



HAL
open science

Comportement des nanoparticules de silice en milieu biologique : des cellules aux biomatériaux

Sandrine Quignard

► **To cite this version:**

Sandrine Quignard. Comportement des nanoparticules de silice en milieu biologique : des cellules aux biomatériaux. Matériaux. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66271 . tel-00836093

HAL Id: tel-00836093

<https://theses.hal.science/tel-00836093v1>

Submitted on 20 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Chimie

(Ecole doctorale Physique et Chimie des matériaux)

Présentée par

Mlle Sandrine Quignard

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Comportement des nanoparticules de silice en milieu
biologique : des cellules aux biomatériaux**

soutenue le 12 Juillet 2012

devant le jury composé de : (préciser la qualité de chacun des membres).

Mme. Marie-Hélène Delville	Directeur de Recherche	Rapporteur
M. Olivier Spalla	Directeur de Recherche	Rapporteur
Mme. Sophie Cribier	Professeur	Examineur
Mme. Christine Vauthier	Directeur de Recherche	Examineur
M. Michel Boissière	Maître de Conférences	Examineur
M. Thibaud Coradin	Directeur de Recherche	Directeur de thèse

Remerciements

Cette étude a été réalisée au Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris, je tiens à remercier Clément Sanchez de m'avoir accueilli pour préparer cette thèse, et bien avant cela pour effectuer deux stages au laboratoire.

Je voudrais également remercier Thibaud Coradin pour m'avoir accueillie pour mon stage de M2 dans l'équipe, permis de développer ce sujet à l'interface entre les compétences chimiques et biologiques de l'équipe et fait confiance pour poursuivre avec cette thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement l'ensemble de l'équipe du bâtiment F avec qui j'ai passé ces trois années et demi dans les meilleures conditions. Merci à Anny Anglo pour les discussions autour d'un thé et pour avoir coupé et recoupé des blocs dans l'espoir de voir des cellules. Merci à Gervaise Mösser pour toutes ces heures sur le MET à observer des coupes parfois plus artistiques qu'autre chose et chercher inlassablement des cellules qui n'ont pas voulu se montrer. Merci aux deux Christophe, Hélyary et Depagne, l'un pour avoir appris quelques notions de biologie et de culture cellulaire à une chimiste, l'autre pour son aide sur de nombreux appareils et pour sa compagnie au déjeuner pendant près de deux ans, et à Carole Aimé. Merci à Corinne Illoul pour son aide en histologie.

Merci à l'ensemble de thésards et post-doc que j'ai eu l'opportunité de côtoyer pendant plus ou moins longtemps : Martín Desimone et Guillermo Copello avec qui j'ai pu collaborer sur l'étude des matériaux hybrides et partager le bureau quelques temps, Paolo Peixoto, Jiang Yu Wu qui nous a fait réviser la grammaire française à la pause café du vendredi matin, Jérémie Silvent pour les nombreuses B.O. qui ont sonorisé le bureau ; Yan Wang, Benjamin Le Ouay et ces expériences de boissons asiatiques et Marine Blondeau, même s'ils n'étaient là que par intermittence.

Merci aussi aux personnes du Collège. Je ne peux que remercier Guillaume Laurent et Sylvie Masse pour les heures qu'ils ont passées à dépouiller les résultats des expériences RMN. Merci à Isabelle Génois pour le nombre de fois où elle m'a allumé ou éteint le chauffage pour mes expériences BET. Merci aussi à Corinne Pozzo Di Borgo pour avoir passer les commandes même en urgence, à Hélène Gervais, Patricia Maillot et Hélène Helgrishi. Merci

enfin à l'ensemble des membres du laboratoire avec qui j'ai pu interagir, d'une façon ou d'une autre.

Un grand merci à Michel Boissière pour les photos en microscopie confocale et m'avoir permis de faire les tests de génotoxicité à Cergy, merci aussi à Meriem Gaceur qui a essayé les platres de la manip avant moi et m'a donné les clés pour réussir ce test du premier coup.

Enfin, je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail.

« Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées...Telle est bien la beauté et la noblesse de la science : désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue... »

Marie Curie

Sommaire

INTRODUCTION	11
CHAPITRE 1: INTERACTIONS DES PARTICULES DE SILICE AVEC LE VIVANT	15
1.1 CONSIDERATIONS GENERALES SUR L'EXPOSITION AUX NANOPARTICULES	16
1.1.1 Utilisation actuelle des nanoparticules	16
1.1.2 Etudes actuelles de développement pour le domaine médical	17
1.1.3 Cas de l'exposition cutanée	22
1.2 COMPORTEMENT DES NANOPARTICULES DE SILICE DANS DES SYSTEMES VIVANTS	30
1.2.1 Les nanoparticules de silice en milieu biologique	31
1.2.2 Les nanoparticules de silice <i>in vitro</i>	36
1.2.3 Comportement des nanoparticules de silice <i>in vivo</i>	51
1.3 BILAN ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	54
CHAPITRE 2: CARACTERISATION DES NANOPARTICULES	57
2.1 MORPHOLOGIE ET TAILLE DES NANOPARTICULES SYNTHETISEES	59
2.2 STRUCTURE	64
2.2.1 Charge de surface	64
2.2.2 Greffage du fluorophore	66
2.2.3 Composition	67
2.2.4 Porosité et surface spécifique	68
2.2.5 Bilan sur la structure des particules	70
2.3 STABILITE EN MILIEU BIOLOGIQUE	71
2.3.1 Influence de la taille des particules et de leur charge de surface	72
2.3.2 Influence des ponts disulfures	77
2.4 CONCLUSIONS	80
CHAPITRE 3: INTERACTIONS DES NANOPARTICULES AVEC LES CELLULES	81
3.1 ETUDE DE L'EXPOSITION A TEMPS COURTS (24 H)	83
3.1.1 Internalisation des nanoparticules	83
3.1.2 Toxicité des nanoparticules	90
3.1.3 Bilan des interactions des nanoparticules avec les cellules à temps court	94
3.2 ETUDE DE L'EXPOSITION SUR UNE SEMAINE	95
3.2.1 Localisation intracellulaire des particules et cinétique d'internalisation	95
3.2.2 Viabilité cellulaire	97
3.2.3 Bilan sur l'exposition des particules jusqu'à 7 jours	99
3.3 DEVENIR A LONG TERME DES PARTICULES INTERNALISEES	100
3.3.1 Toxicité des particules à long terme	101
3.3.2 Observation des particules internalisées	102
3.3.3 Exocytose des particules ou dissolution intracellulaire ?	104
3.3.5 Bilan	106
3.4 CONCLUSIONS	107

CHAPITRE 4: DIFFUSION DES NANOPARTICULES DE SILICE DANS UN HYDROGEL DE COLLAGENE **109**

4.1 PRESENTATION DU SYSTEME D'ETUDE	110
4.1.1 Le matériau modèle du derme	110
4.1.2 Le système de diffusion	112
4.1.3 Le modèle de diffusion	113
4.1.4 Description d'une courbe type de diffusion et des paramètres résultant de son analyse	115
4.2 INFLUENCE DE DIFFERENTS PARAMETRES	116
4.2.1 Quelle est l'influence de la taille et de la charge de surface des nanoparticules?	116
4.2.2 Influence de la concentration en collagène et de la structure du gel sur la diffusion	123
4.2.3 Quel(s) rôle(s) jouent les cellules?	128
4.2.4 Bilan sur l'influence de différents paramètres sur la diffusion	138
4.3 ETUDE DES MATERIAUX COMPOSITES COLLAGENE-SILICE	140
4.3.1 Formation des matériaux	141
4.3.2 Etude de l'adhésion / prolifération de fibroblastes sur ces matériaux	141
4.3.3 Bilan sur les matériaux composites collagène-silice	146
4.4 CONCLUSIONS SUR LA DIFFUSION DE NANOPARTICULES DE SILICE DANS DES HYDROGELS DE COLLAGENE	147

CHAPITRE 5: NANOPARTICULES DE SILICE POUR LA LIBERATION INTRACELLULAIRE DE PRINCIPES ACTIFS **149**

5.1 ETUDE DE LA STRUCTURE DES PARTICULES N%SS PAR RMN DU SOLIDE	151
5.1.1 Condensation, intégrité du disulfure et mobilité des espèces : résultats des expériences de polarisation croisée	151
5.1.2 Répartition des silanes dans les particules : expériences de corrélation hétéronucléaire	155
5.1.3 Bilan sur la structure des particules	157
5.2 COMPORTEMENT DES NANOPARTICULES EN ENVIRONNEMENT CELLULAIRE MIME	157
5.2.1 Influence d'un pH acide sur la dissolution	157
5.2.2 Influence de l'environnement reducteur	158
5.2.3 Bilan	161
5.3 INTERNALISATION DES NANOPARTICULES ET TOXICITE	161
5.3.1 Internalisation et localisation intracellulaire	161
5.3.2 Toxicité des particules n%SS	166
5.3.3 Exocytose et dissolution intracellulaire	167
5.3.4 Bilan sur l'interaction des particules avec les cellules	170
5.4 LIBERATION D'UN MARQUEUR FLUORESCENT	171
5.4.1 Caractérisation des particules incorporant le marqueur Hoechst 33258	171
5.4.2 Libération du marqueur Hoechst 33258 des particules de silice	172
5.4.3 Influence des ponts disulfures sur la libération	174
5.4.4 Bilan sur l'utilisation des particules de silice pour la libération de molécules encapsulées	176
5.5 CONCLUSIONS SUR LES PARTICULES N%SS ET LEUR APPLICATION POUR LA LIBERATION DE PRINCIPES ACTIFS	176

CHAPITRE 6: PROTOCOLES EXPERIMENTAUX **179**

6.1 SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES DE SILICE	180
6.1.1 Synthèse	180
6.1.2 Caractérisation des nanoparticules synthétisées	183

6.2 COMPORTEMENT DES PARTICULES EN MILIEU BIOLOGIQUE	188
6.2.1 Dissolution en milieu tampon pH 7,4	188
6.2.2 Dissolution en milieu de culture	189
6.2.3 Interactions avec les cellules	189
6.3 DIFFUSION DES PARTICULES DANS DES HYDROGELS DE COLLAGENE	197
6.3.1 Formation des gels de collagène	197
6.3.2 Suivi de la diffusion et dissolution	202
6.3.3 Interactions avec les cellules : internalisation et toxicité	204
6.3.4 Etude de gels composites	206
6.4 ETUDE DES NANOPARTICULES INCORPORANT LES PONTS DISULFURES	207
6.4.1 Influence du pH sur la dissolution	207
6.4.2 Comportement en présence de réducteurs : réaction avec le DTT	207
6.4.3 Interactions avec les cellules : endocytose – exocytose	208
6.4.4 Libération d'une molécule encapsulée	208
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	211
<hr/>	
BIBLIOGRAPHIE	217
<hr/>	
Liste des abréviations	231
<hr/>	
TABLE DES FIGURES	233
<hr/>	
Liste des tableaux	239
<hr/>	
ANNEXES	241
<hr/>	

Introduction

Les nanosciences et nanotechnologies, qui promettent des progrès remarquables dans de nombreux domaines comme la santé, les biotechnologies, l'énergie, l'électronique ou les technologies de l'information, font l'objet depuis quelques années d'un intérêt croissant, comme en témoignent les nombreux moyens humains et financiers mis en œuvre pour leur développement. Ce domaine de la science s'intéresse aux nano-objets (dont une dimension est inférieure à 100 nm) sous plusieurs aspects : synthèse, observation, manipulation, assemblage, étude et exploitation des phénomènes apparaissant à l'échelle nanométrique ou encore compréhension des interactions développées à cette échelle.

Parmi les nano-objets les plus étudiés, on trouve des nanoparticules de nombreux matériaux comme l'or, la silice, les oxydes métalliques (par exemple TiO_2) et les semi-conducteurs (par exemple ZnS , CdSe) pour les cristaux quantiques. Un des intérêts de ces nanoparticules est la possibilité de contrôler la forme, la taille, la composition lors de la synthèse et de modifier la surface pour les fonctionnaliser. De plus la dimension même des nanoparticules et la diversité de nanoparticules synthétisables en font des candidats intéressants pour les applications en bioanalyse et médecine. La silice est largement envisagée pour ces applications puisqu'elle est biocompatible, du moins en formulation macroscopique, et inerte. De plus, la synthèse et la fonctionnalisation des nanoparticules de silice par des sondes, des gènes ou des protéines, sont relativement faciles à mettre en œuvre. Enfin, la silice est déjà utilisée dans le domaine médical, d'où l'intérêt de développer de tels objets.

Les nombreuses applications actuelles ou envisagées des nanoparticules de silice soulèvent cependant plusieurs questions importantes. Afin de développer l'utilisation des nanoparticules de silice dans le domaine bio-médical, il est notamment important de connaître leur comportement en conditions physiologiques et en présence de cellules : stabilité, toxicité... De plus, comprendre dans quelle mesure le contrôle des caractéristiques des particules permet de modifier leur comportement permettra d'optimiser les nanoparticules par rapport aux applications envisagées.

L'objectif de ce travail de doctorat est d'évaluer le comportement en milieu biologique des nanoparticules de silice. Pour ce faire, l'étude a été menée à différents niveaux. Tout d'abord, des nanoparticules de silice, de différentes tailles et charges, ont été caractérisées en milieu biologiques : en particulier leur stabilité colloïdale et leur dissolution ont été étudiées en tampon à pH 7 et en milieu de culture contenant des protéines. Ensuite, des fibroblastes ont été exposés à ces particules afin de déterminer les interactions développées entre les cellules et les particules de silice et leurs conséquences à la fois sur l'activité cellulaire et le devenir des colloïdes. L'influence de l'environnement des cellules sur ces interactions a été étudiée en observant la diffusion de nanoparticules de silice dans un gel de collagène dans lequel des fibroblastes ont été immobilisés et en caractérisant cette diffusion. Enfin, l'influence de la structure des particules sur leur comportement a été étudiée en introduisant des ponts disulfures, susceptibles d'être réduits de façon intracellulaire, dans la structure des particules.

Chapitre 1

Interactions des particules de silice avec le vivant

1.1 CONSIDERATIONS GENERALES SUR L'EXPOSITION AUX NANOPARTICULES	16
1.2 COMPORTEMENT DES NANOPARTICULES DE SILICE DANS DES SYSTEMES VIVANTS	30
1.3 BILAN ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	54

Depuis le début du siècle l'utilisation des nanoparticules s'est développée avec des applications possibles dans de nombreux domaines comme l'énergie, les matériaux ou encore le domaine médical et pharmaceutique. La silice, grâce à la grande facilité et l'adaptabilité de synthèse des particules et à son inertie biologique à l'état macroscopique, est très largement étudiée pour des applications médicales. Par ailleurs, les nanoparticules de silice sont déjà présentes dans de nombreux produits de la vie quotidienne (cosmétiques, aliments...).

Dans ce chapitre seront tout d'abord rappelées quelques-unes des applications des nanoparticules de silice et les questions soulevées. Le comportement de ces nanoparticules en milieu biologique sera ensuite abordé. Enfin, nous présenterons les éléments connus concernant les mécanismes d'internalisation, la toxicité ainsi que le devenir des nanoparticules.

1.1 Considérations générales sur l'exposition aux nanoparticules

1.1.1 UTILISATION ACTUELLE DES NANOPARTICULES

1.1.1.1 Domaines d'application des nanoparticules

Ces dernières années ont vu l'essor des nanotechnologies et des nanosciences dans de nombreux domaines tels que l'électronique, les produits cosmétiques, les technologies de l'information, la catalyse ou encore les biotechnologies. Ainsi observe-t-on une utilisation de plus en plus importante des nanoparticules, i.e. des particules de 1 à 100 nm. Cette limite de taille induit des propriétés qui peuvent, dans certains cas, être différentes de celles du matériau à l'échelle macroscopique : propriétés magnétiques, optiques, mécaniques, catalytiques ou biologiques qui font en partie l'intérêt de ces nano-objets. En particulier, les nanotechnologies représentent un grand espoir dans les domaines de la santé, où ces nanomatériaux sont utilisés comme marqueurs biologiques pour la recherche et le diagnostic, comme vecteurs d'administration de médicaments ou comme milieux de contraste pour l'imagerie médicale.

1.1.1.2 Utilisation des nanoparticules de silice

- Exposition accidentelle

Les nanoparticules de silice sont utilisées dans de nombreuses applications : agent épaississant (ajouté dans les résines, les encres, les élastomères,...), additif alimentaire,

produits cosmétiques ou pharmacologiques, électronique, textile... Du fait de ces nombreuses applications, en 2000, la consommation européenne de colloïdes de silice amorphe représentait 13 kt (ECETOC JACC No 51, 2006). Lors de la production et l'utilisation de ces colloïdes, une partie peut être émise dans l'environnement. Ainsi, a-t-il été estimé qu'environ 4 600 tonnes de silice colloïdales par an ont été émises dans l'environnement aquatique lors de leur utilisation en Europe entre 1996 et 2000. La présence de ces particules dans l'environnement et la quantité produite impliquent de connaître les risques associés à une exposition accidentelle.

- La silice avec un rôle "biologique" passif : exemple de la cosmétique

Les particules de silice sont depuis longtemps utilisées dans les formulations cosmétiques pour améliorer les propriétés rhéologiques des émulsions ainsi que le confort d'utilisation. Parmi les particules utilisées, on peut citer le produit Ronasphere[®] constitué de particules de silice entre 50 nm et 3 µm de diamètre ou Micronasphere M qui allie des nanoparticules de silice à des plaques de mica et est utilisé comme base des produits de maquillage minéraux. Les particules de silice utilisées peuvent aussi être entourées d'une couche d'un autre oxyde (majoritairement du dioxyde de titane ou des oxydes de fer) pour améliorer le confort sur la peau ainsi que l'absorption de pigments (Anselmann 2001).

Le problème qui est alors soulevé est de savoir si la peau ainsi soumise à une exposition chronique est une barrière efficace ou si les nanoparticules de silice sont capables de traverser la peau et d'accéder à la circulation systémique. Par ailleurs, les résultats d'une étude du comportement des nanoparticules dans la peau permettraient d'optimiser des systèmes de délivrance de médicaments par voie cutanée.

1.1.2 ETUDES ACTUELLES DE DEVELOPPEMENT POUR LE DOMAINE MEDICAL

1.1.2.1 Exploitation des nanoparticules dans le domaine médical

Le développement des nanotechnologies présente de nombreuses applications prometteuses dans le domaine médical (Shi 2012, Shi 2010, Xu 2006, Hughes 2005). Ainsi l'utilisation de nanoparticules comme vecteur de principes actifs (particules inorganiques, polymères, dendrimères) permet-elle d'améliorer l'efficacité thérapeutique de certains principes actifs tout en minimisant les effets secondaires liés à une libération prématurée et en protégeant le

principe actif. De plus, l'incorporation du principe actif dans une particule permet une délivrance ciblée, par exemple dans les cellules cancéreuses (Gu 2007), et éviterait ainsi des thérapies lourdes. Enfin, l'utilisation de nanoparticules permet une libération intracellulaire du principe actif (Faraji 2009) et peut permettre de franchir des barrières biologiques.

Par ailleurs, les nanoparticules peuvent servir à développer des détecteurs rapides et sensibles pour la détection de virus, de marqueurs de certaines maladies ou encore de tumeurs. Ces objets, grâce à leur taille, peuvent aussi permettre d'optimiser l'imagerie *in vivo* en fournissant des sondes plus petites, moins invasives et plus sensibles (particules magnétiques, quantum dots, nanotubes de carbone...).

De plus, ces nanomatériaux peuvent avoir des propriétés thérapeutiques et être directement utilisés pour certains traitements ; des nanoparticules d'or ou magnétiques peuvent induire de l'hyperthermie utilisée pour tuer des cellules cancéreuses, les nanoparticules d'argent cristallines peuvent servir d'antibactérien.

Enfin, le développement de biomatériaux bénéficie aussi de l'essor des nanotechnologies, par exemple par la nanostructuration des surfaces des implants pour une meilleure biocompatibilité ou l'optimisation des propriétés mécaniques dans des matériaux composites.

1.1.2.2 La silice ayant un rôle "biologique" actif

Concernant les applications médicales, les nanoparticules de silice sont actuellement étudiées pour leurs applications en imagerie mais aussi en thérapie en les utilisant comme agent de vectorisation. En particulier la grande diversité de la chimie des silanes fait des nanoparticules de silice un candidat prometteur pour une délivrance ciblée, voire intracellulaire contrôlée.

- Imagerie

Les nanoparticules de silice peuvent être utilisées pour développer des sondes d'imagerie nanométriques dans lesquelles l'agent de contraste est protégé de l'environnement par la matrice de silice.

De nombreuses études ont été réalisées sur l'incorporation de fluorophores organiques dans des nanoparticules de silice pour marquer et imager des cellules (Kumar 2008, Wang 2006, Tan 2004). L'encapsulation du fluorophore dans une matrice de silice permet d'augmenter l'intensité de fluorescence et la stabilité du signal de fluorescence. Par ailleurs, la taille nanométrique de ces sondes permet leur internalisation dans des cellules cibles. Ces particules peuvent ensuite être utilisées pour explorer les phénomènes d'interactions intra et

intercellulaires en greffant des groupements en surface permettant de cibler la zone visée. Ces particules peuvent aussi servir à marquer des tissus *in vivo* (Santra 2004).

Par ailleurs, les particules de silice sont aussi étudiées pour développer des agents de contraste pour l'IRM (Pinho 2012, Taylor-Pashow 2010, Voisin 2007). L'utilisation de nanoparticules présente des avantages par rapport à l'agent de contraste seul, notamment en améliorant les propriétés de relaxation, qui en font de meilleurs agents de contraste *in vivo*. Par ailleurs, il est possible d'avoir un nombre important d'atomes, de gadolinium par exemple, par particule, ce qui permet d'avoir un signal plus fort lors de l'imagerie et améliore donc la sensibilité (Santra 2005). Enfin, l'utilisation de particules permet un ciblage, par greffage de groupements spécifiques en surface, pour avoir une sonde d'imagerie plus précise.

- Photothérapie dynamique

Ces dernières années ont vu le développement de la thérapie photodynamique en remplacement de la radio ou chimiothérapie, pour des traitements notamment contre le cancer. Cette technique est basée sur l'accumulation de molécules photosensibles dans les cellules. Sous l'action d'un rayonnement, ces molécules permettent la formation d'oxygène singulet, espèce cytotoxique qui provoque l'apoptose ou la nécrose des cellules par stress oxydant. Les nanoparticules de silice sont des candidats prometteurs pour l'encapsulation de molécules photosensibles en raison de la diversité des synthèses permettant d'encapsuler un grand nombre de molécules, de la stabilité de la matrice de silice et de la possibilité de fonctionnaliser les particules (Couleaud 2010).

- Système de libération contrôlée

Pour servir de système de libération de principes actifs, les nanoparticules de silice doivent pouvoir incorporer ces molécules dans des conditions compatibles avec leur éventuelle fragilité. Dans le cas de la silice, il existe différentes façons d'intégrer un principe actif : l'encapsulation, le greffage en surface, ou encore la formation de particules mésoporeuses ou de capsules de silice.

L'encapsulation de molécules fonctionnelles dépend de leur propriété hydrophilie/hydrophobie. En effet, il est facile d'intégrer des molécules hydrophiles dans la matrice de silice par des interactions non-covalentes lors de la synthèse par voie Stöber ou par émulsion (Barbé 2004, Finnie 2006). Par contre lorsque la molécule à encapsuler est hydrophobe, il est nécessaire d'utiliser des particules comportant un organosilane. Lors de la

synthèse, la molécule à encapsuler est placée en phase organique avant d'initier l'hydrolyse-condensation du précurseur de silice dans une voie par émulsion (Kim 2007).

Il est aussi possible d'utiliser les particules de silice pour attacher en surface les molécules d'intérêt via différentes fonctionnalisations. Les molécules peuvent être simplement adsorbées, avec le risque d'une libération anticipée, ou liées de façon covalente à la surface de la silice (Wang 2006). La variété des groupements silanes disponibles permet d'avoir en surface des particules la fonction la plus appropriée pour greffer la biomolécule d'intérêt : une fonction acide carboxylique pour greffer des protéines ou des molécules possédant une fonction amine, thiol pour réagir avec un oligonucléotide possédant un pont disulfure ou encore amine qui permet le greffage via des isothiocyanates.

Par ailleurs, la formation de particules mésoporeuses permet d'encapsuler le principe actif dans les pores des particules. Ces particules sont particulièrement étudiées (Vallet-Regi 2006, Lu 2007), en partie à cause de leur modularité, de la facilité d'encapsulation des molécules, de la quantité de molécules par particules (jusqu'à quelques centaines de milligrammes par gramme de particules) et de la possibilité d'intégrer un système de "portes" contrôlant l'ouverture des pores (Slowing 2008).

Enfin, les capsules ("sphères creuses") de silice ont aussi été étudiées pour la libération de principes actifs (Chen 2004, Li 2004). Elles présentent une capacité plus importante que les particules de silice pleines mais le contrôle de la libération dans ces systèmes est plus délicat.

- Ciblage et contrôle de la libération

Quel que soit le type de particule de silice choisi pour l'application comme vecteur de principes actifs, la recherche actuelle vise à développer des particules capables de cibler spécifiquement leur lieu d'action et de ne libérer la molécule active qu'une fois à destination. Pour parvenir à ce résultat, la chimie de la silice est mise à contribution pour fonctionnaliser la surface des particules. Les groupements placés en surface peuvent être des polymères protecteurs (Fuller 2008, Maileander 2009) permettant d'éviter une élimination prématurée des particules avant qu'elles n'atteignent leur cible, des "clapets" s'ouvrant sous l'action d'un stimulus défini pour contrôler la libération (Cauda 2010, Kim 2010, Slowing 2008), des fragments reconnaissables par la cellule pour cibler l'action des particules (Rosenholm 2009, Lu 2010), des peptides permettant la pénétration des particules dans les cellules (Santra 2004, Mao 2010), ou encore des ligands favorisant l'évasion des particules des endosomes en vue d'une libération intracellulaire (Vivero-Escoto 2010).

- *Ciblage*

Développer un système ciblant spécifiquement la zone à traiter est l'un des enjeux de la recherche biomédicale à l'heure actuelle. Ces systèmes portent essentiellement sur la reconnaissance spécifique de certains récepteurs. Pour cela, la surface des particules de silice peut être habillée d'anticorps, de peptides ou de ligands spécifiques. Par exemple, les cellules cancéreuses possèdent des récepteurs folate en nombre bien plus important que les cellules saines. Pour traiter spécifiquement ces cellules, on peut greffer en surface des particules de l'acide folique, reconnu par les récepteurs. On observe ainsi que le nombre de particules internalisées dans les cellules cancéreuses est bien plus important que celui observé dans les cellules saines (Rosenholm 2009). Cependant, il ne suffit pas de cibler la zone à traiter, il faut qu'une fois arrivées à destination les particules puissent libérer leur charge thérapeutique.

- *Contrôle de la libération*

Le contrôle de la libération permet non seulement d'éviter une perte des molécules actives avant d'atteindre la zone à traiter, mais aussi de moduler le profil pharmacocinétique. Il existe différentes stratégies pour contrôler la libération de principes actifs encapsulés dans des nanoparticules. Lors de leur internalisation, les particules se retrouvent en général dans des endosomes et éventuellement dans des lysosomes. Ces vésicules possèdent différentes caractéristiques qui peuvent être exploitées pour contrôler la libération de principes actifs des vecteurs nanométriques. L'une de ces caractéristiques est le pH acide rencontré dans ces vésicules, l'autre la présence d'enzymes capables de réduire des ponts disulfures. Cette approche a été étudiée pour formuler des vecteurs pharmaceutiques dans lesquels le principe actif est soit greffé au vecteur par une fonction disulfure (Yan 2010) soit encapsulé dans le vecteur avec une "porte" s'ouvrant par réduction d'un pont disulfure (Kim 2010, Slowing 2008, Lai 2003). Dans ces deux cas, le principe actif n'est pas libéré prématurément dans l'organisme mais uniquement après internalisation du vecteur thérapeutique.

- Particules multifonctionnelles

Les différentes fonctionnalités présentées ci-dessus peuvent être réunies dans une même particule, permettant ainsi d'avoir une particule, outil d'imagerie, capable de cibler spécifiquement un type de cellule et de libérer un principe actif de façon intracellulaire (Cheng 2010, Burns 2006). Cheng *et al.* décrivent par exemple la tri-fonctionnalisation de particules de silice mésoporeuses pour le traitement de cellules cancéreuses. Ces particules

contiennent un agent de contraste inclus dans la matrice de silice formant la structure de la particule. L'intérieur des pores est fonctionnalisé pour permettre le greffage d'un agent photosensible utilisé pour de la thérapie photodynamique. Enfin, la surface extérieure des particules est fonctionnalisée en y greffant un peptide qui permet le ciblage spécifique des tumeurs.

1.1.3 CAS DE L'EXPOSITION CUTANEE

La production importante de nanoparticules de silice et leur utilisation dans de nombreux produits de la vie quotidienne posent le problème de l'exposition involontaire à ces nanomatériaux (ECETOC JACC No.51). Les trois voies d'accès principales à l'organisme sont la voie respiratoire, digestive et cutanée. Seule l'exposition par voie cutanée sera développée dans la suite, importante pour comprendre l'impact de l'utilisation de nanoparticules de silice dans des produits cosmétiques ou dans des gels pour la délivrance de médicaments par voie cutanée.

1.1.3.1 Structure de la peau

La peau est un organe complexe qui forme une barrière de protection vis-à-vis de l'environnement extérieur. Elle est constituée de trois tissus superposés : l'hypoderme, le derme et l'épiderme (figure 1.1). Elle recouvre entièrement le corps et possède de multiples fonctions. Outre sa fonction de protection qui empêche la pénétration dans l'organisme de micro-organismes et limite l'entrée de produits toxiques, la peau a aussi de nombreux autres rôles : elle intervient dans la thermorégulation, la perception et possède des fonctions immunologiques et métaboliques. Dans cette description, l'accent sera mis sur la composante dermique, modélisée pour cette étude.

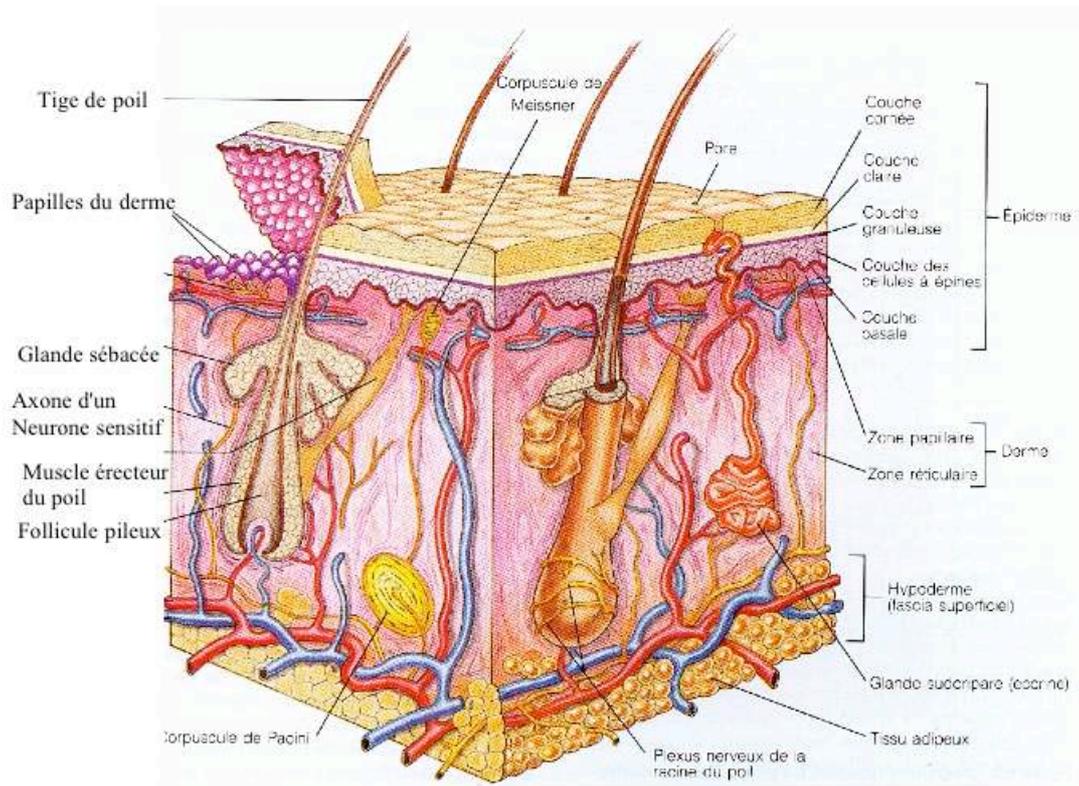


Figure 1-1 : Structure de la peau (Marieb 1993)

- Le derme

Le derme est un tissu conjonctif dense, compressible et élastique. Son épaisseur est variable selon les régions du corps entre 1 et 2 mm. Il a un rôle nutritif vis-à-vis de l'épiderme avec la diffusion vers ce dernier de nutriments. Le derme est constitué de structures fibreuses et d'une matrice extracellulaire dans laquelle se trouvent des fibroblastes (cellules caractéristiques des tissus conjonctifs). Les structures fibreuses sont constituées principalement de collagènes, majoritairement du collagène de type I, III et V, et de fibres élastiques d'élastine. Le collagène de type I est synthétisé par les fibroblastes sous la forme d'un précurseur soluble en milieu physiologique. Les domaines terminaux de ce précurseur sont clivés par voie enzymatique (peptidases) pour donner le collagène qui, lui, n'est pas soluble dans les conditions physiologiques et va s'auto-assembler en fibrilles.

- Le collagène

Le collagène a une structure hélicoïdale rigide triple-brin (environ 1,5 nm de diamètre et 300 nm de longueur). Les molécules de collagène s'auto-organisent en formant des fibrilles (50 à 200 nm de diamètre) (figure 1.2) qui s'assemblent en faisceaux de plusieurs micromètres de diamètre. Les fibres de collagène permettent de stocker les forces de tension.

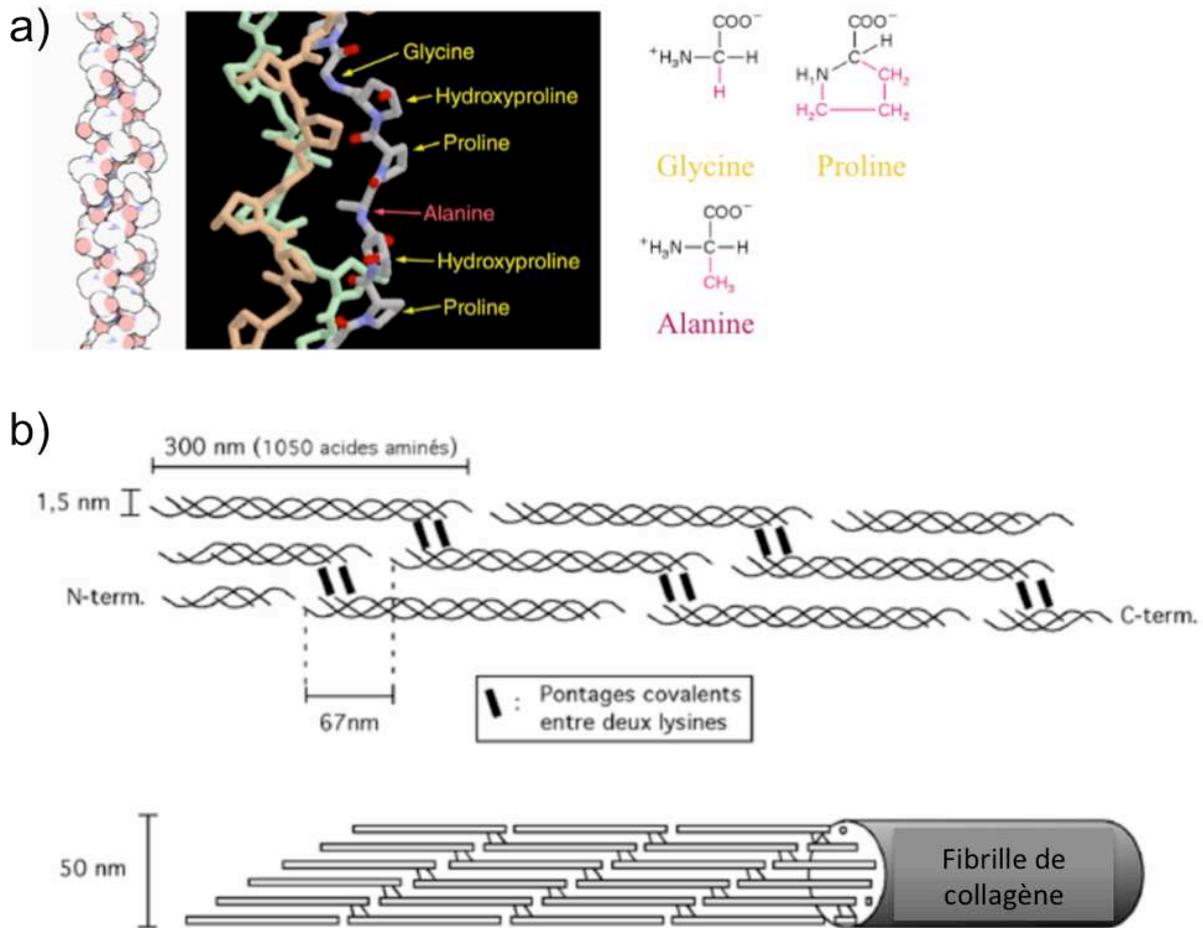


Figure 1-2: a) Enchaînement caractéristique d'acides aminés dans la triple hélice de collagène (image Protein Data Bank), b) assemblage en fibrilles

Le collagène peut être extrait de tissus animaux (par exemple les tendons) riches en cette protéine et solubilisé en milieu acide. A pH physiologique, la molécule de collagène est très peu chargée, ce qui entraîne la précipitation sous formes de fibrilles. C'est ainsi que l'on peut provoquer la fibrillogénèse d'une solution acide de collagène par neutralisation pour former des matériaux à base de collagène.

- Les cellules du derme : les fibroblastes

Les fibroblastes sont les cellules majoritaires du derme. Ce sont des cellules d'origine mésenchymateuse, de grande taille (de 20 à 30 μm de longueur et 5 à 10 μm de large). Elles ont une morphologie fusiforme et sont caractérisées par un noyau ovale et un cytoplasme parfois étoilé. Ces cellules sont responsables de la production des macromolécules de la matrice extracellulaire. Par ailleurs, ce sont les fibroblastes qui assurent le renouvellement de

la matrice extracellulaire en synthétisant des protéines capables de dégrader le collagène et l'élastine : les collagénases et élastases.

1.1.3.2 Diffusion de particules à travers la peau

La diffusion des nanoparticules à travers la peau dépend de plusieurs facteurs : leur taille mais aussi leur état d'agrégation, la charge de surface et la présence éventuelle d'une couronne de protéine, mais l'état de la peau joue aussi un rôle important (présence d'abrasion, flexions répétées, ...). Tous ces paramètres vont avoir une influence sur la capacité des nanoparticules à pénétrer la peau ainsi que sur la profondeur de pénétration et la localisation des nanoparticules. L'analyse de l'influence de ces différents paramètres est rendue difficile par la corrélation qu'il y a entre plusieurs d'entre eux. Par exemple, lorsque l'on fait varier la taille des nanoparticules, on modifie en parallèle la densité de charge. Dans la suite de ce paragraphe, l'influence de la taille et de la charge de surface des particules est présentée.

- Influence de la taille

De nombreuses études font état de l'influence de la taille des nanoparticules sur la capacité à pénétrer et traverser la peau, ou du moins sur la cinétique du processus. Il est couramment admis concernant la pénétration cutanée que des particules de diamètre inférieur à 3 μm peuvent pénétrer dans le *stratum corneum*, les particules de diamètre supérieur à 10 μm restent à la surface de la peau sans y pénétrer, et les particules de diamètre intermédiaire s'accumulent dans les follicules sébacés (Schaefer, 1990). Cependant cette règle n'est pas absolue et il existe de nombreux contre-exemples qui soulignent que la taille n'est pas le seul paramètre déterminant dans la capacité des particules à traverser la peau.

Sonavane *et al.* (Sonavane 2008) ont montré que sur 24 heures des nanoparticules d'or, dans une gamme de taille allant de 15 nm à 200 nm, étaient capables de pénétrer la peau de rat. Cependant, lorsque la taille augmente, la cinétique de diffusion diminue et l'on voit apparaître un temps de latence initial qui augmente. Parallèlement, la localisation des nanoparticules est aussi dépendante de leur taille. En effet, plus la taille diminue, plus les particules sont retrouvées dans des couches profondes de la peau, les plus grosses étant majoritairement situées dans l'épiderme.

La nature du nanomatériau peut modifier certaines propriétés des particules, et notamment leur élasticité ou leur capacité à se déformer sous l'action d'une contrainte. Ainsi peut-on

aboutir à des résultats très différents en comparant des particules inorganiques rigides et des particules polymères. Alvarez-Román *et al.* (Alvarez-Román 2004) ont étudié la pénétration et la distribution de nanoparticules polymères (20 et 200 nm) dans la peau et observent une accumulation des nanoparticules dans les ouvertures folliculaires d'autant plus favorisée que les particules sont petites. Cette étude montre aussi que les particules restent dans les couches supérieures de la peau et ne sont donc pas capables, en l'état, d'offrir une voie de pénétration dans l'organisme pour libérer l'agent actif encapsulé. Parallèlement, Vogt *et al.* (Vogt 2006) ont obtenu des résultats légèrement différents en montrant que des nanoparticules fluorescentes de polystyrène de 40 nm étaient capables d'atteindre le derme périfolliculaire en passant par la voie folliculaire.

Contrairement à ces études, Kohli *et al.* (Kohli 2004) ont montré que des particules de latex de 50 et 500 nm chargées négativement étaient capables de traverser la peau. Leur étude montre aussi qu'il y a peu de différences dans la proportion de particules ayant traversé au bout de 6 heures, ce qui semble indiquer que, dans ce cas, la taille (sur une gamme de 50 à 500 nm) n'est pas un facteur prépondérant. La seule différence notable est aux temps très courts où plus de petites particules que de grandes ont traversé la peau. Par contre, l'étude montre que des particules de latex de 100 et 200 nm, chargées négativement, elles aussi, n'ont pas la capacité de traverser la peau.

Enfin, une étude sur la distribution de nanoparticules de silice après exposition cutanée (Nabeshi 2011) montre que des particules de 70 nm de diamètres sont capables de traverser la peau et se retrouvent dans la circulation systémique et dans plusieurs organes après 28 jours.

Ainsi la taille a-t-elle une influence sur la pénétration des nanoparticules dans les différentes couches de la peau, mais ne semble pas toujours le paramètre clé. De plus, il semble y avoir des seuils, probablement dus à des effets de surface, où le comportement des particules peut s'inverser. Enfin, le comportement des particules peut différer en fonction de l'élasticité du matériau, il peut notamment y avoir des effets de déformation des particules polymères tandis que les particules inorganiques ne sont pas flexibles (Hervé-Bazin 2007). Le tableau 1.1 résume les résultats des différentes études présentées en fonction des caractéristiques des nanoparticules et du type d'étude.

Caractéristiques des particules			Type d'étude	Résultat principal	Réf
Matériau	Taille (nm)	Charge surface	de durée		
Or	De 15 à 200 nm	-40 mV	<i>In vitro</i> 24 h	- diffusion ralentit avec la taille - profondeur de pénétration diminue avec la taille	Sonavane 2008
Polystyrène	De 20 à 200 nm	négatives surface carboxylates	<i>In vitro</i> 2 h	- accumulation des particules dans les ouvertures folliculaires (favorisée par diamètre petit)	Alvarez-Roman 2004
Polystyrène	40 nm	Non précisé	<i>In vitro</i> 16 h	- NPs dans le derme	Vogt 2006
Polystyrène	750 nm		<i>In vitro</i> 16 h	- NPs ne traversent pas l'épiderme	
Latex	50 et 500 nm	négatives	<i>In vitro</i> 6 h	- NPs traversent la peau - peu d'influence de la taille - la diffusion ralentit avec la taille des NPs	Kohli 2004
Latex	100 et 200 nm	négatives	<i>In vitro</i>	- NPs ne traversent pas la peau	
Latex	50, 100 200 et 500 nm	positives neutres	<i>In vitro</i>	- NPs ne traversent pas la peau	
Silice	70 nm	- 20 mV	<i>In vivo</i> 28	- NPs accèdent à la circulation systémique	Nabeshi 2011

jours					
TiO ₂	< 100 nm	négatives	<i>In vitro</i>	- NPs dans le stratum corneum	Wu 2009
TiO ₂	< 100 nm	négatives	<i>In vivo</i>	- NPs atteignent le derme après 3 60 jours - NPs dans différents organes après 60 jours	
Argent	25 nm	stabilisées par greffage de polyvinylpir- rolidone	<i>In vitro</i> 24 h	- NPs traversent la peau endommagée - NPs dans le <i>stratum corneum</i> d'une peau intacte	Larese 2009

Tableau 1-1: Résumé des résultats de diffusion de diverses nanoparticules à travers la peau

- Influence de la charge de surface

A taille égale, des particules de charges différentes ne se comportent pas de façon identique vis-à-vis de la diffusion à travers la peau. En effet, Kohli *et al.* ont montré que contrairement aux particules chargées négativement, des particules positives ou neutres n'étaient pas capables de traverser la peau, de même que les particules négatives de 100 et 200 nm. L'hypothèse avancée par cette équipe est que la charge nette de surface des particules joue un rôle décisif dans le passage de la barrière de la peau. Ceci expliquerait aussi pourquoi, dans le cas des particules négatives, les particules de 50 et 500 nm traversent contrairement à celles de 100 et 200 nm. Effectivement, les petites particules de 50 nm présentent une surface spécifique plus importante et donc plus de charges en contact avec la peau, de même les particules de 500 nm possèdent une densité de groupements chargés plus importante.

Etonnamment, ce sont les particules chargées négativement qui semblent les plus à même de traverser la barrière que constitue la peau. La peau est chargée négativement dans les conditions physiologiques (Marro 2001) et favorisera donc les interactions avec des espèces cationiques, tandis que les espèces anioniques développeront des interactions répulsives. Ces interactions peuvent expliquer pourquoi, si elles pénètrent dans la peau, les particules

négatives traversent plus facilement la barrière cutanée. Néanmoins, il est difficile de conclure directement puisque pour la plupart des études mentionnées, les nanoparticules n'ont pas été caractérisées dans le milieu d'étude, de sorte que la charge réelle des particules en contact de la peau n'est pas connue. La charge initiale des particules aura bien une influence, mais celle-ci peut être indirecte en modifiant la couronne de protéines pouvant s'adsorber à la surface des particules.

- Influence de la peau : présence de lésions, flexions répétées

L'état de la peau (irritation, hydratation, abrasion) ainsi que les contraintes mécaniques appliquées (flexion, massage) jouent un rôle déterminant dans la capacité des nanoparticules à traverser la peau.

Dans une étude concernant la capacité à traverser la peau de nanoparticules d'argent de 25 nm, Larese *et al.* (Larese 2009) ont montré que la fonction de barrière de la peau était amoindrie lorsque cette dernière est endommagée. En effet, tandis que les nanoparticules s'accumulent dans le *stratum corneum* d'une peau intacte, elles sont capables de traverser une peau endommagée (abrasion du *stratum corneum*). Ces résultats ont aussi été obtenus lors de l'étude de la capacité de barrière de la peau face à des nanoparticules d'oxyde de titane retrouvées dans certaines crèmes solaires (Nanoderm 2007). Par ailleurs, il a été montré dans de nombreuses études que les flexions répétées ou les massages favorisent la pénétration des nanoparticules dans la peau (Monteiro-Riviere 2009, Rouse 2007).

- Comparaison des études *in vitro* et *in vivo*

Il faut mettre les résultats de ces études *in vitro* en regard de ce qui se passe *in vivo*. En effet, même si la plupart de ces études sont menées sur des échantillons de peau intacte, le comportement des nanoparticules et les durées d'études ne sont pas forcément représentatifs de résultats *in vivo*. Wu *et al.* (Wu 2009) ont ainsi montré que des nanoparticules de dioxyde de titane de diamètres inférieures à 100 nm restaient dans le *Stratum Corneum* dans les expériences *in vitro* tandis que ces mêmes particules, exposées *in vivo*, atteignent les couches profondes de l'épiderme après 3 jours et traversent entièrement la peau pour atteindre différents tissus et organes après 60 jours, provoquant ainsi un stress oxydant supérieur à la normale.

- Conclusions

Les études portant sur la capacité des nanoparticules à pénétrer l'organisme après exposition cutanée amènent à des conclusions parfois contradictoires (Crosera 2009). Il semble nécessaire d'appréhender ces questions avec plus de données afin de comprendre si la peau représente une voie d'accès des nanoparticules à l'organisme ou si elle peut être envisagée comme un organe cible. Malgré la disparité des résultats, il ressort de ces études la nécessité de connaître le comportement des nanoparticules dans le milieu d'étude à long terme (agrégation, adsorption de protéines, stabilité chimique).

1.1.3.3 Un exemple d'application : délivrance de médicaments par voie cutanée

Les industries pharmaceutiques développent depuis quelques années déjà des systèmes de délivrance de médicaments par voie cutanée (Farahmand 2009). Le principal problème rencontré est la difficulté de certaines molécules à traverser la couche superficielle protectrice de la peau : le *stratum corneum*. Pour remédier à ce problème il existe différentes solutions, l'une d'elle est l'utilisation de vecteurs nanométriques. Cette approche a un double intérêt puisqu'elle permet de favoriser le passage cutané tout en protégeant la molécule encapsulée et en ayant la possibilité de moduler sa libération. Elle a été étudiée par exemple dans le cadre de l'utilisation potentielle de nanoparticules comme vecteurs de vaccins transdermiques (Kohli 2004). Par ailleurs, le développement des techniques de microscopie permet de suivre la pénétration dermique de ces nanovecteurs ainsi que la libération du médicament encapsulé (Stracke 2006), permettant ainsi leur optimisation.

Ces vecteurs nanométriques sont souvent intégrés dans des gels afin de faciliter leur application et d'avoir la possibilité d'une libération progressive sur un temps relativement long (Ding 2011).

1.2 Comportement des nanoparticules de silice dans des systèmes vivants

Pour développer des nanoparticules de silice à usage biomédical qui soient efficaces et non dangereuses, il est primordial de comprendre leur comportement en milieu biologique et ce que cela peut impliquer pour les résultats des tests *in vitro* et *in vivo* (Lin 2012).

1.2.1 LES NANOPARTICULES DE SILICE EN MILIEU BIOLOGIQUE

1.2.1.1 Stabilité colloïdale des nanoparticules en milieu biologique

- Le phénomène d'agrégation des particules

Dans certaines conditions, une suspension de nanoparticules peut ne pas être stable : elle peut gélifier ou coaguler. Dans les deux cas, les nanoparticules développent des interactions entre elles qui permettent la formation d'un assemblage tridimensionnel. Dans le cas de la coagulation ou de la floculation, il y a formation d'un précipité correspondant à des agrégats de particules relativement compacts, à une concentration plus importante. La stabilité des particules vis-à-vis de l'agrégation en solution aqueuse dépend de leur hydrophilicité. En effet, des particules hydrophobes seront stables en solution si leur charge de surface est suffisamment importante pour induire des forces de répulsion électrostatiques entre les particules. Pour des particules hydrophiles, ce facteur est un peu moins important puisqu'il faut alors tenir compte de la stabilisation des particules par solvatation, *i.e.* par la création d'une couche d'eau entourant ces particules. Cette couche d'eau crée une barrière face aux interactions de Van der Waals qui peuvent attirer deux particules l'une vers l'autre, de même que des surfaces chargées repoussent des particules de même charge par interactions électrostatiques répulsives.

Etant donné que l'agrégation de particules en suspension est contrôlée par le bilan des interactions attractives et répulsives entre particules, tout facteur influençant ces interactions modifie par ailleurs la stabilité colloïdale et donc l'agrégation des particules. Ainsi la force ionique, le pH, la concentration en particules, leur taille et la nature de leur surface sont-ils autant de facteurs pouvant perturber la stabilité des particules en suspension.

- Cas de la silice en milieu biologique

- Influence du milieu

Pour un pH autour de 7, comme rencontré dans des conditions biologiques standard, les suspensions de nanoparticules de silice sont stables si la concentration en sels est basse mais précipitent lorsque cette concentration augmente au-delà d'un seuil critique. En présence de sels, la charge de surface des particules de silice, initialement négative à pH neutre à cause des groupements silanolates, diminue par adsorption de cations et les forces répulsives ne sont plus suffisantes pour maintenir la stabilité de la suspension. Par ailleurs, en conditions biologiques, non seulement de nombreux ions sont présents mais il y a aussi, par exemple, des

protéines qui peuvent s'adsorber en surface des particules et jouer un rôle similaire dans la diminution de la charge de surface et qui pourraient aussi servir de "pont" entre particules.

- Influence de la taille des particules

La taille des particules peut modifier leur agrégation. En effet, plus les particules sont petites, plus elles ont d'énergie cinétique fournie par les mouvements browniens. Cette énergie peut permettre, lors de collisions entre particules, de franchir la barrière énergétique des forces électrostatiques. D'un autre côté, lorsqu'on travaille à une concentration donnée, plus les particules sont petites plus elles sont nombreuses et donc plus les probabilités de collision amenant à la formation de clusters de particules sont élevées.

- Influence de la surface des particules

Enfin, la modification de la surface des particules peut moduler leur agrégation (Bagwe 2006). Ainsi le greffage d'un nombre insuffisant de groupements amines en surface conduit-il à une surface globalement neutre, ce qui implique une agglomération des particules due au manque de forces de répulsion électrostatiques. Cependant, lorsque d'autres groupements que les amines sont présents, les particules peuvent atteindre une charge de surface suffisante pour garder leur stabilité colloïdale. Par ailleurs, la modification de surface peut améliorer la stabilité colloïdale de particules de silice ayant tendance à s'agréger en conditions biologiques. C'est le cas par exemple de nanoparticules de silice mésoporeuses dont la stabilité à pH 7 est améliorée par greffage en surface de polyéthylène glycol (Wang 2010).

Les nanoparticules de silice sont donc d'autant plus stables que l'environnement contient peu de sels et de protéines, qu'elles sont peu nombreuses et de diamètre plus grand et que leur surface est greffée par des groupements adéquats.

1.2.1.2 Dissolution des nanoparticules

- Equilibre de solubilité

Lorsqu'un composé solide est mis en contact avec une solution, il s'établit un équilibre entre la forme solide et la forme soluble de ce composé, régi thermodynamiquement par la constante de solubilité. Cette dernière donne la concentration à l'équilibre de la forme soluble. Cet équilibre est spécifique au matériau et dépend de sa nature et de la température, pour une dissolution exothermique, plus la température est importante plus la concentration en formes solubles à l'équilibre est importante. Par contre, l'aspect cinétique du processus peut dépendre de nombreux autres paramètres comme le pH, la présence d'autres molécules, la surface spécifique du solide, sa structure...

En effet, le pH peut modifier le phénomène en l'accéléralant ou en le ralentissant. La surface spécifique est un paramètre important puisque plus le solide a une surface spécifique importante, plus la surface de contact avec la solution est élevée et donc plus la dissolution peut être favorisée. Enfin un autre paramètre pouvant influencer la dissolution d'un solide en solution est la convection. En effet, s'il y a seulement la convection naturelle, il faut un certain temps pour que les formes solubles s'éloignent du solide, laps de temps pendant lequel on peut provisoirement avoir une concentration suffisante en forme soluble pour être localement à l'équilibre. Par contre, s'il y a une convection forcée, alors les formes solubles produites sont très rapidement éloignées du solide et la dissolution se poursuit jusqu'à atteindre la concentration d'équilibre macroscopique.

- Quels sont les facteurs influençant la dissolution de la silice ?

On s'intéresse ici à la dissolution de la silice amorphe. La solubilité de la silice à 25°C dans l'eau varie entre 70 et 150 ppm en fonction de la taille des particules, de leur structure et de leur composition (Iler 1979). Cependant, même si la solubilité n'en est pas affectée, l'environnement peut avoir une influence importante sur la vitesse de dissolution. Parmi ces facteurs, on peut citer le pH, la présence de sels ou encore la présence de protéines. Au niveau mécanistique, la dissolution de la silice est une dépolymérisation du réseau par hydrolyse (figure 1.3). Cette dissolution nécessite la présence d'un catalyseur qui peut s'adsorber en surface de la silice et augmenter la coordination des atomes de silicium de surface, affaiblissant de ce fait les liaisons Si-O avec les autres atomes de silicium du réseau.

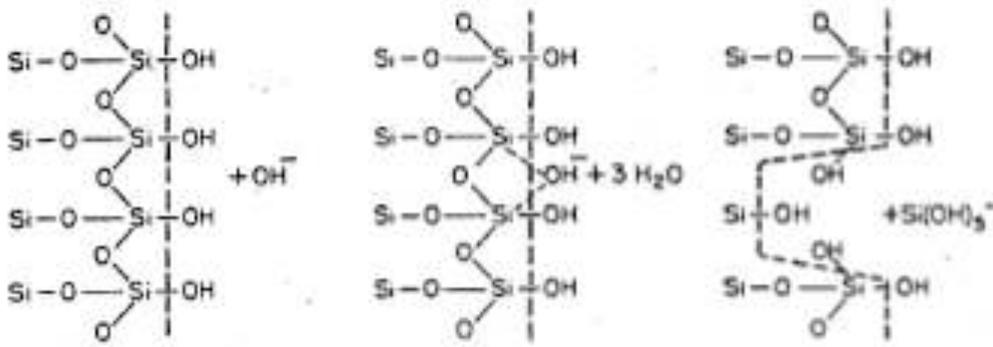


Figure 1-3 : Dissolution de la silice (Iler 1979)

- Influence du pH

Les ions hydroxydes sont des catalyseurs de la dissolution, de ce fait il n'est pas étonnant d'observer qu'entre pH 3 et pH 7 la dissolution augmente avec la concentration en ions

hydroxyles. Au-delà de pH 9 et en-dessous de pH 3, la dissolution semble moins dépendre du pH (Iler 1979, Vogelsberger 1992). Ainsi la dissolution de silice à pH 7,4 est-elle rapide et visible dès 6 heures tandis qu'à pH 2, après 6 heures aucune dissolution n'est observée (Finnie 2009). Lors de la dissolution, après adsorption d'un ion hydroxyle, il y a libération en surface d'une molécule qui dépend du pH : acide silicique pour des pH acides et silicates pour des pH plus basiques (Sjöberg 1996). Les particules de silice seront donc moins dissoutes en conditions acides qu'à pH neutre.

- Influence de la présence de sels

La silice est inerte dans l'eau pure tandis qu'elle se dissout rapidement dans l'eau de mer. Ceci indique que la présence de sels dans l'environnement est un facteur favorisant la dissolution. La présence de cations alcalins dans l'environnement favorise la dissolution en s'adsorbant à la surface et en interagissant avec les atomes d'oxygène des ponts Si-O-Si (Wallace 2010). La constante de dissolution de la silice en présence de 0,05 M de NaCl est 21 fois plus importante que dans l'eau pure (Ehrlich, 2010). En milieux biologiques, la silice sera donc plus facilement dissoute puisque ces milieux contiennent généralement des sels.

- Influence de la présence de molécules biologiques

En milieu biologique, les particules sont en contact avec de nombreuses protéines qui peuvent s'adsorber en surface. L'adsorption de molécules en surface des particules crée une barrière pour la diffusion des formes solubles libérées de la surface lors de la dissolution et diminue la tension de surface (qui est un des moteurs de la dissolution) ; contribuant ainsi à diminuer la dissolution. Cependant, la nature des molécules est importante puisqu'elles peuvent aussi avoir l'effet inverse et servir de catalyseur de dissolution. Par ailleurs, l'adsorption étant un phénomène dynamique, les molécules biologiques s'échangent en permanence avec le milieu environnant. Ces molécules peuvent complexer les formes solubles et donc les enlever de la surface lors de l'échange avec le milieu environnant, accélérant ainsi la dissolution (Borm 2006, Ehrlich 2010).

L'étude de la dissolution de microparticules de silice dans du PBS seul ou avec 10% de sérum fœtal montre qu'en présence des protéines contenues dans le sérum, la dissolution des particules est diminuée d'environ 30% (Finnie 2009). Cet effet est attribué à l'adsorption de protéines comme l'albumine en surface des particules (Lord 2006, Larsericsdotter 2005). Dans les études en présence de sérum, les protéines présentes vont donc réduire la dissolution des particules de silice mais ne l'empêcheront pas.

Par ailleurs, une étude récente a montré que certaines polyamines permettent de favoriser la dissolution de nanoparticules de silice, en imposant localement une solvataion de la surface à l'interface entre la particule et la molécule (Patwardhan 2011).

On ne peut donc pas donner de règle générale sur l'influence des molécules biologiques sur la dissolution des nanoparticules de silice : elles peuvent aussi bien ralentir la dissolution que servir de catalyseur.

- Caractéristiques des particules (taille, surface spécifique, nature de la surface)

Etant donné que la dissolution consiste en la libération d'acide silicique de la surface des particules, plus la surface spécifique est grande plus la dissolution est importante. Ainsi des particules poreuses ou possédant une nanotopographie importante subiront-elles une dissolution plus rapide. Ceci implique aussi que plus les particules sont petites, plus leur surface en contact avec l'environnement est importante, plus leur dissolution est rapide. De même, des particules amorphes sont plus solubles que des particules cristallisées dans lesquelles les interactions au sein du réseau sont plus importantes.

Par ailleurs, l'état d'agrégation des particules peut modifier leur dissolution. En effet, lorsque les particules sont sous forme d'agrégats, une partie de la surface n'est pas en contact avec le milieu environnant et ne peut donc subir de dissolution. Plus les particules sont agrégées, plus la constante de dissolution diminue. Par ailleurs, la formation d'agrégats change la courbure locale des particules et peut donc modifier la cinétique de dissolution en perturbant la couche de diffusion qui entoure l'agrégat (Borm 2006). Cette couche correspond à la zone entourant la surface dans laquelle se trouvent les molécules issues de la dissolution ; plus cette couche est importante plus la dissolution ralentit.

Enfin, la nature de la surface (groupements chimiques présents en surface) a un rôle important dans la dissolution puisqu'elle va modifier l'adsorption de protéines, qui peuvent accélérer ou ralentir la dissolution. Ainsi le greffage en surface de polyéthylène glycol permet-il de ralentir la dégradation de particules de silice en milieu biomimétique (Cauda 2010). De même, la fonctionnalisation de silice mésoporeuse avec des organosilanes (alkyl ou aminopropyl) permet de la stabiliser en conditions physiologiques (Izquierdo-Barba 2010).

En conclusion, la dissolution des nanoparticules de silice dépend du milieu, de leur stabilité colloïdale et de leurs caractéristiques (taille, charge de surface, porosité).

1.2.2 LES NANOPARTICULES DE SILICE *IN VITRO*

Par leurs dimensions, les nanoparticules sont à même d'interagir avec les cellules. Ces interactions peuvent conduire ou non à leur internalisation par différents processus décrits ci-après et peuvent déclencher une réponse des cellules *in vitro* traduisant divers degrés de toxicité.

1.2.2.1 Internalisation des nanoparticules

Lorsque la taille des particules est suffisamment petite, ces dernières peuvent pénétrer dans les cellules de différentes façons : soit elles rentrent par simple diffusion à travers la membrane plasmique, soit elles sont internalisées par un mécanisme de pinocytose déclenché par la cellule. Les paragraphes qui suivent décrivent brièvement ces deux types d'internalisation ainsi que les facteurs l'influençant.

- Internalisation par diffusion passive

Certaines nanoparticules, suffisamment petites (quelques nanomètres) et possédant des groupements de surface adéquats peuvent traverser la membrane cellulaire directement, sans passer par un mécanisme d'endocytose. Une étude récente sur des globules rouges, incapables d'endocytose, a ainsi montré que des quantum dots fonctionnalisés sont capables de traverser la membrane cellulaire, sans détruire la structure de cette dernière ni créer de trous dans l'organisation en double couche (Wang 2012). Cependant, ce cas de figure n'est pas le plus répandu et en général les particules sont internalisées par endocytose.

- Internalisation par endocytose

Il existe différents mécanismes d'endocytose dont la macropinocytose, l'endocytose par voie clathrine et l'endocytose par voie caveolae (figure 1.4) (Hillaireau 2009, Alberts 2002). Ces mécanismes peuvent avoir lieu dans de nombreuses lignées cellulaires.

- Endocytose par voie clathrine

Cette voie d'internalisation joue un rôle physiologique essentiel puisqu'elle permet l'apport de nutriments dans les cellules par internalisation de macromolécules présentes dans les fluides extracellulaires. Cette internalisation peut se faire par reconnaissance de récepteurs spécifiques (par exemple des lipoprotéines ou des transferrines) ou non, la première voie étant souvent plus rapide. Lors de l'interaction des molécules ou particules avec la membrane, dans une région riche en clathrine, cette dernière se déforme pour créer une cavité. Cette cavité

s'enfonce dans la cellule jusqu'à former une vésicule entourée de clathrine dans laquelle les molécules ou les particules sont internalisées. Cette vésicule fusionne avec un endosome. A ce moment, soit le matériel internalisé est reconnu et recyclé (Mellman 1996), soit il possède des fonctions lui permettant de s'échapper de l'endosome (Rosenholm 2009, Sauer 2010) soit il reste prisonnier dans l'endosome. Grâce à des pompes à protons fonctionnant avec de l'ATP, les endosomes sont progressivement acidifiés (passant de pH 6 pour un endosome "jeune" à pH 5 dans un endosome mature). Les endosomes matures fusionnent alors avec des vésicules contenant des enzymes acide hydrolases, qui apportent un environnement favorable à la dégradation du matériel présent dans ces endosomes, pour former des lysosomes.

Ce processus est le mieux décrit dans la littérature et l'un des plus rencontrés, il est donc important de connaître le devenir des particules internalisées par cette voie. Dans le cadre de l'utilisation de nanoparticules pour la libération intracellulaire de principes actifs, les particules peuvent alors être modifiées pour, par exemple, libérer leur contenu lors de la dégradation lysosomale ou pour au contraire s'échapper des endosomes avant la fusion avec les vésicules pré-lysosomales afin de préserver leur contenu de l'environnement agressif des lysosomes.

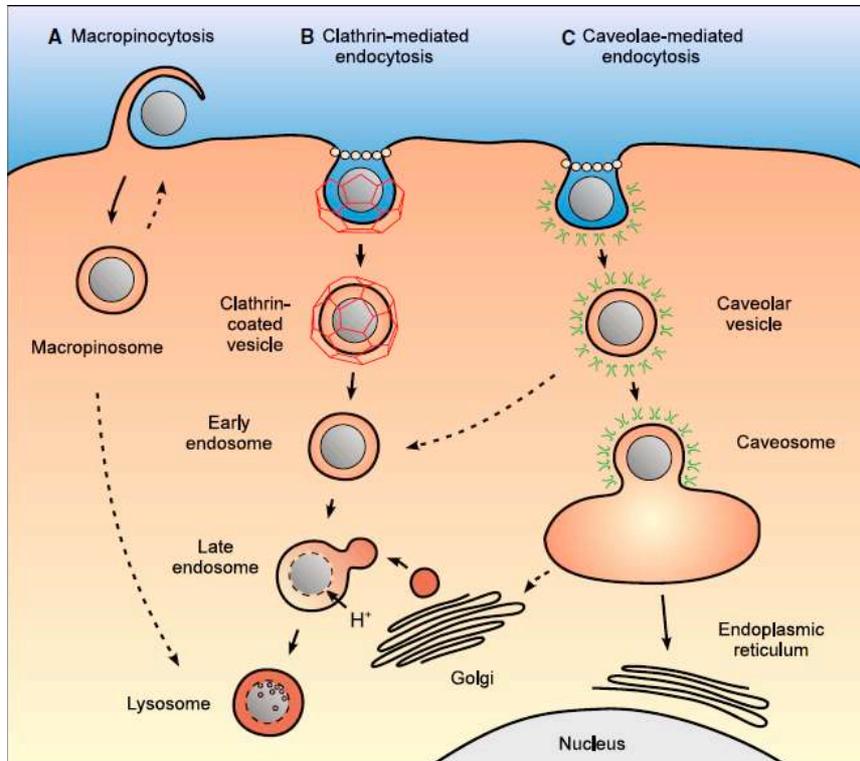


Figure 1-4 : Schéma des différentes voies d'internalisation (Hillaireau 2009)

- Endocytose par voie caveolae :

Les particules peuvent aussi être internalisées par endocytose par voie caveolae. Cette voie est utilisée par les cellules pour internaliser certaines protéines ; c'est aussi la voie d'accès utilisée par certains virus. Dans ce cas, la membrane se déforme et crée une cavité bordée de caveoline pour internaliser les particules. Ce processus est contrôlé par de nombreux signaux intracellulaires ou provenant des particules internalisées. Lorsque la dynamine GTPase provoque le détachement de la membrane, il se forme une vésicule caveolaire qui se retrouve dans le cytosol et qui, contrairement aux endosomes, n'est pas riche en enzymes. Cette voie permet donc d'éviter la dégradation lysosomale et peut être une alternative pour la libération intracellulaire de molécules "fragiles" comme des acides nucléiques.

- Facteurs influençant l'internalisation

L'internalisation de particules est gouvernée par différents paramètres. Parmi ceux-ci on trouve : la lignée cellulaire (une même particule peut être internalisée dans une lignée cellulaire mais pas dans une autre), la taille des particules, leur forme et enfin leur surface qui modifie les interactions électrostatiques des particules avec la membrane.

