 2002, **168**, 1427-1432.
10. S. G. Bown, A. Z. Rogowska, D. E. Whitelaw, W. R. Lees, L. B. Lovat, P. Ripley, L. Jones, P. Wyld, A. Gillams and A. W. R. Hatfield, **Photodynamic therapy for cancer of the pancreas** *Gut*, 2002, **50**, 549-557.
11. N. F. Jamieson, A. Mosse, S. G. Bown and L. B. Lovat, **Photodynamic therapy to eradicate dysplasia and early carcinoma in Barrett's oesophagus** *Gut*, 2002, **50**, A6-A7.
12. F. Cairnduff, M. R. Stringer, E. J. Hudson, D. V. Ash and S. B. Brown, **Superficial Photodynamic Therapy with Topical 5-Aminolevulinic Acid for Superficial Primary and Secondary Skin-Cancer** *Brit J Cancer*, 1994, **69**, 605-608.
13. M. C. DeRosa and R. J. Crutchley, **Photosensitized singlet oxygen and its applications** *Coordin Chem Rev*, 2002, **233**, 351-371.
14. B. W. Henderson and T. J. Dougherty, **How Does Photodynamic Therapy Work** *Photochem Photobiol*, 1992, **55**, 145-157.
15. K. Konopka and T. Goslinski, **Photodynamic therapy in dentistry** *J Dent Res*, 2007, **86**, 694-707.
16. Z. Luksiene, **Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment** *Medicina (Kaunas)*, 2003, **39**, 1137-1150.
17. M. Ochsner, **Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours** *J Photoch Photobio B*, 1997, **39**, 1-18.
18. T. J. Dougherty, **Special issue: Photodynamic therapy - Introduction** *Laser Surg Med*, 2006, **38**, 347-347.
19. P. B. Martijn triesscheijn, Jan H. M. Schellens, Fiona A. Stewart, **Photodynamic Therapy in Oncology** *The Oncologist*, 2006, **11**, 1034-1044.
20. R. W. Redmond and I. E. Kochevar, **Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen** *Photochem Photobiol*, 2006, **82**, 1178-1186.

21. K. Konopka, **Photodynamic therapy in dentistry (vol 86, pg 694, 2007)** *J Dent Res*, 2007, **86**, 1126-1126.
22. A. P. Castano, T. N. Demidova and M. R. Hamblin, **Mechanisms in photodynamic therapy: Part three- Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction** *Photodiagn Photodyn*, 2005, **2**, 91-106.
23. T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan and Q. Peng, **Photodynamic therapy** *J Natl Cancer I*, 1998, **90**, 889-905.
24. A. P. Castano, P. Mroz and M. R. Hamblin, **Photodynamic therapy and anti-tumour immunity** *Nat Rev Cancer*, 2006, **6**, 535-545.
25. D. Kessel and Y. Luo, **Photodynamic therapy: A mitochondrial inducer of apoptosis** *Cell Death Differ*, 1999, **6**, 28-35.
26. P. Rustin, **Mitochondria, from cell death to proliferation** *Nat Genet*, 2002, **30**, 352-353.
27. J. L. Perfettini and G. Kroemer, **Caspase activation is not death** *Nat Immunol*, 2003, **4**, 308-310.
28. A. Y. P. Mroz, G. B. Kharkwal and M. R. Hamblin, **Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer** *Cancer*, 2011, **3**, 2516-2539.
29. D. L. G. L. Canti, A. Nicolin, P. Taroni, G. Valentini, R. Cubeddu, **Immunopharmacology studies on photosensitizers used in photodynamic therapy** *Proc Spie*, 1994, **2078**, 268-275.
30. S. R. Scheffer, H. Nave, F. Korangy, K. Schlote, R. Pabst, E. M. Jaffee, M. P. Manns and T. F. Greten, **Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo** *Int J Cancer*, 2003, **103**, 205-211.
31. L. Zitvogel, N. Casares, M. O. Pequignot, N. Chaput, M. L. Albert and G. Kroemer, **Immune response against dying tumor cells** *Adv Immunol*, 2004, **84**, 131-179.
32. S. O. Gollnick, S. S. Evans, H. Baumann, B. Owczarczak, P. Maier, L. Vaughan, W. C. Wang, E. Unger and B. W. Henderson, **Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation** *Brit J Cancer*, 2003, **88**, 1772-1779.
33. B. W. Sur, P. Nguyen, C. H. Sun, B. J. Tromberg and E. L. Nelson, **Immunophototherapy using PDT combined with rapid intratumoral dendritic cell injection** *Photochem Photobiol*, 2008, **84**, 1257-1264.
34. R. Bonnett, R. D. White, U. J. Winfield and M. C. Berenbaum, **Hydroporphyrins of the Meso-Tetra(Hydroxyphenyl)Porphyrin Series as Tumor Photosensitizers** *Biochemical Journal*, 1989, **261**, 277-280.
35. R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X. H. Hu, C. J. H. Childs and C. H. Sibata, **Photosensitizers in clinical PDT** *Photodiagn Photodyn*, 2004, **1**, 27-42.
36. P. Colin, J. P. Estevez, N. Betrouni, A. Ouzzane, P. Puech, X. Leroy, J. Biserte, A. Villers and S. Mordon, **Photodynamic therapy and prostate cancer** *Prog Urol*, 2011, **21**, 85-92.
37. T. J. Dougherty, **Studies on the Structure of Porphyrins Contained in Photofrin-Ii** *Photochem Photobiol*, 1987, **46**, 569-573.
38. M. Schaffer, P. M. Schaffer, M. Vogesser, B. Ertl-Wagner, J. Rauch, R. Oberneder, G. Jori, A. Hofstetter and E. Duhmke, **Application of Photofrin II as a specific radiosensitising agent in patients with bladder cancer - a report of two cases** *Photoch Photobio Sci*, 2002, **1**, 686-689.
39. D. J. H. Roberts and F. Cairnduff, **Photodynamic Therapy of Primary Skin-Cancer - a Review** *Brit J Plast Surg*, 1995, **48**, 360-370.
40. K. Furuse, M. Fukuoka, H. Kato, T. Horai, K. Kubota, N. Kodama, Y. Kusunoki, N. Takifuji, T. Okunaka, C. Konaka, H. Wada and Y. Hayata, **A Prospective Phase-Ii**

**Study on Photodynamic Therapy with Photofrin-Ii for Centrally Located Early-Stage Lung-Cancer** *J Clin Oncol*, 1993, **11**, 1852-1857.

41. M. A. Biel, **Photodynamic therapy and the treatment of head and neck neoplasia** *Laryngoscope*, 1998, **108**, 1259-1268.
42. Q. Peng, T. Warloe, K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, K. E. Giercksky and J. M. Nesland, **5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy - Clinical research and future challenges** *Cancer*, 1997, **79**, 2282-2308.
43. S. B. Brown, E. A. Brown and I. Walker, **The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment** *Lancet Oncol*, 2004, **5**, 497-508.
44. I. Rosenthal, **Phthalocyanines as Photodynamic Sensitizers** *Photochem Photobiol*, 1991, **53**, 859-&.
45. M. Shopova, D. Wohrle, N. Stoichkova, A. Milev, V. Mantareva, S. Muller, K. Kassabov and K. Georgiev, **Hydrophobic Zn(Ii)-Naphthalocyanines as Photodynamic Therapy Agents for Lewis Lung-Carcinoma** *J Photoch Photobio B*, 1994, **23**, 35-42.
46. S. V. Sheleg, E. A. Zhavrid, T. V. Khodina, G. A. Kochubeev, Y. P. Istomin, V. N. Chalov and I. N. Zhuravkin, **Photodynamic therapy with chlorin e(6) for skin metastases of melanoma** *Photodermatol Photo*, 2004, **20**, 21-26.
47. K. S. Mcmahon, T. J. Wieman, P. H. Moore and V. H. Fingar, **Effects of Photodynamic Therapy Using Mono-L-Aspartyl Chlorin E(6) on Vessel Constriction, Vessel Leakage, and Tumor Response** *Cancer Research*, 1994, **54**, 5374-5379.
48. M. P. Copper, I. B. Tan, H. Oppelaar, M. C. Ruevekamp and F. A. Stewart, **Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin photodynamic therapy in early-stage squamous cell carcinoma of the head and neck** *Arch Otolaryngol*, 2003, **129**, 709-711.
49. P. Baas, A. E. Saarnak, H. Oppelaar, H. Neering and F. A. Stewart, **Photodynamic therapy with meta-tetrahydroxyphenylchlorin for basal cell carcinoma: a phase I/II study** *Brit J Dermatol*, 2001, **145**, 75-78.
50. C. M. Moore, T. R. Nathan, W. R. Lees, C. A. Mosse, A. Freeman, M. Emberton and S. G. Bown, **Photodynamic therapy using meso tetra hydroxy phenyl chlorin (mTHPC) in early prostate cancer** *Laser Surg Med*, 2006, **38**, 356-363.
51. M. Sibrian-Vazquez, T. J. Jensen, F. R. Fronczek, R. P. Hammer and M. G. Vicente, **Synthesis and characterization of positively charged porphyrin-peptide conjugates** *Bioconjugate Chem*, 2005, **16**, 852-863.
52. P. Maillard, J. L. Guerquin-Kern, M. Momenteau and S. Gaspard, **Glycoconjugated Tetrapyrrolic Macrocycles** *J Am Chem Soc*, 1989, **111**, 9125-9127.
53. R. Schneider, F. Schmitt, C. Frochot, Y. Fort, N. Lourette, F. Guillemin, J. F. Muller and M. Barberi-Heyob, **Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy** *Bioorgan Med Chem*, 2005, **13**, 2799-2808.
54. N. Swamy, D. A. James, S. C. Mohr, R. N. Hanson and R. Ray, **An estradiol-porphyrin conjugate selectively localizes into estrogen receptor-positive breast cancer cells** *Bioorgan Med Chem*, 2002, **10**, 3237-3243.
55. P. J. Donald, R. D. Cardiff, D. E. He and K. Kendall, **Monoclonal antibody-porphyrin conjugate for head and neck cancer: the possible magic bullet** *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1991, **105**, 781-787.
56. W. Kaiser and C. G. B. Garrett, **2-Photon Excitation in Caf2 - Eu2+** *Phys Rev Lett*, 1961, **7**, 229-&.
57. P. T. C. So, C. Y. Dong, B. R. Masters and K. M. Berland, **Two-photon excitation fluorescence microscopy** *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2000, **2**, 399-429.

