

Titre: Livraison ciblée de médicaments anti-cancéreux stimulée par laser
Title: de nanoparticules or-lipides

Auteur: Antoine Uzel
Author:

Date: 2021

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Uzel, A. (2021). Livraison ciblée de médicaments anti-cancéreux stimulée par
Citation: laser de nanoparticules or-lipides [Master's thesis, Polytechnique Montréal].
PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/9967/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/9967/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Michel Meunier
Advisors:

Programme: Génie physique
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Livraison ciblée de médicaments anti-cancéreux stimulée par laser de
nanoparticules or-lipides**

ANTOINE UZEL

Département de génie physique

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie physique

Décembre 2021

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Livraison ciblée de médicaments anti-cancéreux stimulée par laser de nanoparticules or-lipides

présenté par **Antoine UZEL**

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

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

Caroline BOUDOUX, présidente

Michel MEUNIER, membre et directeur de recherche

Marc LAVERTU, membre

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Pr Michel Meunier de m'avoir accueilli dans son groupe et de m'avoir permis de travailler sur un projet qui correspondait à mes demandes et à mes attentes. J'ai beaucoup apprécié travailler dans le laboratoire et en apprendre un peu plus chaque jour. Un grand merci à nos collaborateurs de UBC pour leur aide, particulièrement au Dr Igor Jigaltsev pour la formulation des liposomes, ainsi qu'aux Dr Dominik Witzigmann et Dr Pieter Cullis pour leurs conseils.

Un immense merci aux membres de notre groupe de recherche, notamment à Morteza Hasanzadeh Kafshgari pour son aide dans mon projet et de m'avoir accompagné tout au long de sa réalisation. Merci, à Sergiy Patskovsky pour ses commentaires, ainsi qu'aux étudiants au PhD du groupe : Cécile Darvot, Jennyfer Zapata Farfan, Leonidas Agiotis, Lu Wang pour m'avoir aidé dans la réalisation de mes expériences et pour leurs conseils. Un remerciement spécial à Isabelle Largillière pour son aide dans la relecture de mon mémoire. Merci au reste de l'équipe de recherche pour ces super moments passés au bureau : Jie, Guillaume, Justin, Flavie, Hassan ainsi qu'à Marianne et Greg pour ces derniers mois passés ensemble au laboratoire.

Finalement merci à mes parents, à ma sœur et à l'ensemble de ma famille pour m'avoir permis de partir à l'étranger pour étudier au Canada. Merci à mes colocataires qui m'ont accompagné pendant cette maîtrise : Baptiste, Corentin, Gabriel et Thomas pour avoir découvert la vie à Montréal avec moi et en faire une super expérience. Merci aussi à ma copine Justine pour son soutien et m'avoir encouragé pendant la rédaction de mon mémoire et pendant toute ma maîtrise plus généralement.

RÉSUMÉ

Le cancer est une cause de mortalité des plus importantes dans le monde, celui-ci touche une dizaine de millions de personnes chaque année. Les méthodes actuelles de soin du cancer se sont améliorées au cours des dernières années mais ne sont pas parfaites et dans de nombreux cas il est impossible de le soigner. Les méthodes de radiologie, chirurgie ou de chimiothérapie continuent d'être au centre de la recherche et des nouvelles approches de soin sont investiguées. Pour la chimiothérapie, la principale piste étudiée est celle de la livraison ciblée de médicaments permettant ainsi de réduire les effets secondaires de ce type de traitement. L'utilisation de nano vecteurs comme vecteurs de livraison de médicaments peut permettre d'augmenter la dose maximale tolérée par un être humain et de détruire les cellules cancéreuses sans affecter les cellules saines. Le laboratoire du Pr Pieter Cullis de l'Université British Columbia a donc mis au point un système de nanoparticules lipidiques dans lesquelles sont encapsulées un médicament contre le cancer (Doxorubicin) ainsi que des nanoparticules d'or de 5 nm de diamètre. Ces nanovecteurs de 100 nm de diamètre présentent une bonne stabilité et peuvent circuler dans le corps via le flux sanguin sans être nettoyés par les cellules macrophages. Grâce aux propriétés optiques uniques des nanoparticules d'or et des interactions nanoparticules-laser, il est possible de libérer les médicaments et donc de cibler seulement un endroit spécifique et d'effectuer la livraison de médicaments aux cellules cancéreuses spécifiquement. Premièrement, une caractérisation des nanoparticules lipidiques et étude de leur comportement lors de l'incubation avec les cellules fut effectuée. Deuxièmement, une étude de livraison de médicaments *in vitro* sur des cellules MDA-MB-231 de cancer du sein a été menée avec deux lasers différents. Un laser nanoseconde irradiant à 527 nm correspondant au pic d'absorption des nanoparticules d'or de 5 nm de diamètre permet, lorsque la puissance surfacique est suffisante, de les fragmenter sans endommager les cellules. Une fluence de 71 J/cm² permet d'obtenir une libération quasi-totale de la Doxorubicin dans la zone irradiée et d'augmenter par un facteur 10 la quantité de Doxorubicin délivrée lorsque des nanoparticules d'or sont encapsulées. Il suffit que chaque nanoparticule d'or reçoive une impulsion du laser pour induire la livraison ciblée. Le second type de laser utilisé est un laser femtoseconde irradiant à 800 nm. Ici, le laser permet la formation d'une nanobulle autour des nanoparticules d'or et ainsi former de petits trous à la surface des liposomes et laisser le médicament s'échapper. Les résultats obtenus sont alors similaires à ceux obtenus avec le laser nanoseconde.

ABSTRACT

Cancer is one of the most important causes of death in the world, affecting around ten million people every year. Current methods of cancer treatment have improved in recent years but are not perfect and in many cases, it is impossible to cure. Radiology, surgery or chemotherapy methods continue to be the focus of research and new approaches to treat are being investigated. For chemotherapy, the main strategy studied is targeted delivery of drugs, which could reduce the side effects of this type of treatment. The use of nanovectors as drug delivery vehicles can increase the maximum dose tolerated by a human being and destroy cancer cells without affecting healthy cells. The laboratory of Prof. Pieter Cullis at the University of British Columbia has therefore developed a system of lipid nanoparticles in which a cancer drug (doxorubicin) and gold nanoparticles of 5 nm in diameter are encapsulated. These 100 nm diameter nanovectors have good stability and can circulate in the body via the bloodstream without being cleared by macrophage cells. Due to the unique optical properties of the gold nanoparticles and the nanoparticle-laser interactions, it is possible to release the drugs and thus target only a specific location and deliver the drugs exclusively to the cancer cells. Firstly, a characterization of the lipid nanoparticles and study of their behavior during incubation with cells was performed. Secondly, an in vitro drug delivery study on MDA-MB-231 breast cancer cells was conducted with two different lasers. A nanosecond laser irradiating at 527 nm which correspond to the absorption peak of 5 nm gold nanoparticles allows, when the fluence is sufficient, to fragment them without damaging the cells. A fluence of 71 J/cm² allows a quasi-total release of Doxorubicin in the irradiated area and increases by a factor of 10 the amount of doxorubicin delivered when gold nanoparticles are encapsulated. It is sufficient for each gold nanoparticle to receive a laser pulse to induce targeted delivery. The second type of laser used is a femtosecond laser irradiating at 800 nm. Here, the laser allows the formation of a nanobubble around the gold nanoparticles and thus forms small holes on the surface of the liposomes and allows the drug to escape. The results obtained are then similar to those obtained with the nanosecond laser.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	4
2.1 Traitement contre le cancer	4
2.1.1 Livraison ciblée de médicaments	7
2.2 Systèmes de livraison organiques dans le traitement contre le cancer.....	9
2.2.1 Les nanovecteurs organiques	9
2.2.2 Propriétés et caractéristiques des liposomes	13
2.3 Nanoparticules plasmoniques et interaction laser-nanoparticules	18
2.3.1 Nanoparticules plasmoniques et leurs propriétés	18
2.3.2 Interaction de nanoparticules avec un laser.....	21
2.4 Combinaison liposomes nanoparticules d'or	24
CHAPITRE 3 CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES LIPIDIQUES.....	26
3.1 Présentation des nanoparticules utilisées	27
3.1.1 Méthode de préparation des liposomes	29
3.1.2 Spectre en fluorescence	30
3.1.3 Spectre d'absorption UV-Visible des nanoparticules	31

3.2	Méthode de détermination de la libération des médicaments	34
3.3	Stabilité des lipides sous chauffage.....	37
CHAPITRE 4 PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL D'IRRADIATION		39
4.1	Présentation du matériel et des cellules utilisées	39
4.1.1	Cellules utilisées.....	39
4.1.2	Préparation des échantillons	39
4.1.3	Équipements utilisés.....	40
4.2	Comportement des LNPs dans les cellules	42
4.2.1	Méthodologie de la prise d'images	42
4.2.2	Interprétation d'images obtenues	43
4.2.3	Influence du temps d'incubation	45
4.3	Protocole d'irradiation.....	48
CHAPITRE 5 LIVRAISON DE MÉDICAMENTS PAR IMPULSIONS LASER DANS LES CELLULES CANCÉREUSES		51
5.1	Livraison par impulsions nanosecondes.....	51
5.1.1	Mise en évidence de la libération de la DOX.....	51
5.1.2	Méthode de quantification de livraison après irradiation.....	52
5.2	Optimisation de la fluence du laser	55
5.3	Optimisation des paramètres de balayage	57
5.4	Toxicité de l'irradiation laser sur les cellules.....	60
5.5	Etude de l'influence du temps d'incubation sur la livraison	62
5.5.1	Réduction du temps d'incubation à 1h.....	62
5.5.2	Irradiation après incubation de 15 minutes	65
5.6	Livraison par impulsions femtosecondes	67
CHAPITRE 6 DISCUSSION		69

6.1	Mécanisme de livraison de DOX par laser.....	69
6.1.1	Irradiation avec laser nanoseconde	69
6.1.2	Irradiation avec laser femtoseconde	69
6.1.3	Étude d'effets collectifs.....	70
6.1.4	Encapsulation de nanobâtons	71
6.2	Passage au <i>in vivo</i>	73
CHAPITRE 7 CONCLUSION		75
7.1	Résumé des travaux effectués	75
7.2	Futur du projet.....	76
RÉFÉRENCES.....		78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3-1 Diamètre moyen des liposomes, Indice de polydispersité et potentiel Zêta des différents échantillons fournis de LNPs.	29
Tableau 5-1 Récapitulatif de la quantité de DOX délivrée aux cellules en fonction d'une irradiation ou non et de la présence de nanoparticules d'or dans les LNPs ou non. La quantité de DOX est normalisée à 1 correspondant à la quantité délivrée par les LNPs/DOX sans irradiation.	60

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 Effet EPR et ciblage passif. Les nanovecteurs peuvent entrer dans les cellules tumorales à travers les interstices entre les cellules endothéliales (cellules tapissant les vaisseaux sanguins) et s'y accumuler en raison d'un mauvais drainage lymphatique [14]. Ces interstices sont formés par les vaisseaux angiogéniques qui assurent l'apport important en nutriments au développement des cellules cancéreuses.	8
Figure 2-2 Les nanovecteurs peuvent être classés en deux groupes. Les nanovecteurs organiques : micelle, liposome, nanogel, dendrimer et les nanovecteurs inorganiques : nanoparticules d'or, nanomatériel d'oxyde de fer superparamagnétique, puits quantiques et ions lanthanides paramagnétiques [17].	9
Figure 2-3 Représentation schématique d'une micelle et de son composant divisé en deux parties : le groupe hydrophile et le groupe hydrophobe [27].	10
Figure 2-4 Schéma d'un liposome et de sa double couche de lipides composées de phospholipides divisés en une queue hydrophobe et une tête hydrophile. Ces phospholipides permettent de former la couche extérieure de lipide des liposomes à l'intérieur de laquelle se trouve un cœur aqueux [28].	12
Figure 2-5 Représentation schématique de l'endocytose des liposomes pour la livraison de gènes dans les cellules[39]. Les liposomes entrent dans la cellule par endocytose. Ils sont ensuite dans l'endosome et libèrent leur contenant grâce aux enzymes présents dans l'endosome ici. L'ADN peut ensuite entrer dans le noyau. Le fonctionnement de l'endocytose pour des liposomes encapsulant des médicaments comme la DOX est similaire.	14
Figure 2-6 Schéma de la structure chimique du DOXIL. La DOX se trouve dans le cœur aqueux des liposomes. La couche externe est composée de cholestérol et de HSPC sur laquelle se trouve une couche de PEG [49].	17
Figure 2-7 Formes classiques de nanoparticules d'or utilisées [52, 53].	18
Figure 2-8 Spectres d'extinction de nanoparticules en alliage or-argent de 60 nm [54].	19

Figure 2-9 Évolution de l'état d'une nanoparticule d'or de 100 nm sous irradiation en fonction de la température obtenue avec des points de température caractéristiques pour l'eau et l'or respectivement : fusion (1 et 5), vaporisation (2 et 6), point critique(3 et 7) et point spinodal de l'eau (4) [59].	22
Figure 2-10 Fenêtre thérapeutique, absorption des différents composants des tissus humains de 300 à 1100 nm [60]. La fenêtre thérapeutique se trouve entre 650 nm et 850 nm où les composants absorbent très peu.	23
Figure 3-1 Image Cryo-TEM des liposomes avec de la Doxorubicin dans le cœur aqueux (marquées par les flèches) et les nanoparticules d'or de 5nm dans la couche extérieure de lipides.	28
Figure 3-2 Spectre en fluorescence de la Doxorubicin, pic d'excitation à 480 nm et pic d'émission à 590 nm [68].	31
Figure 3-3 Spectres d'absorbance UV-visible expérimentaux des différents échantillons de LNPs et de la DOX en solution. Les mesures ont été acquises à la même concentration de DOX de 0.1 mg/mL.	33
Figure 3-4 Spectres d'absorbance normalisés des LNPs/AuNPs et des AuNPs de 5nm de diamètre. Le spectre théorique d'une nanoparticule d'or unique de 5 nm de diamètre dans l'eau a été obtenue en utilisant la théorie de Mie. La barre pointillée verte indique la longueur d'onde du laser.	33
Figure 3-5 A- Spectres d'émission fluorescente normalisés des LNPs/AuNPs/DOX avec et sans ajout de Triton-X et spectre de la DOX. B- Spectres d'émission fluorescente non-normalisés des mêmes LNPs/AuNPs/DOX avec et sans ajout de Triton. Tous les spectres ont été acquis à la même concentration de DOX de 0.1 mg/mL.	35
Figure 3-6 Échantillon de LNPs/AuNPs/DOX après centrifugation avec ajout de Triton à 2% (à droite) et sans (à gauche).	36
Figure 3-7 Spectres d'émission fluorescente des LNPs/AuNPs/DOX avec et sans ajout de Triton après centrifugation à la même concentration de DOX.	36
Figure 3-8 Spectre d'émission de LNPs/DOX pendant chauffage de la température ambiante de 20°C jusqu'à 71°C. La température de 71°C est atteinte après 60 minutes d'expériences et a été maintenue durant 63 autres minutes.	37

- Figure 4-1 Lignée cellulaire MDA-MB-231 pendant la culture [69]. Faible densité à gauche et haute densité à droite. La barre d'échelle représente 100 μm40
- Figure 4-2 Montage expérimental pour irradiation avec laser nano seconde [70]. Le montage amène le faisceau laser dans un microscope sur lequel sont effectuées les irradiations. Les éléments le composant sont différents miroirs, un polariseur/analyseur, un télescope et un obturateur.41
- Figure 4-3 Résultats typiques représentant le comportement de la DOX dans les cellules, schéma à droite et images correspondantes à gauche. La concentration de DOX utilisée est de 5 $\mu\text{g/mL}$ dans chacune des images. L'étape A correspond au moment de l'ajout des LNPs/AuNPs/DOX. L'étape B est l'entrée des LNPs/AuNPs/DOX dans les lysosomes. L'étape C correspond à la libération de la DOX à partir des LNP suite à l'irradiation. La couleur verte correspond à une coloration à la calceine et le rouge est lié à la fluorescence de la DOX.44
- Figure 4-4 LNPs/AuNPs/DOX dans les cellules MDA-MB-231 avec un temps d'incubation de 28h. La flèche rouge montre un exemple d'agrégats de LNPs/AuNPs/DOX dans des lysosomes.45
- Figure 4-5 Évolution de la fluorescence de la DOX dans les cellules MBA-MB-231 en fonction du temps d'incubation (4 heures à gauche et 1 jour à droite) et du type d'échantillon (A, D : LNP/DOX; B, E : LNPs/AuNPs/DOX; C,F : DOX). L'échelle est valable pour l'ensemble des images.....47
- Figure 4-6 Fluorescence des noyaux des cellules MDA-MB 231 après incubation d'un jour avec LNPs/AuNPs/DOX à une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$. A : fluorescence rouge de la DOX. B : fluorescence bleue du DAPI. C : superposition de la fluorescence de la DOX et du DAPI. L'échelle est la même pour toutes les images.48
- Figure 4-7 Représentation schématique de la chronologie du protocole expérimental d'irradiation, de la préparation des LNPs jusqu'à la prise d'images des résultats.....49
- Figure 4-8 Schéma de balayage effectué dans les puits des plaques avec grille. Chaque ligne pointillée représente une ligne de balayage.....50

- Figure 5-1 Images en fluorescence de cellules MDA-MB-231 traitées avec des LNPs contrôles (sans AuNPs) et avec AuNPs, avec et sans irradiation. Coloration de la membrane cellulaire par Calceine AM en vert et fluorescence de couleur rouge liée à la DOX. L'échelle est valable pour les quatre images.....52
- Figure 5-2 Exemple d'images utilisées pour le calcul du taux de libération de la DOX. A) Cellules MDA-MB-231 irradiées pendant l'incubation de 4 heures de LNPs/AuNPs/DOX à 71 J/cm^2 avec une vitesse de balayage de $50 \text{ }\mu\text{m/s}$ et un pas de $5 \text{ }\mu\text{m}$. B) Cellules incubées pendant 4 heures avec de la DOX en solution à la même concentration de DOX.55
- Figure 5-3 Pourcentage de libération de la DOX à différentes fluences (de 0 à 100 J/cm^2) avec les paramètres de balayage identiques ($100 \text{ }\mu\text{m/s}$ et $10 \text{ }\mu\text{m}$ de pas) suite à une incubation de 4 heures des cellules avec LNPs/DOX et LNPs/AuNPs/DOX à une concentration de $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$56
- Figure 5-4 Évolution du pourcentage de libération de la DOX en fonction des paramètres de balayage à une fluence de 100 J/cm^2 suite à une incubation de 4 heures des cellules avec LNPs/DOX et LNPs/AuNPs/DOX à une concentration de $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$58
- Figure 5-5 Évolution du pourcentage de libération de la DOX en fonction des paramètres de balayage à une fluence de 71 J/cm^2 suite à une incubation de 4 heures des cellules avec LNPs/DOX et LNPs/AuNPs/DOX à une concentration de $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$59
- Figure 5-6 Vérification de la survie des cellules MDA-MB-231 après irradiation suite à une incubation avec PI (fluorescence des noyaux des cellules en rouge) et calceine AM (membranes vertes). Les images A et C sont le même échantillon pour une irradiation à 71 J/cm^2 à $50 \text{ }\mu\text{m/s}$ et un pas de $5 \text{ }\mu\text{m}$. Les images B et D sont aussi le même échantillon avec une irradiation à 100 J/cm^2 et les mêmes paramètres de balayage. L'échelle est valide pour les quatre images.....62
- Figure 5-7 Images en fluorescence de cellules MDA-MB-231 traitées avec des LNPs/AuNPs/DOX avec une heure d'incubation et irradiation à 100 J/cm^2 , $50 \text{ }\mu\text{m/s}$ et pas de $5 \text{ }\mu\text{m}$ (A : première irradiation 15 minutes après l'ajout des LNPs/AuNPs DOX et B : seconde irradiation)64
- Figure 5-8 Fluorescence de la DOX (couleur rouge) et de la Calceine (couleur verte) de cellules MDA-MB-231 avec incubation de LNPs/AuNPs/DOX pendant une heure à une concentration de $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$. Irradiation effectuée : après l'étape de lavage en image A, juste avant l'étape de

lavage en image B et pas d'irradiation en image C. L'irradiation effectuée à 100 J/cm ² , 50 µm /s et pas de 5 µm. L'échelle est valable pour les trois images.	65
Figure 5-9 Images en fluorescence de cellules MDA-MB-231 traitées avec des LNPs contrôles (sans AuNP) et avec AuNP, avec et sans irradiation. Coloration de la membrane cellulaire par Calceine AM en vert et fluorescence de couleur rouge liée à la DOX. L'échelle est valable pour les quatre images.....	66
Figure 5-10 Images en fluorescence de cellules MDA-MB-231 incubées avec des LNPs/DOX avec et sans AuNP traitées avec ou sans irradiation par le laser femtoseconde. La concentration utilisée est de 50 µg/mL. Les paramètres de balayage utilisés sont 5000 µm/s et pas de 10 µm. L'échelle est valable pour les quatre images.....	68
Figure 6-1 Image cryo-TEM de LNPs de nanobâtons de 20x5 nm encapsulés dans les LNP. Les nanobâtons sont visibles en noir dans la couche de lipides extérieure.....	72

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN Acide Désoxyribonucléique

ARNm Acide Ribonucléique messenger

AuNP Nanoparticules d'or

Chol Cholestérols

DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMT Dose Maximale Tolérée

DODAP 1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium propane

DOPE Dioleoylphosphatidylethanolamine

DOX Doxorubicin

DPPC Dipalmitoylphosphatidylcholine

DSPC Distearoylphosphatidylcholine

EPR Enhanced Permeability and Retention

HSPC Hydrogenated soybean phosphatidylcholine

LNP Lipid Nanoparticle

pARNi Petit Acide Ribonucléique Interférent

PBS Phosphate Buffered Saline

PEG Polyéthylène Glycol

PI Propidium Iodine

SA Sulfate d'Ammonium

SEM Scanning Electron Microscopy

TEM Transmission Electron Microscopy

UV UltraViolet

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Le cancer représente la première cause de mortalité dans le monde. On estime à 9,6 millions, le nombre de décès en 2018 dus à un cancer. La chimiothérapie est l'un des principaux traitements utilisés. Cette méthode présente cependant de nombreux désavantages. En effet, outre les effets secondaires indésirables comme la perte des cheveux ou les nausées, la quantité de médicaments arrivant jusqu'à la tumeur est très faible, de l'ordre de 0.00125% pour un homme de 80 kg par voie intravasculaire [1]. Une partie des médicaments va détruire les cellules saines, ce qui entraîne que la dose maximale tolérée (DMT) par une personne est plus faible que la dose nécessaire pour éradiquer la tumeur. La recherche en chimiothérapie se concentre principalement sur une méthode qui permettrait d'augmenter significativement cette dose tolérée par un être humain. Une des méthodes qui est investiguée est celle de la livraison ciblée de médicaments. Celle-ci consiste à placer les médicaments dans un vecteur de livraison pour que seule la tumeur cancéreuse soit affectée par les médicaments. Ainsi, le laboratoire du professeur Pieter Cullis de l'Université British Columbia, le partenaire de ce projet, a mis au point un système de liposomes encapsulant de la doxorubicin (DOX), médicament contre le cancer, et des nanoparticules d'or (AuNPs) d'un diamètre de 5 nm. Ce système, stable dans le corps humain, montre un temps de vie de circulation dans le flux sanguin *in vivo* de 24 heures. Le travail de cette maîtrise se concentre alors sur un moyen de libérer le médicament depuis les liposomes. Ceux-ci peuvent, grâce à leur long temps de circulation, parcourir le corps et atteindre des tumeurs. Ils peuvent ensuite entrer dans les cellules mais sans toutefois libérer les médicaments et donc éradiquer la tumeur. Pour que le médicament induise la mort des cellules il faut que celui-ci sorte des liposomes et atteignent le noyau de la cellule. Afin d'obtenir ce résultat, le principe de ce projet est d'utiliser un laser et les propriétés des nanoparticules d'or pour ouvrir les liposomes. Il est possible d'obtenir de nombreux effets grâce à l'interaction nanoparticules d'or-laser. Ces effets vont dépendre de différents paramètres qui sont :

- le type de laser,
- la longueur d'onde du laser,
- la puissance surfacique (fluence) et
- le temps d'irradiation.

L'ensemble de ces paramètres doit donc être optimisé pour obtenir un protocole de livraison efficace. L'hypothèse de recherche est donc qu'il est possible de livrer de manière ciblée des médicaments encapsulés dans des liposomes aux cellules, par interaction entre laser et nanoparticules d'or, elles aussi encapsulées dans les liposomes. Pour vérifier cette hypothèse plusieurs objectifs doivent être accomplis :

- Caractériser les nanoparticules lipidiques pour choisir un laser adapté à induire une livraison
- Trouver une méthode de détermination de l'effet de livraison afin de savoir si le médicament est encapsulé ou en dehors des liposomes
- Montrer que le laser peut induire la livraison du médicament
- Quantifier l'effet de l'interaction laser-nanoparticules d'or sur la libération du médicament depuis les nanoparticules lipidiques

Les liposomes furent reçus au laboratoire au début du projet. Une grande partie du projet a donc consisté à la caractérisation de ces nanoparticules ainsi qu'à la détermination du type de laser et de la longueur d'onde à utiliser. Cette partie de caractérisation avait aussi pour but de définir une méthode qualitative et quantitative de détermination de la libération des médicaments. Des tests *in vitro* ont été effectués, permettant d'irradier un nombre restreint de cellules et ainsi réaliser un maximum d'expériences. Le temps de l'expérience étant directement lié au temps d'irradiation, il fut donc décidé de travailler sur des zones de petite taille (de l'ordre du dixième de mm²) et effectuer des irradiations de la centaine de secondes à une trentaine de minutes. De nombreuses expériences ont été mises en œuvre, en faisant varier les différents paramètres possibles d'irradiation. La preuve de concept de la livraison a d'abord été démontrée avec un laser nanoseconde, dont la longueur d'onde de 527 nm, correspond au pic d'absorption des nanoparticules d'or. Il s'agit alors d'une irradiation en résonance. Puisque la lumière dans le proche infrarouge est très peu absorbée par le corps humain, ce qui présente donc un avantage pour des applications *in vivo* et dans le domaine biomédical plus généralement, l'utilisation d'un laser femtoseconde irradiant dans l'infrarouge à 800 nm a été explorée. Pour les nanosphères d'or, l'infrarouge est une région où elles absorbent très peu, l'irradiation est alors hors-résonance. Dans ce cas-ci aussi, il fut possible d'obtenir des résultats tout aussi prometteurs, montrant clairement le phénomène de livraison.

Dans ce mémoire, nous commencerons par présenter la revue de littérature. Nous passerons ensuite aux résultats de la caractérisation des liposomes. Puis, nous détaillerons dans le Chapitre 4 le protocole expérimental mis en œuvre. Enfin dans le Chapitre 5 nous montrerons l'ensemble des résultats de livraison obtenus par des irradiations laser nanoseconde et femtoseconde. Nous conclurons sur une discussion sur le travail effectué et présenterons des pistes à explorer pour des travaux futurs.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Traitement contre le cancer

Dans cette section, les différentes méthodes actuelles de traitement contre le cancer vont être décrites, en portant une attention particulière sur la chimiothérapie. Il s'agit en effet de la méthode qui va être étudiée dans le cadre de ce travail. En premier temps, les méthodes de la chirurgie et de la radiothérapie seront brièvement présentées et le fonctionnement de la chimiothérapie sera détaillé. Et finalement, les propositions actuelles pour améliorer ce traitement seront décrites [2].

Chirurgie

La chirurgie est une méthode couramment employée dans le traitement contre le cancer. Il s'agit de la méthode la plus efficace pour éliminer le cancer avant que celui-ci ne commence à se déplacer dans d'autres régions en formant des métastases [3]. Elle peut intervenir à différents moments dans le traitement [4]. Il peut s'agir de prévention en enlevant des tissus qui peuvent présenter des risques dans la formation du cancer ou d'une biopsie de tissus à analyser. Dans ce cas, elle sert à définir le grade du cancer et à en diagnostiquer le type et le stade d'avancement par exemple. Le type de cancer correspond aux organes infectés, le stade est lui le degré d'avancement du cancer et varie d'un à quatre, plus il est élevé, plus le cancer est avancé et le grade de cancer fait référence à l'agressivité du cancer. Le grade trois est le plus élevé et correspond à un cancer très agressif, avec notamment une multiplication des cellules cancéreuses très rapide et importante. Enfin, le principal objectif de la chirurgie est d'agir comme traitement direct en enlevant les tissus cancéreux. Il est plus facile de traiter dans ce cas un cancer précoce, qui n'a pas encore métastasé. Cependant, cette méthode peut ne pas être applicable pour certains patients. C'est le cas si la tumeur est trop petite pour être vue par le chirurgien ou trop grosse. Dans le cas où la tumeur est située trop proche d'organes sensibles, et qu'il est impossible de l'enlever sans les endommager, il est préférable d'avoir recours à d'autres méthodes. Le principal inconvénient de cette méthode est son caractère invasif et le fait qu'elle ne puisse pas traiter tous les cancers.

Radiothérapie

Une méthode alternative à la chirurgie peut être la radiothérapie. Celle-ci est souvent employée en complément à d'autres méthodes comme la chirurgie ou la chimiothérapie. Cette méthode fonctionne sur le principe de dégradation de l'Acide Désoxyribonucléique (ADN) des cellules cancéreuses, pour bloquer leur multiplication et leur croissance [2]. La est très efficace contre des cellules se divisant rapidement comme les cellules cancéreuses, celles-ci seront plus affectées par les radiations que les cellules normales. Pour une même dose d'irradiation, les cellules saines ont un taux de mortalité plus faible mais non nul, ce qui représente un désavantage important de cette méthode. Il faut alors trouver un compromis sur la dose à appliquer pour détruire un maximum de cellules cancéreuses sans pour autant détruire un nombre important de cellules saines. Il est possible de distinguer deux types de radiothérapie [5, 6]. La première est dite externe, la plus classique où la source de rayonnements est un appareil en dehors du corps. Les principales sources de rayonnement dans ce cas sont des photons. La seconde, la radiothérapie interne, consiste en l'injection de substances radioactives qui vont émettre des rayonnements depuis l'intérieur du corps dans l'environnement des cellules cancéreuses.

Chimiothérapie

La chimiothérapie est une méthode chimique du traitement de cancer. Des médicaments détruisant les cellules sont injectés dans le corps et vont cibler principalement les cellules cancéreuses qui se développent et se divisent beaucoup. Différents éléments vont influencer le choix de chimiothérapie comme la zone du corps touchée, le stade du cancer et l'état physique du patient. De nombreux types de médicaments existent et certains pourront être plus efficaces contre certains cancers que d'autres. Il est possible de citer les suivants :

- les médicaments qui vont altérer l'ADN, empêchant ainsi la division cellulaire en endommageant l'ADN des cellules.
- Les antimétabolites qui agissent comme l'ADN ou l'acide ribonucléique (ARN) pour les cellules cancéreuses. Quand celles-ci vont utiliser les antimétabolites plutôt que leur propre ADN elles vont être endommagées et vont mourir.

- Les antimitotiques qui bloquent la mitose, la division cellulaire des cellules et empêchent donc la multiplication du nombre de cellules cancéreuses.
- Les antibiotiques antitumoraux qui se lient directement à l'ADN des cellules et empêchent son bon fonctionnement.
- Les inhibiteurs de l'enzyme de réparation de l'ADN qui ciblent les enzymes qui réparent normalement l'ADN. Celui-ci ne pouvant plus être réparé dans le cas de dommages la cellule va alors mourir [2].

Dans le domaine de la recherche, le médicament le plus utilisé est la Doxorubicin. Ce médicament présente la propriété physique très intéressante d'être naturellement fluorescent. Ce médicament est fabriqué à base de Daunorubicin, lui aussi souvent utilisé dans la recherche. Ces deux médicaments sont aussi commercialisés sous différentes formes, leur utilisation n'est pas cantonnée à la recherche.

Comme la radiothérapie, la chimiothérapie ne va pas cibler que les cellules cancéreuses, mais aussi les cellules saines, ce qui constitue une de ses principales limitations. Un autre défaut de cette technique est la quantité de médicaments arrivant finalement jusqu'aux cellules cancéreuses. En effet, en moyenne, une personne de 80 kg recevra seulement 0.00125% de la quantité de médicaments administrés de manière intraveineuse [1]. Le reste des médicaments ira attaquer des cellules saines ou sera rejeté par le corps humain. Une donnée importante dans le cas de la chimiothérapie est la dose maximale tolérée. Cela correspond à la dose maximale qu'il est possible d'injecter sans que la survie du patient soit compromise par des causes autre que le cancer en lui-même [7].