- Influence de la morphologie des particules (taille et forme)

De façon générale, les particules sphériques semblent plus facilement internalisées que les particules tubulaires (Trewyn 2008, Huang 2010), mais ceci dépend des lignées cellulaires. Une explication de ce phénomène consiste à dire qu'il est plus rapide de former une cavité dans la membrane qui entoure une particule sphérique qu'un cylindre. Mais il faut relativiser cela en tenant compte du paramètre de forme. En effet, dans la géométrie cylindrique, le rapport diamètre/hauteur est un paramètre important puisqu'il peut modifier considérablement le comportement des particules. Un cylindre court se comportera comme une sphère tandis qu'un cylindre allongé n'aura pas les mêmes propriétés. Une étude par simulation en dynamique moléculaire de l'endocytose de nanoparticules sphériques ou sphéro-cylindriques (i.e des cylindres dont les extrémités sont des demi-sphères) dans une membrane lipidique montre que l'internalisation de particules de géométrie sphéro-cylindrique (avec un facteur de forme faible) est thermodynamiquement favorable, en accord avec la théorie de l'élasticité des membranes de Helfrich (Vácha 2011).

Par ailleurs, la taille des particules est un paramètre clé pour leur internalisation. En effet, selon leur taille les particules ne seront pas internalisées de la même façon ni à la même vitesse. On peut considérer que des objets sub-micrométriques peuvent être internalisés par des cellules mais plus les particules sont petites plus leur endocytose est rapide. Cependant, il

faut tenir compte de l'éventuelle agrégation des particules à la surface des cellules qui internalisent alors l'agrégat et non les particules dispersées.

Une étude faite par simulation moléculaire montre que, dans le cas d'une endocytose avec reconnaissance par des récepteurs, il peut y avoir un effet de coopérativité lors de l'internalisation de particules de diamètre inférieur à 6 nm (Yue 2012). Ainsi les calculs prédisent-ils, pour des particules de quelques nanomètres de diamètre, que lorsque l'endocytose d'une particule débute, d'autres particules viennent pour former un cluster à la surface de la cellule qui est internalisé en l'état. Lorsque le diamètre augmente, l'endocytose ralentit et les particules peuvent être internalisées individuellement. Ces résultats proviennent de la nécessité pour le système de fournir suffisamment d'énergie via les liaisons récepteurs-ligands pour former une vésicule d'internalisation (Jin 2009). Enfin, la taille des particules peut modifier la voie d'internalisation (Rejman 2004). Ainsi l'étude de l'internalisation de particules de latex a-t-elle montré que pour un diamètre inférieur à 200 nm, les particules sont internalisées par voie clathrine, tandis que pour des diamètres supérieurs, l'internalisation se fait de plus en plus par voie caveolae, cette dernière étant la voie principale pour des particules de 500 nm.

Ainsi la morphologie des particules joue-t-elle un rôle essentiel sur leur internalisation. La cinétique est d'autant plus rapide que les particules sont petites et sphériques et la voie d'endocytose varie avec la taille. De plus, l'agrégation peut modifier l'internalisation des particules, sans pour autant être un frein.

- Influence de la surface

La surface des particules peut modifier significativement le phénomène d'internalisation (Mailänder 2009). Cet effet peut avoir diverses sources : des interactions électrostatiques des groupements chargés des particules (groupements de surface ou couronne de protéines) avec la membrane cellulaire, la présence de ligands spécifiques en surface des cellules qui seront reconnus par les récepteurs membranaires, ou encore la topographie de la surface.

Des études récentes (Slowing 2006) ont montré que l'internalisation de particules de silice mésoporeuses chargées positivement était plus efficace que celle des particules négatives à cause des interactions favorables entre les particules positives et la membrane plasmique chargée négativement. Cependant, il faut aussi prendre en compte l'adsorption de protéines, qui a lieu de façon non spécifique si les particules ne possèdent pas de groupements de surface permettant de la contrôler. Les particules positives vont alors plus facilement interagir avec les protéines sériques, conduisant éventuellement à une neutralisation de la charge, une opsonisation de ces particules et leur élimination (Adler 2010).

Par ailleurs, le contrôle de la densité de groupements de surface et de leur nature peut permettre d'éviter l'internalisation non sélective de particules et peut modifier la voie d'internalisation (Moros 2012, Adler 2010, Lynch 2007). Ainsi le greffage en surface de particules de polystyrène de groupements acide carboxylique ou amine permet-il d'augmenter légèrement ou significativement leur internalisation (Mailänder 2009). De même, le greffage de groupements acide folique permet de cibler les cellules cancéreuses (Rosenholm 2009). En outre, le greffage de groupements spécifiques, comme le peptide Tat, permet une internalisation directe des particules qui se retrouvent ensuite dans le cytoplasme et évitent la dégradation lysosomale (Mao 2010).

Enfin, la présence de groupements amines en surface des particules semble favoriser leur internalisation, suggérant des interactions spécifiques des groupements amines avec la machinerie cellulaire d'internalisation par voie clathrine, du moins dans certaines lignées cellulaires (Jiang 2010).

En conclusion, la charge de surface des particules est un paramètre clé pour leur internalisation puisqu'elle gouverne les interactions avec les protéines et/ou la membrane cellulaire.

- Internalisation de particules de silice

De nombreuses études existent sur l'internalisation de nanoparticules de silice, considérées comme des candidats prometteurs pour des applications en imagerie médicale et libération intracellulaire ciblée de principes actifs. Le mécanisme d'endocytose, bien que pouvant différer d'une lignée cellulaire à l'autre semble toujours être un processus actif, et l'internalisation des particules de silice se fait majoritairement par voie clathrine ou caveolae. Quelques études à l'échelle cellulaire montrent que l'internalisation des particules de silice se fait en quelques heures (Hu 2011, Shapero 2011, Stayton 2009, Sun 2008). Cependant, la taille des particules ainsi que leur concentration peuvent modifier la quantité de particules internalisées ainsi que l'efficacité du processus. Ainsi l'étude de l'internalisation de particules de silice, de 60 à 600 nm de diamètre, négatives dans le milieu de culture, dans des cellules hépatiques HepG2 a-t-elle montré que : (i) à concentration constante en silice, la quantité de particules internalisées augmente presque linéairement sur 24 heures pour les particules de plus de 60 nm de diamètre, et augmente avec la taille des particules, tandis que pour les particules de 60 nm de diamètre, il y a une internalisation très rapide puis après 3 heures, le nombre de particules dans les cellules diminue ; (ii) plus la concentration en silice augmente, plus l'internalisation est rapide (Hu 2011).

L'étude de l'internalisation de particules de silice, de 50 à 300 nm de diamètre, légèrement négatives dans le milieu de culture, dans des cellules pulmonaires a montré que le processus nécessite de l'énergie et qu'au bout de quelques heures, les particules peuvent être observées dans des endosomes. De plus, l'influence de la taille des particules sur l'internalisation a été mise en évidence et il a été observé que plus les particules de silice sont petites, plus l'internalisation est importante et rapide, avec une différence majeure lorsque le diamètre est inférieur à 100 nm (Shapero 2011). Ces deux études montrent clairement que l'on ne peut pas donner d'évolution générale de l'internalisation des particules de silice en fonction de leurs caractéristiques puisque l'endocytose dépend de la lignée cellulaire. Cependant, bien que les évolutions soient différentes, il ressort de ces études que la taille des particules est un facteur important pour l'internalisation.

Enfin, la surface des particules est un autre facteur pouvant modifier considérablement l'internalisation. L'étude de Stayton *et al.* a ainsi montré que la présence d'une couronne de protéines en surface des particules, lorsque ces dernières sont dans un milieu avec sérum, diminue nettement la quantité de particules internalisées dans des cellules pulmonaires A549 (Stayton 2009). Ces résultats montrent qu'il est important d'étudier l'internalisation dans des conditions aussi proches que possible des conditions *in vivo* pour obtenir des résultats comparables puisque l'interaction des particules avec les protéines du milieu peut jouer un rôle important dans leur interaction avec les cellules.

1.2.2.2 Toxicité des particules

Sachant que les particules de silice sont capables de rentrer dans des cellules de nombreuses lignées cellulaires différentes, il se pose alors la question de leur toxicité. Les paragraphes suivants présentent les différents paramètres qui peuvent jouer sur la toxicité des particules de silice mais aussi la nature de la toxicité rencontrée.

- Toxicité de la silice

La toxicité de microparticules de silice cristalline a fait l'objet de nombreuses études puisque ce type de particules est à l'origine de la silicose, une affection pulmonaire causée par l'exposition chronique par inhalation à des particules de silice cristalline et dans laquelle on trouve des nodules composés de particules de silice entourées de collagène et de cellules (macrophages, lymphocytes et fibroblastes). La silice cristalline a été classée comme

cancérogène par l'agence internationale de recherche sur le cancer en 1997. Cependant, cette toxicité importante observée pour la silice cristallisée n'est pas forcément retrouvée pour des particules de silice amorphe. Le comportement de ces dernières avec les cellules et l'organisme est différent, la silice amorphe n'a notamment pas encore été classée comme substance cancérogène. Mais la silice amorphe a été moins étudiée, les études *in vitro* commencent à se faire plus nombreuses en raison des applications biomédicales potentielles de ces particules mais il existe encore peu d'études *in vivo* en comparaison.

Il est difficile de conclure de façon générale puisque selon la lignée cellulaire il existe une grande variabilité des résultats, cependant il semble que le contrôle des caractéristiques des particules (taille, charge de surface, forme, porosité, stabilité en milieu biologique) permette de moduler leur toxicité. Par ailleurs, cette toxicité étant liée à la dose effective reçue par les cellules, l'application des nanoparticules de silice dans le domaine biomédicale reste possible puisque dans certaines conditions, *in vitro* et *in vivo*, il est possible d'obtenir une toxicité négligeable ou réversible après une période sans exposition (Napierska 2010, Jin 2007).

- Paramètres déterminants pour la toxicité

Parmi les paramètres influençant la nature toxique des particules de silice, on trouve évidemment les caractéristiques des particules (morphologie, nature de la surface). Mais ce ne sont pas les seuls facteurs qui peuvent être déterminants ; lorsqu'on change la lignée cellulaire étudiée ou le mode d'exposition, les résultats de toxicité peuvent être modifiés voire inversés. Par ailleurs, il est difficile de comparer directement le comportement des différentes particules puisque changer la taille à concentration constante par exemple va changer la surface spécifique mais aussi le nombre de particules. Il faut donc fixer un paramètre, avec les limites que cela comporte, pour observer les modifications dans la réponse cellulaire (Lison 2008).

- Taille des nanoparticules

En gardant à l'esprit que les résultats peuvent varier de façon importante d'une lignée cellulaire à l'autre, on peut dire que globalement plus les particules sont petites, et notamment pour des diamètres inférieurs à un certain seuil, plus la toxicité est importante. Rabolli *et al.* ont ainsi montré qu'il existe une relation linéaire entre le diamètre des particules et la cytotoxicité (Rabolli 2010). Yuan *et al.* ont montré que pour des diamètres supérieurs à 100 nm, la modification de la taille des particules a peu d'influence sur la viabilité cellulaire tandis que pour des diamètres inférieurs à 100 nm, plus les particules sont petites plus elles sont

toxiques (Yuan 2010), ce dernier point a aussi été montré par d'autres études (Nabeshi 2011, Napierska 2009, Yu 2009, Jin 2008).

Cependant, l'influence de la taille doit être modulée par la question de la dose puisque changer le diamètre des particules va changer le nombre de particules par unité de concentration et aussi la surface spécifique, paramètre clé de l'interaction des particules avec les cellules.

- *Charge et nature de la surface*

Un deuxième paramètre important pour la toxicité des particules est la surface (charge et nature chimique). En effet, selon la charge de surface et la nature des groupements chimiques présents, les interactions avec les protéines et les cellules seront différentes, ce qui peut modifier la toxicité des particules en modifiant le mécanisme d'action des particules ou en modifiant leur internalisation dans les cellules.

La modification de surface apportant une charge positive permet, comme vu dans le paragraphe 1.3.1.3, de favoriser l'internalisation. Cependant, cette modification de surface n'entraîne pas de modification de la biocompatibilité des nanoparticules de silice mésoporeuses avec des cellules 3T3 ou des cellules souches mésenchymateuses selon l'étude de Chung *et al.* (Chung 2007). Yu *et al.* ont par ailleurs montré que la présence de groupements amines en surface des particules de silice réduit leur toxicité par rapport à des particules de silice non modifiées. Cet effet peut être dû à la modification des interactions entre les particules et la membrane cellulaire, plus fortes en présence d'amines chargées positivement, qui entraînerait une diminution de l'internalisation (Yu 2011).

Ruizendaal *et al.* ont obtenu des résultats contraires où les particules modifiées avec des amines en surface présentent une toxicité accrue pour des cellules Caco-2 par rapport aux particules ayant en surface des groupements azides ou carboxylates (Ruizendaal 2009). Cependant, la nature des particules, la lignée cellulaire et la taille des particules varient entre ces deux études, ce qui rend la comparaison difficile. Malgré tout, il est intéressant de noter que dans cette étude, la présence de protéines a un rôle dans la toxicité, rôle plus important lorsque les particules sont initialement positives que lorsqu'elles sont neutres ou négatives : l'activité métabolique diminue lorsque les cellules sont exposées aux nanoparticules de silice greffées avec des amines en surface en présence de sérum. Cette influence des protéines a aussi été mise en évidence par Drescher *et al.* dans une étude sur la toxicité des nanoparticules de silice amorphe sur des cellules eukaryotes (Drescher 2011). En effet, la présence de protéines dans le milieu de culture peut provoquer l'agrégation des particules (cf paragraphe

5.2.1.2) et donc diminuer leur internalisation par formation d'objets micrométriques et non nanométriques.

Ainsi une charge de surface positive ou la présence de protéines adsorbées semblent-elles être des facteurs diminuant la toxicité des nanoparticules de silice.

- Porosité

Lors des études de toxicité, l'un des paramètres permettant de comparer l'influence de différentes particules est la surface spécifique. Dans ce cadre, outre leur taille, la porosité des particules doit être prise en compte. Ainsi Rabolli *et al.* ont-ils montré que la microporosité des nanoparticules de silice est un facteur qui diminue la toxicité de ces particules pour différentes lignées cellulaires tandis que la surface spécifique a plutôt un effet opposé (Rabolli 2010). En effet, plus la surface spécifique augmente plus le nombre de groupements silanol en surface augmente ; or l'une des toxicités de la silice est liée à l'interaction des groupements silanol avec les ammoniums de la membrane cellulaire. Par ailleurs, des études *in vivo* semblent indiquer que la surface spécifique, de même que la nature des groupements de surface, est un facteur important pour la détermination de la toxicité des particules (études doses-réponses) (Yu 2012).

- Composition des particules

L'intégration d'une composante organique dans la structure des particules pour former des particules hybrides peut modifier la toxicité des particules. Ainsi Chang *et al.* ont-ils montré que des particules hybrides silice-chitosane permettent de garder une viabilité cellulaire de 85% par rapport aux cellules témoins pour des cellules exposées à des concentrations importantes (667 µg/mL) tandis que les particules de silice induisent une perte d'environ 40% de la viabilité cellulaire sur les mêmes lignées cellulaires. De même, les interactions des particules avec les cellules ne sont pas les mêmes : les particules de silice endommagent la membrane cellulaire, ce qui n'est pas le cas des hybrides silice-chitosane.

- Forme des particules

La majorité des études est faite sur des particules sphériques. Cependant quelques études comparent l'effet de nanoparticules de silice sphériques et en bâtonnets. Selon le facteur de forme (longueur du bâtonnet/diamètre) l'influence de la géométrie des particules est plus ou moins sensible. Dans leur étude, Yu *et al.* ont montré que pour des facteurs de forme allant de 1 à 8, la géométrie des particules de silice mésoporeuses a peu d'influence sur leur toxicité (Yu 2011). A l'inverse, une étude *in vivo* sur l'influence de particules de silice de différentes géométries sur le développement embryonnaire chez le poisson zèbre montre que des

particules de silice sphériques ne sont ni toxiques ni tératogènes alors que des bâtonnets induisent des malformations des embryons et présentent une toxicité aigüe (Nelson 2010).

Finalement, l'ensemble des caractéristiques des particules peut influencer la toxicité et les résultats parfois contradictoires des différentes études montrent l'importance d'une caractérisation précise des particules dans le milieu d'étude. Par ailleurs, ces études montrent aussi que le temps d'exposition et les lignées cellulaires utilisées pour les études *in vitro* peuvent modifier notablement les résultats.

- Lignée cellulaire

Les résultats présentés dans les paragraphes précédents montrent que selon la lignée cellulaire utilisée dans les études, la toxicité des nanoparticules de silice diffère. Chang *et al.* suggèrent que la cytotoxicité des particules de silice amorphe *in vitro* dépend de l'activité métabolique de la lignée cellulaire utilisée (Chang 2007). En effet, plus les cellules prolifèrent rapidement moins elles sont sensibles à une exposition à de fortes concentrations de nanoparticules de silice. Cette capacité des particules de silice à perturber la prolifération cellulaire, dépendant de la lignée cellulaire, a aussi été mise en évidence par Yu *et al.* (Yu 2011). Dans leur étude, ils montrent que des cellules épithéliales cancéreuses, ayant une prolifération rapide et importante, sont beaucoup moins sensibles à la présence de nanoparticules de silice que des cellules saines.

- Nature de la toxicité

L'exposition à des nanoparticules de silice peut induire une toxicité au niveau cellulaire par différentes voies. Les particules peuvent par exemple endommager la membrane par interaction des groupements silanol avec les ammoniums présents dans la membrane (Depasse 1977), induire un stress oxydant, ou endommager l'ADN.

- Stress oxydant

De nombreuses études indiquent qu'une exposition à des particules de silice induit un stress oxydant dans les cellules, résultat de la sur-production d'espèces réactives de l'oxygène et de la peroxydation des lipides de la membrane cellulaire (Akhtar 2010, Liu 2010, Wang 2009, Lin 2006). La production d'espèces réactives de l'oxygène est un processus qui se produit en milieu biologique par exemple par réduction enzymatique de l'oxygène. Ces réactions sont normalement contrôlées par une cascade de signaux et par des enzymes antioxydantes qui vont neutraliser l'excès d'espèces réactives.

L'interaction des cellules avec des nanoparticules peut provoquer la formation accrue d'espèces réactives de l'oxygène. Ceci peut se faire via l'interaction, au niveau de la

membrane plasmique, des nanoparticules avec des enzymes comme les NADPH oxydases qui interviennent dans le stress oxydant. Les nanoparticules peuvent aussi interagir avec des organites source d'espèces réactives de l'oxygène comme les mitochondries ou le réticulum endoplasmique (Unfried 2007). Enfin les nanoparticules peuvent avoir un effet néfaste sur le système antioxydant présent dans les cellules, en diminuant par exemple le niveau intracellulaire de glutathion, qui joue un rôle essentiel dans les mécanismes redox impliqués dans les mécanismes de défense contre le stress oxydatif. Cet effet est progressif et dépend de la taille des particules ainsi que de la concentration à laquelle sont exposées les cellules.

L'étude menée par Akhtar *et al.* sur la toxicité de nanoparticules de silice dans des cellules épithéliales pulmonaires montre que, lorsqu'elles sont exposées aux nanoparticules, ces cellules conservent leur niveau de glutathion mais qu'il y a formation d'espèces réactives de l'oxygène (Akhtar 2010). Cependant, il faut noter que les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène produits restent faibles comparés à d'autres matériaux connus pour induire un fort stress oxydant. Ces résultats peuvent varier puisqu'une autre équipe a mis en évidence la diminution du niveau de glutathion dans des cellules du rein suite à leur exposition à des nanoparticules de silice de 20 et 50 nm de diamètre à différentes concentrations. Par ailleurs, des niveaux assez élevés d'espèces réactives de l'oxygène ont été mesurés dans ces cellules après exposition aux nanoparticules ainsi qu'une peroxydation lipidique au niveau de la membrane (Wang 2009). Dans ce cas, il semble que la production de radicaux soit plutôt liée à la diminution du niveau de glutathion et entraîne l'apoptose des cellules.

Cet effet du stress oxydant a été mis en évidence par Liu *et al.* qui ont montré que l'exposition de cellules endothéliales à des nanoparticules de silice induit leur apoptose via l'interaction néfaste des particules avec les mitochondries. Ces interactions induisent une cascade de signaux intracellulaires qui conduit à la sur-expression de protéines pro-apoptotiques et à la suppression des protéines anti-apoptotiques (Liu 2010).

Il semble que les particules de silice soient parfois capables d'induire directement la formation d'espèces réactives de l'oxygène lors de leur interaction avec la membrane. Ces espèces réactives peuvent alors entraîner une peroxydation des lipides de la membrane qui l'endommage. Par ailleurs, les nanoparticules de silice peuvent entraîner, suite à leur internalisation et à leur interaction avec les différents organites, une dérégulation du signal enzymatique qui conduit à un dysfonctionnement de la cellule. Enfin, lors des études *in vivo*, le stress oxydant peut aussi être généré indirectement par un signal enzymatique déclenché suite à l'internalisation des particules dans des macrophages.

Cependant, une étude récente permet d'envisager la protection contre le stress oxydant induit par les particules de silice par la glutathion transférase 1 microsomale (Shi 2012). Cette enzyme antioxydante, présente dans la membrane des mitochondries et dans le réticulum endoplasmique, joue un rôle de protection contre le stress oxydant et semble, lorsqu'elle est sur-exprimée protéger efficacement les cellules contre le stress oxydant induit par l'exposition aux nanoparticules de silice.

- Génotoxicité

Bien que l'analyse de la localisation intracellulaire des nanoparticules de silice montre que ces dernières sont en général dans des endosomes, dans le cytoplasme ou dans les mitochondries mais rarement au niveau du noyau, certaines études ont mis en évidence une interaction, directe ou indirecte, des nanoparticules de silice avec l'ADN (Park 2011, Gong 2010, Chen 2005) tandis que d'autres montrent l'absence de génotoxicité des particules de silice (Barnes 2008). Bien que de façon générale, les nanoparticules de silice semblent peu génotoxiques, dans la suite sont présentées les différentes causes de génotoxicité qui ont pu être observées pour des nanoparticules de silice.

La génotoxicité des particules de silice peut être liée à une interaction directe des particules dans le noyau. Chen *et al.* ont ainsi montré que, lorsqu'elles sont exposées à des particules de silice entre 40 et 70 nm de diamètre, différentes cellules épithéliales voient leur noyau rapidement (dès 4 heures d'exposition) perturbé (Chen 2005). En effet, ces particules se retrouvent, après internalisation, dans le noyau des cellules. Cette localisation des particules induit la formation de clusters de topoisomérase, une enzyme nucléaire impliquée dans la gestion des problèmes topologiques liés à l'activité nucléaire (réplication de l'ADN, transcription, ségrégation des chromosomes, ...). Ces clusters vont perturber l'organisation du noyau et inhiber la réplication, la transcription de l'ADN et donc la prolifération cellulaire. Nabeshi *et al.* ont montré qu'après exposition cutanée, des particules de silice de 70 nm de diamètre sont retrouvées dans les noyaux des kératinocytes, des cellules HaCaT et des hépatocytes, avec différents effets : les nanoparticules induisent des mutations génétiques dans les cellules HaCaT et, dans les hépatocytes, forment des complexes avec des protéines impliquées dans le transport vers le noyau (Nabeshi 2011).

La génotoxicité induite par les particules de silice peut aussi être liée à la dérégulation d'enzyme intervenant dans le maintien de l'intégrité du génome. Ainsi Gong *et al.* ont-ils montré que l'exposition de cellules épithéliales HaCaT à des particules de silice de 15 nm de diamètre induit une modification de l'expression des enzymes ADN méthyltransférases,

responsables du maintien de la méthylation des cytosines dans le génome. Cette dérégulation peut entraîner des effets à long terme, même lorsque les cellules ne sont plus exposées aux nanoparticules, via l'induction de changement épigénétiques dans le génome (Gong 2010). L'étude de Park *et al.* sur l'effet génotoxique de particules de silice de 10 à 400 nm de diamètre sur des fibroblastes montre que l'endommagement de l'ADN peut être dû à un mécanisme indirect (Park 2011). Les résultats de cette étude montrent que les particules de moins de 80 nm de diamètre induisent des aberrations chromosomiques ou des mutations génétiques alors qu'aucune particule n'a pu être observée dans le noyau. Pour expliquer ces modifications, les auteurs suggèrent deux hypothèses d'interactions indirectes des nanoparticules de silice. La première consiste à dire que la génération de stress oxydant peut endommager l'ADN par réaction avec les espèces réactives générées. La deuxième suggère que l'endommagement de l'ADN pourrait être dû à un effet d'obstacles, constitués par les particules présentes dans des vacuoles dans le cytoplasme, qui gênerait la mitose par modification de la structure d'actine.

- Autres phénomènes induits par la présence des nanoparticules

L'exposition de cellules à des nanoparticules de silice peut induire des modifications morphologiques (Yuan 2010), ultrastructurales (Linthicum 2001) avec par exemple des changements dans la membrane dus à la présence d'acide silicique polymérisé et entraînant la formation de structures multivésiculaires. Les nanoparticules de silice peuvent aussi modifier les capacités d'adhésion et de migration des fibroblastes (Zhang 2010). Par ailleurs la dissolution des nanoparticules de silice peut provoquer des dysfonctionnements et est par exemple responsable de la surproduction de collagène observée dans la silicose (Erdogdu 1998). Enfin, les nanoparticules de silice peuvent avoir un effet néfaste sur le développement embryonnaire (Yamashita 2011, Nelson 2010).

- Doses d'exposition

Les différentes études portant sur la toxicité des nanoparticules de silice font intervenir des doses d'exposition très variables en fonction du but de l'étude. Pour la détermination de la toxicité des particules sur des cellules en culture 2D, les doses utilisées vont généralement de 10 à 500 µg/mL environ, gamme permettant le plus souvent de déterminer la dose létale médiane. Les études de toxicité par diffusion à travers la peau, pour différents matériaux sous forme nanométrique, font intervenir quant à elles des gammes de concentrations plus larges et difficiles à comparer puisqu'elles sont exprimées de différentes façons : en dose massique ou

nombre de particules par surface exposée, en concentration massique, en flux de particules ou encore en dose par rapport au poids de l'animal pour les études *in vivo*.

1.2.2.3 Devenir des nanoparticules internalisées *in vitro*

Malgré le nombre considérable d'études portant sur l'internalisation de particules de silice, mésoporeuses ou non, sur leur toxicité et sur leur potentiel comme vecteurs de principes actifs ou agents d'imagerie, les études concernant le devenir des particules internalisées sont beaucoup plus restreintes. Une fois à l'intérieur d'une cellule, les particules peuvent s'échapper des endosomes ou non. Par la suite, les particules ont plusieurs options : soit elles sont sensibles à l'environnement dans lequel elles se trouvent piégées et elles sont dégradées, soit elle sont excrétées par la cellule par exocytose, soit elles s'accumulent dans la cellule. Les deux premières options sont les plus intéressantes pour des applications biomédicales, la dernière posant le problème d'une exposition sur des temps longs à des doses de plus en plus importantes.

- Devenir des particules de silice présentes dans les endosomes

Lorsqu'elles sont internalisées par les voies d'endocytose les plus courantes, les nanoparticules se retrouvent dans des endosomes. A partir de là, soit elles restent prisonnières et se retrouvent dans des lysosomes, soit elles sont capables de s'échapper des endosomes et peuvent alors être localisées n'importe où dans la cellule. Sur l'ensemble des études concernant l'internalisation de nanoparticules de silice, on constate qu'elles sont majoritairement dans les endosomes-lysosomes (Shapero 2011) et peuvent être localisées dans le cytosol, à proximité des mitochondries mais rarement dans le noyau.

En modulant la surface des particules, il est possible de leur permettre de s'échapper des endosomes et donc d'atteindre d'autres localisations intracellulaires. En effet, des particules chargées négativement, avec une charge importante, sont capables de s'échapper des endosomes dans les 6 heures suivant leur internalisation (Slowing 2006). Ce phénomène est supposé lié à la capacité des particules chargées négativement à capter des protons et donc à perturber le pH des endosomes, avec pour effet de fragiliser leur structure en modifiant le gradient osmotique et permet donc aux particules de s'échapper. Ce même effet peut être obtenu en greffant certains groupements en surface des particules, par exemple des polymères contenant des fonctions amines (Rosenholm 2009, Fuller 2008).

- Exocytose des particules

Il existe un certain nombre de processus qui permettent à la cellule d'internaliser des éléments extérieurs et à l'inverse, il existe aussi un mécanisme d'exocytose qui permet à la cellule de libérer dans l'environnement extérieur certaines molécules. Ce mécanisme est en général utilisé pour excréter des protéines qui sont placées dans des vésicules de sécrétion et transitent ainsi de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique où les vésicules fusionnent avec la membrane pour libérer leur contenu. Certains lysosomes peuvent aussi fusionner avec la membrane pour excréter des "débris" insolubles. Cette voie, dans les cellules non spécialisées, est utilisée en situation de stress (Alberts 2002).

L'exocytose de nanoparticules de silice a été rapportée dans quelques études (Slowing 2011, Hu 2011, Stayton 2009). Ce phénomène dépend de la taille des particules ainsi que du temps d'incubation. En effet, Hu *et al.* ont montré que, pour des particules négatives dans le milieu de culture, de 60 à 600 nm de diamètre, plus les particules sont petites plus elles sont excrétées rapidement et en plus grande quantité (Hu 2011). Par ailleurs, le taux de particules excrétées est d'autant plus faible que le temps d'exposition est long ; l'étude précédente a montré que 63% des particules de 60 nm de diamètre sont excrétées après 12 heures d'exposition alors que ce taux chute à 50% quand le temps d'exposition passe à 24 heures. Cet effet est d'autant plus marqué que le diamètre des particules est grand. Les auteurs de cette étude suggèrent que l'exocytose des particules est partiellement gouvernée par un équilibre de concentration en nanoparticules de silice entre l'intérieur des cellules et le milieu extérieur.

Stayton *et al.* ont aussi mis en évidence l'exocytose de nanoparticules de silice lorsque les cellules ne sont plus exposées à un milieu contenant ces particules (Stayton 2009). Cependant, leur étude souligne que l'exocytose est un processus plus lent que l'endocytose et est incomplet, laissant des particules présentes dans les cellules. Enfin, l'étude menée par Slowing *et al.* sur l'exocytose de nanoparticules de silice mésoporeuses montre que ce processus est moins efficace lorsque le milieu de culture contient du sérum qu'en l'absence de protéines (Slowing 2011). De plus, il est important de noter que selon la lignée cellulaire utilisée, l'exocytose des nanoparticules de silice mésoporeuses est observée ou non. Enfin, cette étude a permis de montrer que des nanoparticules excrétées par les cellules peuvent être internalisées par des cellules voisines.

- Dégradation intracellulaire des particules

Certaines particules modifiées peuvent être sensibles à l'environnement agressif trouvé dans les endosomes et surtout dans les lysosomes. Dans ce cas, les particules peuvent être

dégradées de façon intracellulaire. C'est ce qui est observé pour des particules en polymères biodégradables. Jusqu'à présent, les particules de silice étaient considérées comme non dégradables par les cellules. Cependant, des études menées avec des particules hybrides polymère-silice ont montré une dégradation intracellulaire. Ainsi l'étude de l'internalisation de particules hybrides gélatine-silice a-t-elle montré que le cœur organique des particules est dégradé lors de l'internalisation dans des fibroblastes (Allouche 2006). Par ailleurs, après internalisation dans des fibroblastes, des particules hybrides alginate-silice présentent un aspect beaucoup plus poreux que les particules du milieu extérieur, ce qui suggère une dégradation partielle des particules dans la cellule, probablement initiée au niveau des composantes organiques (Boissière 2006).

Les conditions particulières rencontrées pendant l'internalisation peuvent être exploitées pour rompre des liaisons. Parmi l'ensemble des fonctions clivables de façon intracellulaire, on peut s'intéresser au pont disulfure, liaison exploitée pour greffer des principes actifs sur un vecteur et provoquer leur libération par réduction intracellulaire (Sauer 2010, Yan 2010, Bauhuber 2009, Saito 2003). Bien qu'il existe peu de données sur les protéines réductrices présentes dans les endosomes ou les lysosomes, une enzyme capable de réduire un pont disulfure en conditions acides a été mise en évidence : la thiol-réductase lysosomal gamma-interferon induite (GILT) (Arunachalam 2000).

1.2.3 COMPORTEMENT DES NANOPARTICULES DE SILICE *IN VIVO*

Les nanoparticules de silice sont étudiées pour des applications en imagerie médicale et pour la libération contrôlée de principes actifs, il est donc important de connaître leur comportement *in vivo*. A ce jour, il existe peu d'études sur le devenir *in vivo* des nanoparticules de silice.

1.2.3.1 Pharmacocinétique des nanoparticules dans l'organisme

Pour optimiser le développement des nanoparticules utilisées comme vecteurs de principes actifs, il est nécessaire de connaître leur biodistribution dans l'organisme (Hagens 2007). Après injection intra-veineuse ou application cutanée, les particules vont se retrouver dans la circulation systémique et pouvoir atteindre de nombreux organes dont le foie, la rate, le cœur ou encore le cerveau. Les particules peuvent ensuite être éliminées de l'organisme soit par dégradation métabolique soit par excrétion via les reins, la bile. Il semblerait que la nature chimique ainsi que les caractéristiques morphologiques des particules jouent un rôle sur leur

temps de résidence dans l'organisme, leur localisation et leur éventuelle élimination. Le suivi précis du devenir des nanoparticules dans l'organisme et l'adaptation des modèles pharmacocinétiques, utilisés pour les principes actifs, aux nanoparticules permettra de déterminer les paramètres qui contrôlent le temps de résidence, la localisation et l'élimination des particules (Li 2010).

1.2.3.2 Biodistribution et évacuation des particules de silice *in vivo*

- Influence de la taille des particules

Après injection intraveineuse chez le rat, Kumar *et al.* ont observé l'accumulation des particules de silice de 20 nm négatives dans le foie et la rate (environ 75% de la dose injectée) tandis que d'autres organes comme les poumons, les reins ou le cœur présentent une accumulation de particules faible 24 heures après l'injection (Kumar 2010). Cependant ces mesures sont faites par fluorescence, le signal pour le foie et la rate peut être dû aux particules présentes dans l'organe ou dans les nombreux vaisseaux qui le traversent. Ils observent aussi l'excrétion d'une partie des particules par la voie hépato-biliaire ainsi que leur dégradation dans le foie. 15 jours après l'injection, aucun des tissus analysés ne présente de signal de fluorescence dû aux nanoparticules. Les animaux traités ont par ailleurs été suivis pendant un mois après l'injection et ne présentaient pas de changements physiologiques ou neurologiques. Ces particules semblent donc de bons candidats pour l'imagerie *in vivo*.

Une autre étude du comportement de nanoparticules de silice, de 20 nm et 80 nm, *in vivo* après injection intraveineuse chez le rat a donné des résultats légèrement différents. Xie *et al.* ont ainsi montré que ces particules s'accumulent majoritairement dans le foie, la rate et les poumons mais sont peu présentes dans le sang, le cœur, les reins, l'estomac ou le cerveau (Xie 2010). Dans ces différents organes, la quantité de particules accumulées décroît avec le temps mais après 30 jours, l'iode radioactif intégré dans les particules est toujours présent dans le foie et la rate. Cette accumulation de particules pendant un temps long induit une réponse inflammatoire dans le foie. Cependant, il est intéressant de noter que les quantités de particules accumulées dans ces différents organes sont plus importantes pour les particules plus petites.

- Influence de la surface des particules

Un autre facteur pouvant moduler l'accumulation des particules dans les différents organes est la nature ainsi que la charge de surface (Souris 2010, van Schooneveld 2008). L'étude de Souris *et al.* montre que les particules de silice mésoporeuses de 70 nm chargées positivement (+34 mV) sont rapidement excrétées du foie et se retrouvent dans le tractus gastro-intestinal pour être éliminées de l'organisme. A l'inverse, les particules négatives (-17 mV) s'accumulent dans le foie et restent plusieurs jours, voire plusieurs mois, dans l'organisme. Il semble donc qu'une charge de surface positive soit préférable pour l'utilisation des nanoparticules de silice dans le domaine médical puisqu'elle favorise leur élimination de l'organisme. De même, la présence de groupements lipidiques en surface des particules améliore la biocompatibilité et le profil pharmacocinétique des nanoparticules (van Schooneveld 2008). La modification de surface permet d'éviter l'agrégation des particules qui semble jouer un rôle crucial sur les voies d'élimination des particules des organes et de l'organisme.

- Temps et mode d'exposition

En fonction du mode d'administration des particules et du temps d'exposition, la toxicité observée peut varier. Par exemple, des nanoparticules mésoporeuses injectées par voie sous-cutanée présentent une bonne biocompatibilité *in vivo* chez le rat et sont lentement éliminées tandis que ces mêmes particules sont létales lorsqu'elles sont injectées par voie intra-veineuse (Hudson 2008). Par ailleurs, le temps d'exposition est un facteur important puisque les effets d'une exposition courte, prolongée ou chronique peuvent être assez différents. De façon générale, plus le temps d'exposition est long plus la toxicité, du moins l'effet sur la viabilité cellulaire est important (Lin 2006).

- Un exemple d'utilisation : le traitement des cellules cancéreuses

Lu *et al.* ont montré que des nanoparticules de silice mésoporeuses de 100 nm de diamètre permettent de libérer un agent de traitement après s'être accumulées préférentiellement dans les cellules cancéreuses. De plus, leur étude montre que les nanoparticules sont en grande partie excrétées et les animaux ne présentent pas de lésions ou d'anomalies histopathologiques liées à l'exposition aux nanoparticules. En outre, chez les animaux traités, les tumeurs sont significativement réduites, montrant ainsi l'efficacité *in vivo* du traitement utilisant des nanoparticules de silice comme vecteurs. Le développement de ces particules pour des traitements semble donc prometteur.

1.3 Bilan et objectifs de l'étude

La quantité d'études existant sur l'utilisation de nanoparticules de silice dans le domaine médical montre l'intérêt suscité par ce matériau, candidat prometteur pour des utilisations dans l'imagerie médicale, la libération intracellulaire contrôlée de principes actifs ou l'analyse biologique. La silice possède en outre l'avantage d'un mode de synthèse permettant d'obtenir des particules de tailles et morphologies contrôlées et il existe un large éventail de groupements permettant de fonctionnaliser la surface.

Par ailleurs, les études sur la silice montrent que l'agrégation et la dissolution de nanoparticules de silice ont lieu en milieu biologique mais sont modulées par différents facteurs comme les caractéristiques des particules, le pH, la concentration en sels ou encore la présence de protéines.

A l'échelle cellulaire, les nanoparticules de silice sont internalisées dans de nombreuses lignées cellulaires. La nature et la cinétique de ce processus varient en fonction des caractéristiques des particules, du temps d'exposition et de la lignée cellulaire. La voie d'internalisation rencontrée le plus fréquemment est l'internalisation par voie clathrine qui mène les particules dans des endosomes. Certaines particules restent piégées dans ces endosomes qui se transforment ensuite en lysosomes, tandis que d'autres s'en échappent et se retrouvent dans le cytoplasme mais rarement dans le noyau. Malgré le nombre important d'études *in vitro* sur la toxicité de ces nanoparticules de silice, il est difficile de conclure de façon générale. Lorsqu'une toxicité est notée, il peut s'agir de cytotoxicité provoquée par un stress oxydant ou une perturbation de la membrane plasmique, ou d'une toxicité au niveau génétique, parfois liée à la précédente.

Enfin, bien que l'endocytose de nanoparticules de silice ait été mise en évidence dans de nombreuses études, il existe encore peu de données sur leur devenir à long terme une fois dans les cellules. Quelques études montrent cependant que des particules de silice peuvent être excrétées par les cellules voire être partiellement dégradées de façon intracellulaire.

L'ensemble des applications envisagées pour les nanoparticules de silice implique de connaître, et si possible comprendre, les mécanismes d'interactions de ces nanoparticules avec les cellules et plus généralement leur comportement en milieu biologique. De l'ensemble des études présentées il ressort la nécessité d'une caractérisation précise des particules dans des conditions aussi proches que possible de celles rencontrées en milieu biologique. La première partie de l'étude consiste donc à caractériser les différentes nanoparticules

synthétisées et évaluer l'influence de la taille, la charge de surface et la composition sur leur stabilité en milieu biologique (agrégation, dissolution).

Au vu de l'utilisation actuelle des nanoparticules de silice dans des produits cosmétiques, l'exposition par voie cutanée est un problème réel. Lors de leur diffusion à travers la peau, les nanoparticules de silice vont rencontrer des cellules. Il est donc intéressant d'étudier le comportement des nanoparticules de silice en présence de cellules du derme. Dans ce cas, on cherche à répondre aux questions suivantes : les particules sont-elles internalisées ? Sont-elles toxiques ? Quelle est l'influence de leurs caractéristiques sur ces deux phénomènes ? Et enfin, quel est leur devenir à long terme après exposition aux cellules ?

Pour se rapprocher des conditions d'exposition cutanée, volontaire ou involontaire, les cellules sont immobilisées dans un hydrogel de collagène, modèle de derme. On cherche alors à répondre aux questions suivantes : quelle est l'influence des caractéristiques des particules sur leur diffusion et leur comportement dans les gels de collagène ? Les caractéristiques de ces derniers modifient-elles ces phénomènes ? Les particules de silice sont-elles internalisées dans les cellules immobilisées, sont-elles toxiques ?

Enfin, quelques études sur le devenir de particules internalisées suggèrent que la modification des particules de silice peut favoriser leur dégradation intracellulaire. Dans ce cas, on peut se poser la question suivante : peut-on favoriser la dégradation intracellulaire de particules de silice en intégrant dans la matrice une fonction que les cellules sont capables de dégrader comme un pont disulfure ? Avant de pouvoir y répondre, il est nécessaire de vérifier plusieurs choses : est-il possible de synthétiser des particules dont le cœur contient des ponts disulfures ? Les ponts disulfures ainsi incorporés modifient-ils le comportement des nanoparticules dans les cellules ? Enfin, si c'est le cas, ces particules peuvent-elles être utilisées pour des applications thérapeutiques ?

Chapitre 2

Caractérisation des nanoparticules

2.1 MORPHOLOGIE ET TAILLE DES NANOPARTICULES SYNTHETISEES	59
2.2 STRUCTURE	64
2.3 STABILITE EN MILIEU BIOLOGIQUE	71
2.4 CONCLUSIONS	80

Les effets biologiques variés et parfois contradictoires observés pour les nanoparticules montrent l'importance d'une caractérisation précise et multi-technique. Le premier niveau de caractérisation consiste à déterminer la taille, la forme et la charge de surface des particules. Dans le cadre d'une étude de ces nanoparticules en suspension en milieu biologique, il faut ensuite s'intéresser à leur stabilité dans de telles conditions : agrégation et/ou dissolution. La connaissance de la stabilité intrinsèque des nanoparticules en solution aqueuse ne suffit pas puisque la présence de sels, de protéines, le pH ou la température sont autant de facteurs pouvant modifier ces processus. Ainsi la première partie de ce travail consiste-t-elle à caractériser les nanoparticules synthétisées ainsi qu'à étudier leur stabilité en milieu biologique.

Les nanoparticules de silice peuvent être obtenues via différentes voies de synthèse : par le procédé Stöber "classique" (Stöber 1968, Bogush 1988, Rao 2005) ou modifié (Yokoi 2009, Fouilloux 2010, Hartlen 2008), par émulsion (Arriagada 1995, Gan 1996) ou par spray (Iskandar 2003). Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser la méthode sol-gel en utilisant des méthodes dérivées de la synthèse de Stöber. Cette synthèse est basée sur l'hydrolyse-condensation d'un tétraalcoxyde de silicium catalysée en milieu basique. Le TEOS ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, TetraEthoxyOrthoSilicate) est d'abord hydrolysé en acide silicique qui va se condenser pour former des oligomères ou de petites particules constituées de quelques oligomères. Ces objets se forment jusqu'à atteindre la stabilité colloïdale, favorisée en milieu basique. On a alors un certain nombre de particules qui vont ensuite croître, dans une réaction limitée par l'hydrolyse du précurseur et former des particules sphériques (van Blaaderen 1992). Lors de la synthèse, il est possible d'incorporer un organosilane, qui va co-condenser avec le TEOS et se retrouver réparti dans les particules finales aussi bien en surface que dans le cœur des nanoparticules (van Blaaderen 1992).

Dans le cadre de cette étude, il est nécessaire de pouvoir suivre les nanoparticules au cours du temps. C'est pourquoi les particules synthétisées sont rendues fluorescentes par incorporation de fluorescéine. Une simple adsorption basée sur des interactions électrostatiques de la fluorescéine avec la silice laisserait une ambiguïté quant à l'espèce suivie par fluorescence : nanoparticules ou FITC désorbée. Afin de ne pas être confronté à ce problème, la fluorescéine est greffée de façon covalente sur un aminopropylsilane. Ce silane-FITC est ajouté lors de la synthèse afin de permettre la co-condensation de l'aminopropylsilane et du TEOS et d'obtenir des nanoparticules uniformément fluorescentes. (van Blaaderen 1992, Roy 2010) Le greffage covalent a un autre intérêt dans la mesure où il permet d'avoir accès qualitativement au processus de dissolution, seul moyen de libérer l'espèce fluorescente.

2.1 Morphologie et taille des nanoparticules synthétisées

La synthèse par voie sol-gel utilisée permet d'obtenir des particules sphériques. Une série de nanoparticules de silice fluorescentes avec différentes tailles (de 10 à 200 nm) a été préparée en modifiant le procédé décrit par Stöber. Pour des particules de diamètre supérieur à 30 nm, le tétraéthoxysilane a été hydrolysé dans une solution d'ammoniaque dans l'éthanol, puis la solution APTES-FITC – obtenue par condensation de l'aminopropyltriéthoxysilane avec la fluorescéine isothiocyanate (Nyffeneger 1993) – a été ajoutée avant la formation des colloïdes. Les particules de diamètre plus petit ont été obtenues en utilisant une solution aqueuse de lysine comme catalyseur basique au lieu de l'ammoniaque (Thomassen 2010).

En effet, le procédé décrit par Stöber ne permet pas d'obtenir facilement des particules monodisperses de moins de 30 nm de diamètre. Ceci est dû au manque de contrôle de l'étape de nucléation dans ce procédé. Pour obtenir des particules dans cette gamme de taille, la synthèse se fait par émulsion de TEOS dans une solution aqueuse d'acides aminés : L-lysine ou L-arginine (Hartlen 2008, Yokoi 2009, Fouilloux 2010 et 2012). Une suspension de colloïdes d'environ 5-6 nm de diamètre est très vite obtenue. La monodispersité de cette suspension est due à l'augmentation lente de la saturation de la solution en précurseur de silice, puisque le TEOS est initialement situé dans une couche organique, jusqu'à atteindre une valeur critique qui induit la nucléation de particules en nombre suffisant pour absorber tous les monomères produits. Après 12 heures de chauffage à 60°C, l'émulsion devient une dispersion homogène et les particules formées peuvent croître. De plus, les acides aminés peuvent s'adsorber à la surface des particules de silice en formation et favoriser ainsi le contrôle de leur taille finale. En variant les concentrations en réactifs et la température, la taille des particules obtenues peut être ajustée pour obtenir une suspension monodisperse de particules de diamètre inférieur à 30 nm.

Pour l'ensemble de ces particules (synthétisées par voie Stöber ou lysine), la fluorescéine est présente à la fois en surface et dans le cœur des particules (Figure 2.1) (Imhof 1999). Dans la suite de ce manuscrit, ces particules seront appelées "pleines", par comparaison avec les particules modifiées avec un second organosilane, décrites ci-après, et notées $Si_{\pm x}$ où x représente le diamètre moyen observé en DLS et \pm le signe du potentiel zêta.

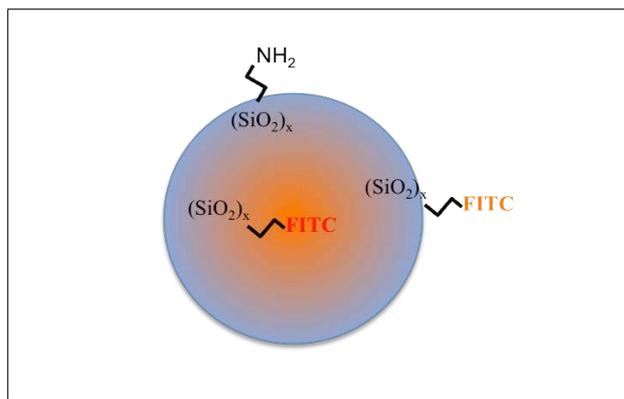


Figure 2-1: Structure schématique des nanoparticules fluorescentes

Par ailleurs, pour étudier l'influence de la présence de fonctions disulfures, qui peuvent être réduites de façon intracellulaire, sur le comportement des particules avec les cellules, une série de particules incorporant une quantité croissante de ponts disulfures (de 0 à 40% en masse de la quantité de TEOS) a été synthétisée. Ces particules ont été obtenues par incorporation de différentes quantités d'un disilane contenant un pont disulfure (BTSPD : Bis(TriethoxySilyl-Propyl)Disulfide) (figure 2.2) avant l'introduction de la solution APTES-FITC lors de la synthèse. Ces particules seront par la suite dénommées n%SS où n représente le taux massique de disulfure par rapport au TEOS ajouté lors de la synthèse.

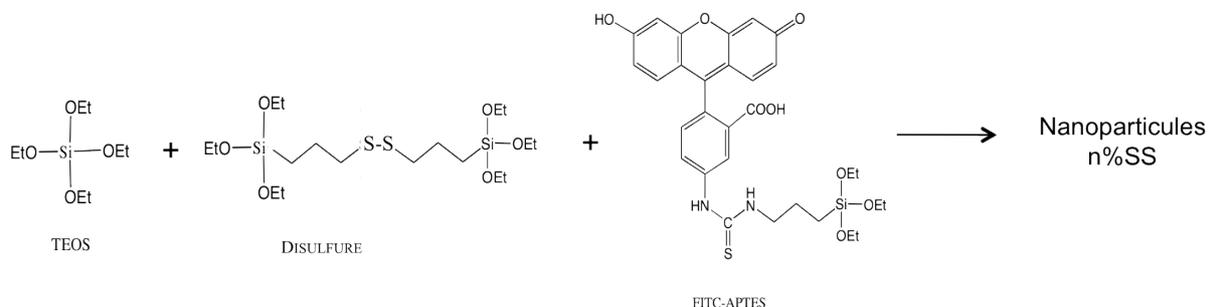


Figure 2-2: Equation bilan de la synthèse des particules n%SS

Une première étude par diffusion dynamique de la lumière (DLS) a permis d'obtenir le rayon hydrodynamique des nanoparticules ainsi que leur état d'agrégation dans une suspension à 0,6 mg/mL. Le tableau 2.1 montre que les différentes nanoparticules synthétisées – avec et sans pont disulfure- sont monodisperses dans l'eau et initialement dans le milieu de culture. De plus, la DLS permet de voir si ces nanoparticules sont stables en suspension. On observe ainsi pour les particules pleines une agrégation des nanoparticules de 200 nm de diamètre dans l'eau, phénomène qui reste limité, tandis qu'aucune agrégation n'est observée pour les particules plus petites. Par contre, lorsque ces particules sont mises en suspension dans du

milieu de culture, on observe la formation d'un précipité en quelques heures, ce phénomène étant d'autant plus rapide que les particules sont grosses (figure 2.3).

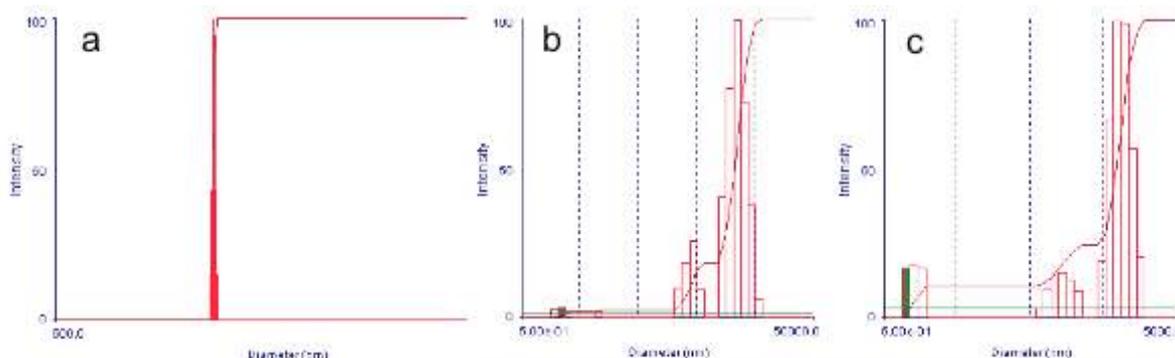


Figure 2-3: Suivi de l'agrégation des nanoparticules fluorescentes dans le milieu de culture à 37°C par DLS, a) Si+200 après 2 heures dans le milieu, b) Si+60 après 6 heures, c) Si-10 après 24 heures

En ce qui concerne les nanoparticules incorporant les ponts disulfures, on observe des suspensions peu stables, que ce soit dans l'eau ou dans le milieu de culture, pour des taux de ponts disulfures supérieurs ou égaux à 20% dans les particules fluorescentes. A des taux en ponts disulfures comparables, les particules non fluorescentes se présentent comme des suspensions stables dans l'eau. Par contre, quel que soit le taux de ponts disulfures ajouté, le diamètre des particules ne varie pas (tableau 2.1).

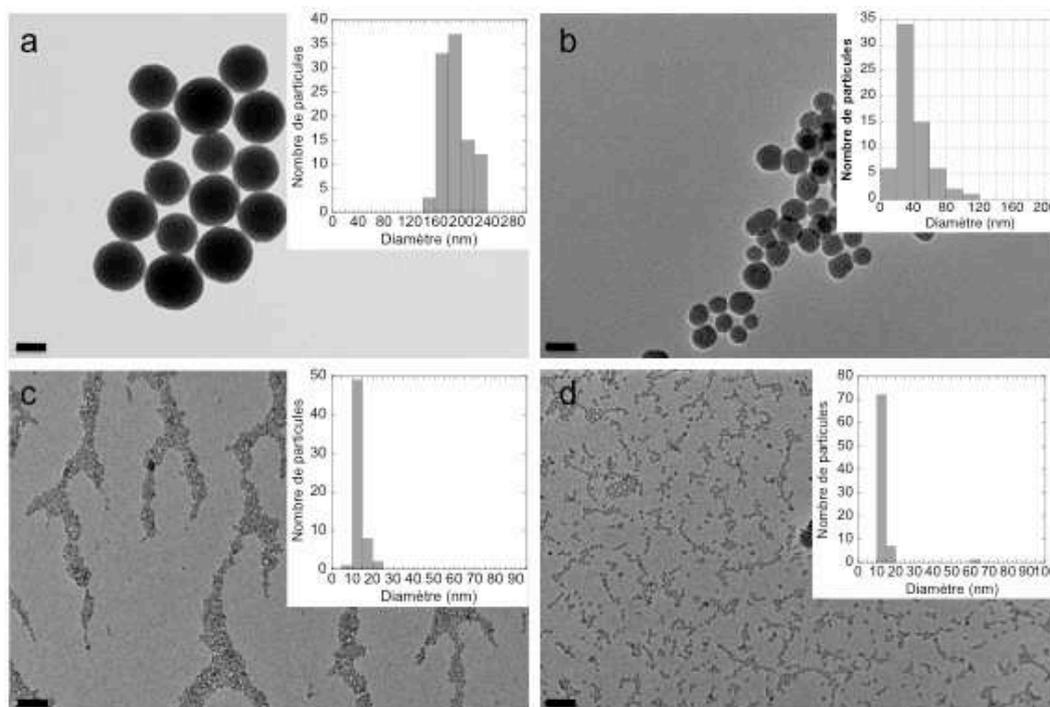


Figure 2-4: Images MET et analyse statistique de la taille des particules pleines fluorescentes: (a) Si+200, (b) Si+60, (c) Si+10, (d) Si-10 (barre 100 nm)

Caractéristiques Nanoparticules	Diamètre (nm)		Potentiel ζ (mV)		Taux de FITC	Surface spécifique ($m^2 \cdot g^{-1}$)	Constante de dissolution dans le milieu de culture ($mg \cdot mL^{-1} \cdot min^{-1}$)
	DLS	MET	eau	milieu			
Si+200	230 ± 15	175 ± 20	+50 ± 4	-3 ± 3	0,10%	8 ± 2 *	7,84
Si+60	60 ± 15	40 ± 15	+56 ± 5	-5 ± 3	0,07%	35 ± 10 *	0,41
Si+10	n.d.	10 ± 3	+42 ± 4	-5 ± 3	0,02%	136 ± 46 *	0,12
Si-10	n.d.	10 ± 5	-18 ± 4	-23 ± 4	0,02%	136 ± 46 *	0,035
SS0%	50 ± 15	38 ± 5	+54 ± 2	+8 ± 2	0,11%	71,5	0,061
SS10%	81 ± 15	44 ± 7	+16 ± 3	+5 ± 2	0,06%	71	0,088
SS20%	150 ± 25	45 ± 7	-3 ± 2	+4 ± 3	0,05%	187	0,023
SS30%	149 ± 20	48 ± 5	+2 ± 2	+13 ± 4	0,04%	144	0,0092
SS40%	180 ± 25	46 ± 7	-1 ± 2	+13 ± 4	0,03%	87	0,012
Si200 non fluo	255 ± 15	190 ± 18	+25 ± 5	-11 ± 3	-	-	-
SS20% non fluo	108 ± 15	-	-30 ± 1	+7 ± 2	-	242	-
SS40% non fluo	110 ± 20	-	-30 ± 2	+16 ± 3	-	217	-

Tableau 2.1: Caractéristiques des nanoparticules synthétisées

La microscopie électronique en transmission permet de confirmer la taille des particules et leur forme sphérique quelle que soit la synthèse (tableau 2.1, figures 2.4 et 2.5). On peut observer en outre que les particules pleines apparaissent homogènes sur les images de MET. Par contre, on constate que lorsque le taux de ponts disulfures augmente, une hétérogénéité de la densité électronique au sein des nanoparticules apparaît, suggérant la formation de "poches" organiques de 7 à 10 nm de diamètre – contenant une grande quantité d'organosilanes - au sein de la matrice de silice.

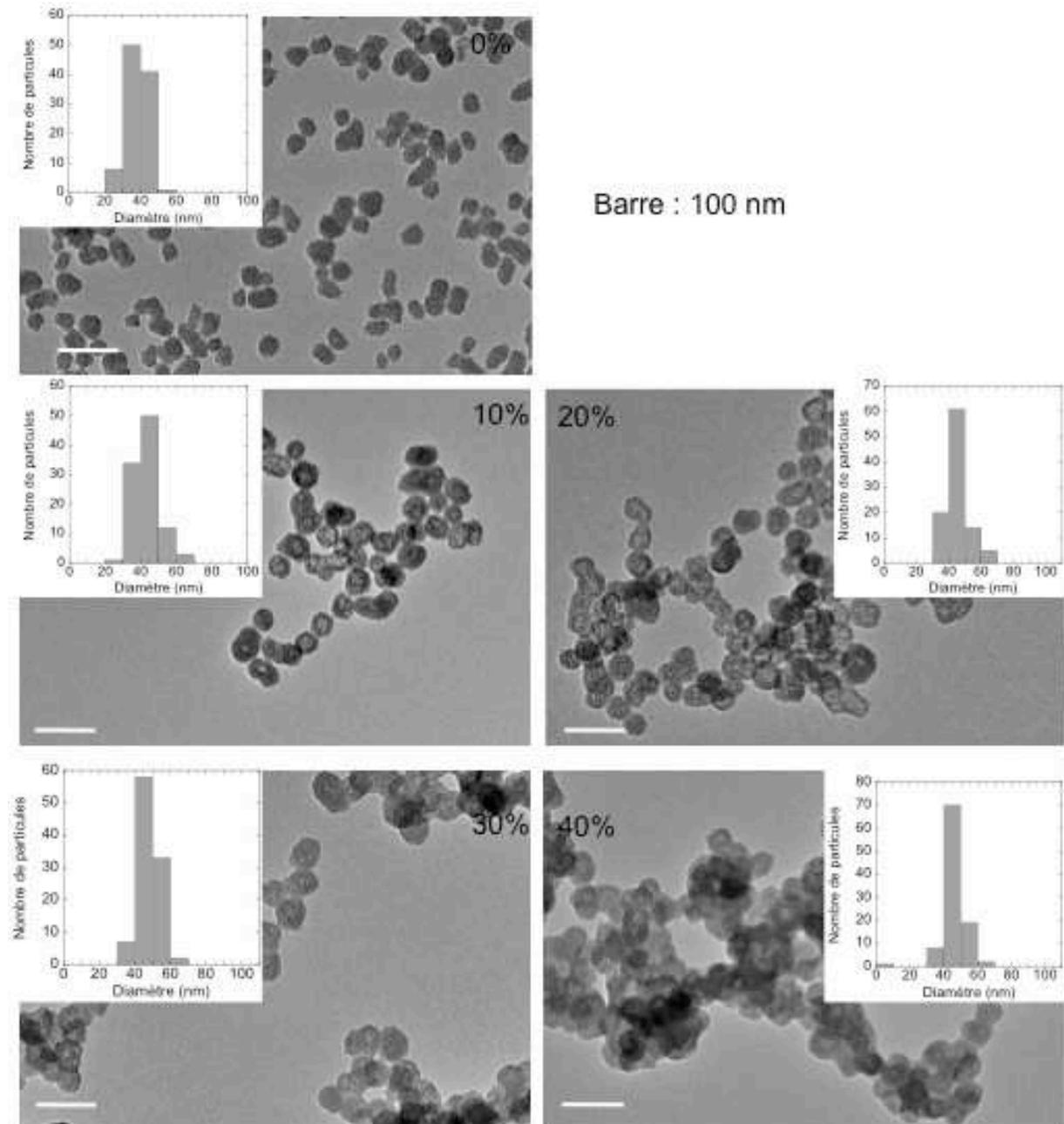


Figure 2-5: Images en MET des nanoparticules incorporant des ponts disulfures et analyse statistique de la dispersion en taille

Une fois ces premiers paramètres définis, il se pose la question de la structure des particules : quelle quantité de fluorophore a-t-on introduit dans les particules ? La structure est-elle modifiée par l'ajout d'organosilane(s) ? Comment expliquer la différence de stabilité des particules ?

2.2 Structure

2.2.1 CHARGE DE SURFACE

On a vu lors de l'étude DLS que certaines nanoparticules étaient peu stables en suspension. La diminution des interactions électrostatiques répulsives stabilisantes dues au greffage en surface d'organosilanes peut expliquer ce phénomène. La mesure du potentiel ζ permet de mettre en évidence le greffage en surface d'organosilanes. En effet, cette mesure permet d'avoir accès à la charge de surface des particules en mesurant leur mobilité. Lorsqu'une particule chargée est placée en suspension, il y a à l'interface une réorganisation locale des ions. A proximité de la surface chargée de la particule on trouve une première couche composée majoritairement d'ions de charge opposée (couche de Stern), en interaction forte avec la surface de la particule. Puis on trouve une couche diffuse, dans laquelle les ions sont en interaction plus faible avec la particule. Au sein de cette couche diffuse, il existe une limite qui définit une entité stable composée de la particule et des ions qui l'entourent, et qui correspond au diamètre hydrodynamique. Lorsque la particule est en mouvement, les ions contenus dans cette limite suivent le mouvement de la particule. Le potentiel à ce niveau mesuré par l'appareil est le potentiel zêta. Le potentiel zêta reflète donc le nombre de charges présentes en surface des particules.

On s'intéresse dans un premier temps à la charge des particules pleines dans l'eau (tableau 2.1). Les particules non fluorescentes présentent une charge de surface négative due à la présence de groupements silanols déprotonés en surface des particules. Ce potentiel est suffisamment bas pour que les interactions électrostatiques répulsives entre particules stabilisent la suspension. Les particules fluorescentes de plus grande taille, obtenues par modification du procédé Stöber, présentent une charge de surface positive (Si+200 et Si+40), au contraire des particules de 10 nm de diamètre obtenues avec la lysine (Si-10).

Les seuls groupements pouvant apporter une charge positive sont les groupements ammonium de l'APTES. Lors de la synthèse de la solution APTES-FITC, l'APTES est mis en excès pour s'assurer que tous les groupements FITC sont greffés de façon covalente. Ainsi l'APTES-FITC ainsi que l'APTES libre peuvent-ils condenser en surface des particules, lors de la synthèse de particules, apportant respectivement une charge neutre et une charge positive. Il y a donc suffisamment de groupements en surface pour écranter les groupements silanolates et aboutir à une charge globale positive. Dans le cas des particules obtenues avec la lysine, on observe une charge de surface initialement négative $\zeta = -18$ mV, mais moins négative que pour des particules de silice pure. Ceci indique qu'il y a un effet d'écran des charges négatives des groupements silanolate par les fonctions NH_3^+ de la lysine. Ces particules ont, en parallèle, été post-fonctionnalisées avec de l'APTES, ce qui leur confère une charge positive comparable aux nanoparticules de 60 et 200 nm de diamètre. Ainsi avons-nous à notre disposition une gamme de particules positives de 10 à 200 nm de diamètre.

L'étude de la série des nanoparticules n%SS montre une évolution de la charge de surface avec le taux de disulfure. En effet, l'ajout de 10% de disulfure diminue le potentiel ζ dans l'eau de + 54 mV à + 16 mV. Ceci peut s'expliquer par l'incorporation de disilane dans l'ensemble de la structure, incluant la surface, apportant une charge globale neutre et diminuant le nombre de groupements NH_3^+ présents en surface. Lorsque le taux de disulfure ajouté est supérieur ou égal à 20%, on observe un potentiel ζ approximativement nul, et ce quel que soit le taux de disulfure entre 20 et 40%. L'absence d'évolution significative de la charge de surface au-delà d'un taux seuil en ponts disulfures (situé entre 10% et 20% massique) peut traduire le greffage en surface du disulfure apportant une charge globale neutre à la place de l'APTES apportant une charge positive.

Il est intéressant de comparer ces résultats avec la charge de surface observée pour les particules contenant 20% et 40% de disulfure mais non fluorescentes. Dans ce cas, le potentiel zêta ne varie pas et vaut environ -30 mV. Si on augmentait le nombre de disulfures greffés en surface en passant de 20% à 40%, on devrait observer une diminution de la valeur absolue de la charge de surface. En effet dans ce cas, les disulfures de charge neutre remplaceraient des groupements silanolates chargés négativement et de ce fait amèneraient à une charge globalement moins importante. Or ce n'est pas ce qui est observé. On peut donc émettre l'hypothèse qu'au-delà de 20% en masse, le nombre de disulfures greffés en surface évolue peu et a atteint une valeur limite. Cette hypothèse permettrait aussi d'expliquer l'évolution du potentiel zêta dans les particules fluorescentes.

Lorsque les particules sont en suspension dans le milieu de culture, la présence de sels et de protéines peut modifier la charge de surface apparente (Rezwan 2005). Ainsi observe-t-on une modification importante de la charge des particules pleines initialement positives qui, par adsorption de protéines, deviennent neutres. La formation de cette couronne de protéines, en modifiant la charge de surface, va modifier la stabilité des nanoparticules dans le milieu. Par contre, les particules initialement négatives vont conserver une charge apparente négative, due à une différence d'adsorption des protéines présentes dans le milieu de culture. En effet, pour des surfaces hydrophiles comme la silice, les interactions électrostatiques sont le facteur principal gouvernant l'adsorption de protéines. En prenant l'exemple de l'albumine de sérum bovin, protéine présente en quantité importante dans le milieu complet, on constate que cette protéine s'adsorbera plus sur une surface chargée positivement que sur une surface négative (Rezwan 2005). Cette protéine étant chargée négativement, il en résulte qu'après adsorption en surface, la particule entourée de protéines présente une charge moindre.

Dans le cas des particules n%SS, entre 0 et 20% en disulfure on obtient des particules presque neutres dans le milieu de culture ; par contre, pour des taux de disulfure de 30% ou 40% on obtient des particules légèrement positives : $\zeta = +13$ mV. Cette différence de charge de surface dans le milieu de culture est due à une interaction différente des particules avec les protéines selon que le taux de disulfure est supérieur ou inférieur à 20%. Ces interactions différentes reflètent la différence de surface en terme de groupements chimiques, même si la charge globale est neutre dans l'eau pour l'ensemble de ces particules.

2.2.2 GREFFAGE DU FLUOROPHORE

La quantité de fluorescéine incorporée dans les particules peut être déterminée par spectroscopie d'absorption UV-visible puisque la fluorescéine absorbe avec un maximum situé à 494 nm. Afin de mesurer l'absorbance de la fluorescéine, il est nécessaire d'hydrolyser au préalable les nanoparticules pour éviter les interférences dues à la diffusion. Cette mesure permet de quantifier le nombre de groupements fluorescents par particule. On observe un taux de fluorescéine d'environ 0,1% en mole par rapport à la silice dans l'ensemble des nanoparticules étudiées (tableau 2.1). Dans le cas des particules n%SS, ce rapport diminue lorsqu'on augmente la quantité de disilane introduite dans les particules. De même ce rapport diminue avec la taille des nanoparticules.

Lors de la synthèse, on ne peut incorporer qu'un nombre réduit d'organosilane. De ce fait, lorsqu'on augmente la quantité de disulfure, la taille des particules restant constante, on diminue le nombre de molécules APTES-FITC qui vont s'incorporer dans les particules. De même, lorsqu'on diminue la taille des nanoparticules, on incorpore un peu moins de fluorescéine par mole de particules. En effet, bien que la surface augmente lorsqu'on diminue la taille des particules, le volume des particules diminue et peut donc contenir moins de FITC. Les deux phénomènes vont en sens inverse et se compensent partiellement, d'où l'évolution faible du taux de fluorescéine pour les particules entre 10 nm et 200 nm de diamètre.

2.2.3 COMPOSITION

Pour la compréhension du comportement des nanoparticules, il est nécessaire de connaître la composition de ces dernières afin de savoir quelle quantité d'organosilane a été intégrée. Cette démarche est d'autant plus importante dans le cas des particules modifiées par introduction d'une quantité croissante de ponts disulfures afin de connaître la gamme réelle d'étude. La composition est obtenue par analyse élémentaire (tableau 2.2) pour déterminer le taux d'incorporation des ponts disulfures dans les différentes particules.