58. M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning and H. L. Anderson, **Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes** *Angew Chem Int Edit*, 2009, **48**, 3244-3266.
59. R. Marchesini, E. Melloni, G. Pezzoni, G. Savi, F. Zunino, F. Docchio and G. Fava, **A Study on the Possible Involvement of Nonlinear Mechanism of Light-Absorption by Hpd with Nd-Yag Laser** *Laser Surg Med*, 1986, **6**, 323-327.
60. P. Lenz, **In-Vivo Excitation of Photosensitizers by Infrared Light** *Photochem Photobiol*, 1995, **62**, 333-338.
61. W. G. Fisher, W. P. Partridge, C. Dees and E. A. Wachter, **Simultaneous two-photon activation of type-I photodynamic therapy agents** *Photochem Photobiol*, 1997, **66**, 141-155.
62. M. A. Oar, W. R. Dichtel, J. M. Serin, J. M. J. Frechet, J. E. Rogers, J. E. Slagle, P. A. Fleitz, L. S. Tan, T. Y. Ohulchanskyy and P. N. Prasad, **Light-harvesting chromophores with metalated porphyrin cores for tuned photosensitization of singlet oxygen via two-photon excited FRET** *Chem Mater*, 2006, **18**, 3682-3692.
63. J. Croissant, A. Chaix, O. Mongin, M. Wang, S. Clement, L. Raehm, J. O. Durand, V. Hugues, M. Blanchard-Desce, M. Maynadier, A. Gallud, M. Gary-Bobo, M. Garcia, J. Lu, F. Tamanoi, D. P. Ferris, D. Tarn and J. I. Zink, **Two-Photon-Triggered Drug Delivery via Fluorescent Nanovalves** *Small*, 2014, **10**, 1752-1755.
64. J. Croissant, M. Maynadier, O. Mongin, V. Hugues, M. Blanchard-Desce, A. Chaix, X. Cattoen, M. W. C. Man, A. Gallud, M. Gary-Bobo, M. Garcia, L. Raehm and J. O. Durand, **Enhanced Two-Photon Fluorescence Imaging and Therapy of Cancer Cells via Gold@Bridged Silsesquioxane Nanoparticles** *Small*, 2015, **11**, 295-299.
65. M. Gary-Bobo, Y. Mir, C. Rouxel, D. Brevet, I. Basile, M. Maynadier, O. Vaillant, O. Mongin, M. Blanchard-Desce, A. Morere, M. Garcia, J. O. Durand and L. Raehm, **Mannose-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Efficient Two-Photon Photodynamic Therapy of Solid Tumors** *Angew Chem Int Edit*, 2011, **50**, 11425-11429.
66. H. A. Collins, M. Khurana, E. H. Moriyama, A. Mariampillai, E. Dahlstedt, M. Balaz, M. K. Kuimova, M. Drobizhev, V. X. D. Yang, D. Phillips, A. Rebane, B. C. Wilson and H. L. Anderson, **Blood-vessel closure using photosensitizers engineered for two-photon excitation** *Nat Photonics*, 2008, **2**, 420-424.
67. A. Mhashilkar, S. Chada, J. A. Roth and R. Ramesh, **Gene therapy - Therapeutic approaches and implications** *Biotechnol Adv*, 2001, **19**, 279-297.
68. D. Escors and K. Breckpot, **Lentiviral Vectors in Gene Therapy: Their Current Status and Future Potential** *Arch Immunol Ther Ex*, 2010, **58**, 107-119.
69. Y. Yaron, R. L. Kramer, M. P. Johnson and M. I. Evans, **Gene therapy - Is the future here yet?** *Obstet Gyn Clin N Am*, 1997, **24**, 179-&.
70. J. C. Olsen and R. Swanstrom, **A New Pathway in the Generation of Defective Retrovirus DNA** *J Virol*, 1985, **56**, 779-789.
71. S. K. Campos and M. A. Barry, **Current advances and future challenges in adenoviral vector biology and targeting** *Curr Gene Ther*, 2007, **7**, 189-204.
72. D. Majhen and A. Ambriovic-Ristov, **Adenoviral vectors - How to use them in cancer gene therapy?** *Virus Res*, 2006, **119**, 121-133.
73. M. A. Witlox, M. L. Lamfers, P. I. J. M. Wuisman, D. T. Curiel and G. P. Siegal, **Evolving gene therapy approaches for osteosarcoma using viral vectors: Review** *Bone*, 2007, **40**, 797-812.
74. T. Suda and D. Liu, **Hydrodynamic gene delivery: Its principles and applications** *Mol Ther*, 2007, **15**, 2063-2069.

75. G. F. Zhang, V. Budker and J. A. Wolff, **High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA** *Hum Gene Ther*, 1999, **10**, 1735-1737.
76. E. Neumann, M. Schaeferridder, Y. Wang and P. H. Hofschneider, **Gene-Transfer into Mouse Lyoma Cells by Electroporation in High Electric-Fields** *Embo Journal*, 1982, **1**, 841-845.
77. X. Gao, K. S. Kim and D. X. Liu, **Nonviral gene delivery: What we know and what is next** *Aaps J*, 2007, **9**, E92-E104.
78. M. S. Al-Dosari and X. Gao, **Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress** *Aaps J*, 2009, **11**, 671-681.
79. M. Miyazaki, Y. Obata, K. Abe, A. Furusu, T. Koji, Y. Tabata and S. Kohno, **Gene transfer using nonviral delivery systems** *Periton Dialysis Int*, 2006, **26**, 633-640.
80. M. T. S. Lin, L. Pulkkinen, J. Uitto and K. Yoon, **The gene gun: current applications in cutaneous gene therapy** *Int J Dermatol*, 2000, **39**, 161-170.
81. K. Nishida, M. Doita, T. Takada, K. I. Kakutani, H. Miyamoto, T. Shimomura, K. Maeno and M. Kurosaka, **Sustained transgene expression in intervertebral disc cells in vivo mediated by microbubble-enhanced ultrasound gene therapy** *Spine*, 2006, **31**, 1415-1419.
82. C. X. He, Y. Tabata and J. Q. Gao, **Non-viral gene delivery carrier and its three-dimensional transfection system** *Int J Pharmaceut*, 2010, **386**, 232-242.
83. M. T. Peracchia, E. Fattal, D. Desmaele, M. Besnard, J. P. Noel, J. M. Gomis, M. Appel, J. d'Angelo and P. Couvreur, **Stealth (R) PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting** *J Control Release*, 1999, **60**, 121-128.
84. D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M. L. Viriot, F. Guillemin and M. Barberi-Heyob, **Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents** *Trends Biotechnol*, 2008, **26**, 612-621.
85. V. Dixit, J. Van den Bossche, D. M. Sherman, D. H. Thompson and R. P. Andres, **Synthesis and grafting of thioctic acid-PEG-folate conjugates onto Au nanoparticles for selective targeting of folate receptor-positive tumor cells** *Bioconjugate Chem*, 2006, **17**, 603-609.
86. V. Lebret, L. Raehm, J. O. Durand, M. Smaihi, M. H. V. Werts, M. Blanchard-Desce, D. Methy-Gonnod and C. Dubernet, **Folic Acid-Targeted Mesoporous Silica Nanoparticles for Two-Photon Fluorescence** *J Biomed Nanotechnol*, 2010, **6**, 176-180.
87. E. Secret, K. Smith, V. Dubljevic, E. Moore, P. Macardle, B. Delalat, M. L. Rogers, T. G. Johns, J. O. Durand, F. Cunin and N. H. Voelcker, **Antibody-Functionalized Porous Silicon Nanoparticles for Vectorization of Hydrophobic Drugs** *Adv Healthc Mater*, 2013, **2**, 718-727.
88. E. Secret, M. Maynadier, A. Gallud, A. Chaix, E. Bouffard, M. Gary-Bobo, N. Marcotte, O. Mongin, K. El Cheikh, V. Hugues, M. Auffan, C. Frochot, A. Morere, P. Maillard, M. Blanchard-Desce, M. J. Sailor, M. Garcia, J. O. Durand and F. Cunin, **Two-Photon Excitation of Porphyrin-Functionalized Porous Silicon Nanoparticles for Photodynamic Therapy** *Adv Mater*, 2014, **26**, 7643-7648.
89. F. Danhier, B. Vroman, N. Lecouturier, N. Crokart, V. Pourcelle, H. Freichels, C. Jerome, J. Marchand-Brynaert, O. Feron and V. Preat, **Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with Paclitaxel** *J Control Release*, 2009, **140**, 166-173.
90. S. J. Lee, K. Park, Y. K. Oh, S. H. Kwon, S. Her, I. S. Kim, K. Choi, S. J. Lee, H. Kim, S. G. Lee, K. Kim and I. C. Kwon, **Tumor specificity and therapeutic efficacy**

