POLYPUBLIE
Polytechnique Montréal

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
UNIVERSITÉ D'INGÉNIERIE

Titre: Title:	Perméabilisation de membranes cellulaires à l'aide d'un laser nanoseconde amplifié par nanoparticules plasmoniques
Auteur: Author:	Bastien St-Louis Lalonde
Date:	2012
Type:	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
Référence: Citation:	St-Louis Lalonde, B. (2012). Perméabilisation de membranes cellulaires à l'aide d'un laser nanoseconde amplifié par nanoparticules plasmoniques [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/1026/

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: PolyPublie URL:	https://publications.polymtl.ca/1026/
Directeurs de recherche: Advisors:	Michel Meunier
Programme: Program:	Génie physique

Ce fichier a été téléchargé à partir de PolyPublie, le dépôt institutionnel de Polytechnique Montréal
This file has been downloaded from PolyPublie, the institutional repository of Polytechnique Montréal

https://publications.polymtl.ca

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

PERMÉABILISATION DE MEMBRANES CELLULAIRES À L'AIDE D'UN LASER NANOSECONDE AMPLIFIÉ PAR NANOPARTICULES PLASMONIQUES

BASTIEN ST-LOUIS LALONDE
DÉPARTEMENT DE GÉNIE PHYSIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE PHYSIQUE)
DÉCEMBRE 2012

© Bastien St-Louis Lalonde, 2012.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

PERMÉABILISATION DE MEMBRANES CELLULAIRES À L'AIDE D'UN LASER NANOSECONDE AMPLIFIÉ PAR NANOPARTICULES PLASMONIQUES

présenté par : ST-LOUIS LALONDE Bastien
en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées
a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. FRANCOEUR Sébastien, Ph.D., président
M. MEUNIER Michel, Ph.D., membre et directeur de recherche
M. COSTANTINO Santiago, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

J'aimerais en premier lieu remercier mon directeur de recherche, Michel Meunier, grâce à qui ce projet fut réalisable. Ses précieux conseils dans toutes les sphères de la recherche, son appui moral et financier ainsi que son excellente équipe de recherche m'ont permis de mener à bien cette maîtrise.

Un gros merci à Judith Baumgart qui m'a transmis plusieurs de ses connaissances dans le domaine de la biologie, m'a patiemment guidé au début de mon projet de recherche et m'a apporté une aide continuelle. Je remercie Paul Boyer et David Rioux pour leur aide dans l'élaboration de mes montages et sur le fonctionnement des lasers, Yves Drolet qui m'a apporté un soutient technique constant et qui m'a enjoué au travers de multiples blagues, Étienne Boulais pour l'excellente ambiance dans le bureau et pour ses précisions sur les phenomènes d'interractions laser-NPs. J'ai aussi beaucoup apprécié les conseils et la participation de nos collaborateurs de l'Université McGill, Laure Humbert et Jean-Jacques Lebrun. Je remercie aussi Mathieu Maisonneuve, André-Pierre Blanchard-Dionne, Vincent Latendresse et Nancy Tawil (les plasmons) pour les bons moments passés en leur compagnie.

Je tiens ensuite à remercier spécialement mes parents, Denis et Dominique, qui m'ont fièrement supporté tout au long de mes études et qui ont toujours été présents pour moi. Merci à Veronique, ma compagne, d'avoir partagé mes plaintes ou mes excitations par rapport à mes résultats et qui m'a agréablement tenu compagnie durant ces deux années.

Finalement je veux remercier mes amis qui m'ont encouragé et écouté, spécialement Alexandre Kheir qui a suivi l'évolution de mon projet et avec qui j'ai eu d'intéressantes discussions.

RÉSUMÉ

La membrane plasmique des cellules eucaryotes assure une perméabilité sélective entre le cytoplasme et le milieu extérieur. Elle régule l'entrée et la sortie des ions (O_2, N_2, K, etc..) et des molécules (eau, éthanol, etc..) nécessaires à son bon fonctionnement par des mécanismes de diffusion ou de transport actif. Dans des domaines tels que la biologie moléculaire ou le développement de nouveaux traitements, il est parfois souhaitable de contourner cette perméabilité sélective afin d'insérer à l'intérieur des cellules des molécules qui y sont normalement imperméables. Ces molécules peuvent être des plasmides d'ADN, des ARN, ou différents médicaments. Afin de surmonter cette barrière biologique, nous proposons l'optoporation à l'aide d'un laser amplifié par nanostructures plasmoniques. Cette technique non invasive permet d'augmenter la perméabilité membranaire d'un grand volume de cellules en peu de temps.

L'optoporation à l'aide d'un laser amplifié par nanostructures plasmoniques correspond à une irradiation par laser pulsé sur des cellules préalablement incubées avec des nanoparticules d'or (AuNPs). L'interaction laser-AuNP crée une bulle de cavitation qui permet d'augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire en perturbant l'organisation de ses éléments bilipidiques. Des molécules en suspension dans le milieu externe peuvent ensuite pénétrer à l'intérieur de la cellule par diffusion. Sous les conditions propices, l'intégrité de la membrane sera rapidement retrouvée et la cellule sera peu affectée.

La faisabilité de cette technique de perméabilisation a été testée avec un laser à impulsions nanosecondes opérant à 532 nm et à 1064 nm. La membrane plasmique de fibroblastes cancéreux humains (mélanômes wm278) a été perforée avec succès tout en conservant une excellente viabilité cellulaire. Le fluorophore Lucifer Yellow (LY) a été incorporé à l'intérieur de 30% des cellules irradiées. La viabilité 2 h après la traitement a été évaluée par exclusion d'iodure de propidium (IP) tandis que la vitalité des cellules à long terme a été évaluée à l'aide de tests MTT. Sous les conditions optimales, à 532 nm, la viabilité est de 84% après 2h (exclusion IP) et la vitalité passe de 64% (2h) à 88% après 72 h (MTT). À 1064 nm, la viabilité atteint 85% et la vitalité se situe entre 81% et 99% entre 2 et 72 h. Les dimensions des AuNPs après irradiation ont également été examinées afin de déterminer si elles avaient subi des transformations durant le traitement. Pour ce faire, des mesures spectroscopiques ainsi que des images au MEB ont été réalisées. Une réduction de taille est observée après quelque secondes d'irradiation mais les quelques impulsions livrées lors du traitement ne sont pas suffisants pour transformer significativement les NPs.

ABSTRACT

The plasmic membrane of eukaryot cells provides a selective permeability between the cytoplasm and the external environment. It regulates the passage of ions (O_2, N_2, K, etc...) and molecules (H_2O, C_2H_6O, etc...) by mechanisms like passive diffusion and active transport. In various fields like molecular biology or drug development, it is sometimes needed to bypass this selective permeability to introduce external molecules that are normally impermeable to cell membrane. Examples of external molecules may be DNA plasmid, RNA segment or drugs. We propose a method based on laser amplification by plasmonic nanoparticles to overcome this biological barrier. This non invasive method increases the membrane permeability of a large number of cells in a short time.

Optoporation by laser amplified with plasmonic nanoparticles consists of pulsed laser irradiation on cells that have been previously incubated with gold nanoparticles (AuNPs). The laser-AuNPs interactions will create a cavitation bubble which in turn will decrease the membrane permeability by disrupting the bilipid layer arrangement. Molecules in the external medium may then penetrate inside the cells and under the right experimental conditions, the cells will rapidly reseal their membrane and continue living without nefast effects.

The feasibility of high throughput optical perforation amplified by plasmonic nanoparticles have been tested with a nanosecond pulsed laser working at 532 nm and 1064 nm. The plasma membrane of cancerous human fibroblast (melanoma wm278) have been successfully perforated while keeping an excellent viability rate. Up to 30% of cells are perforated in which the Lucifer Yellow fluorophore have been incorporated. The viability 2 h after the treatment was evaluated by PI exclusion and the long term vitality was tested by MTT essay. Under optimal conditions at 532 nm, the 2 h viability is 84% and the vitality start at 64% for 2h and reaches 88% after 72 h. With 1064 nm pusles, the 2 h viability is situated at 85% and vitality goes from 81% at 2h to 99% 72 h after experiment. The AuNPs size were examined to determine if any transformation occurred upon irradiation. This was verified by spectroscopic measurements as well as SEM images. Gold nanoparticles undergo rapid transformation upon irradiation but the 5 pulses delivered during the treatment prove to be insufficient to damage the nanoparticles.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS iii

RÉSUMÉ iv

ABSTRACT v

TABLE DES MATIÈRES vi

LISTE DES TABLEAUX ix

LISTE DES FIGURES x

LISTE DES ANNEXES xiii

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS xiv

CHAPITRE 1 Introduction 1

CHAPITRE 2 Revue de littérature sur les méthodes de perméabilisation de membrane cellulaire 3

2.1 Revue de la cellule avec emphase sur la membrane plasmique 3

2.2 Technique de perméabilisation et/ou transfection 7

2.2.1 Méthode biologique : Vecteur viral 7

2.2.2 Méthode chimique : Lipides et polymères cationiques 8

2.2.3 Méthode physique 9

2.3 Mécanisme d'interaction laser-AuNPs 16

CHAPITRE 3 Méthodologie expérimentale 18

3.1 Préparation des spécimens biologiques 18

3.1.1 Pétris pour irradiation 18

3.1.2 Essais MTT 19

3.1.3 MEB 19

3.2 Traitement laser 20

3.2.1 Caractérisation laser 20

3.2.2 Irradiation des pétris et mesures spectrométriques 22

3.3 Analyse des résultats 24

3.3.1 Perforation et viabilité . . . 24
3.3.2 Spectrométrie . . . 27
3.3.3 MTT . . . 30
3.3.4 MEB . . . 30

CHAPITRE 4 Article : Visible and Near infrared resonance plasmonic enhanced nanosecond laser optoporation of cancer cells . . . 32
4.1 Introduction . . . 32
4.2 Materials and methods . . . 34
4.2.1 Laser set up . . . 34
4.2.2 Cell preparation . . . 35
4.2.3 Fluorescence microscopy . . . 35
4.2.4 MTT assay . . . 35
4.2.5 Analysis . . . 36
4.2.6 SEM . . . 36
4.3 Results . . . 36
4.3.1 Perforation and viability . . . 36
4.3.2 MTT assays . . . 38
4.3.3 Nanoparticles transformation . . . 39
4.4 Discussion . . . 41
4.4.1 Effect of pulse width: Femtosecond vs nanosecond pulses . . . 41
4.4.2 Effect of wavelength: On (532nm) vs off (1064nm) resonance in the nanosecond regime . . . 42
4.5 Conclusion . . . 42

CHAPITRE 5 Discussion Générale . . . 44
5.1 Viabilité . . . 44
5.2 Perforation . . . 47
5.3 Nanoparticules . . . 49
5.4 Avantages de la technique laser . . . 50
5.5 Application *in vivo* . . . 51

CHAPITRE 6 CONCLUSION . . . 53
6.1 Synthèse des travaux . . . 53
6.2 Améliorations possible et directions futures . . . 53

RÉFÉRENCES . . . 55

ANNEXES 60

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Résultats de Yao *et al.* (2009) pour 5 impulsion de 90 mJ/cm^2 sur des cellules chargées avec des AuNPs de 15 et 30 nm de diamètre 15
Tableau 3.1 Absorption et émission des colorants utilisés. 25
Tableau 3.2 Relation entre la taille de AuNPs et la position du pic de leur spectre d'absorption. 28

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Vue d'ensemble de la cellule eukaryote où l'on peut voir la membrane plasmique, le noyau et les organites (oeuvre créé par Messer Woland, reproduction autorisée). 3

Figure 2.2 Assemblage possible des phospholipides (oeuvre créé par Mariana Ruiz Villarreal, reproduction autorisée). 5

Figure 2.3 Schéma des étapes du processus d'endocytose d'une nanoparticule. 1) La particule entre en contact avec la membrane cellulaire, 2) Invagination de la particule, 3) Le vésicule formé se referme complètement, 4) Le vésicule se détache et se déplace vers l'intérieur de la cellule où il sera dégradé. 6

Figure 2.4 Schéma des étapes du procédé d'électroporation. 1) Les cellules sont dans une suspension contenant les molécules à introduire, 2) des impulsions électriques sont appliquées, 3) les molécules externes entrent par diffusion dans les cellules perforées. 10

Figure 2.5 Schéma du montage pour appliquer des ondes créées par laser sur des cellules en pétri. tiré de Obara *et al.* (2004) 11

Figure 2.6 Schéma du montage pour l'optoporation laser. Un objectif focalise le faisceau en un point de quelque microns de diamètre pour permettre la perforation de cellule individuellement. 12

Figure 2.7 Schéma du mécanisme de perméabilisation avec particules absorbantes. (1) Des nanoparticules d'or sont déposées sur la surface membranaire, (2) les molécules exogènes sont ajoutées à la solution avant l'irradiation, (3) pendant l'irradiation laser, des nano bulles sont créées autour des nanoparticules ce qui perfore ou ouvre la membrane. (4) Les molécules peuvent pénétrer à l'intérieur de la cellule, aidées par le jet entrant créé lors de l'effondrement de la bulle. 14

Figure 3.1 Schéma du montage laser utilisé pour l'irradiation des cellules 21

Figure 3.2 Faisceau laser à 532 nm (a, b) et à 1064 nm (c, d) pour 2 différentes grosseurs (le zoom a été ajusté). Le profil d'intensité est distribué de façon plus égale à 1064 nm. 22

Figure 3.3 Image des pétris matek utilisés pour l'irradiation. Les trois zones sont dessinées sous le pétri et l'irradiation se fait à l'intérieur de celles-ci. Les différents paramètres reliées à l'irradiation sont aussi représentés. . 23

Figure 3.4 Schéma du montage du spectromètre qui permet de prendre des acquisitions lors de l'irradiation. 24
Figure 3.5 Exemple des différents filtres utilisés pour l'analyse des résultats. En (a) l'image en microscoIPe de contraste de phase, (b) canal filtrant pour le DAPI, l'ADN de toute les cellules est visible dans leur noyau, (c) canal filtrant le LY, on peut y voir toute les cellules qui ont été perforées. (les couleurs sont ajoutées manuellement puisque la caméra CCD du microscope n'enregistre que des mesures d'intensité par IPxel.) 25
Figure 3.6 Exemple du changement de confluence suite à une irradiation laser. (a) et (b) proviennent d'une image contrôle tandis que (c) et (d) proviennent d'une image à l'intérieur d'une zone irradiée à 70 mJ/cm^2 par des impulsion de 532 nm. 26
Figure 3.7 Spectre d'absorption avant (a) et après (b) irradiation de 800 mJ/cm^2 à 1064nm avec leur ajustement de courbe gaussienne. Le décalage vers le bleu est mesuré entre les deux centres des pics, ici un décalage de 43.8 nm a été mesuré. 28
Figure 3.8 Position du pic d'absorption d'une solution de AuNPs de 100nm pour 30 secondes d'irradiation à 3 fluences différentes (impulsions à 1064nm). 29
Figure 3.9 Position du pic d'absorption d'une solution de AuNPs de 100nm pour 30 secondes d'irradiation au fluence de 10, 50 et 100 mJ/cm^2 (impulsions à 532 nm). 30
Figure 4.1 Permeabilisation rate measured by LY introduction in melanoma cells and 2h viability (by PI exclusion) in the operating range of fluence for 532 nm and 1064 nm wavelenghts. (a) and (b) are cells irradiated without AuNPs while (c) and (d) represent cells with 100 nm AuNPs. (n=3 or 4, the error bars represent the standard deviation) 37
Figure 4.2 a) Comparison of MTT assay for both lasers up to 72h after treatment. The cells were able to fully recover without any noticeable effect (n=4, the error bars represent the standard deviation, results from 2 independent experiences). b) Phase contrast image showing rounded cells (red arrows) after treatment and c) corresponding fluorescent image showing intake of LY 39
Figure 4.3 SEM images showing AuNPs (red arrows) on cells before and after treatment with their size distribution for both wavelengths. Bar is 2 μm. (n=2, results from 2 independent experiences) 40

Figure 5.1 AuNPs (flèches rouges) en bordure d'une cellule (1,2) et sous la membrane (3,4) 46
Figure 5.2 Effet d'une faisceau gaussien sur la perforation des cellules. Les cellules se trouvant au centre (ligne pointillées) expriment plus de fluorescence que ceux en périphérie (ligne pleine). 48
Figure 5.3 Schématique de AuNPs qui ciblent seulement un type de cellules parmi une population. 51
Figure 5.4 Schématique du système de traitement proposé par Lukianova-Hleb *et al.* (2010b), a) injection de la solution de AuNPs qui va cibler les cellules cancéreuses, b) une solution transparente rince les AuNPs en trop tout en laissant un trajet favorable pour la propagation du laser. Ensuite une première impulsion (verte) vient former une petite bulle qui est détecté par diffraction du laser sonde(rouge). c) Élimination de la cellule en appliquant une deuxième impulsion plus puissante. d) La cellule fautive est détruite sans que son voisinage en soit affecté. 52
Figure B.1 Décalage vers le bleu d'une solution de AuNPs irradiée à l'aide d'impulsion de 5ns à 532nm en fonction de la fluence. On peut noter qu'il semble y avoir un régime différent pour les faibles fluences et les fluences élevés. 62
Figure B.2 Décalage vers le bleu d'une solution de AuNPs irradiée à l'aide d'impulsion de 6ns à 1064nm en fonction de la fluence. 63
Figure B.3 Dynamique temporelle du décalage vers le bleu pour les 2 longueurs d'onde lorsqu'une solution est irradié avec les fluence optimales, $50mJ/cm^2$ (532nm) et $1J/cm^2$(1064nm) 63

LISTE DES ANNEXES

Annexe A mygaussfit 60
Annexe B Résultats supplémentaires 62

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

NP	Nanoparticule
AuNP	Nanoparticule d'or
LY	Lucifer Yellow
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
IP	iodure de propidium
GFP	protéine fluorescente verte (abrégé de l'anglais 'Green Fluorescent Protein')
MTT	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
FBS	sérum de veau foesìtal (abrégé de l'anglais "Fetal bovine serum")
PBS	tampon phosphate salin (abrégé de l'anglais "Phosphate- buffered saline")
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
kDa	kilo dalton
ns	nanoseconde
ps	picoseconde
fs	femtoseconde
MEB	microscopie électronique à balayage
Nd :YAG	grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme (abrégé de l'anglais 'neodymium-doped yttrium aluminium garnet')
LP^2L	Laboratoire de Plasmonique et Procédés par Laser

CHAPITRE 1

Introduction

Le désir d'introduire des macromolécules exogènes telles qu'un plasmide, un segment d'ARN, un colorant ou un médicament à l'intérieur des cellules est de plus en plus présent dans plusieurs domaines comme la médecine, la biologie moléculaire ou cellulaire et même en agriculture. En biologie, on peut utiliser cet outil puissant afin d'étudier la fonction et la régulation de gènes et protéines, afin d'insérer une sonde moléculaire ou afin d'introduire une drogue qui modifiera le comportement cellulaire. Une importante application est la thérapie génique qui est proposée comme un traitement alternatif aux traitements traditionnels. Celle-ci utilise de l'ADN pour traiter des maladies pour lesquelles aucun traitement n'a été trouvé. L'ADN exogène qui est insérée à l'intérieur de cellules peut servir à modifier l'expression de certain gènes défectueux ou il peut coder une protéine qui aura des effets pharmaceutiques.

Par contre, afin d'introduire des macromolécules à l'intérieur de cellules, la perméabilité de la membrane plasmique, qui agit comme barrière biologique, doit être contrôlée. La membrane, composée majoritairement de lipides organisés en une double couche étanche, est perméable seulement à certains ions et petites molécules qui utilisent soit le mécanisme de la diffusion simple, de la diffusion facilitée ou du transport actif afin de traverser cette membrane. Pour les molécules non prises en charge par ces mécanismes naturels, des procédés de perméabilisation doivent être appliqués. Plusieurs ont été développés depuis la première transfection réalisée en 1973 par FL Graham et AJ Van der Eb (FL et Van der eb, 1973). Par exemple, un virus peut injecter son matériel génétique au travers de la membrane, des polymères et des liposomes dans lesquels est encapsulé le matériel exogène peuvent fusionner avec la membrane cellulaire et libérer leur contenu à l'intérieur du cytoplasme ou la membrane peut être perforée grâce à un laser hautement focalisé. Les techniques idéales doivent comporter une haute efficacité, être sélective, permettre le traitement d'un grand volume, être facilement reproductible et les cellules traitées doivent montrer un haut taux de survie (viabilité) ainsi que conserver une bonne vitalité à long terme.

En Juin 2010, le laboratoire LP^2L était en train de développer une nouvelle technique de perméabilisation membranaire basée sur l'amplification d'un laser femtoseconde par nanoparticules plasmoniques Baumgart *et al.* (2011). Le but de cette technique est de produire des nanobulles autour des NPs qui perturberont l'organisation des lipides membranaires. Ceci

augmentera la perméabilité de la cellule qui pourra ensuite incorporer un colorant fluorescent ou un plasmide. Bien qu'offrant des résultats très intéressants, un laser à impulsions femtosecondes est couteux, compliqué à utiliser par des personnes non spécialisées et nécessite beaucoup d'entretien.