Nanoparticules	S	Si	C	N	S/Si	S/Si théorique
0%SS	-	38,8	2,39	0,55	-	-
10%SS	2,63	37,4	4,76	0,41	7 %	8,85 %
20%SS	3,48	36,4	7,97	0,48	9,5 %	16,4 %
30%SS	4,74	35,4	9,34	0,44	13,4 %	22,9 %
40%SS	6,50	33,9	11,45	0,48	19,2 %	28,6 %
20%SS non fluorescentes	4,24	36,2	8,27	-	11,7 %	16,5 %
40%SS non fluorescentes	6,77	34,0	12,27	-	19,9 %	29,0 %

Tableau 2-2 : Composition des nanoparticules n%SS obtenue par analyse élémentaire (% massique des éléments)

On observe ainsi comme attendu une augmentation du rapport S/Si quand on augmente la quantité de disulfure ajoutée. Il est intéressant de noter que l'ajout de fluorescéine modifie peu l'incorporation de disulfure dans les particules, comme l'attestent les compositions des particules 20%SS et 40%SS fluorescentes et non fluorescentes. On peut noter aussi que la composition des particules 10%SS correspond à 80% de la composition initiale du mélange

lors de la synthèse. Par contre, pour les particules avec plus de 20% de disulfure, fluorescentes ou non, le rapport soufre/silicium dans les particules finales correspond à environ 60-70% de la composition initiale.

En combinant le taux de FITC obtenu par analyse UV-visible et les compositions données par l'analyse élémentaire, on s'aperçoit que les différents silanes ne sont pas entièrement hydrolysés. En effet, pour rendre compte du pourcentage massique en carbone obtenu il faut considérer qu'il reste des groupements éthoxy dans les particules. La quantité de groupements éthoxy présents dans les particules indique que le degré de condensation varie en fonction du taux de disulfure. Ce point sera abordé plus en détail dans le chapitre 5 avec l'étude par RMN du solide.

2.2.4 POROSITE ET SURFACE SPECIFIQUE

Une dernière caractéristique qui peut être nécessaire à la compréhension des phénomènes observés est la porosité des nanoparticules. En effet, la porosité peut modifier notablement le comportement de ces dernières, notamment vis-à-vis de la dissolution.

Les nanoparticules pleines n'ont pas été étudiées par sorption d'azote et la surface spécifique a été estimée par calcul. Par contre cette approche a été utilisée pour déterminer la surface spécifique et la porosité des nanoparticules n%SS (tableau 2.3, figure 2.6). L'introduction de disulfure modifie les interactions entre les nanoparticules, provoquant éventuellement la formation d'agrégats. La structure de ces agrégats peut être perturbée lors de l'adsorption-désorption d'azote, ce qui implique que les résultats présentés ci-après doivent être analysés avec prudence. L'ensemble des isothermes d'adsorption-désorption et les analyses de distribution de taille de pores sont présentés en annexe.

En observant les premiers points des isothermes d'adsorption, on constate que l'introduction d'une quantité suffisante de disulfure modifie la microporosité des particules (figure 2.6). En effet, au delà de 10% de disulfure, les particules deviennent microporeuses et voient par conséquent leur surface spécifique augmenter (tableau 2.3).

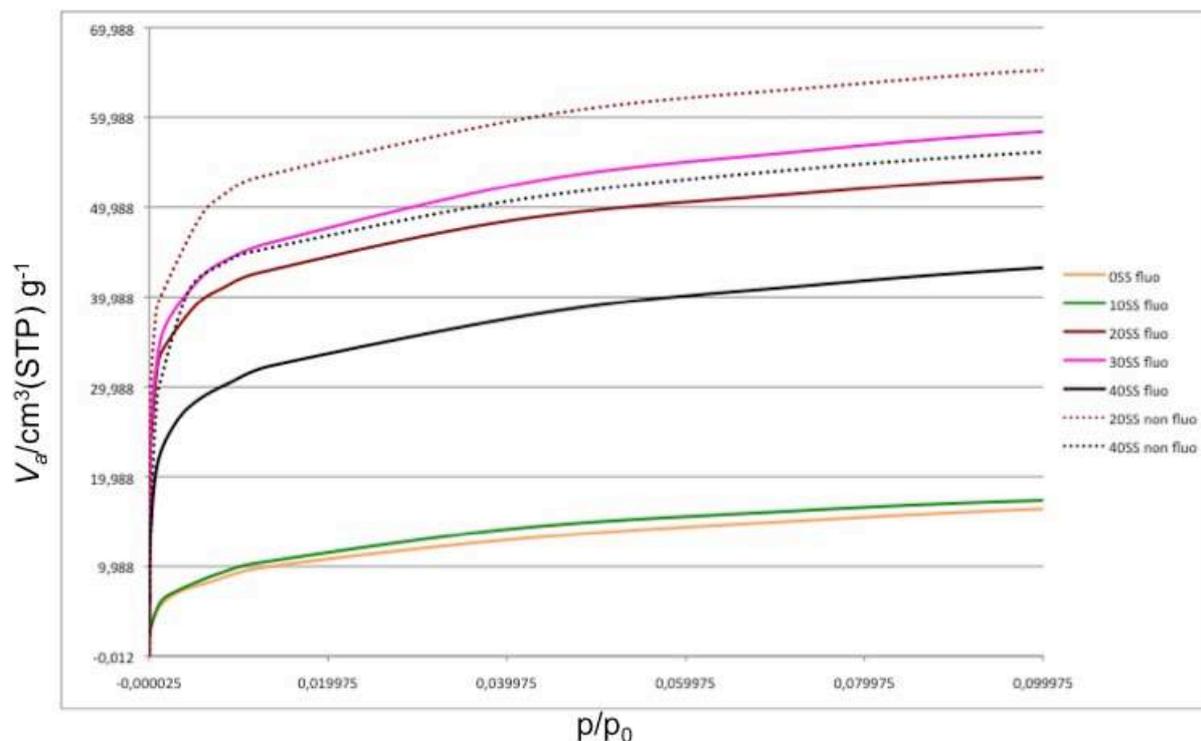


Figure 2-7 : Zoom sur les premiers points de l'isotherme d'adsorption d'azote pour les particules n%SS

Cette microporosité est d'autant plus importante que la quantité de disulfure ajoutée est grande, entre 10% et 30% ; entre 30 et 40% de disulfure, la microporosité diminue mais reste plus importante que pour les particules 0%SS ou 10%SS. En outre, on constate que les particules 20%SS et 40%SS non fluorescentes (i.e. sans APTES-FITC) sont plus microporeuses que leurs équivalents fluorescents. Cette observation peut être liée à une modification de la structure des particules induite par la présence d'APTES.

Nanoparticules	Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)	Volume poreux α_s ($cm^3.g^{-1}$)
0% SS	71	0,38
10% SS	71	0,54
20% SS	187	0,53
30%SS	144	0,20
40% SS	92	0,47
20% SS non fluo	242	0,52
40% SS non fluo	217	0,63

Tableau 2-3 : Porosité et surface spécifique des nanoparticules contenant des ponts disulfures

Par ailleurs, les volumes poreux ont été déterminés par la méthode BJH mais, au vu de certaines des isothermes obtenues, nous discuterons uniquement des tendances d'évolution. On constate ainsi que la macro- et méso-porosité évolue en fonction du taux de disulfure (volume poreux, tableau 2.3). En effet, l'ajout de 10, 20 ou 40% de disulfure augmente le volume poreux par rapport aux particules 0%SS. Cette évolution en fonction du taux de disulfure initialement introduit peut être le résultat d'interactions inter-particulaires différentes, partiellement régies par les disulfures greffés en surface des particules, et notamment des interactions entre les groupements "pendant" greffés en surface par un seul de leurs atomes de silicium.

En conclusion, l'introduction du silane disulfure dans les nanoparticules modifie la surface spécifique des poudres ainsi que la porosité intraparticulaire. Par ailleurs, l'ajout d'APTES-FITC diminue la microporosité des nanoparticules, ce qui peut être lié à une modification de la surface des particules (diminution du potentiel ζ en présence d'APTES-FITC, tableau 2.1).

2.2.5 BILAN SUR LA STRUCTURE DES PARTICULES

Nous avons donc à notre disposition une série de nanoparticules fluorescentes sphériques de silice de différentes tailles (entre 10 et 200 nm), de différentes charges de surface (positives et négatives) et de différentes structures (apportées par l'incorporation d'un disilane disulfure). Dans l'ensemble des particules rendues fluorescentes par greffage covalent de FITC, on obtient un taux de greffage similaire d'environ 0,1%. Par ailleurs, les particules pleines possèdent dans l'eau une charge de surface d'environ +40 mV qui rend les suspensions stables, tandis que cette charge est très légèrement négative dans le milieu de culture (adsorption de protéines). A l'inverse, les particules n%SS ont une charge de surface très faible dans l'eau pour un taux de disulfure supérieur à 10% et la présence de protéines dans le milieu de culture ne la modifie que légèrement. Enfin, l'incorporation de quantités croissantes de disulfure modifie la composition des particules, notamment le nombre de groupements éthoxy restant dus à l'hydrolyse incomplète des différents silanes, et influence la surface spécifique obtenue ainsi que la porosité des particules. Une fois les particules caractérisées, il faut ensuite s'intéresser à l'influence de ces différentes caractéristiques sur leur comportement en milieu biologique.

2.3 Stabilité en milieu biologique

Afin de déterminer le comportement des nanoparticules de silice en milieu biologique, des études ont été menées sur des suspensions à 0,6 mg/mL dans le milieu de culture et dans un milieu tampon à pH 7,4. Le tampon utilisé doit être sans phosphate pour le suivi par dosage de l'acide silicique libéré par dissolution à cause des interférences des ions phosphates avec le dosage par le molybdate d'ammonium (Thayer 1930) ; le choix s'est donc porté sur un tampon Tris-HCl. Afin de se rapprocher des conditions biologiques, le tampon contient 10 mM de KCl – ce qui correspond à une concentration proche de celle du plasma sanguin (5 mM), mais est bien inférieure à la concentration dans le cytosol (140 mM). L'étude en milieu de culture se fait avec un milieu complet contenant du sérum et donc des protéines.

La dissolution des nanoparticules est suivie par différentes techniques : dosage de l'acide silicique libéré, évolution de la taille en MET et suivi de la fluorescéine libérée. Cette dernière est obtenue en centrifugeant la suspension avec un seuil de rétention de 3 kD, ce qui permet de mesurer l'intensité de fluorescence des espèces libérées lors de la dissolution et de taille inférieure à 0,13 nm (diamètre des pores du filtre). L'ICP a aussi été testée comme méthode de suivi, pour avoir accès à la quantité de silice dissoute. En effet, en comparant les valeurs obtenues pour le milieu contenant à la fois la silice dissoute et les particules et celles pour ce même milieu où toutes les particules seraient dissoutes, on devrait obtenir la quantité de silice dissoute. Malheureusement, les tests que nous avons menés ont montré qu'il n'y a pas de corrélation entre l'intensité mesurée par ICP et la proportion silice soluble/nanoparticules (tableau 2.4).

Solution de silicates	Silicium mesuré (mg/mL)	Ludox	Silicium mesuré (mg/mL)	Silicium total = 50 mg/mL dans un mélange Ludox:Silicate	Silicium mesuré (mg/mL)
20 mg/mL	20	20 mg/mL	10	25:75	14,3
40 mg/mL	40	50 mg/mL	24,2	50:50	18,1
60 mg/mL	58,7	100 mg/mL	49,2	75:25	19,5
80 mg/mL	78,9				
100 mg/mL	97,2				

Tableau 2-4 : Résultats des mesures d'ICP pour des solutions de silicates, de particules (Ludox) et des mélanges silicate-particules à concentration totale en silicium constante

Pour s'assurer que l'introduction de fluorescéine ne modifie pas le comportement des nanoparticules, le même suivi de dissolution est réalisé sur des particules synthétisées dans les mêmes conditions mais sans FITC (Si+200 non fluo).

2.3.1 INFLUENCE DE LA TAILLE DES PARTICULES ET DE LEUR CHARGE DE SURFACE

On veut déterminer l'influence des caractéristiques des nanoparticules pleines sur leur comportement en milieu biologique simulé – tampon Tris-HCl pH 7.4 – et en milieu de culture complet.

Pour s'assurer que le comportement observé pour les particules fluorescentes n'est pas dû à l'ajout de fluorescéine, la dissolution des particules Si+200 fluorescentes et non fluorescentes est étudiée dans le tampon Tris-HCl pH 7,4 par dosage de l'acide silicique et dans le milieu de culture par suivi MET. On observe, pour le suivi dans le milieu de culture, une évolution du diamètre moyen similaire pour les particules fluorescentes et non fluorescentes (figure 2.7 a), ce qui indique que la fluorescéine ne modifie pas significativement la dissolution des nanoparticules. Par ailleurs, le dosage de l'acide silicique libéré lors de la dissolution des particules Si+200 fluorescentes et non fluorescentes donne des courbes similaires (figure 2.7 b), indiquant encore le peu d'influence de la fluorescéine sur la dissolution.

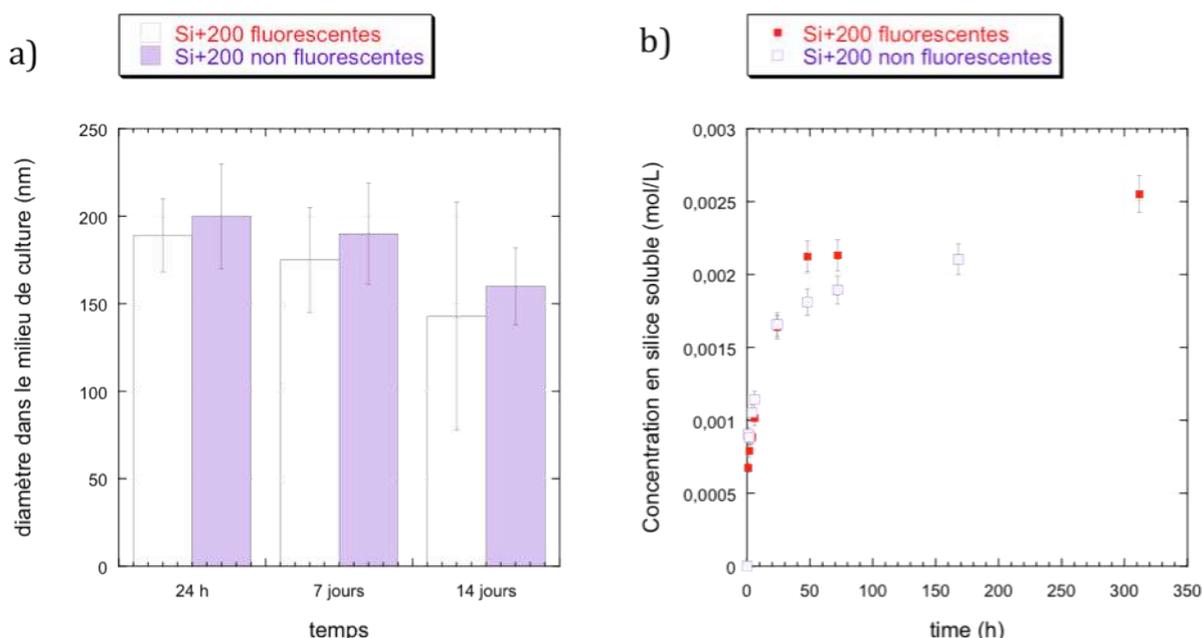


Figure 2-7 : Analyse en MET de la taille des nanoparticules Si+200 fluorescentes et non fluorescentes dans le milieu de culture à 37°C et dosage de la silice dissoute dans le tampon pH 7,4 à 37°C

Par ailleurs, il est important de s'assurer que le suivi par fluorescence donne une indication qualitative du phénomène de dissolution. Pour cela, la dissolution des nanoparticules Si+200 et Si+60 dans le tampon pH 7,4 est suivie par dosage de l'acide silicique libéré ainsi que par mesure de l'intensité de fluorescence des formes solubles libérées lors de la dissolution. On observe des courbes à l'allure similaire dans les deux suivis (figure 2.8). La différence majeure à noter est la concentration au palier. Cette dernière est respectivement 1,5 et 3 fois plus importante pour le suivi de l'intensité de fluorescence de Si+200 et Si+60 par rapport au suivi par dosage de l'acide silicique.

Le palier atteint sur les courbes de dosage de l'acide silicique correspond à la concentration à l'équilibre de solubilité de la silice (0,002 mol/L à 25°C). Cependant, lors du dosage de l'acide silicique, les oligomères résultant éventuellement de la dissolution ne sont pas dosés, de même les fragments FITC-APTES libérés par dissolution ne sont pas pris en compte dans ce dosage. A l'inverse, lors du suivi de l'intensité de fluorescence, toutes ces espèces, à condition qu'elles soient fluorescentes, vont être prises en compte. Voilà pourquoi la concentration au palier est plus importante dans le suivi par fluorescence. Ces premiers résultats montrent que le suivi par fluorescence donne effectivement accès qualitativement au processus de dissolution et que l'incorporation de FITC ne modifie pas le comportement des nanoparticules.

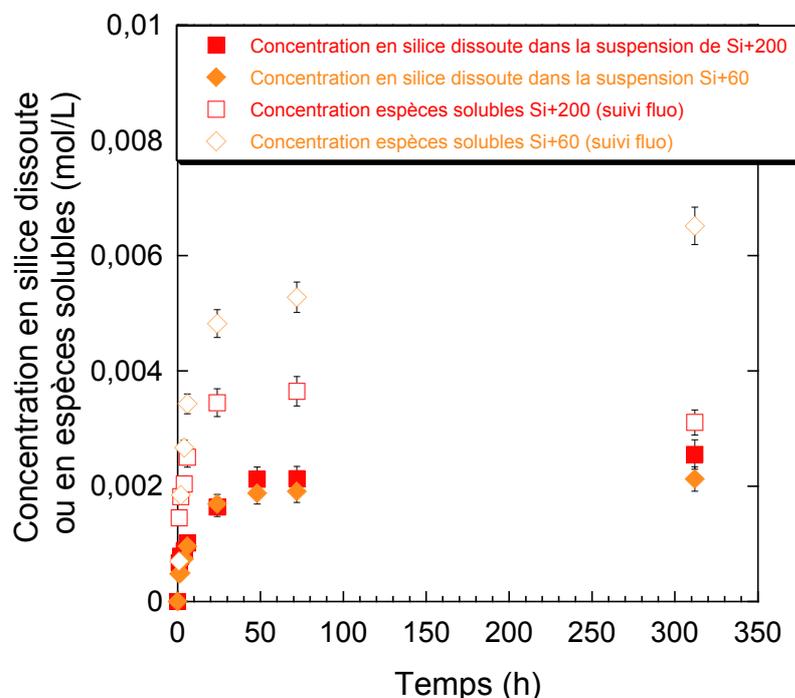


Figure 2-8 : Suivi par dosage de l'acide silicique et par fluorescence de la dissolution de Si+200 et Si+60 dans le tampon Tris-HCl pH 7,4 @ 37°C

S'étant assuré de la validité du suivi par fluorescence, on peut s'intéresser à la dissolution des nanoparticules pleines dans le milieu de culture, et à l'influence de la taille et charge de surface des particules sur ce processus (figure 2.9). Les courbes de dissolution montrent qu'un plateau est atteint à partir de 24 heures. Ce plateau correspond à environ 70% de formes solubles dans le cas des particules positives (Si+200, Si+60, Si+10) et seulement 35% de formes solubles pour les particules négatives Si-10. Il est important de noter que ces fractions de formes solubles sont plus importantes que ce qui était attendu au vu des données de dissolution de la silice (20% de silice soluble pour une concentration initiale de 10 mM à 25°C – 36% à 50°C (Iler, 1979)). Cependant il ne faut pas oublier que dans le suivi de la dissolution par fluorescence on observe l'ensemble des formes solubles suffisamment petites et pas uniquement la silice soluble. Par ailleurs, ce palier plus important qu'attendu peut s'expliquer par la présence de groupements FITC en surface des particules. En effet, ces groupements en surface vont subir les premiers la dissolution et artificiellement accélérer la dissolution telle que suivie par fluorescence. De plus, la condensation du réseau de silice est plus faible autour des atomes de silicium des organosilanes qui ne forment que trois ponts siloxane. Ainsi cette différence locale de condensation pourrait-elle aussi favoriser une dissolution un peu plus importante des particules fluorescentes par rapport à la dissolution de particules de silice pure.

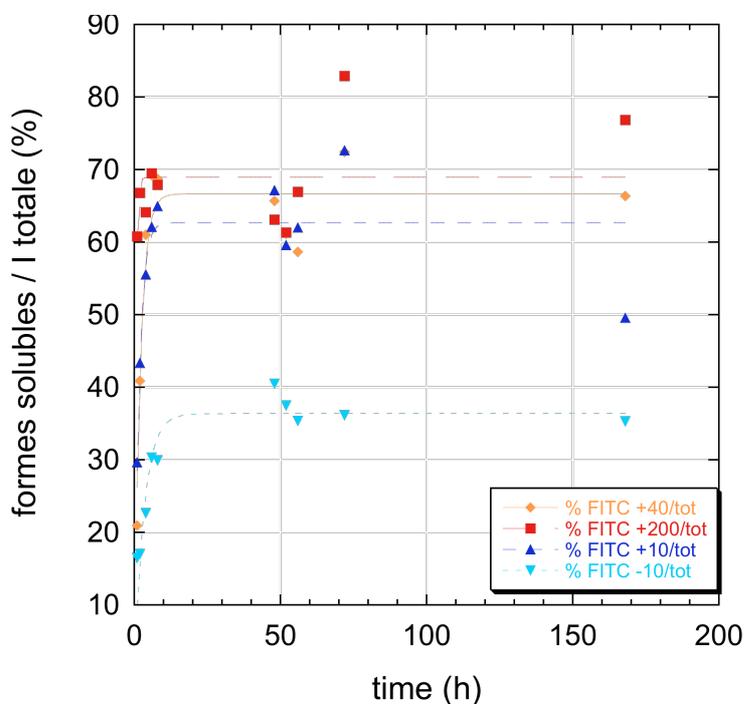


Figure 2-9 : Dissolution des nanoparticules pleines dans le milieu de culture à 37°C, suivi par fluorescence

Par ailleurs, nous avons modélisé ces courbes de dissolution pour obtenir un taux de dissolution apparent ainsi que le temps nécessaire pour atteindre 50% du plateau de dissolution:

$$\text{Equation de dissolution : } \frac{dC}{dt} = \frac{R}{C_{eq}} S^* (C_{eq} - C)$$

$$\text{D'où l'évolution de la concentration : } C = C_{eq} (1 - 10^{-RS^*/C_{eq}})$$

avec C la concentration en silice dissoute, C_{eq} la concentration à l'équilibre, S la surface spécifique et R le taux de dissolution) (Iler 1979). On observe que le taux de dissolution diminue avec la taille des particules (tableau 2.5), en parallèle le système est plus lent pour atteindre 50% du plateau d'équilibre de dissolution (évolution de $t_{1/2}$ tableau 2.5). On s'attendrait plutôt à la tendance inverse, avec un taux de dissolution plus important pour des particules plus petites qui présentent une surface spécifique plus importante. Cependant l'agrégation des particules dans le milieu peut perturber les tendances. En outre, les particules de 60 et 200 nm de diamètre peuvent comporter une microporosité que l'on ne retrouve pas dans les particules de 10 nm présentant une surface plus "plane" et qui expliquerait l'évolution des taux de dissolution (van Blaaderen, Kentgens 1992). Enfin, il peut y avoir une différence de structure entre Si+200, Si+60 et Si±10, notamment une différence de répartition de la fluorescéine entre la surface et le cœur des particules.

Un autre résultat inattendu est la différence du taux de dissolution entre les particules positives et négatives de 10 nm de diamètre. En effet, on s'attend à ce que la modification de surface stabilise les nanoparticules, or ce n'est pas ce qui est observé ici. On peut suggérer une influence du milieu de culture, et notamment de la couronne de protéines s'adsorbant à la surface des particules positives qui modifierait leur dissolution. En effet, la couronne de protéines peut piéger les sels présents dans le milieu à proximité des particules, et favoriser ainsi la dissolution (Iler 1979). Les particules négatives Si-10 ne semblant pas présenter de couronne de protéines significatives, la dissolution n'est pas favorisée et apparaît donc moins importante que pour les particules positives.

Nanoparticules	Taux de dissolution (mg.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	Plateau de dissolution (% I totale)	t _{1/2} (min)
Si+200	7,84	68,9	1
Si+60	0,41	66,6	18
Si+10	0,12	62,7	57
Si-10	0,035	36,4	112
0% SS	0,061	63,1	112
10% SS	0,088	51,9	64
20% SS	0,023	61,6	289
30% SS	0,0092	45,6	534
40% SS	0,012	21,2	191

Tableau 2-5 : Paramètres de dissolution des nanoparticules dans le milieu de culture à 37°C

En conclusion, nous avons montré que la fluorescéine ne modifie pas le comportement des nanoparticules en milieu biologique, et que le suivi par fluorescence est une bonne méthode pour avoir accès qualitativement au processus de dissolution. Nous avons vu aussi que la dissolution des particules pleines en milieu biologique dépend de leur taille mais surtout de leur charge. En effet, il a été mis en évidence que les particules chargées positivement se dissolvent mieux que les négatives, et ce d'autant plus vite que les particules sont grandes. Une hypothèse permettant d'expliquer cette dissolution favorisée dans le cas des particules positives est l'influence de la couronne de protéines qui entoure les particules et qui peut modifier localement l'environnement à la surface des particules (notamment la concentration en sels). Concernant l'évolution de la dissolution avec la taille des particules, on peut l'expliquer par des différences de texture de surface et notamment la présence éventuelle de microporosité sur les particules les plus grosses. Une autre hypothèse serait une différence de distribution des fragments fluorescents entre le cœur et la surface des particules.

Il reste maintenant à voir si la modification des particules par incorporation de ponts disulfures modifie leur comportement en milieu biologique.

2.3.2 INFLUENCE DES PONTS DISULFURES

On a vu dans la partie précédente que l'ajout de ponts disulfures ne modifie pas le diamètre des particules obtenues. Par contre il modifie notablement d'autres propriétés comme le potentiel ζ . Il s'agit maintenant de voir l'effet des ponts disulfures sur la dissolution des particules dans le milieu tampon Tris-HCl pH 7,4 et dans le milieu de culture.

Le suivi de la dissolution dans le tampon à pH 7,4 montre que l'ajout de ponts disulfures ralentit le processus (figure 2.10). En effet, sans pont disulfure, les particules atteignent le plateau d'équilibre après 24 heures tandis que les particules contenant des ponts disulfures n'atteignent cet équilibre que plus tard (au-delà de 7 jours). Par ailleurs, on remarque que plus la quantité de disulfure ajoutée est importante plus le plateau d'équilibre est bas. Cependant, il faut faire attention avant de conclure car, comme vu précédemment, le dosage ne tient compte que de l'acide silicique libéré. Or plus le taux de disulfure augmente plus on a de chances de libérer l'organosilane soufré lors de la dissolution, et ce dernier est invisible au dosage mais participe à l'équilibre de solubilité. Il faut donc rester prudent dans l'analyse de ces courbes.

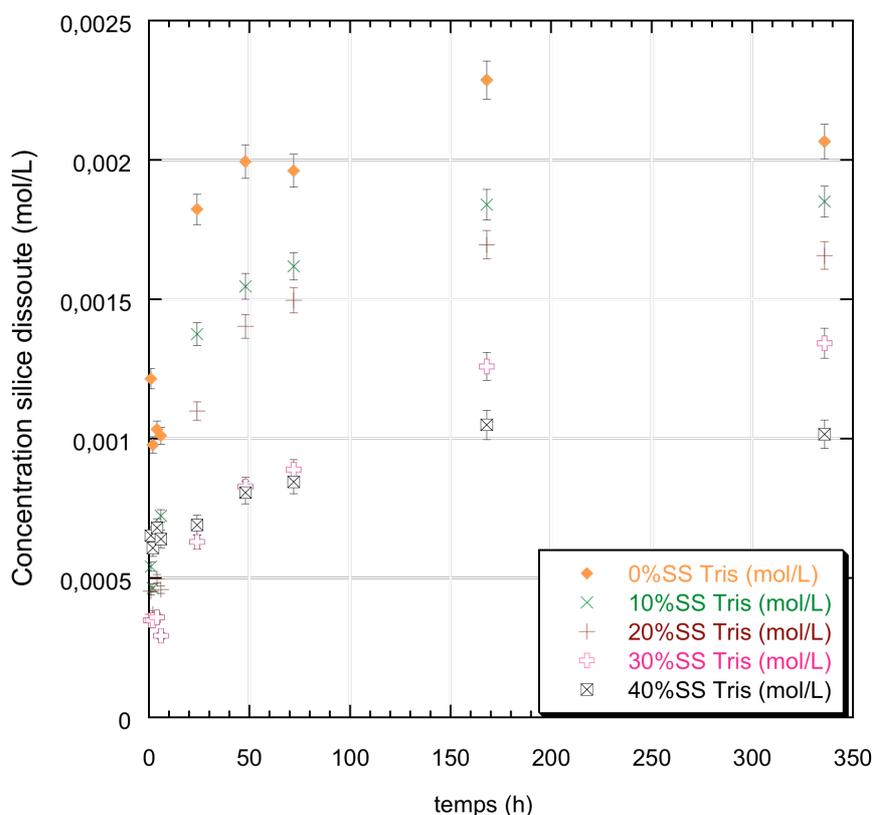


Figure 2-10: Dissolution des nanoparticules n%SS dans le tampon Tris-HCl pH 7,4 à 37°C, suivie par dosage de l'acide silicique

Lorsqu'on s'intéresse à la dissolution des nanoparticules n%SS dans le milieu de culture, suivie par fluorescence, on remarque tout d'abord deux comportements différents entre les particules 30%SS et les autres (figure 2.11). En effet, toutes les particules sauf 30%SS atteignent un plateau après 24 h, dont la valeur dépend du taux de disulfure incorporé. Dans le cas des particules 30%SS, il semble y avoir un premier plateau entre 24 heures et 72 heures puis la dissolution augmente à nouveau.

Les constantes de dissolution (tableau 2.5) diminuent lorsque le taux de disulfure augmente. On peut remarquer que la constante de dissolution des particules 0%SS diffère de celle des particules Si+60, alors que ces particules ont une composition et une taille similaire. Cette différence vient du fait que pour calculer cette constante à partir de l'ajustement des points expérimentaux à la courbe de dissolution, il faut faire intervenir la surface spécifique. Or, comme précisé dans le paragraphe 2.2.4, la surface spécifique a été obtenue par calcul pour les particules Si+60 (en considérant une sphère parfaitement plane) et ne correspond pas à la surface spécifique réelle (la mesure par BET sur ces particules Si+60 donne une surface spécifique trois fois plus importante que celle obtenue par calcul), tandis qu'elle a été mesurée par sorption d'azote pour les particules 0%SS. Par contre les valeurs des plateaux de dissolution atteints ne varient pas linéairement avec le taux de disulfure. En effet, on observe bien une diminution de la valeur du plateau de dissolution quand on passe de 0 à 10% puis 40% en disulfure. Par contre, la courbe de dissolution des particules 20%SS est similaire à celle des particules sans ponts disulfures 0%SS. Enfin, les particules 30%SS ont un comportement particulier puisque le premier plateau est le plus bas de tous mais après 7 jours, on a une valeur intermédiaire entre 10%SS et 40%SS.

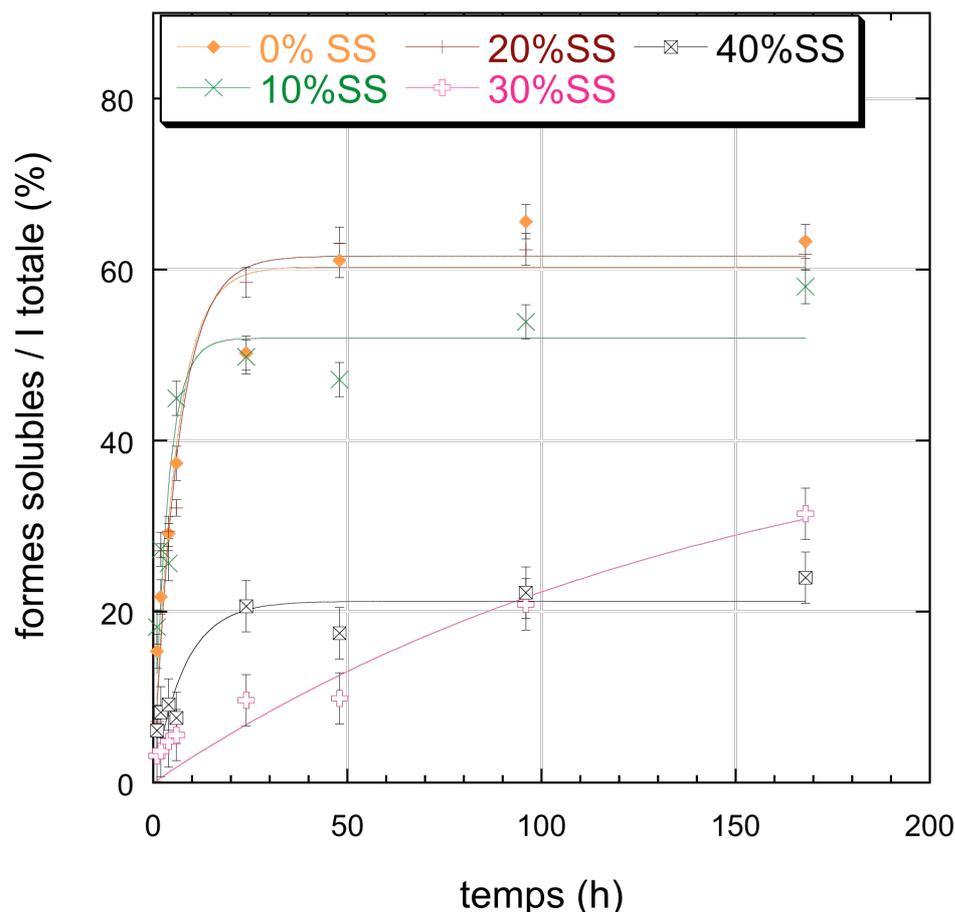


Figure 2-11: Dissolution des nanoparticules n%SS dans le milieu de culture à 37°C, suivie par fluorescence

L'évolution des courbes de dissolution entre les nanoparticules 0%SS et 10%SS peut s'expliquer par le greffage du disulfure en surface qui va diminuer le nombre d'espèces solubles fluorescentes libérées. En effet, le greffage du disulfure en surface a deux effets concernant la dissolution : d'une part la présence de disulfure en surface peut diminuer le nombre de groupements fluorescents en surface, d'autre part le disulfure étant un disilane, il peut ralentir la dissolution puisqu'il faut rompre deux fois plus de liaisons siloxanes s'il est doublement lié au réseau de silice. Il en va de même pour l'évolution de 10%SS à 40%SS : la surface spécifique évoluant peu l'augmentation du nombre de disilane induit une diminution de la dissolution.

L'augmentation du plateau de dissolution pour les particules 20%SS est probablement due à la surface plus importante de ces particules. En effet, les particules 0%SS et 10%SS ont une surface spécifique similaire (tableau 2.4) alors que les particules 20%SS ont une surface spécifique trois fois plus importante, ce qui peut contre-balancer les effets de greffage du disulfure puisque plus la surface spécifique est importante, plus il y a de liaisons de surface

qui peuvent être rompues. Enfin, pour les particules 30%SS, l'augmentation des formes solubles fluorescentes observée au-delà de 72 heures pourrait traduire une différence de structure interne.

En conclusion, l'introduction d'un disilane portant une fonction disulfure modifie notablement le comportement des particules. La dissolution est d'autant plus lente que le taux de disulfure est important. Par ailleurs, plus le taux de disulfure augmente moins le taux de dissolution est important, que ce soit par libération d'espèces fluorescentes ou d'acide silicique.

2.4 Conclusions

Nous avons donc à notre disposition une série de nanoparticules fluorescentes sphériques, possédant des groupements amines en surface leur conférant une charge positive et de taille variable entre 10 et 200 nm. Par ailleurs, afin de pouvoir étudier l'influence de la charge de surface, nous avons obtenu des particules négatives de 10 nm de diamètre. Enfin, l'incorporation de groupements disulfures dans les particules, de 10 à 40% en masse par rapport au précurseur de silice (TEOS), donnent des particules de diamètre similaire mais avec des structures différentes : la charge de surface est proche de zéro pour des taux de disulfure supérieurs à 10%, la teneur en soufre augmente avec l'ajout de disulfure mais l'hydrolyse des précurseurs diminue puisque le nombre de groupements éthoxy présents dans les particules finales augmente. Enfin la surface spécifique passe par un maximum pour 20% de disulfure, traduisant une différence d'organisation du cœur et de la surface des particules.

Par ailleurs, la présence de fluorescéine ne modifie pas le comportement des particules en milieu biologique. On observe une dissolution de l'ensemble des particules étudiées à 37°C dont la vitesse et la valeur dépendent de la charge de surface et de la composition des particules. En effet, la présence de groupements amines en surface des particules pleines positives favorise la dissolution tandis que l'augmentation du taux de disulfure a globalement l'effet inverse : ralentissement et diminution de la dissolution.

L'ensemble de ces informations va nous être particulièrement utile pour la compréhension des phénomènes observés lors de la mise en contact avec des fibroblastes de particules pleines en culture 2D (chapitre 3) et 3D (chapitre 4) ainsi que de particules microporeuses en culture 2D (chapitre 5).

Chapitre 3

Interactions des nanoparticules avec les cellules

3.1 ETUDE DE L'EXPOSITION A TEMPS COURTS (24 H)	83
3.2 ETUDE DE L'EXPOSITION SUR UNE SEMAINE	95
3.3 DEVENIR A LONG TERME DES PARTICULES INTERNALISEES	100
3.4 CONCLUSIONS	107

Une des premières questions soulevées lorsqu'on évoque le comportement en milieu biologique de nanomatériaux est celle de leurs interactions avec des cellules. Dans ce chapitre, nous nous intéressons aux effets de nanoparticules de silice de taille et charge de surface différentes. Les premières questions soulevées sont : les particules sont-elles internalisées dans les cellules ? Où sont-elles localisées ? La taille et la charge de surface ont-elles une incidence sur ces phénomènes ? Pour y répondre, les cellules exposées aux nanoparticules sont suivies par microscopie optique et électronique au cours du temps.

Par ailleurs, il est important de quantifier la toxicité, i.e. l'influence sur la viabilité cellulaire ainsi que sur l'intégrité génétique, en fonction des caractéristiques des particules étudiées. Pour cela différents tests permettant de dénombrer les cellules, d'évaluer leur activité métabolique ou encore d'évaluer les dommages génétiques éventuellement engendrés, ont été menés.

Enfin, en vue d'application comme vecteurs de principes actifs, il est primordial de suivre le devenir des particules internalisées. En effet, il est nécessaire de répondre aux questions suivantes : les cellules sont-elles capables d'excréter les particules internalisées ? Peuvent-elles les dégrader ? Ou bien les particules s'accumulent-elles dans les cellules, soulevant alors la question de la dose et de l'exposition chronique ? Afin de tenter de répondre à ces interrogations, nous avons étudié l'internalisation/exocytose des différentes nanoparticules de silice pleines, décrites dans le chapitre précédent, sur un temps long (2 semaines). Le choix des cellules s'est porté sur les fibroblastes dermiques humains (NHDF) puisque ces cellules sont susceptibles d'être en contact chronique avec les nanoparticules de silice utilisées dans l'industrie cosmétique. Tout au long de l'étude, une attention particulière a été portée sur la distinction nanoparticules/formes solubles afin de déterminer la stabilité intracellulaire des particules de silices utilisées.

3.1 Etude de l'exposition à temps courts (24 h)

Les fibroblastes dermiques humains ont été mis en culture 2D dans du milieu de culture complet (DMEM, complété par 10% de SVF, une solution de pénicilline/ streptomycine et 1% d'une solution d'antifongique) dans des plaques 24 puits et incubés 24 heures pour adhérer au support avant d'être exposés à une suspension de nanoparticules de silice dans du milieu de culture complet (cf chapitre 6 p. 190). Pour pouvoir comparer l'influence de particules de tailles différentes, il est important de fixer un paramètre de concentration : massique, molaire ou surfacique. Notre choix s'est porté sur une concentration massique, facteur utilisé couramment dans les études biologiques. Par ailleurs, la valeur de 0,6 mg/mL a été fixée compte tenu des impératifs techniques dus aux modes de suivi, DLS et fluorescence, qui nécessitent une intensité suffisante pour obtenir des résultats valides. Le détail des expériences est donné dans le chapitre présentant les protocoles expérimentaux.

3.1.1 INTERNALISATION DES NANOPARTICULES

A différents temps au cours des premières 24 heures, les cellules ont été fixées pour être observées en microscopie à fluorescence et en microscopie électronique en transmission.

En 24 heures, on observe l'internalisation des nanoparticules dans les NHDF, quelles que soient les caractéristiques des particules utilisées (taille, charge de surface). Cependant la taille des particules a une influence sur la cinétique d'internalisation ainsi que sur les conséquences de cette internalisation. Deux marqueurs fluorescents sont utilisés afin de visualiser les membranes cellulaires et les vésicules acides. Les résidus N-acétylglucosamine de la membrane plasmique fixent le marqueur WGA (Wheat Germ Agglutinin) contenant un fluorophore (AlexaFluor 555) qui émet dans le rouge. Compte-tenu des longueurs d'ondes d'émission des particules (FITC) et du marqueur membranaire, le marqueur des vésicules acides ou lysosomes a été choisi pour émettre dans une zone différente et coïncidant avec les filtres à disposition sur le microscope à fluorescence. Le choix s'est porté sur le marqueur Lysosensor Yellow-Blue, qui apparaît en bleu foncé dans des vésicules légèrement acides et en jaune dans des vésicules très acides comme les lysosomes.

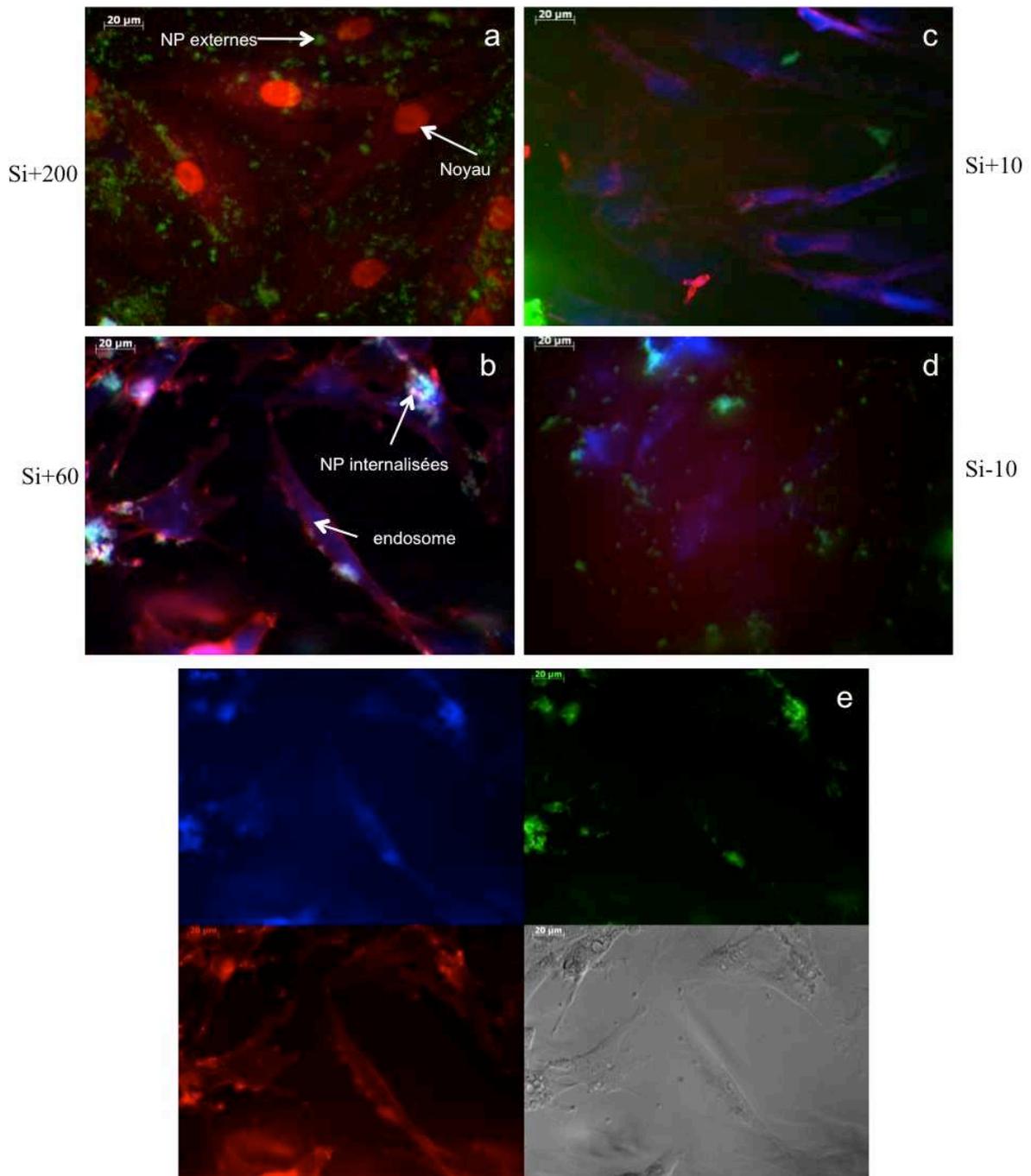


Figure 3-1: Image en microscopie à fluorescence des fibroblastes dermiques humains après 4h d'exposition aux nanoparticules (0,6 mg/mL dans le milieu de culture) : a) Si+200, b) Si+60, c) Si+10, d) Si-10, e) décomposition de b) et image en transmission.

Après 4 heures de contact, on observe différents comportements. Les particules de 200 nm de diamètre, positives, sont visibles à proximité des cellules (points verts sur la figure 3.1a) mais ne semblent pas présentes à l'intérieur des cellules, ou du moins l'internalisation éventuelle n'est pas détectable par fluorescence. Les cellules présentent la morphologie allongée usuelle des fibroblastes. Les vésicules légèrement acides, qui devraient apparaître en bleu foncé après

marquage avec du Lysosensor Yellow-Blue, ne sont pas visibles. Au même temps d'exposition, les cellules en contact avec les particules Si+60 ont la même morphologie. Par contre on observe la présence de vésicules intracellulaires en plus grand nombre. Certaines semblent colocalisées avec le signal de la fluorescéine des particules et apparaissent en bleu clair sur les images (fig 3.1b et e), indiquant l'internalisation des particules dans ces vésicules. Ainsi les particules de plus de 40 nm de diamètre ne semblent-elles pas perturber la morphologie des cellules NHDF après 4 heures d'exposition, et sont internalisées d'autant plus vite qu'elles sont petites.

Les particules de 10 nm de diamètre, quant à elles, ont un effet notablement différent après 4 heures d'exposition. En effet, les cellules exposées aux particules positives de 10 nm apparaissent beaucoup plus étirées (fig 3.1 c), ce qui indique une perturbation de leur physiologie. De plus, un grand nombre de vésicules est observé et les nanoparticules de silice sont présentes essentiellement à l'intérieur des cellules et peu à l'extérieur.

Enfin, lorsqu'on s'intéresse à l'effet de la charge de surface avec les particules Si-10, on observe très peu de cellules, et les quelques cellules présentes ont une morphologie notablement modifiée. Les particules apparaissent sous forme d'agrégats sans localisation spécifique. De ces premières observations, on peut conclure que les particules de 10 nm de diamètre, positives ou négatives, ont déjà perturbé fortement les cellules après 4 heures d'exposition, et ce d'autant plus dans le cas des particules négatives.

Les observations à 24 heures sont dans la continuité des phénomènes observés après 4 heures d'exposition. Les cellules en contact avec Si+200 et Si+60 ont gardé une morphologie et une densité cellulaire normale. Contrairement à ce qu'on a pu observer à 4h d'exposition, après 24h un nombre important de nanoparticules est internalisé dans des vésicules acides (fig 3.2 a et b), visualisées par les points bleu clair – superposition du signal de la FITC et de Lysosensor – répartis dans les cellules. On peut aussi noter que bien que les particules soient internalisées aucune n'est visible dans le noyau. En ce qui concerne les particules de 10 nm de diamètre, la densité cellulaire a diminué suite aux interactions des particules avec les cellules. Dans le cas de Si+10, on observe des cellules à la morphologie très allongée, avec des particules internalisées réparties sur l'ensemble de la cellule, y compris aux abords de la membrane nucléaire – signal jaune dû à la superposition du signal de la FITC et du marqueur WGA AlexaFluor555 (fig 3.2 c). Enfin les cellules exposées aux particules Si-10 sont très peu nombreuses et des agrégats de particules peuvent être observés au voisinage des cellules encore présentes.

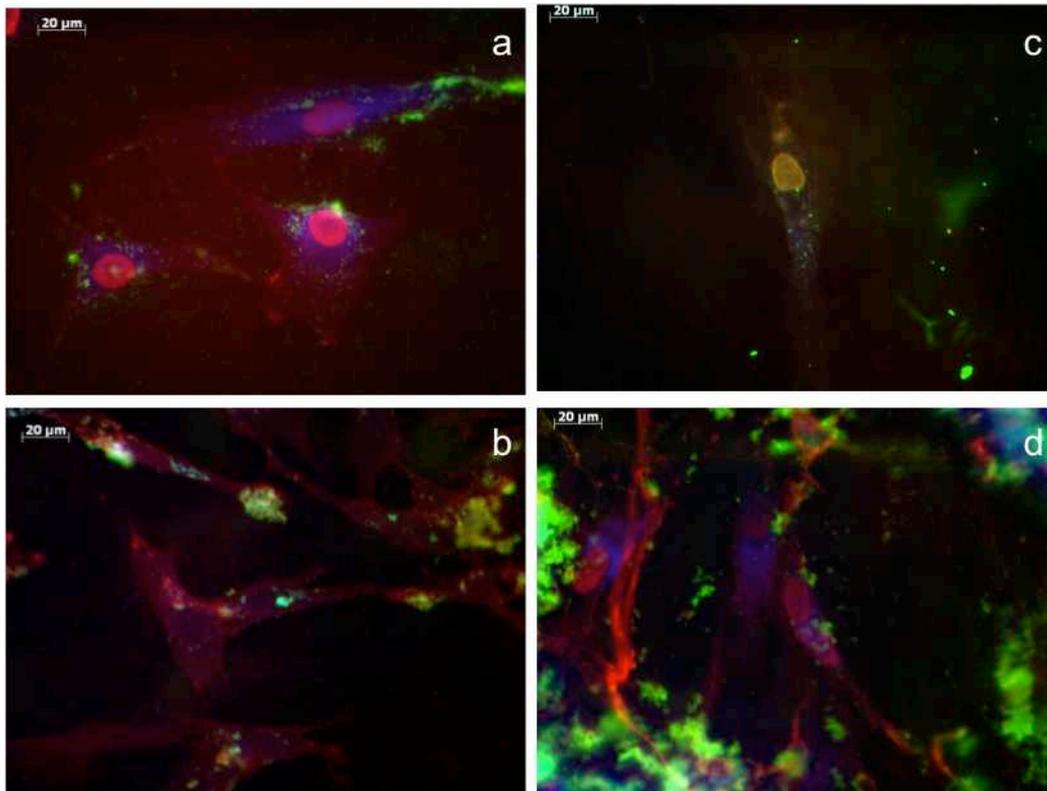


Figure 3-2: Images en microscopie à fluorescence des fibroblastes dermiques humains après 24h d'exposition aux nanoparticules (0,6 mg/mL dans le milieu de culture) : a) Si+200, b) Si+60, c) Si+10, d) Si-10.

La diminution de la densité cellulaire observée pour les cellules exposées aux particules de 10 nm de diamètre, positives ou négatives, est liée à la toxicité des particules. En effet, avant d'être observées les cellules sont rincées pour enlever les particules à l'extérieur puis fixées. Lors du rinçage, les cellules qui n'adhèrent plus assez à la surface, mortes ou bien avec trop peu de points d'adhérence à cause des interactions avec les nanoparticules, sont éliminées.

Afin d'estimer qualitativement les cinétiques d'internalisation des différentes nanoparticules, l'intensité du signal intracellulaire de la FITC a été estimée d'après les clichés de microscopie à fluorescence (fig 3.3). On observe ainsi une internalisation importante et rapide des particules de 10 nm de diamètre dans les premières 24 heures tandis que ce phénomène est plus lent et beaucoup moins intense pour Si+60 et Si+200.

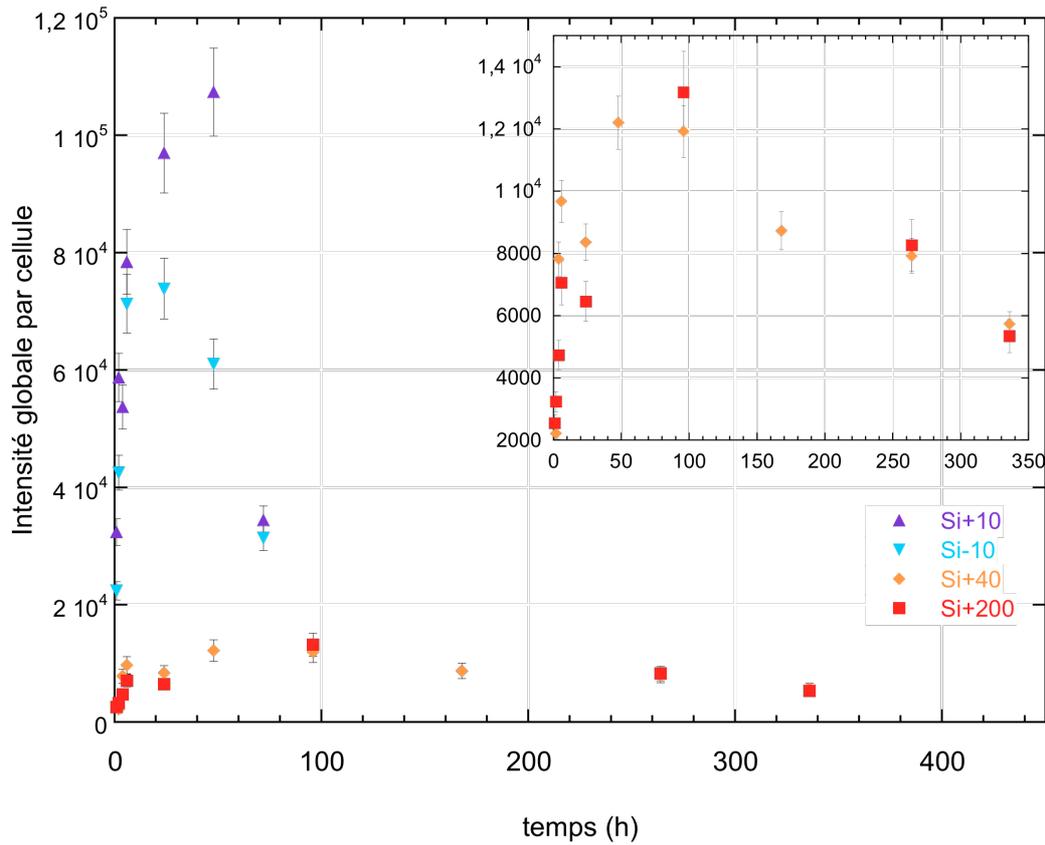


Figure 3-3: Evolution de l'intensité intracellulaire de la FITC en fonction du temps de contact nanoparticules-cellules, déterminée par analyse des images obtenues en microscopie à fluorescence

De ces observations en microscopie à fluorescence on peut donc conclure que toutes les nanoparticules étudiées peuvent pénétrer dans les cellules NHDF. Cependant les caractéristiques des nanoparticules jouent un rôle sur la cinétique d'internalisation, qui est d'autant plus rapide que les particules sont petites. Le type de nanoparticules a aussi un effet notable sur les conséquences de l'exposition aux nanoparticules sur la morphologie et la densité cellulaire, les particules Si-10 ayant l'effet le plus néfaste.

Pour aller plus loin dans la visualisation des nanoparticules internalisées, les cellules ont été observées en MET sur des coupes ultra-fines. On constate qu'en accord avec ce qui est observé en microscopie à fluorescence, les cellules exposées aux nanoparticules Si+200 et Si+40 possèdent une membrane intègre (fig 3.4 a-d). De plus on peut voir des organites tels que les mitochondries ou le réticulum endoplasmique, qui traduisent l'activité des cellules observées. Enfin, la différence majeure entre Si+200 et Si+60 est le nombre de nanoparticules internalisées par vésicules, respectivement aux alentours de 5 et de 30.

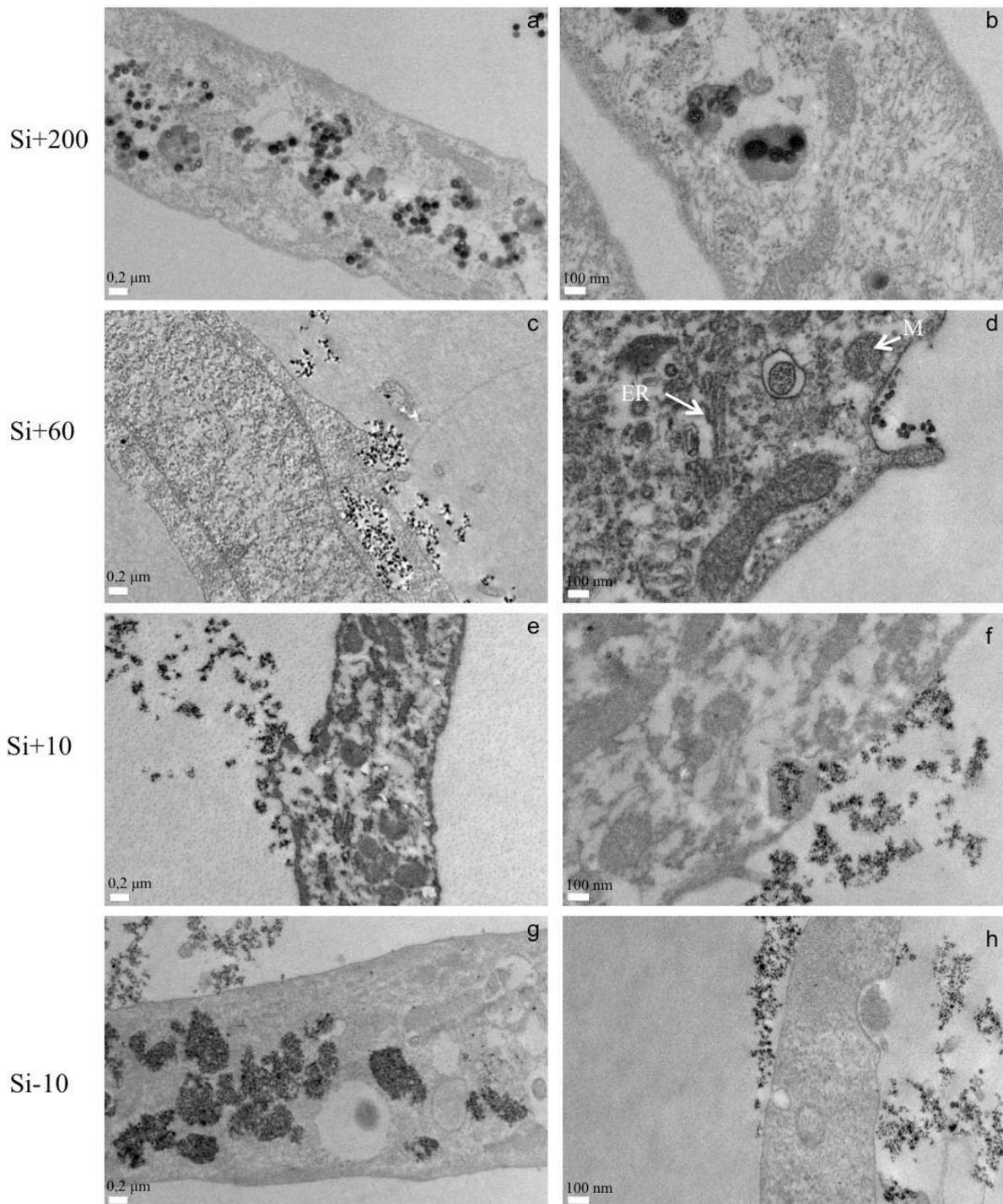


Figure 3-4: Images en MET des cellules NHDF après 24 heures d'exposition aux nanoparticules ((0,6 mg/mL dans le milieu de culture) (a, b) Si+200, (c, d) Si+60, (e, f) Si+10 et (g, h) Si-10 (M : mitochondrie, ER : réticulum endoplasmique)

Sur la photo 3.4.d on observe une extension de la membrane cellulaire pour englober des particules, suggérant une internalisation par un mécanisme de type endocytose active. Conformément à l'observation en fluorescence, les cellules exposées aux particules Si+10 et Si-10 apparaissent très étirées, et les membranes cellulaires semblent endommagées (fig 3.4 e-

h). Cependant le comportement des cellules semble différent selon qu'elles sont exposées à des particules de 10 nm positives ou négatives. En effet, les particules négatives Si-10 semblent internalisées sous forme d'agrégats larges et relativement denses, tandis que les particules positives Si+10 semblent se disperser dans le cytoplasme.

Pour déterminer le type de mécanisme d'endocytose, les cellules ont été incubées avec des inhibiteurs spécifiques des voies d'internalisation clathrine et caveolae.

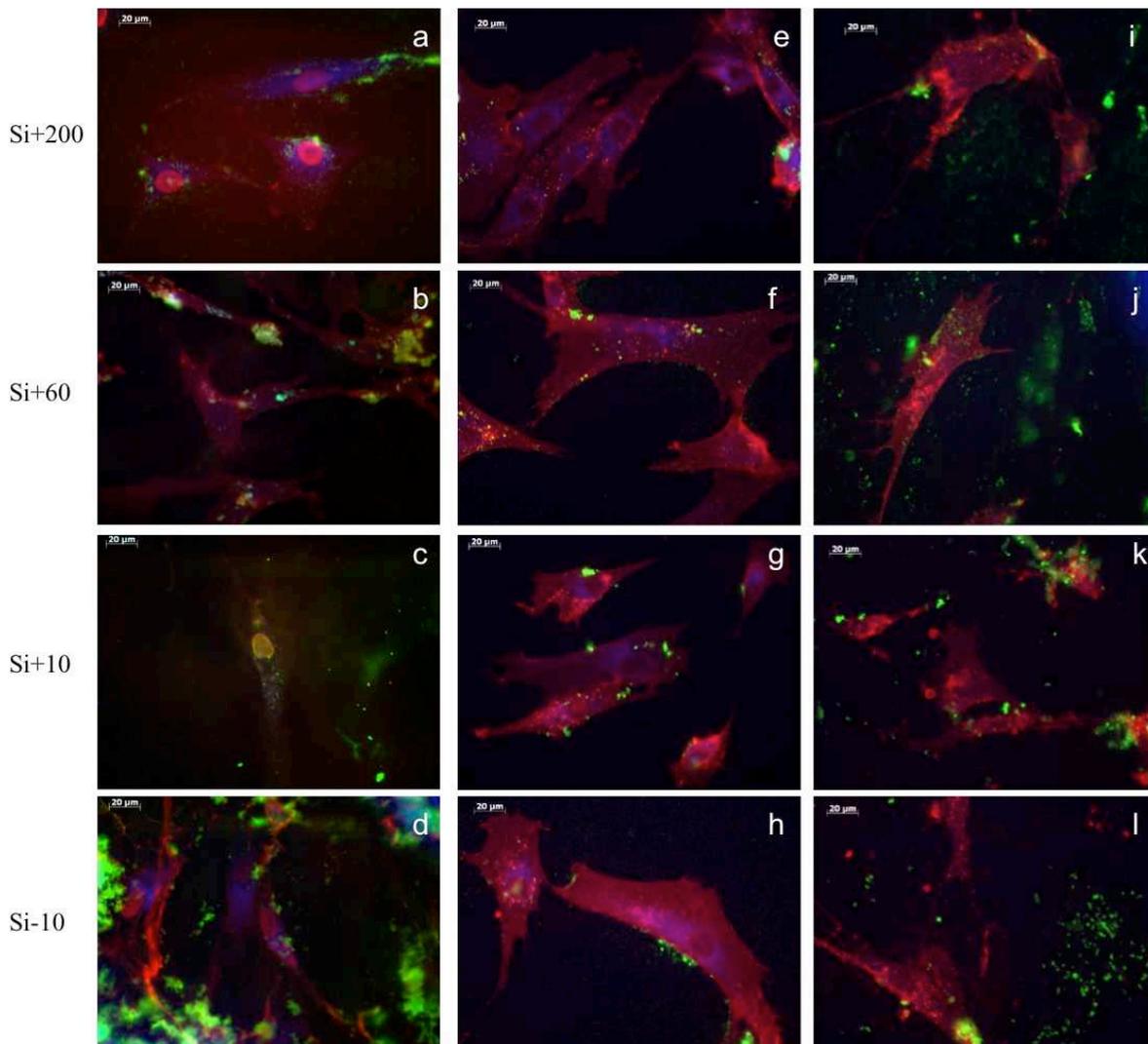


Figure 3-5: Images en microscopie à fluorescence des fibroblastes dermiques humains après 24h d'exposition aux nanoparticules (0,6 mg/mL dans le milieu de culture) : a-d) sans inhibiteur, e-l) avec un inhibiteur : e-h) monodansylcadaverine, i-l) phorbol myristate acetate

Après 24 heures d'exposition aux nanoparticules en présence d'un inhibiteur de la voie clathrine, on ne détecte pas de particules internalisées par fluorescence, et ce pour les quatre types de particules étudiées (fig. 3.5). De plus, on remarque que les cellules exposées aux particules Si+10 et Si-10 ne semblent pas avoir subi de dommages comme lors de l'exposition

sans inhibiteur, suggérant que les dommages observés sont liés à l'internalisation des particules et pas simplement à une interaction des particules avec la membrane. Ces résultats indiquent que l'internalisation des différentes nanoparticules se fait en partie par voie clathrine.

Finalement, toutes ces observations suggèrent que les particules Si+200 et Si+60 n'induisent pas de toxicité aiguë en 24 heures d'exposition aux cellules, tandis que l'exposition aux particules Si+10 et Si-10 semble beaucoup plus néfaste pour les cellules. Par ailleurs, dans cette gamme de taille (10 – 200 nm), les nanoparticules sont internalisées par les fibroblastes dermiques et ne rentrent pas simplement par diffusion passive à travers la membrane, même pour les particules de 10 nm de diamètre.

3.1.2 TOXICITE DES NANOPARTICULES

Afin de quantifier l'effet observé précédemment, l'impact des différentes nanoparticules de silice sur la viabilité cellulaire a été étudié. Pour cela, nous avons suivi en fonction du temps d'exposition l'évolution du nombre de cellules vivantes, l'activité métabolique ainsi que la génotoxicité.

3.1.2.1 Effet des nanoparticules sur la viabilité cellulaire

La viabilité des cellules exposées aux différentes nanoparticules a été évaluée en parallèle par le test à la résazurine qui permet de mesurer l'activité mitochondriale et par comptage des cellules vivantes par coloration au bleu de Trypan des cellules mortes.

Les résultats du comptage des cellules vivantes confirment l'effet délétère des particules Si-10 sur les cellules : après 24 heures d'exposition, il n'y a plus que 1% de cellules vivantes par rapport au témoin (figure 3.6). Les particules Si+10 se révèlent toxiques mais dans une moindre mesure puisque qu'après 24 heures il y a encore environ 50% de cellules vivantes. Enfin les particules Si+60 et Si+200 ne semblent pas induire de mortalité cellulaire, avec même une tendance inverse dans le cas de Si+200 qui semble favoriser la prolifération cellulaire. Il est intéressant dans ces conditions de savoir si l'effet toxique des particules de 10 nm n'est pas dû à un problème de dose. En effet, à concentration massique égale, il y a dix fois plus de particules de 10 nm que de particules de 200 nm dans les suspensions. Nous avons donc testé la toxicité des particules Si+10 et Si-10 à une concentration dix fois moins importante (soit 0,06mg/mL au lieu de 0,6mg/mL, concentration utilisée dans l'ensemble des

expériences). On peut ainsi noter que, lorsque la concentration est dix fois plus faible, les particules Si+10 et Si-10 ne présentent plus de toxicité après 24 heures d'exposition, on aurait même plutôt une prolifération cellulaire plus importante à 24 heures d'exposition à Si+10.