**of photosensitizer-encapsulated glycol chitosan-based nanoparticles in tumor-bearing mice** *Biomaterials*, 2009, **30**, 2929-2939.

91. A. Khdair, D. Chen, Y. Patil, L. N. Ma, Q. P. Dou, M. P. V. Shekhar and J. Panyam, **Nano particle-mediated combination chemotherapy and photodynamic therapy overcomes tumor drug resistance** *J Control Release*, 2010, **141**, 137-144.
92. S. Sortino, A. Mazzaglia, L. M. Scolaro, F. M. Merlo, V. Valveri and M. T. Sciortino, **Nanoparticles of cationic amphiphilic cyclodextrins entangling anionic porphyrins as carrier-sensitizer system in photodynamic cancer therapy** *Biomaterials*, 2006, **27**, 4256-4265.
93. Y. Sun, Z. L. Chen, X. X. Yang, P. Huang, X. P. Zhou and X. X. Du, **Magnetic chitosan nanoparticles as a drug delivery system for targeting photodynamic therapy** *Nanotechnology*, 2009, **20**.
94. F. Kratz, **Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles** *J Control Release*, 2008, **132**, 171-183.
95. M. Zeisser-Labouebe, F. Delie, R. Gurny and N. Lange, **Benefits of nanoencapsulation for the hypercin-mediated photodetection of ovarian micrometastases** *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, **71**, 207-213.
96. M. Fadel, K. Kassab and D. A. Fadeel, **Zinc phthalocyanine-loaded PLGA biodegradable nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice** *Laser Med Sci*, 2010, **25**, 283-292.
97. J. M. Lu, X. W. Wang, C. Marin-Muller, H. Wang, P. H. Lin, Q. Z. Yao and C. Y. Chen, **Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology** *Expert Rev Mol Diagn*, 2009, **9**, 325-341.
98. S. S. Lucky, K. C. Soo and Y. Zhang, **Nanoparticles in Photodynamic Therapy** *Chem Rev*, 2015, **115**, 1990-2042.
99. G. Birrenbach and P. P. Speiser, **Polymerized Micelles and Their Use as Adjuvants in Immunology** *J Pharm Sci*, 1976, **65**, 1763-1766.
100. C. Vauthier, C. Dubernet, E. Fattal, H. Pinto-Alphandary and P. Couvreur, **Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications** *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, **55**, 519-548.
101. E. Allemann, N. Brasseur, O. Benrezzak, J. Rousseau, S. V. Kudrevich, R. W. Boyle, J. C. Leroux, R. Gurny and J. E. Vanlier, **Peg-Coated Poly(Lactic Acid) Nanoparticles for the Delivery of Hexadecafluoro Zinc Phthalocyanine to Emt-6 Mouse Mammary-Tumors** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1995, **47**, 382-387.
102. Y. N. Konan, M. Berton, R. Gurny and E. Allemann, **Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles** *Eur J Pharm Sci*, 2003, **18**, 241-249.
103. E. Allemann, J. Rousseau, N. Brasseur, S. V. Kudrevich, K. Lewis and J. E. vanLier, **Photodynamic therapy of tumours with hexadecafluoro zinc phthalocyanine formulated in PEG-coated poly(lactic acid) nanoparticles** *Int J Cancer*, 1996, **66**, 821-824.
104. A. D. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkins, **Diffusion of Univalent Ions across Lamellae of Swollen Phospholipids** *J Mol Biol*, 1965, **13**, 238-&.
105. S. Begu, A. A. Pouessel, D. A. Lerner, C. Tourne-Peteilh and J. M. Devoisselle, **Liposil, a promising composite material for drug storage and release** *J Control Release*, 2007, **118**, 1-6.
106. K. Ichikawa, Y. Takeuchi, S. Yonezawa, T. Hikita, K. Kurohane, Y. Namba and N. Oku, **Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) using Visudyne causes effective suppression of tumor growth** *Cancer Lett*, 2004, **205**, 39-48.

107. H. Pinto-Alphandary, A. Andremont and P. Couvreur, **Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications** *Int J Antimicrob Ag*, 2000, **13**, 155-168.
108. M. Liong, J. Lu, M. Kovochich, T. Xia, S. G. Ruehm, A. E. Nel, F. Tamanoi and J. I. Zink, **Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery** *Acs Nano*, 2008, **2**, 889-896.
109. C. H. Lee, S. H. Cheng, Y. J. Wang, Y. C. Chen, N. T. Chen, J. Souris, C. T. Chen, C. Y. Mou, C. S. Yang and L. W. Lo, **Near-Infrared Mesoporous Silica Nanoparticles for Optical Imaging: Characterization and In Vivo Biodistribution** *Adv Funct Mater*, 2009, **19**, 215-222.
110. Y. Klichko, M. Liong, E. Choi, S. Angelos, A. E. Nel, J. F. Stoddart, F. Tamanoi and J. I. Zink, **Mesostructured Silica for Optical Functionality, Nanomachines, and Drug Delivery** *J Am Ceram Soc*, 2009, **92**, S2-S10.
111. F. Yan and R. Kopelman, **The embedding of meta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin into silica nanoparticle platforms for photodynamic therapy and their singlet oxygen production and pH-dependent optical properties** *Photochem Photobiol*, 2003, **78**, 587-591.
112. H. L. Tu, Y. S. Lin, H. Y. Lin, Y. Hung, L. W. Lo, Y. F. Chen and C. Y. Mou, **In vitro Studies of Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Photodynamic Therapy** *Adv Mater*, 2009, **21**, 172-+.
113. S. H. Cheng, C. H. Lee, C. S. Yang, F. G. Tseng, C. Y. Mou and L. W. Lo, **Mesoporous silica nanoparticles functionalized with an oxygen-sensing probe for cell photodynamic therapy: potential cancer theranostics** *J Mater Chem*, 2009, **19**, 1252-1257.
114. B. Z. Zhao, J. J. Yin, P. J. Bilski, C. F. Chignell, J. E. Roberts and Y. Y. He, **Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles** *Toxicol Appl Pharm*, 2009, **241**, 163-172.
115. J. Croissant, M. Maynadier, A. Gallud, H. P. N'Dongo, J. L. Nyalosaso, G. Derrien, C. Charnay, J. O. Durand, L. Raehm, F. Serein-Spirau, N. Cheminet, T. Jarrosson, O. Mongin, M. Blanchard-Desce, M. Gary-Bobo, M. Garcia, J. Lu, F. Tamanoi, D. Tarn, T. M. Guardado-Alvarez and J. I. Zink, **Two-Photon-Triggered Drug Delivery in Cancer Cells Using Nanoimpellers** *Angew Chem Int Edit*, 2013, **52**, 13813-13817.
116. P. Cherukuri, E. S. Glazer and S. A. Curleya, **Targeted hyperthermia using metal nanoparticles** *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, **62**, 339-345.
117. M. Camerin, M. Magaraggia, M. Soncin, G. Jori, M. Moreno, I. Chambrier, M. J. Cook and D. A. Russell, **The in vivo efficacy of phthalocyanine-nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma** *Eur J Cancer*, 2010, **46**, 1910-1918.
118. M. K. K. Oo, X. Yang, H. Du and H. Wang, **5-aminolevulinic acid-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer** *Nanomedicine-Uk*, 2008, **3**, 777-786.
119. Y. Cheng, A. C. Samia, J. D. Meyers, I. Panagopoulos, B. W. Fei and C. Burda, **Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer** *J Am Chem Soc*, 2008, **130**, 10643-10647.
120. K. Zaruba, J. Kralova, P. Rezanka, P. Pouckova, L. Veverkova and V. Kral, **Modified porphyrin-brucine conjugated to gold nanoparticles and their application in photodynamic therapy** *Org Biomol Chem*, 2010, **8**, 3202-3206.
121. N. Reum, C. Fink-Straube, T. Klein, R. W. Hartmann, C. M. Lehr and M. Schneider, **Multilayer Coating of Gold Nanoparticles with Drug-Polymer Coadsorbates** *Langmuir*, 2010, **26**, 16901-16908.