Dans les dernières années, de nombreux chercheurs ont concentré leur recherche sur une méthode qui permettrait d'améliorer cette quantité reçue par les cellules cancéreuses, tout en réduisant celle reçue par les cellules saines. Une des pistes d'amélioration est l'utilisation de vecteurs qui viendraient livrer les médicaments spécifiquement à la tumeur. On peut alors parler de livraison ciblée de médicaments [8]. Pour effectuer cette livraison ciblée, il existe principalement deux méthodes. La première est l'utilisation de vecteurs de livraison qui ne vont cibler que les cellules cancéreuses, par fonctionnalisation de molécules de détection sur la surface du vecteur. Cette molécule peut être spécifique à un récepteur de cellules cancéreuses et donc en faire la cible à détruire. Une seconde méthode est la livraison ciblée déclenchée par excitation externe. Les

médicaments étant stables dans le vecteur et n'attaquant pas les cellules saines, seules les cellules cancéreuses sont les cibles du déclenchement de la livraison car, sont les seules cibles du stimulus.

2.1.1 Livraison ciblée de médicaments

Il existe deux types de mécanisme de livraison et de ciblage. En premier lieu, il peut s'agir de ciblage passif des médicaments. Il n'y a aucun phénomène physique extérieur au corps qui vient influencer sur la quantité de médicaments qui est délivrée à la tumeur. Le principal effet permettant cela est l'effet amélioré de perméabilité et de rétention, plus communément appelé effet EPR (enhanced permeability and retention) [9]. Celui-ci utilise directement les propriétés des cellules tumorales qui forment de vaisseaux angiogéniques (vaisseaux sanguins formées pour assurer le développement de la tumeur). Ces vaisseaux forment des fenestrations importantes entre les cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins [10, 11]. Sur la Figure 2-1, il est possible de voir que des éléments de poids moléculaire élevé vont s'accumuler dans les tumeurs et passer à travers ces interstices via les vaisseaux angiogéniques. En effet, la vascularisation de la tumeur va croître énormément pour répondre à la demande croissante en nutriments et en oxygène de la tumeur [12, 13]. Celle-ci, subira une accumulation mais aussi une rétention accrue des particules due au mauvais drainage lymphatique dans l'environnement des tumeurs [14]. Une technique pour utiliser ce phénomène peut alors consister à placer les médicaments dans des nanovecteurs, afin que ceux-ci subissent l'effet EPR, étant donné leur taille. Il est alors possible de distinguer deux grandes familles de nanovecteurs, illustrées à la Figure 2-2 : les nanoparticules organiques comme les liposomes, les micelles, les dendrimères ou les nanogels [15-17] et les nanoparticules inorganiques comme des nanosphères en or ou des nanoparticules super paramagnétiques d'oxyde de fer. Une autre méthode passive de ciblage des médicaments peut être de cibler directement l'endroit où se trouve la tumeur, via injection locale, pour que la concentration en médicaments soit importante dans l'environnement de la tumeur [8].

Il existe aussi une méthode dite active de livraison de médicaments. Dans ce cas, la libération des médicaments se fera seulement à l'endroit de la tumeur par un stimulus externe de nature optique ou ultrasonore. Ce stimulus peut par exemple, libérer des médicaments encapsulés dans des micelles et ce seulement si le stimulus est activé [18]. Il est aussi possible d'encapsuler les médicaments dans des nanoparticules magnétiques, qui sont ensuite dirigées vers le site de la tumeur, par application d'un champ magnétique externe. Ces nanoparticules magnétiques sont par

exemple des liposomes magnétiques ou des nanoparticules d'oxyde de fer [19]. L'utilisation de nanoparticules lipidiques (LNPs) comme vecteur pour la livraison de médicaments contre le cancer sera détaillée dans la prochaine section.

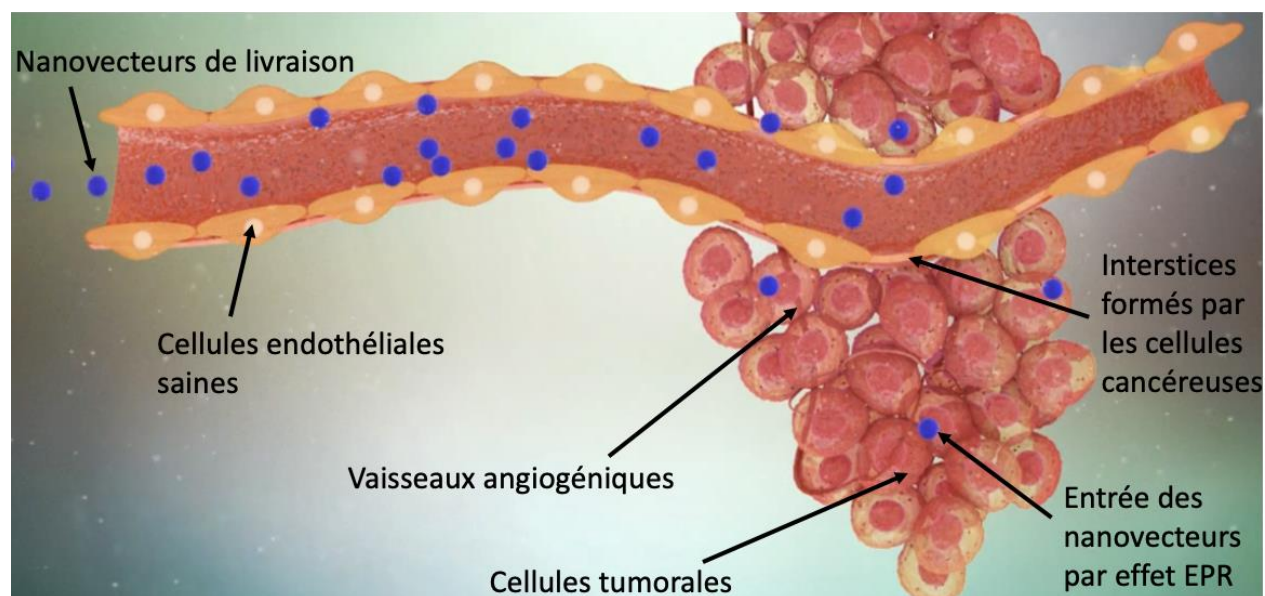


Figure 2-1 Effet EPR et ciblage passif. Les nanovecteurs peuvent entrer dans les cellules tumorales à travers les interstices entre les cellules endothéliales (cellules tapissant les vaisseaux sanguins) et s'y accumuler en raison d'un mauvais drainage lymphatique [14]. Ces interstices sont formés par les vaisseaux angiogéniques qui assurent l'apport important en nutriments au développement des cellules cancéreuses. Adapté de [20].

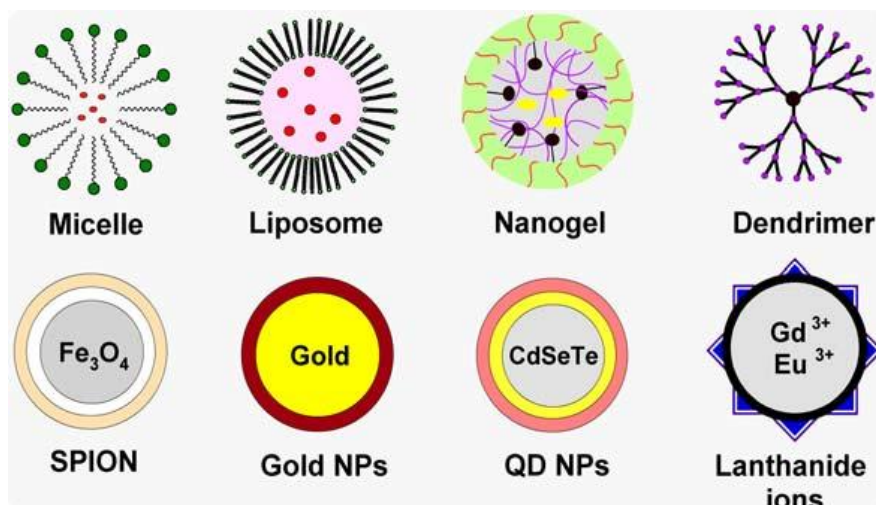


Figure 2-2 Les nanovecteurs peuvent être classés en deux groupes. Les nanovecteurs organiques : micelle, liposome, nanogel, dendrimères et les nanovecteurs inorganiques : nanoparticules d'or, nanomatériel d'oxyde de fer superparamagnétique, puits quantiques et ions lanthanides paramagnétiques [17].

2.2 Systèmes de livraison organiques dans le traitement contre le cancer

2.2.1 Les nanovecteurs à base lipidique

Dans les dernières années, l'utilisation de nanoparticules organiques, et notamment de nanoparticules lipidiques, comme vecteur de livraison s'est beaucoup développée et plusieurs formulations de liposomes sont aujourd'hui disponibles dans le commerce. Le principal avantage de ce type de vecteur de livraison est leur composition, relativement proche de celle des membranes cellulaires, pour que le corps ne les détruise par réponse immunitaire. Le premier travail de création de nanovecteurs comme cargos à modèle cellulaire est publié en 1965, il représente le début de la recherche de systèmes à modèle membranaire [21, 22].

Chaque type de nanoparticule organique présente des avantages et des inconvénients, le bon type de nanovecteurs doit être choisi en fonction du type de médicaments utilisé pour l'encapsulation (petit acide ribonucléique (pARN) ou DOX par exemple).

Une des catégories de nanoparticules organiques sont les micelles. Ce sont des nanoparticules de forme sphéroïde composées d'un ensemble de molécules amphiphiles (molécule qui possède à la fois un groupe hydrophile et un groupe hydrophobe). Dans le cas le plus répandu, ces molécules amphiphiles sont composées d'une tête polaire hydrophile dirigée vers l'extérieur (une couronne hydrophile) de la nanoparticule et d'une queue hydrophobe dirigée vers l'intérieur de la nanoparticule, comme il est montré dans la Figure 2-3. Dans certains cas, il est possible que la queue soit dirigée vers l'extérieur et la tête vers l'intérieur, on parle alors de micelles inversées. En général, les molécules utilisées pour leur formation sont des polymères ou des phospholipides. Dans ce type de système, il va être aisé d'insérer des médicaments hydrophobes dans le cœur hydrophobe des micelles, ce qui représente leur principal avantage. Un autre avantage de ce type de systèmes est le fait que leur couronne hydrophile, naturellement présente dans le cas des micelles, leur permet d'avoir un temps de circulation *in vivo* important [23-25]. Leur préparation est aussi très simple et peu coûteuse. Cependant, ces systèmes représentent une faible portion des nanovecteurs utilisés dans le domaine de la nanomédecine [26] à cause, notamment, de leur faible stabilité dans le flux sanguin en comparaison à d'autres nanovecteurs comme les liposomes. De plus il existe un autre problème : la caractérisation difficile de ces systèmes et plus particulièrement de leur interaction avec l'environnement biologique [25].

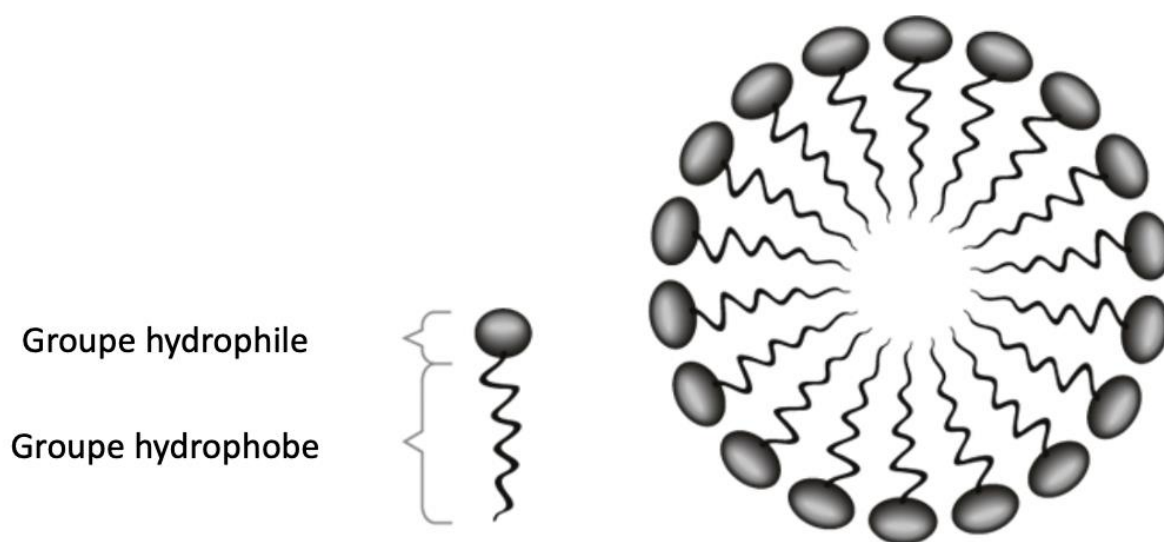


Figure 2-3 Représentation schématique d'une micelle et de son composant divisé en deux parties : le groupe hydrophile et le groupe hydrophobe [27].

Un type de nanovecteurs organiques bien plus développé dans la recherche mais aussi commercialisé est les nanoparticules lipidiques (LNPs). Un avantage de ces nanovecteurs est qu'ils ne vont pas s'accumuler au niveau des cellules saines, il y a donc beaucoup moins d'effets secondaires. Il a par exemple été montré que la dose maximale de doxorubicin tolérée par un homme, est 10 fois plus importante lorsqu'elle est encapsulée dans des nanoparticules lipidiques, si celles-ci ne présentent pas de fuites [28]. La dose injectable à un patient est donc plus élevée pour de la DOX encapsulée dans des nanoparticules lipidiques, par rapport à la DOX en solution. Pour obtenir un traitement efficace, il faut cependant trouver un moyen de déclencher la libération des médicaments. Avec des LNPs qui ne libèrent pas la DOX lors d'un déclenchement externe, le seul phénomène permettant de livrer la DOX aux cellules est une fuite naturelle des LNPs au cours du temps. Dans ce cas, seulement une très faible fraction des médicaments sera finalement délivrée à la tumeur.

Il est possible d'en distinguer deux types : les nanoparticules lipidiques dites solides et les liposomes. Les liposomes sont formés d'au moins une double couche de lipides. Cette double couche est formée par superposition successive de deux molécules amphiphiles décrites précédemment. Comme pour les micelles, on trouve une couronne hydrophile extérieure et les queues des deux molécules amphiphiles interagissent ensemble, il se trouve donc à l'intérieur du liposome une autre couronne hydrophile. Le liposome est composé d'au moins une bicouche de lipides et d'un cœur aqueux. La principale différence entre les liposomes et les micelles est donc la présence d'une double couche de lipides dans les liposomes, alors qu'il n'existe qu'une simple couche dans les micelles. Une représentation schématique d'un liposome est disponible à la Figure 2-4. L'existence de cette bicouche lipidique hydrophile et de ce cœur aqueux dans le liposome permet d'avoir la possibilité d'encapsuler en même temps deux types de molécules : des molécules hydrophiles dans le cœur aqueux, comme des médicaments généralement sous forme cristalline ou des vitamines, mais aussi des éléments hydrophobes dans la bicouche de lipides comme des nanoparticules d'or.

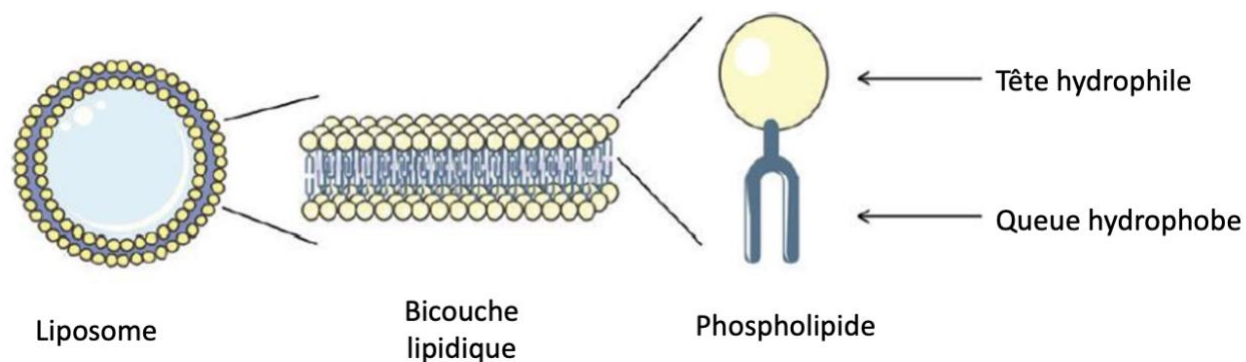


Figure 2-4 Schéma d'un liposome et de sa double couche de lipides composées de phospholipides divisés en une queue hydrophobe et une tête hydrophile. Ces phospholipides permettent de former la couche extérieure de lipide des liposomes à l'intérieur de laquelle se trouve un cœur aqueux [29].

Les nanoparticules lipidiques dites solides sont, quant à elles, composées d'une seule couche de lipides comme les micelles mais possèdent un intérieur solide. Il s'agit en fait d'une matrice lipidique solide pouvant solubiliser les molécules lipophiles. La substance thérapeutique est donc placée à l'intérieur de ce corps solide et peut prendre différentes formes : des médicaments, de l'ARN messager (ARNm) ou encore de l'ADN par exemple. En général, les liposomes sont préférés pour encapsuler des petites molécules comme la DOX, grâce au cœur aqueux qui les composent, tandis que, les nanoparticules lipidiques solides sont préférées pour encapsuler des petits acides ribonucléiques interférents (pARNi) ou de l'ARNm, qui sont alors placés dans le cœur solide [30-32]. Les acides nucléiques sont faciles à encapsuler grâce aux interactions entrant en jeu avec les phospholipides ionisables qui composent les nanoparticules lipidiques solides. Ces deux éléments sont mélangés à un pH de 10, pH basique auquel les phospholipides ionisables seront de charge neutre et vont s'attacher aux acides nucléiques. Après une étape d'ajustement du pH, cette étape de mélange effectuée en présence d'éthanol en solution aqueuse, permet la formation des nanoparticules lipidiques solides, avec l'agent thérapeutique en son intérieur. [33]. Ces nanoparticules font en général une taille allant de 10 à 1000 nm, et peuvent attacher à leur corps solide des molécules de ciblage comme des anticorps. La recherche sur cette méthode de ciblage continue d'être effectuée, mais peu de résultats efficaces ont été obtenus jusqu'à présent. Il a été montré que les nanoparticules lipidiques présentant des molécules de ciblage sur leur surface extérieure, vont subir une clairance par le corps humain et ne peuvent pas atteindre les cellules

cibles [34]. Les nanoparticules lipidiques (solides ou liposomes) présentent l'avantage d'être biocompatibles car sont principalement composés de phospholipides, principal composant des membranes cellulaires. Leur principal inconvénient réside aujourd'hui dans leur préparation relativement complexe et coûteuse. Ces différents avantages ont permis aux nanoparticules lipidiques d'être commercialisées et d'avoir des applications dépassant le cadre de la recherche. Il est possible de citer le liposome Daunosome (*NeXtar, Inc.*) à base de Daunorobucin ou le Doxil (*Sequus Pharmaceutical*) qui encapsule de la Doxorubicin. L'application directe des nanoparticules lipidiques la plus connue reste aujourd'hui les vaccins à base d'ARNm contre le SARS-COV 2 [35-37] qui ont été développés par Moderna et Pfizer-BioNtech. Le premier médicament utilisant le pARNi encapsulé dans des nanoparticules lipidiques (ONPATRO) a aussi été développé, par la compagnie Alnylam.

2.2.2 Propriétés et caractéristiques des liposomes

Dans le cadre de cette maîtrise, ce sont les liposomes qui sont utilisés comme nano vecteurs, par souci de simplification, le terme générique nanoparticules lipidiques (LNPs) sera assimilé aux liposomes dans la suite du mémoire. Le premier système de liposomes a été décrit dans les années 1960 [38] et est toujours en développement depuis, au vu de son potentiel. L'avantage de ce type de systèmes est la façon dont ils vont se comporter dans le corps humain. Les liposomes montrent en général un temps de circulation important dans le flux sanguin *in vivo*, généralement grâce à la présence de Polyéthylène Glycol (PEG) sur la surface. Avec le PEG, les liposomes sont capables de rentrer aisément dans différents types de cellules. La Figure 2-5 montre un schéma de l'entrée naturelle d'un liposome dans une cellule par endocytose et de la livraison d'ADN ici. Le point intéressant de ce schéma est de montrer les différentes étapes de l'entrée des liposomes dans les cellules. Les liposomes vont d'abord subir une endocytose pour rentrer dans la cellule, puis, ceux-ci vont se regrouper dans différents endosomes. Après un certain temps, les endosomes deviennent des lysosomes dans lesquels les liposomes sont encore encapsulés [39]. Les lysosomes sont des vésicules où se trouvent des enzymes, alors que les endosomes sont des vésicules formées par endocytose. Le principe de l'endocytose, pour des liposomes encapsulant de la DOX, est similaire jusqu'à l'étape de libération qui n'a pas toujours lieu selon la formulation des liposomes utilisée. Le point complexe dans l'ensemble de ce type de systèmes est de permettre la fuite du médicament depuis l'endosome. Dans le cas présenté ici, c'est l'interaction entre les lipides anioniques de

l'endosome et les lipides cationiques du liposome qui permet à l'ADN de s'échapper du liposome et de diffuser jusqu'au noyau.

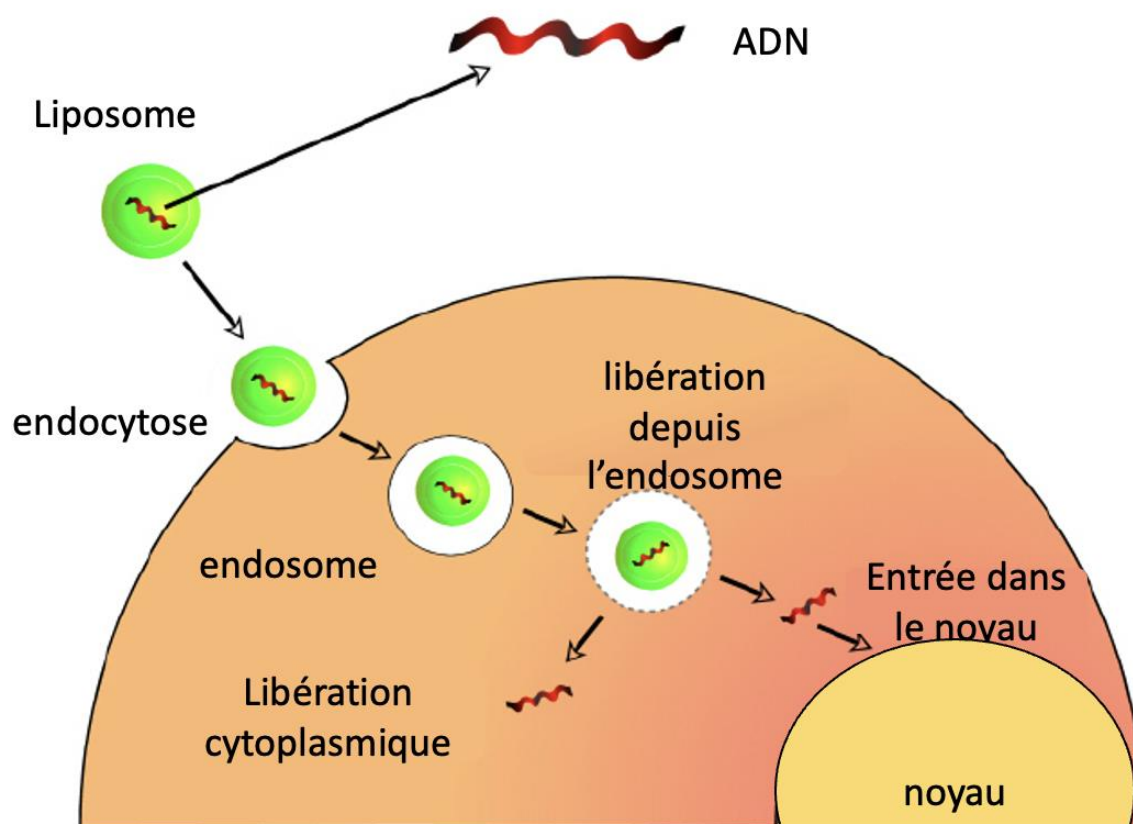


Figure 2-5 Représentation schématique de l'endocytose des liposomes pour la livraison de gènes dans les cellules [40]. Les liposomes entrent dans la cellule par endocytose. Ils sont ensuite dans l'endosome et libèrent leur contenu grâce aux enzymes présents dans l'endosome ici. L'ADN peut ensuite entrer dans le noyau. Le fonctionnement de l'endocytose pour des liposomes encapsulant des médicaments comme la DOX est similaire.

Les liposomes sont généralement préparés par dissolution des lipides ou phospholipides dans un solvant organique. Il y a ensuite une étape d'évaporation, puis une réhydratation dans un solvant aqueux. La dernière étape peut être une extrusion [41], une sonication [42] ou une microfluidisation [43]. C'est à cette dernière étape que les nanoparticules sont formées et que le nombre de couches

des liposomes peut être contrôlé. Par sonication, nous obtenons des liposomes de petite taille avec une seule couche tandis que par extrusion ou microfluidisation, nous pouvons obtenir des liposomes à plusieurs couches. Chacun des composants des liposomes utilisés lors de la formulation est ajouté pour une propriété précise souhaitée des liposomes. Il y a toujours un composant principal que sont les lipides ou phospholipides et il est possible de trouver en plus de cela du Cholestérol (Chol) et du PEG. Un ajout de cholestérol va permettre de rendre les LNP plus stables et celui de PEG permet d'améliorer le temps de circulation des liposomes dans la circulation sanguine [44]. Celui-ci va couvrir les nanoparticules, permettant d'éviter leur agrégation et aussi leur destruction par le système immunitaire via opsonisation ou phagocytose [45]. Le choix des phospholipides se fait selon l'application que l'on souhaite faire des LNPs et des propriétés que l'on souhaite leur donner. Nous pouvons citer les trois types de liposomes, les plus utilisés selon les propriétés données par les phospholipides. Ces familles sont les suivantes :

- Les liposomes classiques, qui ne présentent pas de propriétés particulières par rapport à une caractéristique externe du milieu, comme la température ou le pH. Ceux-ci sont les plus stables et les plus simples à produire en général. Ils sont composés de phospholipides synthétiques ou naturels. Le distearoylphosphatidylcholine (DSPC) est souvent retrouvé comme composant principal.
- On retrouve les liposomes sensibles au pH. Le principe de ces liposomes est de rentrer dans les cellules par endocytose et de se dégrader par action des enzymes dans les lysosomes. En général, ceux-ci sont préparés en utilisant du Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE). Grâce à l'utilisation de ce phospholipide, le liposome sera stable à pH neutre mais à l'entrée dans les lysosomes, le pH devenant acide, les liposomes deviennent instables et libèrent leur contenu [46, 47]. Le problème de ces liposomes est leur stabilité plus faible que les liposomes classiques et la présence de fuites.
- Un dernier type de liposomes souvent retrouvé sont les lipides thermosensibles. Chaque phospholipide possède une température de transition de phase T_c , qui caractérise la température à laquelle les phospholipides vont passer d'une phase solide à une phase liquide. Pour libérer les médicaments, il suffit alors de chauffer la zone souhaitée, une fois que les nanoparticules lipidiques sont entrées dans les cellules [48]. En général, un mix de deux composants sont utilisés pour fabriquer ce type de liposome. Il y a le

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) qui a une température de transition à 41°C et le DSPC avec une température de transition à 55°C. Le DPPC pur permet d'avoir une température de libération des médicaments basse mais la quantité et le taux de libération sont faibles. Ajouter du DSPC ou du Hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC température de transition à 52°C) peut permettre d'augmenter le taux de libération [49]. L'ajout de ce phospholipide permet aussi d'augmenter la température de transition, il peut donc être intéressant de jouer sur le ratio DPPC/DSPC pour obtenir la température de transition souhaitée. Ces liposomes présentent un inconvénient important. La température à laquelle les liposomes doivent être chauffés est supérieure à la température de nécrose des cellules, il faut donc faire très attention durant la phase de chauffage pour ne pas tuer les cellules, et effectuer un chauffage en montant progressivement la température pendant de courtes durées. En effectuant des chauffages à une température de 43°C pendant des durées inférieures à 1 heure, les dommages causés aux cellules restent modérés [50]. En jouant sur la durée de chauffage nécessaire pour que les nanoparticules lipidiques livrent le médicament, il peut être possible de le livrer sans induire la mort de toutes les cellules par chauffage. Ce type de liposomes est aussi en général peu stable et présente des fuites. C'est ce problème qui a empêché le produit ThermoDox de la compagnie *Celsion* de dépasser la phase 3 des essais cliniques.

Aujourd'hui, ce sont principalement les liposomes dits classiques qui sont les plus utilisés, ils ne présentent en effet que très peu de problèmes de fuites comparativement aux deux autres.

Comme expliqué plus haut, ces liposomes ont des applications cliniques et le Doxil en est la première, un schéma de ce produit est disponible à la Figure 2-6. Ce médicament utilise du HSPC comme phospholipide principal.

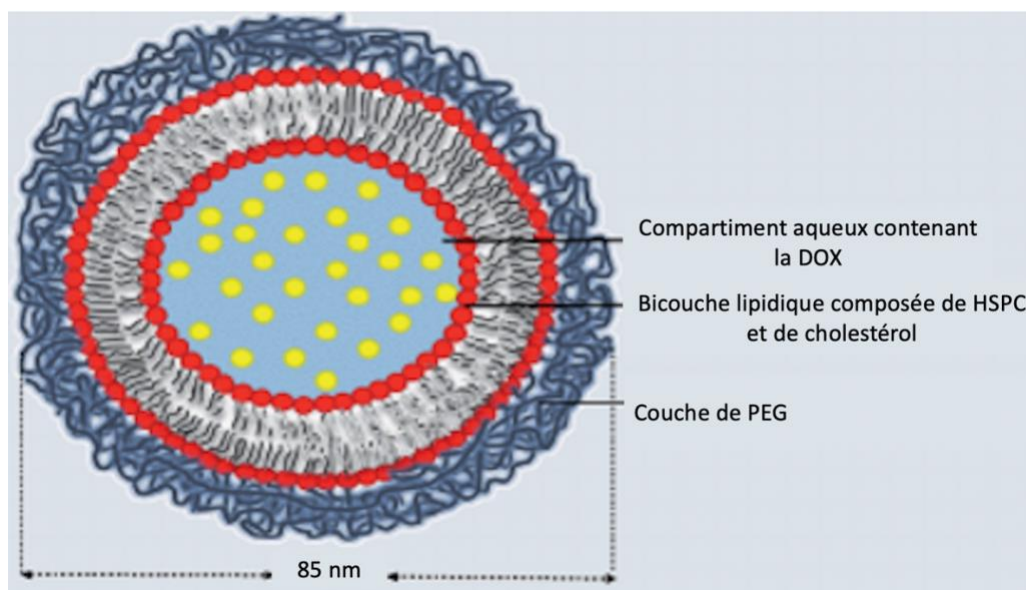


Figure 2-6 Schéma de la structure chimique du DOXIL. La DOX se trouve dans le cœur aqueux des liposomes. La couche externe est composée de cholestérol et de HSPC sur laquelle se trouve une couche de PEG [51].