Ce projet de maîtrise a pour but d'évaluer la faisabilité de ce procédé de perméabilisation en utilisant un laser à impulsions nanosecondes. L'efficacité de perméabilisation et la viabilité cellulaire sont analysées en fonction de la puissance d'irradiation sur des mélanômes humains (MW278). Initialement, seule la longueur d'onde de 532 nm était considérée mais après des tests intéressants, une seconde longueur d'onde de 1064 nm a été étudiée. De plus, la transformation des nanoparticules plasmoniques lors de l'irradiation est étudiée afin de déterminer leur état post irradiation (forme et emplacement).

Le chapitre 1 fournit les concepts de base ainsi que les informations nécessaires à la compréhension du projet. En premier lieu, une brève description de la cellule avec quelques particularités sur la membrane plasmique est donnée puis, les techniques de transfection actuelles les plus communes y sont décrites avec leurs avantages et désavantages. Ensuite, une revue de littérature des travaux portants sur les nanoparticules irradiées par laser pulsés est présentée suivie de quelques détails sur les interactions laser-nanoparticules. Le chapitre 2 décrit la méthodologie, les instruments ainsi que les paramètres utilisés. Le chapitre 3 présente la majorité des résultats, dans un article intitulé : Visible and near infra red resonance plasmonic enhanced nanosecond laser optoporation of cancer cells, soumis dans le journal Biomedical Optics Express. Le chapitre 4 est dédié à la discussion générale du mémoire, il expose les avantages et désavantages du procédé de perméabilisation et les compare avec d'autres techniques existantes. Une partie discute ensuite du transfert aux applications *in vivo*. La conclusion résume les principaux résultats du projet et propose de futures améliorations et avenues.

CHAPITRE 2

Revue de littérature sur les méthodes de perméabilisation de membrane cellulaire

Ce chapitre fournit au lecteur des informations sur la cellule eucaryote et ses constituants avec un emphase sur la composition et le rôle de la membrane plasmique. Suit ensuite une revue des méthodes qui ont été développées afin de transfecter ou perméabiliser les cellules eucaryotes.

2.1 Revue de la cellule avec emphase sur la membrane plasmique

Les structures importantes d'une cellule eucaryote sont la membrane, le cytosquelette, le noyau et les nombreux organites (structures à l'intérieur de la cellule qui sont délimitées par une membrane phospholipidique). Celles-ci sont représentées sur la figure 2.1. Tous ces éléments font partie du cytoplasme (terme qui désigne la totalité du contenu à l'intérieur de la cellule) et ils baignent dans le cytosol (liquide à l'intérieur de la cellule).

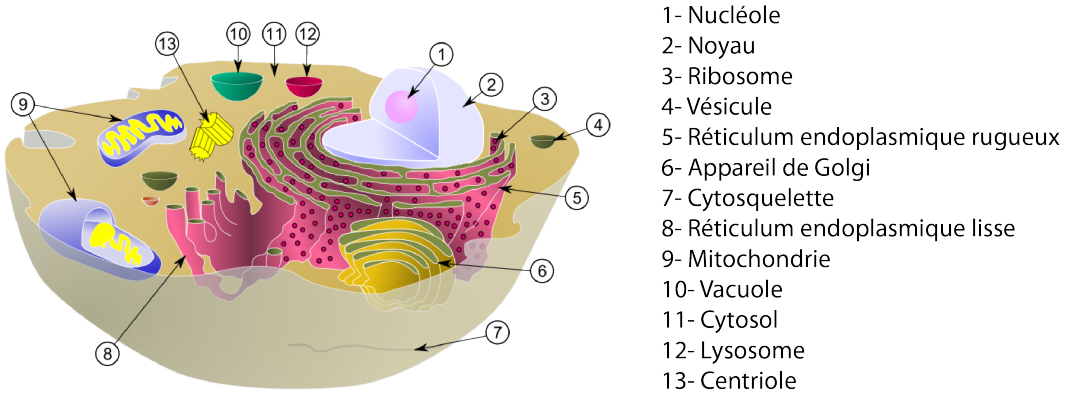

Figure 2.1 Vue d'ensemble de la cellule eukaryote où l'on peut voir la membrane plasmique, le noyau et les organites (oeuvre créé par Messer Woland, reproduction autorisée).

Le cytosquelette est constitué de trois types de filaments différents, les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Alors que les filaments d'actine ont pour fonctions de rigidifier la cellule, les microtubules, quant à eux, sont responsable du maintient de la forme cellulaire. De plus, ces derniers servent aussi de plate forme pour le transport intracellulaire et ils jouent un rôle crucial dans la mitose en formant les fuseaux mitotiques. Le noyau est un organite constitué d'une double membrane et d'un nucléosquelette qui lui

assure une certaine rigidité. Sa principale fonction est de contenir le matériel génétique de la cellule et d'en réguler la transcription (première étape de la création des protéines qui consiste à copier des régions codantes de l'ADN en ARN). Les autres principaux organites sont le reticulum endoplasmique, l'appareil de Gogli, les mitochondries et les lysosomes. Ils ont chacun une fonction précise dans le fonctionnement de la cellule telle que la maturation des protéines dans le reticulum endoplasmique, la création d'énergie sous forme d'adénosine-5'-triphosphate (ATP) dans les mitochondries ou la dégradation des molécules complexes dans les lysosomes.

On nomme membrane plasmique la membrane qui délimite la cellule et qui la sépare de son environnement extérieur tandis que les membranes qui délimitent les organites sont nommées membranes intracellulaires. Une membrane est composée majoritairement de lipides (principalement des phospholipides) et de protéines. Les phospholipides sont amphiphiles ; ils contiennent une tête hydrophile et une queue hydrophobe. En milieu acqueux, ceux-ci s'organiseront de manière à minimiser leur énergie, c'est à dire en maintenant leur tête en contact avec l'eau et en isolant leur queue hydrophobe. Ceci peut donner naissance à trois types de structures telles que représentées sur la figure 2.2, soient un liposome, un micelle ou un feuillet bicouche. La membrane plasmique prend la forme d'un feuillet bicouche qui englobe tout le matériel cellulaire.

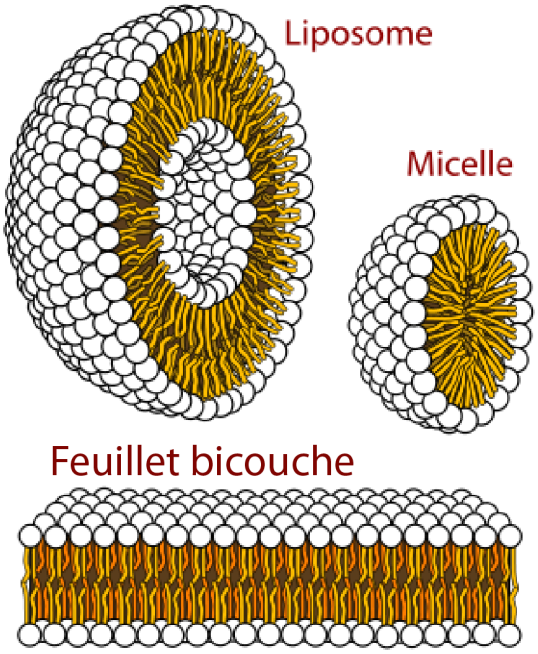

Figure 2.2 Assemblage possible des phospholipides (oeuvre créé par Mariana Ruiz Villarreal, reproduction autorisée).

Cette structure est considérée comme étant une structure dynamique. En effet, les lipides de la membrane peuvent se mouvoir dans les trois directions spatiales par des mouvement latéraux, des rotations sur eux-mêmes, des flexions ou des bascules d'une couche à l'autre. C'est grâce à ces propriétés que la membrane peut s'adapter à différentes formes ou se refermer en se réorganisant rapidement après une perturbation. Les rôles principaux de la membrane plasmique sont de réguler les échanges entre le cytoplasme et le milieu extérieur, d'assurer la communication intercellulaire via des signaux chimiques et de permettre l'adhésion intercellulaire ou sur une surface.

Les échanges de matériel entre la cellule et l'extérieur peuvent se faire de plusieurs façons, dépendamment de la grosseur de l'objet à introduire et de sa nature. Par exemple, les petites molécules hydrophobes et lipophiles peuvent traverser la membrane directement en se faufilant entre les phospholipides et en suivant le gradient de concentration. Les molécules hydrophiles utilisent des transporteurs membranaires comme des canaux ou des pompes pour traverser la membrane ; ce processus se nomme diffusion facilité. Le dernier type est le transport actif, celui-ci est nécessaire lorsque des ions ou molécules doivent se déplacer contre leur gradient de concentration. Des pompes qui utilisent de l'énergie cellulaire (sous forme d'ATP) permettent de tels transferts.

Lorsque la cellule rencontre de plus gros objets, un autre mécanisme entre en jeu, soit l'endocytose. Lors de l'endocytose, une partie de la membrane entourera la particule puis une invagination suivra. La membrane se détachera ensuite et formera une vésicule avec la particules à l'intérieur. Finalement la vésicule sera dégradée par des enzymes et son contenu sera libéré dans le cytoplasme. Les étapes de l'endocytose sont représentées sur la figure 2.3.

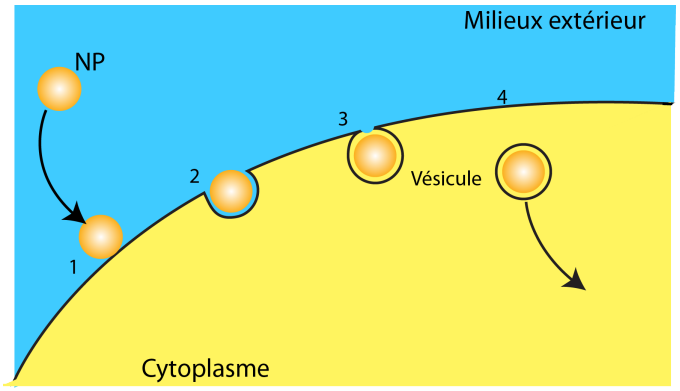

Figure 2.3 Schéma des étapes du processus d'endocytose d'une nanoparticule. 1) La particule entre en contact avec la membrane cellulaire, 2) Invagination de la particule, 3) Le vésicule formé se referme complètement, 4) Le vésicule se détache et se déplace vers l'intérieur de la cellule où il sera dégradé.

Une description de certains termes biologiques qui seront utilisés dans le mémoire est donnée ci-dessous :

`Transfection` :	Le terme transfection désigne l'introduction d'acide nucléique (ADN) à l'intérieur d'une cellule eucaryote de façon non virale. Lorsqu'un vecteur viral (voir 2.2.1) est utilisé, on utilisera le terme transduction.
`Confluence` :	La confluence est la mesure de l'aire couverte par les cellules dans un pétri ou une flasque de culture, exprimée en pourcentage.
`In vivo` :	Dans un organisme vivant.
`In vitro` :	À l'extérieur d'un organisme vivant.
`Apoptose` :	L'apoptose désigne une mort cellulaire déclenchée par la cellule en réponse à un signal.
`Necrose` :	Mort cellulaire non naturelle, causée par des facteurs externes.
`Lyse` :	La lyse est la destruction de l'intégrité physique de la membrane plasmique de cellules eucaryotes sous l'action d'un agent physique, chimique ou biologique. Elle mène à la mort cellulaire.
`Cytotoxicité` :	La cytotoxicité désigne la toxicité associée au cellules. Elle est souvent utilisée pour évaluer la toxicité d'agents chimiques ou de nouveaux médicaments.
`Mutagenèses insertionnelles` :	Mutation causée par l'insertion de matériel génétique dans un gène déjà présent.

2.2 Technique de perméabilisation et/ou transfection

Depuis le premier signalement de transfection par précipitation de phosphate de calcium en 1973 (FL et Van der eb (1973)), plusieurs techniques de perméabilisation et méthodes de transfection ont été développées. On peut classifier les différentes techniques selon le type de mécanisme (biologique, chimique ou physique) utilisé pour traverser la membrane plasmique. Voici les principales techniques de chaque catégorie avec quelques avantages et désavantages.

2.2.1 Méthode biologique : Vecteur viral

Le vecteur viral est la technique qui offre la meilleure efficacité et qui est la plus utilisée. Entre 1989 et 2012, 1257 essais cliniques ont utilisé le vecteur viral comme méthode de transfection (données provenants d'agences officielles (CAR, GTAC etc.), de la littérature publiée, des présentations de conférences et à partir des informations fournies par les

enquêteurs ou les promoteurs d'essais cliniques, compilées par John Wiley & Sons, Inc.[1]). La méthode consiste à utiliser le mode de reproduction naturel des virus qui infectent des cellules hôtes en transférant leur matériel génétique à l'intérieur de celles-ci. Le virus est rendu non dangereux en remplaçant son bagage génétique néfaste à l'intérieur de sa tête par un segment d'ADN contenant le code du gène que l'on veut introduire dans la cellule. Les virus génétiquement modifiés sont ensuite mis en contact avec la culture cellulaire à transfecter.

Par contre, l'infection avec un virus peut causer des mutagenèses insertionnelles ou des problèmes de réponse immunitaire sévère (ceci a même causé deux cas de décès en 1999 et 2007, Lehrman (1999); Evans *et al.* (2008)). De plus, la capacité de chargement de la tête du virus est limitée et les coûts associés à leur production sont très élevés (Tros de Ilarduya *et al.*, 2010). Pour ces raisons, des techniques non virales sont présentement recherchées.

2.2.2 Méthode chimique : Lipides et polymères cationiques

Les agents cationiques représentent une bonne partie des agents de transfection commercialement disponibles. En théorie, leur fonctionnement est relativement simple mais il peut facilement y avoir des complications expérimentales. Premièrement, des complexes de lipides et d'ADN (lipoplexes) ou de polymères et d'ADN (polyplexes) de taille nanométrique sont créés dans une solution tampon aqueuse. Les polymères les plus fréquemment utilisés sont le polyéthylènimine, la polyallylamine, la Poly-L-lysine, le chitosane ou les dendrimères. Lorsque mis en contact avec des cellules, ces complexes cationiques se lieront à la membrane plasmique par des interactions électrostatiques non spécifiques (la membrane cellulaire est chargée négativement). Les complexes seront ensuite internalisés à l'intérieur de la cellule par endocytose. Une fois à l'intérieur, le pH du vésicule descendra de 7 à 5.5, ce qui libérera le contenu du complexe à l'intérieur du cytoplasme. Une fois à l'intérieur, si le contenu est de l'ADN, celui-ci doit se rendre au noyau. Il peut le faire soit par transport passif lors de la division cellulaire, soit par transport actif qui le guidera dans les pores du noyau.

L'administration de lipoplexes *in vivo* induit une activation rapide du système immunitaire ainsi qu'une augmentation de cytokines proinflamatoires (Li et Huang, 2006). De plus, une cytotoxicité associée à la charge des polyplexes est présente et des paramètres comme le poids moléculaire, la topologie structurale, le degré de ramification et la densité de charge peuvent aggraver cette cytotoxicité (Pathak *et al.*, 2009). La conception des polymères doit donc être faite avec précaution.

1. The Journal of Gene Medicine Clinical Trial site, http ://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/

2.2.3 Méthode physique

Malgré les hauts taux d'efficacité des méthodes de transfection biologiques et chimiques, celles-ci utilisent des virus potentiellement dangereux ou des agents chimiques présentant des risques élevés de cytotoxicité. C'est ce qui a motivé le développement de techniques physiques de transfection et de perméabilisation membranaire. Dans la plupart des méthodes physiques, une force viendra perturber l'organisation des lipides qui forment la membrane et son étanchéité sera alors compromise. Par la suite, si la déstabilisation n'est pas trop prononcée, la membrane se refermera à l'aide d'un mécanisme d'exocytose vésiculaire (Reddy *et al.*, 2001) et d'une réorganisation des phospholipides membranaires, ce qui permettra à la cellule de survivre.

Électroporation

Initialement publiée en 1982 (Neumann *et al.*, 1982), l'électroporation est la méthode physique la plus connue et la plus utilisée. Des appareils de transfection commerciaux basés sur cette technique sont disponibles sur le marché. Les cellules à perméabiliser sont placées dans une cuvette spéciale sur laquelle sont attachées deux électrodes. Les cellules doivent être en solution et cette dernière doit contenir les molécules à insérer dans les cellules. De courtes impulsions électriques sont ensuite appliquées entre les électrodes. Les cellules seront donc traversées par un champ électrique, ce qui aura pour effet de déstabiliser ou percer leur membrane plasmique. La perméabilité de la membrane sera alors augmentée et le contenu de la solution environnante pourra ensuite pénétrer à l'intérieur de la cellule par diffusion. La figure 2.4 présente un schéma du procédé d'électroporation.

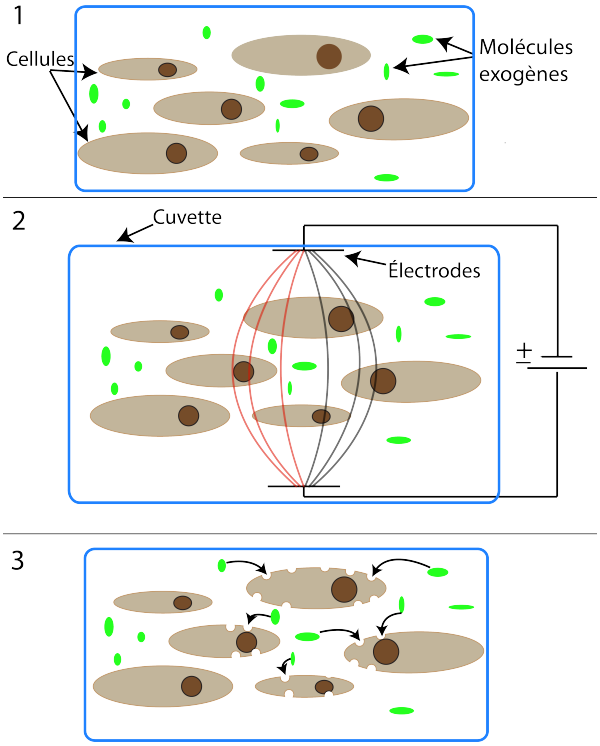

Figure 2.4 Schéma des étapes du procédé d'électroporation. 1) Les cellules sont dans une suspension contenant les molécules à introduire, 2) des impulsions électriques sont appliquées, 3) les molécules externes entrent par diffusion dans les cellules perforées.

L'électroporation est un procédé intéressant qui permet de perméabiliser jusqu'à 90% des cellules, tout en maintenant 80% des cellules viables (Zhao *et al.*, 2006). Cependant les résultats sont hautement dépendants de la lignée cellulaire, les impulsions électriques doivent donc être ajustées en conséquence. Cette méthode comporte aussi quelques désavantages. Premièrement, l'électroporation n'est pas un procédé sélectif. Il ne permet pas de transfecter ou perméabiliser seulement certaines cellules parmi un ensemble car toutes les cellules traversées par le champ électrique seront perméabilisées. Deuxièmement, les impulsions peuvent facilement être trop agressives (mauvaise longueur ou intensité). Si les cellules sont fragiles, la déstabilisation de la membrane sera trop importante et la viabilité sera compromise.

Perméabilisation par onde de choc

Cette méthode originale repose sur le fait que l'organisation des lipides de la membrane plasmique peut être perturbée par une onde de choc et ainsi augmenter le perméabilité de la membrane. Les ondes de choc peuvent être créées de différentes façons, la plus fréquente étant par laser tiré sur une cible (Obara *et al.*, 2004; Takano *et al.*, 2008). Les molécules à insérer sont projetées à l'intérieur des cellules lorsque les ondes sont appliquées ou bien elles

pénètrent par diffusion lorsque la membrane est perméable.

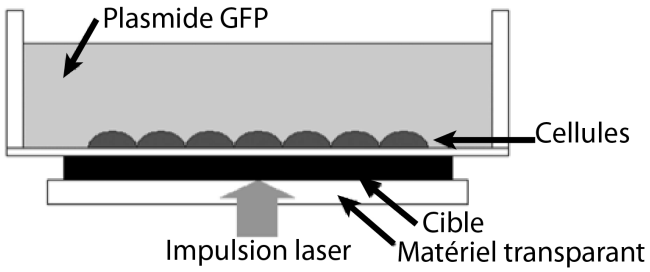

Figure 2.5 Schéma du montage pour appliquer des ondes créées par laser sur des cellules en pétri. tiré de Obara *et al.* (2004)

Malheureusement, l'efficacité de cette technique est assez faible puisque seulement quelques pourcents des cellules traitées seront transfectées. Toutefois, cette technique comporte le bénéfice qu'elle peut être facilement transférable à des spécimens *in vivo*, car le montage requiert seulement une cible en contact avec la peau. De plus, les ondes de choc peuvent avoir une grandeur de pénétration de quelques centimètres dans les tissus biologiques. Ogura *et al.* (2004) ont transfecté un plasmide encodant la luciférase sur une peau de rat en posant le montage de la figure 2.5 directement sur la peau.