122. C. G. Hacliipanayis, M. J. Bonder, S. Balakrishanan, X. Wang, H. Mao and G. C. Hadjipanayis, **Metallic Iron Nanoparticles for MRI Contrast Enhancement and Local Hyperthermia** *Small*, 2008, **4**, 1925-1929.
123. R. Kopelman, Y. E. L. Koo, M. Philbert, B. A. Moffat, G. R. Reddy, P. McConville, D. E. Hall, T. L. Chenevert, M. S. Bhojani, S. M. Buck, A. Rehemtulla and B. D. Ross, **Multifunctional nanoparticle platforms for in vivo MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer** *J Magn Magn Mater*, 2005, **293**, 404-410.
124. G. R. Reddy, M. S. Bhojani, P. McConville, J. Moody, B. A. Moffat, D. E. Hall, G. Kim, Y. E. L. Koo, M. J. Woolliscroft, J. V. Sugai, T. D. Johnson, M. A. Philbert, R. Kopelman, A. Rehemtulla and B. D. Ross, **Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors** *Clin Cancer Res*, 2006, **12**, 6677-6686.
125. Z. Zhu, Z. W. Tang, J. A. Phillips, R. H. Yang, H. Wang and W. H. Tan, **Regulation of singlet oxygen generation using single-walled carbon nanotubes** *J Am Chem Soc*, 2008, **130**, 10856-+.
126. C. Iancu and L. Mocan, **Advances in cancer therapy through the use of carbon nanotube-mediated targeted hyperthermia** *Int J Nanomed*, 2011, **6**, 1675-1684.
127. K. D. Lu, C. B. He and W. B. Lin, **Nanoscale Metal-Organic Framework for Highly Effective Photodynamic Therapy of Resistant Head and Neck Cancer** *J Am Chem Soc*, 2014, **136**, 16712-16715.
128. U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke and T. Nann, **Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels** *Nat Methods*, 2008, **5**, 763-775.
129. X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir and S. Weiss, **Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics** *Science*, 2005, **307**, 538-544.
130. R. Bakalova, H. Ohba, Z. Zhelev, M. Ishikawa and Y. Baba, **Quantum dots as photosensitizers?** *Nat Biotechnol*, 2004, **22**, 1360-1361.
131. A. M. Derfus, W. C. W. Chan and S. N. Bhatia, **Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots** *Nano Lett*, 2004, **4**, 11-18.
132. C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A. Munoz Javier, H. E. Gaub, S. Stolzle, N. Fertig and W. J. Parak, **Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles** *Nano Lett*, 2005, **5**, 331-338.
133. E. J. Anglin, L. Cheng, W. R. Freeman and M. J. Sailor, **Porous silicon in drug delivery devices and materials** *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, **60**, 1266-1277.
134. J. H. Park, L. Gu, G. von Maltzahn, E. Ruoslahti, S. N. Bhatia and M. J. Sailor, **Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications** *Nat Mater*, 2009, **8**, 331-336.
135. S. Y. Wong, J. M. Pelet and D. Putnam, **Polymer systems for gene delivery-past, present, and future** *Prog Polym Sci*, 2007, **32**, 799-837.
136. P. Midoux, C. Pichon, J. J. Yaouanc and P. A. Jaffres, **Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers** *Brit J Pharmacol*, 2009, **157**, 166-178.
137. M. V. Yezhelyev, L. F. Qi, R. M. O'Regan, S. Nie and X. H. Gao, **Proton-sponge coated quantum dots for siRNA delivery and intracellular imaging** *J Am Chem Soc*, 2008, **130**, 9006-9012.
138. D. Brevet, O. Hocine, A. Delalande, L. Raehm, C. Charnay, P. Midoux, J. O. Durand and C. Pichon, **Improved gene transfer with histidine-functionalized mesoporous silica nanoparticles** *Int J Pharmaceut*, 2014, **471**, 197-205.
139. S. B. Hartono, W. Y. Gu, F. Kleitz, J. Liu, L. Z. He, A. P. J. Middelberg, C. Z. Yu, G. Q. Lu and S. Z. Qiao, **Poly-L-lysine Functionalized Large Pore Cubic**

**Mesostructured Silica Nanoparticles as Biocompatible Carriers for Gene Delivery** *Acs Nano*, 2012, **6**, 2104-2117.

140. M. Kar, N. Tiwari, M. Tiwari, M. Lahiri and S. Sen Gupta, **Poly-L-Arginine Grafted Silica Mesoporous Nanoparticles for Enhanced Cellular Uptake and their Application in DNA Delivery and Controlled Drug Release** *Part Part Syst Char*, 2013, **30**, 166-179.
141. T. A. Xia, M. Kovochich, M. Liong, H. Meng, S. Kabehie, S. George, J. I. Zink and A. E. Nel, **Polyethyleneimine Coating Enhances the Cellular Uptake of Mesoporous Silica Nanoparticles and Allows Safe Delivery of siRNA and DNA Constructs** *Acs Nano*, 2009, **3**, 3273-3286.
142. C. Goncalves, C. Pichon, B. Guerin and P. Midoux, **Intracellular processing and stability of DNA complexed with histidylated polylysine conjugates** *J Gene Med*, 2002, **4**, 271-281.
143. P. Midoux, G. Breuzard, J. P. Gomez and C. Pichon, **Polymer-Based Gene Delivery: A Current Review on the Uptake and Intracellular Trafficking of Polyplexes** *Curr Gene Ther*, 2008, **8**, 335-352.
144. C. Pichon, C. Goncalves and P. Midoux, **Histidine-rich peptides and polymers for nucleic acids delivery** *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **53**, 75-94.
145. M. M. P. Midoux, **Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes** *Bioconjugate Chem*, 1999, **10**, 406-411.
146. R. N. Cohen, M. A. E. M. van der Aa, N. Macaraeg, A. P. Lee and F. C. Szoka, **Quantification of plasmid DNA copies in the nucleus after lipoplex and polyplex transfection** *J Control Release*, 2009, **135**, 166-174.
147. Y. Choi, **MIDGE/hNIS vaccination generates antigen-associated CD8+IFN-gamma+ T cells and enhances protective antitumor immunity** *Int J Cancer*, **120**, 1942-1950.
148. D. A. Dean, D. D. Strong and W. E. Zimmer, **Nuclear entry of nonviral vectors** *Gene Ther*, 2005, **12**, 881-890.
149. J. O. Radler, I. Koltover, T. Salditt and C. R. Safinya, **Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes** *Science*, 1997, **275**, 810-814.
150. J. Zabner, **Cationic lipids used in gene transfer** *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, **27**, 17-28.
151. G. Y. Wu and C. H. Wu, **Evidence for Targeted Gene Delivery to Hep G2 Hepatoma-Cells Invitro** *Biochemistry*, 1988, **27**, 887-892.
152. O. Boussif, F. Lezoualch, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J. P. Behr, **A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in-Vivo - Polyethylenimine** *P Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**, 7297-7301.
153. B. H. Zinselmeyer, S. P. Mackay, A. G. Schatzlein and I. F. Uchegbu, **The lower-generation polypropylenimine dendrimers are effective gene-transfer agents** *Pharm Res-Dordr*, 2002, **19**, 960-967.
154. D. V. Schaffer, N. A. Fidelman, N. Dan and D. A. Lauffenburger, **Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery** *Biotechnol Bioeng*, 2000, **67**, 598-606.
155. P. Symonds, J. C. Murray, A. C. Hunter, G. Debska, A. Szewczyk and S. M. Moghimi, **Low and high molecular weight poly(L-lysine)s/poly(L-lysine) - DNA complexes initiate mitochondrial-mediated apoptosis differently** *Febs Lett*, 2005, **579**, 6191-6198.
156. J. H. Kim, J. S. Park, H. N. Yang, D. G. Woo, S. Y. Jeon, H. J. Do, H. Y. Lim, J. M. Kim and K. H. Park, **The use of biodegradable PLGA nanoparticles to mediate**

**SOX9 gene delivery in human mesenchymal stem cells (hMSCs) and induce chondrogenesis** *Biomaterials*, 2011, **32**, 268-278.