Ce produit n'augmente pas significativement l'efficacité thérapeutique du médicament si nous le comparons à la Doxorubicin directement injectée, mais grâce à l'effet EPR notamment, les effets secondaires sont réduits. A la suite de l'utilisation de ce produit, d'autres ont vu le jour comme Myocet, Depocyt et Onyvide [52]. De nombreux efforts ont donc été placés dans la recherche pour essayer de combiner ces systèmes avec un processus de libération venant d'un stimulus extérieur. Les méthodes les plus utilisées pour cela sont des stimuli ultrasonores, magnétiques ou optiques. La libération par stimuli ultrasonores fonctionne grâce à la perturbation dans la structure des liposomes, induite par les ultrasons. Dans le cas magnétique, cela est souvent mis en place avec des nanoparticules paramagnétiques, encapsulées dans les liposomes. Lors de l'application d'un champ magnétique externe, les liposomes s'agglomèrent au niveau de la tumeur, par interaction avec les nanoparticules paramagnétiques. Pour le stimulus optique, c'est généralement une source lumineuse, irradiant à l'endroit de la tumeur, qui induit la destruction des liposomes via chauffage ou effet mécanique. Ce type de stimulus est souvent utilisé en combinaison avec des nanoparticules d'or placées dans les liposomes, ou alors, avec des molécules placées directement dans les couches des liposomes, qui, par interaction avec le stimulus, permettent une ouverture de ces couches. C'est le cas, par exemple, de liposomes contenant des analogues de phosphatidylcholine avec azobenzènes, qui peuvent, par isomérisation, libérer des médicaments lors d'une irradiation UV

[53]. Dans le projet présenté ici, le choix s'est porté sur l'incorporation de nanoparticules d'or de petite taille (5 nanomètres de diamètre) dans les liposomes. Elles vont permettre, par interaction avec un laser, d'induire la livraison de la DOX. Cela peut finalement augmenter l'efficacité thérapeutique de la DOX.

2.3 Nanoparticules plasmoniques et interaction laser-nanoparticules

La solution proposée par le laboratoire partenaire pour obtenir une livraison ciblée de médicaments la plus efficace possible est l'interaction entre des nanoparticules d'or et une irradiation par lasers. Cette section a pour but de décrire les propriétés des nanoparticules et les phénomènes mis en jeu lors de leur interaction avec différents types de laser.

2.3.1 Nanoparticules plasmoniques et leurs propriétés

Les nanoparticules dites plasmoniques, sont des nanoparticules métalliques (souvent en or et/ou argent) avec des tailles comprises entre 1 nm et 200 nm. Il peut en exister de différentes formes et de différentes compositions. Sur la Figure 2-7, il est possible de voir différentes formes usuelles de nanoparticules.

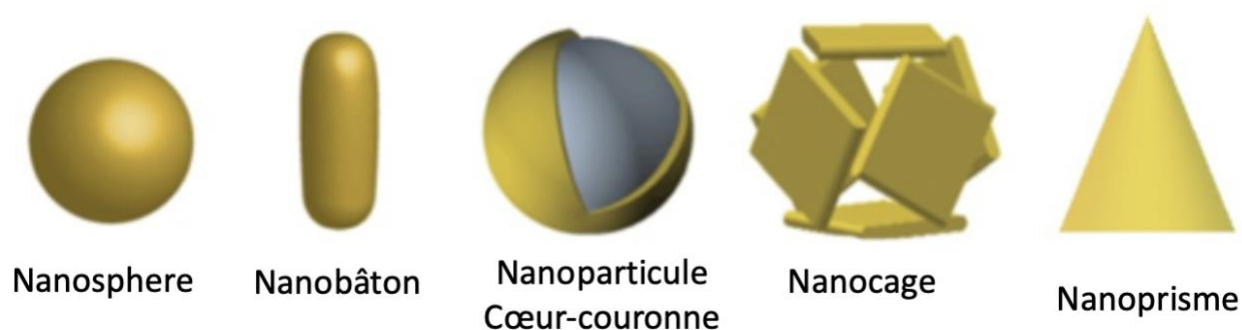


Figure 2-7 Formes classiques de nanoparticules d'or utilisées [54, 55].

Ces nanoparticules possèdent des propriétés très intéressantes dans les domaines optiques du visible et même de l'infrarouge, pour certaines formes spécifiques de nanoparticules, comme les nanobâtons. Les nanoparticules possèdent, en effet, un pic d'extinction d'amplitude importante qu'on appelle aussi pic plasmon. En fonction des caractéristiques des nanoparticules, ce pic se situera à différents endroits dans le domaine du visible ou de l'infrarouge. Par exemple, pour des

nanosphères, augmenter la taille des nanoparticules aura pour effet de déplacer le pic plasmon vers les longueurs d'onde plus élevées se situant dans le rouge, appelé en anglais *redshift*. Le changement de composition des nanoparticules aura aussi un effet sur la position du pic plasmon comme le montre la Figure 2-8.

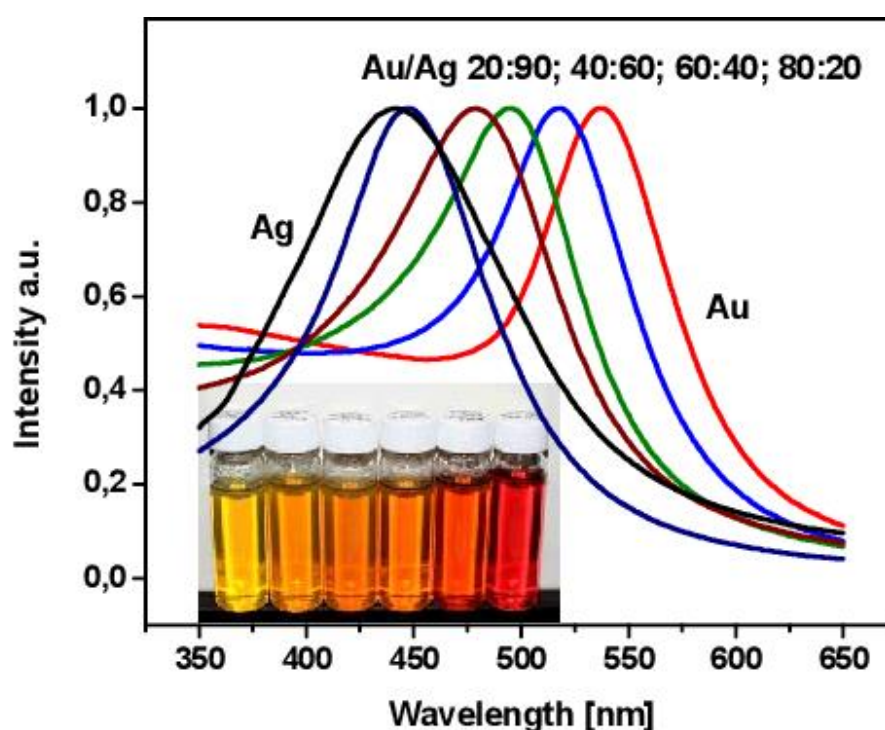


Figure 2-8 Spectres d'extinction de nanoparticules en alliage or-argent de 60 nm [56].

L'origine de ce pic plasmon provient d'un couplage entre les électrons de conduction de la nanoparticule avec l'onde électromagnétique incidente. Cette onde va avoir pour effet de faire se déplacer les électrons autour de leurs noyaux, qui vont alors chercher à faire revenir les électrons en créant une force d'attraction afin de compenser la perte de charge. On se retrouve alors avec un gaz électronique oscillant, généré par la force d'attraction et l'effet de l'onde électromagnétique. Cette excitation collective de ce gaz électronique est appelée plasmon et peut être décrit par un modèle d'oscillateur harmonique. Ainsi, en envoyant une onde électromagnétique incidente sur une nanoparticule à la fréquence correspondant à la fréquence du pic d'extinction de la nanoparticule, il y aura un phénomène de résonance entraînant un chauffage de la nanoparticule,

pouvant résulter en une formation de nanobulle ou même en la fragmentation de la nanoparticule. Il va alors être possible de jouer sur les caractéristiques des nanoparticules et du laser pour obtenir l'application voulue.

Il est possible de calculer le spectre théorique d'une nanoparticule via la théorie de Mie. Le paramètre important est alors la section efficace d'absorption ou de diffusion des nanoparticules, cette section efficace correspond au ratio de la puissance diffusée ou absorbée par rapport à la puissance incidente. Pour des nanoparticules d'or de moins de 60 nm, le phénomène de diffusion est faible et c'est l'absorption qui est prépondérante. Dans ce cas, la section efficace d'absorption varie approximativement comme le volume de la nanoparticule en r_{NP}^3 (r_{NP} étant le rayon de la nanoparticule). Pour des plus grandes nanoparticules, la section efficace de diffusion devient de plus en plus importante à mesure que la taille augmente.

Les nanoparticules d'or sont des systèmes relativement stables, dont les propriétés optiques particulières font d'elles des objets utiles pour différents types d'applications. Elles peuvent être utilisées dans des applications où des propriétés d'absorption seront mises à profit, pour faire de la photothermie par exemple. Mais il est aussi possible d'utiliser les propriétés de diffusion de ces particules et d'en faire des biocapteurs très efficaces. Les nanoparticules d'or peuvent donc avoir des applications dans la détection de cancer et ensuite dans son traitement, en utilisant un laser par exemple.

D'autres propriétés, non utilisées dans le cadre de ce projet, en font des objets très utiles dans le cadre de l'imagerie. Les nanoparticules présentent l'avantage de ne pas subir de photoblanchiment, contrairement à la plupart des fluorophores grandement utilisés. Cela a un avantage très important dans le domaine médical, puisqu'il est possible d'imager des échantillons plusieurs fois et de garder toujours la même intensité de signal. A la vue des propriétés des nanoparticules, il peut aussi être possible d'effectuer du multiplexage et donc d'utiliser différentes nanoparticules, (différentes tailles ou compositions par exemple) puis de les fonctionnaliser, pour que chaque type de nanoparticules cible des marqueurs différents. Par la suite, lors de l'imagerie, il est possible de différencier les nanoparticules directement par la couleur de la lumière diffusée par chacune d'entre elles, et d'associer cela à un algorithme d'intelligence artificielle, qui sera capable de détecter quels types de cellules cancéreuses sont présentes dans un type d'échantillon, afin de savoir de quelle maladie est atteint un patient.

2.3.2 Interaction de nanoparticules avec un laser

Il existe de nombreuses publications et modèles décrivant l'interaction des nanoparticules avec différents types de laser [57-60]. Le comportement des nanoparticules sous irradiation dépendra de différents paramètres comme la durée de l'impulsion et la fluence du laser (J/m^2). Pour connaître le comportement d'une nanoparticule, il faut s'intéresser au temps de diffusion externe τ_d sous irradiation. Il s'agit du temps caractéristique que la nanoparticule va mettre à diffuser l'énergie accumulée par irradiation, à son environnement. Il s'exprime de la façon suivante avec r_{NP} le rayon de la nanoparticule, c_p la capacité thermique volumique du milieu, κ_s la conductivité thermique du milieu environnant et ρ la masse volumique du milieu [59]:

$$\tau_d = \frac{\rho c_p r_{NP}^2}{3\kappa_s} \quad (1)$$

Pour des tailles de nanoparticules en or entre 5 et 100 nm, ce temps varie de 1 ps à 1 ns. Dans le cas où la durée de l'impulsion du laser utilisé est supérieure à cette durée, pour des lasers nanosecondes ou continus notamment, il est possible de définir l'élévation de température d'une nanoparticule suite à une impulsion :

$$\Delta T = \frac{dQ/dt}{4\pi\kappa_s r_{NP}} = \frac{P_{laser}\sigma_{abs}}{4\pi\kappa_s r_{NP}} \quad (2)$$

P_{laser} est ici la densité de puissance utilisée (en W/m^2), σ_{abs} la section efficace d'absorption de la nanoparticule (en m^2) et $\kappa_s=0.598 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ dans le cas de l'eau.

Il peut être intéressant de se concentrer sur l'étude de plusieurs nanoparticules agglomérées plutôt qu'une simple nanoparticule. Dans le cas de nanoparticules d'or dans les liposomes, il est possible de trouver plusieurs nanoparticules très proches les unes des autres. Dans un cas comme celui-là, plusieurs changements peuvent être notés. En premier lieu, on peut observer un décalage du pic plasmon vers les plus grandes longueurs par rapport au spectre d'une nanoparticule seule, ainsi qu'un élargissement du pic. Il peut aussi y avoir un effet collectif d'élévation de température. Si la distance entre les nanoparticules est faible, il y a un effet de sommation des élévations de température de chaque nanoparticule et cela pourra mener à un effet collectif d'élévation de température important. Pour savoir si avec un ensemble de nanoparticules donné, il peut y avoir un

effet collectif d'élévation de température ou non, il est possible de définir le facteur adimensionnel suivant pour un agrégat en 2 dimensions [59] :

$$\eta_2^{ext} = \frac{\kappa_s}{c_p \rho} \frac{p^2}{f r_{NP}^3 L} \quad (3)$$

Dans cette équation nous introduisons p la distance inter particules entre deux surfaces adjacentes, L une longueur caractéristique qu'on peut prendre comme la taille du spot du laser et f le taux de répétition du laser. Si ce facteur adimensionnel $\eta_2^{ext} \gg 1$, alors il est possible de considérer qu'il n'y aura pas d'effet collectif lié à la température.

Suite à l'irradiation de nanoparticules avec un laser émettant à la longueur d'onde de résonance de la nanoparticule, il se produira un chauffage de la nanoparticule et de son environnement qui peut causer différents effets comme cela est montré à la Figure 2-9.

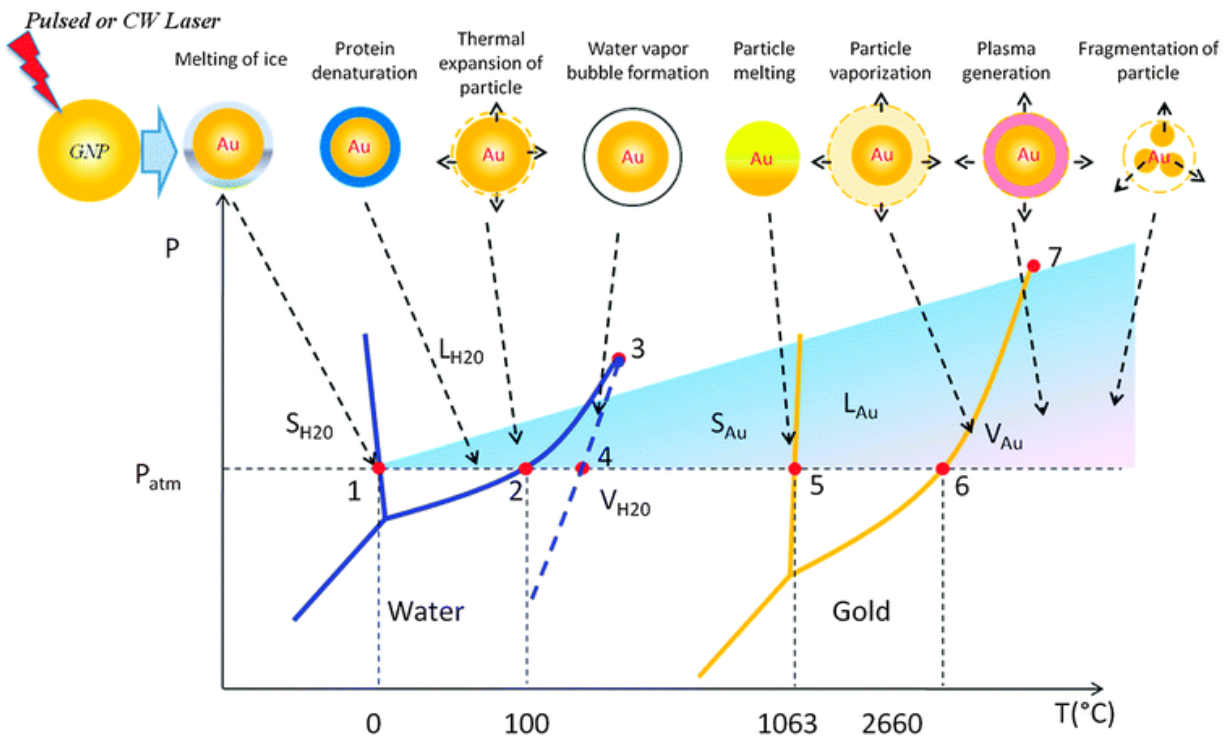


Figure 2-9 Évolution de l'état d'une nanoparticule d'or de 100 nm sous irradiation en fonction de la température obtenue avec des points de température caractéristiques pour l'eau et l'or respectivement : fusion (1 et 5), vaporisation (2 et 6), point critique (3 et 7) et point spinodal de l'eau (4) [61].

Pour entraîner un phénomène de résonance pour les nanoparticules d'or dont le pic plasmon se situe vers 520nm, il est nécessaire d'irradier les nanosphères d'or avec un laser dont la longueur d'onde se situe dans le domaine du visible. Or, dans ce domaine optique, le corps humain absorbe lui aussi. Pour des applications biomédicales il est alors préférable de s'orienter vers un laser irradiant dans le domaine de l'infrarouge, qui se situe dans ce qu'on appelle fréquemment, la fenêtre thérapeutique. Il s'agit des domaines optiques dans lesquels les composants des tissus absorbent le moins. Il est possible de voir sur la Figure 2-10 que cette fenêtre se situe dans l'infrarouge proche de 650 à 850 nm.

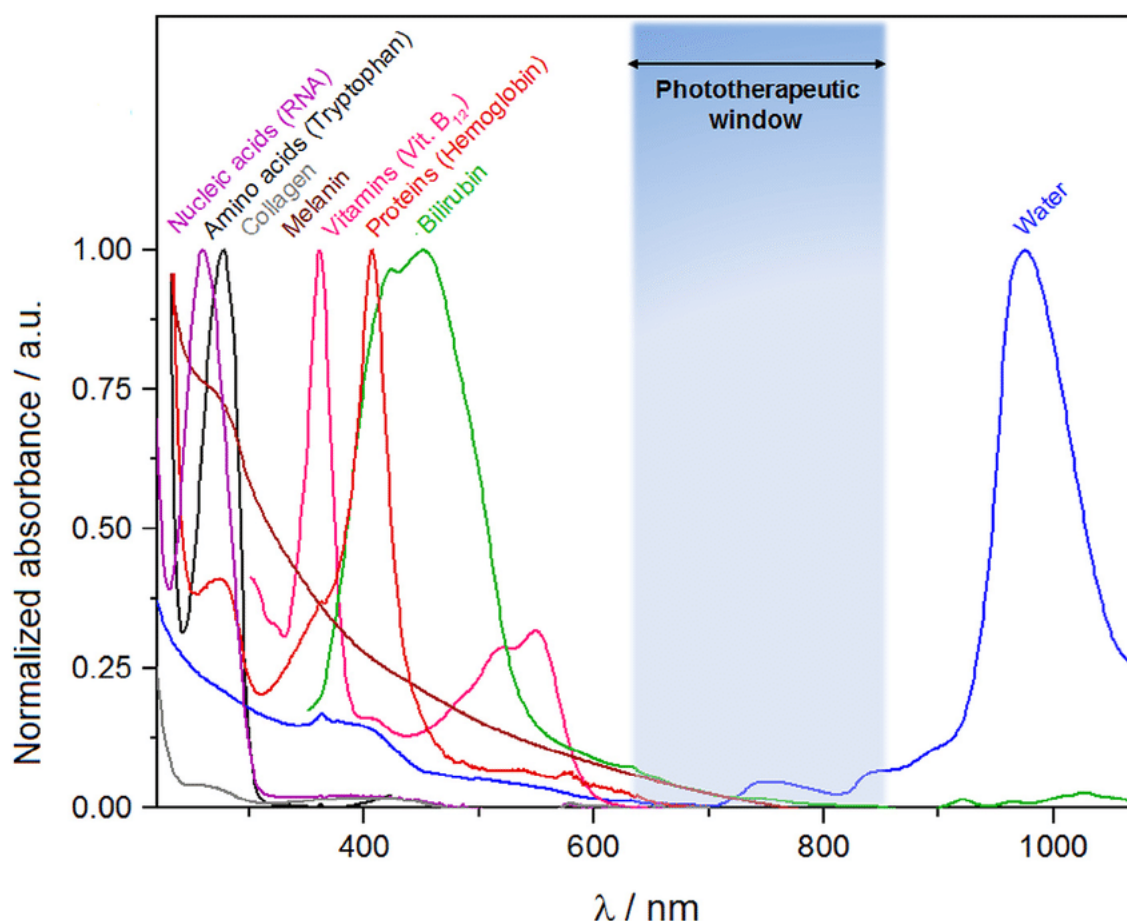


Figure 2-10 Fenêtre thérapeutique, absorption des différents composants des tissus humains de 300 à 1100 nm [62]. La fenêtre thérapeutique se trouve entre 650 nm et 850 nm où les composants absorbent très peu.

Ainsi, un autre type de laser pouvant être utilisé dans le traitement de maladies via nanoparticules sont les lasers femtoseconde ou les diodes lasers, émettant dans l'infrarouge proche. Les diodes sont des éléments peu coûteux se démocratisant pour beaucoup d'applications biomédicales. Elles sont souvent combinées avec des nanoparticules absorbant dans l'infrarouge comme des nanobâtons ou des nanoparticules cœur-couronnes, qui présentent des pics d'absorption intenses dans le domaine du proche infrarouge, contrairement aux nanosphères d'or. Les nanobâtons et les nanoparticules cœur-couronne sont donc de meilleurs candidats dans les applications de photothermie. Dans le cas de l'utilisation de laser femtoseconde, il est aussi possible d'utiliser des nanoparticules hors résonance. Il se produit alors une génération de plasma et potentiellement, une formation de nanobulles via chauffage très localisé du milieu environnant lors de la génération de ce plasma. Ce plasma est généré par un phénomène d'augmentation d'intensité du champ électromagnétique proche autour de la nanoparticule. Ce plasma va ensuite absorber la lumière en quantité plus importante que la nanoparticule, puis chauffer le milieu environnant. Ce chauffage va alors mener à la formation d'une nanobulle autour des nanoparticules irradiées [63].

2.4 Combinaison liposomes nanoparticules d'or

Dans les dernières années, de nombreux efforts ont été mis pour créer des systèmes liposomes/AuNPs. Les nanoparticules d'or sont généralement placées à l'intérieur des LNPs et non à l'extérieur, pour que les liposomes gardent leurs propriétés de temps de circulation important dans le système sanguin. Le but de l'utilisation des LNPs est de faire un nanovecteur ressemblant le plus possible à ce qui pourrait être trouvé naturellement dans le corps humain, augmentant ainsi le temps de circulation des médicaments. Ainsi, si les nanoparticules d'or étaient placées à l'extérieur des liposomes, le nanovecteur s'éloignerait d'un composant qu'on pourrait qualifier de naturel, et pourrait voir son temps de circulation dans le flux sanguin significativement réduit.

Les propriétés particulières des nanoparticules d'or sont utilisées de différentes manières. En premier lieu, les propriétés de chauffage sont à relier directement avec les liposomes thermosensibles. L'idée de la combinaison de lipides thermosensibles et des AuNPs semble prometteuse. Il suffirait d'irradier les liposomes dans la zone souhaitée avec un laser continu pour induire une élévation de température des liposomes, et ainsi libérer les médicaments. Beaucoup de recherches se sont appliquées à étudier ce phénomène [64, 65], mais le désavantage des fuites importantes que présentent ces liposomes thermosensibles font qu'ils ne sont pas les systèmes les

plus adéquats pour encapsuler des nanoparticules d'or, qui ne font qu'accentuer le problème des fuites. Un autre phénomène utilisé pour induire une libération sur ce type de liposomes est la génération de nanobulles ou la fragmentation des nanoparticules d'or pour détruire les liposomes [66].

CHAPITRE 3 CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES LIPIDIQUES

Ce chapitre présente les différentes propriétés des liposomes fournis par le laboratoire partenaire. Celui-ci, avec son importante expérience dans la formulation des liposomes a réussi à développer un protocole adaptable, capable de former des liposomes stables, encapsulant à la fois des médicaments et des nanoparticules d'or, ce qui a conduit à la mise en place de ce projet. Nous rappelons que dans la suite le terme de nanoparticules lipidiques (LNPs) fait référence aux liposomes et non aux nanoparticules lipidiques solides.

3.1 Équipements utilisés pour la caractérisation

Dans ce chapitre, différentes caractéristiques des liposomes seront présentées. Voici les équipements utilisés :

- Les spectres UV-visibles des LNPs sont acquis avec le spectromètre Epoch de la compagnie *BioTek*. Les échantillons sont placés dans des plaques à 96 puits pouvant chacun contenir un volume de 300 μL . Les volumes utilisés allaient de 70 μL à 300 μL en fonction de l'expérience effectuée; le volume était faible pour des mesures faites après une centrifugation et le volume était de 300 μL autrement. Les spectres comparés entre eux ont toujours été obtenus avec des échantillons dont le volume était identique.
- Les spectres fluorescents ont été obtenus avec un spectromètre Shamrock associé à une caméra ANDOR Newton de la compagnie *Oxford Instruments*. Ce spectromètre est monté à la sortie d'un microscope, ce qui peut permettre d'obtenir des spectres d'objets de petite taille comme des nanoparticules uniques. Pour acquérir les spectres présentés dans ce chapitre, un objectif 10x d'ouverture numérique 0.3 est utilisé en association avec un cube de fluorescence composé de 2 filtres passe bandes. Ce cube permet d'observer seulement le spectre en fluorescence. Le cube utilisé est composé d'un filtre passe bande de 505 à 555 nm qui est utilisé pour l'excitation et d'un filtre passe bande de 560 à 620 nm qui sert pour l'émission. Tous deux proviennent de chez *Nikon*. La source lumineuse utilisée est une source de lumière « blanche » à mercure Intensilight de *Nikon*.
- Les mesures de dimension, d'indice de polydispersité et de potentiel Zeta ont été effectuées avec un Zetasizer Nano ZS de l'entreprise *Malvern*.

- Certaines expériences de centrifugation ont été effectuées pour la caractérisation. Lors de ces centrifugations les filtres *Microcon DNA Fast Flow Centrifugal Filter Unit with Ultracel membrane* de *Milipore Sigma* ont été utilisés. Ces centrifugations ont été effectuées à 20 000 g pendant 4 minutes. Elles ont pour but de séparer les LNPs de la DOX en solution.

3.1 Présentation des nanoparticules utilisées

Les nanoparticules lipidiques utilisées dans ce projet ont été préparées par les chercheurs du groupe du professeur P.Cullis. Le laboratoire partenaire, situé à UBC à Vancouver, est spécialisé dans la préparation de nanoparticules lipidiques et a récemment développé une méthode de synthèse permettant l'encapsulation de la Doxorubicin, un médicament contre le cancer, et des nanosphères d'or de 5nm de diamètre. Leur méthode de fabrication présente la nouveauté d'être adaptable. De plus les nanoparticules lipidiques sont stables dans le temps et présentent peu de fuites, contrairement à des nanoparticules lipidiques thermosensibles par exemple, particulièrement quand aucune nanoparticule d'or n'est encapsulée. Il faut pour cela les conserver dans de bonnes conditions au réfrigérateur à 4°C. La formulation utilisée ici est la suivante : 1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium propane (DODAP)/DSPC/Chol/PEG-DSPE, 10/49/40/1 molaire. La raison de l'utilisation de Chol et de PEG-DSPE est, comme présenté dans la revue de littérature, de rendre les liposomes plus stables et pour maximiser le temps de circulation dans le flux sanguin. Le DSPC est le phospholipide qui sert de base et permet d'obtenir des liposomes montrant peu de fuites. Le DODAP est un lipide cationique ionisable qui rend possible l'encapsulation des nanoparticules d'or, par interaction électrostatique avec celles-ci. Il va permettre de former la couche où les AuNPs sont encapsulées. La concentration est faible pour pouvoir obtenir un intérieur aqueux où placer les médicaments dans le liposome. La concentration à utiliser de ce composant a été étudiée par le laboratoire partenaire, et le résultat le plus optimal par rapport à la quantité de nanoparticules d'or encapsulée et le taux de rétention de la DOX est celui qui a été utilisé pour la formulation dans le cadre de ce projet. Le laboratoire partenaire a aussi fourni plusieurs données sur ces liposomes comme des images en cryo-microscopie électronique en transmission (cryoTEM) dont une est montrée à la Figure 3-1. Cela permet d'avoir la confirmation de la bonne encapsulation du médicament et des nanoparticules d'or.

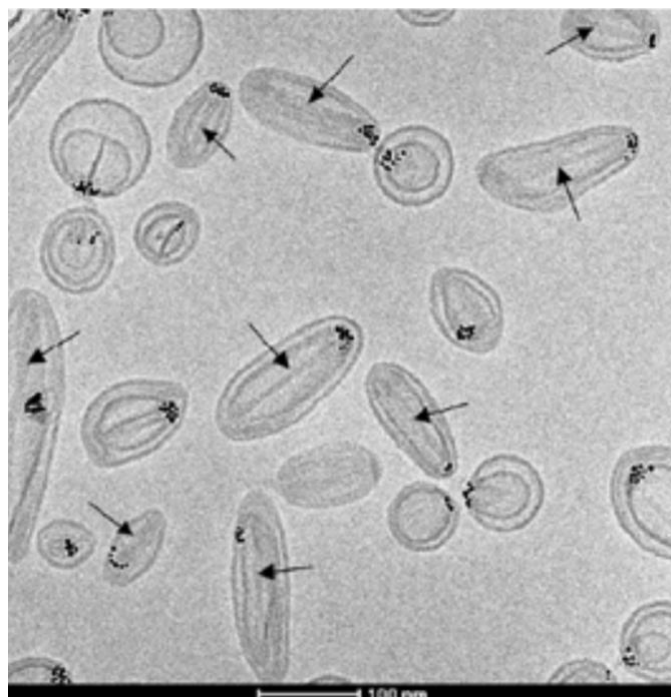


Figure 3-1 Image Cryo-TEM des liposomes avec de la Doxorubicin dans le cœur aqueux (marquées par les flèches) et les nanoparticules d'or de 5nm dans la couche extérieure de lipides.

Il est possible de voir que les nanoparticules lipidiques sont de forme sphéroïde d'environ 100 nm de diamètre. Les points noirs présents dans les lipides sont les nanosphères d'or encapsulées, formant des agrégats. Le nombre de nanoparticules d'or présentes dans les liposomes peut être contrôlé durant la phase de synthèse, mais, il y a un compromis à faire entre le nombre de nanoparticules d'or et la stabilité des lipides, ainsi que la quantité de médicament encapsulée. Le choix d'une dizaine de nanoparticules a été fait par le laboratoire de P.Cullis, car ce nombre semblait être le maximum qui n'engendre pas de fuite importante dans les liposomes. Il est difficile d'encapsuler des nanoparticules plus grandes car la couche de lipides où les nanoparticules sont encapsulées est de petite dimension comme montrée sur la Figure 3-1. Différents échantillons ont été fournis, pour pouvoir effectuer les tests de livraison de médicaments. Les caractéristiques physiques et les composants des différents échantillons sont présentés dans le Tableau 3-1. Le Zêta potentiel a été mesuré sur les échantillons reçus et le diamètre moyen ainsi que l'indice de polydispersité ont été fournis par le laboratoire partenaire. Ces données montrent que les liposomes font sensiblement la même taille, avec une légère augmentation de rayon pour les liposomes

encapsulant de la Doxorubicin et des nanoparticules d'or. La donnée sur le potentiel Zêta permet de s'assurer que les LNPs ne vont pas adhérer aux cellules par interaction électrostatique. Les cellules ayant un potentiel Zêta négatif proche de celui des LNPs utilisées ici, aucune adhésion électrostatique n'aura lieu lors d'une étude *in vivo* ou *in vitro*. De plus, la valeur négative du potentiel permet de s'assurer que les nanoparticules peuvent être rejetées, après un certain temps, par le système réticuloendothélial du corps humain [67]. Le potentiel négatif obtenu est principalement lié à la couche de PEG se trouvant sur la surface extérieure des LNPs. Cette couche de PEG permet d'assurer la stabilité colloïdale des liposomes en solution. Entre les différents échantillons les valeurs sont différentes à cause de la présence de DOX ayant un potentiel positif, et des nanoparticules d'or ayant un potentiel négatif à cause de leur enrobage de surface. La donnée importante ici est ces valeurs de potentiel Zêta, restant du même ordre de grandeur et bien négatives comme attendu.

Tableau 3-1 Diamètre moyen des liposomes, Indice de polydispersité et potentiel Zêta des différents échantillons fournis de LNPs.