Microinjection

La microinjection consiste à l'insertion directe d'une solution à l'intérieur d'une cellule à l'aide d'une micropipette de vitre. La solution injectée contient la cargaison à livrer et l'injection peut se faire dans le cytosol ou directement dans le noyau de la cellule.

En théorie, le taux d'efficacité de cette technique est de 100% pour les cellules viables, ce qui est très intéressant si on considère qu'un taux de viabilité de 80% est généralement atteint. Un avantage majeur de la microinjection est qu'on peut contrôler précisément la quantité de molécules introduites (Zhang et Yu, 2008). Toutefois, c'est un procédé délicat qui requiert des manipulations précises et beaucoup de temps. De plus, l'injection se fait une seule cellule à la fois ce qui limite le rendement de cette technique.

Optoporation

L'optoporation est définit comme une perforation par lumière. Un laser pulsé est hautement focalisé sur la membrane plasmique grâce à un objectif à haute ouverture numérique.

Un schéma du montage est illustré sur la figure 2.6. Des impulsions laser allant des nanosecondes aux femtosecondes peuvent être utilisées, mais plus l'impulsion est courte plus les dommages collatéraux seront minimisés (Vogel et Venugopalan, 2003). Lorsqu'un pore est ouvert, il y a échange de matériel, principalement par diffusion, entre l'intérieur de la cellule et le milieu environnant. Par exemple, Baumgart *et al.* (2008) ont utilisé des impulsions de 140 fs pour perforer des cellules mammaires canines (MTH53a) et y insérer un plasmide codant de la GFP. Jusqu'à 70% des cellules irradiées ont été perforées (vérifié par l'introduction d'un colorant fluorescent) et 30% ont été transfectées tout en maintenant une viabilité de 90%, 90 minutes après traitement. Ils ont aussi analysé le volume de liquide échangé par le pore et ils ont trouvé qu'environ 40% du volume de la cellule était échangé. Cette technique peut aussi être employée sur des cellules humaines qui sont habituellement fragiles, comme des neurones. Lei *et al.* (2008) ont perméabilisé des neurones PC12 et des astrocytes.

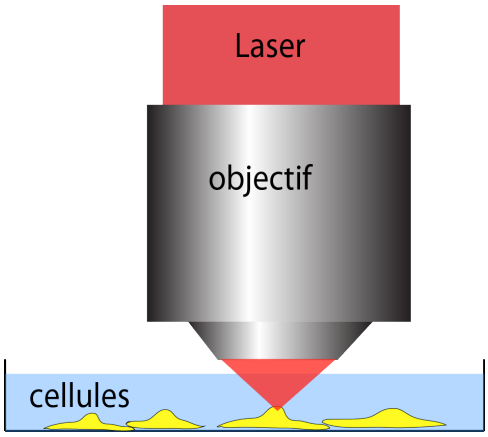

Figure 2.6 Schéma du montage pour l'optoporation laser. Un objectif focalise le faisceau en un point de quelque microns de diamètre pour permettre la perforation de cellule individuellement.

Bien que cette technique soit sans contact direct, qu'elle soit applicable sur des cellules difficiles à transfecter et qu'elle présente un haut taux d'efficacité et de viabilité, elle comporte aussi certains désavantages. En effet, cette technique nécessite un alignement très précis et l'utilisation d'une pince optique afin d'immobiliser des cellules non adhérentes. De plus, elle offre un faible rendement puisqu'elle ne peut traiter qu'une seule cellule à la fois.

Particules absorbantes

Cette technique se base sur l'absorption et la conversion de la lumière en énergie thermique par des particules micro ou nano-métriques. Lorsque ces particules sont irradiées par

des impulsions laser de courte durée, le dépôt d'énergie à proximité des particules (pour plus de détail voir section 2.3) donnera naissance à des bulles de cavitation qui, lorsqu'à proximité de la membrane plasmique, provoqueront la rupture ou la déstabilisation de cette membrane de façon mécanique. Si les impulsions laser sont suffisamment courtes ($\leq ns$), il y aura un effet de confinement thermique (l'énergie thermique n'aura pas le temps de diffuser aux alentours) et la chaleur sera restreinte à proximité de la particule. Ainsi, en sélectionnant une longueur d'onde faiblement absorbée par les cellules et hautement absorbée par les particules, on peut obtenir un dépôt d'énergie à des endroits spécifiques. Ce sont habituellement des AuNPs qui sont utilisées, car elles ont une haute biocompatibilité, elles sont faciles à fabriquer en différentes tailles et structures, et elles ont une chimie de surface qui a été largement étudié dans la littérature ce qui les rend facilement modifiables et conjugables (Pissuwan *et al.*, 2006).

Les particules doivent se retrouver à la surface des cellules très près de la membrane plasmique. Pour ce faire, les particules peuvent être conjuguées avec des anticorps spécifiques qui cibleront leurs antigènes cibles qui se retrouvent à la surface de la cellule. De cette façon, un type de cellule particulier peut être sélectionné parmi une population mixte (Lukianova-Hleb *et al.* (2011)). Si les particules ne sont pas conjuguées avec des anticorps, elle peuvent être simplement déposées dans la solution. Grâce à la gravité, les particules descendront vers les cellules et se colleront à leur membrane, ce qui entamera le processus d'endocytose. Toutefois, les cellules devront être traitées avant l'internalisation complète de la NP (étape 4 sur la fig 2.3) sinon des dommages internes pourront survenir.

Les molécules à insérer seront en suspension dans le milieu cellulaire et après l'irradiation laser, ceux-ci pourront diffuser au travers des pores ou des ouvertures créées par les bulles de cavitation issues des nanoparticules. Elles se retrouveront ainsi à l'intérieur des cellules ciblées. Lukianova-Hleb *et al.* (2012b, 2011) soutiennent que la diffusion simple ne peut pas, à elle seule, expliquer tout l'échange de matériel observé. Ils proposent donc qu'elle soit aidée par un mécanisme de jet entrant créé lors de l'effondrement de la bulle (voir fig 2.7 (4)).

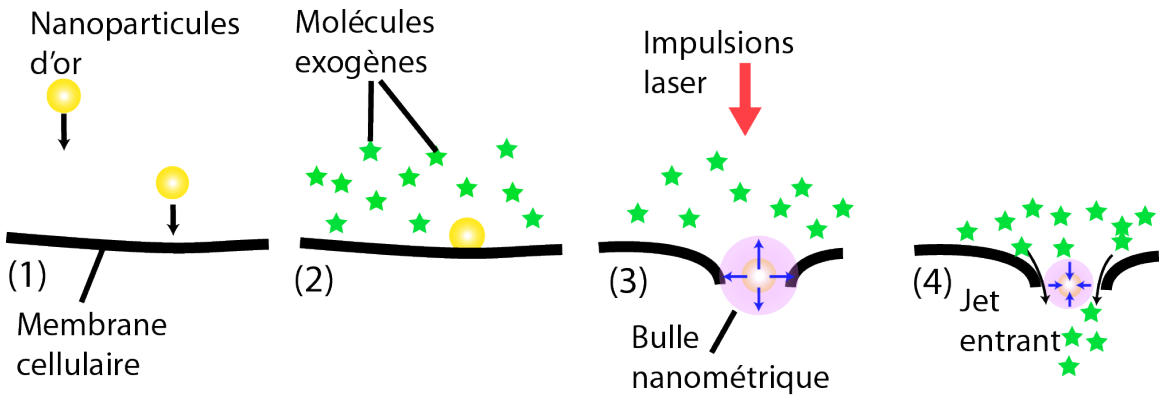

Figure 2.7 Schéma du mécanisme de perméabilisation avec particules absorbantes. (1) Des nanoparticules d'or sont déposées sur la surface membranaire, (2) les molécules exogènes sont ajoutées à la solution avant l'irradiation, (3) pendant l'irradiation laser, des nano bulles sont créées autour des nanoparticules ce qui perfore ou ouvre la membrane. (4) Les molécules peuvent pénétrer à l'intérieur de la cellule, aidées par le jet entrant créé lors de l'effondrement de la bulle.

En balayant un laser sur un tapis cellulaire recouvert de particules, cette méthode permet de traiter un grand nombre de cellules en peu de temps tout en ayant une sélectivité sur les cellules qui seront perméabilisées. Cependant, cette méthode comporte plusieurs paramètres qui doivent être contrôlés et optimisés, tels que le nombre d'impulsions livrées aux NPs, le nombre de nanoparticules par cellules, la puissance utilisée ainsi que la grosseur et la forme des nanoparticules. Yao *et al.* (2009, 2005) ont étudié la variation de ces paramètres sur une lignée cellulaire de la maladie de Hodgkin (L428) et sur des lymphômes humains (Karpas 299) avec un laser Nd :YAG fournissant des impulsions de 6ns à 532 nm. Les résultats optimaux pour le transfert de dextran d'une taille de 10kDa sont représentés sur la figure 2.1. La fluence optimale était de 90 mJ/cm^2 avec cinq impulsions par cellule. Bien que les auteurs utilisent le terme transfection, ce sont seulement des colorants qui ont été insérés dans les cellules.

		Conjugate			
Cell	Parameter	BerH2 30 nm	BerH2 15 nm	ACT-1 30 nm	ACT-1 15 nm
Karpas - 299	Transfection efficiency	57.06%	47.46%	64.22%	35.6%
	Cell death	22.72%	16.04%	16.12%	19.96%
	Irradiation	0.5 mJ	0.5 mJ	0.5 mJ	0.8 mJ
	Energy and particle load	3.2×10^4/cell	1.1×10^5/cell	4.1×10^4/cell	1×10^5/cell
L-428	Transfection efficiency	53.5%	45.06%		
	Cell death	12.64%	32.54%		
	Irradiation	0.8 mJ	1.2 mJ		
	Energy and particle load	1.44×10^4/cell	3.2×10^5/cell		

Tableau 2.1 Résultats de Yao *et al.* (2009) pour 5 impulsion de 90 mJ/cm^2 sur des cellules chargées avec des AuNPs de 15 et 30 nm de diamètre

Une transfection avec un plasmide codant de la GFP (green fluorescent protein) a été réalisée par Lukianova-Hleb *et al.* (2012b, 2011) à l'aide d'impulsions laser à 532 nm de 0.5 ns et 70 ps, respectivement. Lukianova-Hleb *et al.* (2011) ont utilisé des cellules leucémiques jurkat T et des cellules primaires de la moelle osseuse (reconnues pour être particulièrement difficiles à transfecter). Les cellules sont étudiées une à une à l'aide d'un système pompe/-sonde qui permet la détection de nano bulles après qu'une impulsion laser ait été appliquée. Le seuil de création de bulle, définit comme la puissance à laquelle une bulle est observée dans plus de 50% des cas, est situé à 112 mJ/cm^2 pour des impulsion de 0.5 ns et 30 mJ/cm^2 pour 70 ps. Lorsqu'une bulle est créée, 74% des jurkat T présentent une fluorescence due à la GFP 48h après le traitement avec une viabilité de 84%. Dans l'étude de Lukianova-Hleb *et al.* (2012b) le rendement a été amélioré à l'aide d'un système microfluidique qui permet de traiter les cellules une après l'autre à l'aide d'un laser à impulsions picosecondes. Dans cette publication, des cellules squameuses de carcinome et des cellules mononucléées du sang périphérique sont traitées. Jusqu'à 96% des cellules encore vivantes après l'irradiation présentent de la fluorescence due à l'insertion du colorant FITC ou l'expression de la GFP. Bien que d'excellents taux soient atteints, le rendement reste faible car les cellules sont traitées une à une.

La seule publication, à ma connaissance, qui utilise un laser à impulsions femtosecondes afin d'exciter des AuNPs est celle de Baumgart *et al.* (2011). Ces expériences ont été réalisées dans les laboratoires du LP^2L sur des cellules de mélanômes humains. Jusqu'à 70% des cellules irradiées ont été perforées et colorées avec du LY et 23% d'entre elles ont exprimées de la fluorescence due à la GFP tout en maintenant une viabilité de 80%.

Le procédé de création de nanobulles peut aussi être utilisé à d'autres fins, par exemple pour la détection et l'élimination de cellules cancéreuses. En effet, si la puissance du laser est élevée, de plus grosses bulles seront créées ce qui induira des dommages irréversibles sur les cellules. Lapotko *et al.* (2006a) utilisent ce procédé pour tuer des cellules cancéreuses et Kitz *et al.* (2011) ont étudié les paramètres lasers menant aux dommages des cellules. Lukianova-Hleb *et al.* (2010b) utilisent les propriétés de diffusions optiques des bulles de cavitation afin de détecter les cellules ciblées par des nanoparticules bioconjuguées pour ensuite les lyser grâce à une deuxième bulle de plus gros diamètre.

2.3 Mécanisme d'interaction laser-AuNPs

Les AuNPs possèdent des propriétés uniques attribuables à leur résonance plasmonique. La résonance plasmonique est une oscillation collective et cohérente des électrons libres à la surface d'une nanoparticule en résonance avec une onde électromagnétique d'une fréquence spécifique. Ceci donne lieu à une intense absorption et diffusion de la lumière incidente ainsi qu'à une amplification hautement localisée du champ lorsque la fréquence de ce champ est près de la fréquence plasmonique. Pour des AuNPs sphériques, la fréquence de résonance plasmonique se situe entre 500 et 580 nm, dépendamment de leur taille. Les impulsions à 532 nm seront donc en résonance plasmonique tandis que les impulsions à 1064 nm seront hors résonance.

Amplifiées par la présence de NPs, les impulsions nanosecondes vont d'abord chauffer les électrons de la bande de conduction des NPs. Par la suite, ceci produira un champ thermique hautement transitoire et non stationnaire. Ce champ thermique sera transféré au réseau de la NP par des interactions électron-phonon et sera ensuite injecté dans le milieu environnant par des couplages phonon-phonon. Si la température du milieu environnant atteint le point critique de vaporisation, il y aura un changement de phase et la création d'une bulle de cavitation de courte durée autour de la NP. Pendant son expansion, la bulle transitoire induira sur la cellule une contrainte de cisaillement qui perturbera la membrane plasmique

et augmentera ainsi sa perméabilité.

Un contrôle précis de l'absorption d'énergie et de sa dissipation dans le milieu environnant joue un rôle crucial dans le procédé de perméabilisation. L'absorption d'énergie dépend de plusieurs facteur tels que la durée des impulsions, la fluence de celles-ci, la longueur d'onde, la polarisation, la grosseur et forme des nanoparticules ainsi que les propriété physique du milieu environnant.

CHAPITRE 3

Méthodologie expérimentale

L'augmentation de la perméabilisation membranaire est vérifiée par l'introduction d'un colorant fluorescent dans le cytoplasme des cellules. Voici les étapes suivies afin de tester la technique de perméabilisation par impulsions nanosecondes :

- Les cellules sont ensemencées dans des pétris avec fond de verre 24h avant le traitement
- Quatre heures avant le traitement, elles sont incubées avec des AuNPs
- Un colorant fluorescent, le lucifer yellow (LY), est ajouté au milieu cellulaire et le traitement laser est effectué
- Le noyau de chaque cellule ainsi que le cytoplasme des cellules endommagées sont colorés à l'aide de colorants fluorescent puis observées au microscope à fluorescence
- Le taux de perforation ainsi que la viabilité sont ensuite déduits à partir des images de fluorescence

De plus, afin de mesurer l'influence du traitement sur les cellules à long terme, des tests MTT ont été conduits pour évaluer le niveau d'activité cellulaire jusqu'à 72h post-traitement.

La transformation des AuNPs sous l'influence du laser nanoseconde a été vérifiée par des mesures spectroscopiques et des images au microscope électronique à balayage (MEB). La taille et la forme des AuNPs leurs confèrent un spectre d'absorption distinct qui peut servir à caractériser leur taille. Le spectre d'absorption d'une solution de AuNPs a été enregistré pendant que celle-ci était sous irradiation. Le changement de spectre a été utilisé afin de vérifier approximativement le nombre d'impulsions requis pour endommage les AuNPs. De plus, des images MEB de AuNPs incubées avec les cellules ont été prises avant et après le traitement.

3.1 Préparation des spécimens biologiques

3.1.1 Pétris pour irradiation

Les cellules utilisées dans cette étude sont des mélanômes humains (MW278) prélevés au centre hospitalier de l'Université Mcgill. Elles sont cultivées régulièrement dans le milieu de culture RPMI 1640 (Invitrogen, ON, Canada) supplémenté à 10% de FBS (Invitrogen, ON, Canada) et 1% d'antibiotiques (streptomycine et pénicilline) (Invitrogen, ON, Canada). Vingt-quatre heures avant le traitement, les cellules sont ensemencées dans des pétris à fond

de verre (MaTek Corporation, MA, États-Unis) sur lesquels ont été dessinés (sur la face extérieure) des carrés de 5mmX5mm qui définiront les zones d'irradiation. Afin d'obtenir une confluence d'environ 70% le lendemain, $8X10^4$ cellules sont déposées dans la partie vitrée des pétris. Quatre heure avant l'irradiation, les AuNPs sphériques de 100nm (Nanopartz, CO, États-Unis) sont déposés dans le milieu de culture afin d'obtenir une concentration finale de 8.3 $\mu g/mL$. Après l'incubation, les cellules sont rincées (le milieu est retiré, un mL de PBS est ajouté puis enlevé) dans le but de retirer les AuNPs qui n'ont pas adhérées à la surface de la membrane cellulaire. Un mL de milieu frais est ensuite ajouté sur les cellules avec 200 μl d'une solution de LY afin d'obtenir une concentration de 0.3 mM. Les cellules sont ensuite immédiatement irradiées (voir section 3.2).

3.1.2 Essais MTT

Pour les essais MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium), les cellules sont ensemencées pour obtenir la même confluence mais dans des plaques 12 puits avec fond de verre (Matek Corporation, MA, États-Unis) afin de permettre une lecture à l'aide d'un lecteur de plaque Epoch (Biotek instruments, Vermont, États-Unis). La déposition des AuNPs et l'irradiation sont effectuées de la même manière, la seule différence étant que le puits entier est irradié au lieu des zones de 5mmX5mm (voir 3.2). De plus, il n'y a pas de coloration pendant et après le traitement. Quatre puits par plaque sont utilisés comme contrôle positif (ensemencés mais non irradiés), quatre puits seront irradiés à 532 nm et les quatre derniers à 1064 nm. Après l'irradiation, les puits sont rincés et les plaques sont remises à l'incubateur jusqu'au moment désiré pour les tests, soit 2 h, 24 h, 48 h et 72 h. À ce moment, 150 μl d'une solution MTT à 3 mg/mL est ajoutée et les cellules sont incubées avec cette solution pour 3 h. La solution est ensuite retirée et les cristaux de formazan sont dissous par l'ajout de un mL d'une solution de HCL (acide chlorhydrique) 0.1 N dans l'isopropanol sur les cellules. Le tout est brassé afin d'obtenir un liquide homogène puis la plaque est lue aux longueurs d'onde de 570 nm et 690 nm (690 nm sera utilisé comme référence).

3.1.3 MEB

Afin d'observer les cellules au MEB, celles-ci doivent être fixées avant ou après le traitement. Les cellules sont ensemencées et traitées exactement de la même façon que pour les tests MTT (irradiation complète de la zone vitrée et sans coloration). Après le traitement, elles sont rincées au PBS puis incubées durant 30 min. Par la suite, elle sont fixées à l'aide d'un mL d'une solution de glutaraldéhyde 5% pendant une heure. La solution est ensuite retirée et les cellules sont rincées avec de l'eau puis séchées pendant 12 h. L'eau est utilisée au lieu du PBS

lors du dernier rinçage afin que les cristaux contenus dans le PBS ne se retrouvent pas sur les cellules. Après le séchage, la partie vitrée des pétris est délicatement décollée et découpée en petits échantillons. Les échantillons sont montés sur les porte-échantillons du MEB. Afin d'obtenir des échantillons conducteurs (nécessaires pour le fonctionnement du MEB) chaque échantillon est recouvert d'une mince couche d'or d'environ cinq nm. Ils sont ensuite montés dans la chambre sous vide du MEB environnemental (Quanta 200, FEI, Oregon, États-Unis) qui est utilisé en mode haut vacuum.