157. J. Chen, B. Tian, X. Yin, Y. Zhang, D. Hu, Z. Hu, M. Z. Liu, Y. F. Pan, J. F. Zhao, H. Li, C. Hou, J. W. Wang and Y. D. Zhang, **Preparation, characterization and transfection efficiency of cationic PEGylated PLA nanoparticles as gene delivery systems** *J Biotechnol*, 2007, **130**, 107-113.
158. A. Basarkar and J. Singh, **Poly (lactide-co-glycolide)-Polymethacrylate Nanoparticles for Intramuscular Delivery of Plasmid Encoding Interleukin-10 to Prevent Autoimmune Diabetes in Mice** *Pharm Res-Dordr*, 2009, **26**, 72-81.
159. D. M. Lynn and R. Langer, **Degradable poly(beta-amino esters): Synthesis, characterization, and self-assembly with plasmid DNA** *J Am Chem Soc*, 2000, **122**, 10761-10768.
160. I. S. Kim, S. K. Lee, Y. M. Park, Y. B. Lee, S. C. Shin, K. C. Lee and I. J. Oh, **Physicochemical characterization of poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles with polyethylenimine as gene delivery carrier** *Int J Pharmaceut*, 2005, **298**, 255-262.
161. C. Hom, J. Lu, M. Liong, H. Z. Luo, Z. X. Li, J. I. Zink and F. Tamanoi, **Mesoporous Silica Nanoparticles Facilitate Delivery of siRNA to Shutdown Signaling Pathways in Mammalian Cells** *Small*, 2010, **6**, 1185-1190.
162. D. R. Radu, C. Y. Lai, K. Jeftinija, E. W. Rowe, S. Jeftinija and V. S. Y. Lin, **A polyamidoamine dendrimer-capped mesoporous silica nanosphere-based gene transfection reagent** *J Am Chem Soc*, 2004, **126**, 13216-13217.
163. H. K. Na, M. H. Kim, K. Park, S. R. Ryoo, K. E. Lee, H. Jeon, R. Ryoo, C. Hyeon and D. H. Min, **Efficient functional delivery of siRNA using mesoporous silica nanoparticles with ultralarge pores** *Small*, 2012, **8**, 1752-1761.
164. Y. C. X. Li, M. Wang, Y. Ma, W. Xia, H. Gu, **A mesoporous silica nanoparticles - PEI - Fusogenic peptide system for siRNA** *Biomaterials*, 2013, 1391-1401.
165. F. Gao, P. Botella, A. Corma, J. Blesa and L. Dong, **Monodispersed Mesoporous Silica Nanoparticles with Very Large Pores for Enhanced Adsorption and Release of DNA** *J Phys Chem B*, 2009, **113**, 1796-1804.
166. P. S. Ghosh, C. K. Kim, G. Han, N. S. Forbes and V. M. Rotello, **Efficient Gene Delivery Vectors by Tuning the Surface Charge Density of Amino Acid-Functionalized Gold Nanoparticles** *Acs Nano*, 2008, **2**, 2213-2218.
167. Z. Medarova, W. Pham, C. Farrar, V. Petkova and A. Moore, **In vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors** *Nat Med*, 2007, **13**, 372-377.
168. Y. P. Ho, H. H. Chen, K. W. Leong and T. H. Wang, **Evaluating the intracellular stability and unpacking of DNA nanocomplexes by quantum dots-FRET** *J Control Release*, 2006, **116**, 83-89.
169. A. Uhlir, **Electrolytic Shaping of Germanium and Silicon** *At&T Tech J*, 1956, **35**, 333-347.
170. R. Memming and G. Schwandt, **Anodic Dissolution of Silicon in Hydrofluoric Acid Solutions** *Surf Sci*, 1966, **4**, 109-&.
171. V. Lehmann and U. Gosele, **Porous Silicon Formation - a Quantum Wire Effect** *Appl Phys Lett*, 1991, **58**, 856-858.
172. L. T. Canham, **Silicon Quantum Wire Array Fabrication by Electrochemical and Chemical Dissolution of Wafers** *Appl Phys Lett*, 1990, **57**, 1046-1048.
173. L. T. Canham, **Bioactive silicon structure fabrication through nanoetching techniques** *Adv Mater*, 1995, **7**, 1033-&.
174. E. J. Anglin, L. Y. Cheng, W. R. Freeman and M. J. Sailor, **Porous silicon in drug delivery devices and materials** *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, **60**, 1266-1277.

175. X. G. Zhang, **Morphology and formation mechanisms of porous silicon** *J Electrochem Soc*, 2004, **151**, C69-C80.
176. O. Bisi, S. Ossicini and L. Pavesi, **Porous silicon: a quantum sponge structure for silicon based optoelectronics** *Surf Sci Rep*, 2000, **38**, 1-126.
177. E. A. de Vasconcelos, E. F. da Silva, B. E. C. A. dos Santos, W. M. de Azevedo and J. A. K. Freire, **A new method for luminescent porous silicon formation: reaction-induced vapor-phase stain etch** *Phys Status Solidi A*, 2005, **202**, 1539-1542.
178. F. O. Z. Fekih, N. E. Chabane-Sari, **Caractérisation optique du silicium poreux** *Revue des Energies Renouvables*, 2007, 321-326.
179. S. Content, W. C. Trogler and M. J. Sailor, **Detection of nitrobenzene, DNT, and TNT vapors by quenching of porous silicon photoluminescence** *Chem-Eur J*, 2000, **6**, 2205-2213.
180. J. H. Song and M. J. Sailor, **Quenching of photoluminescence from porous silicon by aromatic molecules** *J Am Chem Soc*, 1997, **119**, 7381-7385.
181. D. L. Fisher, J. Harper and M. J. Sailor, **Energy-Transfer Quenching of Porous Si Photoluminescence by Aromatic-Molecules** *J Am Chem Soc*, 1995, **117**, 7846-7847.
182. M. J. Sailor and E. C. Wu, **Photoluminescence-Based Sensing With Porous Silicon Films, Microparticles, and Nanoparticles** *Adv Funct Mater*, 2009, **19**, 3195-3208.
183. D. Kovalev and M. Fujii, **Silicon nanocrystals: Photosensitizers for oxygen molecules** *Adv Mater*, 2005, **17**, 2531-2544.
184. Y. V. Ryabchikov, I. A. Belogorokhov, A. S. Vorontsov, L. A. Osminkina, V. Y. Timoshenko and P. K. Kashkarov, **Dependence of the singlet oxygen photosensitization efficiency on morphology of porous silicon** *Phys Status Solidi A*, 2007, **204**, 1271-1275.
185. R. Jugdaohsingh, **Silicon and bone health** *Journal of Nutrition Health & Aging*, 2007, **11**, 99-110.
186. S. H. C. Anderson, H. Elliott, D. J. Wallis, L. T. Canham and J. J. Powell, **Dissolution of different forms of partially porous silicon wafers under simulated physiological conditions** *Physica Status Solidi a-Applied Research*, 2003, **197**, 331-335.
187. J. Salonen and V. P. Lehto, **Fabrication and chemical surface modification of mesoporous silicon for biomedical applications** *Chem Eng J*, 2008, **137**, 162-172.
188. M. R. Linford and C. E. D. Chidsey, **Alkyl Monolayers Covalently Bonded to Silicon Surfaces** *J Am Chem Soc*, 1993, **115**, 12631-12632.
189. R. Boukherroub, J. T. C. Wojtyk, D. D. M. Wayner and D. J. Lockwood, **Thermal hydrosilylation of undecylenic acid with porous silicon** *J Electrochem Soc*, 2002, **149**, H59-H63.
190. M. P. Stewart and J. M. Buriak, **Photopatterned hydrosilylation on porous silicon** *Angew Chem Int Edit*, 1998, **37**, 3257-3260.
191. M. P. Stewart and J. M. Buriak, **Exciton-mediated hydrosilylation on photoluminescent nanocrystalline silicon** *J Am Chem Soc*, 2001, **123**, 7821-7830.
192. J. M. Buriak, **Organometallic chemistry on silicon and germanium surfaces** *Chem Rev*, 2002, **102**, 1271-1308.
193. J. M. Buriak and M. J. Allen, **Lewis acid mediated functionalization of porous silicon with substituted alkenes and alkynes** *J Am Chem Soc*, 1998, **120**, 1339-1340.
194. M. P. Schwartz, F. Cunin, R. W. Cheung and M. J. Sailor, **Chemical modification of silicon surfaces for biological applications** *Phys Status Solidi A*, 2005, **202**, 1380-1384.
195. R. Boukherroub, D. D. M. Wayner, G. I. Sproule, D. J. Lockwood and L. T. Canham, **Stability enhancement of partially-oxidized porous silicon nanostructures modified with ethyl undecylenate** *Nano Lett*, 2001, **1**, 713-717.