Échantillon	Diamètre moyen des liposomes	Indice de polydispersité	Potentiel Zêta
LNPs/AuNPs /DOX	114 nm	0.075	-5,87 mV
LNPs/AuNPs	88 nm	0.06	-7,4 mV
LNPs/DOX	80 nm	0.18	-2,3 mV
LNPs	73 nm	0.15	-7,95 mV

3.1.1 Méthode de préparation des liposomes

L'encapsulation des nanoparticules d'or dérive d'un précédent travail sur l'encapsulation d'acides nucléiques chargés négativement, comme le pARNi ou l'ARNm, en utilisant des lipides cationiques ionisables [68]. Le problème de ce système est qu'il présente une quantité importante de lipides cationiques ionisables et donc un cœur hydrophobe [69], sans cavité aqueuse pour

encapsuler des médicaments. En partant de ce fait, le laboratoire de P.Cullis a cherché à réduire le taux de lipides ionisables, et à augmenter la proportion de lipides qui adoptent une organisation en bicouche par rapport aux systèmes utilisés pour la livraison d'acides nucléiques. En utilisant un taux de 10% de lipides ionisables DODAP, il est possible d'encapsuler à la fois des nanoparticules d'or et des médicaments faiblement basiques qui représentent plus de 50% des médicaments listés du Merck Index. Ces médicaments peuvent être encapsulés dans des LNPs montrant un gradient de pH avec un intérieur acide. Pour permettre cela, nos partenaires ont développé un protocole pour encapsuler du sulfate d'ammonium (SA) dans le cœur aqueux après l'incorporation des AuNPs dans les liposomes, créant ainsi le gradient de pH entre l'intérieur des liposomes et l'extérieur. Le protocole entier pour former les liposomes suit plusieurs étapes. En premier lieu, les lipides sont dissous dans de l'éthanol. La solution obtenue est ensuite mélangée dans un milieu aqueux à pH 4, qui contient les AuNPs chargées négativement à une concentration de 3:1 de milieu aqueux par rapport à l'éthanol. Ceci est l'étape d'encapsulation des AuNPs. Ensuite, un aliquot de sulfate d'ammonium à haute concentration de 450 mM est ajouté. Le mélange est finalement dialysé contre une solution physiologique saline pour augmenter le pH et enlever l'éthanol. Ces liposomes obtenus montrent alors une couche externe composée presque uniquement de Chol, de DSPC et de PEG. Il a été montré que des liposomes avec ce type de couche extérieure présente un temps de vie de circulation *in vivo* important [28].

3.1.2 Spectre en fluorescence

Une caractéristique importante de la Doxorubicin qui a été utilisée dans l'ensemble de l'étude est sa fluorescence. En effet, cette propriété fait que ce médicament est beaucoup utilisé dans le domaine de la recherche. Le spectre en fluorescence théorique de la DOX est montré à la Figure 3-2. Il présente une absorption allant de 425 nm à 550 nm avec un pic à 480 nm et un spectre d'émission de 550 à 650 nm avec un pic à 590 nm.

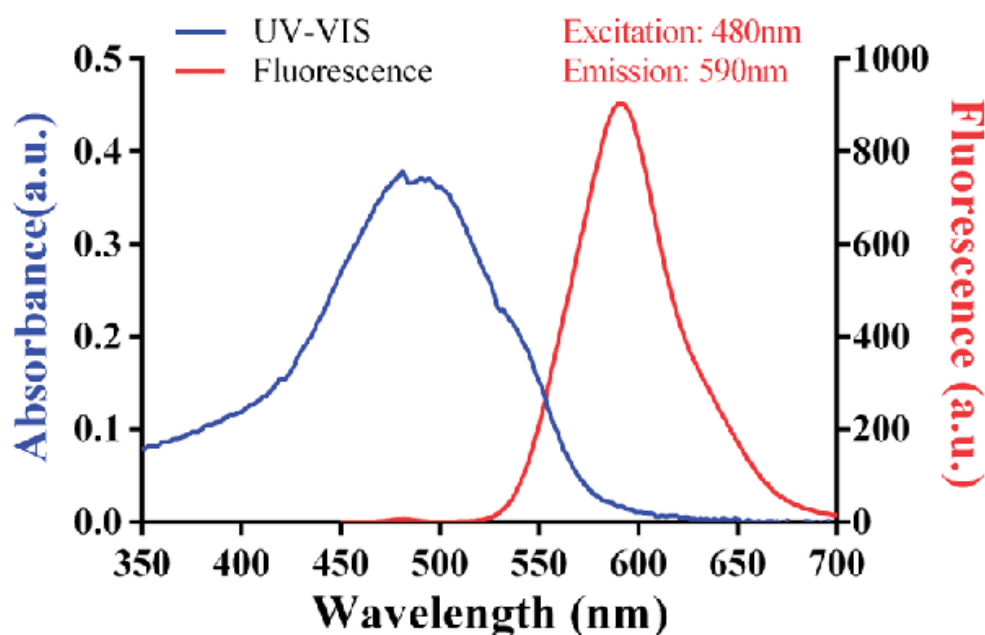


Figure 3-2 Spectre en fluorescence de la Doxorubicin, pic d'excitation à 480 nm et pic d'émission à 590 nm [70].

Lorsque la Doxorubicin est encapsulée dans des LNPs, son intensité fluorescente est bien plus faible. Trois phénomènes peuvent expliquer cette extinction. Dans le cœur aqueux des liposomes, la DOX se trouve en grande concentration dans un espace de petite taille, favorisant ainsi la désexcitation non-radiative et une diminution de la fluorescence. De plus, la DOX est présente sous forme cristalline, ce qui peut aussi réduire l'intensité du phénomène de fluorescence. Enfin, les couches de lipides de la nanoparticule peuvent absorber la lumière incidente ainsi que la lumière émise par fluorescence, entraînant ainsi une diminution du signal. Cette extinction a pu être observée expérimentalement, et permet de déterminer la quantité de médicaments encapsulés, comme ce sera expliqué dans la section 3.2 sur la méthode de détermination de libération des médicaments.

3.1.3 Spectre d'absorption UV-Visible des nanoparticules

Une partie importante de la caractérisation de ces liposomes était basée sur le spectre d'absorption UV-Visible. Ce spectre, montré à la Figure 3-3, **Error! Reference source not found.** permet de déterminer quelle longueur d'onde d'irradiation laser utiliser pour obtenir des effets d'absorption par les nanoparticules d'or. Ces spectres mettent en évidence un pic d'absorbance autour de 500

nm pour les échantillons de LNPs/DOX. Ce pic est lié au spectre d'absorbance de la DOX. Il est possible d'observer un léger décalage dans la longueur d'onde du pic lorsque la DOX est encapsulée. Ceci est dû à l'encapsulation sous forme cristalline de la DOX à l'intérieur des LNPs, modifiant ainsi son spectre par rapport à la forme en solution. Les LNPs absorbent très peu dans cette plage de longueur d'onde, ce qui est encourageant pour des applications d'irradiation, et confirme que la puissance arrivant jusqu'aux nanoparticules d'or sera peu réduite par absorption de la couche de lipides. Les spectres ont été recueillis avec la même concentration de DOX (5 $\mu\text{g/mL}$) dans chaque échantillon mais des problèmes lors de la dilution de la DOX dans le PBS (Phosphate Buffered Saline) peuvent expliquer ces écarts d'absorbance. Les échantillons étudiés sont ici des échantillons de DOX en solution, de LNPd/DOX, de LNPs/AuNPs/DOX, de LNPs/AuNPs et de LNPs. L'écart entre les échantillons de LNP/DOX et de LNPs/AuNPs/DOX est relié au pic plasmon des nanoparticules d'or à 540 nm. La Figure 3-4 confirme que ce pic est lié aux nanoparticules d'or. Le spectre expérimental des nanoparticules d'or en solution est plus large et décalé par rapport au spectre théorique, à cause de la distribution de taille des nanoparticules qui ne font pas toutes 5 nm de diamètre et des agrégats présents dans la solution. Le léger décalage du centre du pic de l'échantillon LNPs/AuNPs s'explique par les agrégats de nanoparticules d'or dans les liposomes, comme le montre la Figure 3-1. Ces données expérimentales suggèrent qu'utiliser un laser à 527 nm offrira un bon phénomène d'absorption par les nanoparticules d'or, et pourra engendrer la destruction ou l'ouverture des LNPs. A partir de ce point, deux idées peuvent être explorées : utiliser un laser continu ou un laser pulsé à cette longueur d'onde. Le laser continu permet un effet de chauffage des nanoparticules tandis que le laser pulsé, comme un laser nanoseconde, chauffe les nanoparticules à de hautes températures pendant une durée très courte et peut engendrer des effets mécaniques comme la formation d'une onde de pression ou même une transition de phase de l'eau formant ainsi une nanobulle. L'autre possibilité est d'effectuer l'irradiation hors résonance, dans l'infrarouge à 800 nm, avec un laser femtoseconde et de chercher à effectuer une génération de nanobulle par chauffage plasma localisé. Afin de vérifier la faisabilité d'utiliser un laser continu, une étude de la stabilité des LNP sous chauffage fut effectuée et est présentée dans la section 3.3.

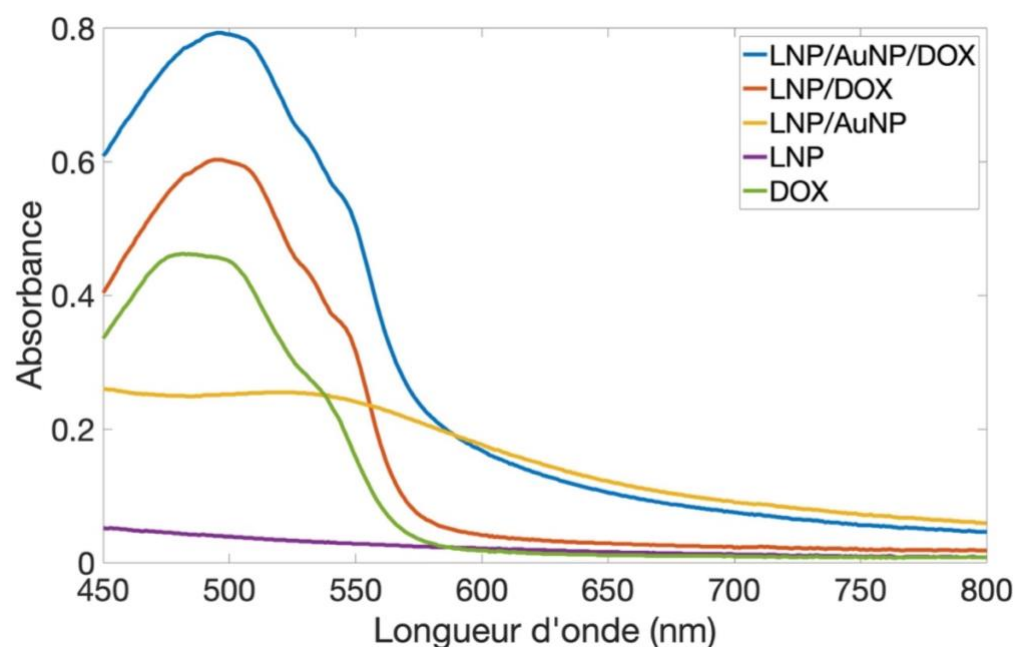


Figure 3-3 Spectres d'absorbance UV-visible expérimentaux des différents échantillons de LNPs et de la DOX en solution. Les mesures ont été acquises à la même concentration de DOX de 0.1 mg/mL.

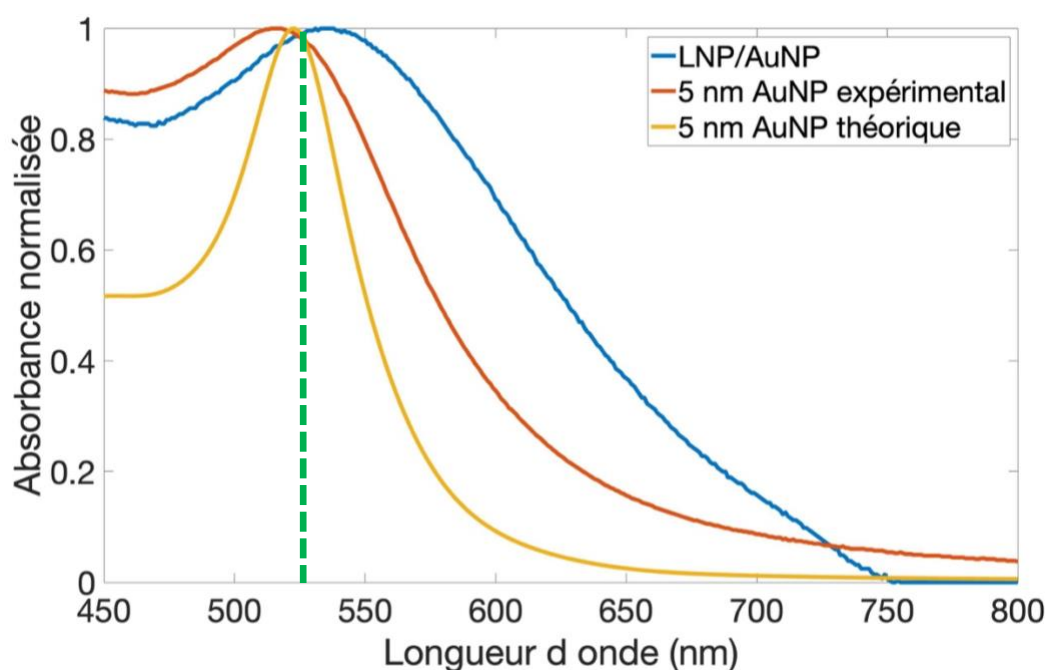


Figure 3-4 Spectres d'absorbance normalisés des LNPs/AuNPs et des AuNPs de 5nm de diamètre. Le spectre théorique d'une nanoparticule d'or unique de 5 nm de diamètre dans l'eau a été obtenue en utilisant la théorie de Mie. La barre pointillée verte indique la longueur d'onde du laser.

3.2 Méthode de détermination de la libération des médicaments

Un des premiers objectifs de cette recherche, avant de s'intéresser à un protocole de libération des médicaments, était de trouver une méthode permettant de savoir si le médicament était libéré ou non. Pour cela, l'extinction de la fluorescence de la DOX lorsqu'elle est encapsulée a été utilisée et son augmentation, observée, lorsqu'elle est libérée. Une méthode chimique de destruction des liposomes a été mise en œuvre en premier lieu. Ceux-ci ont été détruits en utilisant du Triton-X, un détergent de synthèse très utilisé en biologie pour perméabiliser les membranes cytoplasmiques notamment. Les LNPs, dont la structure est semblable aux membranes cellulaires, sont aussi affectées par ce détergent. Leur structure se désagrège alors sous son effet et libèrent le médicament. Les spectres en fluorescence d'échantillon de LNPs/AuNPs/DOX, avec et sans ajout de Triton-X à concentration finale de 2%, ont été acquis et sont montrés à la Figure 3-5. Il a été observé, expérimentalement, qu'une concentration de 0.5% en Triton était suffisante pour induire une destruction totale de la bicouche lipidique, pour des concentrations de lipides allant jusqu'à 1 mg/mL. Lorsque la DOX est sous forme cristalline dans les LNPs, son spectre d'émission est décalé par rapport au spectre de la DOX en solution. Après l'ajout de Triton, la DOX est libérée et se retrouve en solution. Le décalage du pic d'émission fluorescente est alors observable sur l'image A. Les spectres des échantillons de DOX et celui de LNP avec ajout de Triton sont alors similaires. Avec ajout de Triton, l'intensité d'émission obtenue est aussi augmentée, cela met en évidence l'extinction de la DOX lorsqu'elle est encapsulée (voir l'image B). Une vérification a aussi été effectuée pour s'assurer que le Triton ne présentait pas de fluorescence. Cette étude consistait à mesurer l'intensité fluorescente du Triton aux longueurs d'onde utilisées pour la mesure de la DOX. Avec le Triton, l'intensité mesurée est nulle, ce qui est le comportement attendu.

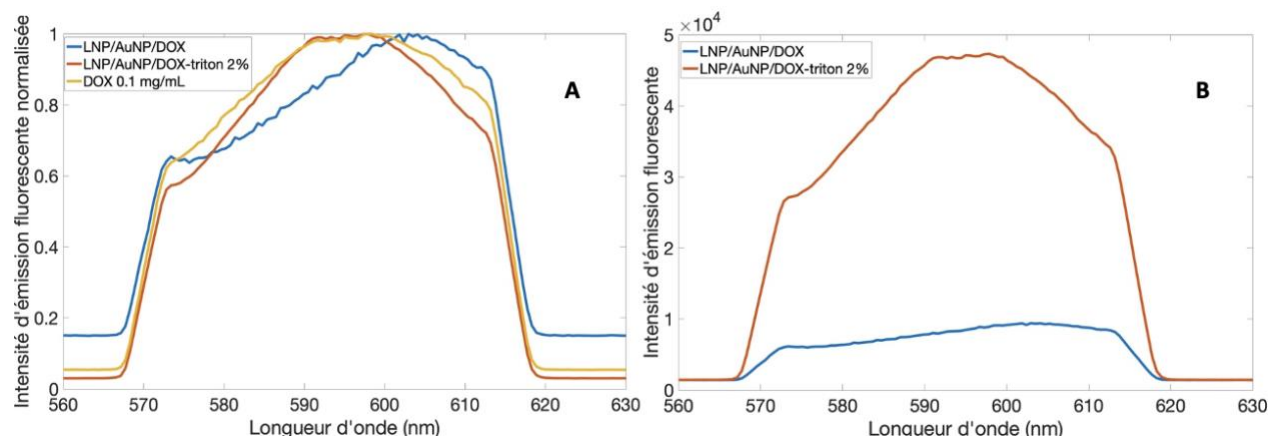


Figure 3-5 A- Spectres d'émission fluorescente normalisés des LNPs/AuNPs/DOX avec et sans ajout de Triton-X et spectre de la DOX. B- Spectres d'émission fluorescente non-normalisés des mêmes LNPs/AuNPs/DOX avec et sans ajout de Triton. Tous les spectres ont été acquis à la même concentration de DOX de 0.1 mg/mL.

Afin de s'assurer que la bicouche lipidique était bien détruite, et que le médicament était entièrement libéré, une autre expérience a été effectuée. Les LNPs, faisant des diamètres d'environ 100 nm, peuvent être filtrées par centrifugation, en utilisant des filtres adéquats. Ainsi, comme suggéré par le labo du P.Cullis, il est possible de centrifuger les LNPs à haute vitesse (20 000 g choisie pour ces expériences) pendant 3 à 4 minutes. Après filtration lors de la centrifugation, la couleur de la solution obtenue est directement liée à la quantité de DOX libérée. Plus la solution est rouge et intense en fluorescence, plus la quantité de DOX libérée est grande. En effet, les liposomes sont filtrés et retenus par le filtre, tandis que la DOX, molécule beaucoup plus petite, de poids moléculaire de 543,5 g/mol, passe à travers et colore la solution. Un résultat typique obtenu après centrifugation est présenté à la Figure 3-6. Les spectres en fluorescence après centrifugation peuvent aussi être acquis, et sont visibles en Figure 3-7. Ils montrent que les intensités $I_{\text{avec triton}} \gg I_{\text{sans triton}}$, confirmant ainsi la libération de la DOX.

Un protocole efficace pour déterminer la libération de DOX consiste donc à mesurer l'intensité en fluorescence après irradiation. La libération entraînera alors une augmentation d'intensité ainsi qu'un décalage du spectre fluorescent. Ensuite une étape de centrifugation ainsi qu'une nouvelle

mesure de fluorescence est appliquée pour confirmer qu'il y a bien eu une libération de la DOX ou non.



Figure 3-6 Échantillon de LNPs/AuNPs/DOX après centrifugation avec ajout de Triton à 2% (à droite) et sans (à gauche).

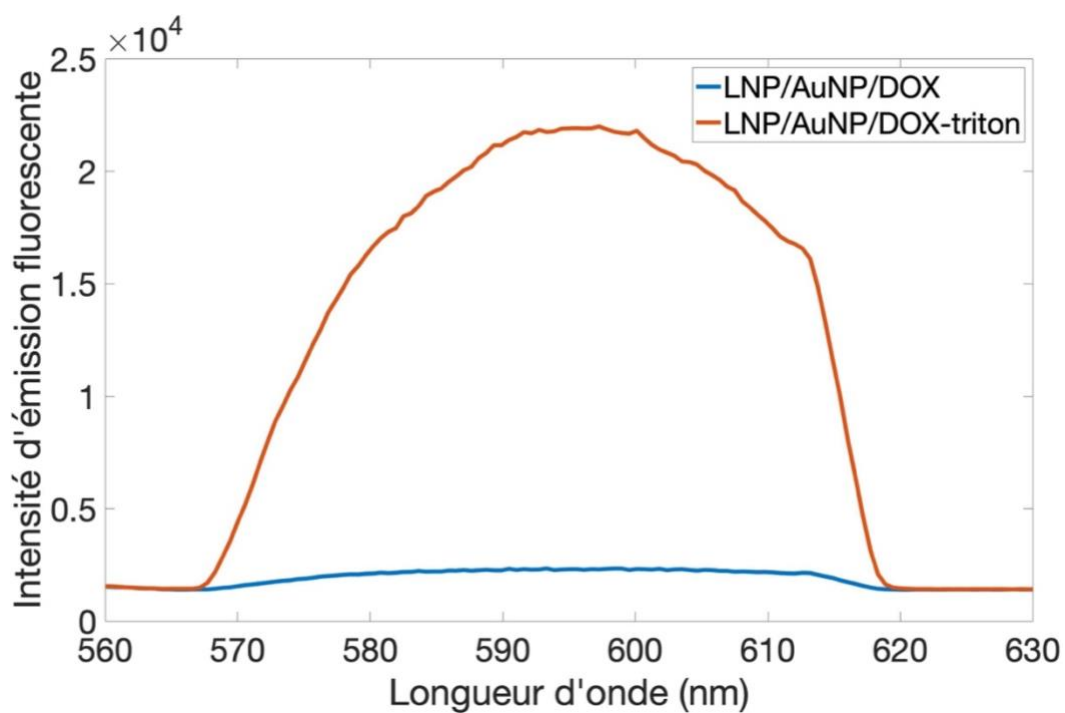


Figure 3-7 Spectres d'émission fluorescente des LNPs/AuNPs/DOX avec et sans ajout de Triton après centrifugation à la même concentration de DOX.

3.3 Stabilité des liposomes sous chauffage

Afin de déduire si le chauffage par irradiation avec un laser continu pouvait avoir un effet, une première expérience plus simple a été mise en place. Les LNPs ont été chauffées à l'aide d'un thermostat, et l'intensité fluorescente a été mesurée au cours du temps. La température a été mesurée directement dans la solution de LNPs. Nous nous sommes intéressés au chauffage des LNPs à une température supérieure à la température de transition du DSPC, qui pourrait engendrer un effet sur la libération de la DOX. Pour rappel, la température de transition est la température à laquelle les lipides changent de phase, et passent d'une phase solide à une phase liquide. Pour le DSPC, cette température est de 55°C. Les résultats de cette expérience sont montrés à la Figure 3-8. Au cours des 123 minutes d'expérience, la température de la solution fut augmentée progressivement, pour atteindre, 60 min après le début du chauffage, une température maximale de 71°C. La température de 71°C fut maintenue durant les 63 autres minutes d'expérience. La fluorescence a été remesurée après le refroidissement et ne montrait aucune évolution par rapport aux spectres obtenus pendant le chauffage.

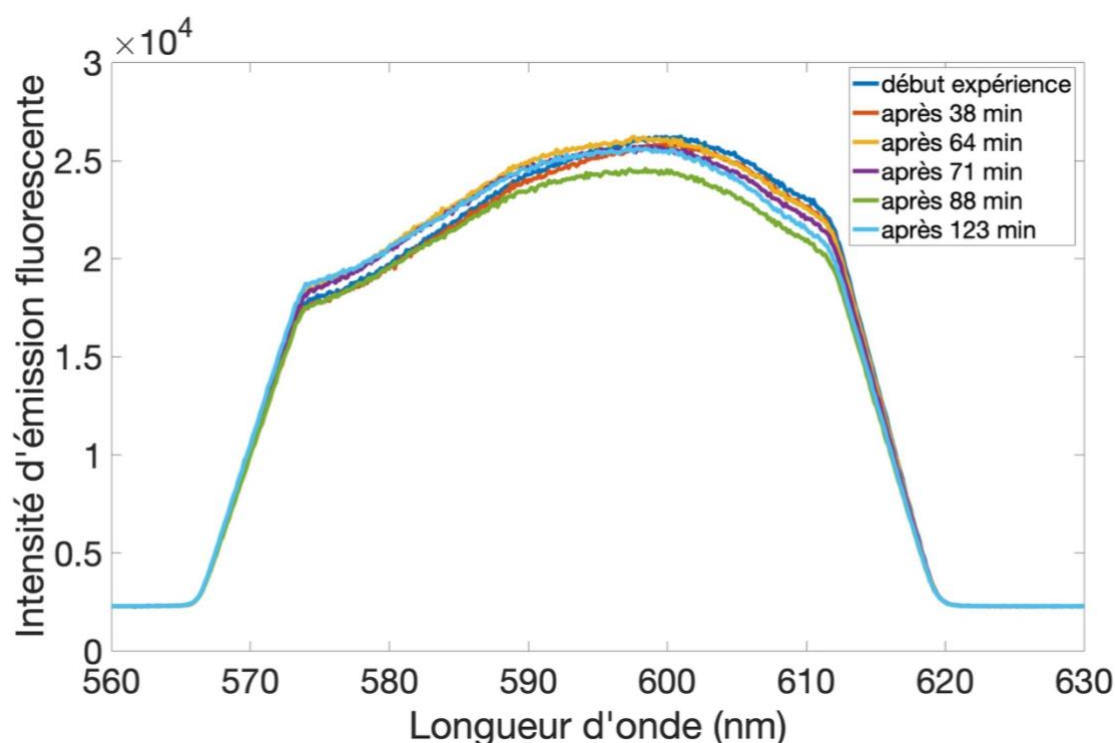


Figure 3-8 Spectre d'émission de LNPs/DOX pendant chauffage de la température ambiante de 20°C jusqu'à 71°C. La température de 71°C est atteinte après 60 minutes d'expériences et a été maintenue durant 63 autres minutes.

Cette expérience montre que le chauffage des LNPs semble avoir peu d'effet et n'est pas une piste intéressante à poursuivre. Nous n'observons ni augmentation de l'intensité fluorescente ni décalage de pic. Pour confirmer qu'il n'y avait aucun effet, les LNPs/DOX ont été centrifugées et la solution obtenue a été comparée avec une solution centrifugée de LNPs/DOX qui n'a pas été chauffée. Aucun changement notable n'a été relevé entre les deux solutions centrifugées, signe que le chauffage n'a eu aucun effet. Le résultat de cette expérience montre que l'utilisation d'une source continue de chaleur, qui pourrait venir d'une irradiation continue d'un laser n'est pas une piste à privilégier. Un chauffage au-delà de 71°C, durant une plus longue période ne serait pas vraiment envisageable pour des applications *in vivo*. De plus, obtenir un chauffage de quelques degrés dans l'environnement des AuNPs de petite taille demanderait une puissance continue de laser très importante et néfaste pour des cellules, lors d'une application *in vitro* par exemple. L'utilisation d'un laser pulsé permettant l'ouverture des LNPs et la libération de la DOX fut donc privilégiée.

En premier lieu, différentes expériences ont été tentées pour essayer de libérer la DOX directement depuis les LNPs en solution. Le principal problème rencontré durant ce type d'expérience est le fait qu'il faille effectuer un balayage du contenant de la solution pour que l'ensemble des LNPs soient, à un instant de l'expérience, au plan focal du laser. En effet, pour obtenir des effets comme la fragmentation des nanoparticules d'or de 5 nm, nous avons noté qu'il fallait que le faisceau soit focalisé pour obtenir une fluence suffisante, entraînant la libération de la DOX. Avec des LNPs en solution, il faudrait faire un balayage 3D du contenant, qui prendrait un temps déraisonnablement long pour espérer pouvoir observer un effet. Pour s'affranchir de cet effet, il fut décidé de travailler directement sur des cellules de cancer, et de les utiliser comme vecteurs pour cibler les LNPs. Cette approche est beaucoup plus proche de l'application visée, qui est de livrer le médicament aux cellules cancéreuses par voie intraveineuse par exemple. Les résultats sont présentés au chapitre suivant.

CHAPITRE 4 PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL D'IRRADIATION

Dans ce chapitre, le matériel expérimental, le procédé expérimental, ainsi que les différents paramètres utilisés lors des expériences *in vitro* sont présentés. L'interaction entre la lignée cellulaire utilisée et les LNPs encapsulant de la DOX sera expliquée et interprétée.

4.1 Présentation du matériel et des cellules utilisées

4.1.1 Cellules utilisées

Dans les études de livraison de médicaments, et dans la recherche contre le cancer en général, il est très fréquent d'effectuer une étude *in vitro* pour caractériser le comportement du traitement sur des cellules, avant de passer à une échelle plus grande, celle du *in vivo*. De nombreuses lignées cellulaires sont disponibles pour effectuer ce travail. Dans cette étude, le choix s'est porté sur les cellules MDA-MB-231, dont une image est visible en Figure 4-1. Ces cellules, très souvent utilisées dans la recherche contre le cancer, sont des cellules de lignée humaine du cancer du sein. Ces cellules proviennent de la société *American Type Culture collection* d'une donatrice âgée de 51 ans [71]. Elles sont de forme longue et allongée, avec une longueur allant de 50 à 150 μm et une épaisseur de 30 μm . Leur culture a été faite dans le milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; *FisherScientific*) avec un ajout de 10% de FBS (Foetal Bovin Serum) et de 1% d'antibiotiques Pénicilline/Streptomycine et acide aminé Glutamine dans des flasques de 75 cm^2 en polystyrène. Ces antibiotiques permettent d'empêcher la contamination des cellules par des bactéries par exemple. Ces cellules présentent l'avantage d'être adhérentes, ce qui facilite leur traitement par irradiation, puisqu'il suffit d'effectuer un balayage 2D d'une plaque pour traiter l'ensemble des cellules.

4.1.2 Préparation des échantillons

Lors de cette étude, chaque échantillon a reçu le même traitement. Avant l'irradiation et l'ajout des LNPs, les cellules sont incubées pendant 36 heures à une concentration de $5 \cdot 10^4$ cellules/mL dans les plaques Ibidi 8 wells grid-500 à 37°C et 5% CO_2 . Des solutions de 300 μL sont placées dans chacun des puits. Les plaques de ces puits sont préalablement traitées par la compagnie à la Poly-L-lysine, pour que les cellules adhèrent bien au fond des puits. Après les 36 heures d'incubation,

les cellules sont confluentes dans les puits et les LNPs sont ajoutées à une concentration finale de 5 µg/mL de DOX, ce qui équivaut à 50 µg/mL en concentration de LNPs. L'intérêt de ces plaques avec une grille formant des carrés de 500 µm x 500 µm est de pouvoir cibler facilement une zone pour l'irradiation, et de tester de nombreuses conditions d'irradiation sur un seul type d'échantillon. La taille du spot au plan focal, pour un laser à 527 nm avec un objectif 4x était de 5 µm, un balayage d'une zone d'environ 500 µm x 500 µm peut être aisément effectué et, par la suite, les cellules irradiées sont facilement retrouvées.

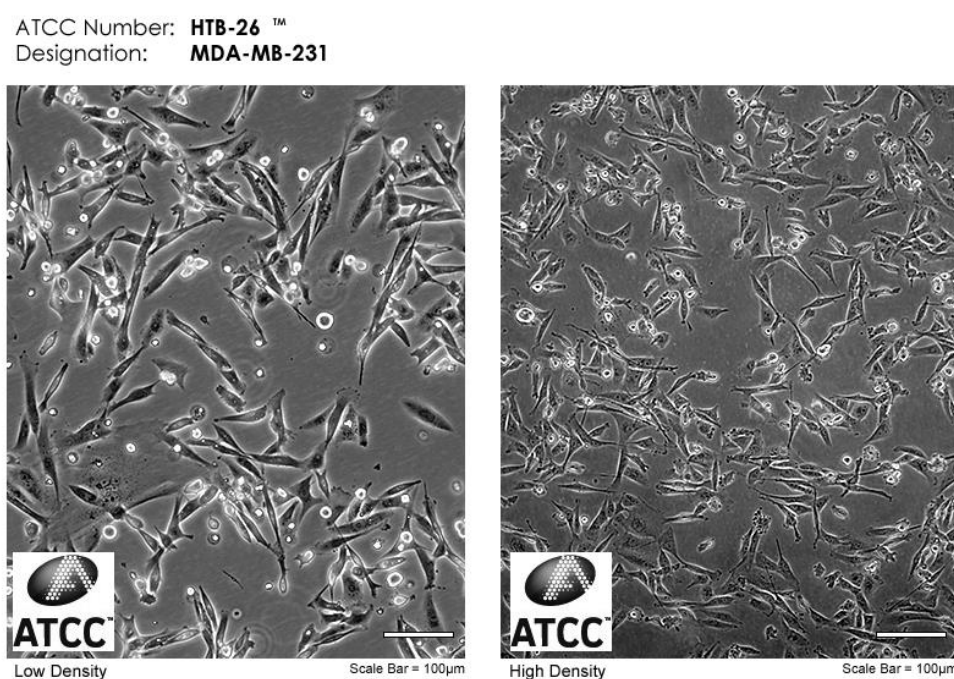


Figure 4-1 Lignée cellulaire MDA-MB-231 pendant la culture [71]. Faible densité à gauche et haute densité à droite. La barre d'échelle représente 100 µm.