3.2 Traitement laser

3.2.1 Caractérisation laser

L'irradiation se fait avec un laser Nd :YAG pulsé (Quantel, Toronto, Canada) opérant à la fréquence fondamentale de 1064 nm ou à la fréquence doublée de 532 nm. La longueur des impulsions varie en fonction du délai entre la Q-Switch et la lampe flash. À 1064 nm, les impulsions mesurent entre 50 et 100 ns tandis à 532 nm, elles varient entre 10 ns et 20 ns. Le taux de répétition du laser est 10 Hz. Il est installé sur le montage qui est illustré à la figure 3.1. La puissance du laser peut être ajustée en réglant le délai entre la lampe flash et la Q switch ou à l'aide d'un atténuateur variable composé d'un polariseur et d'une lame à angle de Brewster (Altechna, Vilnius, Lithuania). Un miroir pivotant permet d'envoyer le faisceau sur un puissance-mètre (Ophir-Spiricon, Ma, États-Unis). Le faisceau est ensuite dirigé sur une lentille focalisante (Thorlabs, NJ, États-Unis) qui est montée sur une table de déplacement en Z, ce qui permet d'ajuster la grosseur du faisceau au plan de l'échantillon. L'unité de puissance utilisée est la fluence qui représente la quantité d'énergie livrée par unité de surface. Avec les paramètres du laser, la fluence par impulsion se calcule de cette façon :

$$F(mJ/cm^2) = \frac{P(mW)}{f(Hz) * \pi r^2(cm^2)} \tag{3.1}$$

Où P représente la puissance moyenne du laser en mW, f la fréquence de répétition du laser en Hz et r le rayon du faisceau en cm au plan de l'échantillon.

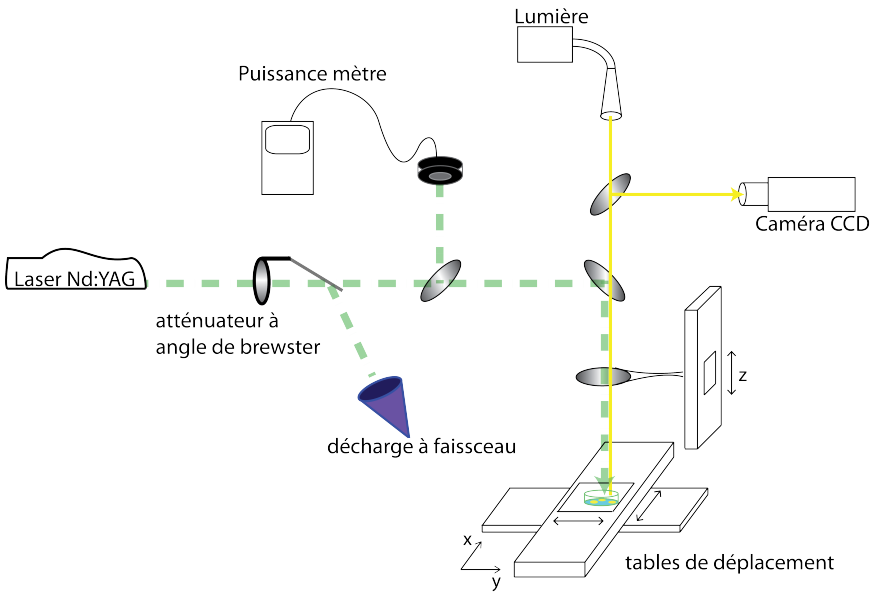

Figure 3.1 Schéma du montage laser utilisé pour l'irradiation des cellules

Le faisceau a été caractérisé à l'aide d'une caméra CCD et du logiciel d'analyse LBA-FW (Ophir-Spiricon, Ma, États-Unis). Le diamètre du faisceau est déterminé avec la méthode des 4 sigmas, qui définit la largeur du faisceau comme 4 fois σ (l'écart type de la distribution verticale ou horizontale du faisceau). Des diamètres de 400 μm, 800 μm et 1.6 mm (voir fig 3.2 ont été testés et l'efficacité maximale a été atteinte avec celui de 1.6 mm. C'est donc ce qui a été utilisé pour la majorité des résultats de ce mémoire. À titre comparatif, Baumgart *et al.* (2011) utilisent un faisceau de 650 μm de diamètre pour effectuer la même tâche avec un laser à impulsions femtosecondes.

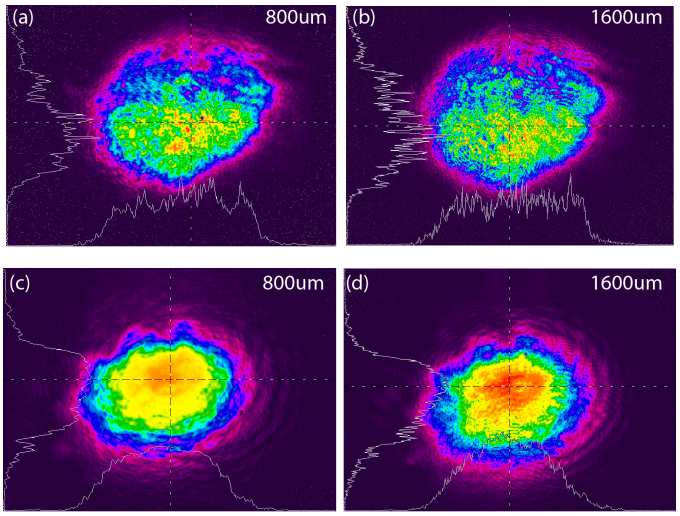

Figure 3.2 Faisceau laser à 532 nm (a, b) et à 1064 nm (c, d) pour 2 différentes grosseurs (le zoom a été ajusté). Le profil d'intensité est distribué de façon plus égale à 1064 nm.

3.2.2 Irradiation des pétris et mesures spectrométriques

Le pétri est placé sur la table de déplacement xy et il est observable grâce à un système d'imagerie composé d'une source, de lentilles grossissantes (10X) et d'une caméra CCD. Les pétris sont divisés en 3 zones de 5mmX5mm qui sont irradiées une à une en balayant l'échantillon sous le faisceau (voir fig 3.3). Chaque zone est irradiée avec une fluence différente. Les paramètres de balayage (pas en y et vitesse de balayage) sont très importants, car c'est ce qui déterminera la quantité d'énergie que les cellules et les AuNPs recevront. Si le pas en y est trop grand, il y aura des endroits non irradiées et s'il est trop petit il y aura une double irradiation aux endroits de superposition. Le pas optimal trouvé a été de 1.1 mm, ce qui donne une superposition de 500 μm des zones irradiées. La vitesse de balayage déterminera combien d'impulsions recevra chaque endroit. Les mesures spectroscopiques ont déterminés que 5 impulsions est la limite afin de minimiser la modification des AuNPs. La vitesse a donc été ajustée à 3 mm/s, afin d'obtenir environ 5 impulsions par endroit (avec un faisceau de 1.6 mm de diamètre) en négligeant la superposition d'une ligne à l'autre.

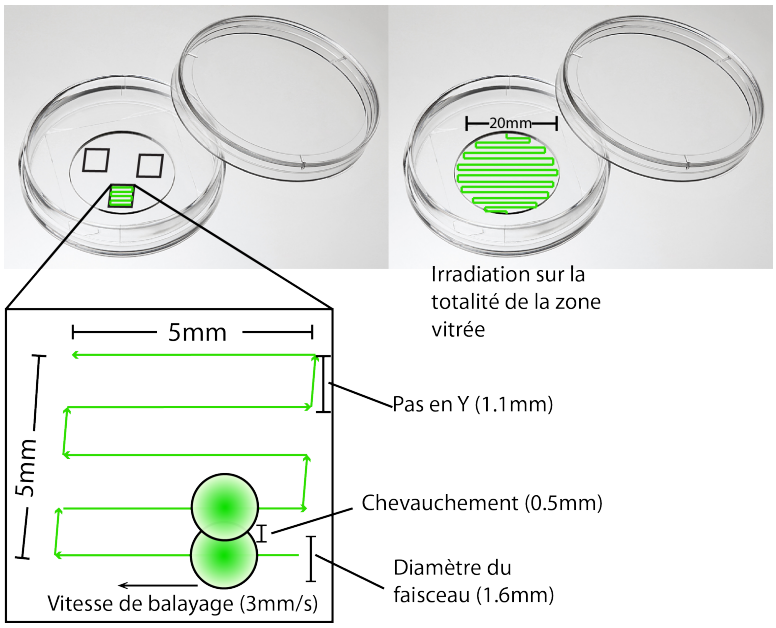

Figure 3.3 Image des pétris matek utilisés pour l'irradiation. Les trois zones sont dessinées sous le pétri et l'irradiation se fait à l'intérieur de celles-ci. Les différents paramètres reliées à l'irradiation sont aussi représentés.

Pour les mesures spectroscopiques, deux mL d'une solution de AuNPs à 60 $\mu g/mL$ sont placés dans une cuvette transparente. Une fibre optique illumine d'une lumière blanche la solution et une autre fibre récolte la lumière transmise de l'autre coté de la cuvette(voir fig 3.4). Le signal est par la suite transmis à un spectromètre (Oceans Optics, Florida, États-Unis) qui fournit les spectres d'absorption et de transmission de la solution en temps réel. Le faisceau, d'une grosseur de cinq mm de diamètre, arrive à 90° par rapport au plan des fibres optiques et il irradie la solution de AuNPs qui est constamment brassée par agitateur magnétique. La solution est irradiée pour plusieurs heures jusqu'à ce que le spectre d'absorption ne change plus.

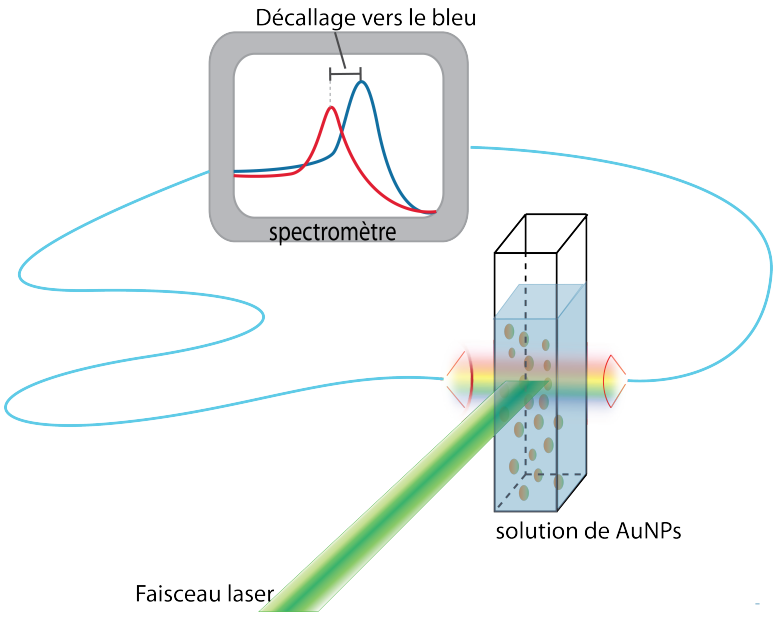

Figure 3.4 Schéma du montage du spectromètre qui permet de prendre des acquisitions lors de l'irradiation.

3.3 Analyse des résultats

3.3.1 Perforation et viabilité

Après l'irradiation, les cellules sont immédiatement rincées afin d'éliminer les fragments de AuNPs et le LY, puis elles sont remises à l'incubateur pour environ 1h. Elles sont ensuite colorées en ajoutant 1.5 μl de la solution d'iodure de propidium (IP) (Sigma-Aldrich, Ontario, Canada) dans le milieu pour obtenir une solution de 1,5 μM pour 10 minutes. Le Les cellules sont ensuite rincées pour retirer l'IP en extra, puis elles sont fixées en étant recouvertes d'une solution de formaldehyde (Sigma-Aldrich, Ontario, Canada) 3.6% pour 10 minutes. Le formaldehyde est retiré, les cellules sont encore rincées mais cette fois, c'est un mL PBS qui est remis sur les cellules. Finalement, 10 μl d'une solution de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) sont ajoutés dans le PBS pour obtenir une solution de 10 μM. Après 10 minutes, les cellules sont rincées une dernière fois et remises dans le PBS pour l'observation au microscope.

Chaque zone irradiée est couverte par 4 ou 5 images prises à l'aide d'un microscope à fluorescence inversé (Carl Zeiss, Toronto, Canada). De plus, 3 images sont prises à l'extérieur des zones irradiées, ce qui servira de contrôle. À chaque endroit photographié, 3 filtres sont subséquemment appliqués afin d'exciter et de récolter l'émission de chaque colorant indivi-

duellement (voir tableau 3.1), puis une photo en mode contraste de phase est prise. La figure 3.5 montre une partie d'une image en contraste de phase, le filtrage pour le DAPI et la filtrage pour le LY.

Tableau 3.1 Absorption et émission des colorants utilisés.

colorant	maximum d'absorption	maximum d'émission
DAPI	360 nm	460 nm
LY	428 nm	540 nm
IP	535 nm	620 nm

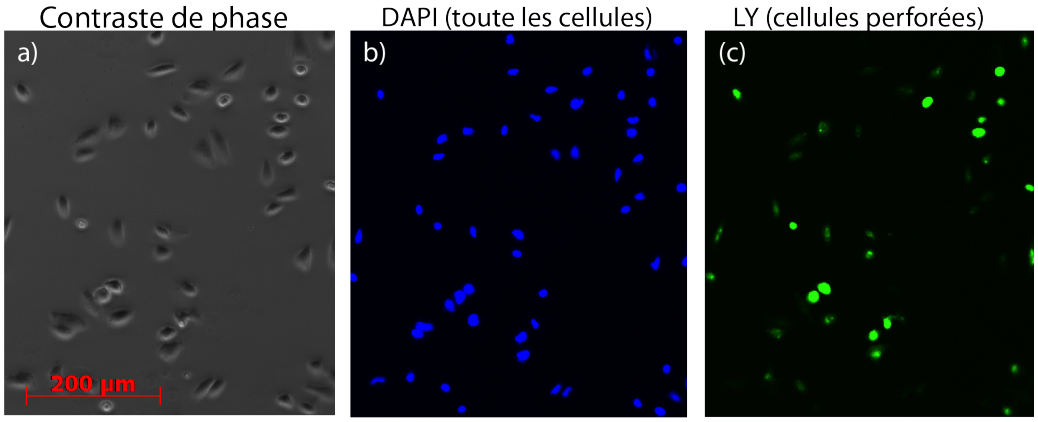

Figure 3.5 Exemple des différents filtres utilisés pour l'analyse des résultats. En (a) l'image en microscopie de contraste de phase, (b) canal filtrant pour le DAPI, l'ADN de toute les cellules est visible dans leur noyau, (c) canal filtrant le LY, on peut y voir toute les cellules qui ont été perforées. (les couleurs sont ajoutées manuellement puisque la caméra CCD du microscope n'enregistre que des mesures d'intensité par pixel.)

Le taux de perforation est déterminé par l'introduction de LY (qui se trouve dans le milieu durant l'irradiation) à l'intérieur du cytoplasme des cellules. La membrane est normalement imperméable à ce colorant, mais lorsque celle-ci est perforée durant le traitement, le LY peut alors pénétrer à l'intérieur de la cellule par diffusion et avec l'aide du jet entrant (voir figure 2.7 d).

Le nombre total de cellules présentes est mesuré avec le colorant DAPI. Celui-ci traverse les membranes cellulaire et se lie fortement à l'ADN de chacune des cellules.

La viabilité du traitement est évaluée de deux manières : par l'exclusion d'un colorant qui est normalement imperméable, l'IP, et par comparaison avec des images contrôles. l'IP est ajouté au milieu cellulaire une heure après le traitement et les cellules n'ayant toujours pas récupéré l'intégrité de leur membrane seront donc colorées et comptées comme mortes.

La perte de l'intégrité membranaire est un phénomène caractéristique de la nécrose.

La deuxième méthode pour évaluer la viabilité est de comparer la confluence des images contrôles à celle des zones irradiées. Lorsque des cellules sont traitées avec une fluence élevée, celles-ci peuvent décoller du fond du pétri et elles seront éliminées lors du rinçage, après le traitement. Ces cellules peuvent avoir été détruites, car les bulles créées étaient trop grosses, ou avoir perdu l'adhérence au pétri à cause de l'onde de choc créée par le laser ou les bulles de cavitation. La figure 3.6 montre la différence de confluence entre une zone contrôle et une zone irradiée par des impulsions de 532 nm à 70 mJ/cm^2.

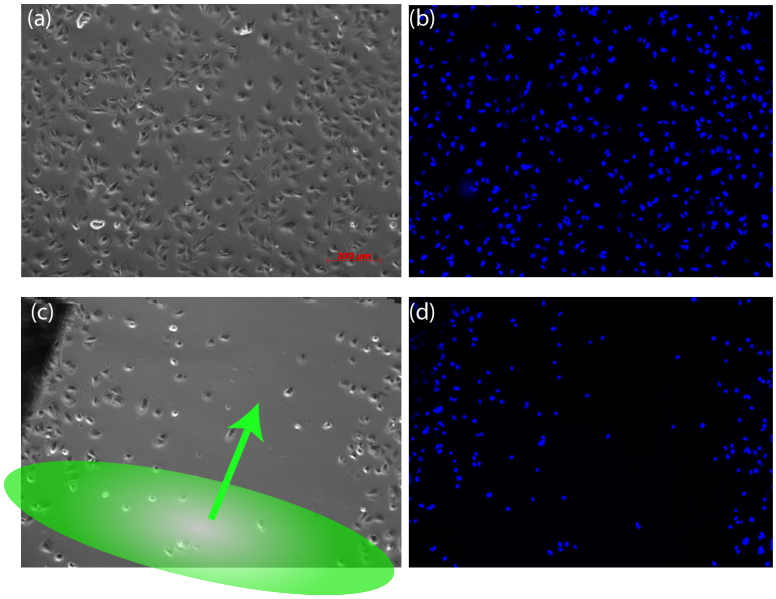

Figure 3.6 Exemple du changement de confluence suite à une irradiation laser. (a) et (b) proviennent d'une image contrôle tandis que (c) et (d) proviennent d'une image à l'intérieur d'une zone irradiée à 70 mJ/cm^2 par des impulsion de 532 nm.

Afin de prendre en compte ces cellules (que l'on considère comme morte), la moyenne des cellules sur les 3 images contrôles (M_{cont}) est comparée à la moyenne des cellules des images irradiées M_{irrad} (équation 3.2).

$$N_{supp} = M_{cont} - M_{irrad} \tag{3.2}$$

La différence, M_{supp}, est ensuite ajoutée au compte des cellules mortes, N_{mort}, et des cellules totales, N_{tot} (équations 3.5 et 3.7).
La fluorescence de fond pour chaque filtre est moyennée sur les 3 images contrôles et la moyenne plus un écart type est utilisé comme seuil inférieur pour déterminer si une cellule

est fluorescente. Le nombre de cellules fluorescentes par image est compté avec le logiciel d'analyse d'image, Image pro plus (Media Cybernetics, Inc., MD, États-Unis). Le total des cellules colorées au DAPI (N_{DAPI}), au LY (N_{LY}) et à l'IP (N_{IP}) sur les 5 images couvrant chaque zone est déterminé et utilisé pour fournir un taux de perforation et un taux de viabilité 2 heures après traitement.

Le taux de perforation, P, est calculé de la façon suivante :

$$P = \frac{N_{perfo} - N_{IP}}{N_{tot}} \tag{3.3}$$

où

$$N_{perfo} = N_{LY} \tag{3.4}$$

et

$$N_{tot} = N_{DAPI} + 5 * N_{supp} \tag{3.5}$$

Le 5 provient du nombre d'image. Les cellule toujours présentes mais dont la membrane est endommagée seront colorées par le LY et l'IP. N_{IP} est donc soustrait au nombre de cellules colorées afin de compter seulement les cellules vivantes dans le calcul de perforation. Le taux de perforation est calculé sur la totalité des cellules présentes avant le traitement (N_{tot}) et non sur les cellules encore vivantes après le traitement seulement.

La viabilité est déterminée comme suit :

$$V = 1 - \frac{N_{mort}}{N_{tot}} * 100 \tag{3.6}$$

où

$$N_{mort} = N_{IP} + 5 * N_{supp} \tag{3.7}$$

L'écart type est calculée entre toutes les images d'une même fluence. Les résultats de perforation et de viabilité sont présentés dans le chapitre suivant, à l'intérieur de l'article.

3.3.2 Spectrométrie

Durant l'irradiation de la solution de AuNPs, un spectre d'absorbance est enregistré à chaque seconde lorsque les changements de spectre sont rapides et à chaque minute pour les changements plus lents. Les changements rapides sont considérés comme ceux qui atteignent leur décalage maximal vers le bleu en moins de 30 minutes. Pour déterminer le centre du pic d'absorption, la fonction Matlab "mygaussfit" écrite par Yohanan Sivan a été utilisée (une copie du code est annexée). Un polynôme de degré 2 est ajusté sur la portion centrale du pic puis les paramètres de ce polynôme sont utilisés pour déduire les paramètres d'amplitude

(A), du centre du pic (μ), et de la largeur du pic (σ). Des spectres ont été pris au hasard et ajustés une deuxième fois mais avec l'outil d'ajustement de courbe "cftool" de Matlab. Le centre du pic a toujours été trouvé à moins de 0.1 nm du centre obtenu avec "mygaussfit". La figure 3.7 montre un exemple de la courbe d'ajustement sur l'pic initial ainsi que sur l'pic final d'une solution après une irradiation de 12 h à 1064 nm avec une fluence de 800 mJ/cm^2. Le décalage vers le bleu est égal à 43.8 nm. La théorie de Mie permet de relier la taille de nanoparticules sphériques en solution à leur spectre d'absorption (Mie, 1908). Le tableau 3.2 montre la relation entre des AuNPs de différentes grosseurs et la position de leur pic d'absorbance (valeur tiré de Link et El-Sayed (1999a)).