196. S. Fellah, A. Teyssot, F. Ozanam, J. N. Chazalviel, J. Vigneron and A. Etcheberry, **Kinetics of electrochemical derivatization of the silicon surface by Grignards** *Langmuir*, 2002, **18**, 5851-5860.
197. S. Fellah, R. Boukherroub, F. Ozanam and J. N. Chazalviel, **Hidden electrochemistry in the thermal grafting of silicon surfaces from Grignard reagents** *Langmuir*, 2004, **20**, 6359-6364.
198. J. H. Song and M. J. Sailor, **Functionalization of nanocrystalline porous silicon surfaces with aryllithium reagents: Formation of silicon-carbon bonds by cleavage of silicon-silicon bonds** *J Am Chem Soc*, 1998, **120**, 2376-2381.
199. C. Gurtner, A. W. Wun and M. Sailor, **Surface modification of porous silicon by electrochemical reduction of organo halides** *Angew Chem Int Edit*, 1999, **38**, 1966-1968.
200. A. M. Kaukonen, L. Laitinen, J. Salonen, J. Tuura, T. Heikkila, T. Limnell, J. Hirvonen and V. P. Lehto, **Enhanced in vitro permeation of furosemide loaded into thermally carbonized mesoporous silicon (TCPSi) microparticles** *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, **66**, 348-356.
201. J. Salonen, V. P. Lehto, M. Bjorkqvist, E. Laine and L. Niinisto, **Studies of thermally-carbonize porous silicon surfaces** *Physica Status Solidi a-Applied Research*, 2000, **182**, 123-126.
202. J. Salonen, E. Laine and L. Niinisto, **Thermal carbonization of porous silicon surface by acetylene** *J Appl Phys*, 2002, **91**, 456-461.
203. M. Bjorkqvist, J. Salonen, E. Laine and L. Niinisto, **Comparison of stabilizing treatments on porous silicon for sensor applications** *Physica Status Solidi a-Applied Research*, 2003, **197**, 374-377.
204. J. Salonen, A. M. Kaukonen, J. Hirvonen and V. P. Lehto, **Mesoporous silicon in drug delivery applications** *J Pharm Sci*, 2008, **97**, 632-653.
205. J. Salonen, L. Laitinen, A. M. Kaukonen, J. Tuura, M. Bjorkqvist, T. Heikkila, K. Vaha-Heikkila, J. Hirvonen and V. P. Lehto, **Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: Loading and release of five model drugs** *J Control Release*, 2005, **108**, 362-374.
206. V. P. Lehto, K. Vaha-Heikkila, J. Paski and J. Salonen, **Use of thermoanalytical methods in quantification of drug load in mesoporous silicon microparticles** *J Therm Anal Calorim*, 2005, **80**, 393-397.
207. J. Salonen, J. Paski, K. Vaha-Heikkila, T. Heikkila, M. Bjorkqvist and V. P. Lehto, **Determination of drug load in porous silicon microparticles by calorimetry** *Phys Status Solidi A*, 2005, **202**, 1629-1633.
208. T. Limnell, J. Riikonen, J. Salonen, A. M. Kaukonen, L. Laitinen, J. Hirvonen and V. P. Lehto, **The effect of different surface treatment and pore size on the dissolution of ibuprofen from mesoporous silicon particles** *Eur J Pharm Sci*, 2006, **28**, S34-S34.
209. K. P. S. Dancil, D. P. Greiner and M. J. Sailor, **A porous silicon optical biosensor: Detection of reversible binding of IgG to a protein A-modified surface** *J Am Chem Soc*, 1999, **121**, 7925-7930.
210. B. Xia, S. J. Xiao, D. J. Guo, J. Wang, M. Chao, H. B. Liu, J. Pei, Y. Q. Chen, Y. C. Tang and J. N. Liu, **Biofunctionalisation of porous silicon (PS) surfaces by using homobifunctional cross-linkers** *J Mater Chem*, 2006, **16**, 570-578.
211. C.-C. W. Emilie Secret, Arnaud Chaix, Anne Galarneau, Philippe Gonzalez, Didier Cot, Michael J. Sailor, Jacques Jestin, Jean-Marc Zanotti, Frederique Cunin, and Benoit Coasne, **Control of the Pore Texture in Nanoporous Silicon via Chemical Dissolution** *Langmuir*, 2015.

212. C. Pacholski, M. Sartor, M. J. Sailor, F. Cunin and G. M. Miskelly, **Biosensing using porous silicon double-layer interferometers: Reflective interferometric Fourier transform spectroscopy** *J Am Chem Soc*, 2005, **127**, 11636-11645.
213. T. F. Harper and M. J. Sailor, **Using porous silicon as a hydrogenating agent: Derivatization of the surface of luminescent nanocrystalline silicon with benzoquinone** *J Am Chem Soc*, 1997, **119**, 6943-6944.
214. G. Mattei, E. V. Alieva, J. E. Petrov and V. A. Yakovlev, **Quick oxidation of porous silicon in presence of pyridine vapor** *Physica Status Solidi a-Applied Research*, 2000, **182**, 139-143.
215. J. H. Song and M. J. Sailor, **Dimethyl sulfoxide as a mild oxidizing agent for porous silicon and its effect on photoluminescence** *Inorg Chem*, 1998, **37**, 3355-3360.
216. B. Salhi, B. Gelloz, N. Koshida, G. Patriarche and R. Boukherroub, **Synthesis and photoluminescence properties of silicon nanowires treated by high-pressure water vapor annealing** *Phys Status Solidi A*, 2007, **204**, 1302-1306.
217. K. W. Kolasinski, **Silicon nanostructures from electroless electrochemical etching** *Curr Opin Solid St M*, 2005, **9**, 73-83.
218. S. E. Letant, S. Content, T. T. Tan, F. Zenhausern and M. J. Sailor, **Integration of porous silicon chips in an electronic artificial nose** *Sensor Actuat B-Chem*, 2000, **69**, 193-198.
219. M. J. Sailor and J. R. Link, **"Smart dust'': nanostructured devices in a grain of sand** *Chem Commun*, 2005, 1375-1383.
220. A. Foucaran, F. PascalDelannoy, A. Giani, A. Sackda, P. Combette and A. Boyer, **Porous silicon layers used for gas sensor applications** *Thin Solid Films*, 1997, **297**, 317-320.
221. S. Chan, P. M. Fauchet, Y. Li, L. J. Rothberg and B. L. Miller, **Porous silicon microcavities for biosensing applications** *Physica Status Solidi a-Applied Research*, 2000, **182**, 541-546.
222. M. Thust, M. J. Schoning, S. Frohnhoff, R. ArensFischer, P. Kordos and H. Luth, **Porous silicon as a substrate material for potentiometric biosensors** *Meas Sci Technol*, 1996, **7**, 26-29.
223. R. T. Collins, P. M. Fauchet and M. A. Tischler, **Porous silicon: From luminescence to LEDs** *Phys Today*, 1997, **50**, 24-31.
224. S. Lazarouk, P. Jaguiro, S. Katsouba, G. Masini, S. LaMonica, G. Maiello and A. Ferrari, **Stable electroluminescence from reverse biased n-type porous silicon-aluminum Schottky junction device** *Appl Phys Lett*, 1996, **68**, 2108-2110.
225. P. Steiner, F. Kozlowski and W. Lang, **Light-Emitting Porous Silicon Diode with an Increased Electroluminescence Quantum Efficiency** *Appl Phys Lett*, 1993, **62**, 2700-2702.
226. A. Richter, P. Steiner, F. Kozlowski and W. Lang, **Current-Induced Light-Emission from a Porous Silicon Device** *Ieee Electr Device L*, 1991, **12**, 691-692.
227. J. L. Coffer, M. A. Whitehead, D. K. Nagesha, P. Mukherjee, G. Akkaraju, M. Totolici, R. S. Saffie and L. T. Canham, **Porous silicon-based scaffolds for tissue engineering and other biomedical applications** *Phys Status Solidi A*, 2005, **202**, 1451-1455.
228. R. C. Anderson, R. S. Muller and C. W. Tobias, **Investigations of Porous Silicon for Vapor Sensing** *Sensor Actuat a-Phys*, 1990, **23**, 835-839.
229. M. Rocchia, E. Garrone, F. Geobaldo, L. Boarino and M. J. Sailor, **Sensing CO2 in a chemically modified porous silicon film** *Phys Status Solidi A*, 2003, **197**, 365-369.
230. M. J. Sailor, W. C. Trogler, S. Content, S. Letant, H. Sohn, Y. Fainman and P. Shames, **Detection of DNT, TNT, HF and nerve agents using photoluminescence**

**and interferometry from a porous silicon chip.** *Unattended Ground Sensor Technologies and Applications Ii*, 2000, **4040**, 95-104.