4.1.3 Équipements utilisés

Pour effectuer les irradiations, le laser nanoseconde utilisé est le Quanta 1 provenant de la compagnie *Quantum Light Instruments*. Les caractéristiques du laser sont les suivantes : longueur d'onde de 527 nm, temps d'impulsion de 7.7 ns et taux de répétition de 10 Hz. Le montage expérimental utilisé est présenté à la Figure 4-2. Les polariseurs et analyseurs croisés permettent de contrôler aisément la puissance du laser. Le télescope permet d'obtenir un faisceau collimaté de

diamètre suffisant pour que celui-ci recouvre toute l'ouverture de l'objectif dans le microscope. L'avantage d'utiliser un microscope est qu'il est facile de visualiser l'échantillon et de viser une zone souhaitée. De plus, le microscope possède une plaque motorisée (Proscan III, *Prior Scientific*) qui peut facilement être commandée via un logiciel LabView pour effectuer le balayage de l'échantillon. Pendant les irradiations, la plaque contenant les cellules est placée dans un incubateur portable, permettant de conserver les cellules dans un environnement à 37°C avec 5% de CO_2 . Cela permet aux cellules de ne pas mourir à cause d'un environnement extérieur qui serait à température ambiante. Il est aussi possible, si souhaité, d'imager et d'irradier un échantillon en même temps. Pour les irradiations, un objectif 4x plan Fluor de *Nikon* d'ouverture numérique de 0.13 est utilisé. La taille du spot au plan focal a été mesurée en utilisant un profiler de rayon et est de 5 μm . Cette valeur est en adéquation avec le rayon du disque d'Airy qui prédit, pour cet objectif, à cette longueur d'onde un spot de 4.95 μm . La distance de Rayleigh vaut 37 μm , et correspond à la distance sur laquelle la taille du spot du laser peut être considérée comme approximativement constante, autour du plan focal. Une telle distance permet donc de cibler les cellules facilement, dans la dimension Z, et de s'assurer que chacune des cellules soit bien irradiée avec la même puissance surfacique.

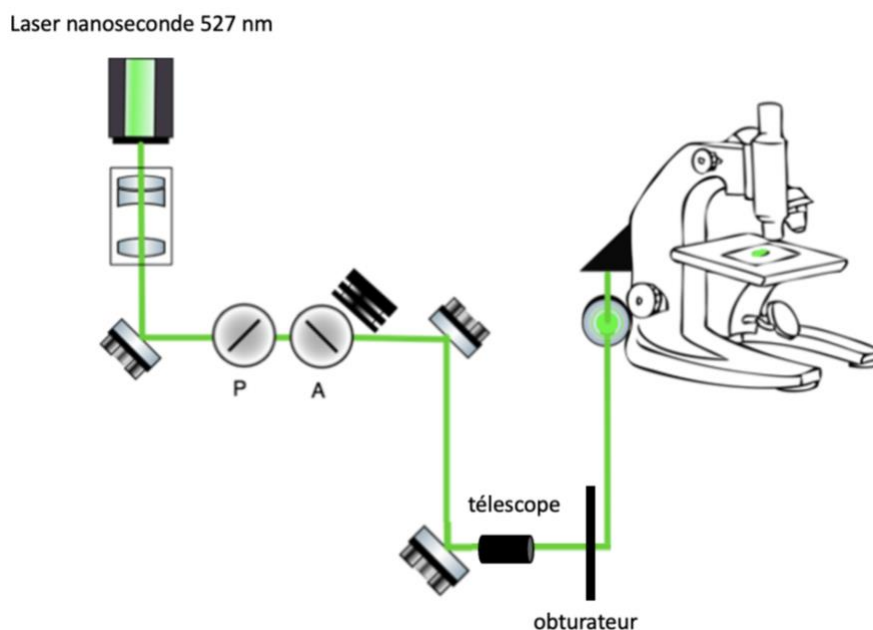


Figure 4-2 Montage expérimental pour irradiation avec laser nano seconde [72]. Le montage amène le faisceau laser dans un microscope sur lequel sont effectuées les irradiations. Les éléments le composant sont différents miroirs, un polariseur/analyseur, un télescope et un obturateur.

4.2 Comportement des LNPs dans les cellules

4.2.1 Méthodologie de la prise d'images

Pour étudier le comportement des LNPs dans les cellules, des images en fluorescence sont acquises avec différents objectifs et filtres. Les objectifs 20x, plan Fluor, d'ouverture numérique 0.45, ainsi qu'un objectif 60x, à huile, d'ouverture numérique allant de 0.5 à 1.25 tous deux de *Nikon*, sont utilisés. Les images prises avec chacun des objectifs ont des buts différents. Les images avec l'objectif 20x permettent de voir les zones irradiées dans son ensemble, puisqu'il est possible de voir une zone de 500 μm x 500 μm dans son ensemble. L'objectif 60x, à huile, permet de se focaliser sur seulement quelques cellules, et donc de voir plus précisément les différences entre quelques cellules irradiées et quelques cellules non irradiées. Deux types d'image en fluorescence sont obtenues pendant la phase d'imagerie. Un premier type d'image correspond à la fluorescence rouge de la DOX. On la retrouve dans les cellules presque immédiatement après l'incubation des cellules avec de la DOX en solution. Un fluorophore est aussi utilisé pour pouvoir imager la membrane cellulaire. Le choix c'est ici porté sur la Calceine AM pour un double intérêt, à une concentration de 0.5 μM . Ce fluorophore vert ne va s'attacher qu'aux cellules vivantes. Cela permet de s'assurer qu'après irradiation, les cellules sont encore vivantes et que le laser n'a pas tué les cellules, tout en livrant la DOX, et aussi de rendre la membrane cellulaire fluorescente, afin d'acquérir des images. Ces images sont obtenues avec deux séries de filtre différentes. Les images pour la fluorescence de la DOX sont obtenues avec un filtre pour fluorophore Cy3 de *Nikon*, avec une bande d'excitation allant de 513 à 556 nm, et une bande d'émission de 570 à 613 nm. Pour les images en fluorescence de la calceine, un filtre de fluorescence de *Nikon* pour fluorescence verte a été utilisé. Pour d'autres expériences les fluorophores propidium iodine (PI) et le 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ont été utilisés. Le PI permet de visualiser, en rouge, le noyau des cellules mortes, et le DAPI permet de visualiser en fluorescence bleu l'ensemble des cellules. Pour le DAPI, la concentration utilisée était de 1 $\mu\text{g/mL}$ et pour le PI il s'agissait d'une concentration de 6.3 μM . Pour ces deux fluorophores, le temps d'incubation était de 30 minutes. Les cellules sont ensuite toujours lavées deux fois, avec du milieu de culture, après cette incubation. Les images sont acquises avec la caméra Q Click Q imaging de *Teledyne Photometrics*. La source lumineuse utilisée est la X-Cite 120LED de *Excelitas*.

4.2.2 Interprétation d'images obtenues

Pour interpréter les différentes images qui seront présentées dans la suite, il est crucial de comprendre ce qu'il se produit après ajout des LNP aux cellules. Il est possible de distinguer trois types d'images, qui correspondent aux trois étapes dans l'interaction de la DOX ou des LNPs/AuNPs/DOX avec les cellules. Des dessins schématiques, ainsi que les images correspondantes à ces situations, sont présentées à la Figure 4-3. La Figure 4-3 A correspond au moment de l'injection des LNPs/AuNPs/DOX, qui sont alors en solution autour des cellules. La contribution de la DOX à la fluorescence consiste alors en un bruit de fond de faible intensité. Il est possible de voir les membranes cellulaires en fluorescence verte, via la coloration à la Calceine AM. Cette image a été prise juste après l'ajout de LNPs/AuNPs/DOX. La Figure 4-3 B correspond à une incubation de 4 heures des LNPs/AuNPs/DOX avec les cellules. Les nanoparticules entrent alors dans les cellules par endocytose et forment des agglomérats dans les lysosomes, formés par les cellules, comme expliqué dans la section 2.2.2. Une image où il est possible de voir plus en détails les LNPs dans les lysosomes a été acquise avec un objectif 100x, à huile, d'ouverture numérique variant de 0.5 à 1.3, et est visible à la Figure 4-4. Cette image a été prise après un temps d'incubation de 28 heures, pour pouvoir facilement observer de nombreux agrégats dans les lysosomes. Avec cette image, il est possible de voir qu'avec un tel temps d'incubation le noyau de la cellule commence lui aussi à devenir fluorescent, ce qui représente un problème important, comme ce sera détaillé dans la prochaine section, car il est alors compliqué de distinguer les effets de l'irradiation si la DOX atteint déjà le noyau des cellules sans irradiation. Cette agglomération des LNPs dans les vésicules (endosomes/lysosomes) est clairement visible par les points rouges à l'intérieur des cellules. Enfin, lorsque les cellules sont en contact avec de la DOX en solution, ou que la DOX est livrée via irradiation, le noyau des cellules va devenir très intensément fluorescent. Ceci est caractéristique de la DOX. Lorsque celle-ci est en solution avec des cellules, elle peut rentrer aisément dans les cellules et diffuser jusqu'à l'intérieur du noyau pour induire la mort cellulaire. Ce comportement n'est pas, ou très peu observé, pour une incubation d'au maximum 4 heures des LNPs/AuNPs/DOX. Ainsi, le fait que les noyaux deviennent très fluorescents est un indicateur de la livraison des médicaments. Ceci peut être vu sur la Figure 4-3 C. Cette image a été prise après 4 heures d'incubation avec de la DOX directement en solution et représente l'objectif à atteindre après irradiation des LNPs/AuNPs/DOX.

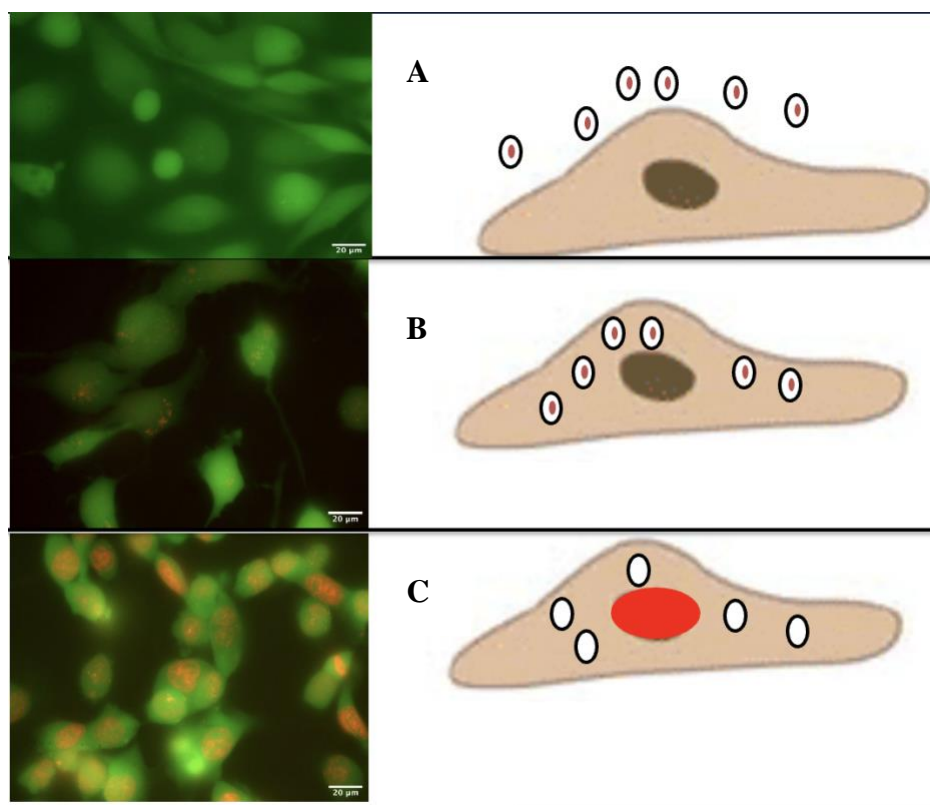


Figure 4-3 Résultats typiques représentant le comportement de la DOX dans les cellules, schéma à droite et images correspondantes à gauche. La concentration de DOX utilisée est de 5 $\mu\text{g/mL}$ dans chacune des images. L'étape A correspond au moment de l'ajout des LNPs/AuNPs/DOX. L'étape B est l'entrée des LNPs/AuNPs/DOX dans les lysosomes. L'étape C correspond à la libération de la DOX à partir des LNPs suite à l'irradiation. La couleur verte correspond à une coloration à la calceine et le rouge est lié à la fluorescence de la DOX.

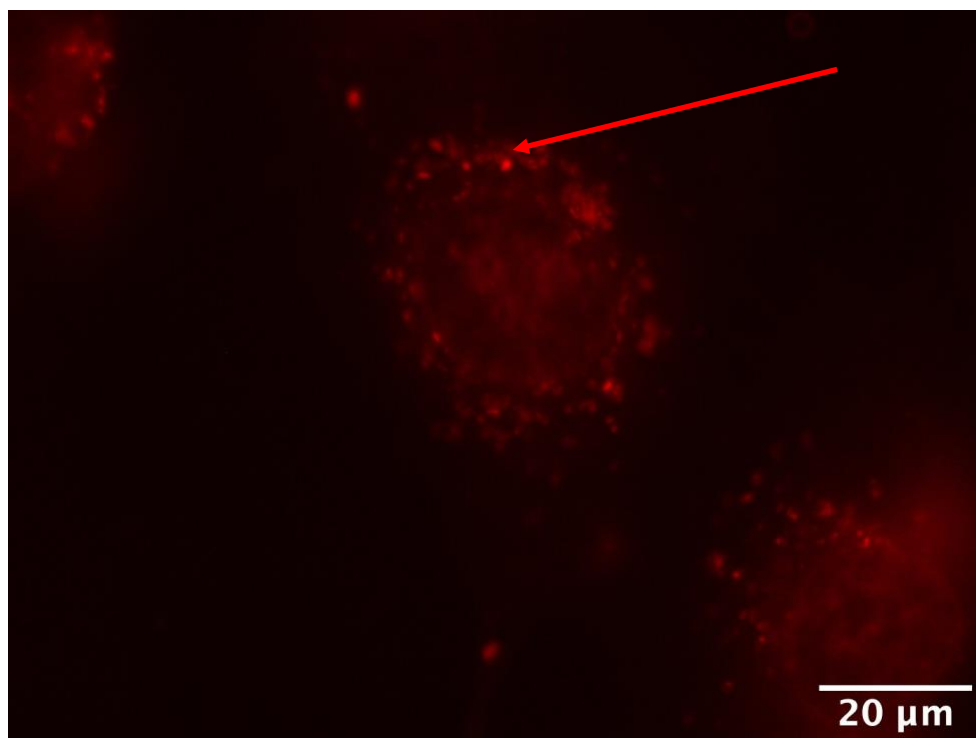


Figure 4-4 LNP/AuNP/DOX dans les cellules MDA-MB-231 avec un temps d'incubation de 28h. La flèche rouge montre un exemple d'agrégats de LNP/AuNP/DOX dans des lysosomes.

4.2.3 Influence du temps d'incubation

Au cours des différentes expériences d'irradiation des LNP dans les cellules, un paramètre qu'il a paru très rapidement important à considérer fut le temps d'incubation des cellules avec les LNP. En effet, il est apparu qu'en présence des nanoparticules d'or, les LNP étaient moins stables et subissaient des fuites de la DOX. Ainsi, en laissant incuber les LNP/AuNP/DOX avec les cellules trop longtemps, les noyaux des cellules deviennent aussi fluorescents, ce qui montre que de la DOX s'est échappée des LNP, et a atteint le noyau des cellules. Les résultats pour des temps d'incubation de LNP/DOX, LNP/AuNP/DOX ou de la DOX, variant de 4 heures à 1 jour, sont montrés à la Figure 4-5, pour une concentration de DOX de 5 $\mu\text{g/mL}$ pour tous les échantillons. Sur cette figure, il est possible de constater qu'entre les échantillons de LNP/DOX et LNP/AuNP/DOX, il y a une différence dans l'intensité fluorescente du noyau. Ceci est visible avec 4 heures d'incubation, qui correspond à la Figure 4-5 A pour LNP/DOX, et la B pour LNP/AuNP/DOX, ou avec un jour en comparant la Figure 4-5 D, pour LNP/DOX, et la Figure 4-5 E, pour LNP/AuNP/DOX. En effet, quel que soit le temps d'incubation, nous observons que

l'intensité fluorescente des noyaux des cellules incubées avec des LNPs/AuNPs/DOX, est bien plus forte que dans le cas de l'incubation avec LNPs/DOX. Ceci montre bien que les LNPs avec des nanoparticules d'or à l'intérieur sont moins stables, comparativement aux LNPs sans AuNPs à l'intérieur, et subissent des fuites de DOX. Il est intéressant de comparer les échantillons de LNPs/AuNPs/DOX avec ceux de DOX en solution. Avec un jour d'incubation, la différence entre ces échantillons n'est plus si flagrante, et les noyaux cellulaires dans les échantillons avec LNPs/AuNPs/DOX sont d'intensité en fluorescence similaire aux noyaux de l'échantillon de DOX, ceci est visible en comparant la Figure 4-5 E et la Figure 4-5 F. Avec de tels échantillons, il serait difficile d'obtenir un contraste important entre cellules irradiées, et cellules non irradiées puisque les noyaux seraient fluorescents à cause de la fuite de DOX depuis les LNPs. Alors qu'avec un temps d'incubation de seulement 4 heures, le contraste entre échantillons avec LNPs/AuNPs/DOX et échantillons avec DOX est claire dans la comparaison de la Figure 4-5 B et de la Figure 4-5 C. Il est possible de voir dans la Figure 4-5 B que les noyaux sont à peine fluorescents et que le phénomène de fuite n'est pas important. Une explication possible de ce phénomène de fuite est directement liée à la présence des nanoparticules d'or dans les LNPs. Pendant la formulation des liposomes, le sulfate d'ammonium est encapsulé dans le cœur des liposomes avant la DOX. La quantité de SA encapsulée influe sur le taux de rétention des LNPs. Plus celle-ci est importante dans les liposomes, plus la capacité de rétention des nanovecteurs l'est aussi. Or, quand des nanoparticules d'or sont encapsulées, la quantité de SA est diminuée, ce qui fait que les LNPs/AuNPs/DOX montrent plus de fuite que les LNPs/DOX.

Pour confirmer que la fluorescence observée sur ce type d'échantillons était bien due à une fuite de la DOX depuis les LNPs, et que la DOX atteignait bien le noyau des cellules, une coloration au DAPI a été effectuée. Ce fluorophore permet de colorer le noyau des cellules. Un résultat des images obtenues sur des cellules après un jour d'incubation avec des LNPs/AuNPs/DOX à une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$ est montrée en Figure 4-6. Sur cette image, il est possible de voir la colocalisation de la fluorescence de la DOX et du DAPI. Ceci indique que la DOX a bien atteint le noyau des cellules et que les LNPs subissent des fuites.

A partir de ces observations, il a été décidé qu'il était nécessaire d'effectuer une étape de lavage des cellules au plus tard 4 heures après l'ajout des LNPs, afin de pouvoir obtenir des résultats satisfaisants lors des irradiations. Cela a mené au protocole d'irradiation décrit au paragraphe suivant.

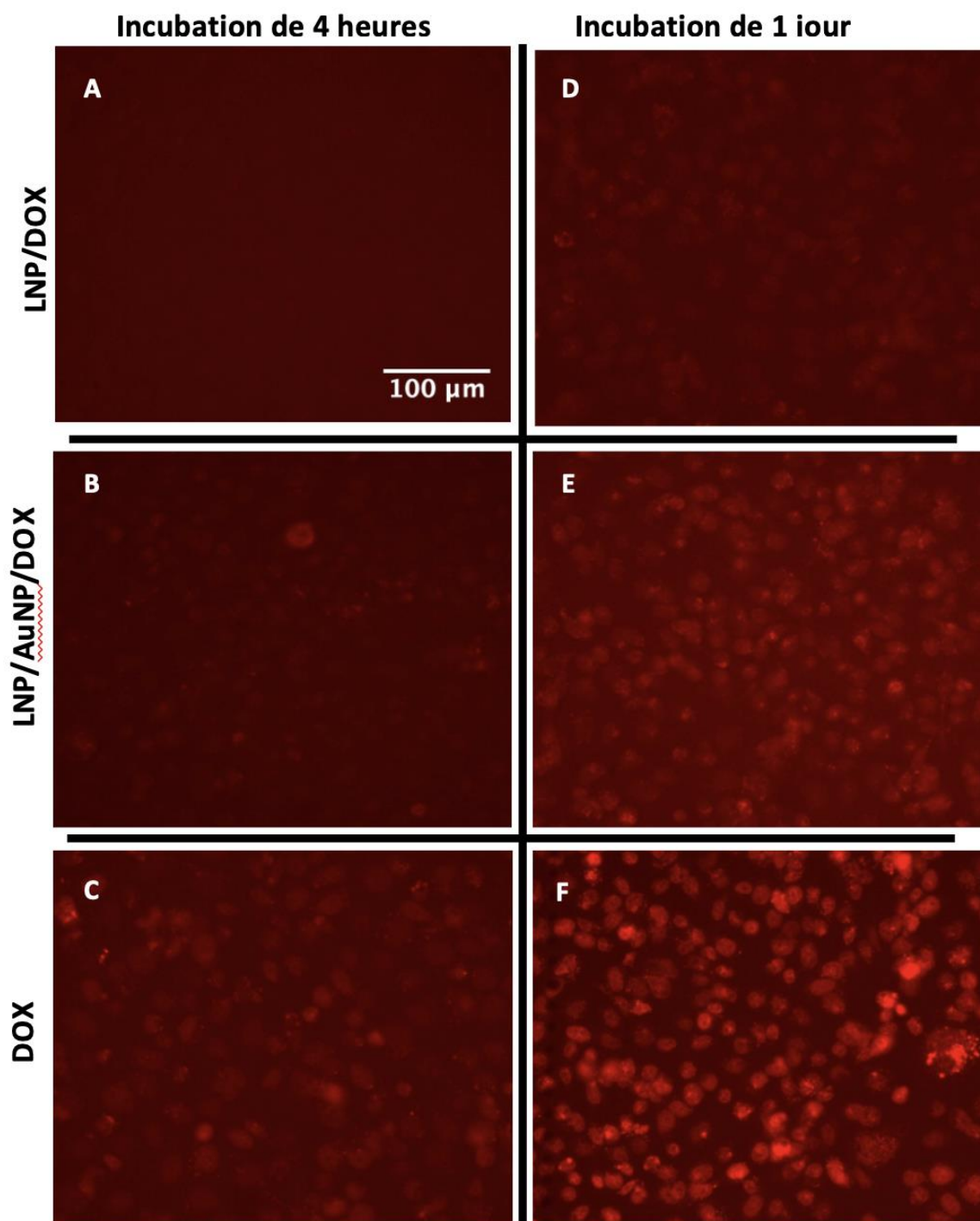


Figure 4-5 Évolution de la fluorescence de la DOX dans les cellules MBA-MB-231 en fonction du temps d'incubation (4 heures à gauche et 1 jour à droite) et du type d'échantillon (A, D : LNP/DOX; B, E : LNP/AuNP/DOX; C, F : DOX). L'échelle est valable pour l'ensemble des images.

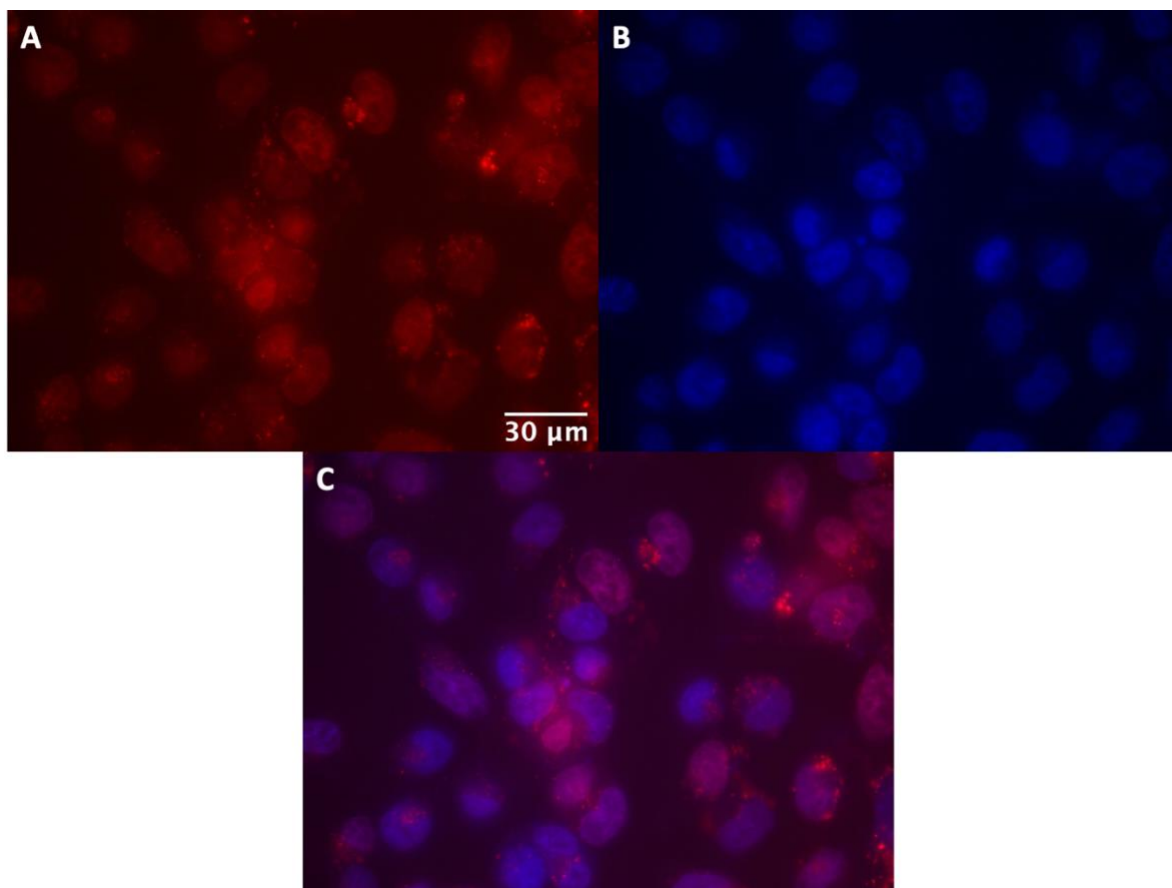


Figure 4-6 Fluorescence des noyaux des cellules MDA-MB 231 après incubation d'un jour avec LNPs/AuNPs/DOX à une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$. A : fluorescence rouge de la DOX. B : fluorescence bleue du DAPI. C : superposition de la fluorescence de la DOX et du DAPI. L'échelle est la même pour toutes les images.

4.3 Protocole d'irradiation

Le protocole utilisé dans l'ensemble des expériences est représenté schématiquement à la Figure 4-7. Celui-ci commence par la mise en incubation des cellules et se termine par l'étape d'imagerie. En premier lieu, 300 μL de cellules sont incubées à une concentration de 2.5×10^4 cellules/mL dans les plaques *Ibidi* μwells grid-500. Après 36 heures d'incubation, le milieu de culture est retiré pour ajouter les LNPs ou la DOX, diluées dans le milieu de culture à une concentration de 5 $\mu\text{g/mL}$ de DOX soit 50 $\mu\text{g/mL}$ de LNPs. Après un minimum de 15 minutes d'attente, temps choisi pour que les LNPs diffusent et commencent à pénétrer dans les cellules [73], les cellules sont irradiées via un balayage de différents carrés de la grille. D'après les expériences effectuées, le moment où

l'irradiation est faite n'influe pas sur l'intensité fluorescente des cellules, et donc, sur la quantité de DOX libérée qui atteignait le noyau. Les échantillons présentent des résultats similaires tant que les irradiations ne sont pas séparées de plus d'une heure (aucun test n'a été effectué pour des instants d'irradiation séparés de plus d'une heure). Seul le temps d'incubation, temps séparant l'ajout des LNPs et le lavage des cellules, semble alors être un facteur important influant sur la quantité de DOX libérée. L'étude de l'influence du moment d'irradiation est détaillée dans la partie 5.5.1. Après irradiation, les cellules sont remises dans l'incubateur. 4 heures après l'ajout des LNPs/DOX, des LNPs/AuNPs/DOX ou de la DOX, une étape de lavage est effectuée pour s'affranchir du problème de fuite, comme expliqué précédemment. Les cellules sont lavées deux fois avec du milieu de culture et sont remises à incuber dans un volume de 300 μL dans du milieu de culture. 20 heures après, la calceine AM est ajoutée si nécessaire, à une concentration de 0.5 μM , dans un volume total de 300 μL . Les cellules sont ensuite remises en incubation, puis sont, 30 minutes plus tard, encore une fois lavées deux fois pour enlever le surplus de calceine AM et réduire la fluorescence de fond. Après avoir remplacé les cellules dans 300 μL de milieu de culture, elles sont imagées avec les objectifs 20x et 60x et les différents filtres nécessaires pour observer la fluorescence de la DOX et de la Calceine. Ce temps d'attente de 20 heures a été choisi pour que la DOX puisse diffuser depuis les LNPs jusqu'aux noyaux des cellules après libération. Dépendamment du type de cellules, ce temps de diffusion peut être différent. *Farhane et. Al* ont étudié ce temps pour deux types de cellules. Pour avoir 100% de DOX atteignant le noyau, il faut attendre deux heures pour un premier type de cellules, et 12 heures pour un second [74]. 20 heures d'attente permettaient ici d'avoir la certitude que la DOX avait bien diffusée jusqu'aux noyaux.

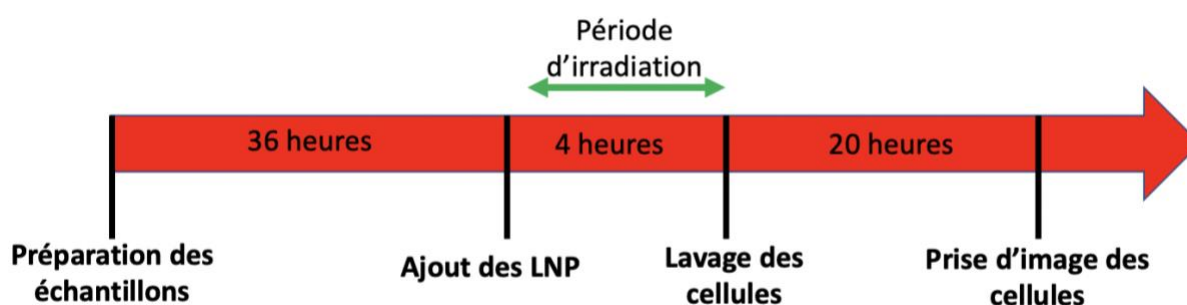


Figure 4-7 Représentation schématique de la chronologie du protocole expérimental d'irradiation, de la préparation des LNPs jusqu'à la prise d'images des résultats.

Ce protocole fut suivi pour différentes conditions de puissance et différents paramètres de balayage. Lors des irradiations, au minimum, un carré de $500\text{ }\mu\text{m}$ x $500\text{ }\mu\text{m}$ était irradié. La façon dont sont balayés les échantillons est montrée à la Figure 4-8. Chaque ligne pointillée représente le passage du laser. La distance entre chacune des lignes varie au choix de l'expérimentateur. La Figure 4-8 est donnée à titre de schéma et ne représente pas la réalité des grandeurs utilisées pour la distance entre les lignes de balayage notamment.