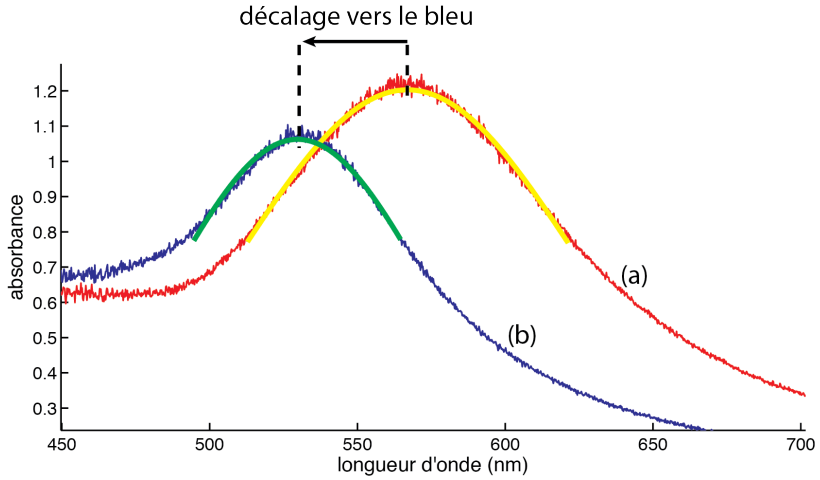

Figure 3.7 Spectre d'absorption avant (a) et après (b) irradiation de 800 mJ/cm^2 à 1064nm avec leur ajustement de courbe gaussienne. Le décalage vers le bleu est mesuré entre les deux centres des pics, ici un décalage de 43.8 nm a été mesuré.

Tableau 3.2 Relation entre la taille de AuNPs et la position du pic de leur spectre d'absorption.

Taille des AuNPs (nm)	Position du pic d'absorption
99	575
48	533
22	521
15	520
9	517

Ces résultats sont utilisés pour vérifier le changement de taille des AuNPs en fonction du temps d'irradiation et du nombre d'impulsions. La cuvette utilisée mesure 1cm d'épaisseur et le faisceau mesure 5 mm de diamètre, le volume irradié de la solution de AuNPs correspond donc à $\pi * r^2 * l = \pi * (0.25cm)^2 * 1cm = 0.20cm^3$. La cuvette contient 2mL de solution donc,

en assumant un brassage homogène et en négligeant l'absorption du faisceau dans le volume irradié, chaque NP de la solution sera irradié en moyenne un dixième du temps d'irradiation. ($V_{total}/V_{irrad} = 2cm^3/0.2cm^3 = 10$) . Ainsi, après chaque seconde, chaque NP aura reçu une impulsions ($frquencelaser = 10Hz$). La figure 3.8 montre la position du pic d'absorbance d'une solution de AuNPs de 100 nm irradiée à 1064 nm en fonction du temps. Afin de s'assurer d'un décalage de moins de 10nm (qui correspond à des AuNPs de taille de $\sim$ 90 nm) avec une fluence de 1 J/cm^2, 5 impulsions au maximum doivent être déposées sur les AuNPs.

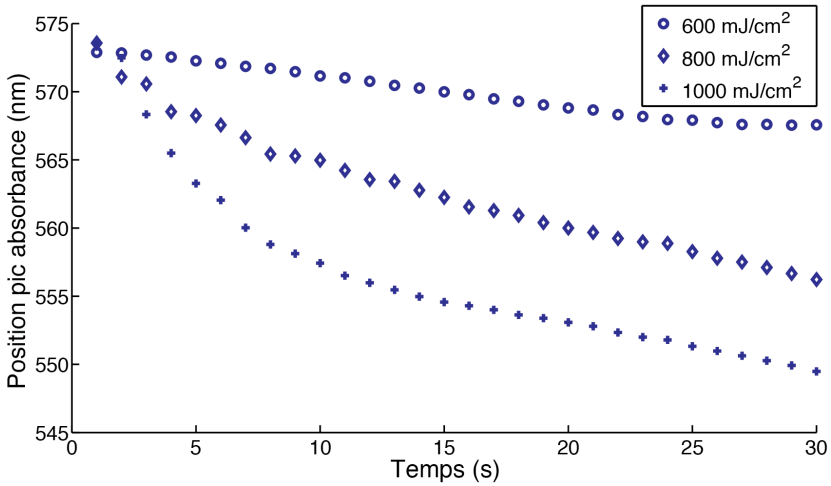

Figure 3.8 Position du pic d'absorption d'une solution de AuNPs de 100nm pour 30 secondes d'irradiation à 3 fluences différentes (impulsions à 1064nm).

La figure 3.9 montre la même relation mais pour une solution de AuNPs irradiée avec des impulsions de 532 nm. Le résultat est similaire à 1064 nm, avec 5 impulsions par NPs, on obtient un décalage maximal de 10 nm, les AuNPs seront donc légèrement affectées.

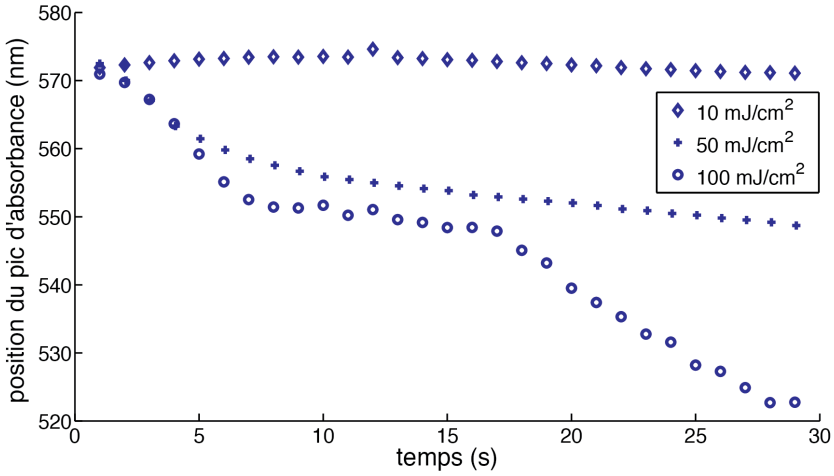

Figure 3.9 Position du pic d'absorption d'une solution de AuNPs de 100nm pour 30 secondes d'irradiation au fluence de 10, 50 et 100 mJ/cm^2 (impulsions à 532 nm).

Des données supplémentaires sur le décalage vers le bleu de chaque fluence étudiée sont fournies à l'annexe B

3.3.3 MTT

Les essais MTT sont basés sur la comparaison entre la quantité de formazan créée par les cellules traitées et celle créée par les cellules contrôles. La concentration de formazan dans chaque puits se mesure par une lecture d'absorbance. Le formazan montre un maximum d'absorption entre 550 nm et 590 nm, donc une mesure est prise à 570 nm. Une mesure référence est aussi prise à 690 nm (le formazan n'absorbe pas à cette longueur d'onde). Pour chaque plaque lue, le signal de la référence à 690 nm est soustrait au signal de chaque puits. Le signal obtenu de cette manière représente donc celui du formazan seulement. Ensuite, les signaux des quatre puits contrôles positifs sont moyennés ainsi que les signaux des 4 puits pour chaque longueur d'onde. Ces moyennes sont ensuite divisées par la moyenne contrôle afin d'obtenir un pourcentage de vitalité. Les barres d'erreur représentent l'écart type calculé sur les 4 puits contrôles et sur les 4 puits de chaque longueur d'onde puis propagé dans le calcul de la vitalité.

3.3.4 MEB

Les images MEB sont utilisées pour vérifier le dépôt de AuNPs et la taille de ceux-ci. Le nombre de AuNPs visibles par cellule est compté directement à partir des images. Les tailles avant et après traitement sont mesurées à partir du logiciel du MEB. Une moyenne de la

taille du diamètre des AuNPs est calculée pour les AuNPs ayants reçu cinq impulsions et pour ceux des échantillons contrôles, avec un écart type standard. La distribution des AuNPs pour chaque échantillon est aussi compilée.

CHAPITRE 4

Article : Visible and Near infrared resonance plasmonic enhanced nanosecond laser optoporation of cancer cells

Bastien St-Louis Lalonde, Étienne Boulais, Jean-Jacques Lebrun and Michel Meunier

Abstract: In this paper, we report a light driven, non-invasive cell membrane perforation technique based on the localized field amplification by a nanosecond pulsed laser near gold nanoparticles (AuNPs). The optoporation phenomena is investigated with pulses generated by a Nd:YAG laser for two wavelengths that are either in the visible (532 nm) or near infrared (NIR) (1064 nm). Here, the main objective is to compare on and off localized surface plasmonic resonance (LSPR) to introduce foreign material through the cell membrane using nanosecond laser pulses. The membrane permeability of human melanoma cells (MW278) has been successfully increased as shown by the intake of a fluorescent dye upon irradiation. The viability of this laser driven perforation method is evaluated by propidium iodide exclusion as well as MTT assay. Our results show that up to 25% of the cells are perforated with 532 nm pulses at 50 mJ/cm^2 and around 30% of the cells are perforated with 1064 nm pulses at 1 J/cm^2. With 532 nm pulses, the viability 2h after treatment is 64% but it increases to 88% 72h later. On the other hand, the irradiation with 1064 nm pulses lead to an improved 2 h viability of 81% and reaches 98% after 72h. Scanning electron microscopy images show that the 5 pulses delivered during treatment induce changes in the AuNps size distribution when irradiated by a 532 nm beam while this distribution is barely affected when 1064 nm is used.

4.1 Introduction

The membrane of eukaryote cell acts as a selective barrier between the cytoplasm and the extracellular space (Alberts *et al.*, 2009). Only small ions and molecules as well as some organic molecules may penetrate through the cell membrane. Large molecules such as synthetic pharmaceutical drugs or DNA plasmids cannot be introduced into cells easily without damaging cell integrity. Many research areas such as gene therapy as well as therapeutical research would greatly benefit from tools that efficiently allows internalization of such molecules into cells (Li et Huang, 2006; M *et al.*, 2012; A Whitehead et Langer, 2009; Florea *et al.*, 2009).

Viral vector is currently the method mostly used to introduce foreign material into cells but safety and immunogenicity concerns (Evans *et al.*, 2008; Lehrman, 1999) favored the development of alternative techniques to accomplish this task (Li et Huang, 2006; Pathak *et al.*, 2009). The main physical methods that have been developed include electroporation (Zhao *et al.*, 2006; Mir, 2009), direct injection (Zhang et Yu, 2008) and laser methods such as laser induced stress wave (Ogura *et al.*, 2004; Takano *et al.*, 2008), direct optoporation (Lei *et al.*, 2008; Baumgart *et al.*, 2008) and selective cell optoporation using light absorbing particles (Pitsillides *et al.*, 2003; Baumgart *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2005; Lukianova-Hleb *et al.*, 2012b). These methods however face major drawbacks. Electroporation may for instance yield low viability through irreversible electroporation (Sankaranarayanan *et al.*, 2011; Canatella *et al.*, 2001) while direct injection and direct optoporation treat one cell at a time leading to a very low throughput.

Using AuNPs, our research group has recently introduced a new high throughput technique for permeabilizing human cancer cells (Baumgart *et al.*, 2011). In this approach AuNPs are deposited on cell membranes and irradiated by weakly focused femtosecond (fs) laser pulses, resulting in a significant increase of membrane permeability. Because of its low side effects and high selectivity, this new promising technique is a very efficient, high throughput and virus-free method that has the potential for transfection and has wide applications in both *in vivo* and the clinic. The AuNPs have several unique characteristics that make them the best option for cell membrane optoporation, drug delivery (Farokhzad et Langer, 2009; Lukianova-Hleb *et al.*, 2012a; Pissuwan *et al.*, 2006) and laser activated nano thermolysis (Lapotko *et al.*, 2006a; Letfullin *et al.*, 2006; Lapotko *et al.*, 2006b) purposes. This uniqueness is due to the existence of a tunable localized surface plasma resonance (LSPR) described as a collective and coherent oscillation of free electrons at the surface of nanoparticles in resonance with an electromagnetic (EM) wave light of a specific wavelength (Link et El-Sayed, 1999b; Eustis et El-Sayed, 2006). The plasmon resonance results in an intense absorption and scattering of incident light, as well as highly localized field enhancement at the plasmon resonance wavelength. Other spectacular characteristics of AuNPs are the presence of a significant surface functionalization capability to conjugate biomolecules and other targeting moieties (Pissuwan *et al.*, 2006; Jain *et al.*, 2007; Tiwari *et al.*, 2011) as well as oxidation resistance, which maximizes their biocompatibility (Pissuwan *et al.*, 2006). In the technique described above, under irradiation, the AuNPs locally amplify the EM field which passes beyond the optical breakdown threshold and then leads to the formation of a cavitation bubble of submicron size. This bubble creates a nanometric pore on the cell membrane or simply disrupts the lipid membrane and increases permeability to allow the introduction of

extracellular cargo (Lukianova-Hleb *et al.*, 2012a). While this technique presents numerous advantages, it uses a femtosecond laser that occupies a large area, is complicated to operate and has heavy costs. In order to increase its accessibility and decrease its cost, we adapted the process to a Nd:YAG nanosecond pulsed laser.

Other groups have exploited the plasmon resonance excited by nanosecond laser for the same purpose: Lin et al (Pitsillides *et al.*, 2003) were amongst the first to demonstrate the permeability increase of cell membrane with plasmonic particles in 2003, Lapotko group used it to create plasmonic nano bubbles that selectively kill cancer cells (Lapotko *et al.*, 2006a,b) and to transfect single J32 cell with a GFP plasmid (Lukianova-Hleb *et al.*, 2011). Yao et al. have studied the influence of the laser parameters on the membrane permeability (Yao *et al.*, 2005, 2009). However, all these studies have been realized at a wavelength of 532 nm which is near the LSPR peak of spherical AuNPs. In this paper, we demonstrate the possibility of cell optoporation when the nanosecond pulsed laser wavelength is off resonance at near infrared (NIR) regime (1064 nm). The advantage of this approach is that when irradiated by NIR radiation, biological tissues present a low absorption coefficient as well as a low scattering coefficient thus minimizing the heat transferred by the EM wave to the cells. In addition, this approach maximizes the penetration depth thus opening the possibility to reach sub layer cells on *in vivo* specimens. Bashkatov et al. (Bashkatov *et al.*, 2005) has measured that the penetration depth in human skin is 0.9 mm at 532nm while it is 3.3 mm at 1064 nm.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Laser set up

Laser irradiation was performed with a Q-switched Nd:YAG laser (Brilliant B, Quantel, France) delivering pulses of 15 ns (for 532m) and 75 ns (for 1064 nm) at a repetition rate of 10Hz. The 1 cm diameter beam is directed to the sample where a 150 mm focusing lens (Throlabs, Newton, New Jersey) fixed on a micrometric stage allows adjusting the beam diameter to 1.6mm at the sample plane. The petri dish is scanned at a speed of 3mm/s with 1.1 mm step between lines by two micrometric translation stages (Throlabs, Newton, New Jersey) controlled by computer. The irradiation is made on 3 regions of interest ($25mm^2$) in the petri, each region takes 2 minutes to irradiate, enabling the treatment of a large number of cells in very short time.

4.2.2 Cell preparation

Human melanoma cells (MW278) are routinely cultured in RPMI1640 supplemented with 10% FBS, L-glutamine and antibiotics (Invitrogen, Burlington, ON) in a 37 °C humidified incubator (5% CO2, 95% air). Prior to experiment, the cells are plated on a glass bottom culture dish (MaTek Corporation, Ashland, MA) to obtain a cell density of 70-80% at irradiation time. 100 nm gold nanoparticles (Nanopartz, CO, USA) are deposited on the cells to a final concentration of 8.3ug/mL and they are incubated for a period of 4 hours. Before irradiation, the cells are washed with PBS to remove NPs that did not attach to the cell membrane. The extracellular cargo to be inserted in the cells is then mixed to the cell medium. For permeability measurements we added a small fluorophore, Lucifer yellow (LY, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario), to a concentration of 0.3 mM. LY was not added in medium for MTT assays and SEM experiments.

4.2.3 Fluorescence microscopy

Two hours after treatment, cells are treated with Propidium Iodide solution (PI, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) at concentration of 1.5 uM to allow the identification of damaged cells with perforated membranes. They are then washed with PBS and fixed with 3.6% formaldehyde solution (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario). After another PBS washing, cell nuclei are stained with DAPI (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) at 1uM. An observer Z1 microscope (Carl Zeiss,Toronto, Ontario) is used to take picture with a 10X objective. Each 25 mm^2 zone is covered with 4-5 photos of each fluorescent channel and 3 control images (out of irradiated zones) are taken. Statistics are then calculated with minimum 3 different zones per fluence.

4.2.4 MTT assay

The cells are seeded in 12 wells plates 24h before experiment. After irradiation, 150 uL of MTT solution (3 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) is mixed to each well. Plates are then protected from external light with aluminum foil and placed at 37°C, 5% CO_2 for another 3 h. Afterward, the medium is replaced with 0.5mL of solubilisation solution (0.1 N HCL in isopropanol) and the plate is weakly shaken for 5min. The plate is then read with an Epoch microplate reader (Biotek instruments, Vermont, USA) in absorption mode at 570 nm with a reference at 690 nm.

4.2.5 Analysis

Fluorescent cells of each color are counted with the Image pro plus program (Media cybernetics, Washington, USA). A mean fluorescence background is calculated for the LY and PI fluorescence channel from the 3 control images in each petri dish and the detection threshold is set at the mean plus one standard deviation. Since many cells detach from the petri dish during irradiation, an adjustment is made by comparing the number of cells in the control image and the ones in irradiated zones. The viability is calculated as follow: $[1 - (N_{PI} + N_{adjust})/(N_{DAPI} + N_{adjust})] * 100\%$ and the perforation rate: $N_{LY}/(N_{DAPI} + N_{adjust}) * 100\%$. The standard deviation is then calculated from all the images of a same fluence.

4.2.6 SEM

After the treatment, the cells are washed with PBS and 30 min later they are fixed with a 5% glutaraldehyde solution during 1h. They are then washed with distilled water and dried under a laminar hood overnight. The next day, they are coated with a 5nm gold layer and observed with a Quanta 200 SEM (FEI, Oregon, USA) in high vacuum mode.

4.3 Results

4.3.1 Perforation and viability

Human melanoma cells are grown to a density of 70-80% confluence on glass bottom petri dish. First, the effect of the laser on cells without NPs was verified. Fig.4.1 (a and b) shows the constant viability (above 95%) for 532nm and 1064nm pulses over the fluence ranges of interest. The perforation rate is lower than 3% for each wavelength.

Prior to irradiation, cells are incubated for 4h with 100 nm diameter AuNPs. Afterward, the cells are washed with PBS and the attached NPs are found near the cell membrane either as small cluster or individually. LY fluorophore is added to the cell solution and the cells are placed on the translation table. The laser is defocused to a spot of 1.6 mm in diameter and each 25 mm^2 zone are scanned under the laser at the speed of 3 mm/s with a line to line step of 1.1 mm. The laser operates at 10Hz and, every cell receives approximately 5 laser pulses (neglecting the overlaps in the line to line step). This scanning technique enables a large number of cells to be treated in a very short time lapse. Thus, the irradiation time of a 25 mm^2 takes 2 minutes while the irradiation of a complete petri dish of 314 mm^2 takes 8 minutes.

To determine the optimal fluences and to demonstrate the membrane perforation, we studied the LY intake efficacy as a function of the applied fluence, defined as the energy delivered per unit area (mJ/cm^2). Cells alone irradiated with the laser at 532 or 1064 nm are impermeable to LY. The same scenario applies to cells loaded with NPs but not irradiated. A fluorescence background from untreated cell is determined for each petri and only treated cells that shows fluorescence above one standard deviation (calculated from the 3 control images) from this threshold are considered successfully perforated.