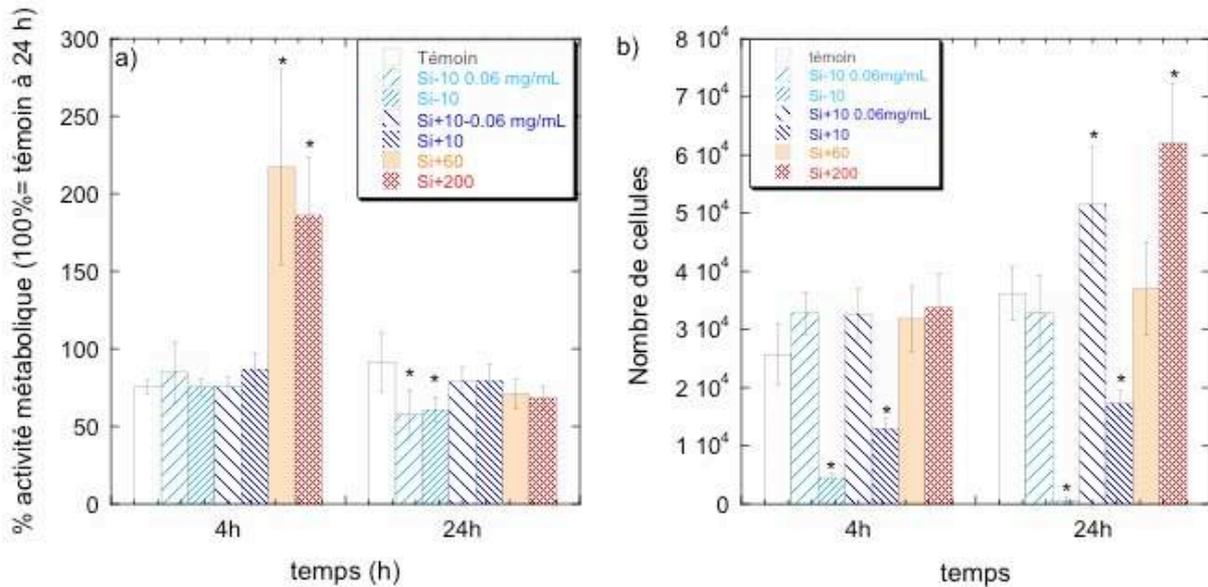


Figure 3-6: Activité métabolique mesurée par le test à la résazurine (a) et évolution du nombre de cellules vivantes (bleu de Trypan) (b) après 4 heures et 24 heures d'exposition aux nanoparticules (0,6 mg/mL dans le milieu de culture et 0,06 mg/mL pour Si±10); * p < 0,05 par rapport au témoin

La mesure de l'activité métabolique par le test à la résazurine permet d'obtenir des informations complémentaires sur l'influence des nanoparticules sur la réponse physiologique des cellules (figure 3.6). L'activité mitochondriale peut être mesurée avec différents tests. Notre choix s'est porté sur la résazurine plutôt que sur le MTT (Voytik-Harbin 1998, Hamid 2004) car ce test a l'avantage de ne pas être toxique pour les cellules, autorisant ainsi à poursuivre l'étude sur les mêmes cellules pour des temps plus longs. Avant d'effectuer le test à la résazurine, il est important de s'assurer que les nanoparticules n'interfèrent pas avec ce test. Tout d'abord, avant d'incuber les cellules avec une solution de résazurine, ces dernières ont été rincées pour enlever toutes les particules qui ne sont pas en interaction avec les cellules. Ceci permet d'éviter d'avoir des problèmes de diffusion de la lumière lors de la mesure de l'absorbance. Ensuite, pour s'assurer que les nanoparticules ne réagissent pas avec la résazurine, une suspension de chacune des particules étudiées a été incubée avec une solution de résazurine, dans les conditions exactes du test. Les absorbances mesurées n'étaient

pas significativement différentes de l'absorbance d'une solution de résazurine seule dans les mêmes conditions. Les particules n'interfèrent donc aucunement avec ce test.

Après 4 heures d'exposition, on observe une activité métabolique comparable pour le témoin (cellules seules en culture) et les cellules exposées aux nanoparticules Si+10 et Si-10 à 0,6 mg/mL et 0,06 mg/mL. Par contre, l'activité métabolique des cellules exposées aux particules Si+40 et Si+200 est significativement accrue par rapport au témoin. A 24 heures d'exposition, les activités métaboliques sont comparables pour l'ensemble des cellules en contact avec des particules positives (Si+10, Si+60 et Si+200). Par contre elle est légèrement inférieure dans le cas des particules négatives Si-10, et ce aux deux concentrations testées.

Si on combine les résultats de ces deux séries d'expériences, il en résulte que les particules Si-10 induisent une activité métabolique démultipliée dans le peu de cellules survivantes, à 4 heures comme à 24 heures d'exposition à une suspension à 0,6 mg/mL. Ce résultat peut s'interpréter comme la réponse des cellules à une situation de stress intense résultant de la mort de nombreuses cellules voisines. Cet état de stress peut aussi partiellement expliquer l'activité importante des cellules exposées à Si+200 et Si+60 pendant 4 heures, à la différence que dans ce cas il n'y a pas induction de mort cellulaire. Après 24 heures, les cellules semblent s'être adaptées à la situation et on retrouve une situation comparable au témoin.

3.1.2.2 Génotoxicité induite par les nanoparticules

Pour compléter cette étude de toxicité, nous avons étudié la génotoxicité potentielle de ces nanoparticules après 24 heures d'exposition, à l'aide du test des comètes. Il existe différentes façons de présenter les résultats de ce test, nous avons choisi de représenter les fractions de noyau de chaque catégorie de dommages : de 0 (pas de comètes, pas de génotoxicité) à IV (ADN presque entièrement dans la queue de la comète, génotoxicité importante). Les comètes correspondant à ces différentes catégories sont représentées figure 3.7. En parallèle, l'indice d'endommagement de l'ADN correspond à une représentation de l'ensemble des catégories de dommages, le nombre de comètes de chaque catégorie étant pondéré par le numéro de la catégorie. Pour savoir si les résultats correspondent à une réelle génotoxicité, nous avons fait deux témoins : l'un négatif où l'on analyse des cellules en culture dans des conditions normales, l'autre positif où les cellules sont exposées à un agent génotoxique (staurosporine) pendant 1 heure. Les résultats de ce test montrent que seules les particules Si-10 présentent une certaine génotoxicité comparée à celle des témoins, et ce uniquement à 0,6 mg/mL. En effet, qu'on regarde la répartition des comètes dans les différentes catégories ou l'indice

d'endommagement de l'ADN, la seule différence significative est observée pour Si-10. Cependant, la génotoxicité observée reste faible comparé à celle du témoin positif.

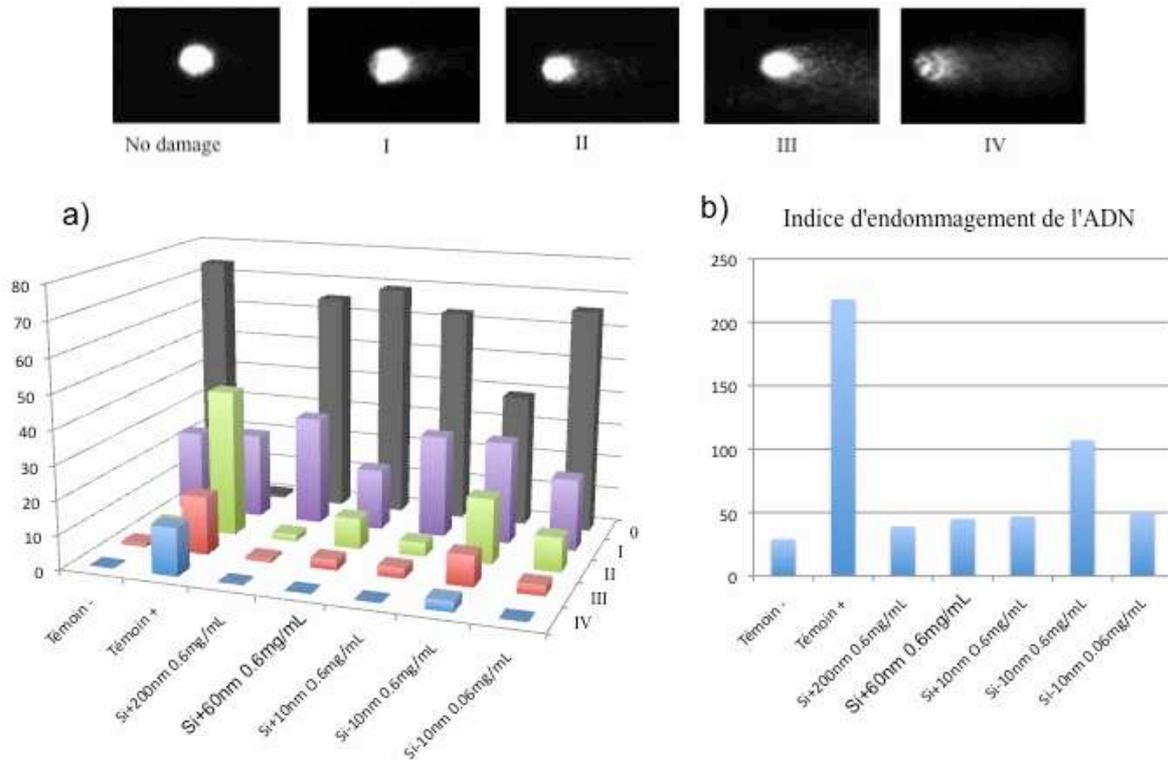


Figure 3-7 : Evaluation de la génotoxicité des particules de silice après 24 h d'exposition par le test des comètes, a) répartition des comètes dans les différentes catégories de dommages, b) indice d'endommagement de l'ADN

Ces résultats sont compatibles avec les observations d'internalisation, ainsi qu'avec d'autres études portant sur la génotoxicité des nanoparticules de silice (Barnes 2008, Park 2011). Pour expliquer ces résultats, on peut suggérer que l'internalisation des nanoparticules Si-10 sous forme d'agrégats constitués de nombreuses particules peut perturber l'ultrastructure cellulaire et permettre l'accès au noyau. Une autre explication de la génotoxicité observée serait un effet indirect des nanoparticules sur l'ADN via la génération d'espèces réactives de l'oxygène – formées lors du stress oxydant induit par les particules (Akthar 2010, Liu 2010). D'autre part, Chen et al. ont montré que des particules de 40 et 70 nm de diamètre peuvent induire la formation d'agrégats de protéines nucléaires dans des cellules épithéliales humaines, qui vont perturber le fonctionnement des cellules en diminuant l'expression de certains gènes et la prolifération cellulaire (Chen 2005). Tout ceci montre que même si aucune particule n'est visible dans le noyau, l'internalisation peut entraîner des effets génotoxiques par des mécanismes indirects.

3.1.3 BILAN DES INTERACTIONS DES NANOPARTICULES AVEC LES CELLULES A TEMPS COURT

Après 24 heures d'exposition, il faut distinguer les effets des particules de 10 nm de diamètre de ceux des particules plus grandes. Les particules Si+200 et Si+60 sont internalisées dans des vésicules en nombre d'autant plus important que la taille diminue et d'autant plus rapidement qu'elles sont petites. Ce phénomène a déjà été observé dans d'autres lignées cellulaires (Jin 2008, Hu 2011, He 2010) pour des particules de taille et charge comparables. Cette internalisation induit une période de stress cellulaire, résorbé à 24 heures, et n'a aucun impact sur la viabilité cellulaire, l'intégrité de la membrane ou du noyau.

L'internalisation d'agrégats de particules se fait via un mécanisme d'endocytose active, majoritairement par voie clathrine, comme observé dans d'autres études portant sur l'internalisation de particules de silice de moins de 200 nm de diamètre (Zhang 2010, Drescher 2011). Les auteurs de ces études suggèrent que les agrégats au voisinage des cellules se dissocieraient avant que les particules soient internalisées individuellement. Au contraire, nos observations semblent montrer que les agrégats de particules sont perçus comme un seul objet par la membrane cellulaire et internalisés en l'état. Ce phénomène a été mis en évidence par Stayton et al. dans une étude à l'échelle cellulaire (Stayton 2009). En effet, en comparant l'internalisation de nanoparticules de 13 nm mise en présence de cellules directement ou après 12 heures passées dans le milieu pour atteindre l'équilibre d'agrégation, ils n'observent aucune différence significative dans les courbes d'internalisation. Ceci suggère bien que les cellules sont capables d'internaliser des agrégats de particules, pour peu que ces derniers ne soient pas trop gros.

Cependant l'évolution de ces agrégats dans les cellules dépend des caractéristiques des nanoparticules. En effet, lorsqu'on compare les effets des particules Si+10 et Si-10, on a vu que l'aspect des agrégats internalisés diffère grandement : des agrégats larges et compacts pour Si-10 et des agrégats plus dispersés et répartis dans le cytosol pour Si+10. La différence de charge de surface pourrait expliquer ces résultats. Lorsque les particules se retrouvent piégées dans les vésicules à pH acide, les particules Si+10 seraient plus stabilisées tandis que les particules Si-10 verraient leur charge de surface diminuer, ce qui les déstabiliserait, rendant la formation d'agrégats compacts favorable.

Ce phénomène d'agrégation importante et non contrôlée pourrait être à l'origine des dommages observés et expliquer la différence de toxicité entre les particules de même taille mais de charge de surface différente, pour une concentration de 0,6 mg/mL. En effet, dans

toutes les conditions étudiées, les particules négatives Si-10 apparaissent plus toxiques que les particules positives Si+10 : mortalité cellulaire plus élevée et génotoxicité.

Enfin, il est intéressant de noter que ces dommages sont liés à l'internalisation des particules puisqu'en présence d'inhibiteurs d'internalisation, les cellules ne subissent pas ces mêmes effets. Par ailleurs, d'autres études ont montré que seules des particules de diamètre suffisamment petit (<20 nm) endommagent la membrane (Yu 2009), ce qui semble en accord avec nos observations.

3.2 Etude de l'exposition sur une semaine

Aux vues de l'utilisation des nanoparticules de silice en cosmétique, il nous a semblé important de ne pas se limiter à une exposition de 24 heures comme c'est le cas dans la plupart de études. Les impératifs de la culture cellulaire nous ont fait limiter l'exposition à 7 jours, délai au-delà duquel il est nécessaire de renouveler le milieu de culture afin que les cellules aient tous les nutriments nécessaires à une prolifération normale.

3.2.1 LOCALISATION INTRACELLULAIRE DES PARTICULES ET CINÉTIQUE D'INTERNALISATION

Les premières informations ont été obtenues par microscopie à fluorescence. Après 48 heures d'exposition, les photos montrent que les particules Si+60 et Si+200 sont présentes en grand nombre dans des vésicules – comme l'atteste la présence de nombreux points bleu clair traduisant la superposition du signal de la FITC et du Lysosensor – sans dommage apparent sur la morphologie des cellules (figure 3.8 a-b). De plus, aucun signal de la FITC n'est visible au niveau du noyau. Au contraire, les cellules exposées aux nanoparticules de 10 nm, positives ou négatives, sont très peu nombreuses et très endommagées (figure 3.8 c-d), comme l'atteste la présence de cellules de forme arrondie (figure 3.8 d), caractéristique de cellules n'ayant plus que très peu de points d'adhésion et sur le point de mourir.

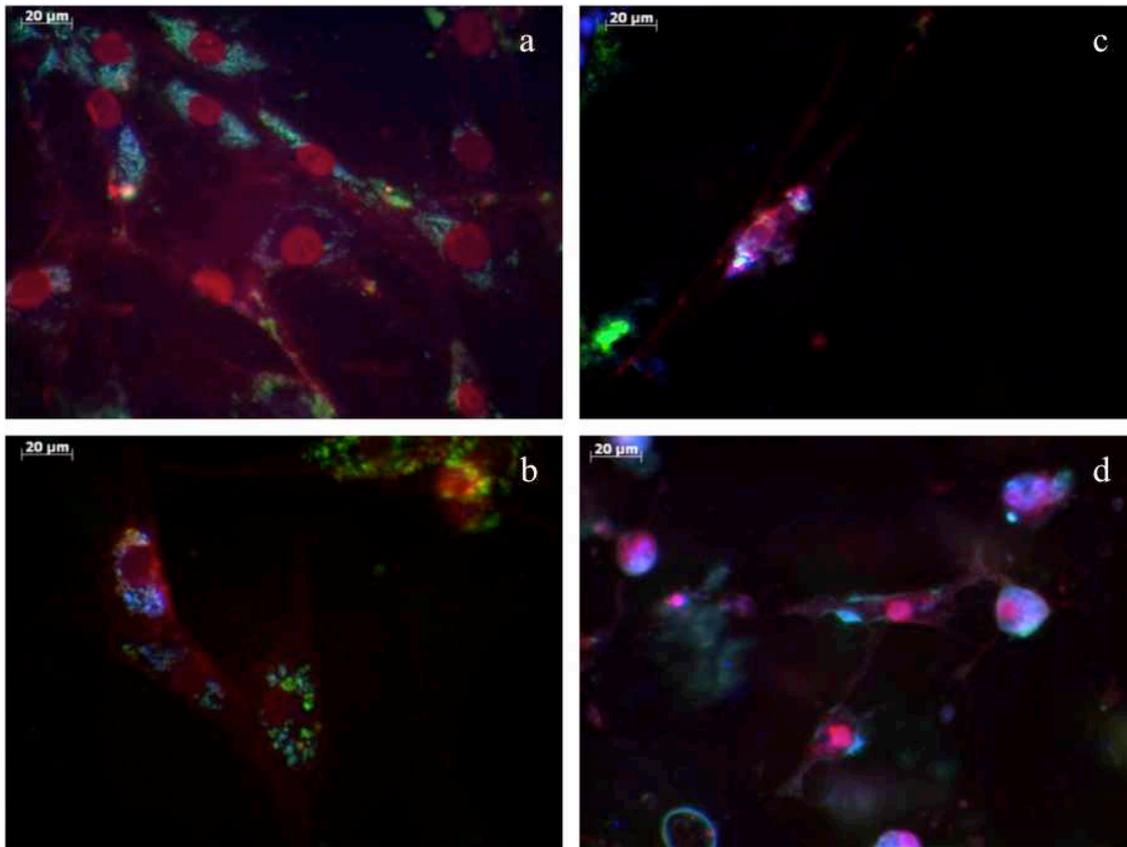


Figure 3-8: Images en microscopie à fluorescence des fibroblastes dermiques humains après 48h d'exposition aux nanoparticules (0,6 mg/ml dans le milieu de culture) : a) Si+200, b) Si+60, c) Si+10, d) Si-10.

Par ailleurs, le suivi de l'intensité du signal intracellulaire de la FITC (figure 3.3) montre que les particules Si+200 et Si+60 s'accumulent dans les cellules pendant 4 jours avant que le signal de la FITC ne commence à diminuer. Cette perte de signal indique qu'il y a moins de FITC dans les cellules après 4 jours. Deux causes sont possibles : soit les particules ressortent des cellules, soit les particules sont partiellement dégradées dans les cellules et la fluorescéine libérée sort des cellules. On observe aussi cette diminution du signal de la FITC dans les cellules exposées aux particules Si+10 et Si-10, à la différence que cette perte de signal est plus rapide et commence respectivement après 3 jours et 24 heures. Dans ce dernier cas, la perte de signal pourrait être due non pas à une libération contrôlée des particules ou de la fluorescéine mais plutôt à une fuite de ces dernières suite aux dommages causés par les particules sur la membrane cellulaire. De plus, les résultats du signal de fluorescence pour les cellules exposées aux nanoparticules Si+10 et Si-10 au-delà de 24 heures peuvent être faussés par le nombre restreint de cellules observables.

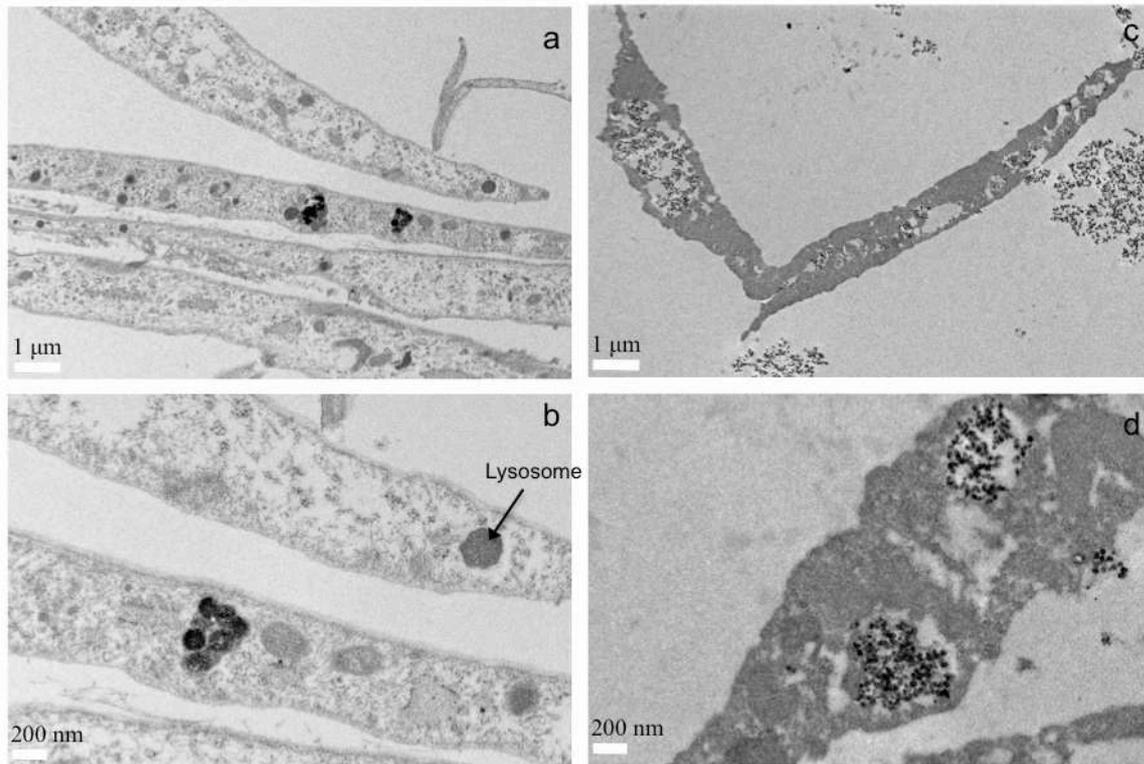


Figure 3-9: Images en MET des cellules NHDF après 7 jours d'exposition aux nanoparticules (0,6 mg/mL dans le milieu de culture) (a, b) Si+200, (c, d) Si+60

Enfin, pour visualiser plus en détail la localisation intracellulaire des particules Si+60 et Si+200, les cellules fixées ont été observées en MET. On observe effectivement une préservation de l'intégrité de la membrane des cellules exposées une semaine aux particules Si+200. On note aussi que des agrégats de particules sont toujours présents dans des vésicules (figure 3.9 a-b). Par rapport aux photos à 24 h, on peut voir la présence de nombreux lysosomes, ainsi qu'une modification de l'aspect des nanoparticules internalisées qui apparaissent avec une structure interne poreuse ou fragmentée (figure 3.9 b). Cette modification de la structure des particules pourrait être due à des phénomènes de dégradation intracellulaire. On retrouve cet aspect sur les nanoparticules Si+60 internalisées (figure 3.9 d). Cependant, la structure interne des cellules est plus affectée que dans le cas des particules Si+200.

3.2.2 VIABILITE CELLULAIRE

L'étude de la toxicité des différentes nanoparticules sur une semaine montre une évolution dans la continuité des résultats à temps court (figure 3.10) et conforme aux observations de microscopie quant à la morphologie des cellules exposées aux nanoparticules. En effet, on

observe pour les particules Si+60 et Si+200 une activité métabolique comparable au témoin après 7 jours d'exposition et une densité cellulaire similaire pour Si+200 et supérieure pour Si+60.

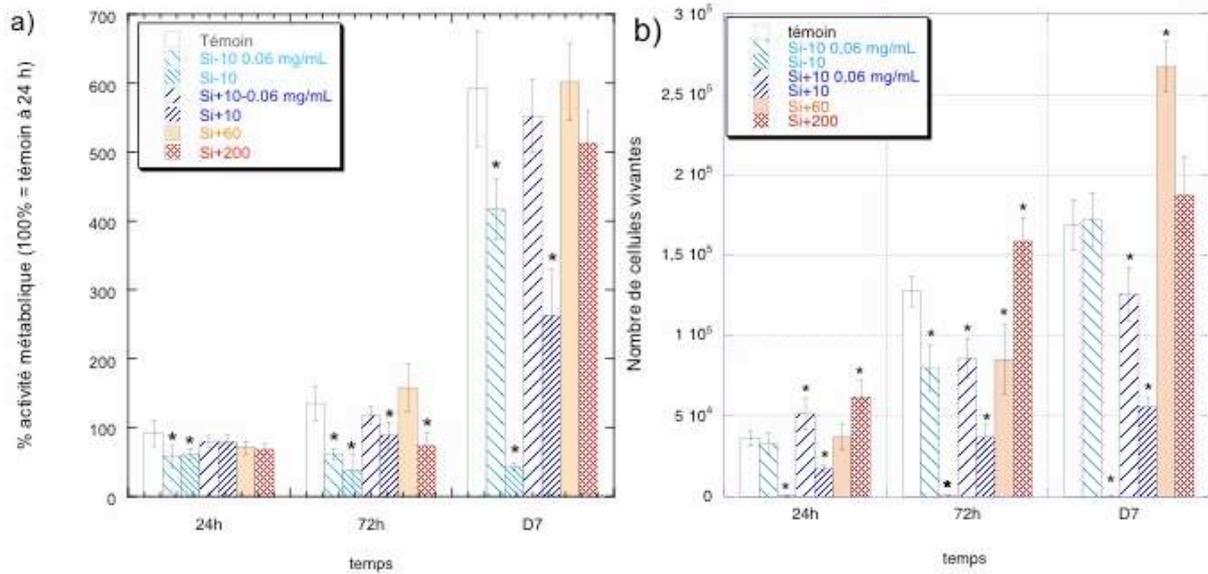


Figure 3-10 : Activité métabolique mesurée par le test à la résazurine (a) et évolution du nombre de cellules vivantes (b) de 24 heures à 7 jours d'exposition aux nanoparticules (0,6 mg/mL et 0,06 mg/mL pour Si±10, dans le milieu de culture); * p < 0,05 par rapport au témoin

En ce qui concerne les particules de 10 nm de diamètre, les tendances observées à 24 heures se confirment. Les particules Si-10 à 0,6 mg/mL induisent une très forte perte cellulaire et une activité métabolique réduite. Lorsque la concentration de ces nanoparticules est divisée par 10 (expérience à 0,06 mg/mL), l'évolution est différente. On peut ainsi noter que la densité cellulaire après 7 jours d'exposition est comparable au témoin, même si l'activité métabolique reste légèrement inférieure à celle des cellules témoins. Enfin, les particules Si+10 ont, elles aussi, un effet néfaste sur la densité cellulaire mais dans des proportions moindres. On observe effectivement une baisse du nombre de cellules exposées à une concentration en particules Si+10 de 0,6 mg/mL. Cependant après 7 jours il y a encore environ 30% de la population observée avec les cellules témoins. L'activité métabolique suit la même évolution : elle est plus faible que pour les cellules témoins mais reste plus importante que dans le cas des cellules exposées aux particules Si-10. De même qu'une diminution de la concentration en Si-10 limite les effets toxiques, les cellules exposées à 0,06 mg/mL de particules Si+10 sont nettement moins perturbées par la présence des particules. Ainsi observe-t-on que l'activité métabolique dans ces conditions est comparable à celle des cellules témoins, la seule différence notable est la densité cellulaire légèrement inférieure.

De cette étude on peut donc conclure que jusqu'à une semaine d'exposition les particules positives de 60 nm et 200 nm ne présentent pas de toxicité notable pour les fibroblastes. A l'opposé, les particules de 10 nm, positives ou négatives, ont un effet néfaste sur les cellules, effet d'autant plus marqué pour les particules négatives. L'analyse simultanée de l'activité métabolique et du nombre de cellules vivantes montrent que les cellules survivant à l'exposition aux nanoparticules de 10 nm de diamètre ne répondent plus à cette situation de stress et retrouvent après une semaine une activité métabolique en accord avec le nombre de cellules. Enfin ces effets toxiques sont très nettement atténués lorsque la concentration en nanoparticules Si+10 et Si-10 est divisée par dix, pour se ramener à un nombre de particules comparables à Si+200.

3.2.3 BILAN SUR L'EXPOSITION DES PARTICULES JUSQU'À 7 JOURS

Comme il a déjà été souligné, de nombreuses études existent sur l'internalisation de particules de silice. Cependant, la majorité de ces études concerne des particules de silice mésoporeuses, considérées comme de bons candidats pour une utilisation comme vecteurs de principes actifs. Bien que non mésoporeuses, les particules utilisées présentent une microporosité qui dépend des conditions de synthèse. Dans ce cadre, il peut être intéressant de confronter nos résultats à ceux obtenus pour des particules mésoporeuses. En effet, plusieurs études ont montré que la porosité des particules est un facteur déterminant pour la toxicité (Rabolli 2010, Yu 2012). Par ailleurs la variabilité des lignées cellulaires utilisées dans ces études ne permet pas de comparaison facile puisqu'en fonction de la nature des cellules et de leur taux de prolifération l'effet de la silice peut être variable (Absher 1980, Chang 2007).

Malgré tout, on peut souligner que l'internalisation dans des endosomes de nanoparticules de 50 à 200 nm de diamètre, sans toxicité significative, a déjà été observée dans différentes lignées cellulaires (Napierska 2010). Dans notre cas, on observe que les particules de 60 nm positives se comportent globalement comme les particules Si+200 en terme d'internalisation et de toxicité. Par ailleurs, quelles que soient les cellules, les nanoparticules les plus petites présentent une toxicité accrue, notamment en-dessous de 20 nm de diamètre (Yu 2009). Ceci est cohérent avec nos observations sur les particules de 10 nm positives qui ont un effet toxique notable et causent des dommages importants aux cellules (à concentration massique identique avec Si+200). Il semble donc qu'il y ait un seuil de taille critique dans la nature des

interactions nanoparticules-cellules (NHDF) à concentration massique en nanoparticules constante.

De plus, on peut noter que les particules Si-10 causent plus de dommages que les particules Si+10. Cependant, il faut se souvenir que dans le milieu de culture, les particules s'entourent d'une couronne de protéines qui modifie leur charge de surface globale (cf chapitre 2) ainsi que la nature chimique de la surface. Les particules Si+10 sont globalement neutres dans le milieu de culture tandis que les particules Si-10 sont réellement négatives, ce qui entraîne des interactions différentes avec la membrane cellulaire, elle-même chargée négativement. Ces observations sont en accord avec d'autres études qui montrent que le greffage d'amines en surface des particules de silice diminue leur toxicité (Chang 2007, Yamashita 2011).

Enfin, une observation importante de cette étude est la diminution du signal de la FITC intracellulaire, résultat d'une libération des particules et/ou de fluorescéine obtenue par dissolution intracellulaire des particules. L'exocytose de nanoparticules de silice a déjà été rapportée (Stayton 2009, Hu 2011), mais sans forcément tenir compte de leur possible dissolution intracellulaire. C'est pour tenter de mieux connaître le devenir à long terme des ces particules que l'étude a été poussée plus loin.

3.3 Devenir à long terme des particules internalisées

Après une semaine d'exposition aux nanoparticules, les cellules ont été rincées et du milieu de culture neuf ajouté afin de poursuivre la culture cellulaire. Sur cette période, les nanoparticules observées seront les nanoparticules internalisées, ou celles libérées par la cellule. Cependant on ne peut pas exclure la présence de nanoparticules non internalisées mais en interaction forte avec la membrane cellulaire et qui de ce fait ne seraient pas éliminées par les rinçages. Les observations en microscopie (fluorescence et électronique) ont été limitées aux cellules exposées aux particules Si+200 et Si+60 à cause du nombre très restreint de cellules encore présentes après une semaine d'exposition aux particules de 10 nm de diamètre.

3.3.1 TOXICITE DES PARTICULES A LONG TERME

L'activité métabolique des cellules exposées une semaine aux différentes particules a été mesurée toutes les semaines pendant 3 semaines, en renouvelant le milieu de culture tous les 7 jours.

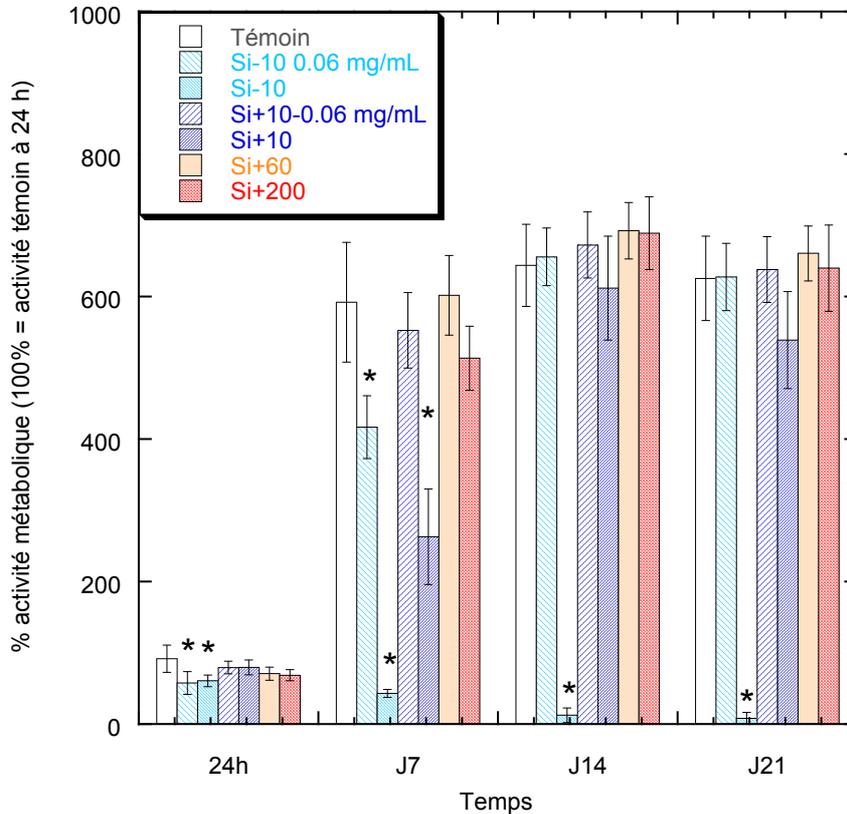


Figure 3-11: Evolution de l'activité métabolique (test à la résazurine) des cellules exposées aux nanoparticules (0,6 mg/mL et 0,06 mg/mL pour Si±10) pendant 7 jours puis mises en culture sans nanoparticules

On observe qu'au delà de la première semaine, il n'y a pas de différence significative de l'activité métabolique des cellules exposées aux particules par rapport aux cellules témoins, à l'exception des cellules exposées aux particules Si-10 à 0,6 mg/mL (figure 3.11). En effet, pour ces dernières, les effets toxiques sont trop importants pour que les cellules récupèrent même lorsqu'on enlève les particules. Il est intéressant de noter que bien que les particules Si+10 aient un effet toxique, les cellules regagnent une activité similaire aux cellules témoins après une semaine de culture sans particules. Il semblerait que le nombre de cellules ayant survécu à l'exposition aux particules soit suffisant pour permettre une prolifération des cellules restantes et leur permettre d'atteindre une activité métabolique similaire au témoin passée la première semaine de culture sans particules.

3.3.2 OBSERVATION DES PARTICULES INTERNALISEES

Les photos de microscopie à fluorescence des cellules après une semaine d'exposition aux nanoparticules suivie d'une semaine de culture montrent qu'il y a encore des particules internalisées, que ce soit pour les particules Si+200 ou Si+60 (figure 3.12a-b). Cependant, il y a de nombreuses particules qui apparaissent aux abords des cellules et d'autres semblent dans les cellules mais ne sont pas dans des endosomes.

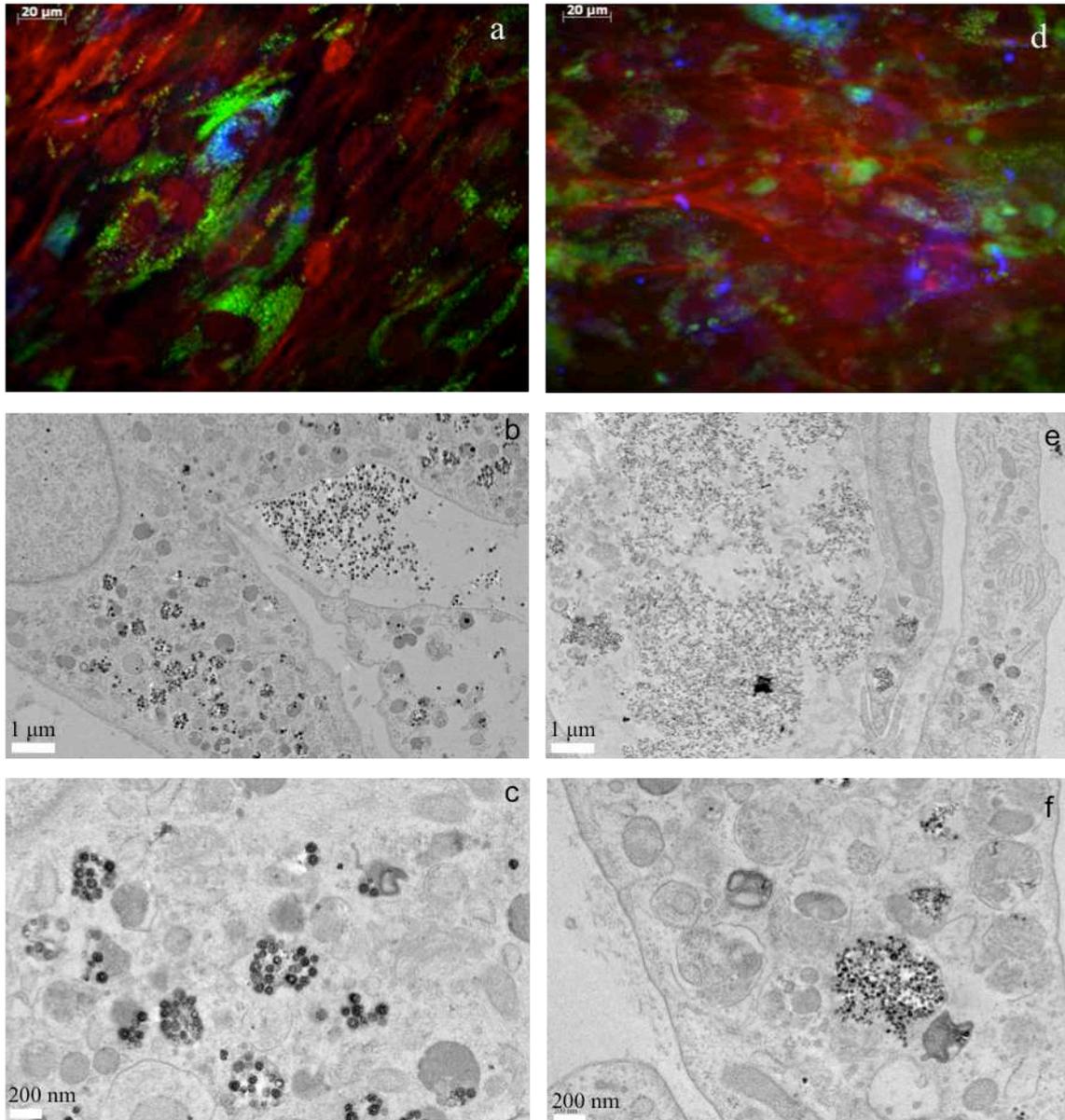


Figure 3-12: Images en microscopie à fluorescence et MET des cellules NHDF après 7 jours d'exposition aux nanoparticules (0,6 mg/mL dans du milieu de culture) et 7 jours de culture dans du milieu sans particules (a, b, c) Si+200, (d, e, f) Si+40

La microscopie électronique sur les coupes de ces mêmes cellules montre qu'effectivement il reste des particules dans les cellules mais aussi que de nombreuses particules sont à

l'extérieur des cellules (figure 3.12 c-f). Ces particules externes aux cellules peuvent provenir de l'exocytose des particules internalisées. Par ailleurs, si on regarde de plus près ces nanoparticules, on s'aperçoit qu'elles présentent une certaine porosité, absente des particules initiales. Cette modification des particules peut être due à une dissolution préférentielle de certaines zones du cœur des particules. En outre, les particules Si+200 observées après 14 jours sont plus petites que les particules initiales, aussi bien les particules internalisées que celles hors des cellules. Cette diminution de taille des particules n'est pas observée de façon significative pour les particules Si+60.

Ces observations sont quantifiées par analyse statistique de la distribution de taille des particules.

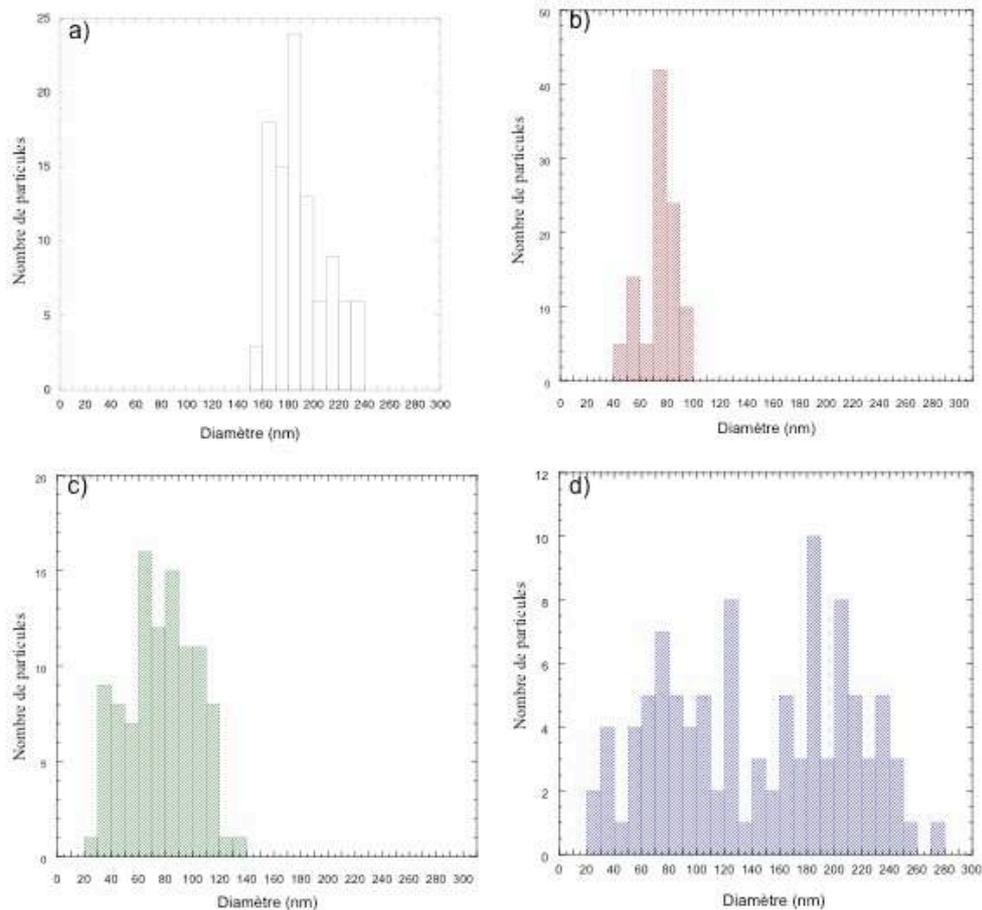


Figure 3-13: Distribution de taille des nanoparticules Si+200 évaluée par MET (a) dans l'eau, (b) dans les cellules après 2 semaines, (c) hors des cellules après 2 semaines, (d) après 2 semaines dans le milieu de culture à 37°C

La figure 3.13 montre que les particules Si+200 internalisées ont une taille moyenne de 70 ± 15 nm après 14 jours (figure 3.13 b) tandis que les particules initiales ont une taille moyenne de 175 ± 20 nm. De même, les particules hors des cellules à 14 jours ont une taille moyenne

de 80 ± 30 nm (figure 3.13 c). Cette diminution de taille n'est pas due uniquement à la dissolution qui a lieu dans le milieu puisque si on regarde la taille de particules après 14 jours dans le milieu à 37°C, on observe bien une partie des particules avec un diamètre plus faible mais il y a aussi une partie de la population de particules qui a un diamètre comparable au diamètre initial. Ceci implique que les particules subissent une dissolution intracellulaire et sont capables de ressortir des cellules. Par ailleurs, la structure interne des cellules ne semble pas modifiée par la présence des particules, et on peut observer de nombreux organites (mitochondries, réticulum endoplasmique) indiquant leur bon fonctionnement.

3.3.3 EXOCYTOSE DES PARTICULES OU DISSOLUTION INTRACELLULAIRE ?

Afin de déterminer si les particules internalisées sont capables de ressortir des cellules ou si elles sont dégradées de façon intracellulaire, après une semaine d'exposition, les cellules ont été rincées et le milieu changé tous les jours pour mesurer l'intensité de fluorescence totale ainsi que celle des formes solubles, obtenues par séparation des nanoparticules du reste du milieu (centrifugation dans un tube avec un seuil de rétention de 3 kD). On observe une libération progressive de particules et de formes solubles pour toutes les particules étudiées (figure 3.14).

Toutefois, il faut distinguer deux types de comportement selon que les particules sont initialement positives ou négatives. En effet, on a vu dans le chapitre précédent que lorsque les particules sont mises en suspension dans le milieu, leur charge de surface est modifiée par l'adsorption de protéines. Ainsi les particules initialement positives voient-elles leur charge écrantée et apparaissent légèrement négatives. A l'inverse, les particules initialement négatives restent bien négatives.

On observe que plus les particules sont petites, plus la contribution des formes solubles au signal de fluorescence est faible. Ainsi les formes solubles, pour les particules Si+200, contribuent-elles pour environ 2/3 du signal de fluorescence et les particules pour seulement 1/3 du signal. Pour les particules Si+60, la libération des particules et des formes solubles suit une tendance similaire avec une contribution majoritaire des formes solubles. Enfin, dans le cas des particules Si+10 il y a très peu de libération d'espèces fluorescentes (particules ou formes solubles) sans différence notable entre les deux contributions. Dans le cas des particules Si-10, on observe un signal de fluorescence composé à environ 90% de particules et très peu de formes solubles libérées dans le milieu.

Ces résultats sont en accord avec les observations en MET. En effet, pour les particules Si+200 il y a dissolution intracellulaire, ce qui a pour conséquence de libérer des formes solubles fluorescentes, au contraire des particules Si-10 qui peuvent être libérées entières à cause des dommages causées aux membranes cellulaires. Par ailleurs, il a déjà été observé que l'exocytose de particules de silice de charge légèrement négative est favorisée lorsqu'elles sont plus petites (Hu 2011).

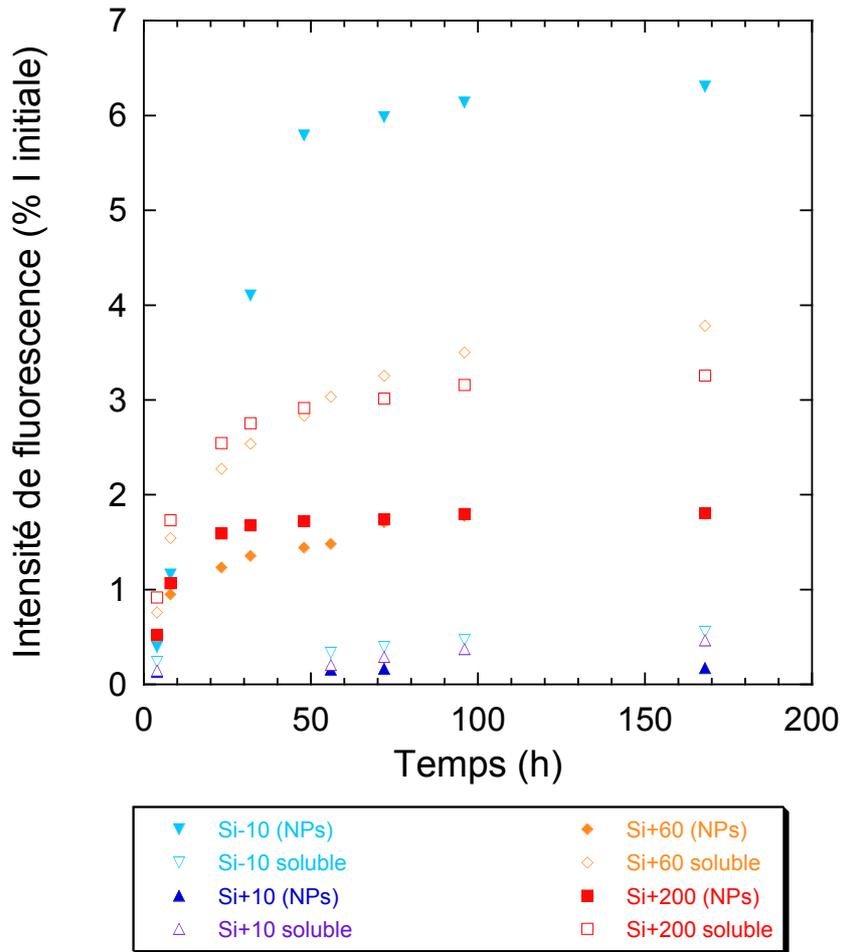


Figure 3-14: Suivi du contenu du milieu renouvelé après une semaine d'exposition des cellules aux nanoparticules, mesuré par fluorescence des espèces solubles (symboles creux) et des nanoparticules libérées (symboles pleins)

On a mis en évidence une dissolution intracellulaire des particules de silice plus ou moins importante en fonction du type de particule observé. Une question se pose alors : quel est le mécanisme responsable de cette dissolution dans les vésicules d'endocytose ? Le pH acide de ces vésicules modifie la cinétique de dissolution mais pas la solubilité de la silice. Vu le nombre de particules par vésicules et le diamètre moyen de ces dernières, on a une concentration en silice d'environ 20 mol/L pour 10 particules de 200 nm dans une vésicule de 500 nm de diamètre. Cette valeur est très largement au-dessus de la solubilité de la silice

(environ 2 mM à 37°C), donc cette dernière n'est pas le seul moteur de la dissolution. Cependant ces considérations ne sont valables que dans un système fermé. Or les endosomes peuvent être considérés comme des systèmes ouverts d'où les espèces solubles pourraient s'échapper tandis que les particules seraient piégées. En adoptant ce point de vue, on comprend que la thermodynamique prévoit que le système essaye d'atteindre son équilibre, *i.e.* atteindre la limite de solubilité. Comme les espèces solubles sont continuellement retirées, le système n'atteint jamais son état d'équilibre et la dissolution continue.

En conclusion, on a vu que selon la nature des particules, l'exocytose ou la dissolution intracellulaire sera favorisée mais, bien que dans des proportions différentes, les deux phénomènes sont observés.

3.3.5 BILAN

Après une semaine de culture sans nanoparticules, les observations en microscopie montrent qu'il y a toujours des particules présentes dans les cellules, réparties dans des vésicules mais jamais observées au niveau du noyau. Malgré cela, les cellules exposées aux particules positives ont toutes une activité métabolique comparable à celle des cellules témoins, et ce même pour les cellules exposées aux particules toxiques Si+10. Les cellules exposées aux nanoparticules négatives Si-10, quant à elles, ont subi trop de dommages lors de l'exposition à une suspension à 0,6 mg/mL pour survivre. Par contre, lorsque la concentration en particules de 10 nm de diamètre est divisée par 10 pour se ramener à un nombre de particules comparables à Si+200, les cellules présentent une activité métabolique comparable au témoin après une semaine de culture sans particules.

Par ailleurs, au cours de cette semaine de culture, une partie des particules initialement dans les cellules est excrétée. Cette exocytose des particules dépend de leur taille et de leur charge. En effet, comme observé par Hu et al. (Hu 2011) plus les particules sont petites plus elles peuvent ressortir facilement. Cependant, ils ont aussi montré que plus le temps d'incubation est long plus la quantité de particules excrétée est restreinte. Dans notre étude, on observe que pour une charge de surface légèrement négative, plus les particules sont petites plus le rapport particules/formes solubles excrétées augmente. Par ailleurs, les particules négatives Si-10 ressortent presque intégralement sous forme de particules.

De plus, on observe un phénomène de dissolution intracellulaire avant la libération des particules internalisées dans le milieu environnant pour les particules Si+200 et Si+60. Dans

le cas des particules Si+200, ce phénomène se traduit par une diminution visible de la taille des particules qui n'est pas observée pour Si+60. Il ne faut pas oublier que les expériences ont été faites à concentration massique constante, ce qui implique que le nombre de particules est plus important pour Si+60 que Si+200. Ainsi y a-t-il plus de particules qui participent à la dissolution pour Si+60 et chacune voit son diamètre affecté dans des proportions moins significatives. Outre la modification de diamètre, la dissolution intracellulaire des particules semble modifier leur structure en faisant apparaître une "porosité" visualisée en MET. Cette dernière peut être le résultat d'une dissolution des zones les moins condensées dans le cœur des particules, par exemple autour de la FITC. Ce phénomène a été observé pour des particules hybrides alginate-silice pour lesquelles la dissolution de l'alginate entraîne la libération d'espèces siliciques qui peuvent se recondenser sur l'extérieur des particules selon un phénomène de type maturation d'Ostwald (Yang 2007).

3.4 Conclusions

Cette étude a permis de mettre en évidence la capacité des particules de silice de 10 à 200 nm de diamètre, positives ou négatives, à être internalisées par des fibroblastes dermiques humains. Cette internalisation se fait par un mécanisme d'endocytose active, majoritairement par voie clathrine, qui englobe les agrégats de particules au voisinage de la membrane.

A concentration massique constante, les particules de 10 nm de diamètre induisent des dommages beaucoup plus importants dans les cellules, notamment au niveau des membranes. Ces dommages sont liés à l'internalisation puisqu'ils ne sont pas observés en présence d'inhibiteurs. De plus, les particules de 10 nm de diamètre se révèlent plus toxiques pour les fibroblastes dermiques que les particules de 40 et 200 nm de diamètre, et ce d'autant plus lorsqu'elles sont négatives. En effet, seules ces dernières induisent une mortalité cellulaire complète après 7 jours d'exposition, ainsi qu'une certaine génotoxicité après 24 heures d'exposition. Pour ce même diamètre de 10 nm, les particules positives, bien que présentant une certaine toxicité, n'induisent la mort cellulaire que d'une partie de la population et les cellules restantes sont capables de retrouver une activité métabolique normale après une semaine de culture sans particules. A l'opposé, l'internalisation de particules positives de plus de 40 nm de diamètre ne semble pas provoquer de toxicité dans cette lignée cellulaire pour une exposition allant de 4 heures à 7 jours consécutifs.

Enfin, une fois internalisées, les particules positives de plus de 40 nm de diamètre subissent une dissolution intracellulaire et les cellules libèrent de façon progressive à la fois les particules et les espèces solubles issues de la dissolution intracellulaire. Il serait donc envisageable d'utiliser ces particules non mésoporeuses pour de la délivrance intracellulaire de principes actifs basée sur la dissolution des particules comme moteur de libération progressive. Cependant ce type d'application nécessite un contrôle plus efficace de la dissolution (chapitre 5).

Chapitre 4

Diffusion des nanoparticules de silice dans un hydrogel de collagène

4.1 PRESENTATION DU SYSTEME D'ETUDE	110
4.2 INFLUENCE DE DIFFERENTS PARAMETRES	116
4.3 ETUDE DES MATERIAUX COMPOSITES COLLAGENE-SILICE	140
4.4 CONCLUSIONS SUR LA DIFFUSION DE NANOPARTICULES DE SILICE DANS DES HYDROGELS DE COLLAGENE	147

L'utilisation des nanoparticules de silice dans de nombreux produits d'application cutanée, notamment des produits cosmétiques, pose le problème de l'exposition cutanée prolongée et chronique. Des études récentes montrent qu'après exposition cutanée des particules de silice sont capables de traverser la peau et se retrouvent distribuées dans l'organisme (Nabeshi 2011). Par ailleurs, l'utilisation de nanoparticules pour la délivrance de médicaments par voie cutanée est envisagée. Afin d'étudier l'influence de différents paramètres sur la diffusion des nanoparticules de silice, nous nous intéressons dans ce chapitre à leur comportement après application sur un matériau modèle du derme : un hydrogel de collagène. La première question qui se pose est : quelle est l'influence de la taille et de la charge de surface des particules sur leur diffusion à travers le matériau ?

Au-delà de la diffusion, se posent d'autres questions comme : les particules interagissent-elles avec le matériau ? La présence de cellules au sein du gel a-t-elle une influence ? Pour répondre à ces questions, en plus de la diffusion à travers le gel nous nous sommes intéressés à la dissolution des nanoparticules au cours de cette diffusion, à l'internalisation des particules par les cellules présentes dans le gel et à la toxicité éventuellement associée.

Enfin, on peut se demander ce qui se passe lorsque les particules de silice sont intégrées au gel de collagène. En effet, les particules ainsi piégées dans le gel de collagène peuvent avoir un comportement différent et induire des conséquences sur les propriétés du matériau et sur la compatibilité avec les cellules. Il est d'autant plus intéressant d'étudier le matériau composite collagène-nanoparticules de silice que les gels de collagène sont de bons candidats dans le cadre d'applications comme la réparation cutanée. Quelques résultats de cette étude, menée essentiellement par Martín Desimone au cours de ses années de post-doctorat au laboratoire seront présentés.

4.1 Présentation du système d'étude

4.1.1 LE MATERIAU MODELE DU DERME

Le derme est constitué majoritairement d'une matrice de collagène de type I. Le matériau modèle utilisé est donc un gel de collagène de type I. Dans l'étude de diffusion, nous nous sommes limités à une concentration en collagène de 5 mg/mL, concentration inférieure à celle rencontrée dans le derme, afin de pouvoir immobiliser des cellules dans le gel lors de sa

formation. Cependant, afin d'essayer de définir l'influence de la concentration en collagène sur la diffusion et le comportement des particules, des gels de différentes concentrations entre 1,5 et 5 mg/mL ont été formés.

Les hydrogels de collagène ont été formés par neutralisation d'une solution acide de collagène avec une solution de soude et du milieu de culture (Bell 1979). Plus la concentration en collagène est importante, plus le temps de gélification est court. Pour une concentration finale en collagène de 5 mg/mL le gel se forme presque immédiatement après la neutralisation, c'est pourquoi nous ne sommes pas allés au-delà de cette concentration. Cette voie permet d'encapsuler des cellules dans le gel lors de sa formation. Les hydrogels ainsi obtenus seront dénommés dans la suite de ce manuscrit H_n, où n représente la concentration finale en collagène, ou H_{nc}, le c indiquant la présence de cellules dans le gel. De plus, une autre voie de formation des gels a été utilisée afin d'étudier l'influence de la voie de formation du matériau. Dans ce cas, la fibrillogénèse d'une solution acide de collagène est induite sous vapeurs d'ammoniac. Cette voie étant incompatible avec l'encapsulation de cellules, seuls les gels acellulaires à 5 mg/mL ont été étudiés dans ce cas et sont appelés dans la suite C5.

Pour les discussions dans la suite du chapitre, il est important de donner une description de la structure du gel. Les gels de collagène peuvent être considérés comme des fibres dispersées dans un milieu aqueux et partiellement enchevêtrées. De plus, la structure en triple hélice du collagène induit une rigidité des fibres qui peuvent être modélisées par des tubes inélastiques rigides. De ce fait, plus la concentration en collagène augmente plus le nombre de fibres augmente et donc plus la surface d'adsorption sur ces fibres augmente. Par ailleurs, on peut définir des "pores" comme les espaces entre les fibres. Dans les concentrations utilisées, la différence de quantité de collagène est faible par rapport à la masse totale du gel et n'entraîne pas de modification significative de la porosité des gels (figure 4.1). Lors de l'étude des différents gels, on pourra donc négliger la variation de la taille moyenne des pores, par contre la surface d'adsorption augmente avec la concentration en collagène.

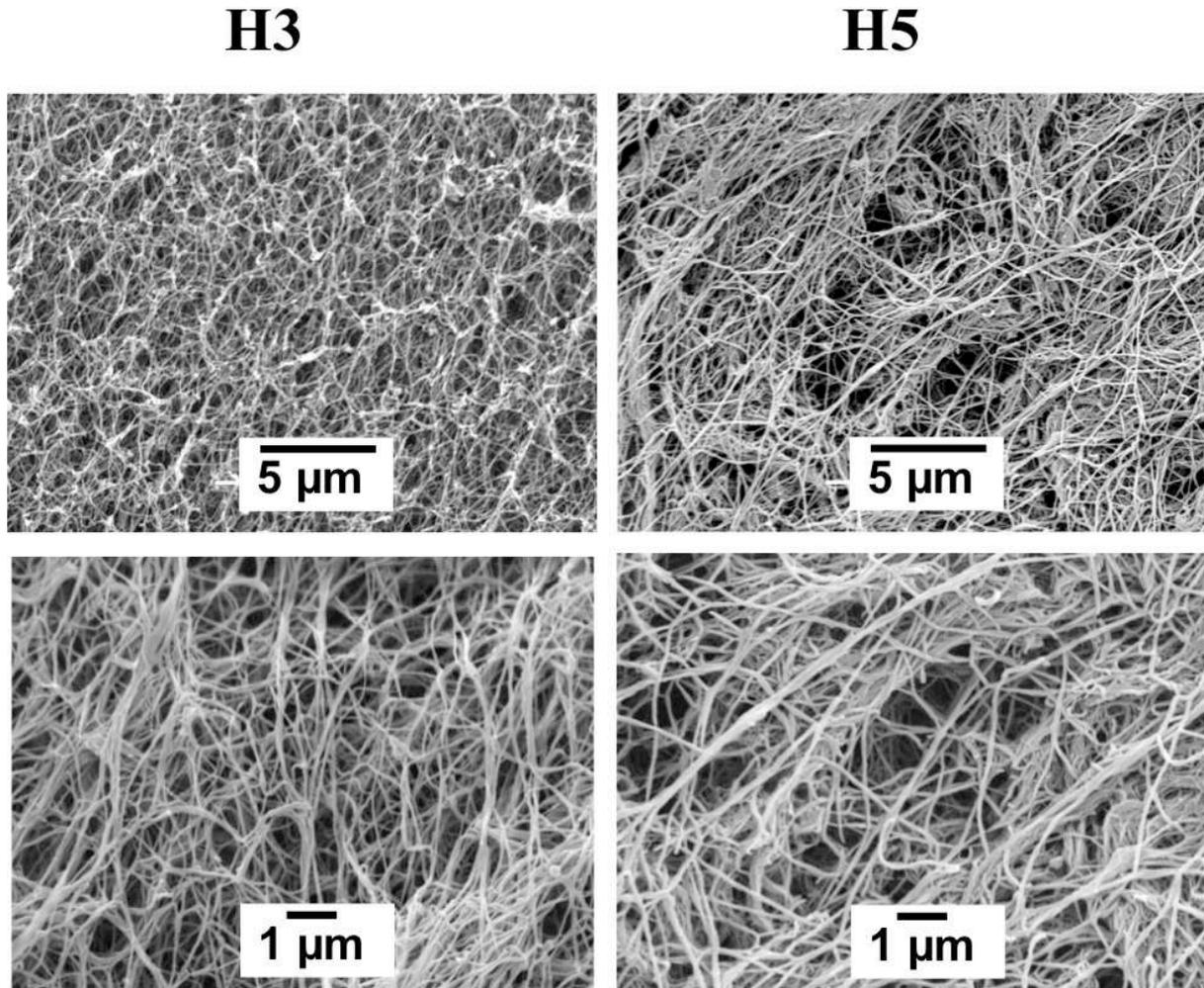


Figure 4-3 : Images de MEB des gels à 3 mg/mL (H3) et 5 mg/mL (H5)

4.1.2 LE SYSTEME DE DIFFUSION

Afin d'étudier la diffusion des particules à travers les gels de collagène, ces derniers ont été coulés dans des inserts de culture possédant une membrane poreuse (figure 4.2). Le volume des gels a été ajusté pour permettre d'avoir une épaisseur de 2 mm, épaisseur rencontrée dans le derme. Après une nuit dans l'incubateur à 37°C avec 5% de CO₂, les particules fluorescentes (Si+200, Si+60, Si+10 et Si-10) en suspension dans le milieu de culture (0,6 mg/mL) ont été placées au-dessus du gel et leur diffusion a été quantifiée par mesure de la fluorescence en sortie du gel.

Afin d'avoir accès à la dissolution des particules au sein du gel, il est nécessaire de différencier en sortie du gel la fluorescence due aux particules de celle des formes solubles. Pour ce faire, le milieu prélevé en sortie du gel a été analysé directement (fluorescence totale)

et après centrifugation dans un tube possédant une membrane poreuse pour permettre de séparer les particules du milieu (fluorescence des formes solubles). La contribution des nanoparticules a été déterminée par différence entre le signal total et le signal des formes solubles.

Le suivi de la diffusion des particules est limité à 72 heures en présence de cellules, délai au-delà duquel la contraction du gel provoquée par les cellules entraîne son décollement des parois de l'insert, créant ainsi la possibilité d'un échange direct des particules entre la suspension au-dessus du gel et le milieu situé sous l'insert.

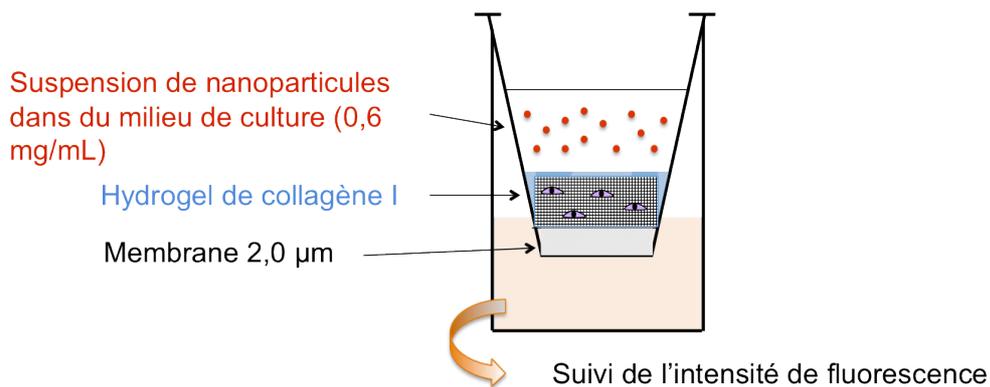


Figure 4-2 : Dispositif de diffusion

4.1.3 LE MODELE DE DIFFUSION

Afin de pouvoir comparer les cinétiques de diffusion, l'équation de diffusion correspondant au système d'étude a été résolue de façon numérique. L'ajustement de la solution aux points expérimentaux permet de déterminer les coefficients de diffusion apparents en considérant un système diffusif couplé à un équilibre d'adsorption. Afin de simplifier le problème, dans un premier temps, le modèle fait l'hypothèse que les constantes d'adsorption et de désorption peuvent être considérées comme similaires. Ces coefficients apparents permettent de comparer de façon plus précise les vitesses de diffusion des différentes particules. L'ajustement des courbes simulées aux points expérimentaux étant manuel, il est difficile d'estimer de façon précise l'incertitude sur les valeurs obtenues mais en considérant le faisceau de courbes tracées, on peut l'estimer entre $0,1 \cdot 10^{-7}$ et $0,5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Une collaboration avec José-Maria Fullana et Pierre-Yves Lagrée de l'Institut Jean le Rond d'Alembert a permis de mettre en place un modèle de calcul numérique des courbes de diffusion du système d'étude. Dans ce modèle, la diffusion est couplée avec l'adsorption des

particules dans le gel et tient compte de la dilution introduite lors du prélèvement du milieu pour les mesures. Les différents paramètres du modèle (temps caractéristique et constante d'adsorption) sont ajustés pour que les courbes obtenues modélisent effectivement les résultats expérimentaux.

Brièvement, le système d'équations différentielles (I) est rendu sans dimension (II).

$$\begin{aligned} \frac{\partial C}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - k \frac{\partial S}{\partial t} & \frac{\partial \tilde{C}}{\partial \tau} &= \frac{\partial^2 \tilde{C}}{\partial \tilde{x}^2} - \tilde{k} \frac{\partial \tilde{S}}{\partial \tau} \\ \frac{\partial S}{\partial t} &= k_a C - k_d S & \frac{\partial \tilde{S}}{\partial \tau} &= \tilde{\lambda}(\tilde{C} - \tilde{S}) \end{aligned} \quad \begin{matrix} \text{(I)} \\ \text{(II)} \end{matrix}$$

C : concentration des nanoparticules diffusant ; $\tilde{C} = \frac{C}{C_0}$

S : concentration des nanoparticules adsorbées ; $\tilde{S} = \frac{S}{S_0}$

x : hauteur dans le gel ($x=0$ correspond au dessus du gel, l est l'épaisseur du gel) ; $\tilde{x} = \frac{x}{l}$

D : coefficient de diffusion des particules

k_a : adsorption des nanoparticules sur la matrice de collagène

k_d : désorption des nanoparticules sur la matrice de collagène

$\tilde{\lambda}$: interaction des particules avec la matrice en système adimensionnel ; $\tilde{\lambda} = \frac{l^2/D}{k_d}$

τ : variable temporelle sans dimension ; $\tau = \frac{t}{l^2/D}$

Ce système est résolu de façon numérique avec les conditions initiales:

$$C(x, t=0)=0$$

$$C(x=0, t=0)=C_0$$

$$S(x, t=0)=0$$

La programmation détaillée de la résolution est donnée dans l'annexe I et le schéma des processus couplés pris en compte dans ce modèle est donné sur la figure 4-3.

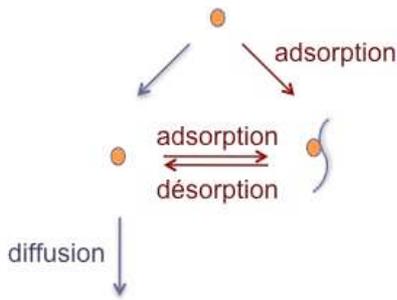


Figure 4-3 : Schéma des deux processus couplés pris en compte dans la modélisation

4.1.4 DESCRIPTION D'UNE COURBE TYPE DE DIFFUSION ET DES PARAMETRES RESULTANT DE SON ANALYSE

La figure 4.4 présente une courbe de diffusion obtenue avec le modèle, ainsi qu'une courbe de dissolution. La courbe de diffusion peut se découper en trois parties. La première partie correspond au temps de latence initial. C'est le temps nécessaire pour permettre aux particules de diffuser jusqu'au point d'étude. Ce temps dépend des caractéristiques des particules, de leur interaction avec le matériau mais aussi des propriétés du matériau (viscosité, porosité,...). La deuxième partie correspond à la courbure de la courbe, c'est cette partie qui permet de définir le coefficient de diffusion (en tenant compte du temps de latence initial). Plus cette courbure est abrupte, plus les particules diffusent vite. Enfin, la troisième partie correspond au plateau de diffusion. Dans les résultats présentés par la suite, le plateau n'est pas toujours atteint sur le temps d'étude, nous discuterons donc de la valeur à 72 heures. Lors de cette étude, nous avons suivi la diffusion des particules et des formes solubles issues de leur dissolution ; les valeurs à 72 heures de ces deux contributions seront donc présentées. Cette valeur de plateau dépend de la vitesse de diffusion des particules mais aussi, et surtout, de l'adsorption des particules dans le matériau. Plus ce plateau est abaissé par rapport à une courbe de diffusion pure (sans adsorption), plus l'adsorption des particules dans le matériau est importante et concurrente de la diffusion.