231. J. M. Lauerhaas, G. M. Credo, J. L. Heinrich and M. J. Sailor, **Reversible Luminescence Quenching of Porous Si by Solvents** *J Am Chem Soc*, 1992, **114**, 1911-1912.
232. P. A. Snow, E. K. Squire, P. S. J. Russell and L. T. Canham, **Vapor sensing using the optical properties of porous silicon Bragg mirrors** *J Appl Phys*, 1999, **86**, 1781-1784.
233. V. S. Y. Lin, K. Motesharei, K. P. S. Dancil, M. J. Sailor and M. R. Ghadiri, **A porous silicon-based optical interferometric biosensor** *Science*, 1997, **278**, 840-843.
234. M. M. Orosco, C. Pacholski, G. M. Miskelly and M. J. Sailor, **Protein-coated porous-silicon photonic crystals for amplified optical detection of protease activity** *Adv Mater*, 2006, **18**, 1393-+.
235. D. van Noort, S. Welin-Klintstrom, H. Arwin, S. Zangooie, I. Lundstrom and C. F. Mandenius, **Monitoring specific interaction of low molecular weight biomolecules on oxidized porous silicon using ellipsometry** *Biosens Bioelectron*, 1998, **13**, 439-449.
236. S. Chan, S. R. Horner, P. M. Fauchet and B. L. Miller, **Identification of gram negative bacteria using nanoscale silicon microcavities** *J Am Chem Soc*, 2001, **123**, 11797-11798.
237. C. Pacholski, C. Yu, G. M. Miskelly, D. Godin and M. J. Sailor, **Reflective interferometric Fourier transform spectroscopy: A self-compensating label-free immunosensor using double-layers of porous SiO2** *J Am Chem Soc*, 2006, **128**, 4250-4252.
238. C. Pacholski and M. J. Sailor, **Sensing with porous silicon double layers: A general approach for background suppression** *Physica Status Solidi C - Current Topics in Solid State Physics, Vol 4 No 6*, 2007, **4**, 2088-2092.
239. S. D. Alvarez, A. M. Derfus, M. P. Schwartz, S. N. Bhatia and M. J. Sailor, **The compatibility of hepatocytes with chemically modified porous silicon with reference to in vitro biosensors** *Biomaterials*, 2009, **30**, 26-34.
240. S. P. Low, K. A. Williams, L. T. Canham and N. H. Voelcker, **Evaluation of mammalian cell adhesion on surface-modified porous silicon** *Biomaterials*, 2006, **27**, 4538-4546.
241. E. J. Anglin, M. P. Schwartz, V. P. Ng, L. A. Perelman and M. J. Sailor, **Engineering the chemistry and nanostructure of porous Silicon Fabry-Perot films for loading and release of a steroid** *Langmuir*, 2004, **20**, 11264-11269.
242. J. S. Andrew, E. J. Anglin, E. C. Wu, M. Y. Chen, L. Y. Cheng, W. R. Freeman and M. J. Sailor, **Sustained Release of a Monoclonal Antibody from Electrochemically Prepared Mesoporous Silicon Oxide** *Adv Funct Mater*, 2010, **20**, 4168-4174.
243. L. Vaccari, D. Canton, N. Zaffaroni, R. Villa, M. Tormen and E. di Fabrizio, **Porous silicon as drug carrier for controlled delivery of doxorubicin anticancer agent** *Microelectron Eng*, 2006, **83**, 1598-1601.
244. A. B. Foraker, R. J. Walczak, M. H. Cohen, T. A. Boiarski, C. F. Grove and P. W. Swaan, **Microfabricated porous silicon particles enhance paracellular delivery of insulin across intestinal Caco-2 cell monolayers** *Pharm Res-Dordr*, 2003, **20**, 110-116.
245. T. Tanaka, L. S. Mangala, P. E. Vivas-Mejia, R. Nieves-Alicea, A. P. Mann, E. Mora, H. D. Han, M. M. K. Shahzad, X. W. Liu, R. Bhavane, J. H. Gu, J. R. Fakhoury, C. Chiappini, C. H. Lu, K. Matsuo, B. Godin, R. L. Stone, A. M. Nick, G. Lopez-Berestein, A. K. Sood and M. Ferrari, **Sustained Small Interfering RNA Delivery by Mesoporous Silicon Particles** *Cancer Research*, 2010, **70**, 3687-3696.

246. L. Cheng, E. Anglin, F. Cunin, D. Kim, M. J. Sailor, I. Falkenstein, A. Tammewar and W. R. Freeman, **Intravitreal properties of porous silicon photonic crystals: A potential self-reporting intraocular drugdelivery vehicle** *Brit J Ophthalmol*, 2008, **92**, 705-711.
247. W. R. Freeman and I. Falkenstein, **Avastin and new treatments for AMD: Where are we?** *Retina-J Ret Vit Dis*, 2006, **26**, 853-858.
248. J. C. Thomas, C. Pacholski and M. J. Sailor, **Delivery of nanogram payloads using magnetic porous silicon microcarriers** *Lab Chip*, 2006, **6**, 782-787.
249. J. R. Dorvee, A. M. Derfus, S. N. Bhatia and M. J. Sailor, **Manipulation of liquid droplets using amphiphilic, magnetic one-dimensional photonic crystal chaperones** *Nat Mater*, 2004, **3**, 896-899.
250. A. S. W. Goh, A. Y. F. Chung, R. H. G. Lo, T. N. Lau, S. W. K. Yu, M. Chng, S. Satchithanantham, S. L. E. Loong, D. C. E. Ng, B. C. Lim, S. Connor and P. K. H. Chow, **A novel approach to brachytherapy in hepatocellular carcinoma using a phosphorous(32) (P-32) brachytherapy delivery device - A first-in-man study** *Int J Radiat Oncol*, 2007, **67**, 786-792.
251. L. M. Bimbo, M. Sarparanta, H. A. Santos, A. J. Airaksinen, E. Makila, T. Laaksonen, L. Peltonen, V. P. Lehto, J. Hirvonen and J. Salonen, **Biocompatibility of Thermally Hydrocarbonized Porous Silicon Nanoparticles and their Biodistribution in Rats** *Acs Nano*, 2010, **4**, 3023-3032.
252. M. Xue, X. Zhong, Z. Shaposhnik, Y. Q. Qu, F. Tamanoi, X. F. Duan and J. I. Zink, **pH-Operated Mechanized Porous Silicon Nanoparticles** *J Am Chem Soc*, 2011, **133**, 8798-8801.
253. J. Croissant and J. I. Zink, **Nanovalve-Controlled Cargo Release Activated by Plasmonic Heating** *J Am Chem Soc*, 2012, **134**, 7628-7631.
254. D. P. Ferris, Y. L. Zhao, N. M. Khashab, H. A. Khatib, J. F. Stoddart and J. I. Zink, **Light-Operated Mechanized Nanoparticles** *J Am Chem Soc*, 2009, **131**, 1686-+.
255. L. Xiao, L. Gu, S. B. Howell and M. J. Sailor, **Porous Silicon Nanoparticle Photosensitizers for Singlet Oxygen and Their Phototoxicity against Cancer Cells** *Acs Nano*, 2011, **5**, 3651-3659.
256. C. Hong, J. Lee, H. Zheng, S. S. Hong and C. Lee, **Porous silicon nanoparticles for cancer photothermotherapy** *Nanoscale Res Lett*, 2011, **6**.
257. L. Gu, L. E. Ruff, Z. T. Qin, M. Corr, S. M. Hedrick and M. J. Sailor, **Multivalent Porous Silicon Nanoparticles Enhance the Immune Activation Potency of Agonistic CD40 Antibody** *Adv Mater*, 2012, **24**, 3981-3987.
258. F. De Angelis, A. Pujia, C. Falcone, E. Iaccino, C. Palmieri, C. Liberale, F. Mecarini, P. Candeloro, L. Luberto, A. de Laurentiis, G. Das, G. Scala and E. Di Fabrizio, **Water soluble nanoporous nanoparticle for in vivo targeted drug delivery and controlled release in B cells tumor context** *Nanoscale*, 2010, **2**, 2230-2236.
259. Broekhof.Jc and J. H. Deboer, **Studies on Pore Systems in Catalysts .13. Pore Distributions from Desorption Branch of a Nitrogen Sorption Isotherm in Case of Cylindrical Pores .B. Applications** *J Catal*, 1968, **10**, 377-&.
260. S. Brunauer, P. H. Emmett and E. Teller, **Adsorption of gases in multimolecular layers** *J Am Chem Soc*, 1938, **60**, 309-319.
261. A. G. Cullis, L. T. Canham and P. D. J. Calcott, **The structural and luminescence properties of porous silicon** *J Appl Phys*, 1997, **82**, 909-965.
262. A. Sa'ar, **Photoluminescence from silicon nanostructures: The mutual role of quantum confinement and surface chemistry** *J Nanophotonics*, 2009, **3**.
263. S. Letant and J. C. Vial, **Energy transfer in dye impregnated porous silicon** *J Appl Phys*, 1997, **82**, 397-401.