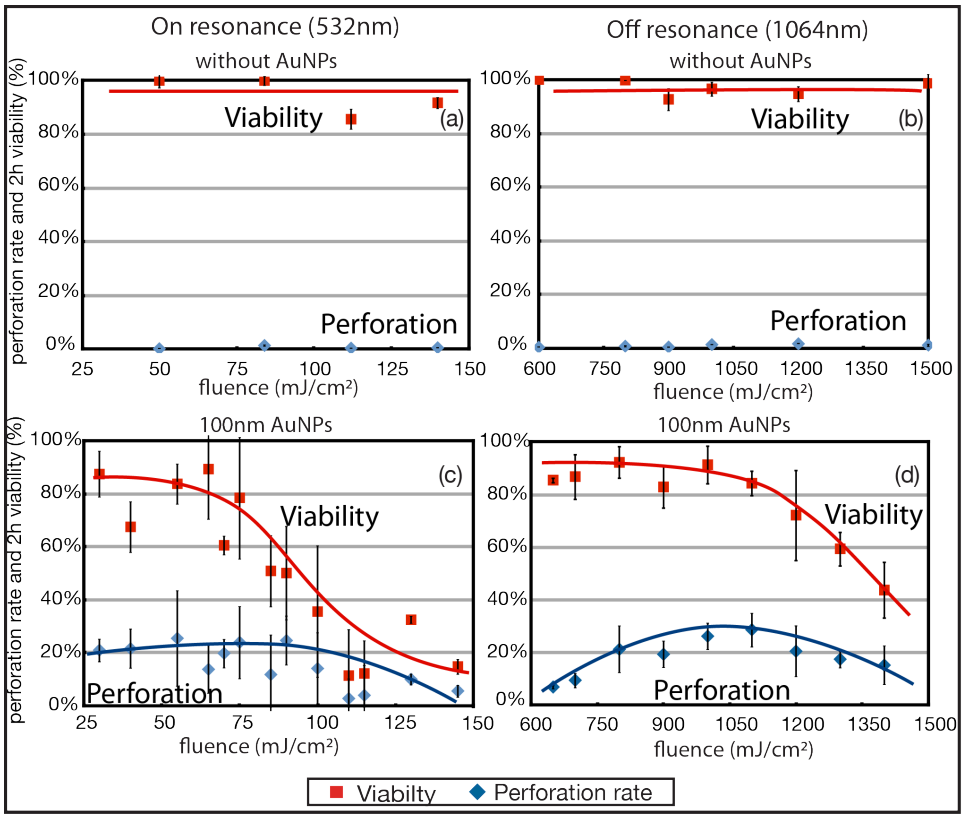

Figure 4.1 Permeabilisation rate measured by LY introduction in melanoma cells and 2h viability (by PI exclusion) in the operating range of fluence for 532 nm and 1064 nm wavelenghts. (a) and (b) are cells irradiated without AuNPs while (c) and (d) represent cells with 100 nm AuNPs. (n=3 or 4, the error bars represent the standard deviation)

Irradiation with 532 nm pulses did not require high laser energy since 532 nm is in the absorption peak of 100 nm spherical nanoparticles. Fluences from 25 to 70 mJ/cm^2 were enough to perforate and enable LY intake in more than 20% of the total irradiated cells while maintaining a viability between 65% and 85%. Above 100 mJ/cm^2, most of the cells either die by large membrane disruption or they detach from the irradiated zones. The detached

cells are counted in the viability as described in section 4.2.5. The optimal fluence that kept 83 ± 8 % of the cells alive while permeabilizing 26 ± 18 % of them is situated at 55 mJ/cm^2. These results give an energy threshold that could enable one to design an experiment aimed either at killing harmful cells or, alternatively, treating them with exogenous materials by controlling their membrane permeability. The threshold energy corresponding to a viability of 50% is located at 85 mJ/cm^2.

However, finely controlling the fluence at the irradiation plane is not trivial since it is directly dependent on the energy emitted from the laser and on the size of the laser beam at the sample plane. A little offset in those parameters would kill the cells instead of only perforating them. The large error bars seen on Fig 4.1(c) reflect this situation. For this reason, we decided to use a wavelength which is weakly absorbed by the AuNPs. The NIR wavelength, 1064nm, is available on a Nd:YAG laser as the fundamental frequency.

Fig. 4.1(d) shows the perforation rate and viability as a function of the delivered fluence. Compared to irradiation at 532 nm, the viability is less affected by small changes in fluences. The viability remains around 85% up to 1050 mJ/cm^2 and decrease to 44% at 1.4 J/cm^2. The perforation rate increases from 6% at 650 mJ/cm^2 to 29% at 1.1 J/cm^2 and then decreases to 15% for 1.4 J/cm^2. The optimal fluence is situated at 1.1 J/cm^2 where 29 ± 8% of the cells are perforated although we obtain excellent results from 1 to 1.1 J/cm^2. Viability is higher at 1064nm and more stable even if the fluence used is approximately 15X higher. The 50% viability threshold for this wavelength is situated at 1.4 J/cm^2.

4.3.2 MTT assays

The viability shown on Fig. 4.1 represents the viability taken 2h after treatment by PI exclusion. However, since this experiment assesses only membrane integrity, it gives no information about the internal cell metabolism. To address this point, we conducted MTT cell vitality assays on cells irradiated with 50 mJ/cm^2 for 532 nm and 1 J/cm^2 for 1064 nm pulses. This biological assay specifically measures mitochondrial activity of the cells, allowing for a quantitative measurement of cell vitality. The irradiation conditions are equivalent to the one used for optoporation (cells are loaded with the same AuNPs concentration but no external cargo is added to the solution). Visually, small changes in the shape of the irradiated cells were observed as they were more rounded than the control cells (see Fig. 4.2 (b)). Most cells however came back to their normal elongated shape after 24 h.

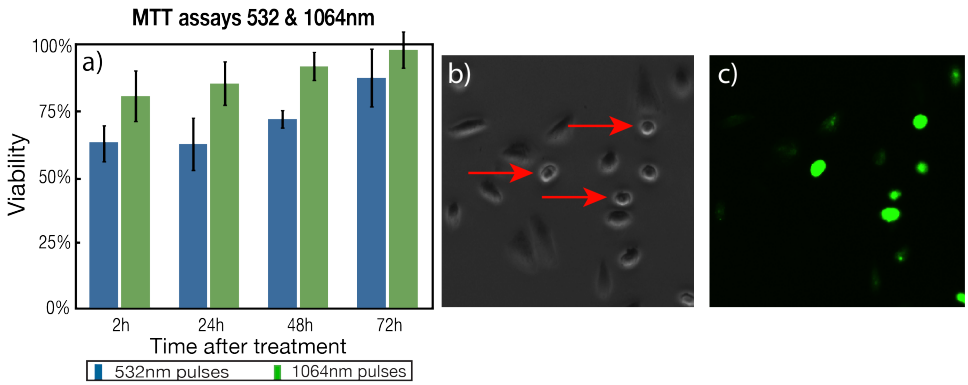

Figure 4.2 a) Comparison of MTT assay for both lasers up to 72h after treatment. The cells were able to fully recover without any noticeable effect (n=4, the error bars represent the standard deviation, results from 2 independent experiences). b) Phase contrast image showing rounded cells (red arrows) after treatment and c) corresponding fluorescent image showing intake of LY

For both wavelengths, MTT cell vitality measurements at 2h, 64 ± 7% and 81 ± 10% for 532nm and 1064nm respectively, are lower than the viabilities evaluated by PI exclusion and control images (84 ± 8% and 91 ± 7% respectively). MTT assay gives information about the cells metabolic activities by measuring the amount of formazan produced by dehydrogenases and reductases mitochondrial enzymes. This result indicates that even if the cells are present and their membrane is intact, their internal metabolism might be slowed down or malfunctioning. The difference is more significant at 532nm where there is a 20% difference. However, the vitality gradually increases over time and reaches 88 ± 11% and 99 ± 7% after 72h for 532nm and 1064 nm respectively. This increase indicates that cells have recovered after irradiation and that they survived and are proliferating, indicating that their metabolism is back to normal.

4.3.3 Nanoparticles transformation

SEM measurements were performed to monitor the status of the AuNPs during the treatment. Baumgart et al (Baumgart *et al.*, 2011) recently showed by spectroscopy and SEM that AuNPs stayed intact with fluences up to 600 mJ/cm^2 with a femtosecond laser. However, AuNPs have been reported to undergo size reduction when irradiated by nanosecond laser (Inasawa *et al.*, 2005; Takami *et al.*, 1999). The size reduction may also be accompanied by the creation of smaller fragments (< 10 nm). These small fragments may intercalate between DNA segments and induce genetic problems and morphological changes for doses as low as 10 ug/mL (Schaeublin *et al.*, 2011). It is therefore crucial to determine if the size reduction process takes place during the treatment.

The integrity of the AuNPs has been verified with SEM images taken before and after the treatment. The irradiation was performed at fluences of 50 mJ/cm^2 at 532 nm and 1 J/cm^2 at 1064 nm. 30 minutes after the treatment, the cells are fixed with glutaraldehyde. The next day, the samples are covered with a 5 nm gold layer and observed in high vacuum mode with the SEM. Fig. 4.1 (left) shows cells loaded with NPs before the laser treatment.

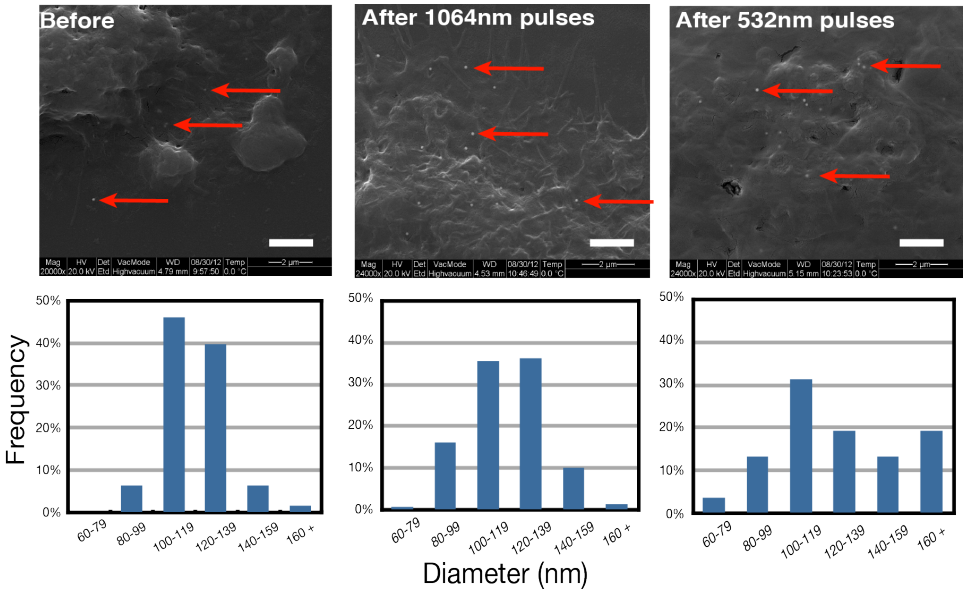

Figure 4.3 SEM images showing AuNPs (red arrows) on cells before and after treatment with their size distribution for both wavelengths. Bar is 2 μm. (n=2, results from 2 independent experiences)

We can see single AuNPs as well as clusters of 2 and 3 AuNPs just underneath the membrane. Fig. 4.3 (center and right) shows cells that have been irradiated by 532 nm and 1064 nm pulses. The AuNPs diameters have been measured with the SEM software and no significant difference in the AuNPs mean diameter have been found between the irradiated and non-irradiated sample. The mean diameter of NPs before treatment is 120 $\pm$ 16 nm while it is 128 $\pm$ 33 nm when treatment is performed with 532 nm pulses and 117 $\pm$ 20 nm for 1064 nm pulses. However, the size distribution of irradiated samples shows a more disperse population as seen on Fig. 4.3. This suggests that the AuNPs undergo small transformations. This may lead to the creation of small fragments which could be harmful for cells. However, the MTT assays show positive results which indicate that the effect of small fragments might be negligible. The 532 nm treatment modifies the AuNPs size to a greater extent than the 1064 nm treatment.

4.4 Discussion

4.4.1 Effect of pulse width: Femtosecond vs nanosecond pulses

The interaction mechanisms between a pulsed laser and AuNPs is a complex process highly dependent on the pulse wavelength, duration, energy and intensity. High intensity fs pulses can be used to induce non-linear absorption of the laser energy in the plasmonic enhanced near-field in the vicinity of the AuNPs, creating a nanoplasma. For instance, we have previously used 100 mJ/cm^2 45 fs off-resonance 800 nm pulses to perforate cells (Baumgart *et al.*, 2011). This fluence yields a local intensity that reaches $\sim 4 * 10^{13} W/cm^2$ in the near-field where the field enhancement is calculated to be around 4.5 from the Mie theory. Referring to Vogel et al., this intensity is sufficient to induce important plasma production as the optical breakdown occurs for intensity of $10^{13} W/cm^2$ (Vogel *et al.*, 2005). An electron plasma is hence produced by a combination of photoionization and impact ionization (Boulais *et al.*, 2012). This plasma transfers its energy to the water molecules very rapidly through collision and recombination processes, yielding large pressure wave and vapour bubbles around the AuNPs. For femtosecond pulse, the energy deposition step is clearly separated from the release of heat to the environment and the cavitation bubble dynamic.

For the nanosecond pulses used at 532nm and 1064nm, multiphoton absorption is not expected as the intensity does not reach the optical breakdown threshold. At the optimal fluence (50 mJ/cm^2 for 532 nm and 1 J/cm^2 for 1064 nm), the near-field intensity reaches $1.5 * 10^7 W/cm^2$ and $1.8 * 10^8 W/cm^2$ for 532 nm and 1064 nm irradiation while considering the field enhancement. These values are many orders of magnitude below the intensity threshold for optical breakdown calculated by Vogel et al. ($6 * 10^{11} W/cm^2$ for 532 nm and $2 * 10^{11} W/cm^2$ for 1064 nm) (Vogel *et al.*, 2005). The main mechanism of heat transfer to the surrounding environment is in consequence expected to be energy absorption by the AuNPs with subsequent conduction transfer through the NP/environment interface. Bubble nucleation is usually expected to occur from phase explosion as the temperature approaches the critical temperature (Vogel et Venugopalan, 2003). As bubble nucleation occurs in 100 ps-1 ns, energy deposition for nanosecond laser pulse overlaps with heat transfer and bubble growth around the NPs. In particular, the vapor bubble will quench the energy absorption by the NPs by intense scattering and modification of the resonance condition. The vapor layer also insulates the surrounding environment from the particle, so that plasmon nanobubbles induce highly localized mechanical damage to the surrounding cells (Lukianova-Hleb *et al.*, 2010a).

4.4.2 Effect of wavelength: On (532nm) vs off (1064nm) resonance in the nanosecond regime

Plasmon resonance for AuNPs peaks around 530 nm, leading to a strong absorption and scattering, when NPs are irradiated at 532 nm. However, for an irradiation wavelength of 1064 nm, the AuNPs are considered off-resonant and both absorption and scattering efficiencies are strongly reduced ($\sigma_{abs}(532nm) \approx 100\sigma_{abs}(1064nm) and \sigma_{scat}(532nm) \approx 370\sigma_{scat}(1064nm)$). It is expected that higher fluences are required to achieve perforation of the cell membrane at 1064 nm than at 532 nm. Results presented in Fig. 4.1 hence show that the fluence necessary to achieve efficient perforation using a 1064 nm pulse is 20 times higher than for the 532 nm pulse.

Cavitation bubble created with nanoseconds pulses at 532 nm have been observed and extensively studied (Lapotko *et al.*, 2006b; Lukianova-Hleb *et al.*, 2010b; Kitz *et al.*, 2011; Lukianova-Hleb *et al.*, 2010a) but so far no study, to our knowledge, have reported bubbles created with ns pulses at 1064 nm. Using the optical set-up described in (Lachaine *et al.*, 2012), preliminary data shows the generation of nanobubbles with 1064 nm pulses but only for fluences above 10 J/cm^2. It is therefore uncertain that cavitation occurs at the fluence used for optoporation (1 J/cm^2). The mechanism leading to membrane permeabilization with the 1064 nm pulses is thus still unclear and might be related to heating only instead of cavitation bubble induced shear stress. A similar mechanism has been reported by Nikolskaya et al. (Nikolskaya *et al.*, 2006) in their study of membrane permeabilization with a continuous diode laser. No vapor bubbles were associated with the permeabilization process and they proposed heating of phenol red and other absorbing dyes as the main mechanism for permeabilization. Further studies are required to determine the near infrared plasmonic enhanced laser optoporation process.

4.5 Conclusion

We demonstrate that membrane permeabilization with AuNPs irradiated by off LSPR nanosecond pulses (1064 nm) is achievable and, in our case, yields to slightly improved results compared with on resonance 532nm wavelength irradiation. Both wavelengths generate optimal perforation rate above 25% but the 1064 nm pulses provide better viability according to MTT and PI exclusion tests. The viability is sligthy affected at the optimal fluences where it reaches 88% for 532 nm pulses and 98% for 1064 nm 72h after treatment. Damage to AuNPs following irradiation with 532 nm pulses are slightly more important when compared to 1064 nm pulses at the treatment fluence. The range for effective perforation with

1064nm pulses is 10X broader than with 532 nm, which represents an important technical asset since it requires less control of the parameters to achieve efficient perforation. In addition, the optoporation throughput is relatively high, with the treatment of 10000 cells/min.

As the cell permeabilization mechanism for the 532 nm wavelength is associated to the production of nanoscale vapor bubbles around the AuNPs, the situation is less clear with 1064 nm irradiation, where permeabilization seems associated to a heating process, much similar to the case of continuous laser optoporation. When compared to off-resonance ultrafast laser optoporation, nanosecond off-resonance optoporation is shown to be less efficient (30% compared to 70% from our previous studies (Baumgart *et al.*, 2011)). The viabilities of the two methods are comparable even though nanosecond pulses induce small transformation on the AuNPs. However, the relatively high cost and complexity of ultrafast laser justifies the interest for nanosecond off-resonance plasmonic enhanced cell transfection.

Acknowledgment This work is supported by "Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies" (FQRNT). The authors also thank Yves Drolet for technical support and Rémi Lachaine, Ali Hatef and Judith Baumgart for fruitful discussions. The authors also greatly appreciate the help of Laure Humbert for the preparation on biological samples.

CHAPITRE 5

Discussion Générale

Une technique de perméabilisation membranaire idéale doit comprendre des caractéristiques spécifiques telles qu'une bonne viabilité des cellules traitées, un haut rendement, un haut taux de perforation ainsi qu'une haute spécificité. La perforation par laser nanoseconde amplifié à l'aide de nanoparticules plasmoniques permet de maintenir une bonne viabilité et d'obtenir un haut rendement. Toutefois, certains aspects, tels le taux de perforation et la spécificité, nécessitent une amélioration. Chacun de ses aspects est révisé dans cette section et une comparaison avec d'autres techniques est fournie.

5.1 Viabilité

Un des points critiques lors de l'élaboration d'une technique de perméabilisation membranaire est la viabilité des cellules face au traitement proposé. Le processus doit se faire en douceur et la cellule ne doit pas avoir de difficulté à récupérer. Avec les paramètres optimaux, le traitement laser induit peu de mortalité immédiatement après l'irradiation et la vitalité des cellules monte jusqu'à 99% après 72 h.

Le premier point à vérifier est l'effet qu'aura le laser lorsqu'il sera irradié sur les cellules. Des tests d'exclusion d'IP effectués sur des cellules irradiées sans nanoparticule prouvent que le laser n'occasionne aucun dommage (voir figure 4.1 a et b), du moins sur une monocouche cellulaire *in vitro*, et ce, autant à 532 nm qu'à 1064 nm. Les nanoparticules, qui sont souvent vues comme une source potentielle de cytotoxicité, ont un effet minimal sur la viabilité (moins de 1%), comme l'ont démontré Baumgart *et al.* (2011) en utilisant exactement le même protocole de déposition et d'incubation. Par contre, ce sont surtout les AuNPs de petites tailles ($<$ 20 nm) qui affectent la viabilité des cellules. Comme des impulsions nanosecondes induisent normalement une diminution de taille et un changement de forme (Link *et al.*, 2000; Inasawa *et al.*, 2005; Takami *et al.*, 1999), il est primordial de vérifier si le traitement donne lieu à de tels phénomènes. Cet aspect est discuté en détail dans la section 5.3 et il a été montré que le peu d'impulsions utilisées lors du traitement affecte peu les AuNPs.

La cytotoxicité est donc associée à l'effet d'amplification du champ électromagnétique par les nanoparticules plasmoniques. Il a été montré par Kitz *et al.* (2011) ainsi que Lukianova-

Hleb *et al.* (2010b) que le temps de vie et la grosseur des bulles de cavitation créées par l'interaction laser-AuNPs sont directement proportionnels à la fluence du laser (pour des impulsions de 0.5 ns à 532 nm). Des bulles de large diamètre risquent d'endommager sérieusement la cellule, surtout s'il y en a plusieurs par cellules. L'action additionnée de toutes ces bulles peut faire éclater la membrane ou l'endommager de façon irréparable. Par contre, si les pores formés dans la membrane sont suffisamment petits, la cellule sera en mesure de les refermer et sa viabilité n'en sera pas affectée. Il y a donc un compromis à faire entre la grosseur de bulle qui permettra de perforer le maximum de cellules et celle qui les tuera. L'emplacement des AuNPs lors de l'irradiation joue aussi un rôle crucial. Si ceux-ci se retrouvent à l'intérieur des cellules, ils risquent d'endommager les organites ou de lyser la cellule. Leur distribution à travers le pétri doit aussi être le plus égale possible afin de retrouver des AuNPs en quantité égale sur chaque cellule.