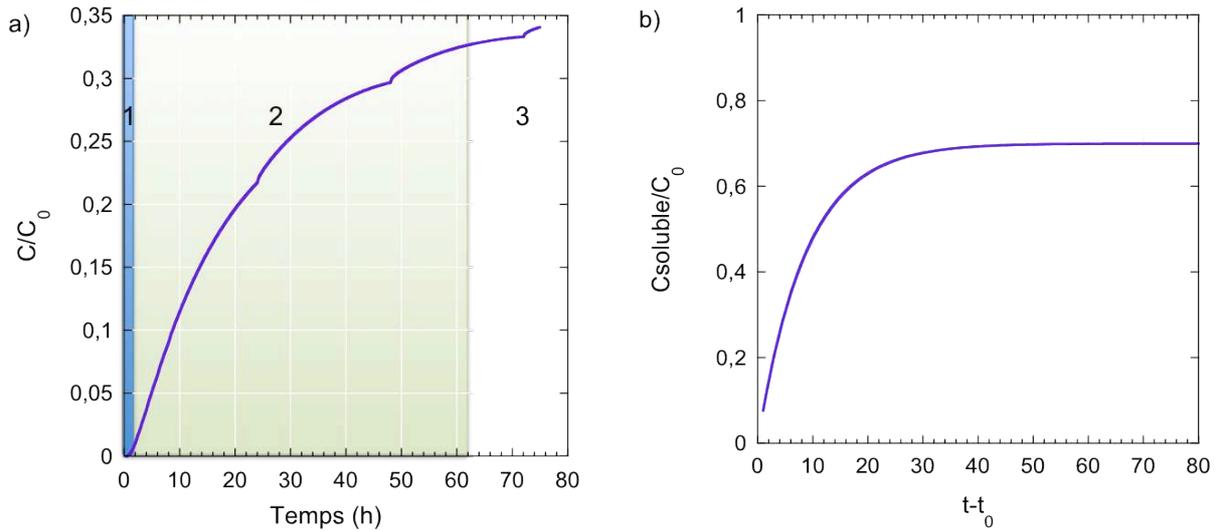


Figure 4-4 : Courbes calculée de a) diffusion et b) dissolution

Enfin, la figure 4.3 b représente une courbe de dissolution. Afin de s'affranchir du temps de latence initial t_0 , dû à la diffusion de ces espèces dans le gel, les courbes modélisées sont les courbes expérimentales de diffusion des formes solubles tracées avec un temps relatif correspondant au temps réel moins le temps de latence ($t-t_0$). La constante de dissolution apparente est obtenue en modélisant la courbure de la courbe et la concentration à l'équilibre (plateau). Cette constante n'est pas une constante de dissolution au sens strict puisqu'elle tient compte de la diffusion des formes solubles. Malgré tout c'est une caractéristique qui permet de comparer le comportement des différentes particules au sein des gels.

4.2 Influence de différents paramètres

4.2.1 QUELLE EST L'INFLUENCE DE LA TAILLE ET DE LA CHARGE DE SURFACE DES NANOPARTICULES?

Les premiers paramètres pouvant influencer la diffusion et le comportement des nanoparticules dans le gel sont la taille et la charge de surface des particules. Afin d'analyser l'impact de ces paramètres, la diffusion des particules Si+200, Si+60, Si+10 et Si-10 à travers un gel de collagène à 3 mg/mL sans cellule a été étudiée.

4.2.1.1 Effet des caractéristiques des particules sur leur diffusion

On s'intéresse dans un premier temps à l'impact des caractéristiques des particules (taille, charge) sur la quantité d'espèces fluorescentes qui diffusent à travers un gel de collagène à 3 mg/mL pendant 72 heures. On constate ainsi qu'il n'y a pas de grandes différences sur l'évolution de l'intensité totale (nanoparticules + formes solubles) pour les particules Si+200 et Si+60 (figure 4.5-a), les courbes de diffusion des espèces fluorescentes sont similaires. Par contre, lorsque le diamètre des particules diminue (Si±10) on observe un comportement différent. En effet, pour cette taille de particules on peut noter la présence d'un temps de latence initial de quelques heures qui traduit un temps de résidence dans le gel plus important avant que les premières espèces fluorescentes (nanoparticules ou formes solubles) ne soient détectées en sortie du gel. Par ailleurs, on constate que la charge de surface initiale des particules a une incidence sur la quantité d'espèces fluorescentes diffusées après 72 heures. Dans le cas des particules positives, la diminution du diamètre de 60 à 10 nm entraîne une augmentation du nombre d'espèces fluorescentes qui diffusent. Par contre, les particules négatives Si-10 donnent une intensité de fluorescence en sortie du gel plus faible que toutes les particules positives, ce qui traduit une capacité moindre des particules Si-10 et de leurs formes solubles à traverser le gel, due à des interactions plus fortes développées avec le matériau.

Afin d'étudier l'influence des caractéristiques des particules de silice sur leur comportement lors de leur diffusion à travers un gel de collagène, nous avons décomposé le signal de fluorescence total en ses deux contributions : nanoparticules et formes solubles. Les courbes correspondantes sont tracées pour Si-10 sur la figure 4.5-b. Pour les autres nanoparticules, les différents paramètres caractéristiques (intensité du signal des nanoparticules et des formes solubles à 72 h, temps de latence initial pour les formes solubles, coefficients de diffusion apparents) sont résumés dans le tableau 4.1.

On constate que la taille des particules influe sur leur comportement lors de leur diffusion dans le gel de collagène, et notamment sur la proportion de nanoparticules dans le signal de fluorescence en sortie du gel. En effet, il faut distinguer deux comportements selon que les particules ont un diamètre de 10 nm ou supérieur à 60 nm. On peut ainsi noter que, dans le cas de Si+200 et Si+60, environ 20-25% des espèces ayant diffusé sont des particules, les 75-80% restant constituent les produits de dissolution de ces particules au sein du gel. Par contre, lorsqu'on s'intéresse aux particules de 10 nm de diamètre, on s'aperçoit que la proportion de particules ayant traversé le gel H3 après 72 heures est plus importante, respectivement 47% et

60% pour Si+10 et Si-10. Les particules de 10 nm de diamètre vont donc diffuser à travers le gel essentiellement sous forme de particules tandis que pour les particules de plus de 60 nm de diamètre les formes solubles contribuent majoritairement à la diffusion.

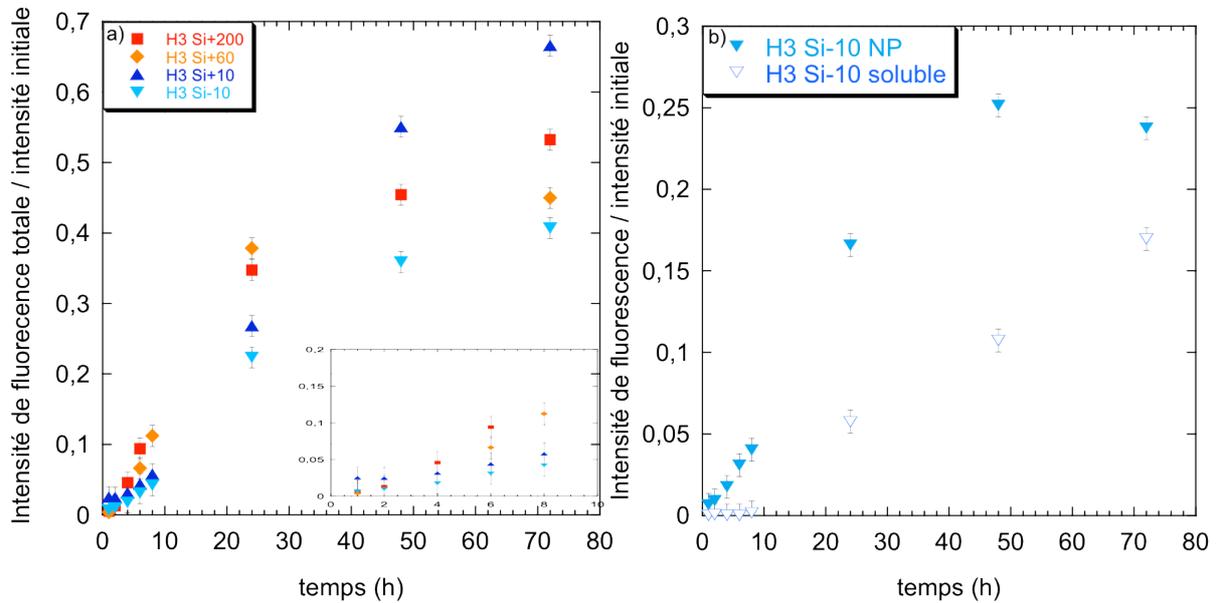


Figure 4-5 : Evolution de l'intensité totale de fluorescence en sortie d'un gel à 3 mg/mL lors de la diffusion des particules de silice (0,6 mg/mL dans du milieu de culture) et décomposition du signal de diffusion de Si-10 en formes solubles et nanoparticules

	Valeur à 72 h		Coefficient de diffusion		k_d app. gel 10^4 $\text{mg.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$	k_d , milieu 10^4 $\text{mg.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$	t_0 (h)
	Particules	formes solubles	D_{NP} $10^7 \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$	$D_{soluble}$ $10^7 \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$			
Si+200	$13 \pm 2 \%$	$40 \pm 2 \%$	5,0	11	$4,4 \pm 0,3$	470 ± 50	$0,8 \pm 0,2$
Si+60	$9 \pm 2 \%$	$36 \pm 2 \%$	3,7	11	$1,3 \pm 0,2$	25 ± 4	$1,2 \pm 0,2$
Si+10	$31 \pm 3 \%$	$35 \pm 2 \%$	7,4	3,7	$0,12 \pm 0,03$	$7,2 \pm 1,3$	$3,2 \pm 0,8$
Si-10	$25 \pm 2 \%$	$17 \pm 2 \%$	6,2	2,0	$0,07 \pm 0,01$	$2,1 \pm 0,3$	$8 \pm 0,5$

Tableau 4-1 : Paramètres de diffusion dans un gel de collagène à 3 mg/mL, t_0 représente le temps de latence initiale pour les formes solubles

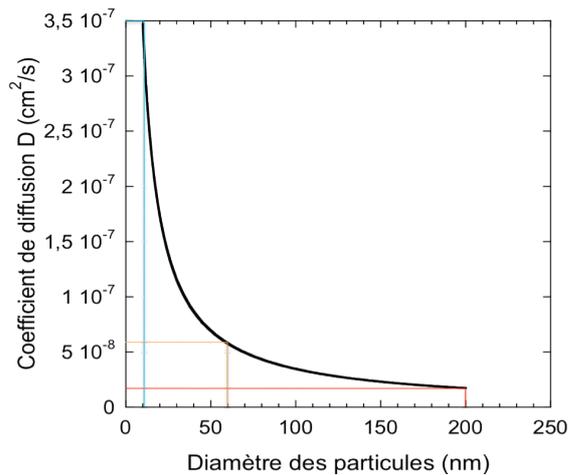
Il semblerait donc que la taille, dans une certaine gamme, et la charge de surface soient des facteurs influençant la quantité de formes fluorescentes capables de traverser un gel de collagène à 3 mg/mL en 72 h, ainsi que la dissolution de ces particules au sein du gel. Les

particules négatives sont celles qui diffusent le moins. Pour les particules positives, les particules les plus grosses diffusent en nombre moins important que les particules plus petites. Ces résultats traduisent une différence d'interactions des particules avec le matériau, la charge de surface négative semblant favoriser ces interactions. Ceci peut s'expliquer par la charge du collagène dans les conditions étudiées. Bien qu'on soit proche du pH correspondant au point isolélectrique du collagène (Li 2009), il existe des sites chargés positivement et orientés vers l'extérieur de la triple hélice (Venugopal 1994) qui permettent aux nanoparticules négatives de s'adsorber.

4.2.1.2 Etude des cinétiques de diffusion des particules

Pour aller plus loin dans l'analyse de ces courbes, nous avons modélisé la diffusion et obtenu des coefficients de diffusion (tableau 4.1) qui permettent de comparer les cinétiques de diffusion des différentes particules. Ces coefficients résultent de l'ajustement manuel des courbes obtenues par simulation aux points expérimentaux. Le programme de résolution numérique des équations régissant le système ne tient pas compte de l'ensemble des phénomènes concomitants et ne permet pas de modéliser correctement la fin des courbes. La détermination des coefficients de diffusion a donc été faite par ajustement avec les points expérimentaux de début de courbes. On constate que les particules Si+200 diffusent un peu plus vite que les particules Si+60 mais la différence reste faible. De même, les particules de 10 nm de diamètre diffusent légèrement plus vite que les particules plus grandes. Enfin, il ne semble pas y avoir de différence significative entre les coefficients de diffusion des particules Si+10 et Si-10. Il semble donc que la taille (dans une gamme de diamètre entre 10 et 200 nm) et la charge de surface des particules modifient peu la vitesse de diffusion des particules au sein d'un gel de collagène à 3 mg/mL.

Par ailleurs, les gels étant constitués essentiellement d'eau, on peut calculer, pour comparaison, les coefficients de diffusion des nanoparticules dans l'eau à 37°C en utilisant la relation de Stokes-Einstein (figure 4.6). On constate que pour les particules de 10 nm et 60 nm de diamètre, le coefficient de diffusion mesuré dans le gel est similaire à celui des particules dans l'eau. Par contre pour les particules de 200 nm de diamètre, le coefficient dans le gel est environ 20 fois plus élevé que dans l'eau.



$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$$

k_B = constante de Boltzman

T = température en Kelvin

η = viscosité de l'eau

R_h = rayon hydrodynamique des particules

Figure 4-6 : Coefficients de diffusion des particules calculés dans l'eau

La présence des fibres de collagène dans le gel ne modifie donc pas la vitesse de diffusion des particules de diamètre inférieur à 60 nm par rapport à leur vitesse de diffusion calculée dans l'eau. Par contre, la vitesse de diffusion des particules Si+200 est sensiblement modifiée en présence de collagène par rapport à la vitesse de diffusion dans l'eau. Pour proposer une explication à cette différence, il faut comparer la diffusion des particules dans le gel à la chute d'une boule entre deux parois rigides inélastiques, en faisant abstraction des interactions développées entre les particules et le collagène. Dans cette configuration, si la boule a un diamètre petit par rapport à l'espace entre les parois, sa chute est peu modifiée par rapport à une chute libre. Par contre, lorsque la boule a un diamètre du même ordre de grandeur que l'espace inter-parois, il peut y avoir des frottements avec les parois qui modifient sa vitesse ; en outre les contraintes qui s'exercent autour de la boule sont modifiées par la proximité de la paroi ce qui modifie la diffusion. On peut alors supposer que les particules Si±10 et Si+60 correspondent au premier cas de figure tandis que les particules Si+200 peuvent être perturbées par la présence des fibres de collagène puisque leur diamètre est du même ordre de grandeur que la distance entre fibres. Cependant, il ne faut pas oublier que lors de leur diffusion à travers le gel, les particules subissent une dissolution qui réduit leur diamètre en libérant des formes solubles. Ce phénomène de dissolution a lieu en même temps que la diffusion, avec un temps caractéristique du même ordre de grandeur, il peut donc perturber de façon significative la diffusion.

En conclusion, on peut dire que, dans un gel de collagène à 3 mg/mL, la vitesse de diffusion des particules dans le gel dépend peu de leur taille et de leur charge de surface. Cette diffusion dans un gel de collagène est peu modifiée par rapport à la diffusion dans l'eau, sauf pour les particules Si+200 qui diffusent plus vite dans le gel que dans l'eau.

4.2.1.3 Suivi de la dissolution des particules au sein du gel

Enfin, on s'intéresse aux courbes d'évolution de l'intensité de fluorescence des formes solubles, qui donnent accès à la dissolution des particules. Il est alors important de savoir ce que l'on observe : une dissolution au sein du gel de collagène ou bien la dissolution dans le milieu de récupération des particules ayant diffusé. Afin de s'en assurer, l'évolution des intensités de fluorescence des nanoparticules et des formes solubles en sortie du gel a été mesurée en prélevant l'intégralité du milieu à chaque temps (ce qui permet d'enlever les nanoparticules présentes dans le milieu après diffusion pour ne pas leur laisser le temps de se dissoudre hors du gel) au lieu de n'en prélever qu'une partie. Les premiers points de ces courbes se superposent. Ces résultats suggèrent que l'évolution des formes solubles observée est due à la diffusion des produits de dissolution des particules au sein du gel. En effet, si on observait la dissolution des particules dans le milieu situé en sortie du gel, lorsque l'intégralité du milieu est prélevée on s'attendrait à une modification de la courbe d'évolution de l'intensité de formes solubles. Or ce n'est pas ce qui est observé.

- Diffusion des formes solubles

On s'intéresse dans un premier temps à la quantité de formes solubles ayant diffusé par rapport au total des espèces ayant diffusé. Pour l'ensemble des particules positives étudiées, on observe une proportion similaire de formes solubles à 72 h, soit environ 35-40%. Par contre, pour les particules négatives Si-10, le signal observé en sortie du gel est composé majoritairement de nanoparticules tandis que celui de Si+10 est composé pour moitié de particules et pour moitié de formes solubles. La charge de surface a donc un impact sur la proportion de formes solubles diffusant à travers le gel. Par ailleurs, il est intéressant de noter que le temps de latence initial est principalement observé sur la diffusion des formes solubles et très peu sur la diffusion des particules (figure 4.5-b). Ce temps augmente lorsque la taille des particules diminue et quand on passe des particules positives Si+10 aux négatives Si-10. Enfin, la modélisation des courbes de diffusion des formes solubles montre que leur cinétique dépend de la taille initiale des particules dont elles sont issues (tableau 4.1). En effet, on observe une différence notable entre les coefficients de diffusion des formes solubles issues des particules de 10 nm de diamètre et ceux des formes solubles issues des particules de plus de 60 nm de diamètre, ces dernières diffusant plus rapidement. Ces résultats, comme l'évolution du temps de latence initial, peuvent s'expliquer en considérant la dissolution des

particules au sein du gel. En effet, contrairement aux nanoparticules qui sont présentes dans la solution source de diffusion, les formes solubles doivent être produites avant de pouvoir diffuser. Or, on observe, déjà dans le milieu de culture, une différence de vitesse de dissolution entre les particules de plus de 60 nm de diamètre et celles de 10 nm de diamètre. Pour confirmer ceci dans la configuration de l'étude (dissolution au sein du gel de collagène), nous nous sommes intéressés à la constante de dissolution apparente dans le gel de collagène.

- Cinétiques de dissolution

Pour pouvoir comparer la dissolution des particules dans les gels de collagène et dans le milieu de culture à 37°C, la constante de dissolution apparente des particules de silice est calculée à partir des courbes d'évolution de l'intensité de fluorescence des formes solubles. Lorsqu'on compare les différentes particules, on s'aperçoit que la dissolution est trois fois plus rapide pour Si+200 que pour Si+60 (tableau 4.1). On peut aussi noter que la dissolution des particules Si+10 et Si-10 est nettement plus lente que celle de Si+200 et Si+60 : la constante de dissolution apparente est un ordre de grandeur plus faible. Ces valeurs sont en accord avec les différences de diffusion observées. On remarque enfin que la dissolution des particules est ralentie dans le gel de collagène par rapport à la dissolution dans le milieu seul, la constante de dissolution est globalement deux ordres de grandeur plus faible (tableau 4.1). Cependant, l'ordre d'évolution des constantes de dissolution apparente, en fonction de la taille et de la charge, est conservée. Enfin, il est intéressant de noter que le taux de dissolution (rapport formes solubles/total) est similaire à celui obtenu dans le milieu de culture seul (cf figure 2.7).

4.2.1.4 Bilan sur l'influence des caractéristiques des particules sur leur diffusion et leur comportement dans un gel de collagène

En conclusion, toutes les particules étudiées, de 10 nm à 200 nm de diamètre, positives et négatives, sont capables de traverser un gel de collagène à 3 mg/mL en quelques heures. Cependant, les caractéristiques des particules, taille et charge de surface, ont une influence sur la cinétique de diffusion et la quantité de formes qui diffusent. L'effet de la taille semble en accord avec les résultats des études de Sonavane *et al.* et Nabeshi *et al.* (Sonavane 2008, Nabeshi 2011). Par contre les résultats concernant l'influence de la charge de surface des particules semblent à l'opposé de ceux obtenus par Kohli *et al.* (Kohli 2004) où les particules négatives diffusaient plus que les positives. Cependant il ne faut pas oublier que la nature chimique du matériau peut avoir une influence, notamment sur les protéines qui vont

s'adsorber en surface des particules et modifier leur charge. Dans notre étude, les particules dites positives ont une charge très légèrement négatives en milieu de culture (due à l'adsorption de protéines) et les particules négatives sont chargées très négativement, avec peu d'influence des protéines.

Enfin, les particules subissent toutes une dissolution au sein du gel, phénomène qui est ralenti par rapport à la dissolution dans le milieu de culture. Ce ralentissement de la dissolution s'explique par les interactions entre les nanoparticules et les fibres de collagène. Ces dernières sont sensibles aux caractéristiques des particules et modifient le nombre de nanoparticules et/ou de formes solubles adsorbées ainsi que la force de ces interactions. Ce phénomène d'adsorption empêche la diffusion libre des formes fluorescentes et ralentit donc artificiellement la dissolution.

4.2.2 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN COLLAGÈNE ET DE LA STRUCTURE DU GEL SUR LA DIFFUSION

La diffusion de nanoparticules dans un gel de collagène dépend de ses caractéristiques: viscosité, taille et orientation des fibrilles, tortuosité. Afin d'étudier l'influence de ces paramètres, des hydrogels à différentes concentrations en collagène (entre 1,5 et 5 mg/mL) ont été formés. De plus, la température et la force ionique ayant un impact sur la fibrillogénèse, des gels de collagène ont été obtenus par neutralisation sous vapeurs d'ammoniac à température ambiante et comparés aux hydrogels formés à 37°C par neutralisation avec de la soude en présence de milieu de culture. La diffusion de nanoparticules Si+60 dans ces différents gels a été étudiée.

4.2.2.1 Influence de la concentration en collagène

On s'intéresse en premier lieu à l'influence de la concentration en collagène sur la quantité d'espèces fluorescentes capables de diffuser à travers un gel de collagène en 72 heures. On observe que plus la concentration en collagène augmente (entre 1,5 et 5 mg/mL) plus la quantité d'espèces fluorescentes qui diffusent diminue : le plateau passe de 80% pour un gel à 1,5 mg/mL à 25% pour un gel à 5 mg/mL (figure 4.7). De plus, l'augmentation de la concentration en collagène induit la présence d'un temps de latence initial plus marqué. En effet, pour les gels à 1,5 et 3 mg/mL, des formes fluorescentes sont observées très rapidement en sortie du gel tandis que pour les gels à 5 mg/mL (H5 et C5) on observe un léger retard avant d'observer un signal de fluorescence en sortie du gel.

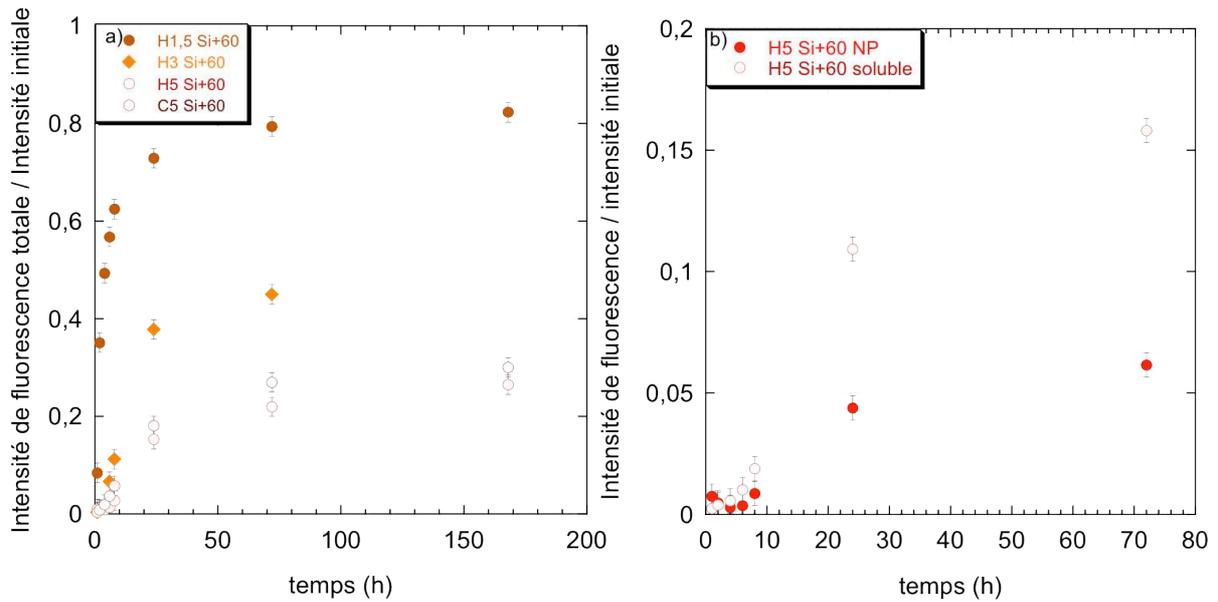


Figure 4-7: Influence de la concentration en collagène et de la voie de fibrillogénèse sur la diffusion totale (particules et formes solubles) des particules Si+60 (0,6 mg/mL dans du milieu de culture) et contribution des nanoparticules et des formes solubles au signal de diffusion de Si+60 dans un hydrogel de collagène à 5 mg/mL

Comme pour l'étude de l'influence des caractéristiques des particules, nous avons décomposé le signal de fluorescence en ses deux composantes : nanoparticules et formes solubles (figure 4.7 et tableau 4.2). On constate ainsi que la concentration en collagène est un facteur influençant la quantité de particules qui diffusent et traversent le gel. En effet, pour une concentration en collagène de 1,5 mg/mL, on observe en sortie environ 50% de particules tandis que pour des concentrations de 3 et 5 mg/mL, le nombre de particules observé en sortie du gel chute à environ 10%. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration en collagène a aussi un effet sur la quantité de formes solubles qui traversent le gel : entre 30 et 40% pour des concentrations inférieures à 3 mg/mL et seulement 20% pour des gels à 5 mg/mL. Enfin, plus la concentration en collagène est élevée plus le temps de latence initial avant d'observer des formes solubles en sortie du gel augmente.

Lorsque la concentration en collagène augmente, la surface d'adsorption sur les fibres de collagène augmente. De ce fait, on peut faire l'hypothèse que dans le cas des gels à 1,5 mg/mL, il faut peu de particules pour "saturer" les sites d'adsorption disponibles, le reste des particules et les formes solubles issues de la dissolution de ces dernières sont libres de diffuser. Pour les gels à 3 mg/mL, le nombre de sites d'adsorption augmente et il y a donc plus de particules qui peuvent s'adsorber et ainsi ne plus participer à la diffusion ; par contre

il ne reste pas suffisamment de sites d'adsorption pour retenir les formes solubles. Enfin, quand les gels sont à 5 mg/mL, non seulement les particules peuvent s'adsorber mais il reste des sites d'adsorption accessibles aux formes solubles, ce qui expliquerait pourquoi la quantité de formes solubles observée en sortie du gel diminue lorsque la concentration en collagène passe de 3 à 5 mg/mL tandis que la quantité de particules reste inchangée.

Enfin, grâce à la modélisation, nous avons pu obtenir les coefficients de diffusion des particules et des formes solubles dans les gels de concentrations différentes, ainsi que la constante de dissolution apparente des particules Si+60 dans ces gels (tableau 4.2). Ces paramètres montrent que les cinétiques de diffusion, aussi bien des particules que des formes solubles, ralentissent de façon importante lorsqu'on augmente la concentration en collagène. De plus, on peut établir une relation entre le coefficient de diffusion et la concentration en collagène : $D = D_0 \exp(-\alpha C^v)$ (Phillis 1989). Comme les concentrations en collagène utilisées sont faibles, on peut développer la relation précédente en série de Taylor et obtenir : $D = D_0 * (1 - \alpha C_{collagène}^v)$, relation qui peut s'ajuster aux points expérimentaux obtenus (figure 4.8).

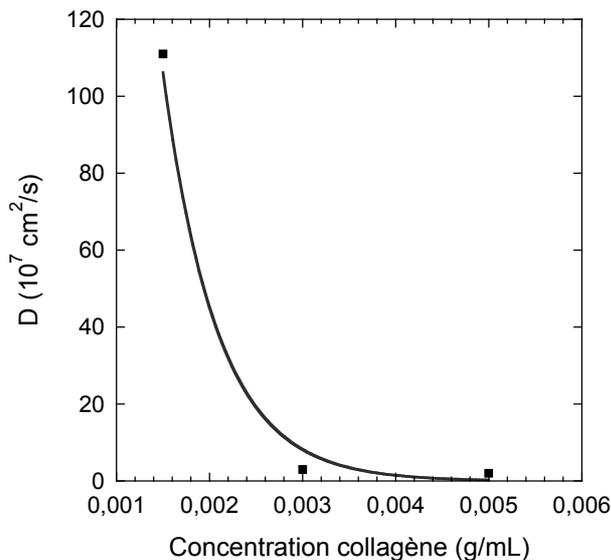


Figure 4-8: Modélisation de l'évolution du coefficient de diffusion en fonction de la concentration en collagène

L'étude du matériau montre qu'entre 1,5 et 5 mg/mL, il n'y a pas de différence significative du réseau fibrillaire et la taille des pores se situe aux alentours de $0,5 \mu\text{m}$ (Ramanujan 2002). Par contre, Ramanujan *et al.* suggèrent que la diffusion peut être entravée par la présence entre les fibres de molécules de collagène non assemblées. On peut donc émettre l'hypothèse que la différence de diffusion observée pour les particules Si+60 dans les gels de différentes

concentrations serait due à leur interaction avec le collagène non assemblé, d'autant plus présent que la concentration augmente. En outre, lorsque la concentration en collagène augmente de 1,5 à 5 mg/mL, il apparaît des inhomogénéités dans l'organisation des fibres au sein du réseau. Ces dernières peuvent créer des chemins de diffusion privilégiés qui expliqueraient le peu d'évolution de la vitesse de diffusion des particules dans les gels H3 et H5 malgré l'augmentation de la concentration en collagène.

Gel	Valeur à 72 h		Coefficient de diffusion		$k_{\text{dissolution}} (10^4 \text{ mg.mL}^{-1}.\text{h}^{-1})$	$t_0 \text{ (h)}$
	NP	formes solubles	$D_{\text{NP}} (10^7 \text{ m}^2.\text{s}^{-1})$	$D_{\text{soluble}} (10^7 \text{ m}^2.\text{s}^{-1})$		
H1,5	$47 \pm 3 \%$	$32 \pm 3 \%$	111	37	$3,4 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,2$
H3	$9 \pm 2 \%$	$39 \pm 2 \%$	3,0	11	$1,3 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$
H5	$6 \pm 2 \%$	$18 \pm 2 \%$	2,0	3,7	$0,46 \pm 0,08$	$2,4 \pm 0,8$
C5	$8 \pm 2 \%$	$21 \pm 2 \%$	2,0	5,0	$0,62 \pm 0,07$	$1,8 \pm 0,3$

Tableau 4-2 : Paramètres de diffusion des nanoparticules Si+60 dans différents gels de collagène

Par ailleurs, la constante de dissolution apparente diminue quand la concentration en collagène varie de 1,5 à 5 mg/mL, mais la proportion de formes solubles dans le signal total augmente. On observe ainsi que la dissolution des particules est plus importante dans des gels plus concentrés mais apparaît moins rapide. Ceci résulte de la compétition entre une diffusion gênée par la présence des fibres ou des molécules de collagène (qui ralentit artificiellement la dissolution) et un taux de dissolution favorisé par ces interactions.

4.2.2.2 Influence de la voie de fibrillogénèse

On veut déterminer si la voie de fibrillogénèse a une incidence sur la diffusion et la dissolution de nanoparticules de silice. Pour cela, on compare les résultats de diffusion et de dissolution obtenus pour les gels de collagène à 5 mg/mL, H5 et C5. On n'observe alors pas de différences significatives (figure 4.7 et tableau 4.2). Le plateau final est d'environ 25% de formes fluorescentes ayant diffusé à 72 heures pour les deux types de gel, avec une répartition similaire entre nanoparticules et formes solubles. De plus, les coefficients de diffusion sont similaires dans ces deux types de gel, que ce soit pour les particules ou pour les formes solubles issues de leur dissolution. Enfin, la constante de dissolution apparente n'est pas modifiée significativement par la modification de la voie de fibrillogénèse. Ceci implique que

la différence de structure induite par les conditions de fibrillogenèse n'a pas d'influence, à cette concentration en collagène, sur la diffusion de particules Si+60 ni sur leur dissolution au sein du gel.

4.2.2.3 Conclusions

Les résultats obtenus sur des gels de concentration en collagène allant de 1,5 à 5 mg/mL montrent que ce paramètre est un facteur influant sur la diffusion et la dissolution des nanoparticules de silice. Plus la concentration en collagène est élevée, plus la diffusion diminue et ralentit pour atteindre une vitesse stable entre 3 et 5 mg/mL. Par ailleurs, la concentration en collagène augmente le taux de dissolution des nanoparticules au sein du gel mais ralentit le phénomène. Enfin, la voie de fibrillogenèse pour des gels à 5 mg/mL, formés sous vapeurs d'ammoniac à température ambiante ou par neutralisation avec de la soude, ne semble pas avoir d'influence.

L'impact de la concentration en collagène sur la diffusion des nanoparticules de silice peut s'expliquer par une différence d'interactions du collagène avec les particules. En effet, plus la concentration en collagène est élevée plus les particules ont de chances de rencontrer du collagène sur leur chemin de diffusion et de développer des interactions électrostatiques avec ce dernier, avec pour conséquence une diminution de la diffusion due à l'immobilisation des particules. Ceci se retrouve dans le modèle où lorsque la concentration en collagène augmente l'adsorption n'est plus négligeable par rapport à la diffusion.

Enfin, comme la taille et la charge de surface des particules, la concentration en collagène influence la dissolution des particules, favorisée par une concentration plus élevée, mais ralentie par rapport au milieu de culture seul. Cependant, la constante calculée correspond à la constante de dissolution des particules dont les formes solubles ont diffusé pour ressortir du gel. Or lors de la dissolution dans le gel, une partie des formes solubles produites peut s'adsorber à la surface des fibres de collagène et ne peuvent donc pas diffuser librement. La différence observée entre la constante de dissolution dans le milieu et celle après diffusion dans le gel peut donc être le reflet de l'adsorption des formes solubles libérées. Cette hypothèse est en partie validée par la modélisation puisqu'il est nécessaire d'introduire une constante d'adsorption du même ordre de grandeur que la diffusion pour obtenir des courbes modélisant les points expérimentaux de diffusion des formes solubles. En l'absence de phénomène d'adsorption, la simulation d'un système purement diffusif des formes solubles mène à des courbes dont les plateaux sont bien supérieurs à ceux observés expérimentalement.

4.2.3 QUEL(S) ROLE(S) JOUENT LES CELLULES?

Une fois déterminée l'influence des caractéristiques des particules et du gel sur la diffusion et la dissolution des particules, on peut se poser la question de l'influence de la présence de cellules au sein du gel. Sachant que, lorsqu'elles sont exposées directement aux particules, les cellules internalisent les différentes particules et induisent une dissolution intracellulaire, on peut s'attendre à une modification de la diffusion et de la dissolution dans les gels.

4.2.3.1 Modification de la diffusion par la présence de cellules

Pour déterminer l'influence des cellules sur la diffusion des différentes nanoparticules de silice, nous avons suivi l'évolution du nombre d'espèces fluorescentes ayant traversé un gel de collagène à 3 mg/mL dans lequel des cellules sont immobilisées. On s'aperçoit alors que l'influence des cellules sur la diffusion dépend des caractéristiques des particules utilisées (taille, charge de surface).

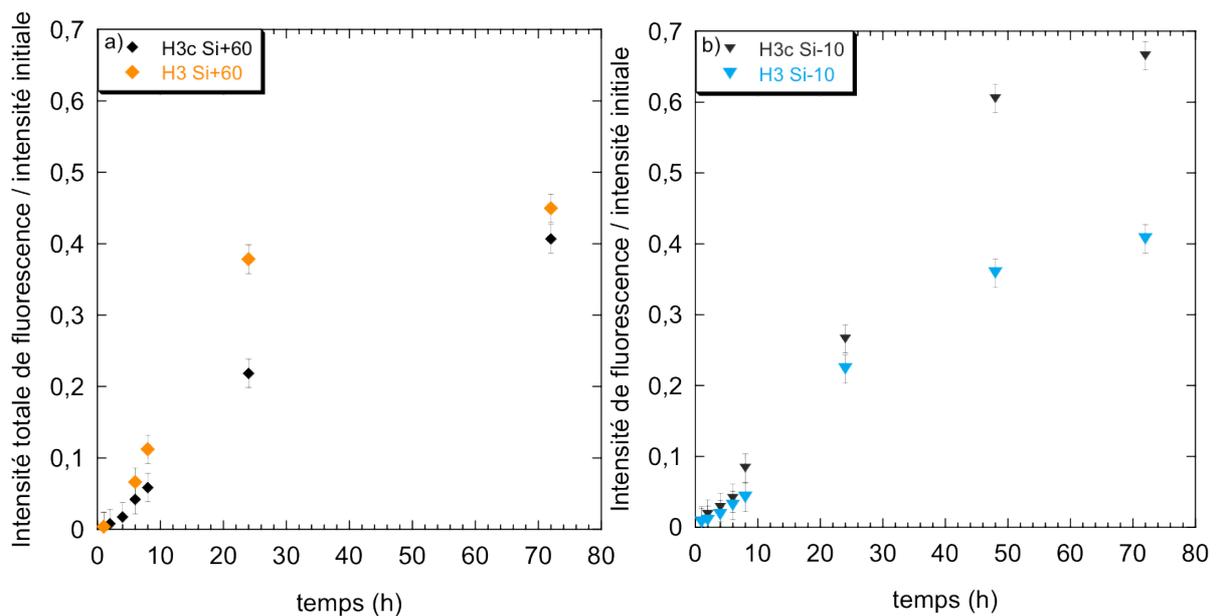


Figure 4-9: Influence des cellules sur la diffusion totale de Si+60 (a) et Si-10 (b) (0,6 mg/mL dans du milieu de culture) dans des gels de collagène à 3 mg/mL

La première constatation que l'on peut faire est que, globalement, l'évolution des différents paramètres (répartition nanoparticules/formes solubles à 72 heures et temps de latence initial) en fonction de la taille et charge de particules, est similaire dans les gels avec et sans cellules. Par contre, si on compare en détail ces différents paramètres, on peut noter certaines différences.

La première différence concerne le signal total de fluorescence en sortie du gel après 72 heures et sa répartition en formes solubles et nanoparticules. En effet, on constate que pour l'ensemble des particules positives, quelle que soit leur taille, la quantité de formes fluorescentes ayant traversé le gel après 72 heures diminue d'environ 10 à 15% en présence de cellules par rapport à la diffusion dans un gel sans cellule (figure 4.9 et tableau 4.3). Par contre, dans le cas des particules négatives, on observe l'inverse, avec une augmentation de la quantité de formes fluorescentes ayant traversé le gel après 72 heures (figure 4.9b). Par ailleurs, la quantité de nanoparticules Si+60 et Si-10 ayant diffusé à 72 heures est affectée par la présence de cellules mais pas celle des particules Si+200 et Si+10. En effet, pour Si+60 comme pour les particules Si-10, la quantité de nanoparticules à 72 heures double en présence de cellules.

Nanoparticules	Valeur à 72 h		Coefficient de diffusion		$k_{\text{dissolution}} (10^4 \text{ mg.mL}^{-1}.\text{h}^{-1})$	t_0 (h)
	NP	formes solubles	$D_{\text{NP}} (10^7 \text{ m}^2.\text{s}^{-1})$	$D_{\text{soluble}} (10^7 \text{ m}^2.\text{s}^{-1})$		
Si+200	$12 \pm 2 \%$	$34 \pm 2 \%$	11,1	22	$9,6 \pm 0,8$	0,1
Si+60	$16 \pm 2 \%$	$25 \pm 2 \%$	3,0	5,5	$0,58 \pm 0,3$	0,5
Si+10	$34 \pm 3 \%$	$23 \pm 2 \%$	5,0	3,1	$0,17 \pm 0,03$	6
Si-10	$46 \pm 2 \%$	$20 \pm 2 \%$	n.d.	3,7	$0,11 \pm 0,02$	2,8

Tableau 4-3 : Paramètres de diffusion dans un gel de collagène à 3 mg/mL avec cellules

Par ailleurs, la détermination des coefficients de diffusion à l'aide de la simulation numérique montre que l'introduction de cellules dans les gels modifie la diffusion des particules, notamment pour les particules Si+200 et Si-10. Le coefficient de diffusion n'a pas pu être déterminé pour les particules Si-10 car le modèle utilisé ne permet pas d'ajuster la courbe calculée aux points expérimentaux. Cette difficulté d'ajustement montre que la diffusion des particules Si-10 est fortement perturbée dans les gels contenant des cellules.

L'augmentation de la diffusion des nanoparticules en présence de cellules pourrait être liée à la modification du réseau de fibres de collagène par les fibroblastes. En effet, lorsque les fibroblastes sont immobilisés dans des matrices lâches de collagène, ils vont remodeler la matrice en exerçant des tractions sur les fibres de collagène pour obtenir un environnement localement plus dense. Ce faisant, il peut se créer des chemins de diffusion, favorisée par un diamètre de pores localement plus important. Dans ce cas, les particules rencontreront statistiquement moins de fibres de collagène, avec lesquelles elles peuvent développer des

interactions, et diffuseront donc plus. L'importance de ce phénomène dépend de la taille et de la charge des particules. En effet, la modification du diamètre des pores du gel a un effet faible sur la diffusion des particules petites par rapport à ce diamètre (Si+10 et Si+60). Par contre, pour des particules de diamètre du même ordre de grandeur (Si+200), l'influence sera potentiellement plus importante. Par ailleurs, pour les particules négatives, qui semblent interagir fortement avec le matériau, la modification de la porosité aura une influence non négligeable sur la diffusion, même si le diamètre des particules est petit par rapport aux pores du matériau, puisque cette modification entraîne des interactions différentes entre les particules et le matériau.

Enfin, les cellules peuvent aussi modifier directement la diffusion par adsorption ou internalisation des particules, alors incapables de diffuser librement. Pour étudier l'influence active des cellules sur la diffusion des nanoparticules, nous avons suivi la diffusion de particules Si+60 dans un gel de collagène à 3 mg/mL avec des cellules préalablement fixées avec du glutaraldehyde pour figer leur structure, donc mortes (figure 4.10 a). On n'observe pas de différence significative sur la diffusion des nanoparticules. Ce résultat suggère que l'influence des cellules sur la diffusion des particules est plutôt un phénomène passif, indirect, dû à l'encombrement spatial des cellules qui modifie localement l'organisation du réseau de fibres, effet d'autant plus visible sur la diffusion à temps long (supérieur à 24 h).

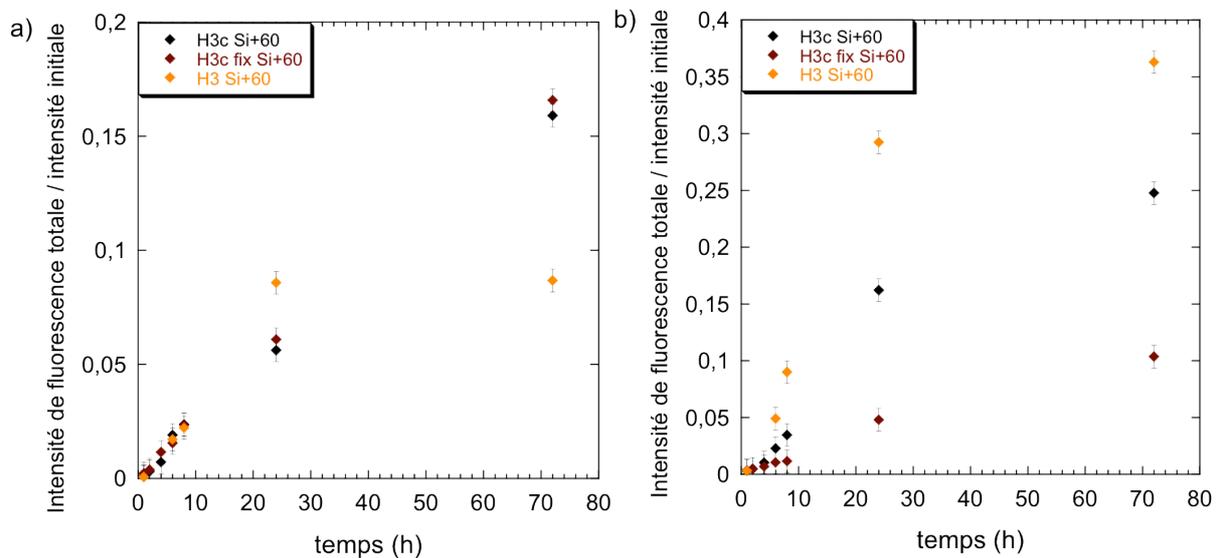


Figure 4-10: Comparaison de l'influence de cellules vivantes et mortes sur la diffusion (a) et la dissolution (b) de nanoparticules Si+60 (0,6 mg/mL dans du milieu de culture) dans un gel à 3 mg/mL

4.2.3.2 Modification de la dissolution

La présence de cellules peut avoir une influence non négligeable sur la dissolution des nanoparticules. La quantité de formes solubles issues de la diffusion des particules Si-10 semble peu affectée par la présence de cellules. Par contre, pour l'ensemble des particules positives, la quantité de formes solubles sorties du gel à 72 heures est plus faible d'environ 10% en présence de cellules (tableaux 4.1 et 4.3). Le temps de latence initial observé pour la diffusion des formes solubles a tendance, quant à lui, à diminuer en présence de cellules.

Malgré ces modifications des quantités d'espèces qui diffusent, lorsqu'on compare les constantes de dissolution apparente des particules dans les gels avec et sans cellules on note une différence pour les particules Si+200. Pour ces dernières, la constante de dissolution apparente, tout comme le coefficient de diffusion des formes solubles, est multipliée par deux en présence de cellules. Par contre, pour toutes les autres particules étudiées, la constante de dissolution apparente ainsi que le coefficient de diffusion des formes solubles sont peu modifiés par la présence de cellules. Cependant, il est intéressant de noter que dans la modélisation de la diffusion des formes solubles, la contribution du phénomène d'adsorption dépend de la présence ou non de cellules. Ainsi est-il nécessaire d'intégrer une adsorption du même ordre de grandeur que la diffusion, voire supérieure, pour modéliser de façon satisfaisante la diffusion des formes solubles en présence de cellules, alors qu'une composante d'adsorption inférieure à 20% de la diffusion permet de rendre compte de la diffusion des formes solubles dans un gel sans cellules. Il semble donc que les cellules constituent une zone d'adsorption supplémentaire des formes solubles.

Il est intéressant de noter que lorsque les cellules présentes dans le gel ont été fixées avant d'être immobilisées, la quantité de formes solubles qui traversent le gel est significativement réduite (figure 4.10 b). On peut émettre l'hypothèse que les formes solubles produites au sein du gel sont capables de rentrer par diffusion passive dans les cellules lorsque les cellules sont fixées. Ce n'est pas le cas lorsque les cellules sont vivantes puisque la membrane remplit son rôle de barrière et empêche l'accumulation des formes solubles dans les cellules. Les cellules fixées n'ont plus la capacité d'excréter les formes solubles, ces dernières peuvent ainsi s'accumuler dans les cellules et ne participent donc plus à la diffusion.

Lors de l'étude de l'interaction directe des nanoparticules avec les NHDF, nous avons montré que les cellules internalisaient les particules et que ces dernières subissaient une dissolution intracellulaire, notamment dans le cas des particules Si+200 et Si+60. Lors de l'étude dans le gel, on ne retrouve pas cette influence aussi marquée. Cependant les temps d'étude sont

différents. En effet, lors de l'exposition directe, les cellules étaient en contact 7 jours avec les particules avant le suivi de la dissolution intracellulaire. Dans l'étude avec les gels de collagène, le suivi s'arrête à 72 heures d'exposition et on ne mesure pas la libération de formes solubles après rinçage. On peut donc faire l'hypothèse que ce phénomène de dissolution intracellulaire est trop faible pour être mis en évidence pour les particules Si+60, Si±10, ou bien que les formes solubles libérées n'ont pas le temps de traverser le gel. Par contre, la différence observée sur la constante de dissolution apparente des particules Si+200 pourrait être due à un phénomène de dissolution intracellulaire des particules.

4.2.3.3 Internalisation des particules et toxicité

La présence de cellules dans le gel implique de répondre aux deux questions suivantes : les cellules internalisent-elles les particules lors de leur diffusion ? les particules sont-elles toxiques pour les cellules immobilisées dans les gels de collagène ?

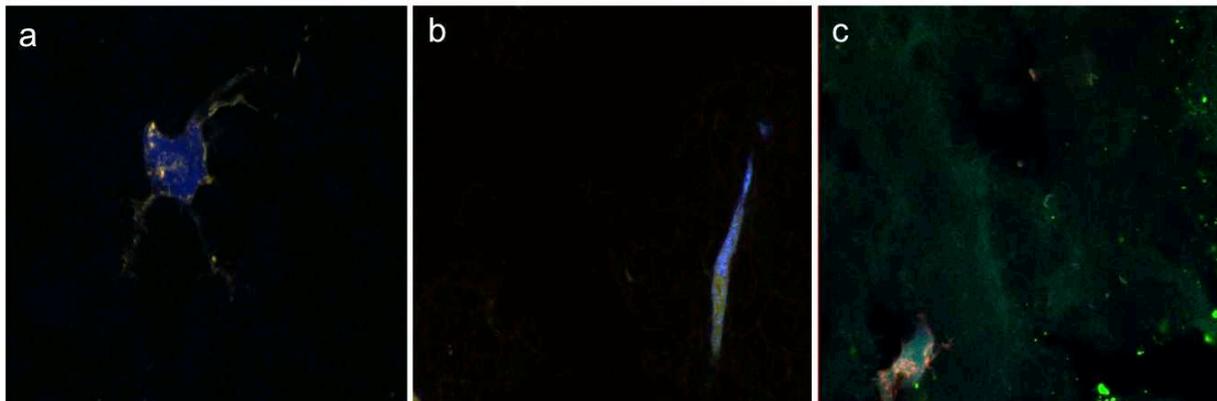


Figure 4-11: Internalisation, suivie par microscopie à fluorescence confocale, après 24 heures d'exposition, des particules Si+60 (0,6 mg/mL dans du milieu de culture) dans les cellules immobilisées dans les gels de collagène a) 1,5 mg/mL, b) 3 mg/mL, c) 5 mg/mL.

- Localisation intracellulaire

Afin de déterminer si les nanoparticules rentrent dans les cellules, après 24 heures de diffusion des nanoparticules, nous avons observé des coupes des différents gels. On constate qu'après 24 h, les particules Si+60 se retrouvent à l'intérieur des cellules immobilisées dans les gels de collagène aux différentes concentrations. L'analyse des images de fluorescence montre que les signaux de la fluorescéine et du marqueur Lysosensor sont co-localisés dans les cellules immobilisées dans un gel H3c, après 24 heures d'exposition aux nanoparticules Si+60 (figures 4.11 et 4.12). L'image 4.11-b est un zoom d'une coupe d'une cellule immobilisée et permet de définir la zone de l'image sur laquelle calculer la co-localisation. Le

graphique 4.11-a représente la co-localisation du signal de la FTIC et du Lysosensor, la zone 3 correspond à la colocalisation, les zones 1 et 2 correspondent aux deux signaux. On constate ainsi que dans cette cellule, la fluorescéine et le Lysosensor sont à 94% situés dans la même zone.

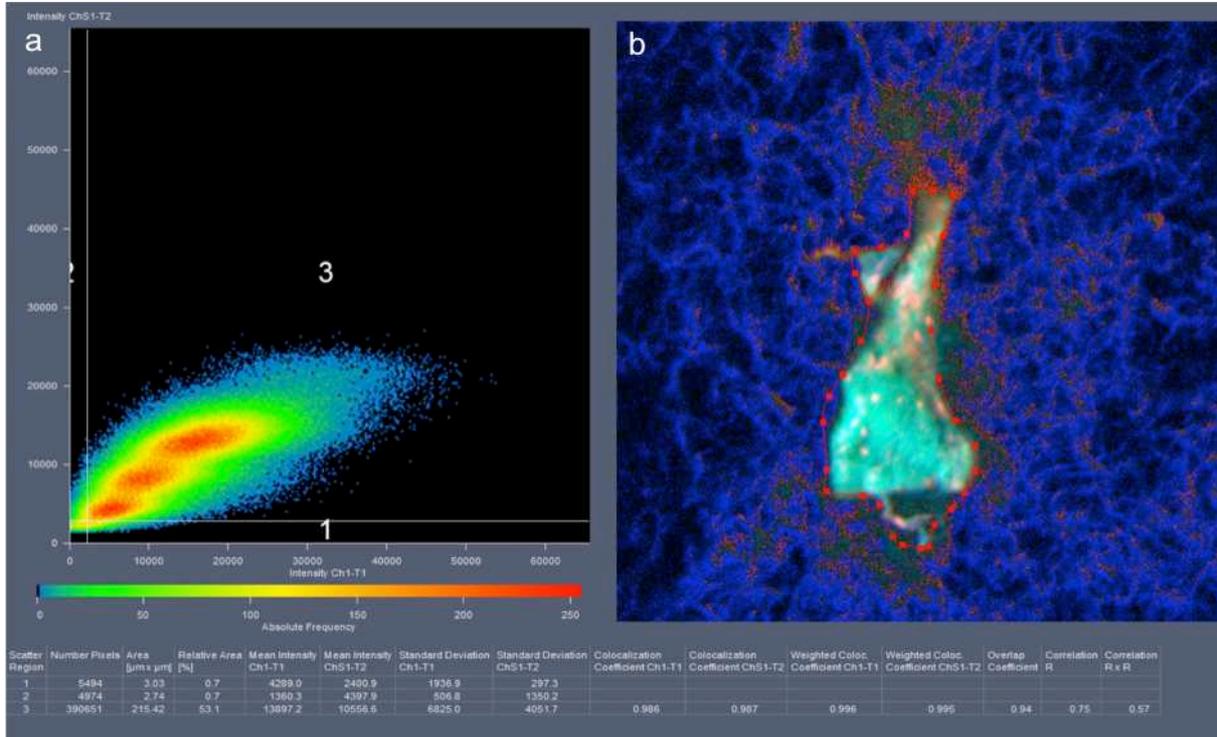


Figure 4-12: Analyse de la colocalisation des signaux de fluorescence de la FITC et du lysosensor dans une cellule de l'échantillon H1,5c exposé 24h aux Si+60 (0,6 mg/mL dans du milieu de culture), la zone 3 représente la colocalisation du signal de la fluorescéine et du Lysosensor

La même analyse effectuée sur des cellules immobilisées dans les gels à 1,5 ou 5 mg/mL exposées aux Si+60 donne une colocalisation similaire du signal de la fluorescéine avec le Lysosensor (plus de 90%). Ces résultats indiquent que les particules sont présentes dans les vésicules acides mises en évidence par le marqueur Lysosensor.

Il aurait été intéressant, pour aller plus loin dans la visualisation des particules internalisées de pouvoir observer ces cellules en MET. Malheureusement, étant donnée la densité de cellules dans le gel, il est difficile d'obtenir une coupe ultrafine contenant des cellules et malgré le nombre de coupes observées, nous n'avons pas pu obtenir d'image de cellules en MET. Cependant, l'analyse par microscopie confocale nous renseigne déjà sur l'internalisation des particules. Par ailleurs, en comparant avec les cellules en exposition directe aux nanoparticules, nous avons obtenu des résultats similaires en microscopie confocal. Il est donc probable que l'internalisation dans les cellules immobilisées au sein des gels soit comparable à celle observée dans les cellules en exposition directe.

Par ailleurs, pour des cellules immobilisées dans un gel à 3 mg/mL, on observe la présence de particules dans les cellules après 24 heures de diffusion pour l'ensemble des particules testées Si+200, Si+60, Si+10 et Si-10. Après 24 heures les particules semblent donc internalisées dans les cellules, quelles que soient la taille ou la charge initiale des particules (figure 4.13 a-d)

Enfin, lors des observations en microscopie à fluorescence, on peut constater que les fibres de collagène apparaissent comme marquées avec la fluorescéine. Ceci confirme l'adsorption de nanoparticules et/ou d'espèces fluorescentes libérées par dissolution sur ces fibres, mise en évidence lors de la modélisation de la diffusion.

- Mécanisme d'internalisation

Afin de déterminer si les particules sont internalisées par les cellules, les gels contenant les cellules sont incubés avec des inhibiteurs d'endocytose. Lorsque les cellules sont exposées aux nanoparticules en présence d'inhibiteurs d'endocytose (voie clathrine et caveolae), on constate, en fonction des caractéristiques des particules, une modification de leur présence intracellulaire.

Pour les particules Si+200 et Si+60, l'inhibiteur de la voie clathrine (cadaverine) empêche effectivement la présence de particules observables au niveau des cellules (figure 4.13 e-f) ; par contre en présence de l'inhibiteur de la voie caveolae (filipine), on constate la présence de particules au niveau de la membrane cellulaire (coloration jaune due à la colocalisation de la fluorescéine et du marqueur membranaire) (figure 4.13 i-j). Pour les particules Si-10, on observe l'effet opposé : en présence d'inhibiteur de la voie clathrine des particules sont observées au moins au niveau de la membrane cellulaire (figure 4.13 h) tandis qu'en présence de l'inhibiteur de la voie caveolae, les cellules n'apparaissent qu'avec le marqueur membranaire (figure 4.13 l). Enfin, pour les particules Si+10 (figure 4.13 g et k), il est plus difficile de conclure quant à l'internalisation des particules en présence d'inhibiteurs d'endocytose ; en présence d'inhibiteur de la voie clathrine il semble y avoir internalisation de particules tandis qu'en présence d'inhibiteur de la voie caveolae on observe une colocalisation de la fluorescéine et du marqueur membranaire.

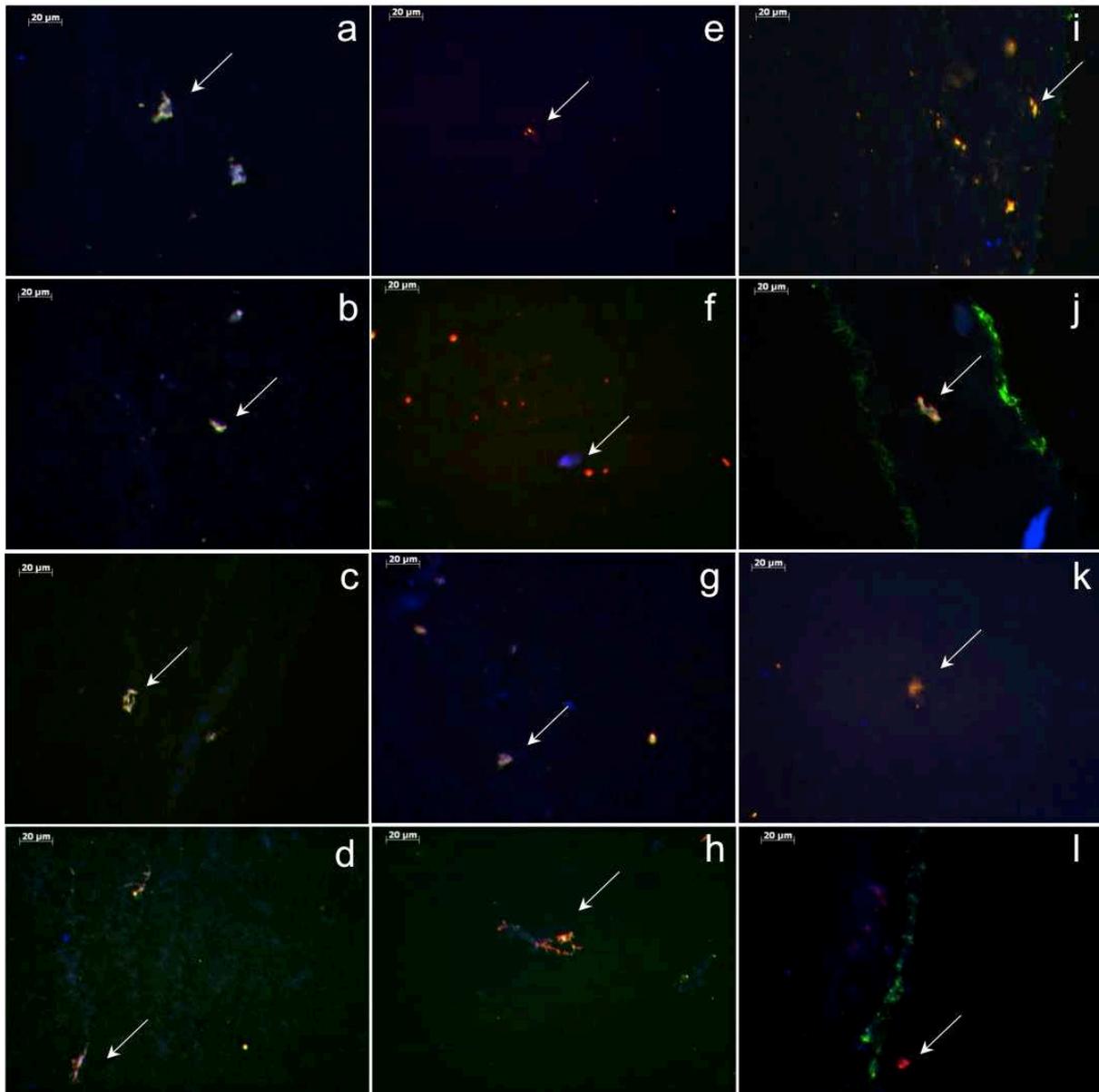


Figure 4-13: Observation par microscopie à fluorescence des cellules immobilisées dans les gels H3c après exposition aux nanoparticules (0,6 mg/mL dans du milieu de culture) (de haut en bas) Si+200, Si+60, Si+10 et Si-10 sans inhibiteur (a-d) ou en présence d'inhibiteur d'internalisation de la voie clathrine (e-h) et de la voie caveolae (i-l) (les flèches indiquent des cellules)

On peut donc conclure que les différentes particules, entre 10 et 200 nm de diamètre, positives ou négatives, sont internalisées par endocytose dans les cellules immobilisées dans des gels de collagène. Il semblerait que selon la taille des particules, la voie d'internalisation principale (clathrine ou caveolae) ne soit pas la même. Cependant, il faudrait analyser plus en détails les coupes des gels en présence d'inhibiteurs d'endocytose afin de vérifier cette hypothèse.

En conclusion, quelle que soit la concentration en collagène, entre 1,5 et 5 mg/mL, les particules Si+60 sont internalisées, après 24 h, dans les cellules immobilisées. De même, l'ensemble des particules Si+200, Si+60, Si+10 et Si-10 sont internalisées par un mécanisme d'endocytose active dans les cellules immobilisées dans un gel de collagène à 3 mg/mL. L'immobilisation des cellules dans un gel de collagène ne semble pas modifier le mécanisme d'internalisation des particules de plus de 60 nm de diamètre, internalisées par voie clathrine dans les cellules immobilisées dans un gel comme dans les cellules en exposition directe aux nanoparticules (chapitre 3 § 3.1.1). Par contre, dans le cas des particules de 10 nm de diamètre, l'immobilisation des cellules semble modifier le processus d'internalisation, mais ces résultats nécessitent une étude plus approfondie pour être confirmés. Dans tous les cas, on obtient une colocalisation importante de la fluorescéine et du Lysosensor, indiquant la présence des particules dans des vésicules acides.

- Toxicité des particules lors de leur diffusion dans les gels cellularisés

L'analyse par microscopie à fluorescence des gels a montré que les particules sont internalisées dans les cellules, il est donc important de savoir si cette internalisation perturbe les cellules en induisant une certaine toxicité. Le suivi de l'activité métabolique des cellules immobilisées dans les gels de collagène montre que lors de la diffusion des différentes nanoparticules, aucune toxicité notable n'est observée (figure 4.14 b). L'exposition aux nanoparticules diffusant dans le gel entraîne plutôt une augmentation de l'activité métabolique, notamment après 14 jours d'exposition. Cette augmentation est la plus importante dans le cas des particules Si-10. De plus, le suivi du nombre de cellules vivantes (obtenu après hydrolyse du gel) montre que les particules positives ont un effet bénéfique (Si+60, Si+10) ou neutre (Si+200) sur le nombre de cellules après 7 jours tandis que les particules négatives Si-10 ont un effet néfaste sur les premières 72 h, effet qui s'estompe légèrement au bout de 7 jours (figure 4.14 a). En corrélant ces deux études, on peut expliquer l'augmentation de l'activité métabolique des cellules exposées à la diffusion des particules Si-10 comme une réponse à une situation de stress.

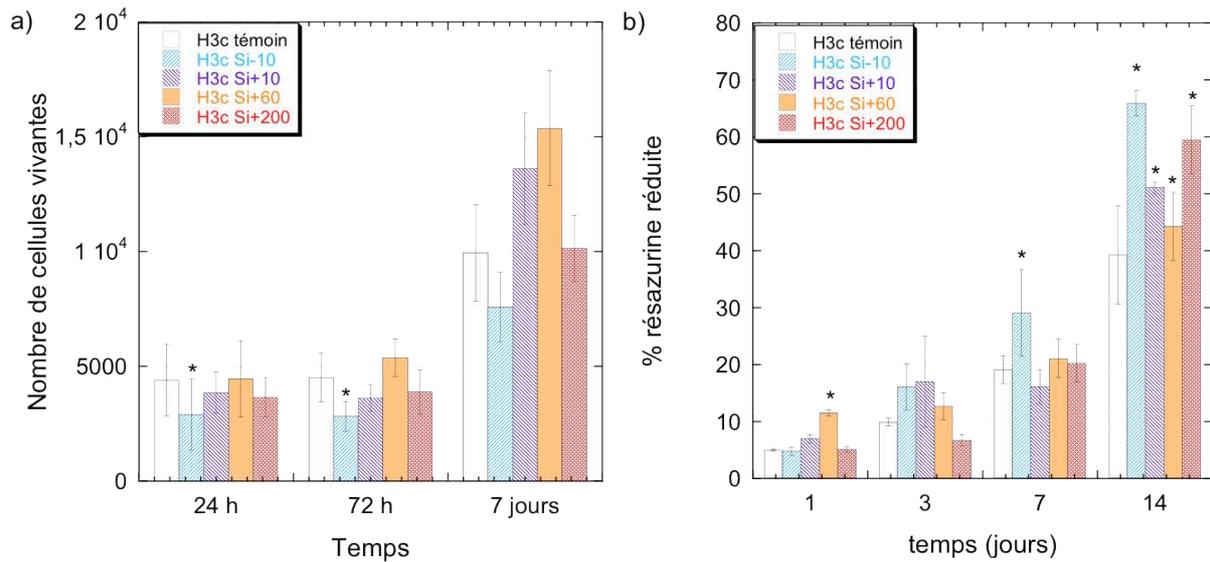


Figure 4-14: Evolution du nombre de cellules vivantes (a) et activité métabolique des cellules (b) dans les gels de collagène à 3 mg/mL exposés aux différentes particules (0,6 mg/mL dans du milieu de culture)

Il est intéressant de comparer ces résultats à l'étude de l'interaction directe des nanoparticules avec les cellules. On remarque alors que la toxicité élevée observée lors de l'exposition directe des cellules aux nanoparticules Si-10 et Si+10 n'est pas observée lorsque les cellules sont immobilisées dans le gel de collagène. On peut expliquer cette différence par un effet de dilution des particules au sein de la matrice de collagène et d'un apport progressif des particules par diffusion vers les cellules. En effet, il s'établit un gradient de concentration en particules au sein du gel et les cellules ne sont en contact qu'avec la fraction des particules diffusant à l'instant t. Par ailleurs, pour les particules de 10 nm de diamètre, les plus toxiques en exposition directe, la quantité de particules récupérées en sortie du gel est la plus importante, ce qui implique que la concentration à laquelle sont exposées les cellules immobilisées dans le gel est nettement inférieure à celle de la suspension initiale. Ceci est en accord avec la diminution de la toxicité observée sur l'exposition directe des cellules à une suspension moins concentrée en nanoparticules. De plus, les nanoparticules pouvant diffuser à travers le gel, le temps de contact avec les cellules sera réduit, ce qui limite les effets potentiellement toxiques de l'exposition aux nanoparticules et d'une accumulation de doses importantes de particules à proximité des cellules.

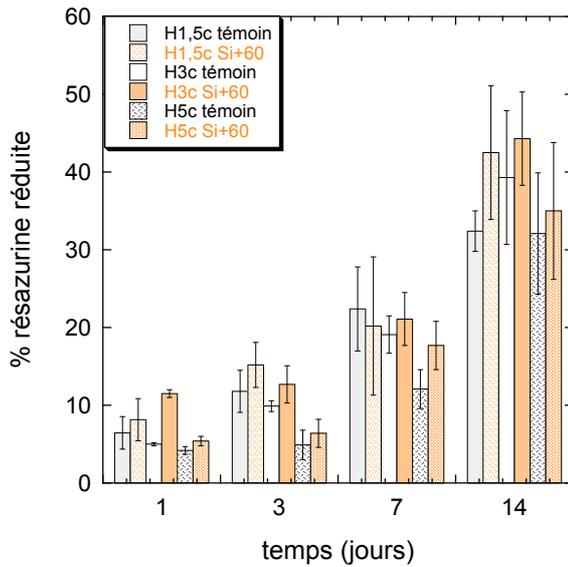


Figure 4-15: Evolution de l'activité métabolique des cellules exposées aux particules Si+60 (0,6 mg/mL dans du milieu de culture) dans les gels de collagène à différentes concentrations.