264. O. Hocine, M. Gary-Bobo, D. Brevet, M. Maynadier, S. Fontanel, L. Raehm, S. Richeter, B. Loock, P. Couleaud, C. Frochot, C. Charnay, G. Derrien, M. Smaihi, A. Sahmoune, A. Morere, P. Maillard, M. Garcia and J. O. Durand, **Silicalites and Mesoporous Silica Nanoparticles for photodynamic therapy** *Int J Pharmaceut*, 2010, **402**, 221-230.
265. O. Sperling, A. Fuchs and T. K. Lindhorst, **Evaluation of the carbohydrate recognition domain of the bacterial adhesin FimH: design, synthesis and binding properties of mannoside ligands** *Org Biomol Chem*, 2006, **4**, 3913-3922.
266. M. Monsigny, C. Petit and A. C. Roche, **Colorimetric Determination of Neutral Sugars by a Resorcinol Sulfuric-Acid Micromethod** *Anal Biochem*, 1988, **175**, 525-530.
267. A. Chiarodo, **National-Cancer-Institute Round-Table on Prostate-Cancer - Future-Research Directions** *Cancer Research*, 1991, **51**, 2498-2505.
268. D. F. Penson, M. Rossignol, A. O. Sartor, P. T. Scardino and L. L. Abenhaim, **Prostate Cancer: Epidemiology and Health-related Quality of Life** *Urology*, 2008, **72**, 3-11.
269. C. L. Esposito, L. Cerchia, S. Catuogno, G. De Vita, J. P. Dassie, G. Santamaria, P. Swiderski, G. Condorelli, P. H. Giangrande and V. de Franciscis, **Multifunctional Aptamer-miRNA Conjugates for Targeted Cancer Therapy** *Mol Ther*, 2014, **22**, 1151-1163.
270. O. C. Farokhzad, S. Y. Jon, A. Khademhosseini, T. N. T. Tran, D. A. LaVan and R. Langer, **Nanopartide-aptamer bioconjugates: A new approach for targeting prostate cancer cells** *Cancer Research*, 2004, **64**, 7668-7672.
271. S. Dhar, F. X. Gu, R. Langer, O. C. Farokhzad and S. J. Lippard, **Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles** *P Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**, 17356-17361.
272. N. H. Bander, D. M. Nanus, M. I. Milowsky, L. Kostakoglu, S. Vallabahajosula and S. J. Goldsmith, **Targeted systemic therapy of prostate cancer with a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen** *Semin Oncol*, 2003, **30**, 667-677.
273. M. Gary-Bobo, P. Nirde, A. Jeanjean, A. Morere and M. Garcia, **Mannose 6-phosphate receptor targeting and its applications in human diseases** *Curr Med Chem*, 2007, **14**, 2945-2953.
274. C. Girardot, G. Lemercier, J. C. Mulatier, J. Chauvin, P. L. Baldeck and C. Andraud, **Novel ruthenium(II) and zinc(II) complexes for two-photon absorption related applications** *Dalton T*, 2007, 3421-3426.
275. M. Four, D. Riehl, O. Mongin, M. Blanchard-Desce, L. M. Lawson-Daku, J. Moreau, J. Chauvin, J. A. Delaire and G. Lemercier, **A novel ruthenium(II) complex for two-photon absorption-based optical power limiting in the near-IR range** *Phys Chem Chem Phys*, 2011, **13**, 17304-17312.
276. W. C. Xu, J. R. Zuo, L. L. Wang, L. N. A. Ji and H. Chao, **Dinuclear ruthenium(II) polypyridyl complexes as single and two-photon luminescence cellular imaging probes** *Chem Commun*, 2014, **50**, 2123-2125.
277. C. Moucheron, **From cisplatin to photoreactive Ru complexes: targeting DNA for biomedical applications** *New J Chem*, 2009, **33**, 235-245.
278. L. Liu, H. Zhang, X. G. Meng, J. Yin, D. F. Li and C. L. Liu, **Dinuclear metal(II) complexes of polybenzimidazole ligands as carriers for DNA delivery** *Biomaterials*, 2010, **31**, 1380-1391.
279. M. R. Berger, F. T. Garzon, B. K. Keppler and D. Schmahl, **Efficacy of New Ruthenium Complexes against Chemically-Induced Autochthonous Colorectal-Carcinoma in Rats** *Anticancer Res*, 1989, **9**, 761-765.

280. M. M. M. a. M. M. G. M. A. K. Abdelhalim, **physical properties of different gold nanoparticles: Ultraviolet-visible and fluorescence measurements** *Nanomedicine and Nanotchnology*, 2012, **3**.
281. C. F. Jiang, T. T. Zhao, P. Y. Yuan, N. Y. Gao, Y. L. Pan, Z. P. Guan, N. Zhou and Q. H. Xu, **Two-Photon Induced Photoluminescence and Singlet Oxygen Generation from Aggregated Gold Nanoparticles** *Acs Appl Mater Inter*, 2013, **5**, 4972-4977.
282. M. A. Wolfert and L. W. Seymour, **Chloroquine and amphipathic peptide helices show synergistic transfection in vitro** *Gene Ther*, 1998, **5**, 409-414.
283. L. C. Gomes-da-Silva, N. A. Fonseca, V. Moura, M. C. P. de Lima, S. Simoes and J. N. Moreira, **Lipid-Based Nanoparticles for siRNA Delivery in Cancer Therapy: Paradigms and Challenges** *Accounts Chem Res*, 2012, **45**, 1163-1171.
284. S. C. Semple, A. Akinc, J. X. Chen, A. P. Sandhu, B. L. Mui, C. K. Cho, D. W. Y. Sah, D. Stebbing, E. J. Crosley, E. Yaworski, I. M. Hafez, J. R. Dorkin, J. Qin, K. Lam, K. G. Rajeev, K. F. Wong, L. B. Jeffs, L. Nechev, M. L. Eisenhardt, M. Jayaraman, M. Kazem, M. A. Maier, M. Srinivasulu, M. J. Weinstein, Q. M. Chen, R. Alvarez, S. A. Barros, S. De, S. K. Klimuk, T. Borland, V. Kosovrasti, W. L. Cantley, Y. K. Tam, M. Manoharan, M. A. Ciufolini, M. A. Tracy, A. de Fougerolles, I. MacLachlan, P. R. Cullis, T. D. Madden and M. J. Hope, **Rational design of cationic lipids for siRNA delivery** *Nat Biotechnol*, 2010, **28**, 172-U118.
285. D. J. Gary, N. Puri and Y. Y. Won, **Polymer-based siRNA delivery: Perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery** *J Control Release*, 2007, **121**, 64-73.
286. T. Endoh and T. Ohtsuki, **Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape** *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, **61**, 704-709.
287. A. D. Keefe, S. Pai and A. Ellington, **Aptamers as therapeutics** *Nat Rev Drug Discov*, 2010, **9**, 537-550.
288. S. T. Kim, A. Chompoosor, Y. C. Yeh, S. S. Agasti, D. J. Solfiell and V. M. Rotello, **Dendronized Gold Nanoparticles for siRNA Delivery** *Small*, 2012, **8**, 3253-3256.
289. A. Estevez-Torres, C. Crozatier, A. Diguet, T. Hara, H. Saito, K. Yoshikawa and D. Baigl, **Sequence-independent and reversible photocontrol of transcription/expression systems using a photosensitive nucleic acid binder** *P Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**, 12219-12223.
290. G. Dellaporta and T. A. Dragani, **Lack of Carcinogenicity in Mice of 4,4'-Diaminobenzanilide and 4,4'-Diaminoazobenzene, 2 Intermediates Used in the Manufacture of Azo Dyes** *Cancer Lett*, 1981, **14**, 329-336.
291. M. K. A. Rahim, T. Kamei and N. Tamaoki, **Dynamic photo-control of kinesin on a photoisomerizable monolayer - hydrolysis rate of ATP and motility of microtubules depending on the terminal group** *Org Biomol Chem*, 2012, **10**, 3321-3331.
292. J. Dong and J. I. Zink, **Light or Heat? The Origin of Cargo Release from Nanoimpeller Particles Containing Upconversion Nanocrystals under IR Irradiation** *Small*, 2015.