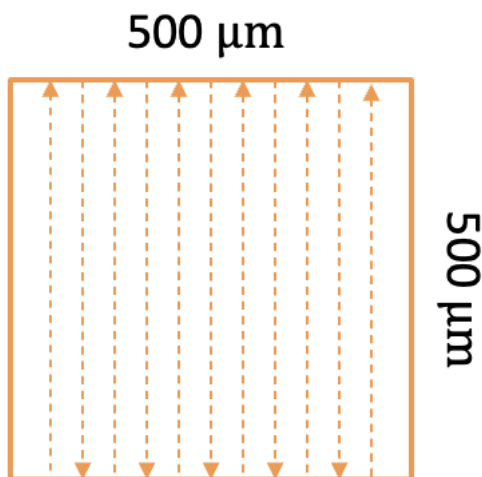


Figure 4-8 Schéma de balayage effectué dans les puits des plaques avec grille. Chaque ligne pointillée représente une ligne de balayage.

CHAPITRE 5 LIVRAISON DE MÉDICAMENTS PAR IMPULSIONS LASER DANS LES CELLULES CANCÉREUSES

Dans ce chapitre, les principaux résultats obtenus lors des irradiations sur les cellules MDA-MB-231 seront présentés. Nous retrouverons d'abord, une étude approfondie des résultats obtenus avec le laser nanoseconde. L'influence des paramètres d'irradiation et de balayage sur le taux de livraison de la DOX sera étudiée. Ensuite nous montrerons la preuve de concept de la livraison de la DOX en utilisant un laser femtoseconde de typer amplificateur.

5.1 Livraison par impulsions nanosecondes

5.1.1 Mise en évidence de la libération de la DOX

Lors de l'étape d'imagerie, il est possible de mettre en évidence une augmentation de l'intensité fluorescente, due à la présence de DOX dans les noyaux des cellules qui ont été irradiées. Les images obtenues sont présentées à la Figure 5-1. Les conditions utilisées ici pour l'irradiation sont une fluence de 71 J/cm^2 et une vitesse de balayage de $50 \text{ }\mu\text{m/s}$, avec un pas de $5 \text{ }\mu\text{m}$ entre chacune des lignes de balayage. Ces paramètres de balayage permettent que chaque nanoparticule d'or reçoive une impulsion du laser, étant donné que le diamètre du spot laser est de $5 \text{ }\mu\text{m}$ et que le taux de répétition du laser est de 10 Hz . Sur chacune des images, la couleur verte correspond à la fluorescence de la Calceine qui montre que, même après irradiation, les cellules sont encore vivantes et que le laser ne semble pas avoir d'effet nocif direct sur les cellules. Comme expliqué précédemment, il est possible de voir sur l'échantillon de LNPs/AuNPs/DOX sans irradiation quelques points rouges, signe de l'accumulation des LNP dans les lysosomes. Avec ou sans irradiation, les images des échantillons contrôles de LNPs/DOX sont similaires et le laser ne libère pas le médicament, qui reste encapsulé dans les LNPs. Un résultat de livraison de médicament n'est obtenu que dans le cas où il y a combinaison d'une irradiation avec une présence de nanoparticules d'or dans les liposomes. Lorsque ces deux éléments sont présents, il est possible d'observer que les noyaux des cellules sont très fluorescents, signe que de la DOX se trouve en dehors des liposomes et a atteint le noyau des cellules. Ainsi, lors de l'irradiation, les nanoparticules d'or absorbent l'énergie du laser et vont se fragmenter ce qui va causer une destruction des LNPs. Le

mécanisme exact permettant la libération des nanoparticules d'or sera étudié plus en détail par la suite. La Figure 5-1 est une preuve de concept de la livraison de médicaments via interaction nanoparticules d'or-laser. Dans la suite, la quantification de l'efficacité de la livraison en fonction des paramètres d'irradiation que sont la fluence du laser, la vitesse de balayages et le pas entre les lignes de balayage sera étudiée.

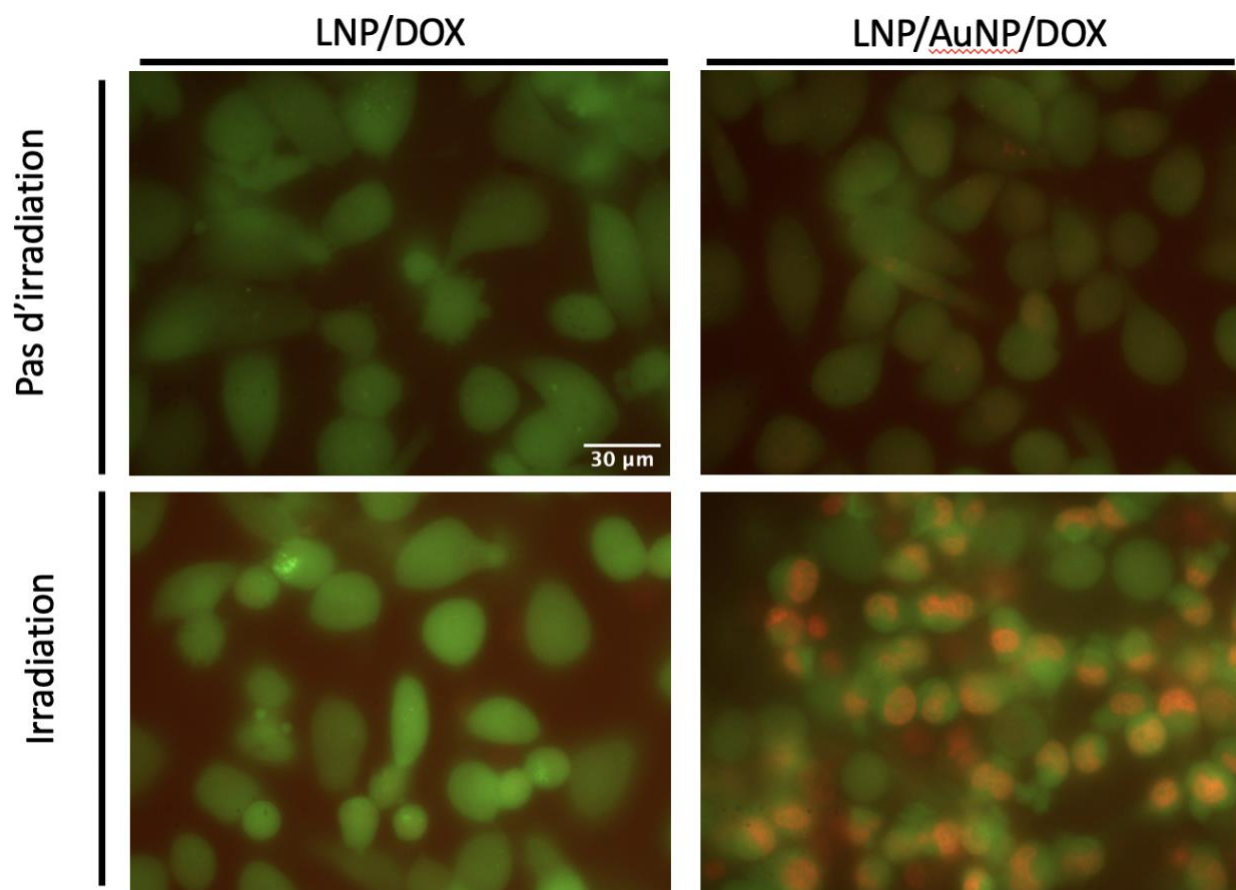


Figure 5-1 Images en fluorescence de cellules MDA-MB-231 traitées avec des LNPs contrôles (sans AuNPs) et avec AuNPs, avec et sans irradiation. Coloration de la membrane cellulaire par Calceine AM en vert et fluorescence de couleur rouge liée à la DOX. L'échelle est valable pour les quatre images.

5.1.2 Méthode de quantification de livraison après irradiation

Après avoir obtenu des résultats prometteurs sur la livraison des médicaments avec des impulsions nanosecondes, une méthode efficace pour quantifier la libération de médicaments a été recherchée. En général, ce type d'étude est directement mené sur les LNPs en solution, en mesurant l'intensité

en fluorescence avant et après irradiation. L'intensité maximale mesurable correspond à une libération de 100% qui est atteinte en utilisant du Triton par exemple. Ici, il n'est pas possible de faire ce type d'étude à cause de la complexité du balayage 3D qu'il faudrait effectuer pour irradier toutes les LNPs à la même puissance surfacique. Ainsi, il fut décidé d'utiliser directement les expériences effectuées sur les cellules pour quantifier le taux de libération des médicaments. Pour ce faire, les irradiations ont été effectuées comme précédemment. Nous supposons alors que l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de DOX libérée. Ceci est une hypothèse raisonnable dans la mesure où cela a été observé expérimentalement, par mesure d'intensité fluorescente à différentes concentrations de DOX connues. De plus, cette méthode de quantification par intensité fluorescente est beaucoup utilisée dans la recherche. Pour obtenir l'intensité maximale mesurable et obtenir ce qui correspond à 100% de libération des médicaments, un échantillon avec de la DOX en solution est utilisé. Cet échantillon ne subit aucune irradiation et suit les mêmes étapes de lavage que les échantillons de LNPs. La prise d'images est alors faite, avec l'objectif 20X, ce qui permet d'obtenir une image d'un carré entier de 500 μm x 500 μm et de visualiser un grand nombre de cellules. Pour déduire le taux de libération dans chacun des échantillons, quatre mesures sont alors prises. Dans l'échantillon de LNPs, avec ou sans irradiation, on mesure l'intensité fluorescente des noyaux de chacune des cellules comprises dans la zone irradiée, la moyenne de ces valeurs est ensuite considérée pour la suite des calculs. Cette intensité peut être notée I_{LNP} . Après cela, l'intensité de différentes zones du fond est mesurée et la moyenne de toutes ces valeurs est calculée elle aussi, notons cette valeur $I_{BackLNP}$. Les mêmes mesures sont effectuées sur l'échantillon avec la DOX en solution, nous notons les deux intensités moyennes obtenues I_{DOX} (intensité fluorescente des noyaux des cellules) et $I_{BackDOX}$ (intensité fluorescente du fond). Il est alors possible à partir de ces valeurs de déduire le taux d'intensité de fluorescence des noyaux des cellules irradiées, ou non, avec des LNPs, par rapport à l'intensité des noyaux des cellules en présence de DOX en solution, ce qui donne le pourcentage de libération de la DOX. Ce pourcentage est donné par l'équation :

$$\%_{libération} = \frac{I_{LNP} - I_{BackLNP}}{I_{DOX} - I_{BackDOX}} \times 100 \quad (4)$$

Dans ce calcul, nous supposons que des cellules où la libération est de 100% ont la même intensité que des cellules avec de la DOX en solution, à une même concentration de DOX. Cette hypothèse est raisonnable mais présente certaines limites. La DOX étant peu soluble dans le PBS, elle doit

être filtrée avant d'être ajoutée aux cellules pour éviter que des éléments de DOX non dissous influent sur l'expérience. Ainsi, la concentration de DOX en solution lors de ces expériences est légèrement surévaluée et donc le pourcentage de libération obtenu peut être supérieur à ce qu'il est en réalité. Ce calcul donne cependant un ordre de grandeur réaliste de ce qui est observé. Même si le pourcentage obtenu pour les LNPs/AuNPs/DOX et LNPs/DOX n'est pas exact, cela permet de quantifier l'effet de l'interaction laser-nanoparticules d'or sur la libération et d'obtenir un facteur concret d'amélioration de la libération due à l'irradiation et à la présence des AuNPs. Un exemple des images comparées pour effectuer ce calcul est donné à la Figure 5-2. Les cellules irradiées semblent beaucoup plus intenses que les cellules avec la DOX en solution, ce qui n'est pas un comportement attendu. Ceci peut être expliqué par le fait que dans l'échantillon irradié, toutes les cellules ne présentent pas cette fluorescence très intense ce qui peut suggérer que les LNPs se regroupent dans une partie des cellules des échantillons, et rend donc les noyaux très intenses en fluorescence. Il faut aussi considérer que le fond peut être plus intense dans un des deux échantillons. De plus, il faut tenir compte de la remarque précédente à propos de la surestimation de la concentration en DOX utilisée qui pourrait être plus faible qu'attendue. Il est possible que le comportement de la DOX ne soit pas le même lorsqu'elle est encapsulée, que lorsqu'elle est directement en solution avec les cellules. La diffusion des LNPs à l'intérieur des cellules est différente de la diffusion de la DOX dans les cellules. Notamment, la DOX rentre plus rapidement dans les cellules et atteint plus facilement le noyau quand elle est en solution que lorsqu'elle est libérée par irradiation laser. Ainsi, après attente pour l'étape d'imagerie, le noyau des échantillons de DOX en solution peut être moins intense en fluorescence car la DOX va commencer à colorer le cytoplasme des cellules, et pas seulement le noyau des cellules, à cause de l'attente de 20 heures [74]. Avec les échantillons de LNPs/AuNPs/DOX, la DOX diffuse probablement moins vite que si elle était en solution car elle sort progressivement des LNPs, ce qui fait que seul le noyau est fluorescent et pas encore le cytoplasme. Cela entraîne une intensité plus importante dans le noyau des cellules dans les échantillons incubés avec LNPs/AuNPs/DOX et irradiés par rapport aux échantillons incubés à la même concentration théorique de DOX en solution.

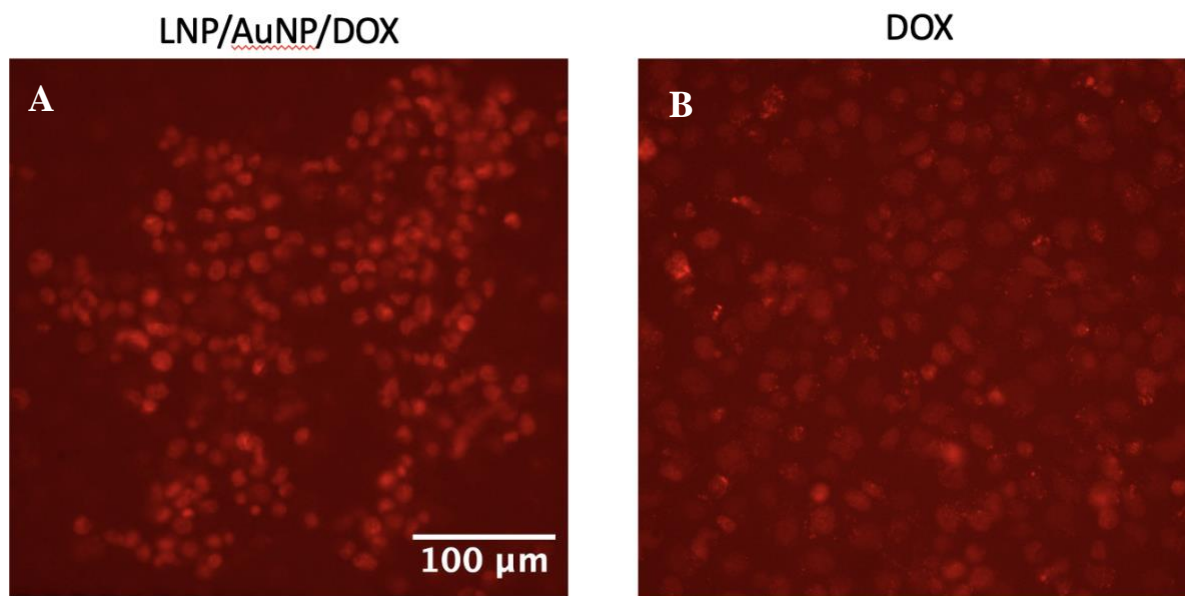


Figure 5-2 Exemple d'images utilisées pour le calcul du taux de libération de la DOX. A) Cellules MDA-MB-231 irradiées pendant l'incubation de 4 heures de LNPs/AuNPs/DOX à 71 J/cm^2 avec une vitesse de balayage de 50 μm/s et un pas de 5 μm . B) Cellules incubées pendant 4 heures avec de la DOX en solution à la même concentration de DOX.

5.2 Optimisation de la fluence du laser

Des échantillons ont été irradiés à une vitesse de balayage de 100 μm/s et un pas de 10 μm mais avec des puissances surfaciques différentes. Les résultats de ces mesures sont présentés en Figure 5-3. Ces résultats ont été obtenus en appliquant la méthode présentée à la section 5.1.2 en mesurant l'intensité fluorescente des noyaux des cellules irradiées. Ce résultat important montre que, quelle que soit la fluence de laser utilisée, les échantillons de LNPs/DOX ne libèrent pas la DOX et leur pourcentage de libération reste constant à une faible valeur. La valeur obtenue n'est pas égale à 0 ici car de la DOX en solution peut exister dans l'échantillon de LNPs/DOX et des phénomènes de fuite, moins importants qu'avec les échantillons de LNPs/AuNPs/DOX, peuvent survenir. Pour les échantillons de LNPs/AuNPs/DOX, il est nécessaire d'avoir une fluence de 43 J/cm^2 pour que le laser ait un effet sur la libération de la DOX. Cet effet devient maximal pour une fluence de 71 J/cm^2 qui semble être une valeur seuil permettant une libération quasi-totale de la DOX. A cette fluence, la quantité de DOX libérée est alors 3 fois plus importante pour les échantillons avec LNPs/AuNPs/DOX lorsqu'il y a irradiation et comparativement à un échantillon avec LNPs/DOX

sans irradiation, la présence de nanoparticules d'or et l'irradiation permet de multiplier la quantité de DOX libérée par environ 8, sans que la totalité de cette libération soit un phénomène ciblé à cause de la fuite.

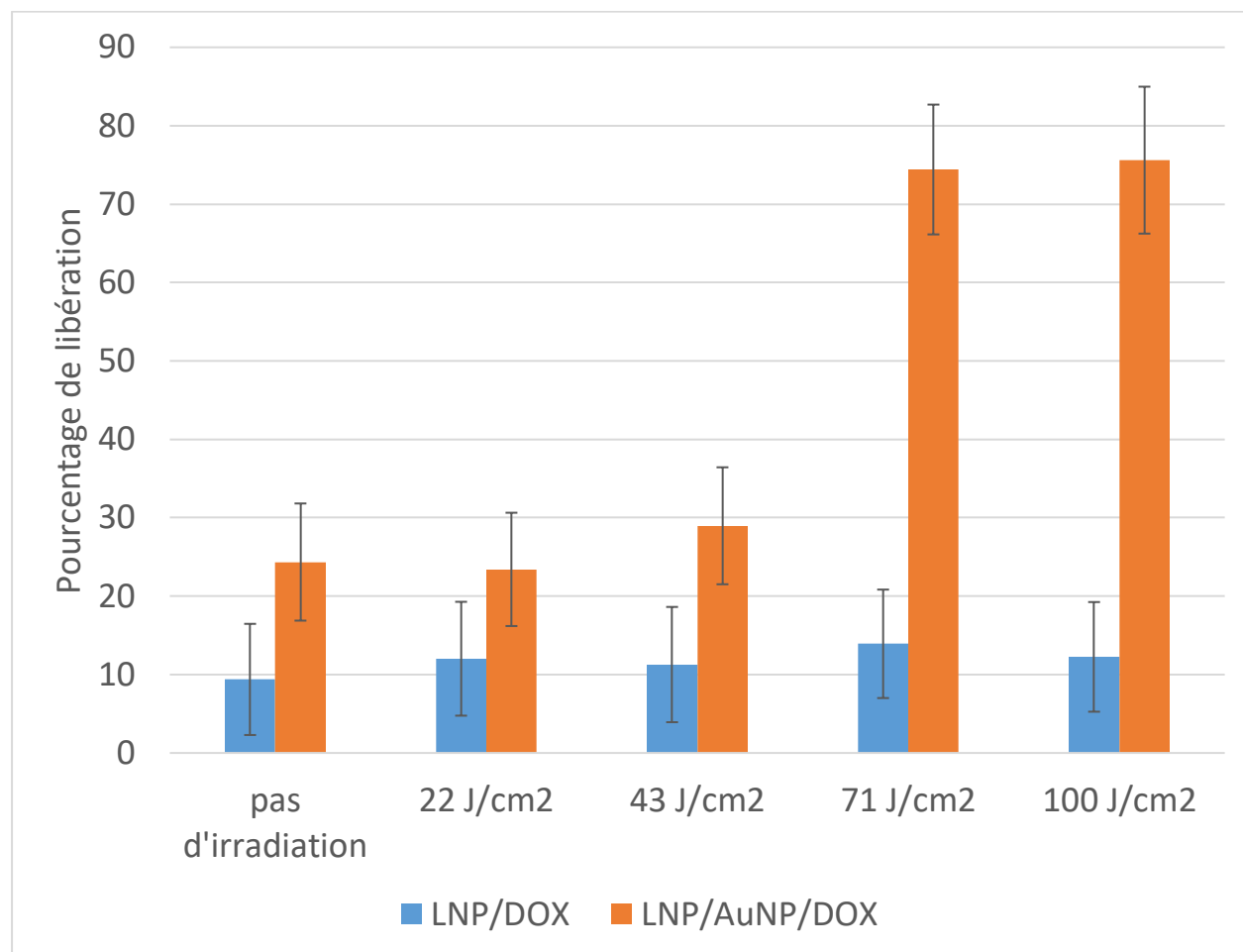


Figure 5-3 Pourcentage de libération de la DOX à différentes fluences (de 0 à 100J/cm²) avec les paramètres de balayage identiques (100 $\mu\text{m/s}$ et 10 μm de pas) suite à une incubation de 4 heures des cellules avec LNPs/DOX et LNPs/AuNPs/DOX à une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Après cette étude, une seconde a été menée sur l'influence des paramètres de balayage du laser aux 2 fluences qui permettaient d'obtenir une libération maximale soit 71 J/cm² et 100J/cm².

5.3 Optimisation des paramètres de balayage

Les résultats obtenus en faisant varier les paramètres de balayage (pas et vitesse de balayage), avec des fluences 71 J/cm^2 et 100 J/cm^2 sont montrés en Figure 5-4 et Figure 5-5. Ces deux figures permettent de conclure que les paramètres de balayage n'influencent pas la libération de la DOX depuis les LNPs/DOX, celle-ci restant presque toujours la même avec ou sans irradiation laser. En revanche, pour les échantillons avec LNPs/AuNPs/DOX, il existe ici encore un seuil à partir duquel le laser induit une libération du médicament. A partir de $200 \text{ } \mu\text{m/s}$ et un pas de $20 \text{ } \mu\text{m}$, l'irradiation commence à permettre la livraison de la DOX. Celle-ci devient bien plus élevée pour des paramètres de $200 \text{ } \mu\text{m/s}$ et un pas de $20 \text{ } \mu\text{m}$, pour atteindre une valeur maximale à $50 \text{ } \mu\text{m/s}$ et un pas de $5 \text{ } \mu\text{m}$. Pour ces valeurs, il est possible de voir que le taux de libération dépasse 100%. Cela peut être possible à cause des limitations du calcul effectué, expliquées dans la section 5.1.2. Ces limitations sont la surestimation de la concentration en DOX des échantillons avec la DOX en solution et l'hypothèse que l'intensité en fluorescence est directement liée au taux de libération de DOX.

Ces valeurs de $50 \text{ } \mu\text{m/s}$ et un pas de $5 \text{ } \mu\text{m}$ ont été choisies comme les plus lentes pour deux raisons. Une première raison est liée au temps de l'expérience. Un balayage d'un carré de $500 \text{ } \mu\text{m} \times 500 \text{ } \mu\text{m}$ avec ces paramètres prend environ 25 minutes, ce qui représente un temps important pour une petite zone irradiée. Passer à des paramètres encore moins rapides aurait induit un temps d'expérience trop long. Cette limitation est reliée au fait que le laser utilisé possède un taux de répétition de $f = 10 \text{ Hz}$, ce qui est faible comparé à des lasers semblables disponibles sur le marché, présentant des taux de répétition de l'ordre du kHz. La seconde raison est plus importante et purement physique. Pour que chaque LNP/AuNPs/DOX reçoive au moins une impulsion, le chevauchement des impulsions successives doit être assuré. Cette condition est obtenue pour une vitesse de balayage V inférieure à Df où D est le diamètre du spot laser et pour un pas égal au diamètre du spot D . Avec de tels paramètres, l'ensemble de la zone d'étude sera irradié par une impulsion. Avec un diamètre de spot du laser de $D = 5 \text{ } \mu\text{m}$, il faut donc un pas de $5 \text{ } \mu\text{m}$ pour s'assurer qu'une des deux directions de l'espace d'étude soit totalement irradiée. Une vitesse de $V = Df = 50 \text{ } \mu\text{m/s}$ permet que chacune des impulsions du laser se touche spatialement, optimisant ainsi le procédé de libération, ce qui est confirmé expérimentalement. Cette analyse explique aussi pourquoi le maximum de libération n'est pas atteint avec des paramètres plus rapides. En effet, à

une vitesse supérieure à 50 $\mu\text{m/s}$ ou à un pas supérieur à 5 μm , toutes les LNPs ne reçoivent plus un minimum d'une impulsion laser. Ainsi, il y a moins de LNPs irradiées. Ces LNPs non irradiées ne livrent pas la DOX ce qui réduit la quantité totale de DOX délivrée au noyau des cellules et donc l'efficacité du traitement. Il est possible de conclure, comme observé expérimentalement, que pour des paramètres plus rapides que 100 $\mu\text{m/s}$ et un pas de 10 μm , le nombre de nanoparticules d'or sur lesquelles une impulsion laser est appliqué est négligeable et qu'aucun effet n'est apporté par le laser.

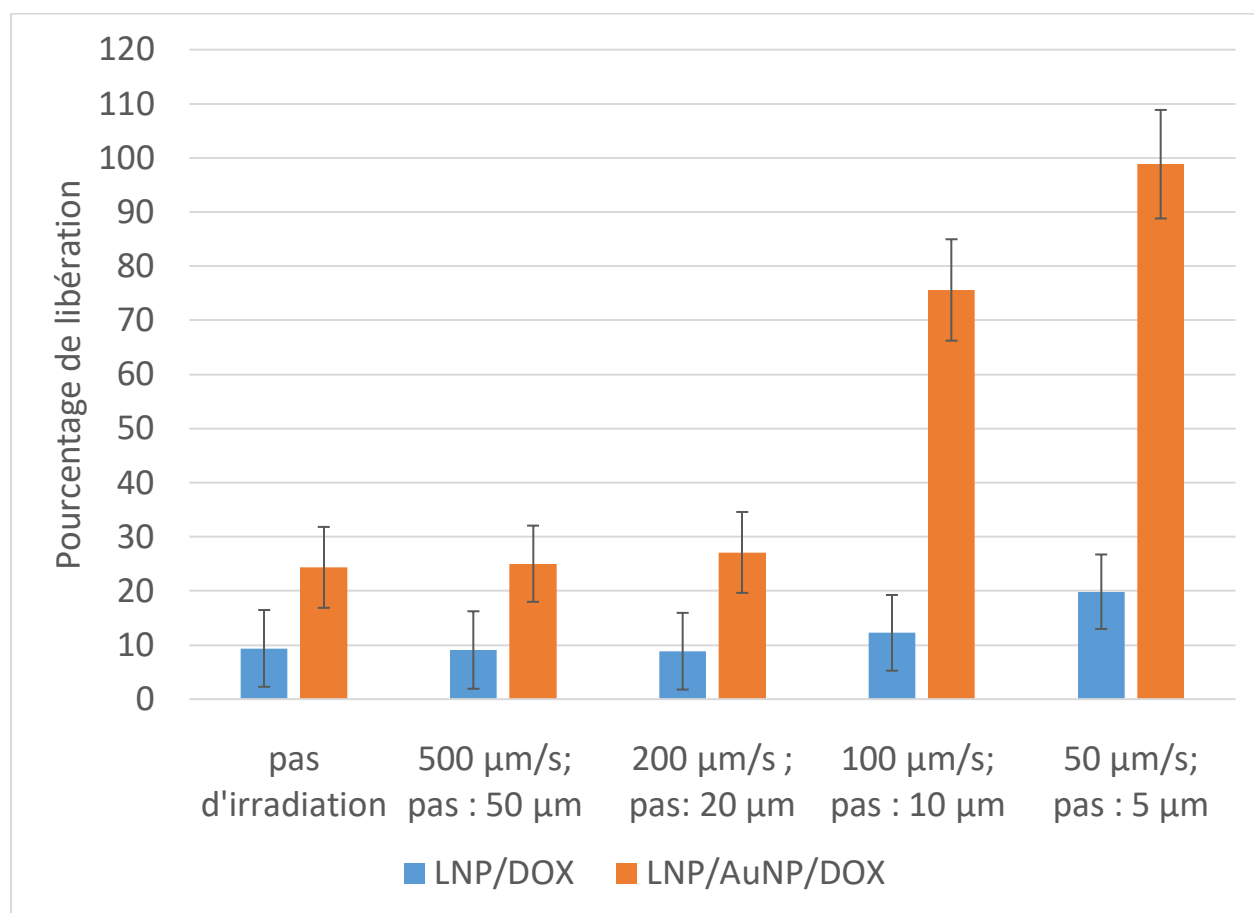


Figure 5-4 Évolution du pourcentage de libération de la DOX en fonction des paramètres de balayage à une fluence de 100 J/cm^2 suite à une incubation de 4 heures des cellules avec LNPs/DOX et LNPs/AuNPs/DOX à une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$.

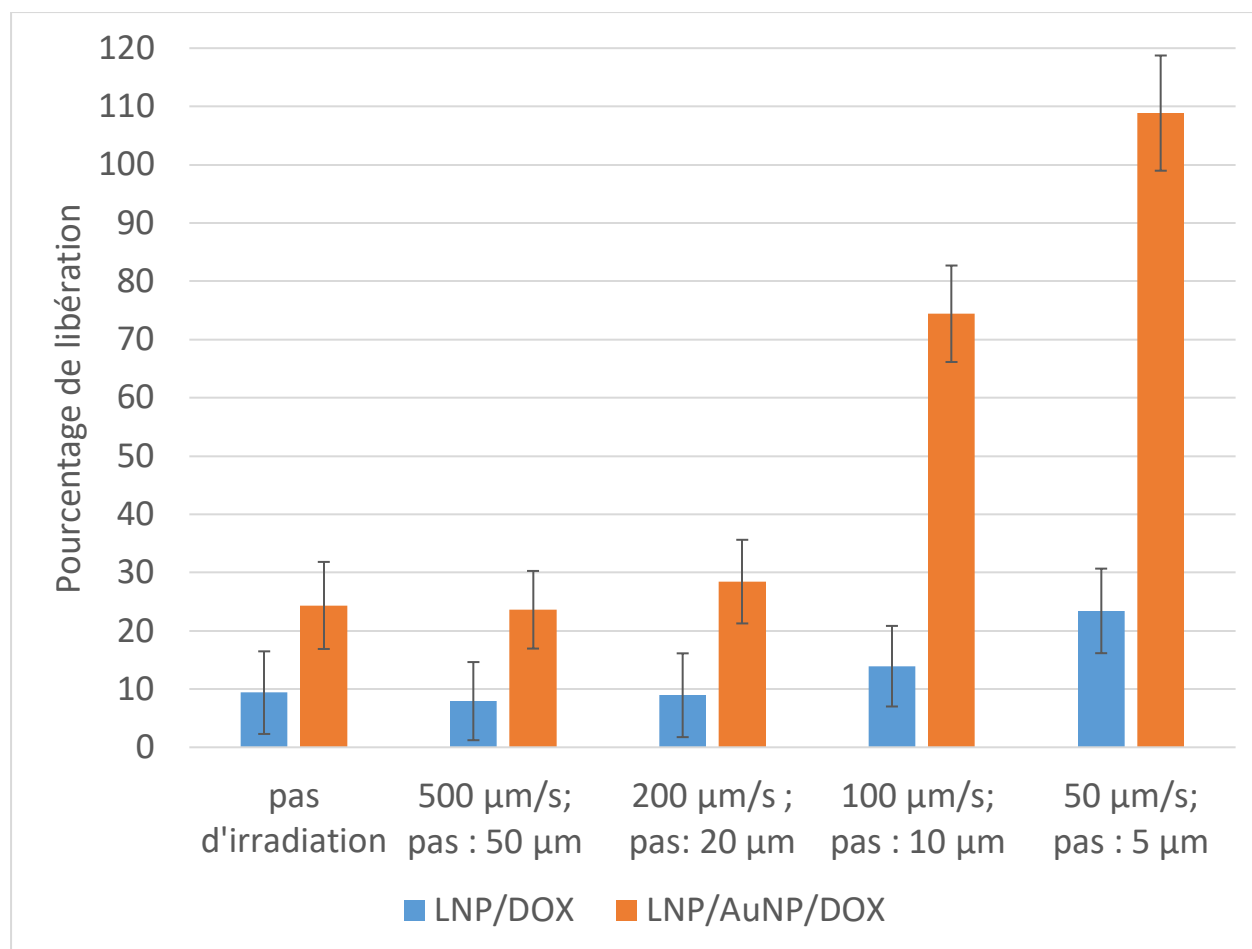
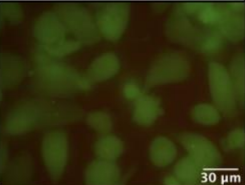
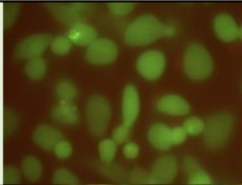
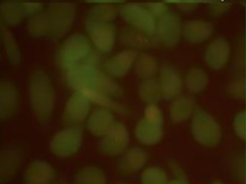
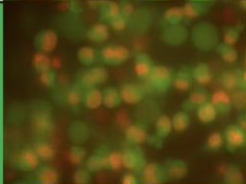


Figure 5-5 Évolution du pourcentage de libération de la DOX en fonction des paramètres de balayage à une fluence de 71 J/cm^2 suite à une incubation de 4 heures des cellules avec LNP/DOX et LNP/AuNPs/DOX à une concentration de 50 μg/mL .