La principale source de mortalité dans les expériences de perforation avec le laser nanoseconde provient de la différence de confluence entre les zones irradiées et les zones contrôles, ceci représentent les cellules qui ont été lysées ou décollées durant l'irradiation. Les cellules qui sont toujours présentes dans les zones traitées, mais dont la membrane est compromise, représentent moins de 5% de la mortalité. Les cellules décollent du fond du pétri lorsque les molécules d'adhésion cellulaire (cadhérines, intégrines, sélectines) sont compromises. Les molécules d'adhésion cellulaire peuvent être compromises lorsque les cellules sont poussées par une force externe ou lorsqu'elles sont en apoptose ou en nécrose. Lors de l'irradiation, certaines cellules peuvent être poussées par des bulles de cavitation ou des ondes de choc créées par des AuNPs qui sont à proximité de celles-ci ou sous leur membrane. La figure 5.1 montre que de telles configurations peuvent se retrouver dans les pétris incubés avec des AuNPs. Des tailles de bulles entre 1 et 5 μm ont été rapportées par Kitz *et al.* (2011) ce qui pourrait être suffisamment gros pour faire décoller une cellules.

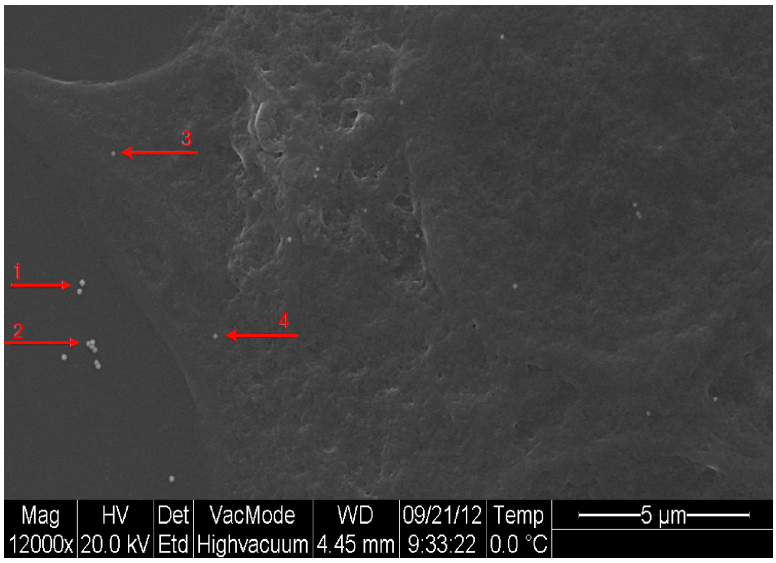

Figure 5.1 AuNPs (flèches rouges) en bordure d'une cellule (1,2) et sous la membrane (3,4)

Les taux de viabilité 2h après irradiation sont montrés sur la figure 4.1 c et d pour les deux longueurs d'onde. Lorsque les impulsions utilisées sont de 532nm, l'absorption du laser par la NP est maximisée (en résonance). Le réglage de la puissance est alors cruciale, car la fluence moyenne ne doit pas dépasser 75 mJ/cm^2 afin de maintenir un taux de viabilité supérieur à 50%. Dans les conditions expérimentales utilisées, ceci représente une énergie sortante du laser de seulement 16 mW. À 21.5 mW, moins de 40% des cellules survivent. Avec des impulsions de 1064 nm, la viabilité reste stable sur une plus large plage de fluence. À partir de 1.1 J/cm^2 elle descend d'environ 12-13% à chaque tranche de 100 mJ/cm^2. Ainsi, une petite fluctuation d'énergie sera moins dommageable pour les cellules. Afin d'obtenir un haut rendement, les cellules sont traitées avec un large faisceau (diamètre $>$ 1 mm). La distribution d'énergie gausienne du faisceau fera en sorte que plusieurs cellules seront irradiées par des énergies différentes. Il est donc préférable d'utiliser la longueur d'onde qui minimise les effets associés aux différences d'énergies d'irradiation (voir figure 3.2).

Les taux de viabilité atteints sont comparables aux techniques qui offrent les meilleurs taux de viabilité post traitement telle que l'optoporation direct par laser ou l'électroporation réalisé dans les meilleurs conditions possibles.

Les essais MTT renseignent sur l'activité métabolique de la cellule par la présence de formazan qui est créé par la réduction de tétrazolium par la succinate déshydrogénase mitochondriale. Plus la cellule est active, plus il y aura de succinate déshydrogénase mitochondriale et donc plus de formazan. Tel que montré sur la figure 4.2, 2h après l'irradiation, les mesures

de vitalité par essais MTT montrent un résultat entre 10 et 20% plus bas que la méthode de viabilité qui compte seulement le nombre de cellules présentes (exclusion IP et image contrôle). Cette différence suggère que l'activité métabolique des cellules est ralentie suite à l'irradiation. Ceci peut être causé par le fait que les cellules sont soumises à des conditions de stress durant le traitement ; elles peuvent perdre leurs contacts avec les cellules voisines, perdent un peu de leur adhérence, leur milieu est changée, etc... Elles doivent donc retrouver leur équilibre avant de recommencer leurs activités. La différence est plus importante à 532 nm qu'à 1064 nm ce qui indique que le traitement à cette longueur d'onde est plus agressif que celui à 1064 nm. Les bulles peuvent être plus grosses, les onde de choc créées plus importantes ou la chaleur transféré au milieu plus élévée. De plus, le faisceau laser à 532 nm comporte plusieurs pics d'intensité (voir figure 3.2) ce qui risque d'affecter les cellules de façon inégale.

Par la suite, la vitalité augmente graduellement ce qui peut indiquer deux résultats ; il y a un plus grand nombre de cellules irradiées que de cellules contrôles (possible si le groupe traité se reproduit plus vite que le groupe contrôle) et/ou les cellules irradiées sont plus actives que ceux des puits contrôles (ex : elle sont en train de migrer, de se diviser ou de produire du matériel cellulaire qui a été perdu ou détruit durant le traitement). Bref, ceci indique que les cellules sont toujours opérationnelles. Les deux longueurs d'onde semblent donc ne pas affecter la machinerie interne des cellules car celles-ci continuent d'être actives jusqu'à 72 h après le traitement.

La vitalité à long terme est difficilement comparable aux autres techniques car très peu d'études, à ma connaissance, ont prises cet aspect post traitement en considération.

5.2 Perforation

Le taux de perforation indique le nombre de cellules vivantes qui ont incorporé le colorant. Lorsqu'une cellule est perforée, celle-ci échange une partie de son cytoplasme avec le milieu extérieur. La quantité de milieu échangé dépend du nombre de pores créés sur la cellule et de la grosseur de ceux-ci. Ceci est illustré sur la figure 5.2 où l'on peut voir des cellules qui ont été irradiées avec un faisceau gaussien. Comme le faisceau est plus intense au centre, les cellules à cet endroit ont incorporé plus de colorant que ceux en périphérie. Ce résultat explique la nécessité d'inclure un chevauchement de faisceau lors du balayage d'une zone à traiter (illusté sur la figure 3.3). Cet exemple montre aussi à quel point une petite différence de puissance peut être importante. Un faisceau de profil plat pourrait être mieux adapté à ce genre d'opération qu'un faisceau gaussien.

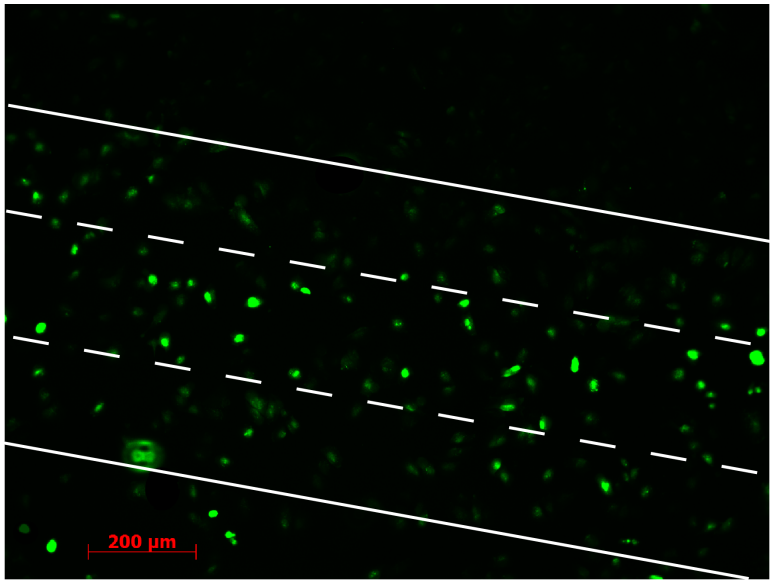

Figure 5.2 Effet d'une faisceau gaussien sur la perforation des cellules. Les cellules se trouvant au centre (ligne pointillées) expriment plus de fluorescence que ceux en périphérie (ligne pleine).

Kitz *et al.* (2011); Anderson *et al.* (2010); Lukianova-Hleb *et al.* (2010a) ont rapporté des seuils de création de bulle de cavitation avec des impulsion nanoseconde de 532 nm (50% de probabilité d'observer une bulle) entre 50 et 100 mJ/cm^2. Ceci expliquerait le faible taux de perforation obtenu au fluences sous $50mJ/cm^2$. En augmentant la fluence au dessus de 100 mJ/cm^2 la probabilité de créer une bulle grimpe jusqu'à 80-100% (dépendamment des études). Par contre, à cette puissance, les mélanômes utilisés dans cette étude décollent du fond du pétri. La longueur d'onde de 532 nm pourrait donc être mieux adapté pour des cellules en suspension.

Avec des impulsions de 532 nm, le taux de perforation reste stable de 20 à 75 mJ/cm^2 (autour de 20%) et décroit pour des fluences plus élevées. À 1064 nm, la perforation augmente graduellement de 600 à 1100 mJ/cm^2 puis atteint le maximum ou le traitement devient trop agressif et les cellules perforées meurent. Les points optimaux sont situés juste sous cette limite, où la perforation et la viabilité sont maximales.

Le nombre d'impulsions envoyées par endroit affecte les résultats de la façon suivante : pour une puissance donnée, une augmentation d'impulsions se traduit par un plus haut taux de perforation mais aussi un plus haut taux de mortalité. En fait, une irradiation à plusieurs

impulsions est similaire à une irradiation avec moins d'impulsions mais à plus haute fluence. Cinq impulsions par endroit ont permis d'obtenir un bon taux de perforant en conservant une bonne viabilité. De plus, avec seulement 5 impulsions, la transformation des AuNPs est limitée.

Avec les conditions de balayage maximisées, jusqu'à 30% des cellules sont perméabilisées, ce qui reste tout de même un faible taux comparativement aux techniques de perforation directe par laser, de lipoplexes ou d'électroporation. Ce résultat est toutefois comparable et même meilleurs que les faibles pourcentages de perméabilisation atteints avec les techniques utilisants des ondes de choc.

5.3 Nanoparticules

L'intégrité des AuNPs post irradiation a été vérifiées afin de déterminer si elles subissent des transformations durant l'irradiation. La transformation des AuNPs peut aussi être accompagnée par la création de petits fragments, ce qui peut être dangereux pour les cellules. Des cellules incubées avec des AuNPs ont été fixées avant et après le traitement puis observer au MEB. La taille moyenne des AuNPs avant le traitement est de 120 ± 16 nm, 128 ± 33 nm lorsqu'irradiées à 532 nm et 117 ± 20nm pour des impulsions de 1064 nm. Les AuNPs mesurées sont plus larges que 100 nm pour 2 raisons. Premièrement, les échantillons sont recouverts d'une couche de cinq nm afin de permettre leur observation au MEB, et, lorsqu'en contact avec un milieu biologique, les AuNPs absorbent des protéines sur leur surface très rapidement (Casals *et al.*, 2010).

La distribution de tailles des AuNPs irradiées avec des impulsions de 1064 nm est légèrement plus étalé que la distribution des échantillons contrôles (voir figure 4.3). L'étalement est plus prononcée avec les impulsions de 532 nm. Les AuNPs subissent donc plus de transformations avec des impulsions de 532 nm qu'avec des impulsions de 1064 nm. La limite de résolution de MEB utilisé ne permet pas de détecter les AuNPs de tailles inférieur à 60nm donc la possibilité que des petits fragments soient créés est à considéré. Ceci pourrait expliquer la plus faible viabilité obtenu dans les tests MTT pour les impulsions de 532nm comparativement à ceux de 1064 nm. Malgré tout, les essais de viabilité à long terme sont très concluant pour les deux longueurs d'onde ce qui porte à croire que les AuNPs affectent très peu les cellules.

5.4 Avantages de la technique laser

Plusieurs avantages rendent cette technique intéressante pour des applications biologiques. Premièrement, la viabilité des cellules traitées est excellente (surtout avec des impulsions de 1064 nm) autant à court terme qu'à long terme. Le faible taux de perforation, qui est un des majeurs défauts de cette technique, est compensé par le fait que ce procédé est capable de produire un très haut rendement en peu de temps. En effet, le traitement d'une zone de 25 mm^2 s'exécute en moins de 2 minutes tandis qu'un pétri de 314 mm^2 nécessite seulement 8 minutes. Ceci permet de perméabiliser environ 10 000 cellules par minute. Il serait ensuite possible de trier les cellules fluorescentes avec un appareil de cytométrie en flux afin d'obtenir une population contenant seulement ces cellules. De plus, ce procédé est non invasif, il n'y a aucun contact direct avec les cellules, ce qui permet de traiter les pétris sans danger de contamination. Peu de matériel est requis, seulement un laser à impulsion nanoseconde et des AuNPs, ce qui en fait un procédé peu couteux. Le seul matériel qui est nécessaire en grande quantité est la cargaison à insérer dans les cellules. Par exemple, Baumgart *et al.* (2011) utilise 60μg de plasmides pour 1 ml de milieu. L'ADN humain peut être dispendieux et la quantité qui ne pénètre pas dans les cellules durant le traitement est perdue. Par contre, ceci est valable pour toutes les techniques qui utilisent la diffusion pour faire pénétrer le matériel exogènes, telles que l'électroporation ou la perméabilisation par onde de choc.

Un autre avantage intéressant est que cette technique permet le ciblage d'un type de cellules parmi une population tel qu'illustré sur la fig 5.3. Ceci n'a pas été mis en oeuvre dans cette étude mais plusieurs protocoles existent déjà pour fonctionnaliser des AuNPs avec des antigènes qui cibleront des récepteurs particuliers (Tiwari *et al.*, 2011; Weissleder *et al.*, 2005). Une fois les cellules ciblées avec des AuNPs fonctionnalisés, le traitement perméabilisera seulement celles-ci. Il est aussi possible de les éliminer seulement en augmentant la puissance laser. En augmentant la puissance au dessus de 100 mJ/cm^2 (pour des impulsions à 532 nm) ou 1.4 J/cm^2 (pour 1064 nm) il sera possible d'éliminer plus de 60% de ces cellules sans endommager les cellules saines se trouvant aux alentours.

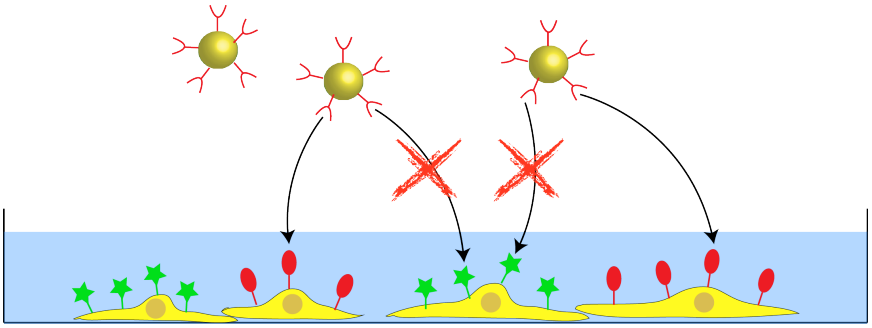

Figure 5.3 Schématique de AuNPs qui ciblent seulement un type de cellules parmi une population.

5.5 Application *in vivo*

Un des objectifs d'étudier les techniques de perméabilisation ou de transfection est de les appliquer *in vivo* afin de pratiquer la thérapie génétique. Théoriquement, la technique de perméabilisation par laser amplifié à l'aide de AuNPs plasmoniques est transférable à des spécimens *in vivo*. On peut imaginer une injection d'une solution de AuNPs sous cutanée ou même sur la surface de la peau afin de placer les AuNPs aux bons endroits suivie d'une deuxième injection du matériel à transfecter juste avant l'irradiation. Une limitation importante est que les endroits atteignables par laser sont restreints, la peau est, bien sûr, le candidat idéal. De plus, à 1064 nm, la pénétration peut atteindre jusqu'à 3.3mm comparativement à 0.9 mm pour 532 nm (Bashkatov *et al.* (2005)). Par contre la peau n'est pas la seule partie traitable, on peut penser à un traitement rétinien qui prendrait avantage de la fenêtre optique de l'oeil ou bien à un couplage du laser dans une fibre optique qui permettrait de rejoindre l'intérieur de l'oesophage ou de l'estomac. Lukianova-Hleb *et al.* (2010b) ont proposé un système de fibre qui livrerait les AuNPs, détecterait les cellules à traiter, puis les irradierait pour les détruire par la suite, voir fig 5.4.

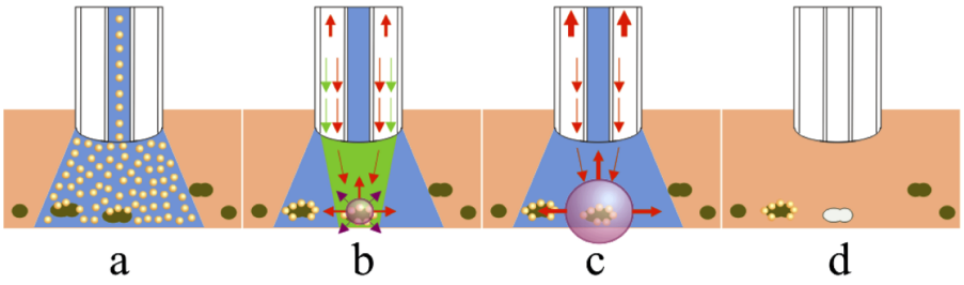

Figure 5.4 Schématique du système de traitement proposé par Lukianova-Hleb *et al.* (2010b), a) injection de la solution de AuNPs qui va cibler les cellules cancéreuses, b) une solution transparente rince les AuNPs en trop tout en laissant un trajet favorable pour la propagation du laser. Ensuite une première impulsion (verte) vient former une petite bulle qui est détecté par diffraction du laser sonde(rouge). c) Élimination de la cellule en appliquant une deuxième impulsion plus puissante. d) La cellule fautive est détruite sans que son voisinage en soit affecté.

Le groupe de Lapotko a étudié le phénomène de création de bulles de cavitation *in vivo* sur des poissons zèbres transparents. Wagner *et al.* (2010) ont injecté dans les poissons des cellules fluorescentes pré incubées avec des nanoparticules conjuguées puis ils utilisent un laser pour les lyser. Ils y parviennent tout en n'affectant pas les zones aux alentours. Puis dans l'étude de Lukianova-Hleb *et al.* (2010c) une injection de AuNPs est faite directement dans le poisson zèbre et des bulles de cavitation sont détectées seulement à l'endroit de l'injection, sans dommages collatéraux. Par contre, aucune molécule externe n'a été transférée à l'intérieur des cellules, la faisabilité d'une telle manipulation *in vivo* reste à étudier.

CHAPITRE 6

CONCLUSION

6.1 Synthèse des travaux

L'objectif de ces études était de réaliser de la perméabilisation membranaire à l'aide d'un laser nanoseconde amplifié par NPs plasmoniques puis d'optimiser les paramètres utilisés. La perméabilisation a été effectuée avec succès en utilisant une longueur d'onde et des nanoparticules en résonance plasmonique ($\lambda = 532$ nm avec NPs de 100 nm de diamètre) ainsi que hors résonance ($\lambda = 1064$ nm et 100 nm diamètre). Les paramètres de balayage et d'irradiation ont été optimisés afin de réaliser un traitement de perméabilisation à haut volume et avec une excellente viabilité. Le balayage du pétri par le laser requiert un chevauchement à cause de la forme gaussienne du faisceau qui ne fournit pas la même énergie à chaque endroit. La vitesse de déplacement a été ajusté afin que 5 impulsions en moyenne soit livrés par endroit. La fenêtre d'opération optimal se situe entre 50 et 70 mJ/cm^2 pour 532 nm et 1000 et 1100 mJ/cm^2 pour 1064 nm.

La viabilité à 2h ainsi que la vitalité jusqu'à 72h post traitement des cellules traitées ont été évaluées. La différence entre les tests MTT et exclusion d'IP suggère que le métabolisme cellulaire est ralentit immédiatement après le traitement. Par contre, cet effet n'est pas permanent car la viabilité grimpe jusqu'à 98% après 72 h.

La réduction de taille des AuNPs sous des impulsions nano seconde a aussi été étudiée. Bien que les NPs soient rapidement dégradées lorsqu'irradiées (tel que montré par les mesures spectroscopiques), les images SEM prouvent qu'ils le sont minimalement lorsque seulement 5 impulsions sont utilisés. Il a été trouvé que, sous les conditions de perforation optimal, les impulsions à 532 nm affectaient plus les AuNPs que les impulsions à 1064 nm.