Le suivi de l'activité métabolique des cellules dans les gels aux différentes concentrations en collagène (figure 4.15) montre que quelle que soit la concentration en collagène entre 1,5 et 5 mg/mL, la diffusion de nanoparticules Si+60 n'induit pas d'effet néfaste sur les cellules. En effet, pour les 3 concentrations étudiées, l'activité métabolique des cellules dans les gels exposés aux nanoparticules est comparable à celle des cellules dans les gels témoins, de 24 heures à 14 jours.

En conclusion, lors de la diffusion des différentes particules, entre 10 et 200 nm de diamètre, positives et négatives, les cellules immobilisées dans les gels de collagène à 3 mg/mL montrent, à long terme, une légère augmentation de leur activité métabolique. Par ailleurs, dans les gels aux différentes concentrations testés, la diffusion de particules Si+60 ne semble pas modifier l'activité métabolique des cellules. Il semble donc que la diffusion de nanoparticules de silice n'induit pas d'effet néfaste dans les cellules immobilisées dans des gels de collagène.

4.2.4 BILAN SUR L'INFLUENCE DE DIFFERENTS PARAMETRES SUR LA DIFFUSION

Finalement, on constate que sur l'ensemble de l'étude, toutes les particules sont capables de traverser les différents gels de collagène et subissent une dissolution au sein du gel. Ces phénomènes sont sensibles aux caractéristiques des particules et du matériau, ainsi qu'à la présence de cellules.

Les caractéristiques des nanoparticules ont une influence notable sur leur capacité de diffusion ainsi que sur leur comportement au sein du gel. Plus la taille diminue plus les particules diffusent, avec une cinétique proportionnelle à leur taille. En parallèle, plus la taille diminue, moins la quantité de formes solubles diffusant est importante et plus la constante apparente de dissolution diminue.

Par ailleurs, les caractéristiques du gel de collagène vont, elles aussi, influencer la diffusion des particules. Plus la concentration en collagène augmente, entre 1,5 et 5 mg/mL, moins il y a de diffusion de nanoparticules et de formes solubles. Par contre, lorsque la concentration en collagène augmente, les formes solubles deviennent la contribution majoritaire du signal de diffusion.

Enfin, la présence de cellules a une influence. Bien que ne changeant pas les évolutions en fonction de la taille et de la charge des particules, la présence des cellules modifie le comportement des particules au sein du gel. Cette influence se fait en partie de façon passive, les cellules étant considérées comme des objets présents sur le trajet de diffusion, et en partie de façon active par l'internalisation des particules dans les cellules ou par la restructuration du réseau de fibres de collagène. Malgré cela, les cellules ont un comportement prolifératif peu modifié par rapport à un gel témoin sans particules.

L'étude de la toxicité des particules sur les cellules montre qu'il est important de s'intéresser à la question de la dose lors de l'exposition. Des études en 2 dimensions sur des cellules peuvent amener à des conclusions non transposables directement à une exposition réelle. En effet, lorsque les cellules sont dans un environnement tridimensionnel, ce dernier a un rôle important vis-à-vis des nanoparticules : adsorption, apport progressif par limitation de la diffusion vers les cellules. Des matériaux de culture en trois dimensions des cellules peuvent donc permettre l'évaluation et l'optimisation de nanoparticules, utilisées comme vecteurs de principes actifs, dans des conditions proches de la réalité (Goodman, 2008).

De plus, cette étude montre que les nanoparticules de silice sont capables de traverser un gel de collagène avec des concentrations allant de 1,5 à 5 mg/mL. Ces gels de collagène constituent un modèle très simplifié du derme. En effet, dans ce modèle il est réduit à une seule protéine : le collagène de type I, sans tenir compte des autres biomolécules qui peuvent avoir un rôle non négligeable. De plus, dans les gels modèles, la concentration est inférieure à la concentration réelle rencontrée dans le derme. Malgré cela, cette étude permet d'apporter quelques éléments de compréhension des interactions des nanoparticules dans une matrice de collagène, et montre que les particules de silice sont capables de traverser cette matrice pour des diamètres allant de 10 à 200 nm et avec des charges de surface positives ou négatives.

Enfin, lors de leur diffusion dans le gel, les particules vont partiellement se dissoudre. Ces résultats pourraient être exploités pour développer un implant à base de collagène intégrant des particules de silice qui pourrait libérer de façon progressive un principe actif par dissolution lors de la diffusion vers la zone d'intérêt. Ce type de matériaux fait l'objet d'études (Ding 2011) puisqu'ils offrent un support biocompatible pour encapsuler des particules (réservoir de principes actifs) qui pourront progressivement diffuser vers la zone à traiter pour libérer leurs molécules, offrant ainsi un traitement optimisé par rapport à une injection par voie intraveineuse par exemple.

4.3 Etude des matériaux composites collagène-silice

Les matériaux à base de collagène sont de très bons candidats pour la formation d'implants intégrant un traitement à libération prolongée. D'un autre côté, les nanoparticules de silice font l'objet de nombreuses études pour leur utilisation dans la libération contrôlée de principes actifs. Nous nous sommes donc intéressés à un matériau composite collagène-silice et à ses éventuelles applications biomédicales. L'étude précédente de diffusion a montré que les nanoparticules de silice sont capables de diffuser dans un gel de collagène, il semble donc intéressant d'aborder la question de la mobilité de ces particules lorsqu'elles sont intégrées au matériau avant la gélification.

Dans les matériaux ainsi formés, les particules de silice peuvent avoir deux rôles : elles peuvent être des réservoirs de principes actifs mais elles peuvent aussi développer des interactions avec le collagène et modifier les propriétés du gel. Ainsi l'introduction d'une composante minérale, comme la silice, au sein du réseau de collagène permet-elle d'obtenir des matériaux aux propriétés mécaniques améliorées (Desimone 2010). Cet effet peut être valorisé dans une utilisation comme biomatériaux, et ce d'autant plus que les gels de collagène sont de bons candidats pour l'ingénierie tissulaire, avec un inconvénient : pour des concentrations en collagène inférieures à 3 mg/mL, leur manipulation n'est pas aisée. L'une des solutions pour palier ce problème consiste à intégrer une composante minérale, une autre solution est d'augmenter la concentration en collagène (Hélary 2010).

Dans notre étude, nous avons choisi de combiner ces deux approches en évaluant la biocompatibilité de gels composites concentrés collagène-silice. Afin d'étudier à la fois l'influence des caractéristiques des nanoparticules et l'influence de la forme sous laquelle la silice est introduite nous avons utilisé deux approches pour intégrer une composante silice

dans le gel de collagène : ajouter des colloïdes de silice ou ajouter une solution de silicate qui peut polymériser au sein du gel. Avant de développer de tels matériaux pour des applications biomédicales, il faut s'assurer de leur compatibilité avec les cellules et de leur intégration dans un organisme vivant. Dans la suite, seules les études concernant l'aptitude des différents matériaux à favoriser l'adhésion – prolifération de cellules seront présentées.

4.3.1 FORMATION DES MATERIAUX

Les matériaux composites collagène-silice ont été obtenus par neutralisation d'une solution acide de collagène et ajout de la silice sous différentes formes avant la gélification. Les différentes formes de silice intégrées dans ce matériau composite sont : des nanoparticules de différentes tailles (12 nm, 80 nm et 390 nm), négatives ou positives (pour les particules de 80 nm, la charge positive a été obtenue par greffage d'amines en surface) ou une solution de silicate de sodium. La concentration en silice dans ces différents gels (10 mM) est identique à la concentration en nanoparticules de silice utilisée pour les études de diffusion. Les gels composites à 3 mg/mL sont obtenus de la même manière que les gels H3 utilisés pour la diffusion en ajoutant la source de silice sans modifier le pH (Desimone 2010). Les sources de silice sont donc des suspensions dans l'acide acétique 17 mM pour les particules et une solution neutralisée de silicate.

Afin d'élargir la gamme de composition des gels collagène-silice à des concentrations en collagène et en silice plus élevées, tout en maintenant des conditions compatibles avec l'encapsulation de cellules, des gels à plus forte concentration en collagène (jusqu'à 15 mg/mL) ont été obtenus en neutralisant la solution acide de collagène avec un tampon Tris-HCl. Cette voie permet d'augmenter le temps de gélification, donc de travailler avec des concentrations finales en collagène plus élevées sans rencontrer de problème d'inhomogénéité des gels.

4.3.2 ETUDE DE L'ADHESION / PROLIFERATION DE FIBROBLASTES SUR CES MATERIAUX

Pour valider l'utilisation de ces matériaux comme substrats biocompatibles, des tests d'adhésion/prolifération ont été menés pour étudier l'influence de la présence des différentes formes de silice sur le comportement des cellules.

4.3.2.1 Influence des caractéristiques des particules

En fonction des caractéristiques des particules et de la concentration en collagène, on observe des différences concernant l'adhésion des cellules sur les gels. On constate que l'introduction de nanoparticules de silice Ludox (particules négatives de 12 nm de diamètre) dans les gels à 3 mg/mL ou à 5 mg/mL modifie peu l'adhésion des fibroblastes (figure 4.16 a). Par contre, si l'on s'intéresse à l'influence des caractéristiques des particules (taille et charge de surface) sur l'adhésion des cellules sur les gels à 5 mg/mL, on constate que globalement l'effet le plus marqué est obtenu avec les particules Si-80, qui favorisent l'adhésion sur les six premières heures. Les particules Si+80 et Si-390, quant à elles, ont un effet plutôt légèrement néfaste sur l'adhésion des cellules.

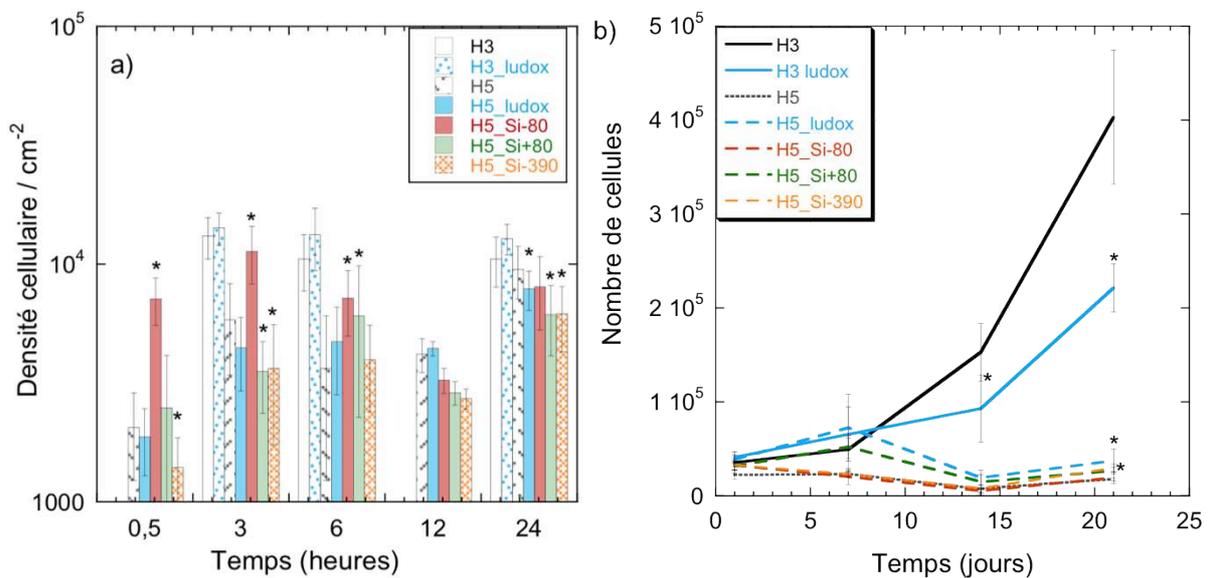


Figure 4-16: Influence des particules sur l'adhésion (a) et la prolifération (b) des NHDF dans les gels composites collagène-silice à 3 mg/mL et 5 mg/mL (10 mM de particules)

Lorsqu'on suit l'évolution de la prolifération des cellules ensemencées en surface de ces gels pendant trois semaines, on note différents comportements selon la nature des particules de silice et la concentration en collagène. Dans les gels à 3 mg/mL, les cellules prolifèrent de façon continue sur les 3 semaines de l'étude. Par contre dans les gels à 5 mg/mL, on observe un comportement de prolifération différent. En effet, le nombre de cellules augmente pendant la première semaine comme pour les gels à 3 mg/mL. Par contre, entre 7 et 14 jours, la prolifération semble s'arrêter et le nombre de cellules diminue (figure 4.16-b). Enfin, après 14 jours de culture sur les gels à 5 mg/mL, la prolifération des cellules reprend et le nombre de cellules augmente à nouveau faiblement.

La présence de particules de silice dans les gels de collagène influence la prolifération des cellules. L'introduction de Ludox (particules de 12 nm de diamètre, négatives) a des effets différents sur la prolifération des cellules dans les gels à 3 mg/mL ou à 5 mg/mL, mais l'évolution de la prolifération dans les gels collagène-Ludox est similaire à celle des gels de collagène purs dans les deux cas (figure 4.16 b). Dans les composites collagène-Ludox, la prolifération des cellules augmente de façon continue pendant les 3 semaines de l'étude dans les gels à 3 mg/mL mais est légèrement plus faible que dans un gel de collagène pur, cette différence est significative à partir de 14 jours ; par contre, dans les gels à 5 mg/mL, on a une évolution de la prolifération similaire à celle observée dans le gel de collagène pur mais avec un nombre de cellules plus important que dans ce dernier, la différence est notamment significative à 7 et 21 jours.

Les caractéristiques des particules ont une influence sur l'évolution de la prolifération. Durant la première semaine de culture le nombre de cellules augmente nettement pour les gels avec Si+80, alors que ce nombre diminue légèrement pour les gels avec Si-80 et Si-390 pour atteindre après une semaine un nombre de cellules comparable au gel témoin. Ensuite, la deuxième semaine de culture correspond, pour l'ensemble des gels, à une diminution du nombre de cellules, comme pour le témoin. Enfin, au-delà de 14 jours de culture, le nombre de cellules augmente à nouveau pour les gels avec toutes les particules testées. Finalement, on constate que l'introduction de particules Si-80 dans le gel de collagène a un effet globalement nul sur la prolifération des cellules. Par contre les particules Si+80 et Si-390 ont un effet légèrement positif. Enfin, ce sont les particules Ludox qui ont l'effet le plus important, bénéfique, sur la prolifération des cellules.

La diminution observée du nombre de cellules entre 7 et 14 jours, dans les gels à 5 mg/mL, pourrait être le résultat d'un état de confluence des cellules à la surface du gel, qui ne peuvent alors plus proliférer. Par ailleurs, la reprise de la prolifération au-delà de 14 jours peut être le résultat de la migration des cellules au sein du gel leur permettant de poursuivre leur prolifération. De plus, les gels Ludox-collagène à 3 mg/mL présentent une structure avec des pores plus petits que les gels de collagène pur, ce qui peut freiner la migration des cellules au sein du matériau et donc limiter leur prolifération. Enfin, si on compare ces résultats avec ceux obtenus lors des expériences de diffusion des nanoparticules à travers les gels, on peut supposer que les particules Ludox ne participent pas toutes au réseau du matériau et certaines sont libres de diffuser. Dans ce cas, les cellules peuvent être exposées à une certaine dose de nanoparticules de Ludox (Si-12) et on comprend, à la lumière de l'étude de diffusion, qu'au

cours de la première semaine de culture le nombre de cellules peut diminuer tout en conservant une activité métabolique accrue (réponse des cellules à une situation de stress).

La modification des conditions de gélification (neutralisation des gels à 5 mg/mL avec du Tris-HCl 1M) et l'introduction de nanoparticules de silice ont donc un impact sur le comportement des cellules mises en contact avec le matériau, notamment sur leur prolifération.

4.3.2.2 Comparaison entre silice colloïdale et silicate

La forme sous laquelle la silice est introduite dans le gel peut, elle aussi, modifier notablement les caractéristiques du gel. On constate ainsi que les propriétés mécaniques des gels à 3 mg/mL et 5 mg/mL sont renforcées par la présence de silicate (différence significative des valeurs mesurées par rhéologie) et peu modifiées par la présence de colloïdes de silice (tableau 4.4).

Gel composite	Module de conservation G (Pa)	Module de perte G'' (Pa)
H3	100	20
H3_Ludox	150	30
H3_silicate	450 *	40 *
H5	90	15
H5_Ludox	40 *	25 *
H5_silicate	1000 *	40 *

Tableau 4-4 : Module de conservation et de perte des gels composites définis par rhéologie (* différence significative déterminée par un test de Wilcoxon ($p < 0,05$))

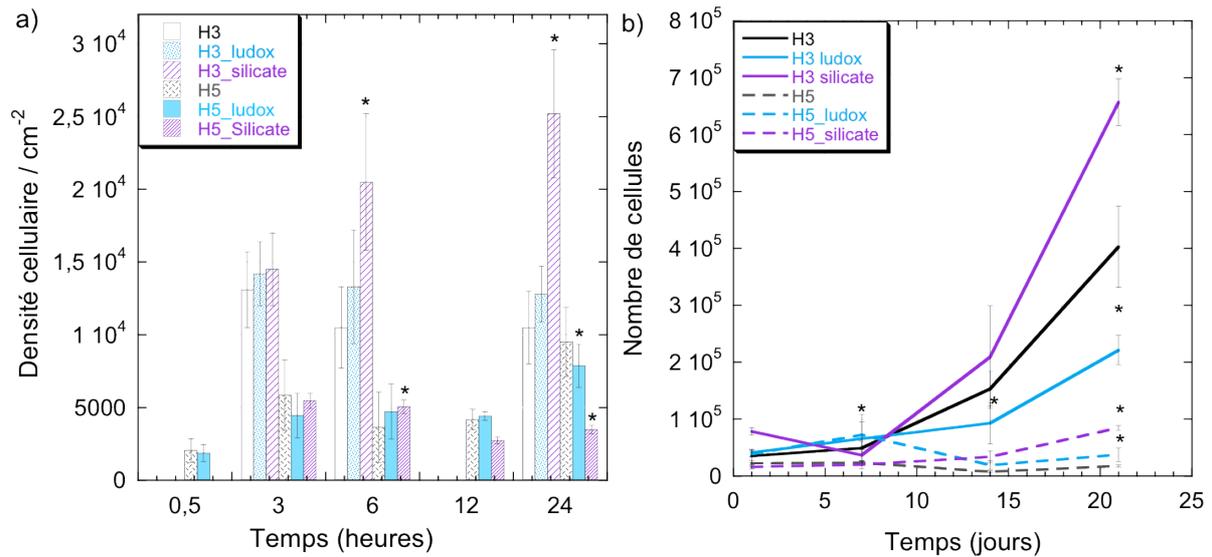


Figure 4-17: Influence de la source de silice sur l'adhésion (a) et la prolifération (b) des NHDF dans les gels composites collagène-silice à 3 mg/mL et 5 mg/mL (10 mM de silice)

Les cellules déposées sur les gels formés avec des silicates ont un comportement différent de celles ensemencées sur les gels formés avec des colloïdes. La formation d'un réseau collagène-silice par introduction de silicates lors de la préparation des gels à 3 mg/mL semble favoriser l'adhésion des cellules ainsi que leur prolifération (figure 4.17). En présence de silicates, le nombre de cellules est en constante augmentation pendant les trois semaines du suivi. Par contre dans les gels à 5 mg/mL formés par neutralisation avec du Tris-HCl, les silicates ont peu d'effet sur l'adhésion sur 12 heures et le nombre de cellules présentes à 24 heures est plus faible que sur le gel témoin. Par contre la prolifération cellulaire est, comme dans les gels à 3 mg/mL, en augmentation pendant les trois semaines de culture, et le nombre de cellules après 21 jours est significativement plus important dans le gel composite collagène-silicate que dans le gel témoin de collagène seul.

L'adhésion des cellules dépend de la surface du matériau sur lequel elles sont déposées, et notamment de la capacité des protéines d'adhésion comme les intégrines à interagir avec la surface. Les gels collagène-silicate sont ceux qui présentent les meilleures propriétés mécaniques, ce qui peut expliquer l'impact favorable sur l'adhésion.

Par ailleurs, l'environnement plus favorable créé par l'introduction de silicates lors de la formation du gel peut se retrouver partiellement dans les gels avec des nanoparticules lorsque les produits de dissolution de ces dernières vont interagir avec les fibres de collagène. La nature des interactions sera différente puisque la silice soluble interagira avec des fibres de collagène déjà formées tandis que les silicates peuvent participer pleinement à la fibrillogénèse. Malgré tout, cette interaction des formes solubles avec les fibres de collagène

peut contribuer à renforcer les propriétés mécaniques du gel et donc apporter un environnement plus favorable pour les cellules. Ce processus prenant du temps, cela expliquerait pourquoi l'activité métabolique des cellules dans les gels en contact avec les nanoparticules en diffusion n'augmente, par rapport au témoin, qu'après deux semaines. Cette modification des propriétés du gel se reflète d'ailleurs dans l'hydrolyse par la collagénase faite pour suivre le nombre de cellules vivantes par coloration au Bleu de Trypan. En effet, les gels exposés aux particules nécessitent un temps d'incubation avec la collagénase deux fois plus long pour être totalement hydrolysés, ce qui traduit la difficulté de l'enzyme à dégrader le collagène en présence de particules de silice. Ceci pourrait être dû à une interaction de la silice avec les fibrilles de collagène, la silice jouant le rôle de "pont" entre les fibrilles ou empêchant l'enzyme d'accéder à son site d'action.

L'ajout de silice, sous forme de nanoparticules ou de silicate, bien que modifiant les propriétés des gels, n'empêche pas la prolifération des cellulesensemencées initialement en surface des gels. Ces résultats sont encourageants pour l'utilisation de ces matériaux comme implants.

4.3.3 BILAN SUR LES MATERIAUX COMPOSITES COLLAGENE-SILICE

L'introduction de silice, sous forme de nanoparticules ou de silicate, dans les gels de collagène permet d'améliorer leurs propriétés mécaniques sans effet néfaste pour les cellules. Les gels formés avec une solution neutralisée de silicate semblent fournir le meilleur matériau pour la prolifération des fibroblastes déposés en surface, que ce soit dans les gels formés par neutralisation avec de la soude ou avec du tampon Tris-HCl. Par contre, lorsque les fibroblastes sont immobilisés dans le gel formé avec des silicates, l'ajout de cette source de silice a un effet néfaste sur l'activité métabolique (Desimone 2011). Il est donc important de bien définir l'utilisation de tels matériaux. Pour être utilisés comme matériaux acellulaires, les gels hybrides collagène-silicate semblent être les meilleurs candidats. Par contre, pour servir de modèle de culture 3D, la silice colloïdale est préférable pour l'encapsulation de cellules. Cependant, l'étude des matériaux hybrides collagène-silicate peut permettre de comprendre des comportements observés dans les gels où les particules subissent une dissolution, entraînant le dépôt éventuel de silice soluble au sein du réseau de fibres de collagène et modifiant le comportement du gel.

4.4 Conclusions sur la diffusion de nanoparticules de silice dans des hydrogels de collagène

Cette étude a permis de mettre en évidence l'influence de différents paramètres sur la diffusion de nanoparticules à travers un gel de collagène, ainsi que sur leur comportement au sein du gel et leur incidence sur les cellules éventuellement présentes.

De façon générale, on a vu que l'ensemble des particules, entre 10 et 200 nm de diamètre, positives ou négatives, sont capables de traverser un gel de collagène à 3 mg/mL, avec ou sans cellules. Cependant, les caractéristiques des particules sont à prendre en considération pour expliquer la différence de capacité à diffuser et de cinétique de diffusion. La capacité des particules à diffuser est inversement proportionnelle à leur taille, contrairement à la vitesse de diffusion, et est favorisée par une concentration en collagène plus faible. Par ailleurs, la présence de cellules ne modifie pas les profils de diffusion, elle influence essentiellement la répartition entre nanoparticules et formes solubles.

De plus, toutes les particules étudiées subissent une dissolution au sein du gel, processus influencé par les interactions entre les nanoparticules et le matériau. Etant donné que la taille et la charge de surface modifient les interactions des particules avec le collagène, ces paramètres ont une influence sur la dissolution des particules : lorsque la taille diminue, la quantité de formes solubles diffusantes est moins importante et la constante apparente de dissolution diminue. Par ailleurs, les caractéristiques du gel de collagène vont, elles aussi, influencer la dissolution des particules. La proportion de formes solubles dans la quantité totale de formes fluorescentes ayant diffusé à 72 heures augmente lorsque la concentration en collagène augmente, les formes solubles devenant la contribution majoritaire du signal. Enfin, la présence des cellules modifie le comportement des particules au sein du gel. Cette influence se fait en partie via l'internalisation des particules dans les cellules et en partie par la fonction passive des cellules qui sont des obstacles pour la diffusion. Malgré cela, les cellules ont un comportement prolifératif peu modifié par rapport à un gel témoin sans particules.

Ces résultats pourraient être exploités pour développer un implant à base de collagène intégrant des particules de silice qui pourrait libérer de façon progressive un principe actif par dissolution lors de la diffusion vers la zone d'intérêt. L'étude de la compatibilité de ces matériaux composites collagène-silice montre que l'ajout de silice sous différentes formes améliore les propriétés mécaniques du matériau sans effet néfaste pour les cellules. Par

ailleurs, en modifiant légèrement le protocole de formation des matériaux, il est possible d'obtenir des gels de concentration plus importante en collagène et en silice, sans problème d'inhomogénéité et sans incidence négative pour les cellules. En combinant les résultats obtenus sur la diffusion de particules de silice à travers les gels de collagène et l'optimisation des propriétés des matériaux composites collagène-silice, il serait possible de concevoir un matériau biocompatible libérant progressivement des particules de silice et leur contenu.

Nanoparticules de silice pour la libération intracellulaire de principes actifs

5.1 ETUDE DE LA STRUCTURE DES PARTICULES N%SS PAR RMN DU SOLIDE	151
5.2 COMPORTEMENT DES NANOPARTICULES EN ENVIRONNEMENT CELLULAIRE MIMÉ	157
5.3 INTERNALISATION DES NANOPARTICULES ET TOXICITÉ	161
5.4 LIBÉRATION D'UN MARQUEUR FLUORESCENT	171
5.5 CONCLUSIONS SUR LES PARTICULES N%SS ET LEUR APPLICATION POUR LA LIBÉRATION DE PRINCIPES ACTIFS	176

Les nanomatériaux, grâce à leurs propriétés particulières et à leur taille, ont un fort potentiel comme vecteurs de principes actifs. Ils peuvent notamment permettre d'améliorer la stabilité et le profil pharmacocinétique de certaines molécules d'intérêt thérapeutique fragiles ou nécessitant un ciblage précis. Parmi les matériaux envisagés pour de telles applications, la silice possède plusieurs avantages. Le premier est la facilité de synthèse et l'adaptabilité des fonctionnalisations possibles (Wang 2008, Taylor-Pashow 2010), permettant même d'intégrer une fonctionnalité d'imagerie dans les particules encapsulant un principe actif (Cheng 2010). D'autre part, les particules de silice possèdent une stabilité thermique et chimique supérieure à celle systèmes organiques utilisés dans les applications biomédicales (Barbé 2004). Enfin, la silice est considérée comme un matériau bio-compatible.

Dans ce contexte, il n'est pas étonnant que de nombreuses études soient menées sur l'utilisation de particules de silice dans le domaine biomédical : imagerie, libération de principes actifs, thérapie génique...(Slowing 2008, Rosenholm 2010). Les auteurs de ces études ont dû répondre aux impératifs des vecteurs thérapeutiques : stabilité, biocompatibilité, méthodes d'encapsulation, modulation du temps de résidence dans l'organisme, contrôle de la libération du principe actif et ciblage des particules... En réponse à ces contraintes, des particules de structure et de composition de plus en plus complexes ont été obtenues, permettant de moduler la réponse biologique mais aussi de contrôler la libération (ciblage et profil pharmacocinétique).

Nous avons vu, dans le chapitre 1 que les capacités réductrices des endosomes peuvent être mises à contribution pour contrôler la libération de principes actifs encapsulés dans une particule, elles pourraient donc aussi permettre de contrôler la dégradation de particules hybrides contenant des ponts disulfures dans leur structure. En effet, lors de leur internalisation, ces particules hybrides se trouveront confrontées à un environnement réducteur entraînant la rupture de ponts disulfures. Si les ponts disulfures sont intégrés à la structure de la particule, tout en étant accessibles aux protéines réductrices, leur rupture peut fragiliser la particule et donc favoriser sa dégradation. C'est pour répondre à cette question que le comportement en environnement cellulaire, mimé ou réel, des particules n%SS a été étudié. Avant de s'intéresser à leur comportement en environnement cellulaire, il est important de déterminer la structure des particules, et notamment répondre aux questions suivantes : le disulfure est-il intégré sans être dégradé ? Où se situent les disulfures: en surface et /ou dans le cœur des particules ?

5.1 Etude de la structure des particules n%SS par RMN du solide

Les différentes caractérisations présentées dans le chapitre 2 montrent que le taux de ponts disulfures a une incidence sur certaines propriétés physiques des nanoparticules : charge de surface, surface spécifique, aspect plus ou moins homogène en MET et nombre de groupements éthoxy présents dans les particules finales. Pour mieux comprendre la structure des particules et la répartition des disulfures, une série de mesures en RMN du solide a été menée et analysée à l'aide de Guillaume Laurent et Sylvie Masse. Ces mesures permettent d'évaluer la condensation de la silice, la répartition des silanes dans les particules et la mobilité des espèces.

5.1.1 CONDENSATION, INTEGRITE DU DISULFURE ET MOBILITE DES ESPECES : RESULTATS DES EXPERIENCES DE POLARISATION CROISEE

Des acquisitions RMN 1D CP-MAS ^1H - ^{13}C et ^1H - ^{29}Si ont été réalisées sur un spectromètre RMN du solide Bruker AVANCE III 300 (fréquence de Larmor du proton : $\nu_L = 300$ MHz).

5.1.1.1 Spectres de polarisation croisée $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C

Les spectres CP $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C apportent plusieurs informations sur la structure des particules. En plus des signaux attribuables à la chaîne carbonée de l'APTES (9,6 ppm, 21,4 ppm et 42,8 ppm) et des éthoxy résiduels des alcoxydes non hydrolysés (17,7 ppm, 18,9 ppm, 58,8 ppm et 60,7 ppm), le pic à 42 ppm prouve que le disulfure est bien incorporé, et ce sans réduction de la fonction disulfure en thiol. En effet, entre un groupement disulfure et un thiol, le signal du carbone en α de l'atome de soufre a un déplacement chimique différent : 42 ppm dans le premier cas et 29 ppm dans le second cas. Or aucun signal à 29 ppm n'est observé (figure 5.1-a). Par ailleurs, bien que les expériences CP ne soient pas quantitatives, comme l'ensemble des spectres a été enregistré dans les mêmes conditions, on peut les comparer entre eux.

Lorsqu'on compare la somme des intensités des pics correspondant aux différents groupements (figure 5.1 b), obtenus en fittant chacun des pics expérimentaux présents sur les spectres $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C CP MAS sous DmFit (Massiot 2002) par ajustement avec des pics modélisés en intensité, largeur, position et rapport Gaussien/Lorentzien, on constate que la composante correspondant au disulfure augmente dans la série n%SS quand n passe de 0 à 40%, en accord avec les résultats de l'analyse élémentaire présentés dans le chapitre 2. De

plus, la présence de FITC ne modifie pas le signal RMN de la composante disulfure dans les particules contenant 20% et 40% de disulfure.

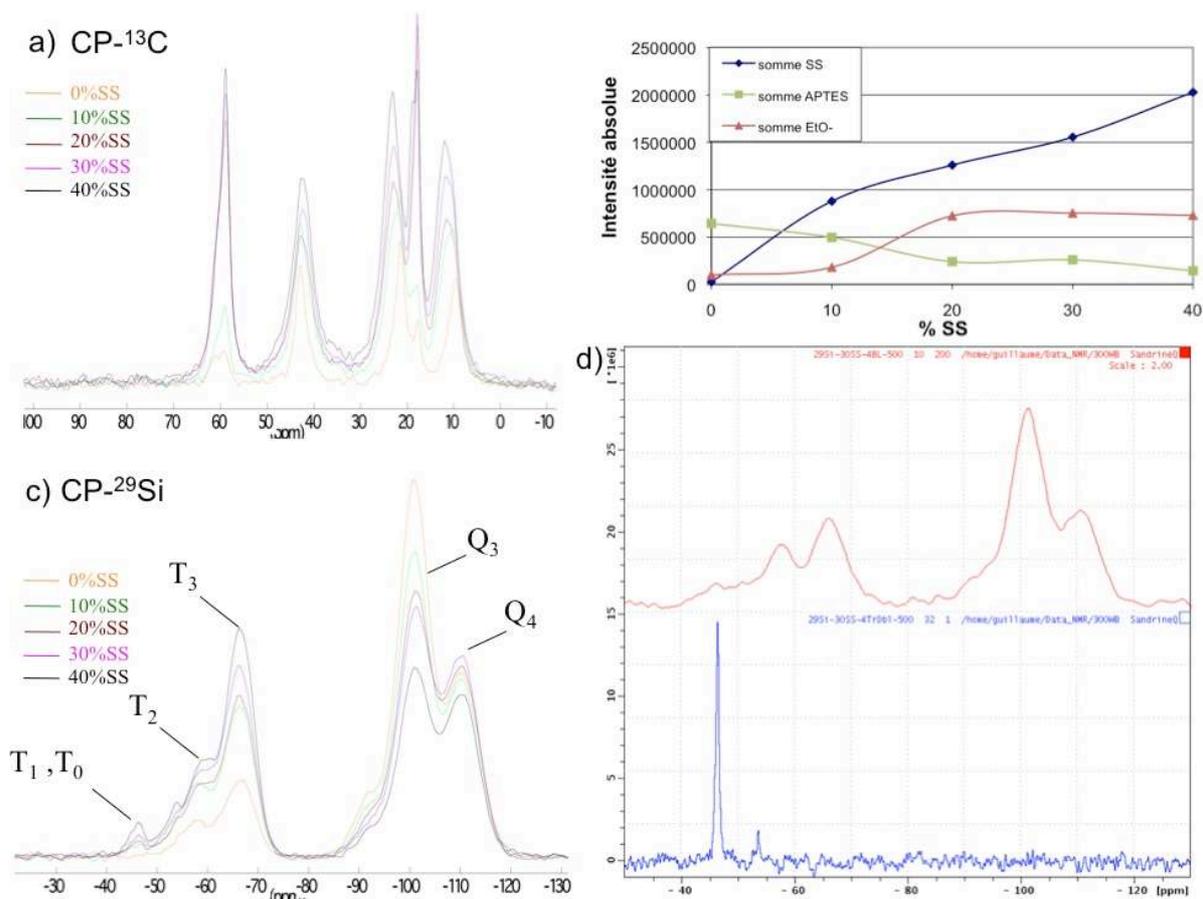


Figure 5-1: a) Spectre RMN $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C CP MAS, b) évolution de la somme des intensités du disulfure, de l'APTES et des ethoxy, c) spectre RMN $\{^1\text{H}\}$ - ^{29}Si CP MAS et d) comparaison des spectres $\{^1\text{H}\}$ - ^{29}Si CP MAS et INEPT pour les particules 30%SS non fluorescentes

En parallèle, on trace l'évolution de la composante éthoxy. Les groupements éthoxy visibles en RMN résultent de l'hydrolyse incomplète des différents précurseurs de silice (TEOS, APTES et disulfure). La composante éthoxy est quasi-constante pour 0 et 10%, augmente entre 10% et 20% de disulfure avant d'atteindre un second palier au-delà de 20%. La quantité d'eau (nécessaire à l'hydrolyse des précurseurs) introduite étant constante dans les synthèses avec les différents taux de disulfure, cela pourrait expliquer que lorsqu'on introduit plus de silanes, l'hydrolyse devient moins bonne. D'un point de vue stœchiométrique, la quantité d'eau introduite est en léger excès (entre 2,2 et 2,7 fois plus d'eau que de groupements éthoxy à hydrolyser), mais cet excès n'est peut-être pas suffisant pour permettre cinétiquement une hydrolyse complète des différents précurseurs. L'absence d'évolution de la composante éthoxy pour les particules 20%SS, 30%SS et 40%SS, malgré l'ajout d'une quantité croissante de disulfure, pourrait être due à la faible différence de quantité totale de groupements éthoxy à

hydrolyser par rapport à la quantité d'eau introduite. Par ailleurs, cette composante est similaire dans les particules non fluorescentes contenant 20% et 40% de disulfure.

Enfin, la composante APTES diminue lorsque le taux de disulfure augmente jusqu'à atteindre 20%, puis reste stable entre 20 et 40% de disulfure. Cette évolution ne correspond pas exactement à l'évolution de la quantité de FITC incorporée (cf chapitre 2) mais la différence est probablement due à l'APTES en excès (sans FITC) incorporé dans les particules.

5.1.1.2 Spectres de polarisation croisée $\{^1\text{H}\}$ - ^{29}Si

Les spectres $\{^1\text{H}\}$ - ^{29}Si CP MAS permettent d'obtenir des informations complémentaires sur le degré de condensation des différents atomes de silicium présents dans les particules. En spectroscopie RMN ^{29}Si , il existe une nomenclature usuelle pour désigner les différents atomes de silicium selon leurs fonctionnalités. On utilise la terminologie Q_n et T_n pour les silanes non ou monofonctionnels, où n représente le nombre d'atomes d'oxygène pontants liés à l'atome central de silicium (figure 5.2).

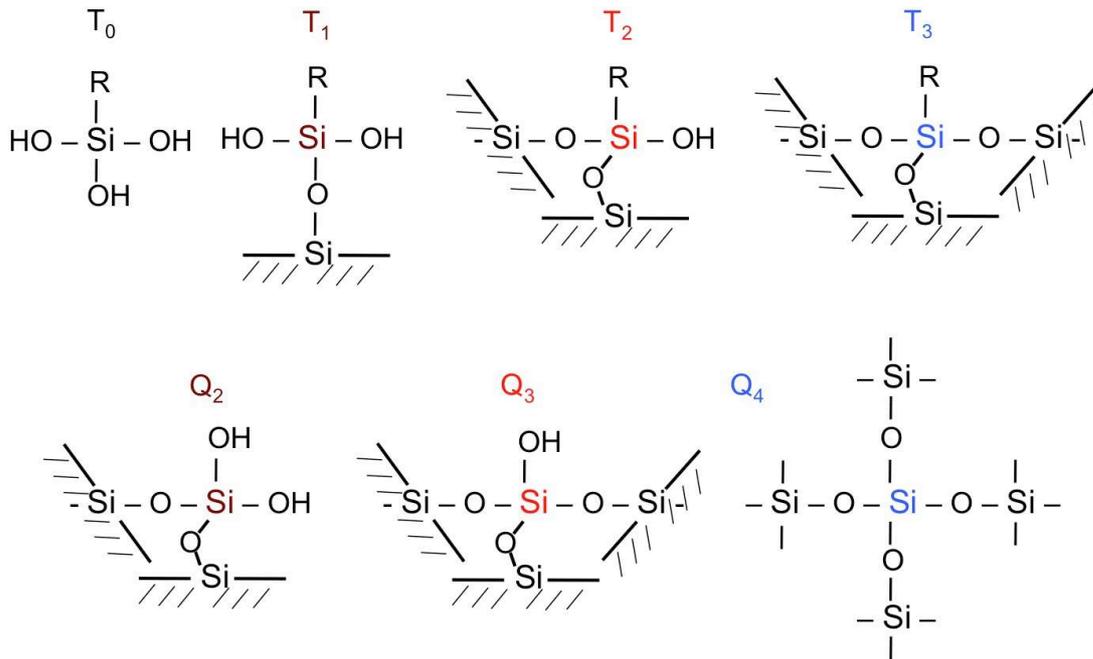


Figure 5-2: Terminologie des différents types d'atomes de silicium

De façon générale, on observe que plus la quantité de disulfure introduite augmente, plus l'intensité des pics des composantes T augmente, avec en parallèle une diminution de l'intensité du signal Q_3 en CP (figure 5.1 c, pic à -101 ppm). L'augmentation de l'intensité des composantes T est liée à la présence d'un plus grand nombre de silanes dans le système. De

plus, la présence d'APTES-FITC modifie peu les spectres RMN ^{29}Si des particules avec 20% et 40% de disulfure. On note tout de même une augmentation de l'intensité des composantes T et une diminution de l'intensité de la composante Q₃ pour les particules 40%SS fluorescentes comparées aux particules non fluorescentes. Cette tendance semble être due à un environnement différent en présence d'APTES, avec notamment un éloignement des protons des atomes de silicium sondés qui impliquerait un transfert d'aimantation des protons vers les atomes de silicium moins important. Pour expliquer ce phénomène, on peut suggérer que la présence de l'APTES à proximité des atomes de silicium Q₃ induirait une liaison hydrogène entre le proton du silanol restant et le groupement amine de l'APTES.

Par ailleurs, on constate, au-delà de 20% de disulfure, l'apparition sur le massif T de deux pics fins à -46 ppm et -53 ppm. Le fait que ces pics soient fins et soient peu apparents en CP (leur intensité augmente lorsque l'on augmente le temps de contact en CP, et augmente en HPDec comparativement à la CP) suggère qu'ils sont dus à des espèces particulièrement mobiles. On peut donc faire l'hypothèse que ces pics résultent d'espèces de surface, mal hydrolysées et appartenant peut-être à un silane "pendant", *i.e.* greffé par un de ses atomes de silicium tandis que l'autre n'a pas réagi et présente donc un groupement T₀. Pour confirmer l'attribution de ces pics à des espèces mobiles, une expérience INEPT $\{^1\text{H}\}$ - ^{29}Si a été réalisée.

5.1.1.3 INEPT $\{^1\text{H}\}$ - ^{29}Si

L'utilisation d'une séquence INEPT permet d'obtenir la réponse des espèces mobiles, difficiles à observer en CP du fait d'un transfert d'aimantation faible. Les particules étudiées possèdent à la fois des groupements rigides et d'autres plus mobiles. Ce sont ces derniers que l'on essaye d'observer grâce à cette séquence. Cependant, nous avons rencontré quelques problèmes de mise en œuvre à cause de la rigidité partielle des groupements (comportement mixte, dénotant certes une certaine mobilité des espèces, mais encore insuffisante pour obtenir une expérience INEPT dans des conditions standard, à cause d'un temps de relaxation T₂ trop court). Seules les particules 30%SS ont été étudiées par cette méthode et seules les particules non fluorescentes ont permis d'obtenir une acquisition avec la séquence INEPT, à condition toutefois de monter la température à 80°C durant l'acquisition, pour augmenter la mobilité de ces groupements. Les particules 30%SS fluorescentes ont présenté une rigidité trop importante pour donner lieu à un signal INEPT dans les mêmes conditions.

Ces expériences permettent d'obtenir la signature spectrale des espèces mobiles, qui correspondent effectivement aux pics observés en CP à -46 et -53 ppm (figure 5.1 d). On peut supposer que le pic à -46 ppm correspond aux T₀ d'un disulfure pendant. Pour déterminer plus

en détail la structure des particules et notamment la répartition du disulfure, des expériences de corrélations à 2 dimensions (2D) ont été réalisées.

5.1.2 REPARTITION DES SILANES DANS LES PARTICULES : EXPERIENCES DE CORRELATION HETERONUCLEAIRE

Des expériences 2D de corrélation hétéronucléaire (^1H - ^{29}Si et ^1H - ^{13}C) ont été acquises pour les échantillons 30%SS (avec et sans fluorescéine) (figure 5.3 a-b).

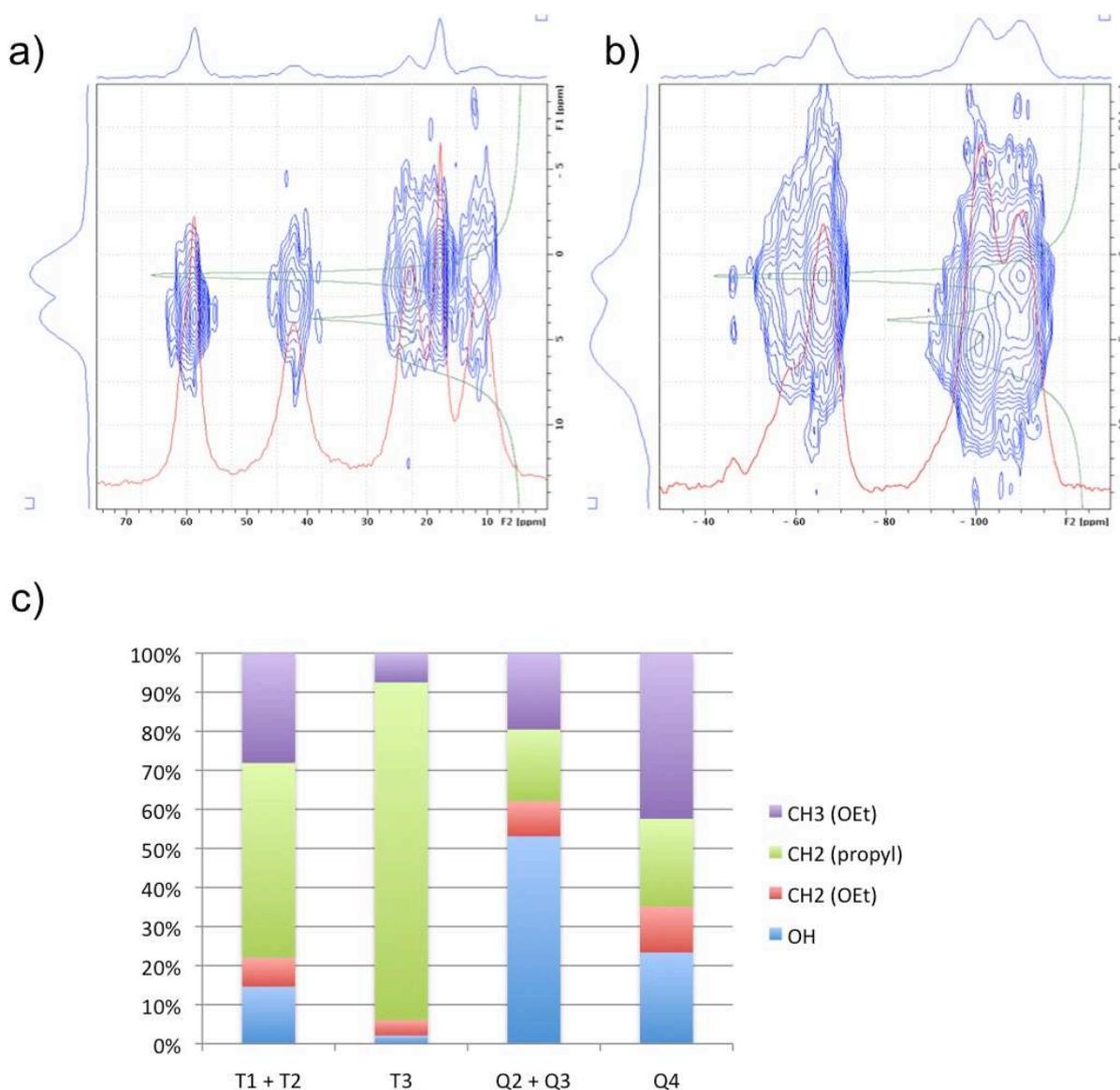


Figure 5-3: Spectres RMN HETCOR des particules 30%SS avec fluorescéine, a) ^1H - ^{13}C , b) ^1H - ^{29}Si , c) analyse croisée des deux spectres 2D pour déterminer quels atomes de carbone sont à proximité des différents types de sites silicium

Chaque spectre 2D montre la corrélation des protons soit avec les atomes de carbone soit avec les atomes de silicium. En croisant les données obtenues par ces deux expériences, il est alors possible d'établir quels types d'atomes de carbone sont proches de quels types d'atomes de silicium (figure 5.3 c). L'analyse des deux spectres 2D donne les informations de proximité spatiale résumées sur le graphique de la figure 5.3 c. On constate que les atomes de silicium des silanes (T_1 et T_2) sont proches de groupements éthyloxy, ce qui traduit leur hydrolyse incomplète.

Une des informations importantes que l'on peut noter est qu'il existe des groupements éthyloxy à proximité d'atomes de silicium Q_4 . Pour obtenir cela, il faut tout d'abord qu'il y ait, dans le cœur des particules, des silanes non entièrement hydrolysés dans le cœur des particules. De plus, ces mêmes atomes Q_4 sont proches des atomes de carbone du groupement propyl du disulfure ou de l'APTES. Les mêmes expériences menées sur les particules non fluorescentes, où le seul silane est le disulfure, donne des résultats similaires sur la proximité spatiale des différents groupements par rapport aux atomes de silicium Q_4 . On peut donc supposer que ces atomes de silicium de cœur sont à proximité de disulfures non entièrement hydrolysés ni condensés. Compte tenu de l'aspect des particules en MET, on peut faire l'hypothèse qu'il existe au sein des particules des "poches" formées de disulfure ayant une extrémité de la chaîne pendante (figure 5.4), le diamètre de ces poches électroniquement moins denses étant compatible avec la longueur de la molécule de disulfure.

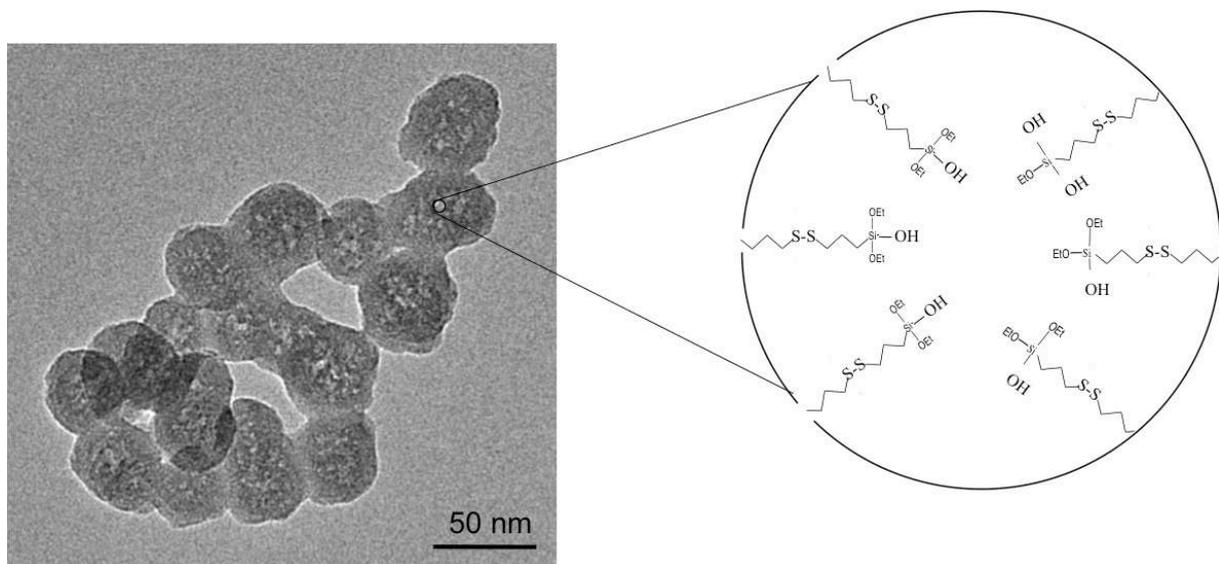


Figure 5-4: Schéma de structure des particules 30%SS

5.1.3 BILAN SUR LA STRUCTURE DES PARTICULES

Les études de RMN ont permis de montrer que le disulfure est incorporé dans les particules sans être dégradé (intégrité du pont S-S). Par ailleurs, la présence de fluorescéine et d'APTES ne semble pas modifier de façon majeure la structure des particules, les différences de comportement des particules fluorescentes seront donc dues principalement à la présence de pont disulfure et non à la présence de fluorescéine. De plus, il semble que le disulfure soit présent en surface mais aussi au sein de "poches" au cœur des particules, poches formées par des disulfures condensés par un seul de leurs atomes de silicium, restant pendant et étant non complètement hydrolysé. Les disulfures de surface seront accessibles aux protéines réductrices. Ceux du cœur ne le seront pas nécessairement, cependant ils contribueront à la différence de comportement des particules puisqu'ils en modifient la structure interne.

5.2 Comportement des nanoparticules en environnement cellulaire mimé

5.2.1 INFLUENCE D'UN PH ACIDE SUR LA DISSOLUTION

Lorsqu'on suit l'évolution de la quantité d'acide silicique libéré par dissolution des particules n%SS dans un tampon acétate à pH 4,5 à 37°C (figure 5.5), on constate que globalement, plus le taux de disulfure augmente plus la quantité d'acide silicique libérée diminue, sauf à partir de 30%. En effet, pour les particules avec 30% ou 40% de disulfure, la courbe de dissolution obtenue par dosage de l'acide silicique libéré est similaire. Ceci indique qu'au delà de 30% de taux initial de disulfure, l'augmentation du nombre de disulfures dans les particules ne modifie pas la libération d'acide silicique par dissolution.

On peut corréliser ce résultat avec la structure des particules où il semble y avoir des silanes à la fois en surface et dans le cœur des particules. Comme précisé dans le chapitre 2, le dosage ne tient compte que de l'acide silicique libéré. Or plus le taux de disulfure augmente plus on a de chances de libérer l'organosilane soufré lors de la dissolution, et ce dernier est invisible au dosage mais participe à l'équilibre de solubilité. Il semble donc que l'introduction de disulfure modifie peu la dissolution des particules à pH 4,5.

On peut cependant constater que, comme attendu, la dissolution est ralentie à pH 4,5 par rapport à pH 7. En effet, après 72 heures à pH 4,5, la dissolution des particules 0%SS n'a pas encore atteint son équilibre tandis qu'elle l'atteint après 24 heures à pH 7(chapitre 2). De même, pour les particules incorporant des ponts disulfures, après 7 jours, le système n'a toujours pas atteint l'équilibre de dissolution à pH 4,5 alors que c'est le cas à pH 7.

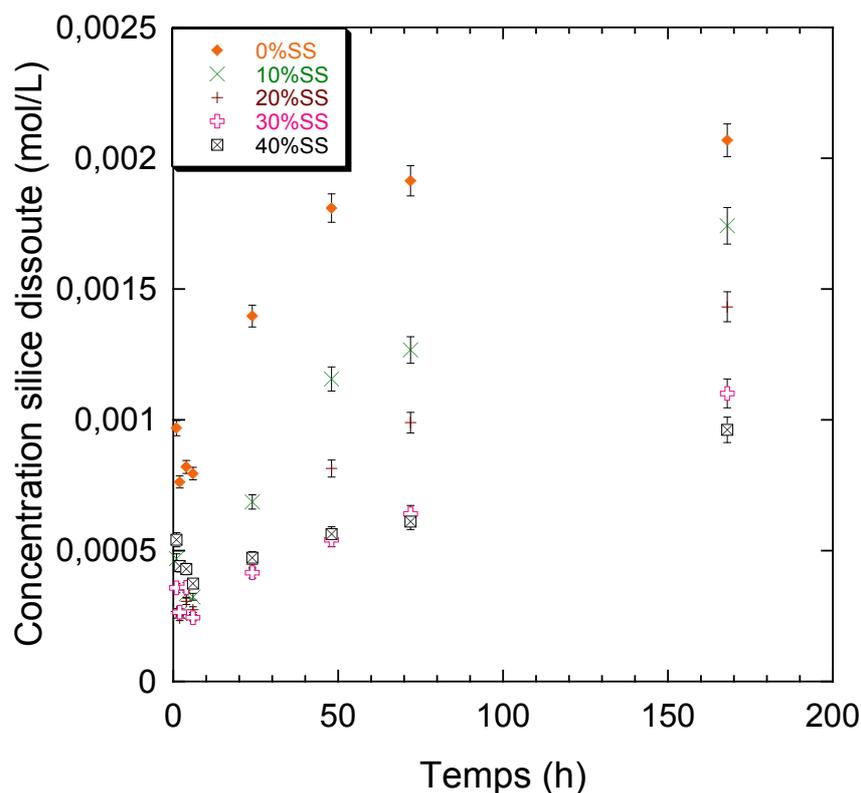


Figure 5-5: Suivi par dosage de la dissolution des particules n%SS (0,6 mg/mL) dans un tampon à pH 4,5 à 37°C

L'acidité des compartiments d'endocytose aura donc comme seul effet un ralentissement de la dissolution, et ce malgré l'introduction de disulfure au sein des particules.

5.2.2 INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT REDUCTEUR

Avant de valider notre hypothèse de travail, à savoir que l'introduction de ponts disulfures au sein des particules permettrait de favoriser leur dégradation intracellulaire, il faut s'assurer que ces ponts disulfures, une fois intégrés à la matrice de silice, peuvent toujours être réduits en thiol. Afin de s'en assurer, nous avons suivi la réduction des ponts disulfures *in vitro* par

du DTT (réaction décrite sur la figure 5.6), à 37°C et pH 7, sous atmosphère N₂ (pour éviter l'oxydation du DTT par le dioxygène de l'air).

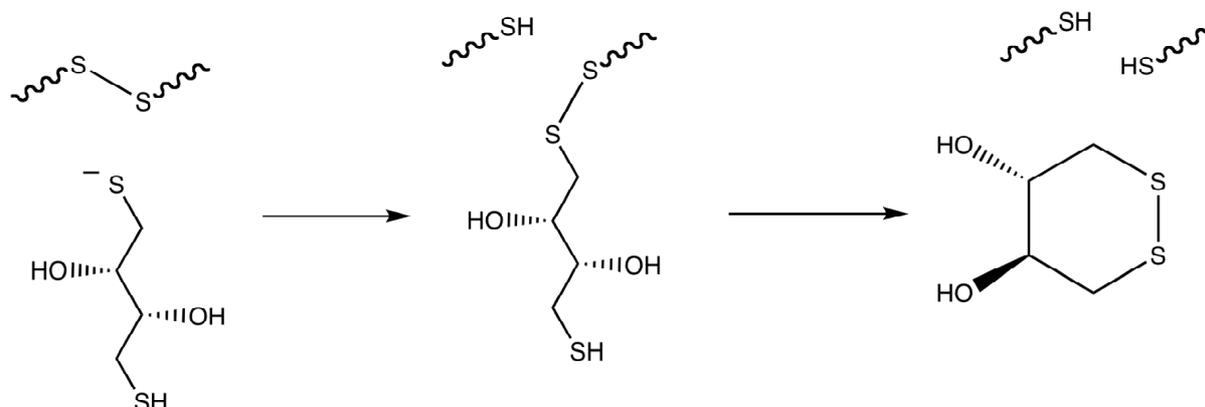


Figure 5-6: Schéma de la réaction du DTT avec un disulfure

La figure 5.7 présente l'évolution de l'absorbance du DTT oxydé, reflet de la réduction des ponts disulfures présents dans les particules. Les particules 0%SS donnent un signal nul, ce qui confirme que le DTT ne peut réagir qu'avec les disulfures et que le dioxygène a été effectivement enlevé du système.

Un des premiers résultats obtenus en analysant ces courbes est que la réduction des disulfures contenus dans les particules est un phénomène lent. En effet, contrairement à la dissolution qui atteint un palier après une semaine, pour les particules 10%SS et 20%SS il faut trois semaines pour atteindre l'équilibre et après deux mois d'étude, il reste encore des disulfures à réduire dans les particules 30%SS et 40%SS.

Lorsqu'on analyse les courbes d'oxydation du DTT, on constate que le taux de disulfure (entre 10 et 40%) n'a pas d'influence sur la quantité de DTT qui réagit au cours des 7 premiers jours. Durant les deux semaines suivantes, on observe une différence de comportements pour les particules avec 10% et 20% de disulfure et celles avec plus de 20%. Les particules avec plus de 20% de disulfure ont toutes un comportement similaire vis-à-vis de l'oxydation du DTT tandis que ce phénomène est un peu plus faible pour les particules 10%SS et 20%SS. A partir de trois semaines de suivi, on observe un plateau pour la réduction des disulfures des particules 10%SS et 20%SS tandis que pour les particules avec plus de 30% de disulfure, la réduction continue mais semble ralentir un peu.

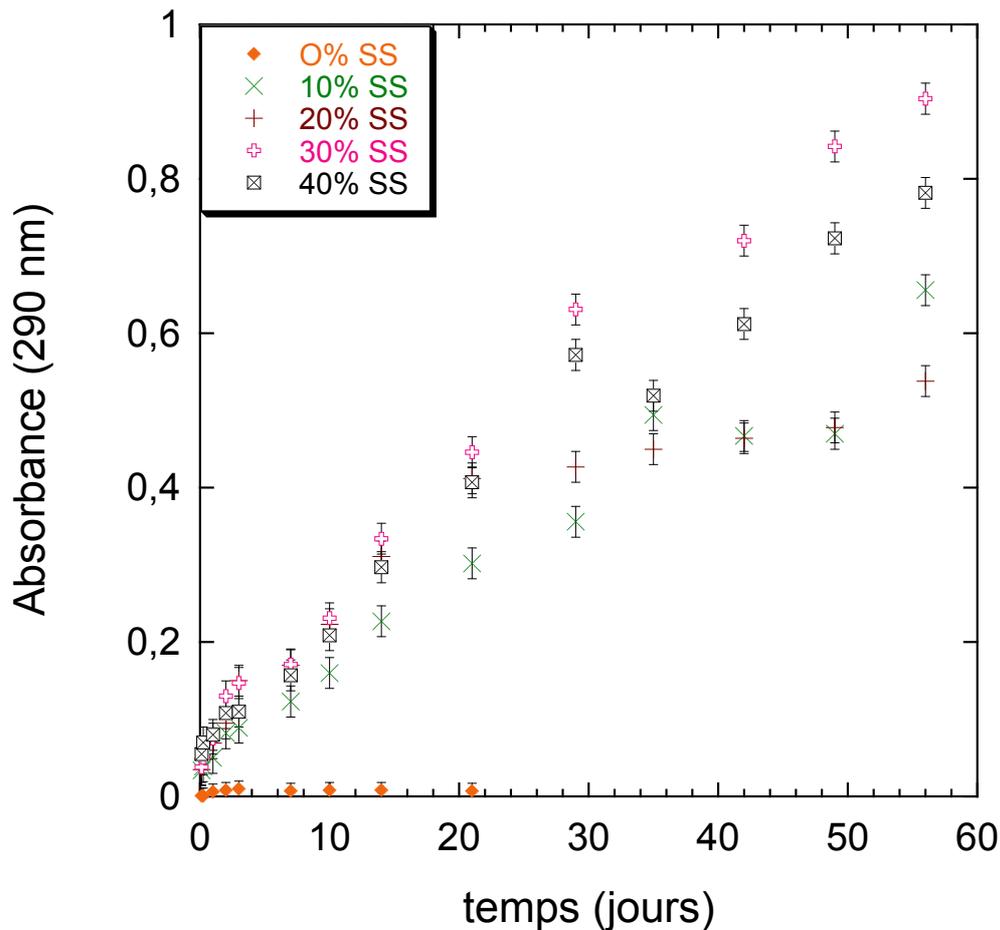


Figure 5-7: Réduction des ponts disulfures des particules n%SS en présence de DTT dans un tampon à pH 7,4 à 37°C

Il est intéressant de noter que lorsque l'expérience est menée à température ambiante (20°C) on n'observe pas de d'oxydation du DTT pendant plus d'un mois. Il semble donc que la réduction des disulfures présents dans les particules par le DTT dépende de l'agitation thermique, résultat probable de la nécessité de fournir une certaine énergie au système pour le faire réagir. Cette énergie thermique peut être nécessaire pour franchir la barrière énergétique de la réaction ou pour accélérer la vitesse de dissolution. Cependant, 37°C est la température de travail en présence de cellules, donc l'extrême lenteur de la réaction à 20°C n'est pas un problème.

La cinétique lente de l'oxydation du DTT dans les particules contenant les ponts disulfures peut être due à la difficulté d'accès du DTT au disulfure. Ceci expliquerait aussi pourquoi il faut une certaine énergie thermique pour observer la réaction. L'absence de différence dans l'oxydation du DTT par les différentes particules n%SS lors de la première semaine peut résulter de la réaction du DTT avec des disulfures d'accessibilité similaire, probablement situés en surface des particules.

5.2.3 BILAN

Cette étude a permis de montrer que l'introduction de ponts disulfures n'a pas d'incidence sur la dissolution à pH acide. Cette dernière est cependant, comme attendu, ralentie par rapport à pH 7. Le pH rencontré dans les endosomes puis les lysosomes aura donc comme seul effet de ralentir la dissolution des particules.

Par contre, la présence de ponts disulfures rend les particules sensibles à un environnement réducteur. En effet, bien que ce soit un phénomène très étalé dans le temps, on observe l'oxydation de DTT en présence des particules n%SS, ce qui traduit la réduction des ponts disulfures, seules espèces dans le milieu capables d'oxyder le DTT. La différence de taux de disulfure ne modifie pas la réaction sur la première semaine d'étude, par contre au-delà, on observe une différence de comportement entre les particules possédant plus ou moins de 20% de disulfures.

5.3 Internalisation des nanoparticules et toxicité

5.3.1 INTERNALISATION ET LOCALISATION INTRACELLULAIRE

Lorsqu'on suit l'internalisation des particules n%SS dans les cellules exposées à une suspension à 0,6 mg/mL dans du milieu de culture, on constate que l'introduction de ponts disulfures modifie le processus. En effet, lorsqu'on regarde les cellules 24 heures après l'ajout des particules, on observe des particules 0%SS internalisées (figure 5.8 a). Lorsqu'on introduit des ponts disulfures, pour un taux de 10% il semble y avoir quelques poches d'internalisation des particules (figure 5.8 b). Lorsque le taux de disulfure augmente, on n'observe plus de particules internalisées. Pour des taux de 20% et 30% on observe des particules en interactions avec la membrane (figure 5.8 c-d), ce qui n'est plus le cas pour les particules 40%SS (figure 5.8 e). Après une semaine d'exposition, les particules sans ponts disulfures sont présentes dans de nombreuses vésicules acides (signal bleu cyan dû à la colocalisation de la FITC et du Lysosensor, figure 5.8 f). Les particules incorporant des ponts disulfures, quant à elles, sont visualisées dans des vésicules acides mais en nombre plus restreint que les particules 0%SS (figure 5.8 g-j).