En résumé, avec des paramètres de balayage de 50 μm/s et un pas de 5 μm , et pour des fluences de 71 J/cm^2 et 100 J/cm^2 , il est possible de conclure que la quantité de DOX libérée par l'effet laser est environ 4 fois supérieure à la quantité libérée sans irradiation lorsque des nanoparticules d'or sont encapsulées dans les LNP. De même, la quantité de DOX libérée avec irradiation à 71 J/cm^2 et 100 J/cm^2 en présence de nanoparticules d'or encapsulées est environ 10 fois supérieure à la quantité libérée avec simplement une incubation de LNP/DOX. Ainsi, il est possible de dire que l'utilisation d'un laser sur les cellules incubées avec des LNP/AuNPs/DOX permet d'augmenter d'un facteur 4 la quantité de médicaments délivrée et non d'un facteur 10 pour le moment à cause du problème de fuites des LNP/AuNPs/DOX. Ceci laisse présager qu'en améliorant la formulation

des lipides pour que les LNPs/AuNPs/DOX ne subissent plus de fuites comme les LNPs/DOX, il serait possible d'effectuer une livraison ciblée de médicaments qui augmenterait d'un facteur 10 la quantité de médicaments délivrée sur le site de la tumeur. Un tableau récapitulatif des résultats obtenus et du facteur d'augmentation de la quantité de DOX délivrée aux cellules est montré au Tableau 5-1.

Tableau 5-1 Récapitulatif de la quantité de DOX délivrée aux cellules en fonction d'une irradiation ou non et de la présence de nanoparticules d'or dans les LNPs ou non. La quantité de DOX est normalisée à 1 correspondant à la quantité délivrée par les LNPs/DOX sans irradiation.

X : quantité normalisée de DOX délivrée aux cellules	Pas de LASER		LASER à 71J/cm², 50 μm/s et pas de 5 μm	
LNP/DOX	1		1	
LNP/AuNP/DOX	2,5		10	

5.4 Toxicité de l'irradiation laser sur les cellules

Après avoir constaté que la DOX pouvait bien être livrée en utilisant les paramètres d'irradiation appropriés avec le laser, il a fallu s'assurer que le laser ne pas tuait les cellules de lui-même. Le fait que le cytoplasme, sous ces conditions, devienne fluorescente avec la calceine indique que la cellule est bien vivante, mais il est préférable de s'assurer de ce fait en effectuant une double vérification avec deux fluorophores différents. Il a donc été décidé d'effectuer les mêmes irradiations sur des cellules seules, conservées dans leur milieu de culture sans présence de LNPs. Pour étudier la mort cellulaire, la double coloration a été faite le lendemain des irradiations. Il y a

eu la coloration à la calceine, à la même concentration que dans les échantillons avec LNPs, ainsi qu'une coloration au PI. Ce marqueur fluorescent, de couleur rouge, ne va colorer que les cellules mortes. En effet, les cellules vivantes restent hermétiques et le PI ne traverse pas la membrane cellulaire. Si la cellule est morte, le PI rentrera facilement dans la cellule et teindra le noyau de fluorescence rouge. Étant donné que la DOX colore aussi le noyau d'une couleur rouge, il était impossible d'utiliser le PI pour vérifier si les cellules étaient mortes quand il y avait incubation de LNPs/DOX ou LNPs/AuNPs/DOX. Comme expliqué dans la méthodologie d'imagerie, les cellules sont alors incubées avec le PI à une concentration de $6.3 \mu\text{M}$ et avec la calceine pendant 30 minutes. S'en suit, un double lavage au milieu de culture et la prise d'images. La Figure 5-6 montre les résultats obtenus. La Figure 5-6 A et la Figure 5-6 C correspondent au même échantillon, irradié à 71 J/cm^2 à $50 \mu\text{m/s}$ et un pas de $5 \mu\text{m}$. La Figure 5-6 B et la Figure 5-6 D correspondent aux mêmes paramètres de balayage, avec une fluence de 100 J/cm^2 . Dans les deux cas, la quasi-totalité des cellules restent bien en vie après irradiation. Les cellules ne présentent en effet pas de fluorescence rouge dans les noyaux, signe que les cellules sont restées hermétiques au PI et la fluorescente verte de la calceine confirme que les cellules sont encore bien vivantes. Ainsi, le laser seul n'entraîne pas de mort cellulaire et cette technologie peut être utilisée pour induire une livraison de la DOX dans les échantillons avec LNPs/AuNPs/DOX.

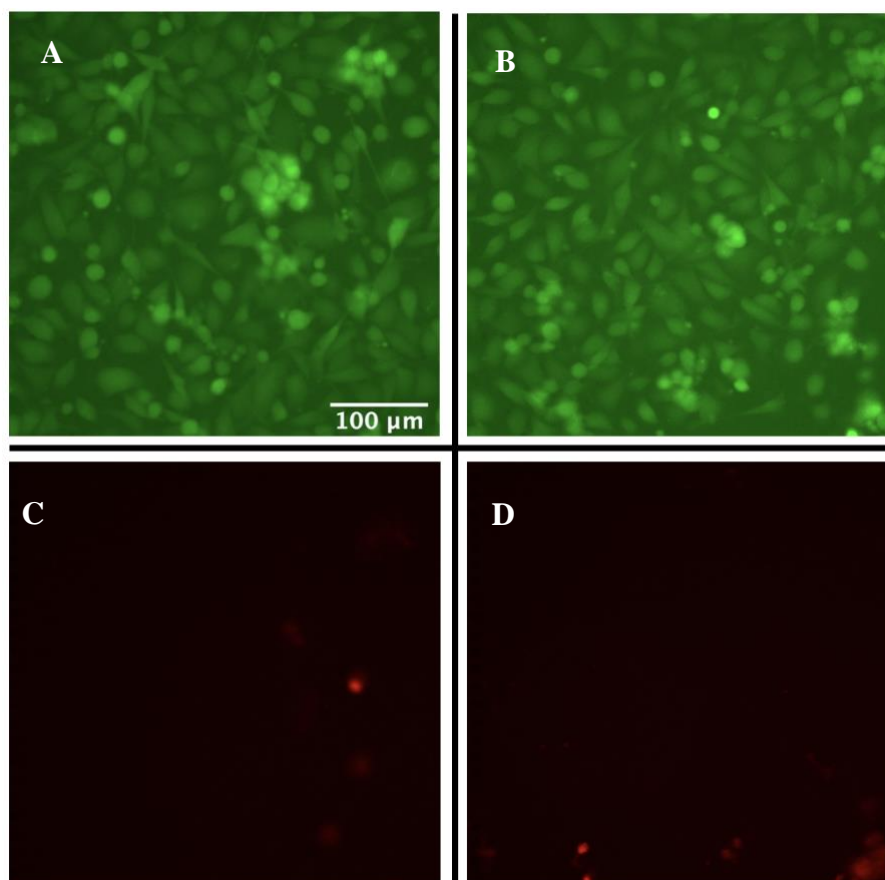


Figure 5-6 Vérification de la survie des cellules MDA-MB-231 après irradiation suite à une incubation avec PI (fluorescence des noyaux des cellules en rouge) et calceine AM (membranes vertes). Les images A et C sont le même échantillon pour une irradiation à 71 J/cm^2 à 50 μm/s et un pas de 5 μm . Les images B et D sont aussi le même échantillon avec une irradiation à 100 J/cm^2 et les mêmes paramètres de balayage. L'échelle est valide pour les quatre images.

5.5 Étude de l'influence du temps d'incubation sur la livraison

5.5.1 Réduction du temps d'incubation à 1h

Le temps d'incubation ayant été fixé à 4h pour la première vague d'expériences, nous avons souhaité voir s'il était possible d'observer un résultat intéressant avec un temps d'incubation plus faible. Il a été décidé de s'intéresser à un temps d'incubation de seulement une heure, et d'effectuer deux irradiations sur deux échantillons différents appartenant au même puits, à une fluence de 100 J/cm^2 avec les paramètres optimums de balayage : une vitesse de 50 μm/s et 5 μm de pas. Les cellules irradiées ont donc été incubées exactement dans les mêmes conditions, mais un carré de

500 μm x 500 μm a été irradié 15 minutes après l'ajout des LNPs/AuNPs/DOX, et un second l'a été juste après la fin de la première irradiation. La seconde irradiation finissait alors 10 minutes avant l'étape de lavage des cellules, qui survenait donc une heure après l'ajout des LNPs/AuNPs/DOX. Cette expérience permettait aussi de vérifier si le moment de l'irradiation influençait la quantité de médicaments libérée. Un effet est observable après irradiation, les noyaux des cellules irradiées sont plus fluorescents sur la Figure 5-7 A et sur la Figure 5-7 B que ceux des cellules non irradiées de la Figure 5-7 C, qui ne sont que très peu visibles. De plus, la Figure 5-7 A montre la première zone irradiée, et la zone irradiée en second correspond à la Figure 5-7 B. Il n'y a pas de différence notable entre ces deux images, ce qui prouve que le moment de l'irradiation importe peu dans le résultat. Cela suggère que le mécanisme de libération de la DOX est un mécanisme rapide, et qu'une différence de 20 minutes dans le moment de l'irradiation n'affecte en rien la quantité de DOX délivrée. Cela nous renseigne aussi sur l'internalisation rapide des LNPs dans les cellules. Une partie des LNPs est bien internalisée après seulement 20 minutes d'incubation.

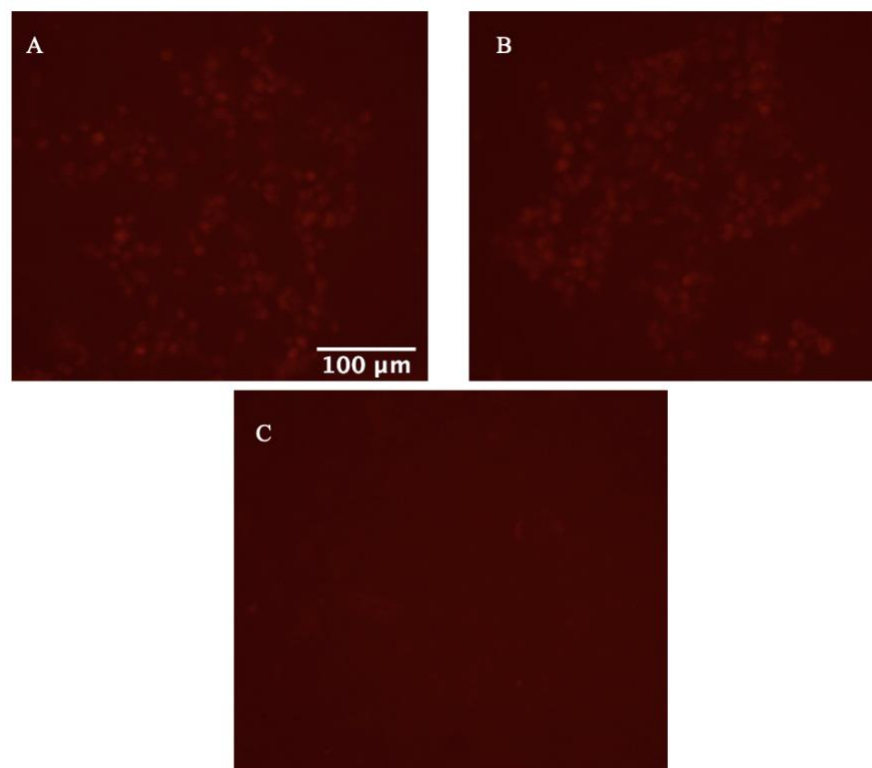


Figure 5-7 Images en fluorescence de cellules MDA-MB-231 traitées avec des LNPs/AuNPs/DOX avec une heure d'incubation et irradiation à 100 J/cm², 50 μm/s et pas de 5 μm (A : première irradiation 15 minutes après l'ajout des LNPs/AuNPs DOX et B : seconde irradiation)

Après avoir eu la confirmation que la réduction du temps d'incubation à une heure permettait de constater que l'irradiation induisait une livraison du médicament au noyau des cellules, nous nous sommes intéressés à effectuer l'irradiation juste après l'étape de lavage. Deux échantillons ont donc été irradiés comme précédemment dans le même puits, mais cette fois l'étape de lavage était effectuée entre les deux irradiations. Il y a eu une première irradiation, l'étape de lavage, puis une seconde irradiation sur un second carré de 500 μm x 500 μm du puits. Les résultats montrés à la Figure 5-8 permettent de s'assurer que seules les LNP se trouvant à l'intérieur des cellules sont affectées par l'irradiation. En effet, la comparaison de la Figure 5-8 A et de la Figure 5-8 B montre que les résultats sont similaires et que la quantité de DOX livrée est similaire, peu importe que l'irradiation ait lieu avant ou après l'étape de lavage. Dans les deux images, les noyaux des cellules montrent une fluorescence rouge très intense, signe de la livraison de la DOX et cette intensité est

bien similaire dans les images A et B. Ainsi, l'irradiation n'affecte que les LNPs étant préalablement entrées dans les cellules par endocytose et les LNPs se trouvant dans l'environnement extérieur des cellules ne sont pas affectées. La Figure 5-8 C agit comme un contrôle et montre bien qu'il est toujours nécessaire d'avoir l'irradiation pour qu'une quantité importante de DOX atteigne le noyau cellulaire.

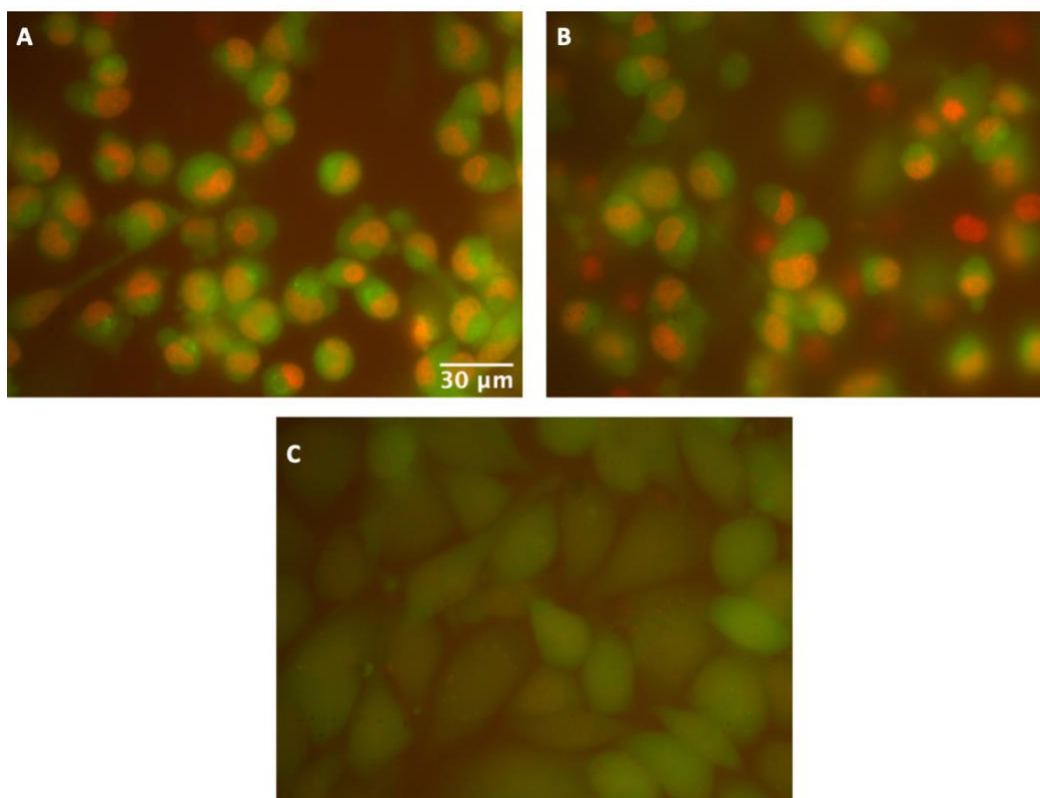


Figure 5-8 Fluorescence de la DOX (couleur rouge) et de la Calceine (couleur verte) de cellules MDA-MB-231 avec incubation de LNPs/AuNPs/DOX pendant une heure à une concentration de $50 \mu\text{g/mL}$. Irradiation effectuée : après l'étape de lavage en image A, juste avant l'étape de lavage en image B et pas d'irradiation en image C. L'irradiation effectuée à 100 J/cm^2 , $50 \mu\text{m/s}$ et pas de $5 \mu\text{m}$. L'échelle est valable pour les trois images.

5.5.2 Irradiation après incubation de 15 minutes

Après les expériences avec une incubation d'une heure, une autre expérience avec un temps d'incubation de 15 minutes fut effectuée, pour imiter au mieux le comportement que pourrait avoir la circulation du flux sanguin dans l'environnement d'une tumeur. Lors d'une expérience *in vivo*, l'étape de lavage sera effectuée naturellement par le flux sanguin. Ainsi en réduisant le temps

d'incubation à 15 minutes, nous nous assurons qu'il est possible d'obtenir des résultats pour des temps d'incubation très faibles et que les LNPs peuvent entrer dans les cellules même avec ce faible temps d'incubation. L'irradiation est alors effectuée juste après l'étape de lavage, 15 minutes après l'injection des LNPs, comme cela pourrait être le cas pour une expérience *in vivo*. Les résultats de cette expérience sont présentés à la Figure 5-9. Les quatre images présentées montrent bien qu'un temps de 15 minutes est suffisant pour que les LNPs entrent dans les cellules par endocytose et qu'effectuer l'irradiation après ce temps d'attente permet d'engendrer la livraison de médicament aux noyaux des cellules. Comme cela a été montré avec un temps d'incubation des LNPs 4 heures, le laser apporte un effet de livraison des médicaments seulement s'il y a des nanoparticules d'or dans les LNPs. C'est seulement dans ce cas que les noyaux des cellules deviennent très fluorescents de couleur rouge, ce qui prouve que la DOX a été livrée au noyau des cellules. Cette expérience représente ce qui pourrait être effectué dans une application *in vivo*, avec une injection locale au niveau de la tumeur des LNPs, une attente de 15 minutes, puis une irradiation.

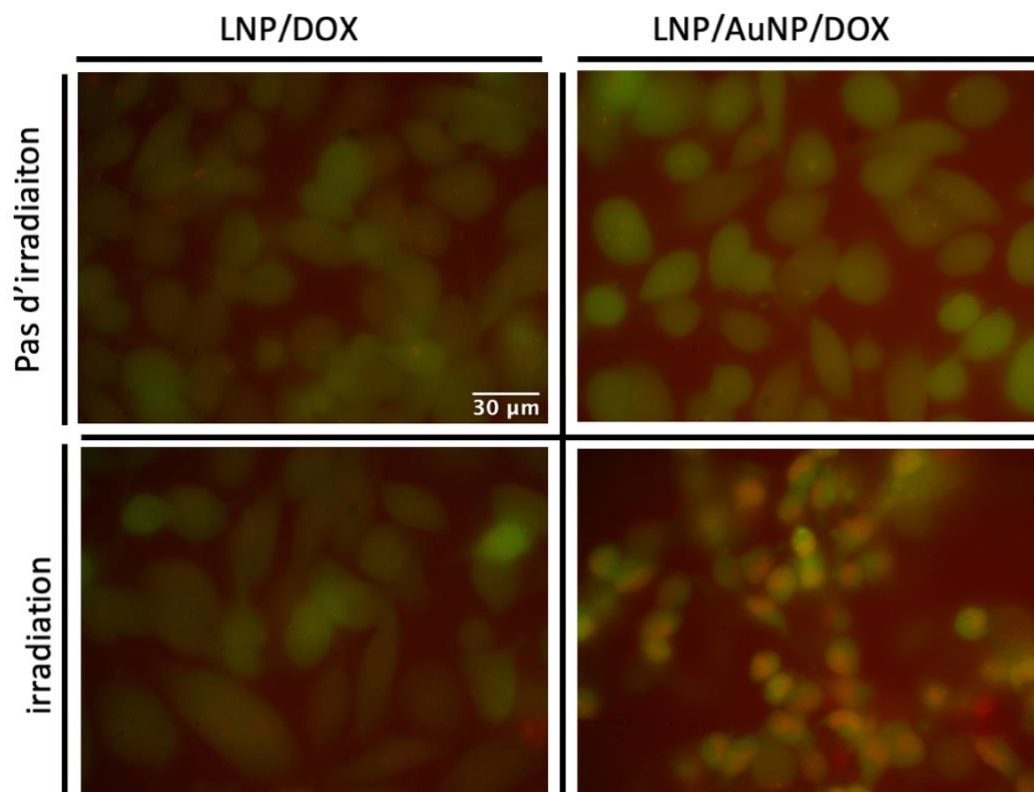


Figure 5-9 Images en fluorescence de cellules MDA-MB-231 traitées avec des LNPs contrôles (sans AuNPs) et avec AuNPs, avec et sans irradiation. Coloration de la membrane cellulaire par Calceine AM en vert et fluorescence de couleur rouge liée à la DOX. L'échelle est valable pour les quatre images.

5.6 Livraison par impulsions femtosecondes

Comme expliqué dans la revue de littérature, après avoir obtenu de tels résultats, nous avons exploré la possibilité d'obtenir des résultats similaires à une longueur d'onde plus intéressante pour une future application chez l'humain. Le fait que le corps humain absorbe de façon non négligeable la lumière dans le domaine du visible limite les applications, d'où le choix de s'orienter vers une irradiation infrarouge. Un laser continu ou nanoseconde dans l'infrarouge n'aurait aucun effet sur les nanoparticules qui n'absorbent pas la lumière à cette longueur d'onde. Il fut donc décidé de s'intéresser au laser femtoseconde à haute puissance crête qui peut induire la formation d'une nanobulle autour des nanoparticules d'or. Le laser utilisé est le SpitFire de *SpectraPhysics*, de longueur d'onde 800 nm et de durée d'impulsion de 55 fs. L'avantage de ce laser est que son taux de répétition est de $f=1\text{ kHz}$, ce qui permet de passer à une vitesse de balayage $V=5f$ plus élevée, tout en gardant la condition d'avoir au minimum une impulsion par nanoparticule (chaque impulsion devant se toucher dans l'espace). Les irradiations sont effectuées avec le même objectif 4x qui était utilisé avec le laser nanoseconde et le protocole utilisé est identique. Avec cet objectif, il a été décidé de travailler avec un spot laser de diamètre valant $D=90\text{ }\mu\text{m}$ et une fluence de 99 mJ/cm^2 . Cette taille de spot permet d'avoir un spot relativement large et de couvrir une zone importante lors de l'irradiation. Les paramètres de balayage utilisés sont une vitesse de $V=5000\text{ }\mu\text{m/s}$ et un pas de $d=10\text{ }\mu\text{m}$. Avec ces paramètres, les LNPs recevront plus d'une impulsion chacune. Pour un spot de $90\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre nous pouvons estimer que chaque LNP reçoit un nombre d'impulsions $n=\frac{D}{d} \times \frac{fD}{V}=162$. Les résultats obtenus sont montrés à la Figure 5-10. Ces images montrent des résultats similaires à ceux obtenus précédemment avec le laser nanoseconde. Encore une fois, les LNPs sans AuNPs ne livrent pas la DOX et seulement le cas où il y a irradiation avec présence de nanoparticules d'or permet une livraison efficace des médicaments. C'est en effet, seulement dans ce cas, que nous observons des noyaux de cellules très fluorescents, grâce à la DOX qui a été livrée. Dans les autres cas, les noyaux restent peu fluorescents en comparaison de ce qui est observé quand nous avons une combinaison de l'irradiation et de présence de nanoparticules d'or dans les LNPs. Une irradiation a aussi été effectuée sur des cellules non traitées avec des LNPs. Ces cellules survivent bien à l'irradiation laser comme attendu. Le laser a donc seulement un effet sur les LNPs qui subissent une ouverture via l'interaction entre les nanoparticules d'or et le laser. Ce type de laser présente donc l'avantage d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus

avec le laser nanoseconde, tout en se trouvant dans la zone thérapeutique, dans le proche infrarouge. Cependant, il faut considérer un autre point pour une éventuelle application qui est le prix du laser. Un laser nanoseconde est relativement peu cher et est utilisé fréquemment dans la recherche pour le biomédical. Le laser femtoseconde avec un système amplifié coûte très cher et n'est pas aussi simple d'emploi. Il est ainsi difficilement miniaturisable contrairement à un laser nanoseconde.

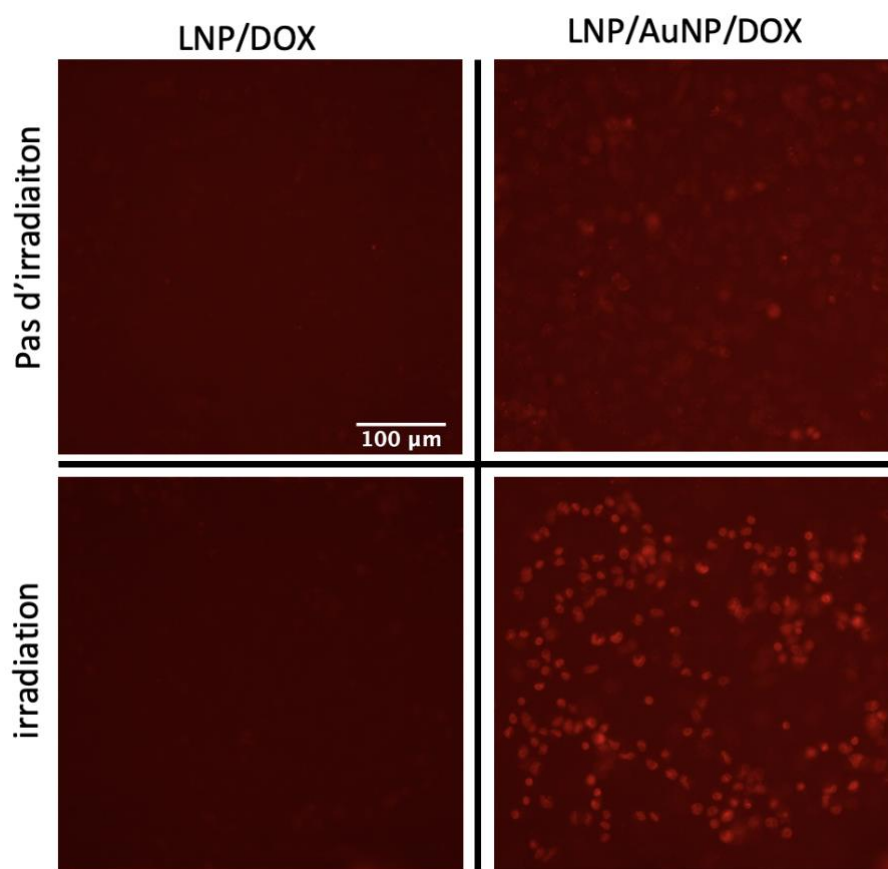


Figure 5-10 Images en fluorescence de cellules MDA-MB-231 incubées avec des LNPs/DOX avec et sans AuNPs traitées avec ou sans irradiation par le laser femtoseconde. La concentration utilisée est de 50 $\mu\text{g/mL}$. Les paramètres de balayage utilisés sont 5000 $\mu\text{m/s}$ et pas de 10 μm . L'échelle est valable pour les quatre images

CHAPITRE 6 DISCUSSION

6.1 Mécanisme de livraison de DOX par laser

Lors de cette étude, différentes méthodes de libération ont été étudiées. Un simple chauffage fut effectué jusqu'à une température de 71°C. Cette température, supérieure à la température de transition du phospholipide principal qui compose les nanoparticules lipidiques, le DSPC, n'a pas permis d'induire un effet sur les nanoparticules lipidiques et la DOX reste encapsulée. Le mécanisme de chauffage à des températures en dessous de 100 °C n'influe pas sur la capacité de garder les nanoparticules encapsulées.

6.1.1 Irradiation avec laser nanoseconde

A la vue des résultats obtenus avec le chauffage, l'irradiation avec un laser nanoseconde peut engendrer un phénomène très local au niveau de la nanoparticule et ainsi compromettre la structure bicouche de la LNP. Il est possible que la nanoparticule d'or soit fragmentée lorsque la fluence du laser est suffisante et ainsi crée des trous dans la LNP. Comme les fluences utilisées se situent au-dessus d'un seuil de libération déterminé expérimentalement de 71 J/cm² et 100 J/cm², on peut estimer théoriquement que l'irradiation de la nanoparticule résulte que la température à sa surface est d'environ 1000K, ce qui correspondrait à des températures de fusion de l'or. Cette température n'est atteinte que pendant une durée très courte (de l'ordre de la dizaine de nanosecondes) et sur une petite distance de l'ordre de quelques nanomètres et avec une seule impulsion laser. Après les irradiations, les nanoparticules d'or ne sont probablement pas intactes. Pour confirmer, cela il serait possible de prendre des images TEM des cellules après irradiation, et notamment d'observer les nanoparticules d'or à l'intérieur des cellules. Il faudrait ensuite les comparer avec les nanoparticules d'or dans les cellules non irradiées, pour voir si une différence est notable au niveau de leur diamètre par exemple.

6.1.2 Irradiation avec laser femtoseconde

Avec le laser Spitfire, l'effet de libération est observé à une fluence de 99 mJ/cm², ce qui se situe en dessous de la valeur observée expérimentalement de détachement des cellules de leur substrat se situant autour de 150 mJ/cm². La vitesse de balayage de 5000 µm/s et le pas de 10 µm utilisés

ici permettent que chaque nanoparticule reçoive environ 162 impulsions, pour une taille de spot de laser de 90 μm .

Aux fluences utilisées du laser femtoseconde, dont la longueur d'onde de 800nm se situe hors résonance, le mécanisme suggéré par Boulais et al [63] est la production d'une nanobulle autour de la nanoparticule d'or, générée par la formation d'un nanoplasma, résultant de l'augmentation du champ électromagnétique proche autour des nanoparticules d'or. La présence de cette nanobulle permettrait la libération du médicament de la LNP. Ce phénomène, appelé optoporation, est souvent observé aux fluences utilisées ici (environ 100mJ/cm²) mais avec des nanoparticules plus grandes. Les nanoparticules de 5 nm sont très peu utilisées dans le domaine de la recherche et la génération de nanobulles par des nanoparticules de cette taille n'a pas été vraiment étudiée. Les nanoparticules dont le diamètre varie de 60 à 100 nm sont bien plus souvent utilisées pour effectuer l'optoporation. Il serait intéressant de mener en plus, une étude expérimentale permettant de confirmer la formation de nanobulles avec les fluences utilisées sur des nanoparticules de 5 nm en solution. Puis, si cette étude est positive, de l'étendre à des nanoparticules d'or encapsulées dans les nanoparticules lipidiques.

Une expérience a aussi été menée avec le laser Tsunami qui est moins cher et avec un taux de répétition beaucoup plus élevé de 80 MHz. Les impulsions de 35 fs sont alors séparées de 12.5 ns. Ce type de laser permet d'induire un effet d'accumulation d'énergie entre les impulsions grâce à ce haut taux de répétition. Les expériences montrent qu'aux fluences utilisées de 0,069 mJ/cm², le laser n'avait aucun effet sur les nanoparticules. Un balayage d'une zone de 500 μm x 500 μm aux mêmes vitesses utilisées avec le laser Spitfire, ou une irradiation sur quelques cellules sans balayage pendant des durées de 15 minutes, ne permettaient pas d'observer de livraison de DOX. L'accumulation d'énergie et une élévation de température locale de quelques degrés autour des nanoparticules d'or n'a pas d'effet sur les nanoparticules lipidiques.