6.2 Améliorations possible et directions futures

Il est certain que la technique de perméabilisation étudiée n'est pas parfaite et quelques améliorations peuvent être apportées. La première étant d'utiliser un faisceau laser de profil plat afin d'obtenir une distribution d'énergie la plus égale possible. Des compagnies de produits optiques (Thorlab, Edmund optic, etc..) offrent des pièces diffractives qui permettent de

transformer un faisceau gaussien en faisceau plat. De cette façon, aucun chevauchement lors du balayage d'un pétri serait nécessaire et la majorité des cellules traitées seraient irradiées avec la même énergie.

Une deuxième amélioration possible serait de bioconjuguer les AuNPs avec des antigènes qui cibleraient des récepteurs membranaires. Ceci permettrait de cibler certaines cellules (par exemple celles qui expriment un récepteur spécifique ou simplement une plus grande quantité d'un récepteur) parmi une population mixte (très utile pour les applications *invivo*). Les avantages d'une bioconjugaison ne se limitent pas seulement au ciblage, elle permet aussi de réduire considérablement le temps d'incubation avec les NPs passant de 4 h (pour notre méthode) à 20-45 min (Pitsillides *et al.*, 2003; Lukianova-Hleb *et al.*, 2012b; Yao *et al.*, 2009). En ciblant des récepteurs membranaires et en maintenant un court temps d'incubation les NPs se retrouveront sur ou très près de la membrane ce qui est idéal pour le traitement.

Afin d'étudier le phénomène fondamental de création de bulle au niveau cellulaire, un montage pourrait être monté sur un microscope ce qui permettrait une observation directe d'une seule cellule ou de quelques unes. Le temps de vie et le diamètre des bulles pourraient être reliés aux interactions observé sur les cellules. La dynamique de diffusion entre le milieu externe et le milieu interne pourrait aussi être étudiée en appliquant le traitement sur des cellules contenant un colorant fluorescent dans leur cytoplasme. Les quantités échangées pourrait alors être étudiées en fonction de la puissance laser, du nombre d'impulsion et du nombre de NPs par cellule.

Pour éviter d'ajouter le matériel à insérer directement dans le milieux environnant, il serait intéressant de l'attacher directement sur les NPs. Il serait détaché lors de la création de la bulle de cavitation et se retrouverait donc à proximité du pore créé par celle-ci. Il pénétrerait dans la cellule par diffusion ou par le jet induit lors de l'effondrement de la bulle. Par contre, la bulle ou la chaleur crée par l'interaction laser-NP ne doit pas détruire ou rendre inactif le matériel attaché, un attachement faible et/ou le plus loin possible de la NP serait l'idéal.

Une autre avenue à explorer serait d'utiliser un laser à impulsions picosecondes au lieux de nanosecondes. Comme les impulsions nanoseconde semblent beaucoup moins efficace que les impulsions femtosecondes (Baumgart *et al.*, 2011), un laser picoseconde pourrait être une bonne alternative en fournissant un meilleur taux de perforation tout en gardant les coûts du laser bas.

RÉFÉRENCES

A WHITEHEAD, K. et LANGER, R. (2009). Knocking down barriers : advances in siRNA delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 129–138.

ALBERTS, B., BRAY, D., HOPKIN, K., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. et WALTER, P. (2009). *Essential Cell Biology*. Garland Science, second edition édition.

ANDERSON, L. J. E., HANSEN, E., LUKIANOVA-HLEB, E. Y., HAFNER, J. H. et LAPOTKO, D. O. (2010). Optically guided controlled release from liposomes with tunable plasmonic nanobubbles. *Journal of Controlled Release*, 144, 151–158.

BASHKATOV, A. N., GENINA, E. A., KOCHUBEY, V. I. et TUCHIN, V. V. (2005). Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 38, 2543–2555.

BAUMGART, J., BINTIG, W., NGEZAHAYO, A., WILLENBROCK, S., ESCOBAR, H. M., ERTME, W., LUBATSCHOWSKI, H. et HEISTERKAMP, A. (2008). Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53a cells. *OPTICS EXPRESS*, 16, 3021–3031.

BAUMGART, J., HUMBERT, L., BOULAIS, É., LACHAINE, R., LEBRUN, J.-J. et MEUNIER, M. (2011). Off-resonance plasmonic enhanced femtosecond laser optoporation and transfection of cancer cells. *Biomaterials*, 33, 2345–2350.

BOULAIS, É., LACHAINE, R. et MEUNIER, M. (2012). Plasma Mediated off-Resonance Plasmonic Enhanced Ultrafast Laser-Induced Nanocavitation. *Nano Letters*, 12, 4763–4769.

CANATELLA, P. J., KARR, J. F., PETROS, J. A. et PRAUSNITZ, M. R. (2001). Quantitative Study of Electroporation-Mediated Molecular Uptake and Cell Viability. *Biophysical Journal*, 80, 755–764.

CASALS, E., PFALLER, T., DUSCHL, A., OOSTINGH, G. J. et PUNTES, V. (2010). Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona. *ACS Nano*, 4, 3623–3632.

EUSTIS, S. et EL-SAYED, M. A. (2006). Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold : Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Society Reviews*, 35, 209.

EVANS, C. H., GHIVIZZANI, S. C. et ROBBINS, P. D. (2008). Arthritis gene therapy's first death. *Arthritis Research & Therapy*, 10, 110.

FAROKHZAD, O. C. et LANGER, R. (2009). Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*, 3, 16–20.

FL, G. et VAN DER EB, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52, 456–467.

FLOREA, S., ANDREEVA, K., MACHADO, C., MIRABITO, P. M. et SCHARDL, C. L. (2009). Elimination of marker genes from transformed filamentous fungi by unselected transient transfection with a Cre-expressing plasmid. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 721–730.

INASAWA, S., SUGIYAMA, M. et YAMAGUCHI, Y. (2005). Laser-Induced Shape Transformation of Gold Nanoparticles below the Melting Point : The Effect of Surface Melting. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109, 3104–3111.

JAIN, P. K., EL-SAYED, I. H. et EL-SAYED, M. A. (2007). Au nanoparticles target cancer. *Nano Today*, 2, 18–29.

KITZ, M., PREISSER, S., WETTERWALD, A., JAEGER, M., THALMANN, G. N. et FRENZ, M. (2011). Vapor bubble generation around gold nano- particles and its application to damaging of cells . Rapport technique.

LACHAINE, R., BOULAIS, E., BOURBEAU, E. et MEUNIER, M. (2012). Effect of pulse duration on plasmonic enhanced ultrafast laser-induced bubble generation in water. *Applied Physics A*.

LAPOTKO, D., LUKIANOVA-HLEB, E. Y., POTAPNEV, M., ALEINIKOVA, O. et ORAEVSKY, A. (2006a). Method of laser activated nano-thermolysis for elimination of tumor cells. *Cancer Letters*, 239, 36–45.

LAPOTKO, D. O., LUKIANOVA, E. et ORAEVSKY, A. A. (2006b). Selective laser nanothermolysis of human leukemia cells with microbubbles generated around clusters of gold nanoparticles. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38, 631–642.

LEHRMAN, S. (1999). Virus treatment questioned after gene therapy death . *Nature*, 401, 517–518.

LEI, M., XU, H., YANG, H. et YAO, B. (2008). Femtosecond laser-assisted microinjection into living neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 174, 215–218.

LETFULLIN, R. R., JOENATHAN, C., GEORGE, T. F. et ZHAROV, V. P. (2006). Laser-induced explosion of gold nanoparticles : potential role for nanophotothermolysis of cancer. *Nanomedicine*, 1, 473–480.

LI, S.-D. et HUANG, L. (2006). Gene therapy progress and prospects : non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Therapy*, 13, 1313–1319.

LINK, S., BURDA, C., NIKOOBAKHT, B. et EL-SAYED, M. A. (2000). Laser-Induced Shape Changes of Colloidal Gold Nanorods Using Femtosecond and Nanosecond Laser Pulses. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104, 6152–6163.

LINK, S. et EL-SAYED, M. A. (1999a). Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103, 4212–4217.

LINK, S. et EL-SAYED, M. A. (1999b). Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103, 8410–8426.

LUKIANOVA-HLEB, E., HU, Y., LATTERINI, L., TARPANI, L., LEE, S., DREZEK, R. A., HAFNER, J. H. et LAPOTKO, D. O. (2010a). Plasmonic Nanobubbles as Transient Vapor Nanobubbles Generated around Plasmonic Nanoparticles. *ACS Nano*, 4, 2109–2123.

LUKIANOVA-HLEB, E. Y., BELYANIN, A., KASHINATH, S., WU, X. et LAPOTKO, D. O. (2012a). Plasmonic nanobubble-enhanced endosomal escape processes for selective and guided intracellular delivery of chemotherapy to drug-resistant cancer cells. *Biomaterials*, 33, 1821–1826.

LUKIANOVA-HLEB, E. Y., HANNA, E. Y., HAFNER, J. H. et LAPOTKO, D. O. (2010b). Tunable plasmonic nanobubbles for cell theranostics. *Nanotechnology*, 21, 085102.

LUKIANOVA-HLEB, E. Y., SAMANIEGO, A. P., WEN, J., METELITSA, L. S., CHANG, C.-C. et LAPOTKO, D. O. (2011). Selective gene transfection of individual cells in vitro with plasmonic nanobubbles. *Journal of Controlled Release*, 152, 286–293.

LUKIANOVA-HLEB, E. Y., SANTIAGO, C., WAGNER, D. S., HAFNER, J. H. et LAPOTKO, D. O. (2010c). Generation and detection of plasmonic nanobubbles in zebrafish. *Nanotechnology*, 21, 225102.

LUKIANOVA-HLEB, E. Y., WAGNER, D. S., BRENNER, M. K. et LAPOTKO, D. O. (2012b). Cell-specific transmembrane injection of molecular cargo with gold nanoparticle-generated transient plasmonic nanobubbles. *Biomaterials*, 33, 5441–5450.

M, P., D, C., SAHU, M. et DURAGKAR N, J. (2012). Review article on gene therapy. *International Journal of Genetics*, 4, 74–79.

MIE, G. (1908). Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen. *Ann. Phys*, 330, 377–445.

MIR, L. M. (2009). Nucleic Acids Electrotransfer-Based Gene Therapy (Electrogenetherapy) : Past, Current, and Future. *Molecular Biotechnology*, 43, 167–176.

NEUMANN, E., CHAEFER RIDDER, M., WANG, Y. et HOFSCHNEIDER, P. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Joumal*, 1, 841–845.

NIKOLSKAYA, A. V., NIKOLSKI, V. P. et EFIMOV, I. R. (2006). Gene Printer : Laser-Scanning Targeted Transfection of Cultured Cardiac Neonatal Rat Cells. *Cell Communication and Adhesion*, 13, 217–222.

OBARA, M., MASAKI, M. U., YOSHINORI, SHUNICHI SATO, H. W. et ASHIDA, H. (2004). Gene transfer into mammalian cells by use of a nanosecond pulsed laser-induced stress wave. *OPTICS LETTERS*, 29, 1227–1229.

OGURA, M., SATO, S., NAKANISHI, K., UENOYAMA, M., KIYOZUMI, T., SAITOH, D., IKEDA, T., ASHIDA, H. et OBARA, M. (2004). In vivo targeted gene transfer in skin by the use of laser-induced stress waves. *Lasers in Surgery and Medicine*, 34, 242–248.

PATHAK, A., PATNAIK, S. et GUPTA, K. C. (2009). Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery. *Biotechnology Journal*, 4, 1559–1572.

PISSUWAN, D., VALENZUELA, S. M. et CORTIE, M. B. (2006). Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 24, 62–67.

PITSILLIDES, C. M., JOE, E. K., WEI, X., ANDERSON, R. R. et LIN, C. P. (2003). Selective Cell Targeting with Light-Absorbing Microparticles and Nanoparticles. *Biophysical Journal*, 84, 4023–4032.

REDDY, A., V CALER, E. et W ANDREWS, N. (2001). Plasma Membrane Repair Is Mediated by Ca2 Regulated Exocytosis of Lysosomes. *Cell*, 106, 157–169.

SANKARANARAYANAN, K., RADHAKRISHNAN, S., KANAGARAJ, S., RAJENDRAN, R., SHAHID, S., KATHIRVEL, P., SUNDARESAN, V., UDAYAKUMAR, V. K., RAMACHANDRAN, R. et SUNDARARAJAN, R. (2011). Effect of Irreversible Electroporation on Cell Proliferation in Fibroblasts. *Proc. ESA Annual Meeting on Electrostatics 2011*, 1–8.

SCHAEUBLIN, N. M., BRAYDICH-STOLLE, L. K., SCHRAND, A. M., MILLER, J. M., HUTCHISON, J., SCHLAGER, J. J. et HUSSAIN, S. M. (2011). Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale*, 3, 410.

TAKAMI, A., KURITA, H. et KODA, S. (1999). Laser-Induced Size Reduction of Noble Metal Particles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103, 1226–1232.

TAKANO, S., SATO, S., TERAKAWA, M., ASIDA, H., OKANO, H. et OBARA, M. (2008). Enhanced Transfection Efficiency in Laser-Induced Stress Wave-Assisted Gene Transfer at Low Laser Fluence by Increasing Pressure Impulse. *Applied Physics Express*, 1, 038001.

TIWARI, P. M., VIG, K., DENNIS, V. A. et SINGH, S. R. (2011). Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 1, 31–63.

TROS DE ILARDUYA, C., SUN, Y. et DÜZGÜNEŞ, N. (2010). Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40, 159–170.

VOGEL, A., NOACK, J., HÜTTMAN, G. et PALTAUF, G. (2005). Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Applied Physics B*, 81, 1015–1047.

VOGEL, A. et VENUGOPALAN, V. (2003). Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues. *Chemical Reviews*, 103, 577–644.

WAGNER, D. S., DELK, N. A., LUKIANOVA-HLEB, E. Y., HAFNER, J. H., FARACH-CARSON, M. C. et LAPOTKO, D. O. (2010). The in vivo performance of plasmonic nanobubbles as cell theranostic agents in zebrafish hosting prostate cancer xenografts. *Biomaterials*, 31, 7567–7574.

WEISSLEDER, R., KELLY, K., SUN, E. Y., SHTATLAND, T. et JOSEPHSON, L. (2005). Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nat Biotechnol*, 23, 1418–23.

YAO, C., QU, X., ZHANG, Z., HÜTTMANN, G. et RAHMANZADEH, R. (2009). Influence of laser parameters on nanoparticle-induced membrane permeabilization. *Journal of Biomedical Optics*, 14, 054034.

YAO, C., RAHMANZADEH, R., ENDL, E., ZHANG, Z., GERDES, J. et HÜTTMANN, G. (2005). Elevation of plasma membrane permeability by laser irradiation of selectively bound nanoparticles. *Journal of Biomedical Optics*, 10, 064012.

ZHANG, Y. et YU, L.-C. (2008). Single-cell microinjection technology in cell biology. *BioEssays*, 30, 606–610.

ZHAO, Y., ZHENG, Z., COHEN, C., GATTINONI, L., PALMER, D., RESTIFO, N., ROSENBERG, S. et MORGAN, R. (2006). High-Efficiency Transfection of Primary Human and Mouse T Lymphocytes Using RNA Electroporation. *Molecular Therapy*, 13, 151–159.

ANNEXE A

mygaussfit

```
function [sigma,mu,A]=mygaussfit(x,y,h)

%
% [sigma,mu,A]=mygaussfit(x,y)
% [sigma,mu,A]=mygaussfit(x,y,h)
%
% this function is doing fit to the function
% y=A * exp( -(x-mu)^2 / (2*sigma^2) )
%
% the fitting is been done by a polyfit
% the lan of the data.
%
% h is the threshold which is the fraction
% from the maximum y height that the data
% is been taken from.
% h should be a number between 0-1.
% if h have not been taken it is set to be 0.2
% as default.
%


%% threshold
if nargin==2, h=0.2; end

%% cutting
ymax=max(y);
xnew=[];
ynew=[];
for n=1:length(x)
    if y(n)>ymax*h;
        xnew=[xnew,x(n)];
        ynew=[ynew,y(n)];
    end
end

```

```
%% fitting
ylog=log(ynew);
xlog=xnew;
p=polyfit(xlog,ylog,2);
A2=p(1);
A1=p(2);
A0=p(3);
sigma=sqrt(-1/(2*A2));
mu=A1*sigma^2;
A=exp(A0+mu^2/(2*sigma^2));
```

A.

ANNEXE B

Résultats supplémentaires

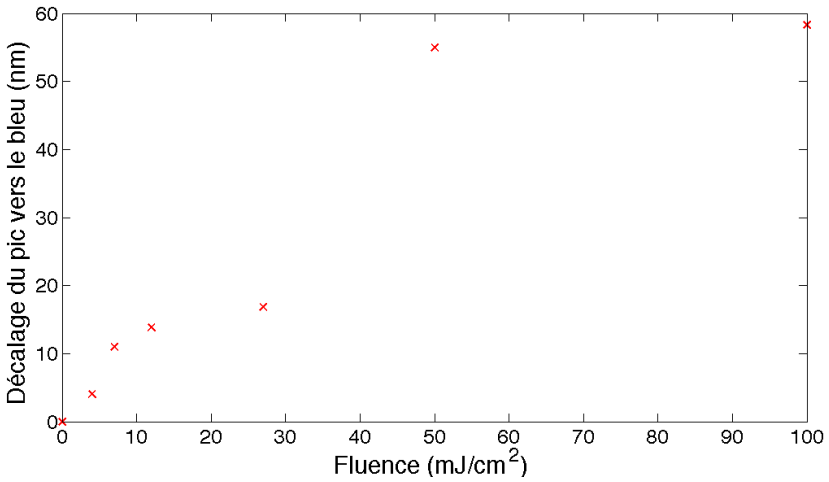

Figure B.1 Décalage vers le bleu d'une solution de AuNPs irradiée à l'aide d'impulsion de 5ns à 532nm en fonction de la fluence. On peut noter qu'il semble y avoir un régime différent pour les faibles fluences et les fluences élevés.

B.

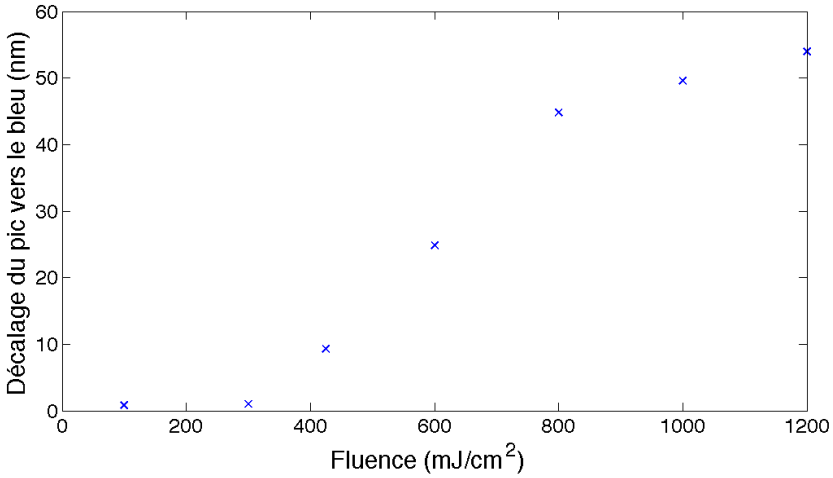

Figure B.2 Décalage vers le bleu d'une solution de AuNPs irradiée à l'aide d'impulsion de 6ns à 1064nm en fonction de la fluence.

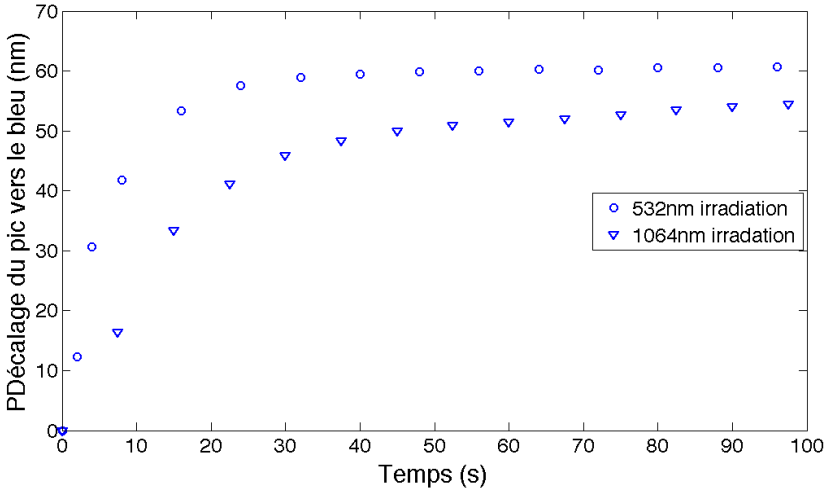

Figure B.3 Dynamique temporelle du décalage vers le bleu pour les 2 longueurs d'onde lorsqu'une solution est irradié avec les fluence optimales, $50mJ/cm^2$ (532nm) et $1J/cm^2$(1064nm)