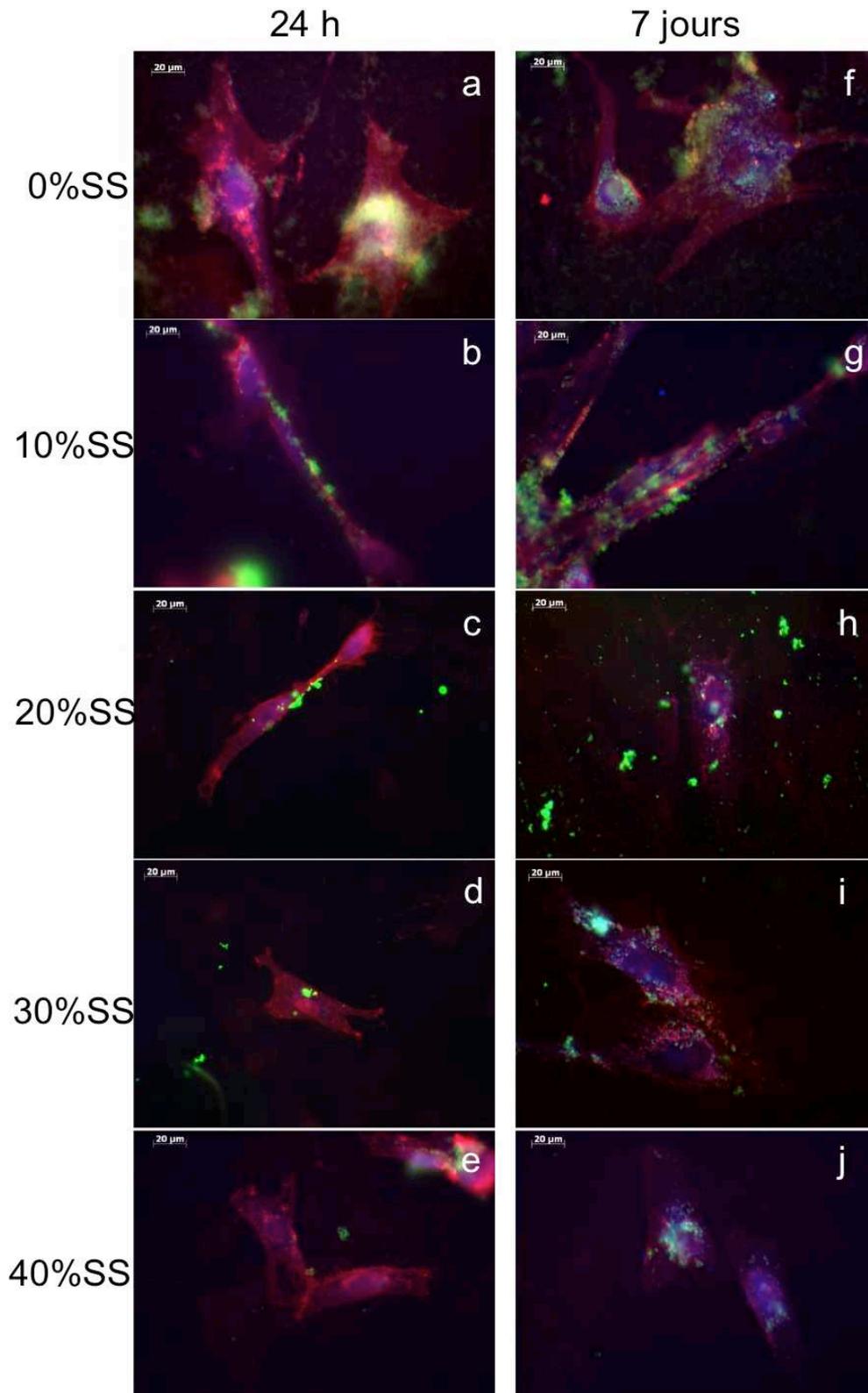


Figure 5-8: Suivi de l'internalisation des particules n%SS dans des NHDF après 24 heures (a-e) et 7 jours (f-j) d'exposition à une suspension de particules à 0,6mg/mL dans du milieu de culture

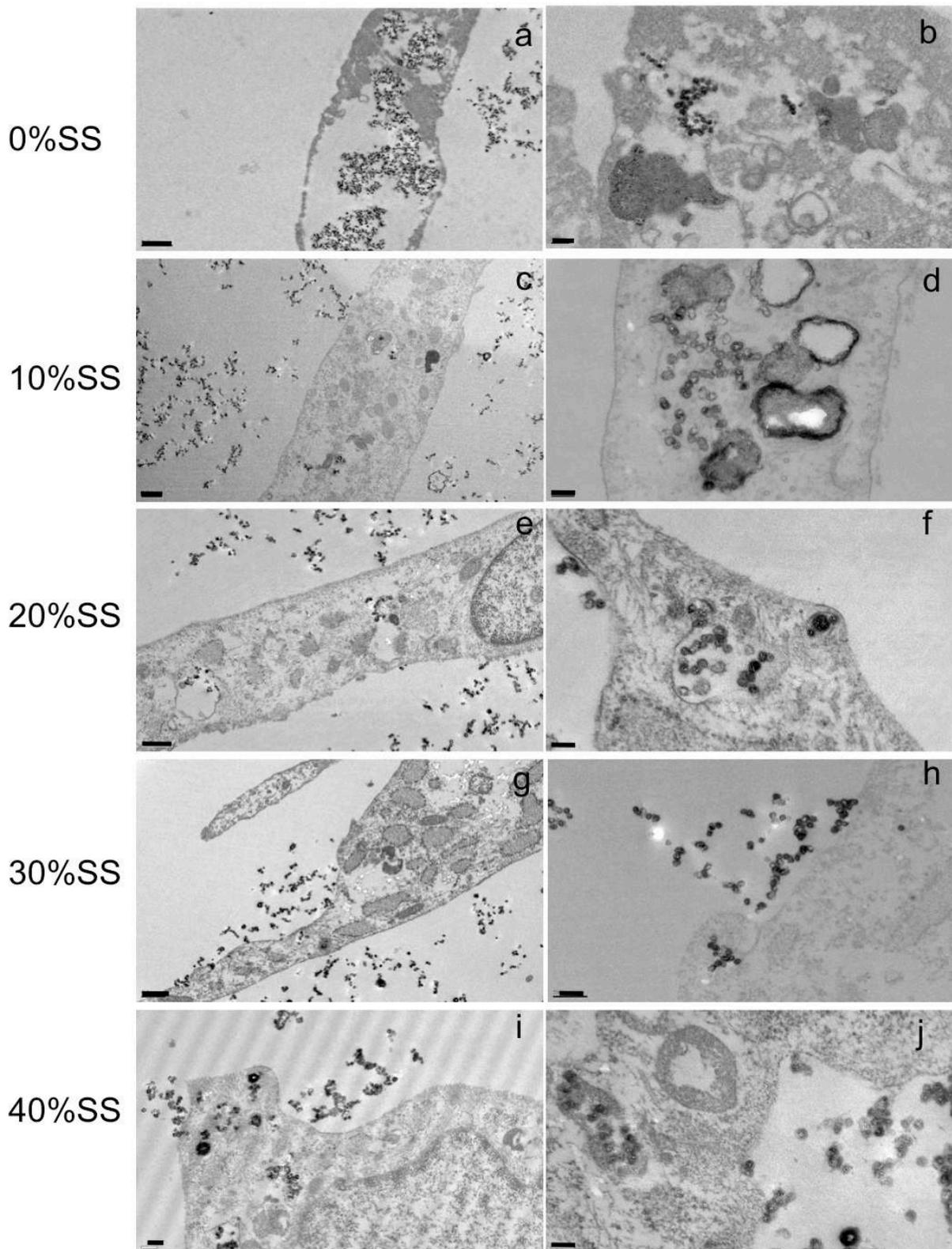


Figure 5-9: images MET des cellules après 7 jours d'exposition aux suspensions de nanoparticules n%SS (0,6 mg/mL dans du milieu de culture) (barre a-c-e-g-i 500 nm, b-d-f-h-j 100 nm)

Pour visualiser plus précisément les particules internalisées, les cellules ont été fixées après 7 jours d'exposition aux particules n%SS. La première constatation que l'on peut faire est que

les particules sont internalisées dans des vésicules, quel que soit le taux de disulfure (figure 5.9). En outre, le nombre de particules par vésicule est variable et ne semble pas dépendre du taux de disulfure. Enfin, si on compare ces photos avec l'internalisation des particules Si+60, de diamètre comparable, on constate que les particules n%SS sont moins agglomérées et moins nombreuses dans les vésicules (figure 5.9 a-b). Lorsqu'on observe les particules internalisées, il est intéressant de noter qu'elles présentent un aspect cœur-coquille, comme si le cœur des particules s'était dissous, laissant place à une capsule de silice (figure 5.9 b-d-f-h). Pour suivre l'évolution de ces particules internalisées, la culture des cellules a été poursuivie sans particules pendant une semaine après les 7 jours d'exposition. Les clichés de MET montrent qu'il y a relativement peu de particules dans les cellules, contrairement au cas des particules Si+60, et celles-ci sont regroupées dans des vésicules (figure 5.10). Les particules 10%SS et 20%SS internalisées apparaissent comme poreuses (figure 5.10 b et d) tandis que les particules 30%SS et 40% apparaissent comme granuleuses (figure 5.10 f et h), mais leur diamètre est peu modifié par rapport à leur diamètre initial.

L'introduction de ponts disulfures dans les particules modifie donc leur interaction avec les cellules. En effet, en présence de ponts disulfures, la cinétique d'internalisation est ralentie. Les particules n%SS s'agrègent rapidement dans le milieu de culture (cf chapitre 2), ce qui peut expliquer l'internalisation plus lente. Par ailleurs, le nombre de particules internalisées semble réduit lorsque ces dernières possèdent des ponts disulfures. Enfin, le devenir des particules au sein des cellules est modifié. Tandis que les particules sans disulfure subissent une dissolution intracellulaire qui diminue leur diamètre, les particules n%SS semblent subir une dissolution intracellulaire différente, induisant la formation de capsules de silice par dissolution du cœur des particules. Ce point sera abordé plus en détail dans le paragraphe 5.3.3.

Ces résultats montrent que l'introduction de ponts disulfures, en modifiant la structure des particules et leur surface, permet de modifier leur internalisation par les cellules. En présence de disulfure, le phénomène est plus lent et semble plus limité. Par ailleurs, l'introduction de ponts disulfures a un autre effet puisqu'elle modifie le comportement intracellulaire des particules.

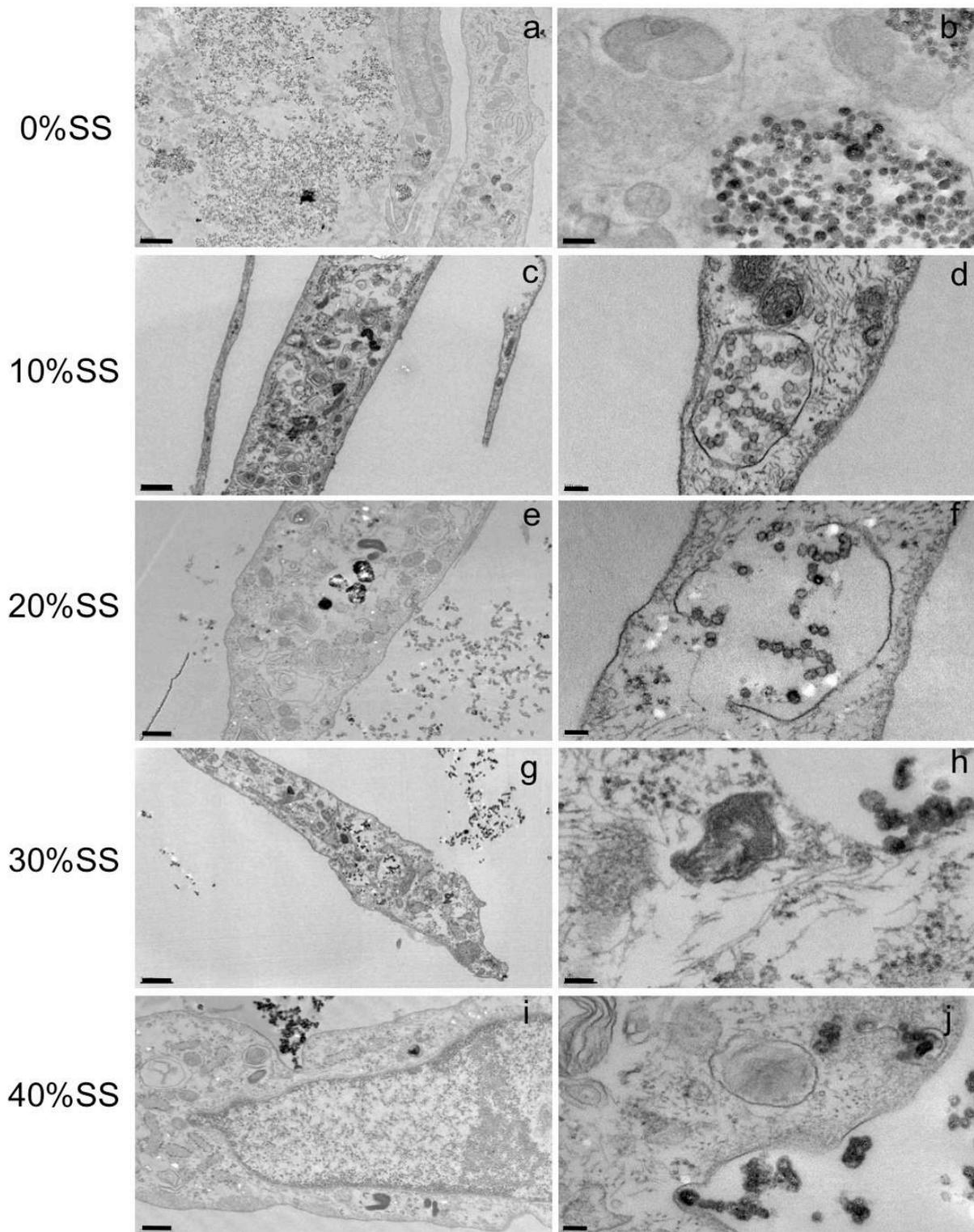


Figure 5-10: Images MET des cellules après 7 jours d'exposition aux particules n%SS (0,6 mg/mL dans du milieu de culture) suivis de 7 jours de culture sans particules (barre a-c-e-g-i 1 μ m, b-d-f-h-j 100 nm)

5.3.2 TOXICITE DES PARTICULES n%SS

Le suivi par microscopie montre que les particules de silice n%SS sont présentes dans les fibroblastes. Il est donc nécessaire de s'assurer que cette internalisation ne perturbe pas leur viabilité. L'évolution de l'activité métabolique, suivie par le test à la résazurine, montre l'absence d'effet néfaste sur les cellules des particules jusqu'à 7 jours d'exposition (figure 5.11). On observe cependant une augmentation de l'activité métabolique des cellules exposées aux particules 10%SS et 20%SS après 24 heures et 72 h, effet qui se résorbe après 7 jours. On peut suggérer, à la lumière de l'étude sur les particules sans disulfure, que durant les 3 premiers jours les cellules répondent à une situation de stress induite par la présence des particules, avant de s'adapter à la situation.

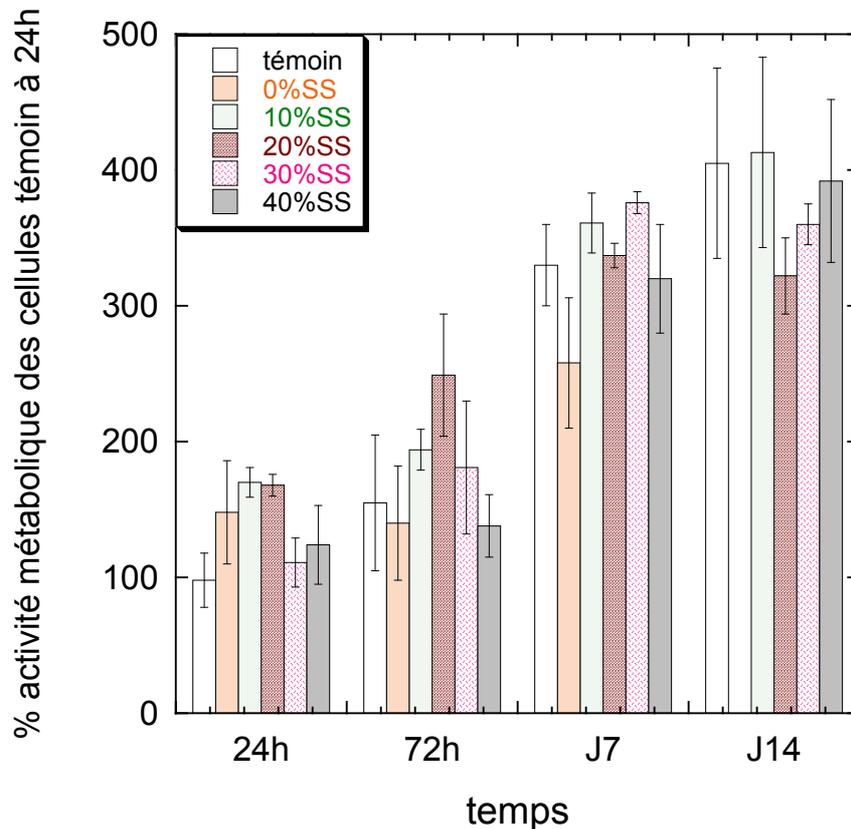


Figure 5-11: Evolution de l'activité métabolique des cellules exposées aux nanoparticules n%SS (0,6 mg/mL dans du milieu de culture)

Il semble donc que, comme en l'absence de ponts disulfures, les particules n%SS, d'environ 40 nm de diamètre, ne sont pas toxiques pour les fibroblastes dermiques humains, et ce jusqu'à 7 jours d'exposition continue à une suspension à 0,6 mg/mL de particules. Ce résultat est encourageant pour l'utilisation de ces particules dans des applications médicales.

5.3.3 EXOCYTOSE ET DISSOLUTION INTRACELLULAIRE

L'étude précédente a montré que les particules peuvent rentrer dans les cellules. Leur présence dans des vésicules intracellulaires suggère que l'internalisation se fait par un mécanisme d'endocytose. Ce phénomène a été mis en évidence pour les particules sans pont disulfure dans le chapitre 3 en utilisant des inhibiteurs des voies principales d'internalisation (clathrine et caveolae). La même étude a été menée avec les particules n%SS mais ne conduit pas à des résultats probants du fait du nombre limité de particules internalisées observables en microscopie à fluorescence après 24 heures d'exposition.

Une fois l'internalisation mise en évidence, la question qui se pose ensuite est : que deviennent les particules internalisées ? Pour répondre à cette question, nous avons exposé les cellules pendant une semaine aux différentes particules n%SS. Puis, après rinçage, nous avons mesuré, par fluorescence, l'évolution de la quantité de particules et de formes solubles excrétées par les cellules. La figure 5.12 représente ces courbes d'évolution, exprimée en pourcentage de l'intensité initiale, pour l'ensemble des particules n%SS étudiées. La première constatation est que l'on observe une libération progressive des particules et des formes solubles. Cependant, plus le taux de disulfure augmente plus la quantité de nanoparticules et de formes solubles excrétées diminue, pour atteindre respectivement 2 et 4% dans le cas des particules 40%SS.

En fonction du taux de disulfure, on observe deux types de comportement. Soit les cellules excrètent majoritairement des particules, c'est le cas pour les particules 0%SS et dans une moindre mesure pour les particules 10%SS pour lesquelles au-delà de 72 heures les deux contributions sont similaires, soit les cellules excrètent plus de formes solubles que de particules, c'est le cas pour les particules 30%SS et 40%SS. Ceci est en accord avec l'étude de la réduction des ponts disulfures par le DTT. En effet, si les ponts disulfures sont réduits de façon intracellulaire, les particules peuvent être fragilisées impliquant la production de plus de formes solubles qui seront potentiellement excrétées.

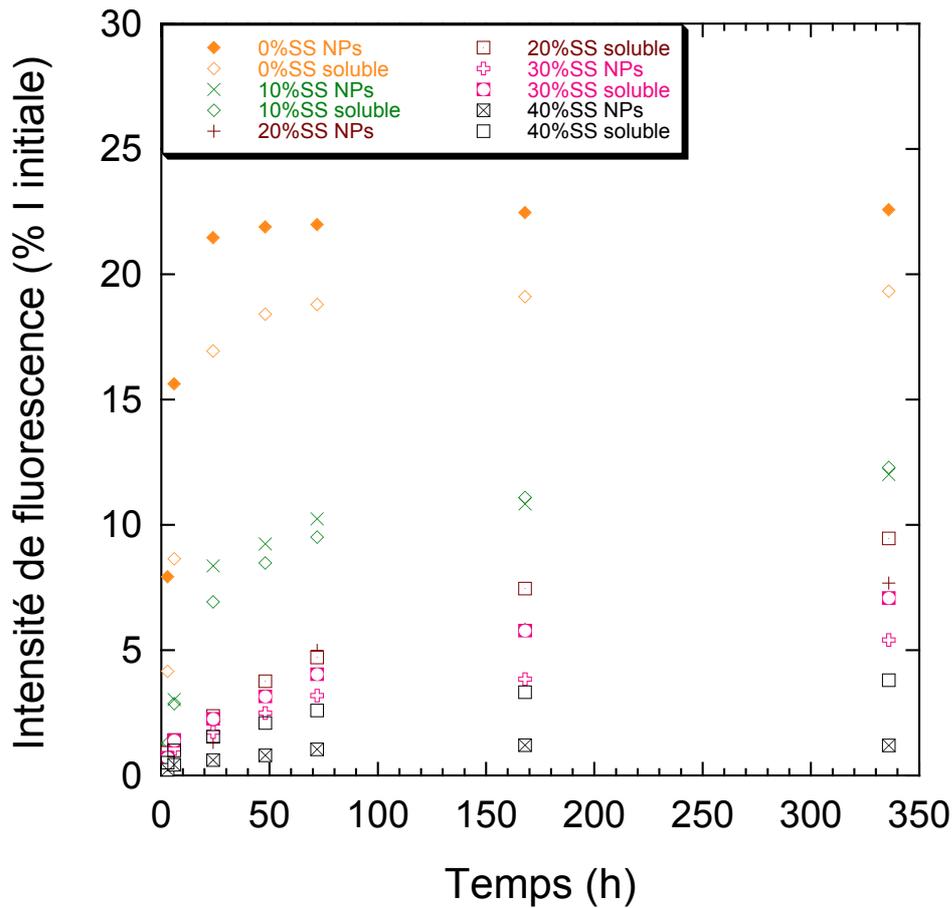


Figure 5-12: Exocytose des particules n%SS et de leur produit de dissolution après 7 jours d'exposition (0,6 mg/mL dans du milieu de culture)

Il est intéressant de noter que l'ajout de ponts disulfures dans les particules de silice semble permettre de moduler l'exocytose et/ou la dissolution intracellulaire des particules. A ce stade de l'étude il est difficile d'en dire plus, l'augmentation du taux de disulfure peut simplement ralentir les phénomènes de dissolution ou d'exocytose, comme elle peut modifier plus fortement le comportement des particules dans les cellules. Quelques éléments supplémentaires sont apportés par la microscopie électronique en transmission.

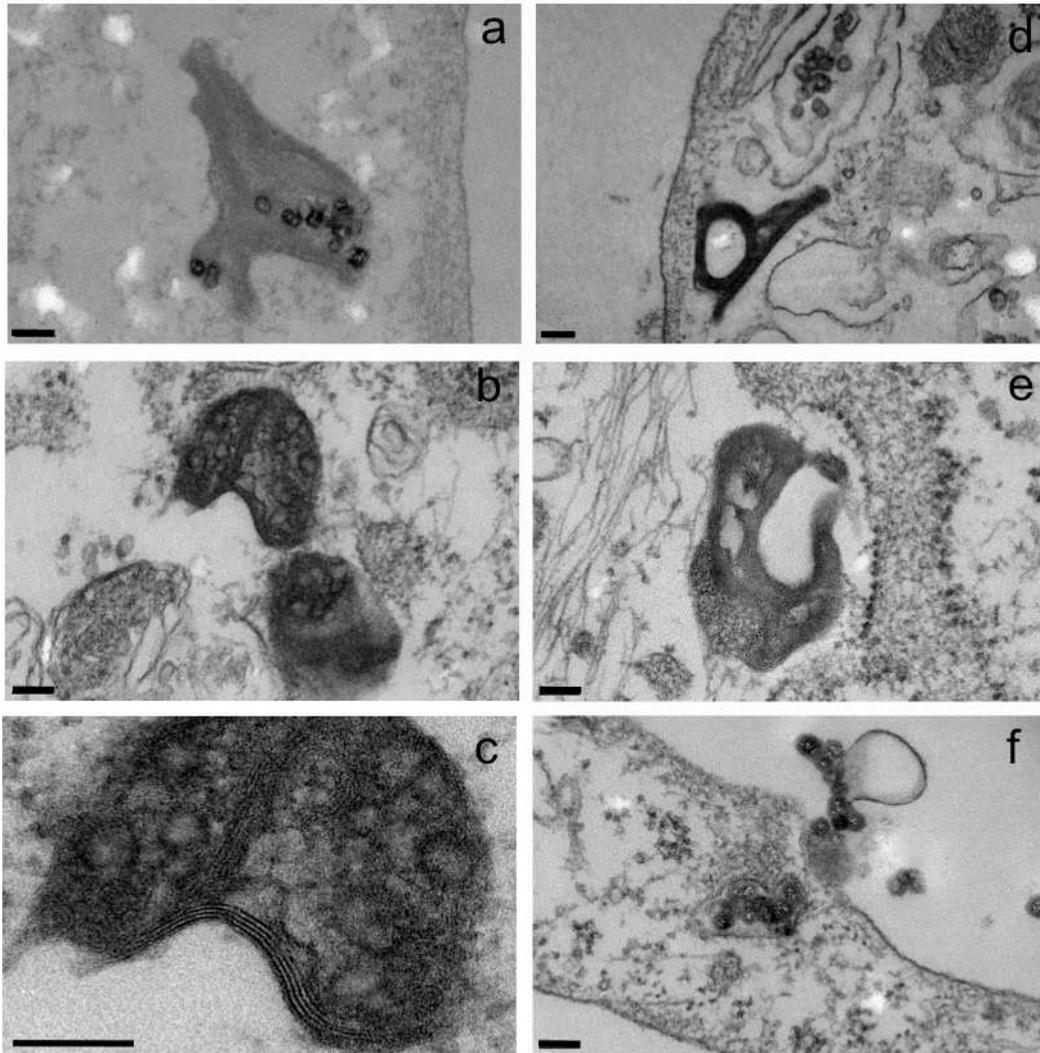


Figure 5-13: Mise en évidence en MET de la dégradation intracellulaire après 14 jours des particules 10%SS (a-c), 20%SS (d), 30%SS (e) et exocytose des particules 30%SS après 14 jours (f) (barre 100 nm)

Lors de l'étude en MET, nous avons constaté la présence de structures organisées liées à la présence des particules contenant des ponts disulfures. Ce sont des structures lamellaires, observées pour les particules 10%SS, 20%SS et 30%SS mais pas pour les particules 0%SS ni pour les particules 40%SS. Ces structures présentent toutes une périodicité d'environ 4-5 nm lorsqu'elles sont bien définies (figure 5.13 b-e) et une structure légèrement plus espacée (7 nm de périodicité) lorsqu'elles sont en formation (figure 5.13 a), et ce quelles que soient les particules entre 10 et 30% de taux de disulfure. Ces structures font penser à des lysosomes et résultent probablement de la dégradation intracellulaire des particules, comme le suggèrent les clichés de la figure 5.13. Le cliché 5.13-a semble correspondre au début de la dissolution intracellulaire des particules, les clichés 5.13-b-c montrent une organisation multi-lamellaire mieux définie et enfin le cliché 5.13-d montre une structure multi-lamellaire où aucune

particule n'est plus visible. Ces structures résultent probablement de la silicification des lysosomes suite à la dissolution des particules. Ceci n'a pas encore été prouvé, l'analyse par EDX de la présence de silicium des structures en MET étant perturbée par le signal de l'osmium. L'analyse des mêmes échantillons préparés pour le MET en absence d'osmium est prévue.

Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'en fonction du taux de disulfure présent dans les particules, ces structures sont observées plus ou moins tôt et en quantité plus ou moins importante. En effet, pour les particules 10%SS, on observe la formation de ces structures sur les clichés à 7 jours d'exposition. Pour les particules 20%SS, cette formation a lieu entre 7 et 14 jours puisqu'à 7 jours on n'observe que des particules dans des vésicules tandis qu'à 14 jours on observe ces structures bien définies et sans particules au centre. Dans le cas des particules 30%SS, des structures en formation sont visibles à 14 jours. Enfin, lorsque le taux de disulfure est de 40%, on n'observe pas de telles structures, ni formées ni en formation, même à 14 jours de culture. Il semble donc que la présence de disulfure au sein des particules modifie leur dissolution intracellulaire, notamment la cinétique du phénomène. Etrangement, plus le taux de disulfure augmente moins les particules semblent subir de dissolution intracellulaire, en tout cas plus le phénomène semble retardé. Ce résultat est en accord avec les courbes d'exocytose/dissolution présentées figure 5.12.

Enfin, la figure 5.13 f montre, à 14 jours de culture, des particules SS30% qui se sont détachées de la cellule avec un fragment de membrane, ce qui résulte peut-être de l'exocytose de particules non dissoutes de façon intracellulaire.

5.3.4 BILAN SUR L'INTERACTION DES PARTICULES AVEC LES CELLULES

Cette étude a permis de montrer que l'introduction de ponts disulfures modifie le comportement des particules en présence de cellules. En effet, même si toutes les particules n%SS étudiées sont internalisées dans les cellules, la cinétique du processus semble d'autant plus lente que le taux de disulfure augmente. Par ailleurs, l'incorporation de ponts disulfures modifie apparemment la quantité de particules internalisées. Cet effet est, a priori, dû aux ponts disulfures eux-mêmes puisque la taille et la charge de surface des particules n%SS varient peu.

D'autre part, la présence des ponts disulfures modifie le comportement intracellulaire des particules. En effet, plus le taux de disulfures augmente plus la quantité de nanoparticules et de formes solubles libérées par exocytose diminue. Par ailleurs, les particules semblent subir

une dissolution intracellulaire dans des structures de type lysosomes, entraînant probablement la silicification de ces vésicules multi-lamellaires. Enfin, la dissolution intracellulaire des particules n%SS semble démarrer par le cœur des particules, entraînant la formation de capsules poreuses de silice. Ce dernier point peut être intéressant pour la libération d'une molécule encapsulée dans le cœur des particules.

5.4 Libération d'un marqueur fluorescent

Afin de tester la validité de l'utilisation de nanoparticules de silice pour libérer de façon intracellulaire par dissolution une molécule encapsulée, nous avons intégré un marqueur nucléaire fluorescent (Hoechst 33258) dans les particules de silice. Le choix de cette molécule n'a pas d'application directe, il s'agit simplement de montrer que des particules de silice, incapables de pénétrer le noyau, peuvent libérer de façon intracellulaire une molécule dont la cible est le noyau cellulaire.

5.4.1 CARACTERISATION DES PARTICULES INCORPORANT LE MARQUEUR HOECHST 33258

Avant d'étudier le comportement des particules incorporant le marqueur fluorescent Hoechst 33258, il est nécessaire de caractériser les particules.

L'étude en DLS montre que les particules incorporant le marqueur Hoechst, avec ou sans ponts disulfures, ont un diamètre de l'ordre de 200 nm. En ce qui concerne la charge de surface, le potentiel zêta mesuré dans l'eau est négatif pour les particules 0%SS, 20%SS et 40%SS avec Hoechst et vaut respectivement -13 mV, -29 mV et -35 mV. Enfin, lorsque ces particules sont mises en suspension dans le milieu de culture, leur potentiel zêta vaut -10 mV, et ce quel que soit le taux de disulfure. Il semble donc que, malgré une charge de surface plus négative quand le taux de disulfure augmente, la couronne de protéines qui se met en place dans le milieu de culture annule ces effets de charge.

L'observation des particules par fluorescence montre que l'intensité de fluorescence de Hoechst 33258 dans les particules incorporant des ponts disulfures est environ cinq fois plus élevée que dans les particules 0%SS. En effet, pour avoir une intensité de signal comparable en microscopie à fluorescence, il est nécessaire d'imposer un temps d'acquisition cinq fois plus élevé pour les particules 0%SS. Il est important de préciser ici que les particules ont été

dialysées pour retirer les molécules n'ayant pas réagi, la fluorescence mesurée est donc due au marqueur Hoechst incorporé dans les particules de silice. Cette différence d'intensité peut être due à un nombre plus important de molécules Hoechst incorporées dans les particules 20%SS et 40%SS que dans les 0%SS. Ceci pourrait être le résultat de l'incorporation de Hoechst dans les "poches" organiques formées par les molécules du silane BTSPD condensé par un seul de ses atomes de silicium.

Les trois types de particules, 0%SS, 20%SS et 40%SS avec Hoechst, présentent donc un diamètre et une charge de surface similaires dans le milieu de culture. Les différences de comportement que l'on pourra observer par la suite seront donc liées à la présence des ponts disulfures et à l'éventuelle modification des interactions de Hoechst 33258 avec la matrice de silice en fonction de la composition des particules.

5.4.2 LIBERATION DU MARQUEUR HOECHST 33258 DES PARTICULES DE SILICE

La figure 5.14 présente le suivi par fluorescence de la libération du marqueur Hoechst 33258 des particules de silice 0%SS. Dans cette étude, le signal bleu représente le marqueur Hoechst, le vert correspond toujours à la FITC (et donc initialement aux nanoparticules) et le signal rouge correspond à la membrane pour les clichés a et b et à un autre marqueur nucléaire (iodure de propidium) pour les autres clichés. Le double marquage du noyau (signal rose dû à la colocalisation de Hoechst et iodure de propidium) permet de s'assurer que le marqueur Hoechst libéré parvient bien à destination. On observe qu'après 6h d'incubation, il semble y avoir quelques particules dans la cellule mais le noyau n'apparaît pas comme marqué avec Hoechst (figure 5.14 a). C'est le cas à partir de 8 heures d'exposition (figure 5.14 b). Pour des temps supérieurs, on constate que le noyau reste marqué avec Hoechst mais le nombre de particules présentes dans les cellules diminue progressivement (figure 5.14 c-e).

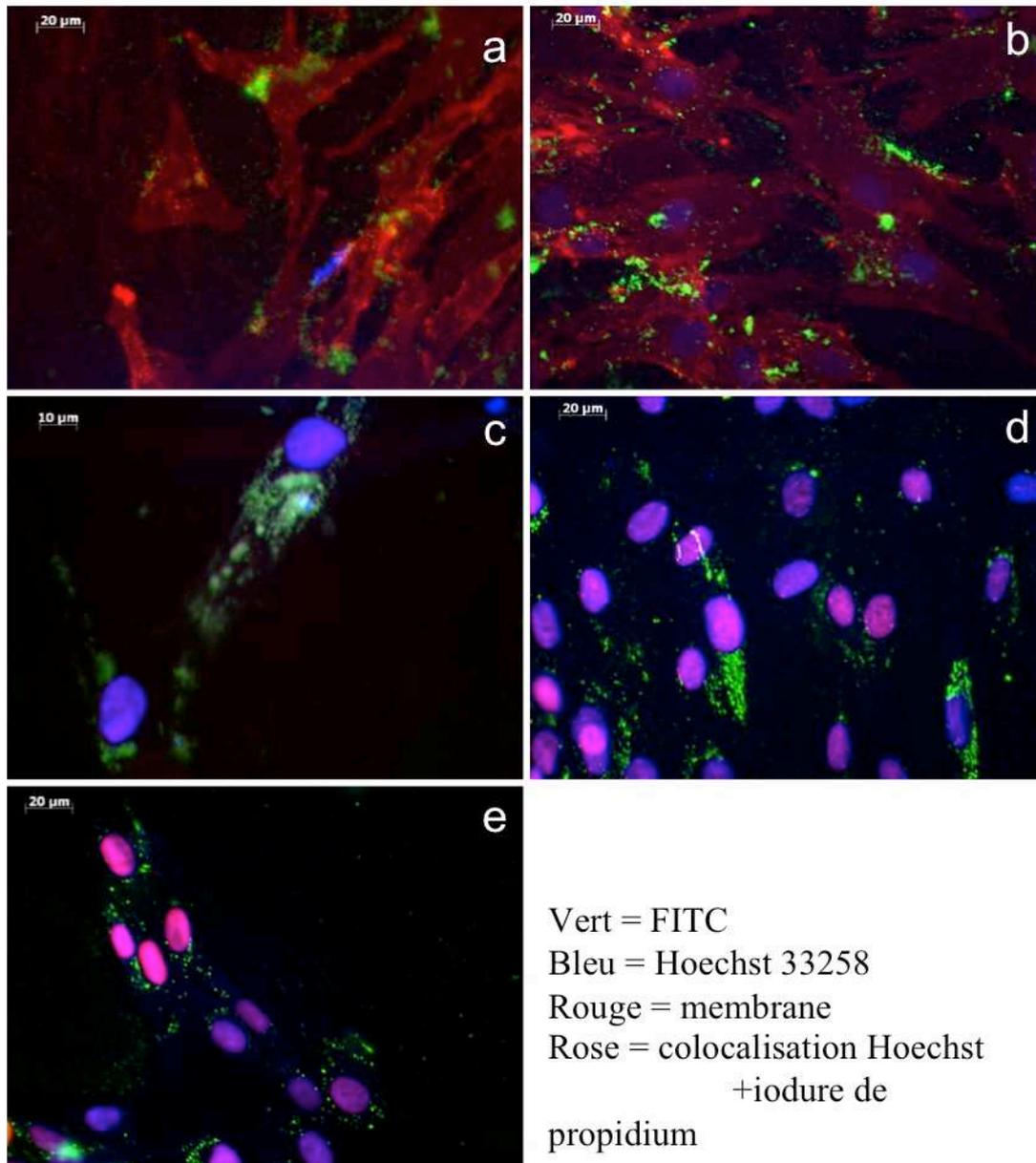


Figure 5-14: Libération intracellulaire du marqueur Hoechst 33258 encapsulé par interactions électrostatiques dans les particules 0%SS après (a) 6h, (b) 8h, (c) 24h, (d) 72 heures et (e) 7 jours d'incubation avec les nanoparticules (0,6 mg/mL dans du milieu de culture)

On observe donc une libération assez rapide du marqueur Hoechst, capable d'atteindre le noyau, après internalisation des particules. Par ailleurs, rapidement, le nombre de particules observables dans les cellules diminue.

5.4.3 INFLUENCE DES PONTS DISULFURES SUR LA LIBERATION

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence de l'ajout de disulfure dans les particules sur la libération du marqueur Hoechst. Puisque le comportement intracellulaire des particules n%SS dépend du taux de disulfure, on peut s'attendre à une influence sur la libération du marqueur fluorescent Hoechst. On constate tout d'abord que, contrairement aux particules sans disulfure, dès 6 heures d'exposition le noyau des cellules est marqué par Hoechst 33258 et les particules internalisées, pour des taux de disulfure de 20 et 40% (figure 5.15). Ensuite, on constate qu'entre 24 heures et 7 jours d'exposition, le nombre de particules présentes dans la cellule, mais toujours hors du noyau, augmente de façon continue, contrairement à ce qui est observé avec les particules 0%SS. En parallèle, le noyau reste marqué par Hoechst 33258. Il semble donc qu'en présence de disulfure, la libération initiale (intra ou extracellulaire) du marqueur fluorescent est plus rapide. En effet, après 6 heures d'exposition aux particules 20%SS+Hoechst et 40%SS+Hoechst le noyau apparaît déjà marqué par Hoechst 33258 tandis qu'au même temps d'exposition aux particules 0%SS contenant le marqueur Hoechst 33258, le noyau n'apparaît pas marqué. Par contre, contrairement aux particules 0%SS, lorsqu'elles possèdent des ponts disulfures les particules s'accumulent dans les cellules pendant les 7 premiers jours. Par ailleurs, il ne semble pas y avoir de grande différence entre les particules 20%SS et 40%SS incorporant le marqueur Hoechst 33258.

Pour interpréter correctement l'influence de la présence de ponts disulfures sur la libération d'une molécule encapsulée, il faudra pousser l'étude précédente plus loin. L'un des points intéressants à observer serait le devenir des particules sur des temps plus longs. Un autre serait le suivi plus précis de l'évolution de l'intensité de Hoechst dans le noyau au cours du temps, afin de déterminer précisément si la présence de ponts disulfures influence la libération du marqueur.

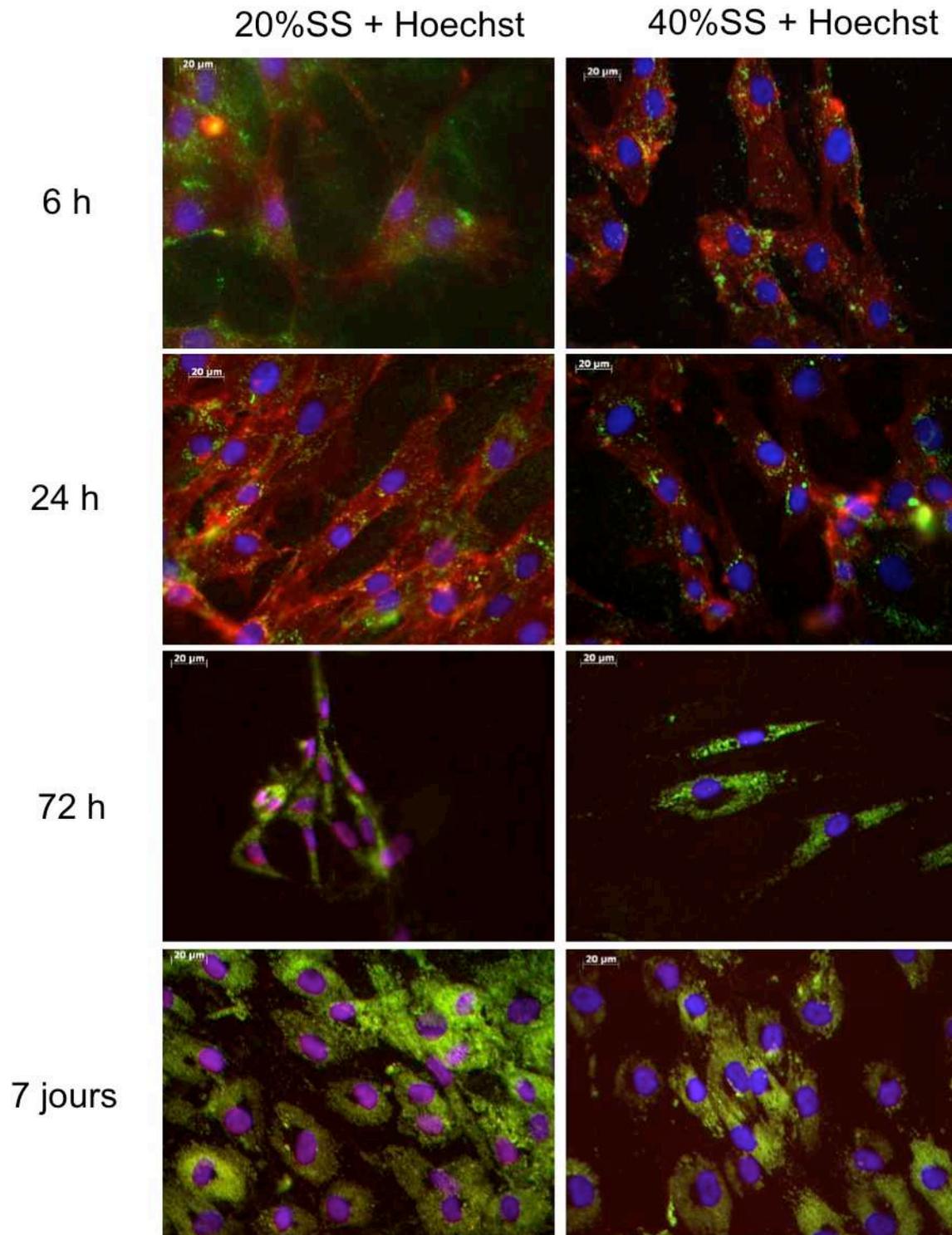


Figure 5-15: Influence de la présence de ponts disulfures dans les particules sur la libération intracellulaire du marqueur Hoechst 33258 après exposition des NHDF à des suspensions à 0,6 mg/mL dans du milieu de culture

5.4.4 BILAN SUR L'UTILISATION DES PARTICULES DE SILICE POUR LA LIBERATION DE MOLECULES ENCAPSULEES

Lorsqu'il est internalisé dans les particules de silice, le marqueur nucléaire Hoechst 33258 peut être libéré dans les cellules. Cette libération se fait plus rapidement en présence de disulfure dans la matrice de silice. Par ailleurs, il semble que l'ajout de disulfures dans les particules permette de moduler la libération du marqueur encapsulé. Cependant ce ne sont que des résultats préliminaires et l'étude devra être poussée plus loin pour déterminer l'influence exacte des ponts disulfures. Malgré tout, ces résultats sont encourageants pour l'utilisation de nanoparticules de silice modifiées pour la libération de principes actifs. Il semble en effet que l'introduction d'une fonction disulfure au sein de la matrice de silice soit un paramètre permettant potentiellement de moduler la libération d'une molécule encapsulée. Cette fonction disulfure a un autre intérêt puisqu'elle semble favoriser la dissolution intracellulaire des particules sans apporter de toxicité pour les cellules. Si ce résultat se confirme sur des temps d'étude plus longs, cela permettrait de développer des particules biodégradables et d'éviter l'accumulation de particules dans les cellules, ainsi qu'un temps de résidence accru.

5.5 Conclusions sur les particules n%SS et leur application pour la libération de principes actifs

En conclusion, cette étude a permis de montrer que l'incorporation de ponts disulfures dans des matrices de silice pour obtenir des particules "biofragmentables" semble une piste intéressante à approfondir. En effet, les particules ainsi obtenues sont sensibles à un environnement réducteur, condition rencontrée notamment dans les endosomes ou les lysosomes. Cette sensibilité à l'environnement d'internalisation modifie le comportement intracellulaire de ces particules par rapport aux particules de silice pleines étudiées dans le chapitre 3.

On observe ainsi que ces particules sont internalisées en nombre plus restreint dans les vésicules et ne semblent pas s'agréger. Par contre, très rapidement on observe que les particules internalisées présentent une structure de coquille, indiquant la dissolution du cœur des particules. Ces phénomènes sont observés pour l'ensemble de la gamme des particules étudiées mais avec des cinétiques apparemment d'autant plus lentes que le taux de disulfure

est important. Enfin, cette dissolution intracellulaire donne naissance à des structures lamellaires, résultats probables de la silicification de lysosomes multi-membranaires. Malgré leur internalisation et leur dissolution intracellulaire, les particules n%SS étudiées ne présentent pas de toxicité pour les fibroblastes jusqu'à une semaine d'exposition.

Enfin, pour valider l'applicabilité de ces particules, nous y avons encapsulé un marqueur fluorescent. L'étude montre que ce marqueur est libéré dans les cellules et capable d'atteindre le noyau. Par ailleurs, les résultats préliminaires suggèrent que l'incorporation de ponts disulfures pourrait être un facteur de modulation de la libération.

Les résultats de cette étude sont donc très encourageants quant à la possibilité de favoriser la dégradation intracellulaire des particules de silice et de moduler la libération de molécules encapsulées en incorporant une fonction sensible à l'environnement rencontré lors de l'internalisation : un pont disulfure.

Chapitre 6

Protocoles expérimentaux

6.1 SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES DE SILICE	180
6.2 COMPORTEMENT DES PARTICULES EN MILIEU BIOLOGIQUE	188
6.3 DIFFUSION DES PARTICULES DANS DES HYDROGELS DE COLLAGÈNE	197
6.4 ÉTUDE DES NANOPARTICULES INCORPORANT LES PONTS DISULFURES	207

particules fluorescentes, les mêmes concentrations en FITC et APTES sont utilisées. (2,57 mmol/L de FITC et 171 mmol/L d'APTES dans l'éthanol absolu dans 10 mL d'éthanol)

6.1.1.2 Synthèse de particules fluorescentes, positives, de diamètre supérieur à 30 nm

Les particules de diamètre supérieur à 30 nm sont synthétisées par voie sol-gel de type Stöber (Stöber 1968, Nyffenegger 1993). Dans de l'éthanol, sont ajoutés sous agitation magnétique l'ammoniaque (30%), qui sert de catalyseur, puis la source de silice (TEOS, Aldrich) et enfin la solution FITC-APTES. Selon le diamètre voulu, les concentrations des différents composants sont ajustées (tableau 6.1). Cette solution est agitée à température ambiante pendant 48 heures. Les particules ainsi obtenues sont dialysées afin d'éliminer les réactifs n'ayant pas réagi (TEOS, APTES, FITC-APTES), le catalyseur (NH₄OH), et changer de solvant pour avoir une suspension de nanoparticules dans l'eau. Les suspensions sont conservées dans l'acide acétique 17 mM.

Nanoparticules	TEOS	L-lysine	NH ₄ OH	APTES-FITC	H ₂ O	Ethanol
Si 40	3,8 mL	-	4,0 mL	3,8 mL	-	100 mL
Si 200	4,0 mL	-	5,5 mL	4,0 mL	3,0 mL	100 mL
Si 10	4,0 mL	0,255 g	-	4,0 mL	51,25 mL	-

Tableau 6-1: Composition des synthèses

6.1.1.3 Synthèse de nanoparticules fluorescentes de diamètre inférieur à 20 nm

Pour obtenir des nanoparticules de diamètre inférieur à 20 nm, nous avons utilisé le protocole dérivé de la synthèse Stöber décrit par L. Thomassen (Thomassen 2010). Le solvant utilisé est l'eau et le catalyseur la L-Lysine. Le TEOS est ajouté goutte à goutte à une solution de L-lysine à 60°C avant la solution FITC-APTES. La solution est laissée sous agitation magnétique à 60°C pendant 72 heures. Après dialyse, les suspensions sont conservées dans l'eau.

6.1.1.4 Modification de surface : greffage de groupements amines

Les particules synthétisées par voie Stöber classique ont déjà des groupements amines greffés en surface. Par contre les particules obtenues avec la lysine présentent une charge de surface négative. Pour obtenir des particules de diamètre inférieur à 20 nm positives, nous avons

greffé des groupements amines en surface de ces particules (Badley 1990). Pour cela, avant dialyse une partie de la suspension de particules est prélevée et diluée dans de l'éthanol absolu. Puis l'APTES et l'ammoniaque sont ajoutés (10 mL de suspension dans 10 mL d'éthanol avec 170 μ L d'APTES et 800 μ L de NH_4OH). Cette suspension est laissée sous agitation 16 h, à température ambiante. Ensuite, les particules dialysées sont conservées en suspension dans de l'acide acétique à 17 mM.

6.1.1.5 Synthèse de nanoparticules incorporant des ponts disulfures

Les particules n%SS ont été synthétisées par voie sol-gel de type Stöber. Le précurseur de silice (TEOS) est ajouté à une solution d'éthanol – ammoniacque, suivi immédiatement de l'ajout du silane contenant le pont disulfure (figure 6.2). Selon le taux de disulfure voulu, la concentration en composé disulfure est ajustée (tableau 6.2). Les concentrations des autres réactifs sont maintenues constantes. Cette solution est laissée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 48 heures.

Les particules fluorescentes sont obtenues en ajoutant la solution FITC-APTES après l'ajout du TEOS et du silane contenant le pont disulfure. Ces particules sont conservées en suspension dans de l'acide acétique 17 mM.

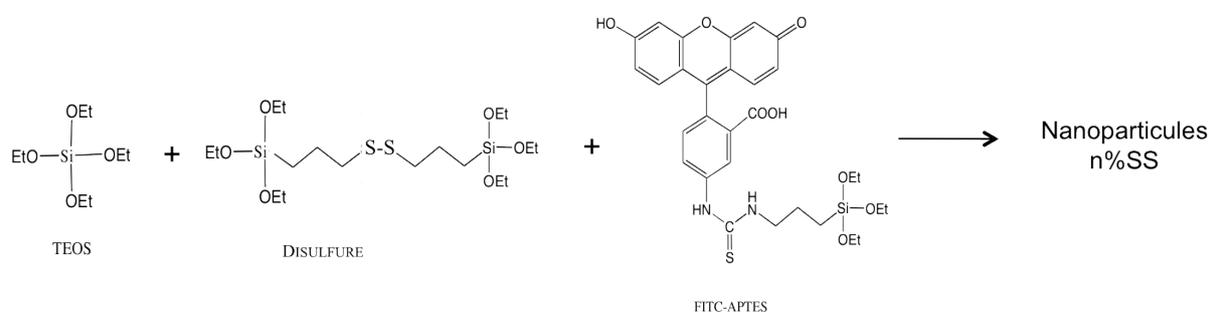


Figure 6-2: Equation bilan de la synthèse des nanoparticules n%SS fluorescentes

Nanoparticules	TEOS	NH_4OH 30%	Disulfure	Ethanol	* FITC-APTES
0%	6,0 mL	7,5 mL	-	150 mL	6,0 mL
10%	6,0 mL	7,5 mL	0,54 mL	150 mL	6,0 mL
20%	6,0 mL	7,5 mL	1,08 mL	150 mL	6,0 mL
30%	6,0 mL	7,5 mL	1,62 mL	150 mL	6,0 mL
40%	6,0 mL	7,5 mL	2,16 mL	150 mL	6,0 mL

Tableau 6-2: Composition des synthèses des nanoparticules hybrides % massique Disulfure/TEOS.

*uniquement pour les nanoparticules fluorescentes

6.1.2 CARACTERISATION DES NANOPARTICULES SYNTHETISEES

6.1.2.1 Taille et morphologie

La taille des nanoparticules synthétisées est déterminée à la fois par DLS et par MET.

(i) Diffusion dynamique de la lumière :

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) permet de mesurer le diamètre hydrodynamique des particules en suspension, ainsi que la distribution de tailles de ces particules.

Appareil et protocole opératoire :

Les analyses sont faites sur un Brookhaven Zeta Plus Analyzer. Pour chaque suspension de particules l'analyse est faite plusieurs fois, sur une durée de 15 min.

(ii) Microscopie électronique en transmission :

La microscopie électronique en transmission permet de mesurer la taille des particules sans leur couche de solvatation. Elle permet aussi de déterminer la morphologie des particules et leur homogénéité.

La microscopie électronique utilise un faisceau d'électrons comme rayonnement, qui permet d'atteindre une résolution atomique. Le contraste d'absorption des électrons au sein de l'échantillon permet de l'imager. L'image est formée en collectant les électrons transmis à travers l'échantillon qui doit être mince.

Pour étudier les nanoparticules de silice, une suspension de ces nanoparticules est déposée sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone.

Les microscopes utilisés sont un Jeol 1011 opérant à 100 kV et un FEI Tecnai opérant à 120 kV.

6.1.2.2 Structure et composition

(i) Détermination de la charge de surface par potentiel zêta

La mesure du potentiel zêta de particules en suspension permet d'étudier leur charge de surface et leur stabilité. Cette mesure est effectuée en déterminant la mobilité électrophorétique (vitesse des particules dans un champ électrique) des particules par vélocimétrie laser Doppler et en y appliquant l'équation de Henry.

Appareil et protocole opératoire

Toutes les mesures ont été effectuées avec un Zeta Plus de Brookhaven. Deux à trois millilitres d'une suspension de particules dans une solution de KCl 10 mM ou dans du milieu de culture sont placés dans la cellule. L'électrode est introduite en prenant soin de ne pas former de bulles dans la cellule.

(ii) Détermination de la composition par analyses élémentaires

Les échantillons des nanoparticules n%SS sèches ont été envoyés au service central d'analyse du CNRS de Solaize. Le silicium est dosé par ICP-AES, le carbone et l'azote par catharométrie et le soufre par infrarouge. Cette analyse permet d'obtenir le rapport massique des différents éléments.

(iii) Greffage du fluorophore

- Fluorescence

Les spectres de fluorescence des nanoparticules greffées avec la FITC sont enregistrés sur un spectromètre Horiba Jobin Yvon FluoroMax 3, avec une excitation à 485 nm.

- Détermination du taux de greffage de la FITC par spectroscopie UV-visible

Le taux de greffage de fluorescéine correspond à la fraction de FITC réellement incorporée dans les particules au cours de la synthèse. Pour le déterminer, les particules sont dissoutes en milieu basique (NaOH 0,2 M). Cette étape permet de libérer la fluorescéine dont la concentration est ensuite déterminée par absorbance UV-visible. Le spectre d'absorption de la fluorescéine est très sensible au pH et à la polarité du solvant, il faut donc s'assurer d'avoir la bonne concentration finale en NaOH. Pour s'assurer que la dissolution est complète, la réaction est poursuivie pendant 24 heures, puis l'absorbance à 490 nm est mesurée. Afin de déterminer la concentration en fluorescéine, une gamme étalon de FITC dissoute dans NaOH 0,2 M est préparée. On en déduit le coefficient d'absorption molaire de la FITC dans ces conditions qui vaut $5,19 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$. Il faut noter que ce protocole fait l'hypothèse suivante : soit la liaison APTES-FITC est rompue en conditions basiques, soit cette liaison ne perturbe pas le spectre d'absorption UV-visible.

(iv) Détermination de la concentration massique

Après dialyse, trois échantillons de 2 mL de suspension de nanoparticules sont mis à évaporer dans des boîtes de Pétri tarées. Lorsque les particules sont sèches, les boîtes sont pesées et la concentration massique utilisée dans les expériences est la moyenne des trois valeurs.

(v) Détermination de la surface spécifique et de la porosité par manométrie d'adsorption d'azote

Pour déterminer la surface spécifique et la porosité des matériaux, on réalise une isotherme d'adsorption d'azote à 77 K. Lorsqu'il se trouve en contact d'un matériau solide, l'azote va s'adsorber en surface de ce dernier. L'ensemble des états d'équilibre N_2 gaz \leftrightarrow N_2 adsorbé, tracé en augmentant la pression correspond à l'isotherme d'adsorption. On suit de même la désorption du gaz lorsque la pression diminue.

L'analyse de l'isotherme d'adsorption par la méthode BET (Brunauer, Emmett et Teller) permet d'avoir accès à la surface spécifique, en reliant le volume des molécules adsorbées à la surface du matériau étudié. Cette méthode suppose que l'adsorbant occupe la surface en monocouche, qui est par la suite recouverte d'une couche supplémentaire... La surface spécifique est calculée en multipliant l'aire d'encombrement d'une molécule de gaz sonde par le nombre de molécules formant la monocouche N_m . N_m peut être déterminé grâce au volume de gaz adsorbé (V_m) correspondant à la monocouche ($N_m = V_m \cdot N_a / 22414$, N_a nombre d'Avogadro et 22414 volume occupé par une mole d'azote dans les conditions normales de température et de pression). La surface occupée par une molécule d'azote peut être calculée et vaut $16,2 \text{ \AA}^2$. On en déduit que la surface spécifique vaut $S_{BET} = 4,37 \cdot V_m$.

La porosité est déterminée par analyse de la distribution de la taille des pores ou par la méthode α_s .

Les isothermes d'adsorption d'azote des différentes nanoparticules de la série n%SS ont été réalisées sur un Belsorp ...

(vi) Détermination de la structure et de la condensation des particules par RMN du solide

La résonance magnétique nucléaire est une technique d'analyse spectroscopique, permettant d'examiner l'influence des atomes voisins sur la variation d'énergie entre les états de spin du noyau de l'élément étudié. Sous l'effet d'un champ magnétique intense, il est possible d'observer des spectres influencés par différentes interactions comme par exemple le déplacement chimique (δ).

Contrairement à ce qui se passe dans les liquides, en solide les interactions anisotropes (couplage dipolaire, déplacement chimique, ...) ne sont plus moyennées par le mouvement brownien. Ces contributions induisent un élargissement des raies rendant l'information délicate à exploiter. Diverses techniques sont développées afin d'annuler ou de minimiser ces interactions. Celles qui ont été utilisées sont brièvement décrites.

Rotation à l'angle magique :

Pour améliorer la résolution des spectres RMN du solide, Andrew *et al.* et Lowe *et al.* (Andrew 1958, Lowe 1959) ont conçu une méthode appelée rotation à l'angle magique ou MAS (Magic Angle Spinning). Cette technique consiste à faire tourner l'échantillon dans le spectromètre, à une fréquence de quelques milliers ou dizaines de milliers de Hertz, autour d'un axe incliné par rapport à la direction verticale du champ B_0 d'un angle θ égal à $54^\circ 44'$. Cet angle appelé « angle magique » permet de réduire l'influence des interactions anisotropes.

Polarisation croisée et rotation à l'angle magique CP-MAS :

Les spectres de RMN du silicium ^{29}Si et du carbone ^{13}C ont été enregistrés en utilisant la technique de polarisation croisée avec rotation à l'angle magique. La polarisation croisée consiste à transférer l'aimantation d'un noyau abondant A comme le proton vers un autre noyau plus rare tel que le carbone ou le silicium, grâce au couplage dipolaire entre les deux noyaux. La modification du temps de contact (temps durant lequel le transfert d'aimantation est autorisé) permet d'observer sélectivement des noyaux H-C en proximité spatiale. Pour les temps de contact les plus courts, seuls les sites les plus proches des noyaux A sont observés. La forme des raies permet d'avoir des informations sur la mobilité des espèces regardées.

Cependant, la technique CP-MAS n'est pas quantitative.

Spectres 2D HET-COR, corrélation de déplacements chimiques hétéronucléaire :

Le spectre HET-COR permet de corréler les raies du spectre ^1H avec celles du spectre ^{29}Si ou ^{13}C d'un échantillon. Cette corrélation apporte des informations sur les interactions entre les différents protons et atomes de silicium ou de carbone, et en couplant ces deux spectres 2D, on obtient des données sur les interactions silicium-carbone. On peut ensuite en déduire des informations structurales basées sur la proximité spatiale des atomes en interaction.

Les expériences de RMN du solide ont toutes été menées sur un spectromètre BRUKER AVANCE III 300 WB (champ magnétique statique $B_0 = 7.04\text{ T}$, fréquences de Larmor : 300 MHz pour ^1H , 75.51 MHz pour ^{13}C et 59.66 MHz pour ^{29}Si).

RMN 1D

Les expériences de polarisation croisée RMN 1D $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C CP-MAS et $\{^1\text{H}\}$ - ^{29}Si CP-MAS ont été réalisées en utilisant une sonde CP/MAS double résonance 7 mm. Les échantillons ont été placés dans un rotor en zircone mis en rotation à l'angle magique (MAS) à 5 kHz. Pour ces expériences, des impulsions de radiofréquence de 90° ont été utilisées. Les acquisitions ont été conduites avec découplage du proton (spinal 64, $\nu_{1\text{H}}=50$ kHz), en utilisant un temps de recyclage de 1 s, un temps de contact de 1 ms pour les expériences $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C CP-MAS et de 3 ms pour les expériences $\{^1\text{H}\}$ - ^{29}Si CP-MAS en utilisant une rampe croissante, et un nombre de scans (NS) de 4096. Pour le traitement du signal, une apodisation exponentielle (LB) de 30 Hz pour les expériences $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C CP-MAS et de 50 Hz pour les expériences $\{^1\text{H}\}$ - ^{29}Si CP-MAS a été appliquée avant de faire la transformée de Fourier.

L'expérience INEPT $\{^1\text{H}\}$ - ^{29}Si a été réalisée en utilisant une sonde triple résonance 4 mm, en chauffant le dispositif à 353 K, avec une fréquence de rotation de 8 kHz, un temps de recyclage de 2s, des temps caractéristiques d'évolution et de refocalisation de 5 ms synchronisés sur la fréquence de rotation, un NS de 72240 et une apodisation exponentielle (LB) de 10 Hz.

RMN 2D

Les expériences RMN 2D $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C HETCOR et $\{^1\text{H}\}$ - ^{29}Si HETCOR ont été réalisées en utilisant une sonde CP/MAS double résonance 4 mm et un rotor en zircone mis en rotation à l'angle magique (MAS) à 14 kHz. Les acquisitions ont été réalisées en utilisant une fenêtre spectrale de 14000 Hz et 32 tranches sur f1, un temps de recyclage de 1s, un temps de contact de 1 ms pour l'HETCOR $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C et de 3 ms pour l'HETCOR $\{^1\text{H}\}$ - ^{29}Si avec une rampe tangente, un nombre de scans de 1680 pour l'HETCOR $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C et de 6800 pour l'HETCOR $\{^1\text{H}\}$ - ^{29}Si . Le signal temporel (FID) a été corrigé en appliquant sur f2 une apodisation exponentielle (LB) de 30 Hz pour l'HETCOR $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C et de 50 Hz pour l'HETCOR $\{^1\text{H}\}$ - ^{29}Si et une apodisation en cosinus sur f1 dans les deux cas.

6.2 Comportement des particules en milieu biologique

6.2.1 DISSOLUTION EN MILIEU TAMPON PH 7,4

La dissolution des particules de silice est suivie à pH 7,4 dans un tampon Tris-HCl 0,05 M, en présence de 10 mM de KCl, concentration en K⁺ proche de celle retrouvée dans le plasma.

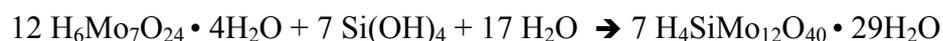
Une suspension de 0,6 mg/mL de nanoparticules est mise sous agitation à 37°C dans le tampon. La dissolution est suivie par deux méthodes : le suivi de l'intensité de fluorescence de la fluorescéine libérée et le dosage de la silice dissoute.

6.2.1.1 Suivi par fluorescence

Aux temps prédéterminés, de 30 minutes à plusieurs jours, 400 µL de suspension sont prélevés. L'intensité de fluorescence est mesurée directement (excitation à 485 nm) pour la moitié du prélèvement. L'autre moitié est mesurée après centrifugation (10 000 rpm, 15 minutes) dans un tube Nanosep 3,5 kD afin d'éliminer les particules et de mesurer uniquement l'intensité de fluorescence due à la fluorescéine libérée ou aux fragments issus de la dissolution pouvant traverser les pores du filtre, *i.e.* de moins de 0,13 nm de diamètre.

6.2.1.2 Dosage de la silice dissoute

Aux temps prédéterminés, on prélève 1,0 mL de suspension pour doser la silice dissoute. Ce dosage repose sur la capacité de l'acide silicique à réagir avec l'heptamolybdate d'ammonium pour former un complexe coloré selon l'équation suivante :



Le complexe ainsi formé absorbe à 400 nm et peut donc être suivi par spectroscopie UV-visible.

Protocole : 1 mL de solution à doser est dilué avec 12,5 mL d'eau Milli-Q. 500 µL d'une solution aqueuse de molybdate d'ammonium tétrahydraté (100 g/L) sont ajoutés sous agitation, suivis de 300 µL d'acide sulfurique 1,5 M (pour réaliser la réaction à pH 1,5). La solution est maintenue sous agitation pendant 10 minutes avant de lire l'absorbance à 400 nm. Si la réaction se poursuit trop longtemps, on ne dose plus uniquement les monomères et dimères, le résultat est donc faussé.

Une gamme étalon, obtenue à partir de solutions de silicate à différentes concentrations, permet de déterminer la concentration en silice dissoute à partir de l'absorbance du complexe

formé.

Dans le cas des particules incorporant de la fluorescéine, il se pose le problème de la superposition des spectres d'absorption de la fluorescéine et de l'acide silico-molybdique. Il est tout de même possible d'obtenir la concentration en silice dissoute en effectuant deux mesures d'absorbance à 400 nm (acide silico-molybdique) et à 440 nm (FITC), ainsi que deux courbes d'étalonnage. Ces deux courbes permettent d'obtenir les coefficients d'absorption molaire de la fluorescéine et de l'acide silico-molybdique aux deux longueurs d'ondes.

$$A(400 \text{ nm}) = C_{\text{FITC}} * \epsilon_{\text{FITC}}(400 \text{ nm}) + C_{\text{Silice}} * \epsilon_{\text{Silice}}(400 \text{ nm})$$

$$A(440 \text{ nm}) = C_{\text{FITC}} * \epsilon_{\text{FITC}}(440 \text{ nm}) + C_{\text{Silice}} * \epsilon_{\text{Silice}}(440 \text{ nm})$$

$$\text{On obtient donc } C_{\text{Silice}} = \frac{A(440 \text{ nm}) * \epsilon_{\text{FITC}}(400 \text{ nm}) - A(400 \text{ nm}) * \epsilon_{\text{FITC}}(440 \text{ nm})}{\epsilon_{\text{Silice}}(440 \text{ nm}) * \epsilon_{\text{FITC}}(400 \text{ nm}) - \epsilon_{\text{Silice}}(400 \text{ nm}) * \epsilon_{\text{FITC}}(440 \text{ nm})}$$

D'après les gammes étalon, on a $\epsilon_{\text{FITC}}(400 \text{ nm}) = 3,1.10^4 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{FITC}}(440 \text{ nm}) = 8,7.10^4 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{Silice}}(400 \text{ nm}) = 181 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{Silice}}(440 \text{ nm}) = 41 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$.

6.2.2 DISSOLUTION EN MILIEU DE CULTURE

La présence de phosphates dans le milieu de culture perturbe le dosage de la silice dissoute en réagissant avec le sel de molybdène (Thayer 1930). Le suivi de la dissolution dans le milieu de culture s'est donc fait uniquement par suivi de la fluorescéine libérée, comme décrit précédemment.

En parallèle, les particules sont analysées en MET au cours du temps afin de voir s'il y a évolution de leur taille et/ou de leur structure. Les particules après 24 h, 7 et 14 jours dans le milieu de culture à 37°C sont déposées sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone et observées sur un microscope opérant à 120 kV. Un minimum d'une centaine de particules est mesuré pour obtenir leur taille.

6.2.3 INTERACTIONS AVEC LES CELLULES

6.2.3.1 Culture cellulaire

Toutes les manipulations de cellules sont effectuées en conditions stériles, sous une hotte à flux laminaire. L'état des cellules est vérifié régulièrement sous un microscope inversé à

contraste de phase (Leica). Les cellules sont placées dans un incubateur maintenu à 37°C, en atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

Lignée cellulaire et mise en culture :

Les cellules utilisées sont des fibroblastes dermiques humains normaux commerciaux provenant de chez PromoCell et sont conservées dans l'azote liquide. Les cellules sont multipliées en les plaçant dans des flacons de culture de 75 cm² dans 10 mL de milieu DMEM complété par 10% de SVF, une solution de pénicilline/ streptomycine (en concentration finale de 100 U/mL et 100 µg/mL respectivement) et 1% d'une solution d'antifongique (amphotéricine B). Lorsque les cellules arrivent à 70-80% de confluence, elles sont détachées des flacons de culture pour être de nouveauensemencées à une densité d'environ 10⁶ cellules par flacon de 75 cm². Pour cela, le milieu de culture est retiré et les cellules sont recouvertes par 7 mL d'une solution PUCK'S-EDTA pendant 5 minutes afin de favoriser leur décollement. En effet, l'EDTA chélate les ions divalents (Ca²⁺ et Mg²⁺) qui interviennent dans l'adhésion des cellules. Après avoir retiré cette solution, les cellules sont placées dans l'incubateur avec 1 mL d'une solution de Trypsine à 0,1% pendant 5 minutes. La Trypsine va permettre de rompre les interactions des cellules avec le support. Après décollement, les cellules sont remises en suspension dans 5 mL de milieu complet. Elles sont centrifugées (5 minutes à 1000 rpm) puis reprises dans 2 mL de milieu complet pour être comptées à l'aide d'un hémacytomètre.

Solution PUCK'S-EDTA :

NaCl 8,0 g/L , KCl 0,4 g/L , Glucose 1,0 g/L, NaHCO₃ 0,35 g/L, EDTA 0,2 g/L, H₂O Milli-Q
La solution ainsi préparée est stérilisée et conservée à 4°C.

6.2.3.2 Internalisation des nanoparticules

Après exposition aux nanoparticules (0,6 mg/mL), les cellules sont observées en microscopie à fluorescence ainsi qu'en MET pour déterminer si les nanoparticules ont été internalisées, et quelle est l'influence sur l'internalisation et sa cinétique des caractéristiques des particules (taille, charge). De plus, pour déterminer la voie d'internalisation, des expériences sont menées en présence d'inhibiteurs spécifiques.

(i) Exposition des cellules aux nanoparticules

Après culture et comptage, les cellules sont incubées soit sur des lamelles de verre dans des plaques 24 puits, à une densité de 10 000 cellules par puits, pour les observations en microscopie à fluorescence, soit dans des boîtes de culture de 25 cm², 100 000 cellules par boîte, pour des observations en MET. Après 24 heures passées dans l'incubateur, pour laisser le temps aux cellules d'adhérer sur le support de culture, le milieu recouvrant les cellules est remplacé par une suspension à 0,6 mg/mL de particules dans le milieu complet sans rouge phénol (DMEM sans rouge phénol complété par 10% de SVF, une solution de pénicilline/ streptomycine (en concentration finale de 100 U/mL et 100 µg/mL respectivement), 1% d'une solution d'antifongique et 1% de GlutaMax). Le volume de suspension ajouté est de 1,0 mL par puits dans les plaques 24 puits et de 5,0 mL dans les boîtes de culture. Aux différents temps d'étude, les cellules sont fixées, comme décrit ci-après, pour être observées.

(ii) Microscopie à fluorescence

Les cellules sont fixées 1 heure avec du PFA (4% dans du PBS 1X) à 4°C avant d'être observées. L'internalisation est mise en évidence avec un marqueur membranaire : WGA Alexa Fluor 555. Après fixation, les cellules sont placées dans du tampon HBSS 1X (KCl 0,4 g/L, KH₂PO₄ 0,06 g/L, NaCl 8,0 g/L, Na₂HPO₄.7H₂O 0,09 g/L, D-glucose 1,0 g/L, H₂O qsp 1L) pendant 5 minutes puis marquées avec une solution de WGA Alexa Fluor 555 à 1 µg/mL (dans HBSS 1X) pendant 10 minutes, suivi de 3 rinçages de 5 minutes dans du tampon HBSS 1X.