6.1.3 Étude d'effets collectifs

A la vue des agglomérats de nanoparticules d'or visibles dans les images Cryo-TEM des LNPs, il peut être intéressant de se demander si les mécanismes de livraison de la DOX sont collectifs ou individuels. Le premier effet collectif pouvant avoir lieu est un effet de chauffage collectif. Si les nanoparticules d'or sont assez proches, l'irradiation avec le laser nanoseconde peut permettre d'avoir une sommation de l'élévation en température entre les nanoparticules d'or de l'agrégat.

Pour vérifier si un tel effet a lieu nous pouvons utiliser l'équation 3 [59] présentée dans la revue de littérature que nous rappelons ici :

$$\eta_2^{ext} = \frac{\kappa_s}{c_p \rho} \frac{p^2}{f r_{NP}^3 L}$$

Si $\eta_2^{ext} \gg 1$, alors aucun effet de chauffage collectif n'a lieu. Dans le cas de notre étude avec le laser nanoseconde avec un taux de répétition de 10 Hz, les nanoparticules sont confinées en 2D dans une surface typique de $L=30$ nm environ dans les LNPs, des nanoparticules de 5 nm de diamètre et pour une distance inter particule p de l'ordre de 0.01 nm, nous obtenons $\eta_2^{ext} = 3016$. D'après l'image Cryo-TEM présentée en Figure 3-1 dans le Chapitre 1, les nanoparticules ne sont pas aussi proches et p est plus grand ainsi $\eta_2^{ext} \gg 1$. Ce calcul suggère qu'aucun effet collectif d'élévation de température n'a lieu et que chaque nanoparticule subit une fragmentation indépendamment les unes des autres.

Un second effet collectif pouvant avoir lieu est un effet collectif plasmonique. Lors d'une agglomération importante, un décalage du spectre et l'apparition d'un pic d'absorption dans les longueurs d'onde du proche infrarouge peut apparaître. Le spectre présenté en Figure 3-4 montre qu'il y a seulement un léger décalage du spectre des LNPs avec AuNPs encapsulées par rapport au spectre des AuNPs en solution. Cela suggère que même si de petits agglomérats dans les LNP sont observés, les nanoparticules d'or sont trop éloignées pour induire un décalage important ou l'apparition d'un second pic plasmonique d'absorption.

Cette courte analyse suggère que l'irradiation par un laser nanoseconde ou par un laser femtoseconde s'effectue sur seulement une nanoparticule d'or et les phénomènes décrits précédemment pour chaque laser se produise en première approximation, sans la considération de la présence des autres nanoparticules. La présence de plusieurs nanoparticules d'or dans la membrane lipidique permet probablement d'augmenter la probabilité de la livraison du médicament de la LNP.

6.1.4 Encapsulation de nanobâtons

Une autre piste à explorer est celle d'encapsuler des nanobâtons plutôt que des nanosphères. Les nanobâtons, qui font 20x5 nm de taille et présentent un pic d'absorption à 800 nm, seraient irradiés cette fois, par le laser femtoseconde, en résonance, contrairement à ce qui est fait avec les

nanosphères. Cela pourrait permettre de réduire la fluence nécessaire pour induire la libération de la DOX. Si cet effet est observé, il serait alors possible d'augmenter la taille du spot pour réduire la fluence à laquelle l'irradiation est faite et donc de passer à une vitesse de balayage supérieure.

Suite à notre suggestion, nos collaborateurs de UBC ont effectué quelques tentatives de synthèse de LNPs contenant des nanobâtons. La Figure 6-1 montre un résultat préliminaire.

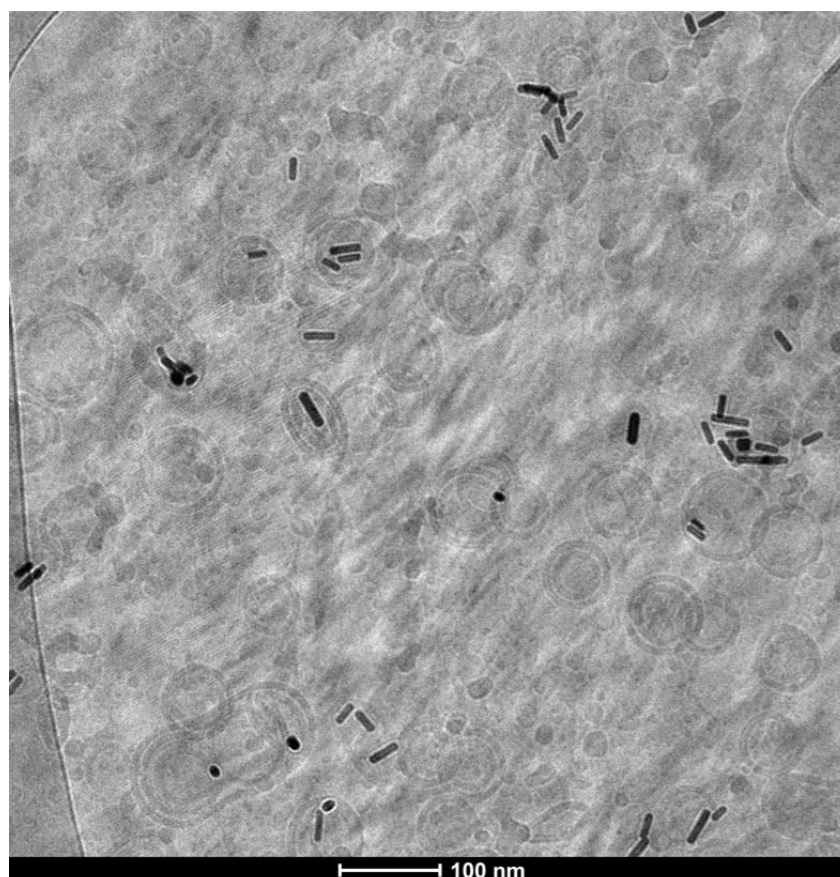


Figure 6-1 Image cryo-TEM de LNPs de nanobâtons de 20x5 nm encapsulés dans les LNPs. Les nanobâtons sont visibles en noir dans la couche de lipides extérieure.

Nous notons que certaines LNP ont un nanobâton encapsulé et qu'une grande partie n'en a aucun. Ceci s'explique par la méthode de préparation des LNPs. La concentration de nanobâtons qui a été utilisée était probablement trop faible mais permet tout de même de conclure qu'ils peuvent être encapsulés dans les LNPs. La formulation des LNPs utilisée est la même que celle utilisée avec les nanosphères de 5 nm. Les prochaines étapes pour cette piste de futur du projet sont de montrer qu'il est possible d'encapsuler efficacement des nanobâtons dans chacune des LNPs et qu'il est

aussi possible d'encapsuler de la DOX dans le cœur des liposomes, en même temps que les nanobâtons.

6.2 Passage au *in vivo*

Un autre problème pouvant survenir lors d'un potentiel passage à un modèle *in vivo* est la durée de l'expérience, notamment avec le laser nanoseconde. La vitesse de balayage est très faible et s'il faut rajouter une dimension en Z il faudrait une très grande durée pour traiter totalement une tumeur. Ce problème est lié au matériel disponible dans le laboratoire. Il serait possible d'effectuer un travail avec des durées d'irradiation plus courtes, en possédant un laser nanoseconde ayant un plus haut taux de répétition que 10Hz. Des lasers de ce type existant sur le marché peuvent aller jusqu'à des taux de l'ordre du kHz. L'utilisation d'un laser femtoseconde, comme celui disponible dans notre laboratoire, avec son taux de répétition plus élevé, est aussi une autre piste intéressante qui pourrait permettre de réduire significativement le temps de traitement. A titre d'exemple, pour balayer une zone d' 1 cm^3 avec le laser disponible, en considérant une taille de spot de $100\text{ }\mu\text{m}$, et un pas en Z de $p_z=160\text{ }\mu\text{m}$ (valeur expérimentale de la longueur de Rayleigh) pour un spot de $30\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre, cela donnerait, en faisant en sorte que chaque impulsion se touche spatialement, comme cela a été fait avec le laser nanoseconde : une vitesse de $V=10\text{ cm/s}$ et un pas de $p=100\text{ }\mu\text{m}$. Cela donne une durée pour balayer le volume d'un cube de côté $d=1\text{ cm}$, de $t=\frac{d}{V} \frac{d}{p} \frac{d}{p_z} = 10\text{ min } 25\text{ s}$. Cette durée est acceptable pour un traitement d'une tumeur, et pourrait encore être réduite en utilisant un spot de plus grand diamètre ou avec une longueur de Rayleigh plus grande.

Une autre piste d'étude serait d'utiliser une formulation de LNPs totalement différente qui serait thermosensible et qui présenterait peu de fuites, ce qui serait une grande amélioration de ce type de liposomes. Cela permettrait de passer à un traitement avec un laser continu irradiant à 527 nm , et ainsi, induire localement une élévation de température de quelques degrés, permettant ainsi un changement de phase des lipides et la livraison des médicaments. Un passage à un simple système de LED irradiant la zone souhaitée pourrait être étudié. Celui-ci serait alors très peu cher, et il serait possible d'en associer un nombre important pour pouvoir éviter ce problème de vitesse de balayage faible en irradiant plusieurs endroits avec différentes diodes par exemple. Pour réaliser ce type d'études, un nouveau système optique doit être conçu en premier lieu, pour permettre de faire des irradiations sur un type d'animal choisi comme des souris.

Pour ce type d'expériences, il faut aussi considérer le problème de la toxicité des nanoparticules d'or. En effet, lors des irradiations avec le laser nanoseconde, il est très probable que les nanoparticules d'or se fragmentent en nanoparticules de plus petite taille. Des nanoparticules de 5 nm ou moins peuvent alors être toxiques si elles sortent des LNPs et se retrouvent dans l'environnement cellulaire, ce qui pourrait être possible avec le laser nanoseconde. Dans le cas de cette étude *in vitro*, cette question est moins importante mais dans le cas d'une application dans le corps humain ou dans une application *in vivo*, il faudra se poser la question de savoir quels peuvent être les effets de la libération de nanoparticules d'or de petite taille après irradiation.

CHAPITRE 7 CONCLUSION

7.1 Résumé des travaux effectués

Au vu de la prévalence du cancer, le développement d'une méthode qui augmenterait significativement l'efficacité de la chimiothérapie serait une grande avancée. Le principe de livraison ciblée des médicaments est très prometteur, et pourrait permettre de réelles applications avec différents types de traitements comme de l'ARNm pour la thérapie génique ou des médicaments plus génériques. Le travail effectué dans le cadre de cette maîtrise a permis de développer une méthode de livraison de médicament depuis un système de nanoparticules lipidiques pouvant circuler dans le flux sanguin pendant un temps important. L'intégration des nanoparticules d'or de 5 nm de diamètre ainsi que de DOX dans le cœur des nanoparticules lipidiques, par une méthode de fabrication adaptable, montrant une bonne stabilité des lipides, est une première. Malgré le fait qu'il faille probablement apporter quelques modifications pour obtenir des résultats montrant peu de fuite de DOX, ces liposomes restent une bonne première étape vers la fabrication d'un système qui pourrait être appliqué *in vivo*. Après avoir caractérisé les nanoparticules qui ont été fournies par nos collaborateurs de UBC, il a été possible de mener une étude *in vitro* et d'utiliser directement les cellules comme moyen de vérification de la livraison de la DOX par irradiation laser. Il a été montré qu'il était possible de livrer les médicaments avec des impulsions nanosecondes, dans le domaine du visible, ou avec des impulsions femtosecondes, dans le domaine de l'infrarouge. Il a été observé que chaque nanoparticule devait recevoir une impulsion d'au moins 71 J/cm^2 pour induire une livraison efficace avec le laser nanoseconde. Cette fluence permet d'obtenir un effet de fragmentation des nanoparticules qui crée des trous dans la couche de lipides d'où le médicament peut s'échapper. Avec cet effet, il est possible d'obtenir une livraison des médicaments de presque 100%. La formation de nanobulles, à une fluence de 99 mJ/cm^2 , utilisée avec le laser femtoseconde, permet aussi de former des trous dans la couche lipidique et d'induire la livraison. Cette fois, plusieurs impulsions doivent être appliqués aux nanoparticules d'or pour induire une livraison efficace. L'efficacité de ce traitement est similaire à ce qui peut être obtenu avec le laser nanoseconde. Enfin, dans l'hypothèse d'une amélioration de la formulation des LNPs/AuNPs/DOX pour les rendre aussi stable que les LNPs/DOX, il a été possible de constater que l'utilisation d'un laser en combinaison des nanoparticules d'or permettrait

d'augmenter d'un facteur 10 la quantité de médicaments délivrée à la tumeur par rapport à une simple injection de LNPs/DOX dans le sang. A l'heure actuelle, ce facteur n'est que de 4 à cause de la quantité non négligeable de médicament libérée par fuites depuis les LNPs/AuNPs/DOX.

7.2 Futur du projet

Pour continuer le projet, différentes pistes sont possibles. Une étude plus approfondie des mécanismes mis en jeu avec le laser femtoseconde et le laser nanoseconde peut être intéressante. L'étude expérimentale avec le laser femtoseconde est encore incomplète et pourrait être étendue en modifiant les paramètres d'irradiation et de balayage.

L'amélioration de la qualité des LNPs représente une suite directe du projet. Le problème de fuite des LNPs présenté dans la section 4.2.3 a réussi à être contourné via l'étape de lavage, et celui-ci n'a pas posé de problèmes pour réussir à montrer l'effet de l'interaction laser-nanoparticules sur la livraison de médicaments. Cependant, pour un passage *in vivo*, il sera beaucoup plus difficile de régler ce problème et de pouvoir différencier l'effet du laser par rapport à l'effet de la fuite de DOX. Cela représente une grosse limitation des LNPs produites à l'heure actuelle. Pour éviter ce problème, une solution serait de changer la formulation pour essayer d'arriver à des LNPs plus stables dans l'environnement cellulaire. Cela permettrait d'obtenir de meilleurs résultats lors des irradiations et de s'affranchir de l'étape de lavage lors des études *in vitro*. Pour de futures études *in vivo*, cela assurerait que la DOX ne pourrait entrer dans les cellules lorsqu'il n'y a pas d'irradiation et donc de diminuer de possibles effets secondaires.

Une autre suite directe peut être effectuée en poussant l'étude vers le *in vivo* sur des souris ou continuer l'étude *in vitro* en utilisant cette fois, des tumeurs 3D et non des cellules attachées à un substrat. Ce type de tumeurs peut être formée en utilisant des plaques spéciales. Cela permettrait en premier temps, d'étudier la façon dont les nanoparticules lipidiques entrent dans les tumeurs. Puis, de s'intéresser à la possibilité de livrer des médicaments dans l'ensemble de la tumeur et non seulement aux cellules à la bordure de la tumeur. Ce type d'études a déjà été menée avec d'autres nanoparticules lipidiques et de la DOX [75].

Une poursuite du projet consiste en un nouveau projet envisagé qui prendrait comme base ce qui a été effectué ici. La méthode de traitement étudiée serait ici la thérapie génique. Cette méthode consiste à placer du matériel génétique dans des cellules pour soigner une maladie en remplaçant

un gène défectueux par exemple. Le nouveau projet s'intéresserait à la livraison de pARNi depuis des nanoparticules lipidiques dans l'œil. L'idée principale du projet serait donc identique à ce qui a été fait, à la différence que ce n'est plus la DOX qui serait livrée mais du pARNi. Celui-ci serait encapsulé dans le cœur aqueux des lipides et les nanoparticules d'or seraient encapsulés dans la couche de lipide autour du cœur. Ce projet aurait un champ d'application différent du traitement du cancer, et s'intéresserait donc au traitement de maladies oculaires.

RÉFÉRENCES

- [1] P. Cullis, ed, 2021.
- [2] "Société Canadienne du Cancer." <https://cancer.ca/fr/treatments/treatment-types> (accessed.
- [3] R. P. Gale. "Le manuel Merck." <https://www.merckmanuals.com/fr-ca/accueil/cancer/prévention-et-traitement-du-cancer/chirurgie-du-cancer> (accessed.
- [4] A. C. Society. "How surgery is used for Cancer." <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/surgery/how-surgery-is-used-for-cancer.html> (accessed.
- [5] Cancer.net. <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/radiation-therapy/understanding-radiation-therapy> (accessed.
- [6] A. C. Society, "A Guide to Radiation Therapy," 2015.
- [7] "National Cancer Institute." <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/maximum-tolerated-dose> (accessed.
- [8] L. V. Vasir JK, "Targeted drug delivery in cancer therapy.," *Technol Cancer Res Treat*, 2005.
- [9] K. Greish, "Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting," *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 624, pp. 25-37, 2010.
- [10] P. Rubin and G. Casarett, "Microcirculation of tumors. I. Anatomy, function, and necrosis," (in eng), *Clin Radiol*, vol. 17, no. 3, pp. 220-9, Jul 1966, doi: 10.1016/s0009-9260(66)80027-2.
- [11] P. Shubik, "Vascularization of tumors: a review," (in eng), *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 103, no. 3, pp. 211-26, 1982, doi: 10.1007/bf00409698.
- [12] R. K. Jain, "Transport of molecules across tumor vasculature," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 6, no. 4, pp. 559-593, 1987/12/01 1987, doi: 10.1007/BF00047468.
- [13] W. G. Roberts and G. E. Palade, "Neovasculature Induced by Vascular Endothelial Growth Factor Is Fenestrated," *Cancer Research*, vol. 57, no. 4, pp. 765-772, 1997. [Online]. Available: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/57/4/765.full.pdf>.
- [14] A. M. Jhaveri and V. P. Torchilin, "Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA," (in English), *Frontiers in Pharmacology*, Review vol. 5, no. 77, 2014-April-25 2014, doi: 10.3389/fphar.2014.00077.
- [15] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review," (in eng), *J Control Release*, vol. 65, no. 1-2, pp. 271-84, Mar 1 2000, doi: 10.1016/s0168-3659(99)00248-5.
- [16] F. M. Muggia, "Doxorubicin-polymer conjugates: further demonstration of the concept of enhanced permeability and retention," (in eng), *Clin Cancer Res*, vol. 5, no. 1, pp. 7-8, Jan 1999.

- [17] M. Rajabi and S. Mousa, "Lipid Nanoparticles and their Application in Nanomedicine," *Current pharmaceutical biotechnology*, vol. 17, 04/15 2016, doi: 10.2174/1389201017666160415155457.
- [18] G. A. Hussein, N. Y. Christensen Da Fau - Rapoport, W. G. Rapoport Ny Fau - Pitt, and W. G. Pitt, "Ultrasonic release of doxorubicin from Pluronic P105 micelles stabilized with an interpenetrating network of N,N-diethylacrylamide," (in eng), no. 0168-3659 (Print).
- [19] U. O. Häfeli, "Magnetically modulated therapeutic systems," (in eng), no. 0378-5173 (Print).
- [20] D. Studio. "NDLS/NPLS for benefits of Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect." <https://www.youtube.com/watch?v=RRLf9-xvAeg> (accessed).
- [21] A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, and G. Weissmann, "The diffusion of ions from a phospholipid model membrane system," (in eng), *Protoplasma*, vol. 63, no. 1, pp. 183-7, 1967.
- [22] D. Papahadjopoulos and J. C. Watkins, "Phospholipid model membranes. II. Permeability properties of hydrated liquid crystals," (in eng), *Biochim Biophys Acta*, vol. 135, no. 4, pp. 639-52, Sep 9 1967, doi: 10.1016/0005-2736(67)90095-8.
- [23] S. a. Z. Leung, Zhengbao and Teng, Weibing and Cohn, Celine and Dai, Zhifei and Wu, Xiaoyi, "Organic-Inorganic Nanovesicles for Doxorubicin Storage and Release," *Soft Matter*, vol. 8, pp. 5756-5764, 2012.
- [24] M. Y. Marzbali and A. Y. Khosroushahi, "Polymeric micelles as mighty nanocarriers for cancer gene therapy: a review," *Cancer chemotherapy and pharmacology*, vol. 79, no. 4, pp. 637-649, 2017.
- [25] M. Ghezzi *et al.*, "Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions," *Journal of Controlled Release*, vol. 332, pp. 312-336, 2021/04/10/ 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.02.031>.
- [26] F. R. De Bie, M. G. Davey, A. C. Larson, J. Deprest, and A. W. Flake, "Artificial placenta and womb technology: Past, current, and future challenges towards clinical translation," *Prenatal Diagnosis*, vol. 41, no. 1, pp. 145-158, 2021.
- [27] A. Gusev, A. Khokhlov, and E. Govorun, "Glossary of Nanotechnology and related terms." [Online]. Available: <https://eng.thesaurus.rusnano.com/wiki/article1199>.
- [28] L. D. Mayer *et al.*, "Influence of vesicle size, lipid composition, and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice," (in eng), *Cancer Res*, vol. 49, no. 21, pp. 5922-30, Nov 1 1989.
- [29] Y. Lee and D. H. Thompson, "Stimuli-responsive liposomes for drug delivery," (in eng), *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, vol. 9, no. 5, Sep 2017, doi: 10.1002/wnan.1450.
- [30] G. Bozzuto and A. Molinari, "Liposomes as nanomedical devices," (in eng), *Int J Nanomedicine*, vol. 10, pp. 975-99, 2015, doi: 10.2147/ijn.S68861.

- [31] J. A. Kulkarni, D. Witzigmann, S. Chen, P. R. Cullis, and R. van der Meel, "Lipid Nanoparticle Technology for Clinical Translation of siRNA Therapeutics," (in eng), *Acc Chem Res*, vol. 52, no. 9, pp. 2435-2444, Sep 17 2019, doi: 10.1021/acs.accounts.9b00368.
- [32] A. Akinc *et al.*, "The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs," (in eng), *Nat Nanotechnol*, vol. 14, no. 12, pp. 1084-1087, Dec 2019, doi: 10.1038/s41565-019-0591-y.
- [33] M. L. Brader, S. J. Williams, J. M. Banks, W. H. Hui, Z. H. Zhou, and L. Jin, "Encapsulation state of messenger RNA inside lipid nanoparticles," *Biophysical Journal*, vol. 120, no. 14, pp. 2766-2770, 2021/07/20/ 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.03.012>.
- [34] T. M. Allen and P. R. Cullis, "Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications," (in eng), *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 65, no. 1, pp. 36-48, Jan 2013, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.037.
- [35] Y. Eygeris, S. Patel, A. Jozic, and G. Sahay, "Deconvoluting lipid nanoparticle structure for messenger RNA delivery," *Nano letters*, vol. 20, no. 6, pp. 4543-4549, 2020.
- [36] CHMP, "Comirnaty - Assessment Report," 2020.
- [37] CHMP, "COVID-19 Vaccine Moderna - Assessment Report," 2021.
- [38] A. D. Bangham, M. M. Standish, and J. C. Watkins, "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids," (in eng), *J Mol Biol*, vol. 13, no. 1, pp. 238-52, Aug 1965, doi: 10.1016/s0022-2836(65)80093-6.
- [39] G. Kilian, "DEVELOPMENT AND TESTING OF LIPOSOME ENCAPSULATED CYCLIC DIPEPTIDES," 10/14 2021.
- [40] K. Khosravi, M. Mozafari, L. Rashidi, and M. Mohammadi, "Calcium Based Non-viral Gene Delivery: An Overview of Methodology and Applications," *Acta Medica Iranica*, vol. 48, pp. 133-141, 01/29 2010.
- [41] M. Al-Remawi, A. Elsayed, I. Maghrabi, M. Hamaidi, and N. Jaber, "Chitosan/lecithin liposomal nanovesicles as an oral insulin delivery system," (in eng), *Pharm Dev Technol*, vol. 22, no. 3, pp. 390-398, May 2017, doi: 10.1080/10837450.2016.1213745.
- [42] E. Veneti, R. S. Tu, and D. T. Auguste, "RGD-Targeted Liposome Binding and Uptake on Breast Cancer Cells Is Dependent on Elastin Linker Secondary Structure," (in eng), *Bioconj Chem*, vol. 27, no. 8, pp. 1813-21, Aug 17 2016, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00205.
- [43] E. M. Davidson, S. Haroutounian, L. Kagan, M. Naveh, A. Aharon, and Y. Ginosar, "A Novel Proliposomal Ropivacaine Oil: Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Studies After Subcutaneous Administration in Pigs," (in eng), *Anesth Analg*, vol. 122, no. 5, pp. 1663-72, May 2016, doi: 10.1213/ane.0000000000001200.
- [44] S. S. Nunes *et al.*, "Influence of PEG coating on the biodistribution and tumor accumulation of pH-sensitive liposomes," (in eng), *Drug Deliv Transl Res*, vol. 9, no. 1, pp. 123-130, 2019, doi: 10.1007/s13346-018-0583-8.
- [45] J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, and L. M. Ensign, "PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery," (in eng), *Advanced drug delivery reviews*, vol. 99, no. Pt A, pp. 28-51, 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.09.012.

- [46] S. Simões, V. Slepishkin, N. Düzgünes, and M. C. Pedroso de Lima, "On the mechanisms of internalization and intracellular delivery mediated by pH-sensitive liposomes," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1515, no. 1, pp. 23-37, 2001/11/01/ 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00389-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00389-3).
- [47] J. Li *et al.*, "A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems," *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 10, no. 2, pp. 81-98, 2015/04/01/ 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>.
- [48] M. B. Yatvin, J. N. Weinstein, W. H. Dennis, and R. Blumenthal, "Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia," (in eng), *Science*, vol. 202, no. 4374, pp. 1290-3, Dec 22 1978, doi: 10.1126/science.364652.
- [49] M. H. Gaber, K. Hong, S. K. Huang, and D. Papahadjopoulos, "Thermosensitive Sterically Stabilized Liposomes: Formulation and in Vitro Studies on Mechanism of Doxorubicin Release by Bovine Serum and Human Plasma," *Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 10, pp. 1407-1416, 1995/10/01 1995, doi: 10.1023/A:1016206631006.
- [50] T. a. P. Ta, Tyrone, "Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy," vol. 169, 2013.
- [51] C. Dhand, M. Prabhakaran, R. Beuerman, R. Lakshminarayanan, N. Dwivedi, and S. Ramakrishna, "Role of size of drug delivery carriers for pulmonary and intravenous administration with emphasis on cancer therapeutics and lung-targeted drug delivery," *RSC Adv.*, vol. 4, 07/25 2014, doi: 10.1039/C4RA02861A.
- [52] U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, and W. Khan, "Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review," (in eng), *Pharmaceutics*, vol. 9, no. 2, Mar 27 2017, doi: 10.3390/pharmaceutics9020012.
- [53] N. Chander *et al.*, "Optimized Photoactivatable Lipid Nanoparticles Enable Red Light Triggered Drug Release," *Small*, vol. 17, no. 21, p. 2008198, 2021, doi: <https://doi.org/10.1002/sml.202008198>.
- [54] K. Bolaños, M. J. Kogan, and E. Araya, "Capping gold nanoparticles with albumin to improve their biomedical properties," (in eng), *International journal of nanomedicine*, vol. 14, pp. 6387-6406, 2019, doi: 10.2147/IJN.S210992.
- [55] G. Ajnai, A. Chiu, T. Kan, C.-C. Cheng, T.-H. Tsai, and J. Chang, "Trends of Gold Nanoparticle-based Drug Delivery System in Cancer Therapy," *Journal of Experimental & Clinical Medicine*, vol. 6, no. 6, pp. 172-178, 2014/12/01/ 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jecm.2014.10.015>.
- [56] S. Patskovsky, E. Bergeron, D. Rioux, M. Simard, and M. Meunier, "Hyperspectral reflected light microscopy of plasmonic Au/Ag alloy nanoparticles incubated as multiplex chromatic biomarkers with cancer cells," *The Analyst*, vol. 139, pp. 5247-5253, 10/21 2014, doi: 10.1039/C4AN01063A.
- [57] V. Pustovalov, "Theoretical study of heating of spherical nanoparticle in media by short laser pulses," *Chemical Physics*, vol. 308, pp. 103-108, 01/10 2005, doi: 10.1016/j.chemphys.2004.08.005.

- [58] V. a. S. Pustovalov, Andrei and Zharov, Vladimir, "Photothermal and accompanied phenomena of selective nanophotothermolysis with gold nanoparticles and laser pulses," *Laser Physics Letters*, vol. 5, pp. 775 - 792, 2008.
- [59] G. Baffou, *Thermoplasmonics Heating Metal Nanoparticles Using Light*. 2017.
- [60] N. Nedyalkov *et al.*, "Interaction of gold nanoparticles with nanosecond laser pulses: Nanoparticle heating," *Applied Surface Science*, vol. 257, pp. 5456-5459, 2011.
- [61] Z. Qin and J. C. Bischof, "Thermophysical and biological responses of gold nanoparticle laser heating," *Chemical Society Reviews*, 10.1039/C1CS15184C vol. 41, no. 3, pp. 1191-1217, 2012, doi: 10.1039/C1CS15184C.
- [62] J. Dabrowski *et al.* *Coordination Chemistry Reviews* 325 (2016) 67–101.
- [63] E. Boulais, R. Lachaine, and M. Meunier, "Plasma mediated off-resonance plasmonic enhanced ultrafast laser-induced nanocavitation," (in eng), *Nano Lett*, vol. 12, no. 9, pp. 4763-9, Sep 12 2012, doi: 10.1021/nl302200w.
- [64] T. Lajunen *et al.*, "Light induced cytosolic drug delivery from liposomes with gold nanoparticles," *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, vol. 203, 02/18 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.02.028.
- [65] S. S. Knights-Mitchell and M. Romanowski, "Near-Infrared Activated Release of Doxorubicin from Plasmon Resonant Liposomes," (in eng), *Nanotheranostics*, vol. 2, no. 4, pp. 295-305, 2018, doi: 10.7150/ntno.22544.
- [66] M. Mathiyazhakan *et al.*, "Non-invasive controlled release from gold nanoparticle integrated photo-responsive liposomes through pulse laser induced microbubble cavitation," (in eng), *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 126, pp. 569-74, Feb 1 2015, doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.11.019.
- [67] S. Samimi, N. Maghsoudnia, R. B. Eftekhari, and F. Dorkoosh, "Chapter 3 - Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems," in *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*, S. S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R. K. Mishra, and S. Thomas Eds.: Elsevier, 2019, pp. 47-76.
- [68] N. M. Belliveau *et al.*, "Microfluidic Synthesis of Highly Potent Limit-size Lipid Nanoparticles for In Vivo Delivery of siRNA," (in eng), *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 1, no. 8, p. e37, Aug 14 2012, doi: 10.1038/mtna.2012.28.
- [69] A. K. Leung *et al.*, "Lipid Nanoparticles Containing siRNA Synthesized by Microfluidic Mixing Exhibit an Electron-Dense Nanostructured Core," (in eng), *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*, vol. 116, no. 34, pp. 18440-18450, Aug 30 2012, doi: 10.1021/jp303267y.
- [70] J. a. Z. Liang, Zhigao and Zhao, Hui and Wan, Shanhe and Zhai, Xiangming and Zhou, Jianwei and Liang, Rongliang and Deng, Qiaoting and Wu, Yingsong and Lin, Guanfeng, "Simple and rapid monitoring of doxorubicin using streptavidin-modified microparticle-based time-resolved fluorescence immunoassay," *RSC Advances*, vol. 8, pp. 15621-15631, 2018.
- [71] ATCC, "MDA-MB-231." [Online]. Available: <https://www.atcc.org/products/htb-26#>.

- [72] C. Darviot, "Thérapie laser assistée par nanoparticules plasmoniques du rétinoblastome," *Mémoire de maîtrise, Ecole Polytechnique de Montréal*, 2018.
- [73] N. Duzgunes and S. Nir, "Mechanisms and kinetics of liposome–cell interactions," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 40, pp. 3–18, 11/10 1999.
- [74] Z. Farhane, F. Bonnier, O. Howe, A. Casey, and H. J. Byrne, "Doxorubicin kinetics and effects on lung cancer cell lines using in vitro Raman micro-spectroscopy: binding signatures, drug resistance and DNA repair," (in eng), *J Biophotonics*, vol. 11, no. 1, Jan 2018, doi: 10.1002/jbio.201700060.
- [75] T. H. a. M. Kim, Christopher and Gombotz, Wayne and Pun, Suzie, "The delivery of doxorubicin to 3-D multicellular spheroids and tumors in a murine xenograft model using tumor-penetrating triblock polymeric micelles," *Biomaterials*, 2010.