La localisation intracellulaire des particules est mise en évidence à l'aide du Lysosensor Yellow-Blue afin de démontrer la présence de nanoparticules dans des compartiments endosomes-lysosomes. Pour cela, les cellules, après marquage des membranes et rinçage sont marquées avec une solution de Lysosensor à 10 µmol/L (dans HBSS 1X). Ce marqueur s'accumule dans les organelles acides sous l'effet de sa protonation. Cette dernière a aussi pour résultat d'augmenter la fluorescence, quenchée par la chaîne latérale faiblement basique de la sonde fluorescente.

L'absence de particules au niveau du noyau est mise en évidence par marquage de ce dernier au DAPI (marquage 5 minutes avec une solution à 5 µg/mL) après perméabilisation de la membrane (10 minutes d'exposition à une solution de PBS 1X contenant 10 mg/mL de BSA et 0,5% Triton X-100).

Après marquage, les lames sont montées avec lamelles avec une solution *SlowFade*[®] Gold Antifade Reagent. Les lames sont ensuite observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Zeiss équipé d'une caméra et d'un ApoTome. Les différents marqueurs sont repérés en utilisant les filtres décrits dans le tableau 6.3.

Filtre	Maximum d'excitation	Largeur d'excitation	Maximum d'émission	Largeur d'émission	Fluorophore
Filtre 43	545 nm	25 nm	605 nm	70 nm	Alexa Fluor 555
Filtre 44	475 nm	40 nm	530 nm	50 nm	FITC
Filtre 49	365 nm		445 nm	50 nm	DAPI Lysosensor

Tableau 6-3: Description des filtres de fluorescence utilisés pour les différents marqueurs

(iii) Microscopie électronique

La microscopie électronique permet de visualiser la localisation intracellulaire précise des nanoparticules, leur aspect, l'évolution de leur taille au cours du temps et le nombre de particules internalisées.

Pour pouvoir être observés en microscopie électronique en transmission, les échantillons biologiques doivent être stabilisés par fixation chimique et déshydratation. De plus, les tissus organiques ayant une faible densité électronique offrent un contraste trop faible pour être observés directement. Il est donc nécessaire de leur ajouter des atomes lourds lors de la fixation pour apporter une densité électronique importante qui permet de les visualiser.

Fixation chimique : cette étape permet de figer la structure microscopique des échantillons à observer. Le fixateur utilisé est une solution de glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon cacodylate (0,033 M, pH 7,4). Ce réactif permet de ponter les groupements amines libres des protéines (collagène et cellules). La fixation est faite pendant 1 heure à 4°C. Puis l'échantillon est rincé dans trois bains d'un mélange tampon cacodylate (0,05 M, pH 7,4)/saccharose 0,3 M (tampon de rinçage).

Une deuxième fixation est effectuée avec du tétraoxyde d'osmium. Ce dernier permet de créer des ponts entre protéines en réagissant avec les doubles liaisons, permettant ainsi de conserver les structures et notamment les membranes. Par ailleurs, l'osmium étant un atome lourd, il diffuse fortement les électrons, apportant ainsi un contraste à l'échantillon. En pratique, les pièces à inclure, déjà fixées au glutaraldéhyde sont placées pendant une heure à 4°C dans une

solution de tétraoxyde d'osmium à 2% dans un mélange tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4)/saccharose 0,3 M. Les échantillons sont ensuite rincés dans trois bains du tampon de rinçage. Après rinçage, les cellules sont récupérées à l'aide d'un grattoir et centrifugées dans des eppendorfs. Jusqu'à l'inclusion finale, les cellules sont gardées sous forme de culot dans les eppendorfs et recentrifugées si nécessaire (1000 rpm, temps ajusté, en fonction de la viscosité, pour avoir un culot).

Les échantillons sont ensuite déshydratés par passage dans des bains d'éthanol de 5 minutes à 50%, 70% et 95%, puis enfin deux bains de 10 minutes d'éthanol à 100%. A la suite de cette déshydratation, l'éthanol est remplacé par de l'oxyde de propylène (un premier bain 50 :50 éthanol et oxyde de propylène puis un bain d'oxyde de propylène pur).

Inclusion : Les échantillons déshydratés sont inclus dans de l'araldite (composition : 20 mL araldite CY212, 22 mL d'anydride dodécyl succinique, agent durcisseur, 1,1 mL de benzyl dimethyl amine, accélérateur). Cette inclusion se fait d'abord par imprégnation progressive des pièces placées dans des mélanges araldite/ oxyde de propylène (0,25/0,75 pendant 1 heure puis 0,75/0,25 pendant 1 nuit à 4°C). Ensuite les pièces sont placées dans de l'araldite pure pendant 3 heures en changeant l'araldite après 1 heure. Enfin les échantillons sont placés dans des moules remplis d'araldite et mis à polymériser pendant 3 jours dans une étuve à 60°C.

Les blocs sont coupés en sections ultrafines de 70 nm à l'aide d'un ultramicrotome (Ultracut Reichert Young). Ces coupes sont déposées sur des grilles de cuivre.

Selon les échantillons, les coupes sont contrastées à l'acide phosphotungstique, à l'acétate d'uranyle ou sont observées sans contraste supplémentaire.

Les coupes ultrafines de cellules fixées à différents temps sont observées à l'aide d'un microscope FEI opérant à 120 kV.

(iv) Internalisation en présence d'inhibiteurs

Afin de déterminer quelle voie d'internalisation est mise en œuvre, les cellules sont incubées avec des inhibiteurs des voies clathrine et caveolae. Les cellules sont respectivement incubées 3 heures avec une solution à 50 μ M de monodansylcadaverine et 30 minutes avec une solution à 5 μ g/mL de filipine ou 10^{-8} M de phorbol myristate acetate, avant d'ajouter les nanoparticules en suspension dans le milieu avec l'inhibiteur. Ensuite, les cellules sont fixées et observées en microscopie à fluorescence, comme décrit précédemment.

(v) Mesure de l'intensité de fluorescence des particules internalisées

Afin de comparer l'internalisation des différentes particules observées par fluorescence, l'intensité de fluorescence de la FITC au niveau des cellules est mesurée sur les images de microscopie à fluorescence. Pour ce faire, la zone correspondant à une cellule est définie grâce au marqueur membranaire WGA-AlexaFluor555, et l'intensité du signal de la FITC est sommée sur cette zone à l'aide du logiciel CellProfiler. Pour éviter de comptabiliser des particules à la surface des cellules, des cellules ne présentant pas d'agrégats de particules en surface ont été sélectionnées.

6.2.3.3 Etude de la toxicité

Chaque expérience est réalisée au moins en triplet, les différences sont évaluées avec une analyse statistique (test Student si les résultats suivent une distribution normale (déterminé par un test de normalité Shapiro-Wilk) et Wilcoxon-Mann-Whitnet pour les autres)

(i) Comptage cellulaire par la technique du bleu trypan

Après exposition aux nanoparticules, les cellules sont décollées comme décrit dans le protocole de culture cellulaire (§ 6.2.3.1). Elles sont ensuite comptées en utilisant le bleu trypan. Cette technique permet de colorer en bleu les cellules mortes, tout en laissant les cellules vivantes non colorées. En effet, ce colorant, une fois entré dans les cellules, provoque un mécanisme d'exclusion le rejetant dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessite de l'énergie et ne peut donc avoir lieu que dans les cellules vivantes ayant une source d'ATP. Ces dernières apparaissent donc non colorées au microscope tandis que les cellules mortes prennent une coloration bleue. Pour cela, 100 μ L d'une solution de bleu Trypan (0,4% dans du PBS 1X) sont ajoutés à 0,5 mL d'une suspension cellulaire. Après homogénéisation, les cellules vivantes non colorées sont comptées avec un hémacytomètre.

(ii) Cytotoxicité : test à la résazurine

Les cellules vivantes réduisent la résazurine bleue en résosfurine rose (schéma 6.3). L'intensité de coloration obtenue est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

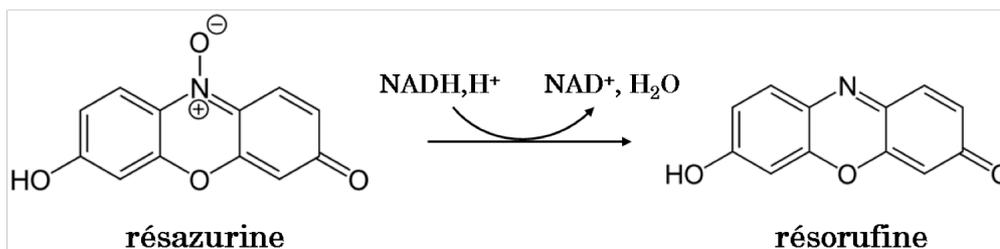


Figure 6-3: Réaction du test à la résazurine

Protocole : Après exposition aux nanoparticules, le milieu est retiré et les cellules sont incubées 4 heures avec 100 μL de milieu sans rouge phénol contenant 10% de résazurine à 440 μM . Au terme de cette incubation, le milieu est prélevé et la DO mesurée à 570 nm (résorufine) et 600 nm (résazurine). Les cellules sont rincées avec du milieu neuf et la culture est poursuivie pour étudier la toxicité aux temps d'exposition plus longs.

Calcul du % de résazurine réduit par rapport au contrôle négatif (milieu + résazurine sans cellules):

$$\% = \frac{\varepsilon_{ox}(600)A(570) - \varepsilon_{ox}(570)A(600)}{\varepsilon_{ox}(600)A^{\circ}(570) - \varepsilon_{ox}(570)A^{\circ}(600)}$$

$$\varepsilon_{ox}(600) = 117,216 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{ox}(570) = 80,586 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$A()$ = absorbance à la longueur d'onde (570 ou 600 nm) de l'échantillon

$A^{\circ}()$ = absorbance à la longueur d'onde (570 ou 600 nm) du témoin négatif

(iii) Génotoxicité : test des comètes en conditions basiques

Principe : Le test des comètes permet la détection d'un endommagement de l'ADN (Collins 2004). Un nombre limité de cellules est suspendu dans un gel d'agarose pour effectuer une électrophorèse. Les cellules sont lysées dans une solution à haute teneur en sel et en détergent, formant ainsi des nucléoides contenant l'ADN. Lors de l'électrophorèse, l'ADN intact va migrer sous forme d'une sphère compacte, tandis que l'ADN ayant été endommagé va présenter des fragments plus courts qui vont davantage migrer vers l'anode, formant ainsi une forme ressemblant à une comète. En conditions alcalines, ce test permet de révéler les ruptures de chaînes simple et double brins, ainsi que les sites alcali-labiles. L'intensité ainsi que la longueur de la queue des comètes dépendent de l'importance des dommages causés à l'ADN. L'analyse des comètes permet ainsi une quantification des effets observés en regroupant les comètes par classe en fonction de l'intensité et longueur de queue, de 0 (pas de

dommage) à IV (ADN presque uniquement localisé dans la queue de la comète) (figure 6.4). Les effets sont ainsi quantifiés par comparaison avec un témoin négatif et positif.



Figure 6-4: Différentes classes de comètes en fonction du dommage causé à l'ADN

Protocole opératoire (Speit 2005): Les cellules ont adhéré dans des plaques 24 puits (50,000 cellules par puits) 24 heures avant d'être exposées pendant 24 heures aux nanoparticules. Après avoir retiré le milieu de culture, les cellules sont rincées avec du PBS 1X avant d'être décollées avec 200 μ L de trypsine (5 minutes dans l'incubateur à 37°C). Les cellules sont resuspendues dans du PBS 1X, puis 50 μ L de cette suspension sont mélangés à 500 μ L d'agarose à bas point de fusion préparé dans du PBS 1X (125 mg d'agarose dans 20 mL de PBS 1X). 50 μ L de ce mélange sont disposés en doublons sur des lames pré-traitées (Comet Slides, Trevigen). Les lames sont mises 20 minutes à 4°C pour laisser l'agarose polymériser avant d'être plongées dans un bain de lyse pendant 2 heures. Ensuite les lames sont déposées sur l'électrophorèse horizontale à 4°C dans le tampon d'électrophorèse pendant 30 minutes sans courant, puis une tension de 25 V et un courant de 300 mA sont appliqués pendant 45 minutes. A la suite de l'électrophorèse, les lames sont plongées dans un bain de neutralisation (Tris-HCl 0,4 M pH 7,5) avant d'être déshydratées dans l'éthanol. Enfin, l'ADN est marqué avec du DAPI (50 μ L par gel d'une solution à 5 μ g/mL dans PBS 1X, 20 minutes). Pour terminer, les lames sont analysées avec un microscope à epi-fluorescence possédant un filtre à 445 nm. Un minimum de 100 comètes est analysé et classé par catégorie de dommages à l'aide du logiciel CellProfiler.

Solutions utilisées :

Solution de lyse :

Solution mère : 2,5 M NaCl (146,1 g), 100 mM EDTA (37,2 g), 10 mM Tris-HCl (1,2 g), pH 10 (NaOH 8,0 g environ), H₂O (890 mL)

Solution finale : Triton X-100 (1 mL), DMSO (10 mL), Solution mère (89 mL)

Tampon d'électrophorèse : 300 mM NaOH, 1 mM EDTA

Toutes les solutions sont préparées juste avant utilisation et conservées à 4°C.

6.2.3.3 Dissolution intracellulaire et exocytose

Afin de déterminer si les particules internalisées sont capables de ressortir des cellules ou si elles sont dégradées de façon intracellulaire, après une semaine d'exposition à une suspension de particules dans le milieu de culture à 0,6 mg/mL, les cellules sont rincées et le milieu changé. Tous les jours, le milieu est intégralement prélevé, et remplacé par du milieu neuf, pour mesurer l'intensité de fluorescence totale ainsi que celle des formes solubles, obtenues par séparation des nanoparticules du reste du milieu (centrifugation dans un tube avec un seuil de rétention de 3,5 kD pendant 15 minutes à 10 000 rpm). L'intensité de fluorescence est mesurée au maximum d'émission, pour une excitation à 485 nm.

6.3 Diffusion des particules dans des hydrogels de collagène

6.3.1 FORMATION DES GELS DE COLLAGENE

6.3.1.1 Extraction du collagène de type I

(i) Obtention des tendons

L'extraction se fait à partir de tendons de queue de rat, sous une hotte à flux laminaire stérile. Pour récupérer les tendons, il faut serrer la queue à 1 cm de son extrémité fine et à l'aide d'une pince (type coupe-ongles) casser la vertèbre par rotation du poignet et tirer pour sortir le tendon. L'opération est répétée de cm en cm en remontant, en s'arrêtant à environ 3 cm de la base de la queue. Les tendons ainsi prélevés sont plongés dans un bécher de PBS 1X.

(ii) Lavage des tendons prélevés

Les tendons doivent être lavés abondamment pour éliminer toutes les traces de sang. La première étape consiste à centrifuger plusieurs fois les tendons (4°C, 4400 tours/min, 5min) en les rinçant avec du PBS 1X. Lorsque le surnageant est limpide et incolore, les tendons sont plongés dans une solution de NaCl 4M pour induire l'éclatement cellulaire par choc osmotique et évacuer les éventuelles traces de sang et d'albumine. Enfin, les tendons sont à nouveau rincés dans du PBS 1X et centrifugés plusieurs fois (4°C, 4400 tours/min, 5 min) pour éliminer un maximum de sel et les débris cellulaires.

(iii) Solubilisation du collagène

Les tendons, une fois lavés, sont dispersés dans une solution d'acide acétique 0,5 M stérile et laissés sous agitation à 20°C pendant 24 heures afin de permettre la dissolution du collagène en condition acide.

(iv) Purification de la solution de collagène

La solution de collagène obtenue dans l'acide acétique 0,5 M est centrifugée à 21000 rpm pendant 2 heures pour éliminer les gros agrégats non dissous. Une solution de NaCl 4 M dans l'acide acétique 0,5 M est ajoutée au surnageant sous agitation de sorte d'obtenir une concentration finale en NaCl de 300 mM. La solution ainsi obtenue est ensuite centrifugée à 21000 rpm pendant 3 heures. Les culots sont éliminés tandis que le surnageant subit un nouveau traitement avec NaCl de sorte d'atteindre une concentration finale de 700 mM et de précipiter le collagène. Cette dernière solution est centrifugée à 4400 rpm pendant 45 min (10°C) et les culots sont redispersés dans une solution d'acide acétique 0,5 M. Afin d'éliminer les traces de sel, la solution de collagène est dialysée contre une solution d'acide acétique 0,5 M (5 bains de 4 heures minimum) puis contre une solution d'acide acétique 17 mM (5 bains). Enfin la solution est centrifugée pendant 4 heures à 21000 rpm (10°C) et conservée à 4°C. La concentration de la solution obtenue est déterminée par dosage de l'hydroxyproline.

(v) Solutions utilisées

Toutes les solutions sont stérilisées avant utilisation.

Acide acétique 0,5M : 57,5 mL d'acide acétique glacial pour 2,0 L de volume total (complété avec de l'eau distillée)

Acide acétique 17mM : 1,0 mL d'acide glacial pour 1,0 L de volume total

PBS 10X : NaCl 80 g/L, KCl 2,0 g/L, Na₂HPO₄-12 H₂O 28,9 g/L, NaH₂PO₄-1 H₂O 2,027 g/L, eau Milli-Q

6.3.1.2 Détermination de la concentration en collagène par dosage de l'hydroxyproline

La concentration en collagène des solutions est déterminée par un dosage de l'hydroxyproline. Cet acide aminé représente environ 13% du poids moléculaire du collagène de type I.

Pour libérer les résidus hydroxyproline, une masse connue de collagène est hydrolysée dans un excès d'HCl 6 N à 100°C pendant une nuit. L'échantillon est ensuite séché avant d'être repris dans 1 mL d'eau Milli-Q. Différentes dilutions de l'échantillon seront ensuite dosées en prélevant des aliquots de 10, 20 et 40 µL complétés à 400 µL avec de l'eau Milli-Q. L'hydroxyproline est ensuite oxydée par ajout de 200 µL d'une solution de chloramine T à température ambiante pendant 20 min. Cette réaction est stoppée par ajout d'acide perchlorique 3,15 M (200 µL) pendant 5 minutes à température ambiante. Enfin, 200 µL de diméthylamino-4-benzaldehyde sont ajoutés et la solution est maintenue à 60°C pendant 20 min. Le diméthylamino-4-benzaldehyde forme un complexe coloré avec l'hydroxyproline oxydée, dont la concentration est déterminée par mesure de la densité optique à 557 nm. Cette valeur est corrélée à la concentration en hydroxyproline via une gamme étalon d'hydroxyproline commerciale. Ainsi la concentration en hydroxyproline dans les aliquots est-elle obtenue et permet de remonter à la concentration massique en collagène en multipliant par les différents facteurs de dilution et par 7,6 (car l'hydroxyproline représente 13% de la masse de collagène).

Solutions :

Tampon de dosage : acide citrique monohydraté 0,25 M (6,25 g), acétate de sodium trihydraté 1 M (17,5 g), hydroxyde de sodium 0,85 M (4,25 g), acide acétique glacial (1,5 mL), H₂O Milli-Q (125 mL).

Acide perchlorique : acide perchlorique (27 mL pour 100 mL de volume total complété avec de l'eau Milli-Q)

Hydroxyproline : Hydroxy-L-proline (20 mg/L dans l'eau)

Chloramine T : Chloramine T (400 mg), H₂O (5 mL), Methyl Cellosolve (7,5 mL), Tampon de dosage (12,5 mL)

Solution de DMBA : Diméthylamino-4-benzaldehyde (0,5 g), Methyl Cellosolve (2,5 mL), à chauffer à 60°C pendant 30min pour une meilleure dissolution.

6.3.1.3 Obtention de solutions plus concentrées

Des solutions de collagène plus concentrées (10 – 15 mg/mL) sont obtenues simplement par évaporation. Un volume connu d'une solution diluée de collagène de concentration connue est mis à évaporer sous une hotte à flux laminaire en conditions stériles. L'évaporation est faite

lentement sous air et permet de suivre l'évolution de la concentration de collagène par pesée. Cependant il faut rester conscient que cette méthode va provoquer une augmentation de la concentration en acide acétique (et donc du pH) puisque l'eau va s'évaporer plus rapidement que l'acide acétique.

6.3.1.4 Formation des gels de collagène

Il faut distinguer deux protocoles légèrement différents selon que l'on veut obtenir des gels de collagène à 3 mg/mL (H3) et 5 mg/mL (H5) ou des gels à 1,5 mg/mL (H1.5). La modification de protocole concerne la température de travail de la première étape et est due à la différence de viscosité des solutions de collagène utilisées : pour H3 et H5 on part d'une solution de collagène à 10 mg/mL très visqueuse qu'il faut manipuler à température ambiante, tandis que pour H1.5 la solution de départ est à 5 mg/mL et peut être manipulée à 4°C. La première étape consiste à mélanger le collagène et le milieu de culture à 4°C pour H1,5 et à 20°C pour H3 et H5 puis de refroidir à 4°C. Ensuite ce mélange est neutralisé par l'ajout d'une solution de soude stérile à 0,1 mol/L. Enfin une suspension de cellules à 500,000 cellules par millilitre est ajoutée. Rapidement (avant gélification) le gel est coulé (figure 6.5). Une fois gélifié, on recouvre le gel de milieu de culture pour éviter qu'il ne se dessèche et on le place dans l'incubateur (atmosphère humide, 5% CO₂). Le gel n'est utilisé que 24 heures après sa formation afin de laisser le temps aux cellules d'adhérer à leur nouvel environnement.

Pour l'étude de la diffusion, 300 µL de gels sont coulés dans des inserts de culture avec une membrane poreuse (pores de 2,0 µm). Ces gels sont recouverts avec 500 µL de milieu et l'insert est placé dans une plaque 24 puits contenant 1 mL de milieu

Le schéma 6.8 récapitule le procédé d'obtention des gels H3 et H3c. Le tableau 6.3 regroupe les proportions utilisées pour obtenir les différents gels.

Formation de gels composites

Des gels encapsulant des nanoparticules de silice de façon isotrope ont été synthétisés, ainsi que des gels hybrides incorporant une solution neutralisée de silicate. Le protocole est le même que pour les gels précédents en ajoutant une étape avant la neutralisation qui consiste à l'adjonction d'une suspension de nanoparticules dans l'acide acétique 17 mM ou de la solution de silicate, neutralisée avec de l'acide chlorhydrique 3 M, à 0,5 mol/L.

Gels	Collagène (10 mg/mL- * 5 mg/mL)	Milieu de culture	SiO ₂ (0,5 mol/L)	NaOH 0,1 mol/L	Cellules (500,000/mL)
H1,5	* 1,5 mL	3,25 mL	-	0,25 mL	-
H1,5c	* 1,5 mL	2,75 mL	-	0,25 mL	0,5 mL
H3	1,5 mL	3,25 mL	-	0,25 mL	-
H3c	1,5 mL	2,75 mL	-	0,25 mL	0,5 mL
H5	2,5 mL	2,25 mL	-	0,25 mL	-
H5c	2,5 mL	1,75 mL	-	0,25 mL	0,5 mL
H3 composite	1,8 mL	2,3 mL	120 µL	0,25 mL	-
H3c composite	1,6 mL	1,8 mL	120 µL	0,25 mL	0,5 mL

Tableau 6-4: Composition des gels de collagène

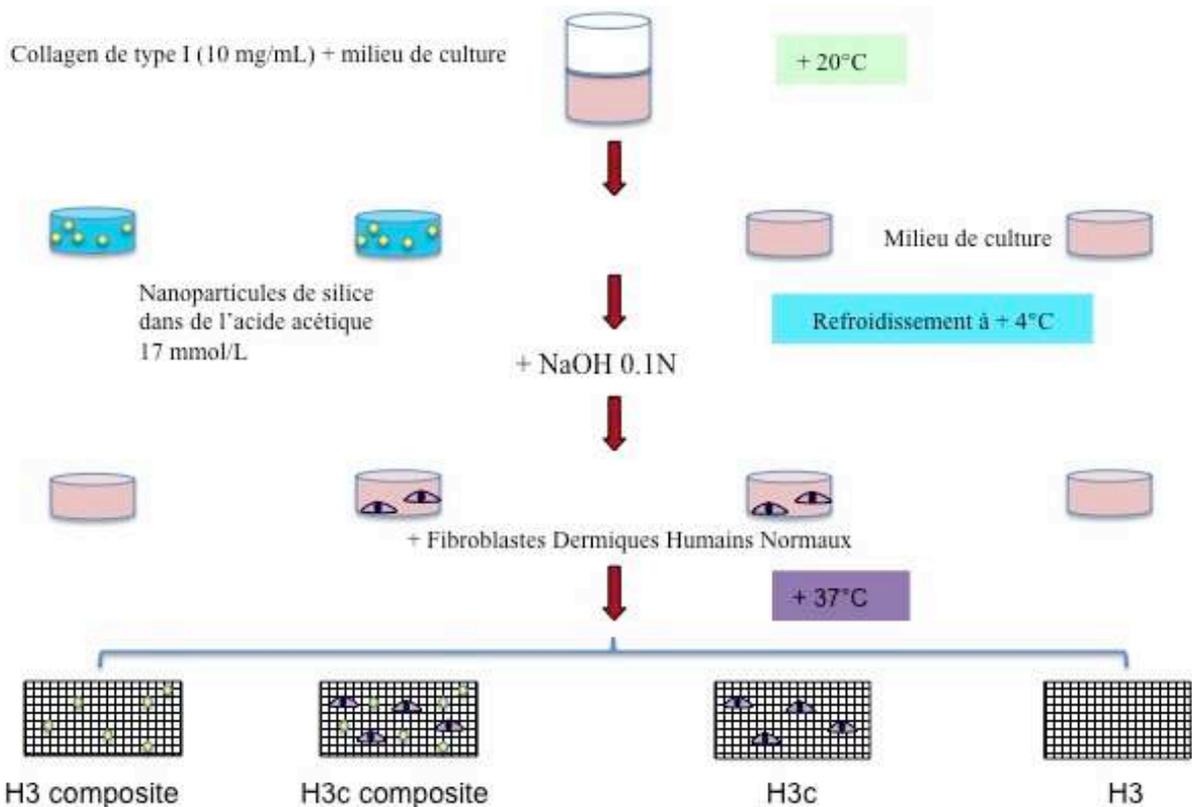


Figure 6-5: Procédé d'obtention des gels de collagène à 3 mg/mL acellulaires (H3), cellularisés (H3c), composite acellulaire (H3 composite), composite cellularisé (H3c composite)

Par ailleurs, des gels à 5 mg/mL ont été formés par neutralisation avec un tampon Tris-HCl 1M. Ces gels sont obtenus en mélangeant 3,75 mL de collagène à 10 mg/mL avec 2,47 mL d'eau Milli-Q, 470 µL de la source de silice à 0,5 M (nanoparticules dans l'acide acétique 17 mM ou silicate neutralisé avec HCl 3 M) et 810 µL de Tris-HCl 1M.

6.3.2 SUIVI DE LA DIFFUSION ET DISSOLUTION

6.3.2.1 Dispositif de diffusion et suivi par fluorescence

24 heures après la formation du gel de collagène dans l'insert, le milieu au-dessus du gel est remplacé par une suspension de nanoparticules de silice fluorescentes dans du milieu de culture complet. Toutes les études sont faites à une concentration massique de 0,6 mg/mL en nanoparticules dans du milieu de culture sans rouge phénol. Chaque condition est réalisée au minimum en triplicat. 400 µL du milieu situé sous la membrane sont prélevés à des temps prédéfinis (de 30 minutes à 72 heures) afin de mesurer l'intensité de fluorescence, et remplacés par 400 µL de milieu. Il est tenu compte de cette dilution dans les courbes d'évolution de l'intensité présentées : $I(t)_{réelle} = I(t)_{mesurée} + 0,4 * I(t-1)_{réelle}$. A chaque temps, le prélèvement est divisé en deux : une moitié est centrifugée dans un filtre Nanosep 3 kD (15 minutes, 10000 tours/minutes) afin de retirer les nanoparticules de la suspension, l'autre moitié est analysée directement. L'intensité de fluorescence de tous les prélèvements est mesurée à 530 nm avec une excitation à 485 nm. L'intensité de fluorescence du centrifugat correspond à la fluorescéine dissoute tandis que l'intensité de fluorescence liée aux nanoparticules est obtenue par différence entre l'intensité du prélèvement total et celle du centrifugat. Les courbes finales sont tracées comme pourcentage de l'intensité de la suspension de nanoparticules à 0,6 mg/mL pour l'évolution des particules et en pourcentage de l'intensité de la suspension entièrement dissoute pour la fluorescéine. L'influence de différents paramètres sur la diffusion a été étudiée : (i) la taille des nanoparticules, (ii) la charge de surface des nanoparticules, (iii) la présence de cellules et (iv) la concentration en collagène. Le schéma 6.9 décrit le principe de suivi de la diffusion par spectroscopie de fluorescence.

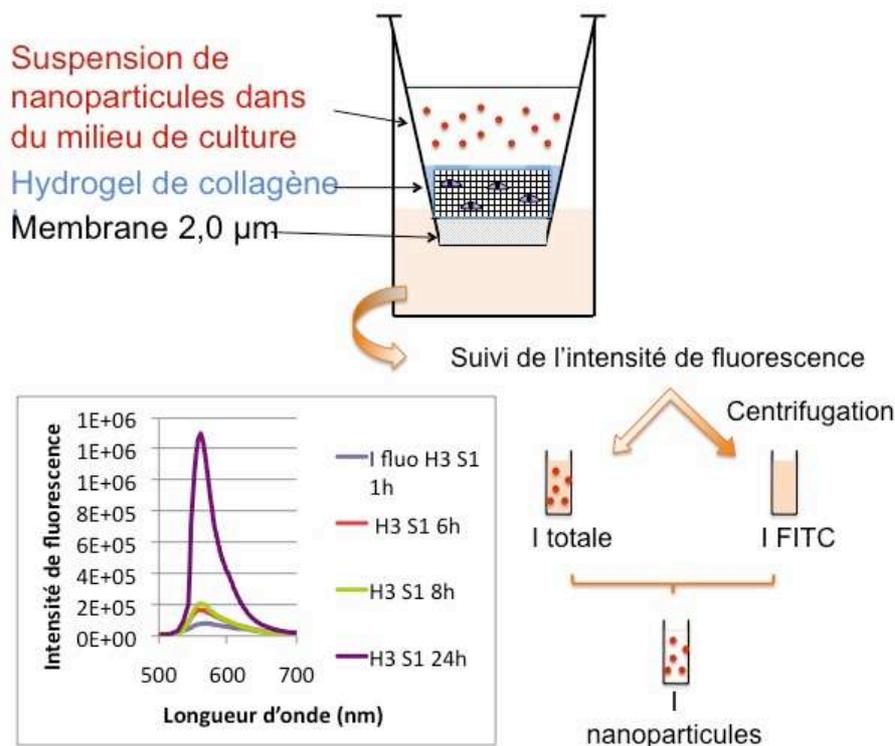


Figure 6-6: Description du dispositif de diffusion et du suivi par spectroscopie de fluorescence

6.3.2.2 Dissolution

Les mesures de l'intensité de fluorescence du milieu de diffusion après centrifugation montrent une intensité non nulle, ce qui traduit la présence de fluorescéine libérée par dissolution des nanoparticules. Pour évaluer l'influence du collagène et des cellules dans ce processus, la dissolution des nanoparticules dans du milieu de culture a été étudiée. L'influence du collagène est obtenue par comparaison de la dissolution dans un gel de collagène acellulaire et dans le milieu, celle des cellules est obtenue par comparaison entre les gels acellulaires et cellularisés. Pour l'étude de la dissolution des nanoparticules dans le milieu de culture seule, une suspension de nanoparticules à 0,6 mg/mL dans le milieu complet est placée à 37°C, sous agitation. Au cours du temps, des prélèvements sont effectués et analysés en spectroscopie à fluorescence (directement et après centrifugation dans un filtre Nanosep 3 kD).

6.3.2.3 Modélisation

Les courbes de diffusion obtenues ayant une allure caractéristique, nous avons modélisé la diffusion afin de remonter aux coefficients de diffusion et aux constantes d'adsorption-désorption des nanoparticules dans le collagène. La difficulté de cette modélisation réside

dans la simultanéité de trois processus : l'adsorption-désorption des nanoparticules, la diffusion et la dissolution des nanoparticules. Afin de simplifier le problème la présence de cellules n'est pas prise en compte dans la modélisation. On considère donc l'équation de Fick couplée à l'adsorption-désorption des nanoparticules.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - \frac{\partial S}{\partial t}$$

$$\frac{\partial S}{\partial t} = \lambda C - \mu S$$

C = concentration des nanoparticules qui diffusent

S = concentration des nanoparticules immobilisées

λ = constante d'adsorption, μ = constante de désorption

Initialement, on a une source spontanée avec $S=C=0$ pour $0 < x < l$, $t=0$ (x = coordonnée dans le gel, l = épaisseur du gel).

Le même travail peut être fait pour la fluorescéine libérée par dissolution des nanoparticules. Le détail de la modélisation est décrit en annexe.

6.3.3 INTERACTIONS AVEC LES CELLULES : INTERNALISATION ET TOXICITE

6.3.3.1 Observation de l'internalisation des particules

- Fixation des gels de collagène pour la microscopie optique

Afin d'observer correctement les échantillons de gels de collagène au microscope optique, il est nécessaire d'avoir des échantillons d'épaisseur suffisamment fine. Pour obtenir des coupes fines et régulières, il est nécessaire d'inclure l'échantillon dans un bloc de paraffine. Pour cela, les échantillons sont fixés puis déshydratés.

Aux temps voulus, les gels sont fixés en les plongeant 24 heures dans une solution de paraformaldehyde à 4% dans du PBS 1X. Ensuite les échantillons sont déshydratés par des bains successifs dans de l'éthanol (24 heures à 70%, 4 heures à 95%, 4 heures à 100%) puis dans un bain de butanol (48 heures minimum). Une fois déshydratés, les échantillons sont placés 3 heures dans de la paraffine fondue, à 60°C avant d'être inclus. Cette dernière étape s'effectue en versant de la paraffine fondue dans des barres de Leuckart placées sur une plaque en verre et en plaçant les pièces à inclure sur une des faces. Une fois la paraffine

durcie, les blocs peuvent être coupés à l'aide d'un microtome, permettant l'obtention de coupes régulières de 7 µm. Les coupes sont ensuite étalées sur des lames de verre et placées à l'étuve à 60°C pendant 2-3 jours.

Avant d'observer les coupes, elles sont déparaffinées dans deux bains successifs de toluène puis réhydratées dans des bains d'éthanol contenant une proportion croissante d'eau jusqu'à un bain d'eau. Pour l'observation en fluorescence, après réhydratation, les lames sont placées dans un tampon HBSS 1X avant d'être marquées. Les membranes cellulaires sont marquées avec du WGA Alexa Fluor 555 (10 µg/mL) pendant 15 minutes puis rincées avec le tampon HBSS (3 fois 10 minutes). Les noyaux sont marqués avec du DAPI à 5 µg/mL pendant 5 minutes après perméabilisation de la membrane avec une solution contenant du Triton X-100. Les lysosomes sont marqués avec un Lysosensor jaune-bleu (10 µmol/L dans HBSS 1X) pendant 30 minutes. Les gels sont enfin rincés abondamment (5 bains de 10 minutes dans le tampon HBSS 1X). Après marquage, les lames sont montées avec lamelles avec une solution *SlowFade*[®] Gold Antifade pour conserver le signal de fluorescence et observées avec un microscope à fluorescence et/ou un microscope confocal.

- Internalisation en présence d'inhibiteurs

Afin de comparer l'internalisation dans les cellules en culture 2D ou immobilisées dans un gel de collagène, les gels cellularisés sont incubés avec les inhibiteurs des voies clathrine et caveolae (§6.2.3.1 (iii)) puis exposés aux nanoparticules. Après 24 heures et 72 h, les gels sont fixés et marqués (§6.3.3.1) pour être observés en microscopie à fluorescence.

- Fixation pour la microscopie électronique en transmission

Les échantillons sont fixés pour la microscopie électronique comme décrit au paragraphe 6.2.3.1 (iii).

6.3.3.2 Toxicité

Afin de déterminer la toxicité des particules pour les cellules immobilisées dans les gels de collagène, le nombre de cellules vivantes est suivi avec la technique du bleu de Trypan et l'activité métabolique est évaluée avec le test à la résazurine.

Pour déterminer le nombre de cellules vivantes, la première étape consiste à hydrolyser le gel de collagène avec de la collagénase à 37°C (2 mg/mL dans du PBS 1X). Cette enzyme va rompre les liaisons peptidiques du collagène permettant ainsi de casser la structure du gel.

Lorsque le gel est entièrement hydrolysé, l'ensemble est centrifugé pendant 5 minutes à 1000 rpm et les cellules sont resuspendues dans 200 µL de PBS 1X. Ces cellules sont ensuite colorées avec du bleu de Trypan (40 µL d'une solution à 0,4% dans du PBS 1X) et comptées à l'aide d'un hémacytomètre.

L'activité métabolique est évaluée avec le test à la résazurine comme décrit pour les cellules (§6.2.3.2 (ii)).

6.3.4 ETUDE DE GELS COMPOSITES

6.3.4.1 Suivi de l'adhésion par marquage au DAPI

Afin d'étudier l'adhésion des fibroblastes sur les matrices de collagène, ces dernières sont fixées 30 min, 3 h, 6h, 9h, 12h et 24h après l'ajout des cellules en surface des gels. Les matrices sont rincées trois fois avec du PBS 1X avant d'être fixées avec du paraformaldehyde à 4% dans du PBS pendant 1 heure. Les échantillons sont de nouveau rincés avant le marquage des noyaux au DAPI, comme décrit précédemment (§ 6.2.3.1 (i)). Une fois marquées, les cellules sont comptées à l'aide d'un microscope à fluorescence en dénombrant le nombre de noyaux sur 7 zones réparties sur l'ensemble de la matrice. Chaque zone représente 0,56 mm² (grandissement x10). L'analyse statistique permet d'obtenir la densité cellulaire moyenne ainsi que sa distribution.

6.3.4.2 Suivi de la prolifération par MTT

La succinate déshydrogénase mitochondriale réduit le cycle tétrazolium du MTT (de couleur jaune) pour former des cristaux de formazan de couleur violette (figure 6.7). Ces cristaux sont dissous avec du DMSO et la densité optique à 570 nm est mesurée. Cette DO est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et peut y être reliée à l'aide d'une courbe étalon.

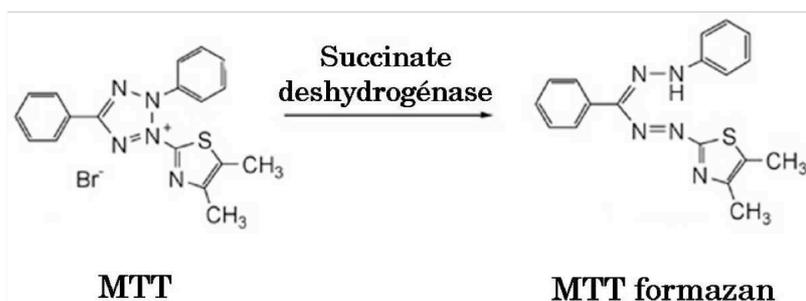


Figure 6-7: Principe du test MTT

Protocole opératoire : A différents temps après l'ajout des cellules en surface, les gels sont incubés 4 heures avec 500 μL d'une solution de MTT (5 mg/mL dans PBS 1X). Au terme de cette incubation, les gels sont rincés 3 fois avec de l'eau distillée (ou jusqu'à obtenir une solution de rinçage incolore) avant d'ajouter le DMSO. Après 30 minutes sous agitation, la DO est mesurée à 570 nm.

6.4 Etude des nanoparticules incorporant les ponts disulfures

6.4.1 INFLUENCE DU pH SUR LA DISSOLUTION

Pour évaluer l'influence du pH sur la dissolution, les particules sont mises en suspension dans un tampon acétate (50 mM, 10 mM KCl) à pH 4,5 (pH trouvé dans les lysosomes) et leur dissolution est suivie par dosage de la silice dissoute avec le molybdate d'ammonium (§6.2.1.2).

6.4.2 COMPORTEMENT EN PRESENCE DE REDUCTEURS : REACTION AVEC LE DTT

Dans le cas des particules n%SS, la réduction des ponts disulfures par du DTT a été étudiée. Cette étude se fait sous atmosphère inerte (N_2) afin d'empêcher l'oxydation du DTT avec le dioxygène de l'air. Le DTT réagit avec les ponts disulfures selon l'équation décrite dans le schéma 6.9 et forme un composé cyclique dont le maximum d'absorption se situe autour de 290 nm. Les particules n%SS sont mises en suspension à 0,6 mg/mL dans 30 mL de tampon Tris-HCl pH 7,4, le dioxygène dissous est éliminé en faisant buller de l'azote pendant 5 minutes. Après ajout de 200 μL d'une solution de DTT (62 mg de DTT dans 2 mL de tampon

phosphate), les suspensions sont gardées en atmosphère N₂ et mises à 37°C. 1 mL de suspension est prélevé à chaque temps d'analyse et centrifugé 15 minutes à 6000 rpm pour mesurer l'absorbance à 290 nm de la solution sans nanoparticules.

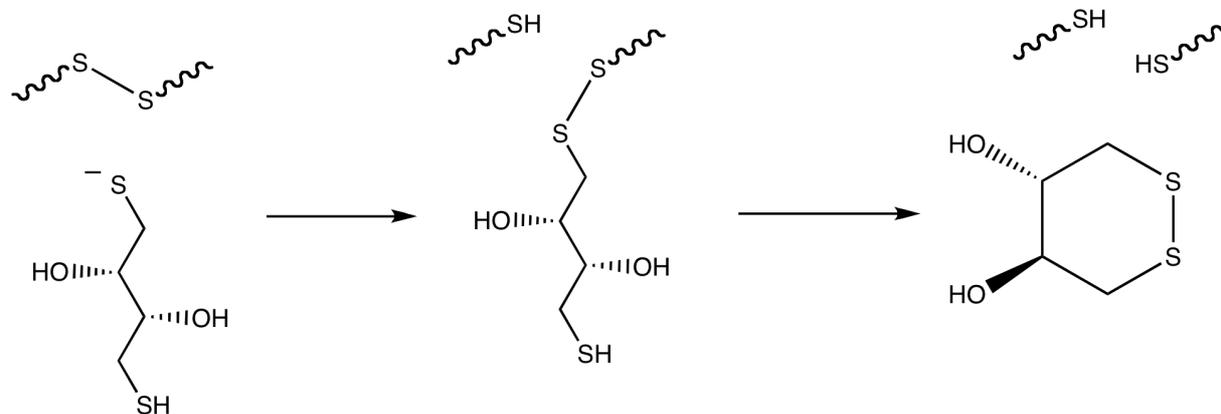


Figure 6-5: Réaction du DTT avec un pont disulfure

6.4.3 INTERACTIONS AVEC LES CELLULES : ENDOCYTOSE – EXOCYTOSE

L'internalisation des nanoparticules après exposition des cellules à une suspension à 0,6 mg/mL et leur localisation intracellulaire sont mises en évidence par microscopie à fluorescence, comme décrit dans le paragraphe 6.2.3.1.

La dissolution intracellulaire des particules et/ou leur exocytose, après 7 jours d'exposition des cellules à une suspension à 0,6 mg/mL de nanoparticules dans le milieu de culture, sont mesurées comme décrit dans le paragraphe 6.2.3.3.

6.4.4 LIBERATION D'UNE MOLECULE ENCAPSULEE

6.4.4.1 Synthèse de nanoparticules incorporant un marqueur nucléaire : Hoechst

Pour étudier la libération d'une molécule incorporée par interactions électrostatiques dans les particules de silice, des nanoparticules de silice fluorescentes, incorporant un marqueur nucléaire Hoechst 33258, sont synthétisées selon la synthèse décrite dans le paragraphe 6.1.1.5. L'influence de la fonctionnalisation par le disulfure est étudiée avec trois compositions : 0%, 20% et 40% massique de disulfure. Lors de la synthèse, après ajout du TEOS, du disulfure et de la solution FITC-APTES, une solution de Hoechst 33258 à 1 mM

dans l'éthanol est ajoutée (5% en volume). Après 48 heures sous agitation à l'abri de la lumière, les particules sont dialysées.

6.4.4.2 Suivi de la libération du marqueur Hoechst

La libération du marqueur Hoechst 33258 est suivie par microscopie à fluorescence sur les cellules fixées 1 heure avec du PFA 4% à 4°C. Pour mettre en évidence le marquage du noyau par Hoechst 33258, ce dernier est marqué avec de l'iodure de propidium selon le protocole décrit ci-après.

Marquage du noyau à l'iodure de propidium :

Avant de marquer le noyau, il faut perméabiliser la membrane en incubant les cellules 10 minutes avec une solution de PBS 1X contenant 1% de BSA et 0,5‰ de Triton X-100. Ensuite, après avoir été rincées avec du tampon SSC 2X (0,3 M NaCl, 0,03 M citrate de sodium, pH 7,0) les cellules sont traitées avec de la RNase 100 µg/mL pendant 20 minutes à 37°C. Les cellules sont alors rincées trois fois 2 minutes dans le tampon SSC 2X puis marquées avec une solution d'iodure de propidium (10 minutes avec une solution à 500 nM). Après rinçage, les lames sont montées avec le réactif *Slowfade*[®] Gold Antifade pour être observées.

Conclusions et perspectives

Ce travail avait pour but d'étudier le comportement des nanoparticules de silice en milieu biologique, étude nécessaire pour les applications envisagées de ces nanoparticules dans le domaine bio-médical. Pour cela l'influence des caractéristiques des nanoparticules sur leur comportement a été observée à différents niveaux : du suivi du comportement des nanoparticules en milieu biologique (réel ou simulé) à l'analyse des interactions entre ces nanoparticules et des cellules. Ces dernières ont été observées dans des cultures 2D, où les cellules sont exposées directement aux nanoparticules, mais aussi lors de la diffusion de nanoparticules dans des matrices de collagène dans lesquelles les cellules sont immobilisées, pour se rapprocher des conditions d'exposition par voie cutanée. Pour cela, des particules de différentes tailles (entre 10 et 200 nm), de charge de surface positives ou négatives et de différentes compositions ont été synthétisées et caractérisées puis exposées à des cellules du derme. L'objectif était d'évaluer dans quelle mesure les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules influencent leur stabilité en milieu biologique, leur capacité à diffuser à travers un matériau modèle du derme et leur comportement au niveau cellulaire.

Cette étude a permis d'obtenir quelques résultats intéressants et prometteurs pour les applications dans le domaine bio-médical, résultats résumés dans les paragraphes qui suivent.

La surface des nanoparticules et leur taille sont des paramètres clés pour leur stabilité en conditions biologiques

Nous avons observé que la charge ainsi que la nature des groupements présents en surface jouent un rôle important dans la cinétique de dissolution des particules en milieu de culture. En effet, le calcul des constantes de dissolution montre que les particules se dissolvent d'autant moins vite qu'elles sont petites et avec une charge de surface négative. Par contre, la taille ne modifie pas le plateau d'équilibre de dissolution, contrairement à la fonctionnalisation de surface : à taille identique (10 nm) les particules possédant des groupements amines en surface se dissolvent plus dans le milieu de culture que leurs homologues chargées négativement. Par ailleurs, à taille constante, l'introduction de disulfure ralentit légèrement la dissolution et modifie significativement le plateau d'équilibre de

dissolution. De plus, la nature de la surface des particules influence la formation d'une couronne de protéines dans le milieu de culture et peut donc altérer le phénomène d'agrégation. Ainsi l'ensemble des particules étudiées s'agrègent-elles dans le milieu de culture, phénomène d'autant plus rapide que les particules sont grosses et de surface peu chargée dans l'eau.

Ces résultats montrent l'importance d'une caractérisation des nanoparticules dans les conditions d'étude afin de connaître le plus précisément possible la nature des objets étudiés. Par ailleurs, il pourrait être intéressant de mieux comprendre l'influence de l'introduction de silanes fonctionnels sur la dissolution des particules de silice.

L'internalisation et la toxicité subséquente dépendent des caractéristiques des particules

Nous avons observé une internalisation dans les NHDF de toutes les nanoparticules étudiées, positives ou négatives, entre 10 et 200 nm de diamètre. Quelles que soient les caractéristiques des particules, leur internalisation est un processus d'endocytose active, majoritairement par voie clathrine. Par ailleurs, il semble que les cellules soient capables d'internaliser en l'état des agrégats de particules présents à proximité de la membrane. La viabilité cellulaire n'est perturbée que pour les particules de 10 nm de diamètre, ce résultat est la conséquence d'un nombre de particules plus important à concentration massique constante et la toxicité n'est plus observée lorsqu'on se ramène à une dose en nombre de particules identique. Pour les autres particules testées, les cellules présentent une période initiale de stress rapidement résorbée et ont une activité métabolique comparable aux cellules témoins sur des temps d'étude allant jusqu'à deux semaines après les 7 jours d'exposition aux nanoparticules. Par ailleurs, seules les particules négatives de 10 nm de diamètre à forte concentration présentent une certaine génotoxicité.

Ces résultats montrent que lors d'une exposition longue (7 jours consécutifs) à une concentration élevée (0,6 mg/mL) en nanoparticules de diamètre supérieur à 60 nm, les cellules maintiennent une activité métabolique comparable aux cellules non exposées aux nanoparticules, résultat encourageant pour les applications bio-médicales. Par contre, ils soulignent que les questions de toxicité sont liées au nombre de nanoparticules et pas uniquement à la concentration massique.

A long terme, les nanoparticules de silice subissent une dissolution intracellulaire

Un résultat intéressant et encore peu décrit que nous avons pu mettre en évidence est la dissolution intracellulaire à long terme des nanoparticules de silice internalisées,

parallèlement à leur exocytose. En effet, lorsque la suspension de nanoparticules est remplacée par du milieu, on observe une libération progressive des particules et de leur produit de dissolution. Cette libération est beaucoup plus lente que l'internalisation et une partie des particules reste piégée dans les cellules une semaine après le changement de milieu.

Ce phénomène pourrait être exploité pour la libération intracellulaire de principes actifs, sous réserve de mieux le comprendre et le contrôler. Il serait intéressant de savoir combien de temps mettent les cellules à excréter totalement, si elles en sont capables, les particules ou leur produit de dissolution et de suivre cette cinétique sur un temps plus long que 7 jours. Par ailleurs, le temps d'exposition pouvant perturber fortement les cinétiques d'exocytose ainsi que la quantité de particules excrétées par les cellules, il faudrait observer ces phénomènes pour des temps d'exposition plus courts, rencontrés dans certaines des applications envisagées.

La diffusion et la dissolution des particules dans un gel de collagène dépendent des caractéristiques des particules

Nous avons montré que les particules de silice, positives ou négatives, de diamètre compris entre 10 et 200 nm, sont capables de traverser une matrice de collagène de 2 mm d'épaisseur, utilisée comme modèle du derme. Les caractéristiques physico-chimiques des particules, la concentration en collagène ou encore la présence de cellules sont autant de paramètres qui modifient la cinétique et l'importance de la diffusion des particules dans ces matériaux. Par ailleurs, il faut tenir compte dans ce système de l'adsorption des nanoparticules sur les fibres de collagène, phénomène influencé par la taille et la charge de surface des particules. Nous avons ainsi observé que les particules les plus petites diffusent en quantité plus importante, avec une faible modification de cinétique. Les coefficients de diffusion peuvent être estimés grâce à la simulation numérique de la diffusion dans le système d'étude. Le coefficient de diffusion des particules dans une matrice est lié à la concentration en collagène : pour des concentrations en collagène faibles, on peut établir une loi de type $D = D_0 * (1 - \alpha C_{collagène}^V)$. Par contre, comme dans le milieu de culture, les particules les plus petites se dissolvent moins vite et les particules initialement négatives se dissolvent moins.

Afin d'affiner notre compréhension de l'influence de la taille des particules et de la concentration en collagène sur la diffusion des particules ainsi que de la contribution de l'adsorption et de la dissolution, l'étude par simulation numérique devra être poussée plus

loin. Ces résultats permettront éventuellement d'optimiser le développement d'implants à base de collagène et nanoparticules de silice.

Les cellules immobilisées dans une matrice de collagène sont capables d'internaliser des nanoparticules de silice lors de leur diffusion

L'immobilisation des cellules dans une matrice de collagène ralentit la cinétique d'endocytose des nanoparticules, sans pour autant l'empêcher, et modifie la toxicité subséquente. En effet, les particules de 10 nm de diamètre, qui se révèlent toxiques en culture 2D, perturbent peu l'activité métabolique des cellules immobilisées dans les matrices de collagène. L'environnement tridimensionnel des cellules semble donc jouer un rôle en limitant la concentration effective aux abords des cellules (adsorption des particules, dilution dans la matrice, apport progressif par diffusion). Ces conditions sont plus proches de la réalité de l'exposition par voie cutanée et pourraient donc être utilisées pour l'évaluation et l'optimisation des nanoparticules utilisant cette voie d'accès.

Des matériaux composites collagène-silice homogènes et bio-compatibles peuvent être formés

L'ajout de silice, sous forme de particules ou de silicates, modifie les propriétés mécaniques des gels de collagène sans effet néfaste pour les cellules qui sont capables de proliférer et migrer dans ces matériaux. En utilisant les résultats de l'étude de diffusion, il serait possible de tester des conditions (caractéristiques des particules et concentration en collagène) qui permettraient d'obtenir des matériaux biocompatibles collagène-silice libérant progressivement les particules de silice et leur contenu.

Des nanoparticules de silice sensibles à un environnement réducteur peuvent être synthétisées

Dans le but d'obtenir des particules "bio-fragmentables", nous avons synthétisé des particules incorporant une fonction disulfure, avec un rapport massique S/Si allant de 0 à 19%, sensibles à l'environnement réducteur rencontré lors de l'internalisation des particules. Nous avons montré que le protocole de synthèse utilisé permet d'obtenir une répartition de cette fonction disulfure en surface mais aussi dans des poches réparties dans le cœur des particules. Par ailleurs, les tests en milieu réducteur hors des cellules montrent que les ponts disulfures introduits peuvent être réduits par du DTT et que ce phénomène est lent et progressif.

L'incorporation de ponts disulfures dans les particules de silice modifie leur comportement en présence de cellules.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence que l'incorporation de fonction disulfure dans les particules altère leur comportement intracellulaire sans apporter de toxicité. Les particules contenant des ponts disulfures sont internalisées dans les NHDF mais en nombre d'autant plus restreint que la quantité de disulfure est importante. L'incorporation de disulfure semble moduler l'exocytose/dissolution des particules. On observe rapidement la formation intracellulaire de structure de type cœur-coquille, résultat probable de la dissolution des zones de cœur moins condensées (par exemple au niveau des poches de disulfure). De plus, on constate que ces particules mènent à la formation de structures internes multi-lamellaires, formation d'autant plus lente que la quantité de disulfure dans les particules est importante, ce qui résulte probablement de la silicification des lysosomes lors de la dissolution intracellulaire des particules. Enfin, nous avons testé la libération intracellulaire d'un marqueur fluorescent encapsulé dans les particules de silice. Les résultats préliminaires obtenus sont encourageants et semblent indiquer que l'introduction de ponts disulfures peut modifier le temps de résidence des particules dans les cellules.

Ces résultats indiquent qu'il est possible de développer des particules de silice dont le devenir intracellulaire est modulé par l'introduction de fonctions sensibles à l'environnement rencontré lors de l'endocytose, comme des ponts disulfures. Le test avec un marqueur fluorescent semblant prometteur, il serait intéressant d'étudier la libération de molécules d'intérêt et d'analyser plus en détail l'influence du taux de disulfure sur le comportement intracellulaire des particules.

Bibliographie

- Absher M., Mortara M., **1980**, *Effect of silica on the proliferative behavior of human lung fibroblasts*, *In vitro*, 16, 371-376
- Adler A.F., Leong K.W., **2010**, *Emerging links between surface nanotechnology and endocytosis: impact on nonviral gene delivery*, *Nano Today*, 5, 553-569
- Akhtar M.J., Ahamed M., Kumar S., Siddiqui H., Patil G., Ashquin M., Ahmad I., **2010**, *Nanotoxicity of pure silica mediated through oxidant generation rather than glutathione depletion in human lung epithelial cells*, *Toxicology*, 276, 95-102
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., **2002**, *Molecular biology of the cell*
- Allouche J., Boissiere M., H elary C. , Livage J. , Coradin T., **2006**, *Biomimetic core-shell gelatine/silica nanoparticles: a new example of biopolymer-based nanocomposites*, *J. Mater. Chem.*, 16, 3120-3125
- Alvarez-Rom an R., Naik A., Kalia Y.N., Guy R.H., Fessi H., **2004**, *Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles*, *J. Control. Release*, 99, 53-62
- Anselmann R., *Nanoparticles and nanolayers in commercial applications*, **2001**, *J. Nanoparticle Res.*, 3, 329-336
- Arriagada F.J., Osseo-Asare K., **1995**, *Synthesis of nanosize silica in a nonionic water-in-oil micro-emulsion : effects of the water/surfactant molar ratio and ammonia concentration*, *J. Colloid Interface Sci.*, 211, 210-220
- Arunachalam B., Phan U.T., Geuze H.J., Cresswell P., **2000**, *Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT)*, *PNAS*, 97, 745-750
- Badley R.D., Ford W.T., McEnroe F.J., Assink R.A., **1990**, *Surface modification of colloidal silica*, *Langmuir*, 6, 792-801
- Bagwe R.P., Hilliard L.R., Tan W.H., **2006**, *Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding*, *Langmuir*, 22, 4357-4362
- Barb e C., Bartlett J., Kong L., Finnie K., Lin H.Q., Larkin M., Calleja S., Bush A., Calleja G., **2004**, *Silica particles: A novel drug-delivery system*, *Adv. Mater.*, 16, 1-8

- Barnes C.A., Elsaesser A., Arkusz J., Smok A., Palus J., Lesniak A., Salvati A., Hanrahan J.P., de Jong W.H., Dziubaltowska E., Stepnik M., Rydzynski K., McKerr G., Lynch I., Dawson K.A., Howard C.V., **2008**, *Reproducible Comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity*, Nano Letters, 8, 3069-3074
- Bauhuber S., Hozsa C., Breunig M., Goepferich A., **2009**, *Delivery of Nucleic Acids via Disulfide-Based Carrier Systems*, Adv. Mater., 21, 1-21
- Bell E., Ivarsson B., Merrill C., **1979**, *Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro*, PNAS, 76, 1274-1278
- Bogush G.H., Tracy M.A., Zukoski I.V., **1988**, *Preparation of monodisperse silica particles : control of size and mass fraction*, J. Non-Cryst. Solids, 104, 95-106
- Boissiere M., Meadows P.J., Brayner R., Héлары C., Livage J., Coradin T., **2006**, *Turning biopolymer particles into hybrid capsules: the example of silica/alginate nanocomposites*, J. Mater. Chem., 16, 1178-1182
- Borm P., Klaessig F.C., Landry T.D., Moudgil B., Pauluhn J., Thomas K., Trottier R., Wood S., **2006**, *Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part V: Role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles*, Toxicol. Sci., 90, 23-32
- Burns A., Ow H., Wiesner U., **2006**, *Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards "Lab on a Particle" architectures for nanobiotechnology*, Chem. Soc. Rev., 35, 1028-1042
- Cauda V., Argyo C., Bein T., **2010**, *Impact of different PEGylation patterns on the long-term bio-stability of colloidal mesoporous silica nanoparticles*, J. Mater. Chem., 20, 8693-8699
- Cauda V., Schlossbauer A., Bein T., **2010**, *Bio-degradation study of colloidal mesoporous silica nanoparticles: Effect of surface functionalization with organo-silanes and poly(ethylene glycol)*, Microporous and Mesoporous Mater., 132, 60-71
- Chang J-S., Chang K.L.B., Hwang D-F., Kong Z-L., **2007**, *In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line*, Environ Sci Technol, 41, 2064-2068
- Chen M., van Mikecz A., **2005**, *Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles*, Experimental Cell Res., 305, 51-62
- Chen J-F., Ding H-M., Wang J-X., Shao L., **2004**, *Preparation and characterization of porous hollow silica nanoparticles for drug delivery application*, Biomaterials, 25, 723-727
- Cheng S-H., Lee C-H., Chen M-C., Souris J.S., Tseng F-G., Yang C-S., Mou C-Y., Chen C-T., Lo L-W., **2010**, *Tri-functionalization of mesoporous silica nanoparticles for comprehensive cancer theranostics-the trio of imaging, targeting and therapy*, J. Mater. Chem., 20, 6149-6157
- Chung T-H., Wu S-H., Yao M., Lu C-W., Lin Y-S., Hung Y., Mou C-Y., Chen Y-C., Huang

- D-M., **2007**, *The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells*, Biomaterials, 28, 2959-2966
- Collins A.R., **2004**, *The comet assay for DNA damage and repair - Principles, applications, and limitations*, Molecular Biotechnology, 26, 249-261
- Couleaud P., Morosini V., Frochot C., Richeter S., Raehm L., Durand J-O., **2010**, *Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications*, Nanoscale, 2, 1083-1095
- Crosera M., Bovenzi M., Maina G., Adami G., Zanette C., Florio C., Larese F.F., **2009**, *Nanoparticle dermal absorption and toxicity : a review of the literature*, Int. Arch. Occup. Environ. Health, 82, 1043-1055
- Depasse J., **1977**, *Comparison between two hypothesis about the physicochemical basis of the toxicity of silica*, J. Colloid Interface Sci., 60, 414-415
- Desimone M.F., Héлары C., Rietveld B., Mosser G., Giraud-Guille M-M., Livage J., Coradin T., **2010**, *Silica-collagen bionanocomposites as three-dimensional scaffolds for fibroblast immobilization*, Acta Biomaterialia, 6, 3998-4004
- Desimone M.F., Héлары C., Quignard S., Rietveld I.B., Bataille I., Copello G.J., Mosser G., Giraud-Guille M-M., Livage J., Meddahi-Pellé A., Coradin T., **2011**, *In vitro studies and preliminary in vivo evaluation of silicified concentrated collagen hydrogels*, Applied Mater. Interface, 3, 3831-3838
- Ding D., Zhu Z., Li R., Li X., Wu W., Jiang X., Liu B., **2011**, *Nanospheres-incorporated implantable hydrogel as a trans-tissue drug delivery system*, ACS Nano, 5, 2520-2534
- Drescher D., Orts-Gil G., Laube G., Natte K., Veh R.W., Österle W., Kneipp J., **2011**, *Toxicity of amorphous silica nanoparticles on eukaryotic cell model is determined by particle agglomeration and serum protein adsorption effects*, Anal. Bioanal. Chem., 400, 1367-1373
- ECETOC JACC report No. 51, **2006**, *Synthetic amorphous silica*,
- Ehrlich H., Demadis K.D., Pokrovsky O.S., Koutsoukos P.G., **2010**, *Modern Views on Desilicification : Biosilica and Abiotic Silica Dissolution in Natural and Artificial Environments*, Chem Rev, 110, 4656-4689
- Erdogdu G., Hasirci V., **1998**, *An overview of the role of mineral solubility in silicosis and asbestosis*, Environ. Res., 78, 38-42
- Faraji A.H., Wipf P., **2009**, *Nanoparticles in cellular drug delivery*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17, 2950-2962
- Farahmand S., Maibach H.I., **2010**, *Transdermal drug pharmacokinetics in man: Interindividual variability and partial prediction*, International J. Pharmaceutics, 367, 249-250

- Finnie K.S., Waller D.J., Perret F.L., Krause-Heuer A.M., Lin H.Q., Hanna J.V., Barbé C.J., **2009**, *Biodegradability of sol-gel silica microparticles for drug delivery*, J. Sol-Gel Science and Technology, 49, 12-18
- Finnie K.S., Jacques D.A., McGann M.J., Blackford M.G., Barbé C.J., **2006**, *Encapsulation and controlled release of biomolécules from silica microparticles*, J. Mater. Chem., 16, 4494-4498
- Fouilloux S., Daillant J., Thill A., **2012**, *Single step synthesis of 5-30 nm monodisperse silica nanoparticles : important experimental parameters and modeling*, Colloids and surfaces A, Physicolchem. Eng. Aspects, 393, 122-127
- Fouilloux S., Désert A., Taché O., Spalla O., Daillant J., Thill A., **2010**, *SAXS exploration of the synthesis of ultra monodisperse silica nanoparticles and quantitative nucléation growth modeling*, J. Colloid Interface Sci., 346, 79-86
- Fuller J.E., Zugates G.T., Ferreira L.S., Ow H.S., Nguyen N.N., Wiesner U.B., Langer R.S., **2008**, *Intracellular delivery of core-shell fluorescent silica nanoparticles*, Biomaterials, 29, 1526-1532
- Gan L.M., Zhang K., Chew C.H., **1996**, *Preparation of silica nanoparticles from sodium orthosilicate in inverse microemulsion*, Colloid Surf. A, 110, 199-206
- Gong C., Tao G., Yang L., Liu J., Liu Q., Zhuang Z., **2010**, *SiO₂ nanoparticles induce global genomic hypomethylation in HaCaT cells*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 397, 397-400
- Goodman T.T., Ng C.P., Pun S.H., **2008**, *3-D Tissue Culture Systems for the Evaluation and Optimization of Nanoparticle-Based Drug Carriers*, Bioconjugate Chem., 19, 1951-1959
- Gu F.X., Karnik R., Wang A.Z., Alexis F., Levy-Nissenbaum E., Hong S., Langer R.S., Farokhzad O.C., **2007**, *Targeted nanoparticles for cancer therapy*, Nano Today, 2, 14-21
- Hagens W.I., Oomen A.G., de Jong W.H., Cassee F.R., Sips A.J.A.M., **2007**, *What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?* Regulatory Toxicology and Pharmacology, 49, 217-229
- Hamid R., Rotshteyn Y., Rabadi L., Parikh R., Bullock P., **2004**, *Comparison of alamar blue and MTT assays for High through-put screening*, Toxicology in vitro, 18, 703-710
- Hartlen K.D., Athanasopoulos A.P.T., Kitaev V., **2008**, *Facile preparation of highly monodisperse small silica spheres (15 to > 200 nm) suitable for colloidal templating and formation of ordered arrays*, Langmuir, 24, 1714-1720
- He C., Hu Y., Yin L., Tang C., Yin C., **2010**, *Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles*, Biomaterials, 31, 3657-3666
- Helary C., Bataille I., Abed A., Illoul C., Anglo A., Louedec L., Letourneur D., Meddahi-Pelle A., Giraud-Guille M-M., **2010**, *Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes*, Biomaterials, 31, 481-490

- Hervé-Bazin B., **2007**, Les nanoparticules : un enjeu pour la santé au travail ?
- Hillaireau H., Couvreur P., **2009**, *Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery*, Cell Mol Life Sci, 66, 2873-2896
- Hu L., Mao Z., Zhang Y., Gao C., **2011**, *Influences of size of silica particles on the cellular endocytosis, exocytosis and cell activity of hepG2 cells*, J. nanoscience lett., 1, 1-16
- Huang X., Teng X., Chen D., Tang F., He J., **2010**, *The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function*, Biomaterials, 31, 438-448
- Hudson S.P., Padera R.F., Langer R., Kohane D.S., **2008**, *The biocompatibility of mesoporous silicates*, Biomaterials, 29, 4045-4055
- Hughes G.A., **2005**, *Nanostructures-mediated drug delivery*, Nanomedicine : nanotechnology, biology and medicine, 1, 22-30
- Iler R.K., **1979**, *The chemistry of silica : solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry*
- Imhof A., Megens M., Engelberts J.J., de Lang D.T.N., Sprik R., Vos W.L., **1999**, *Spectroscopy of fluorescein (FITC) dyed colloidal silica spheres*, J. Phys.Chem. B, 103, 1408-1415
- Iskandar F., Gradon L., Okuyama K., **2003**, *Control of the morphology of nanostructured particles prepared by the spray drying of a nanoparticle sol*, J. Colloid Interface Sci., 265, 296-303
- Izquierdo-Berba I., Colilla M., Manzano M., Vallet-Regí M., **2010**, *In vitro stability of SBA-15 under physiological conditions*, Microporous and mesoporous mater., 132, 442-452
- Jiang X., Dausend J., Hafner M., Musyanovych A., Röcker C., Landfester K., Mailänder V., Nienhaus G. U., **2010**, *Specific effects of surface amines on polystyrène nanoparticles in their interactions with mesenchymal stem cells*, Biomacromol., 11, 748-753
- Jin H., Heller D.A., Sharma R., Strano M.S., **2009**, *Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles*, ACS Nano, 3, 149-158
- Jin Y., Lohstreter S., Pierce D.T., Parisien J., Wu M., Hall C., Zhao J.X., **2008**, *Silica nanoparticles with continuously tunable sizes: Synthesis and size effects on cellular contrast Imaging*, Chem. Mater., 20, 4411-4419
- Jin Y., Kannan S., Wu M., Zhao J.X., **2007**, *Toxicity of luminescent silica nanoparticles to living cells*, Chem Res Toxicol, 20, 1126-1133
- Kim H., Kim S., Park C., Lee H., Park H.J., Kim C., **2010**, *Glutathione-induced intracellular release of guests from mesoporous silica nanocontainers with cyclodextrin gatekeepers*, Adv. Mater., 22, 4280-4283

- Kim S., Ohulchansky T.Y., Pudavar H.E., Pandey R.K., Prasad P.N., **2007**, *Organically modified silica nanoparticles co-encapsulating photosensitizing drug and agrégation-enhanced two-photon absorbing fluorescent dye aggregates for two-photon photodynamic therapy*, J. Am. Chem. Soc., 29, 2669-2675
- Kohli A.K., Alpar H.O., **2004**, *Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery : effect of particle size and charge*, Int. J. Pharm., 275, 13-17
- Kumar R., Roy I., Ohulchanskyy T.Y., Vathy L.A., Bergey E.J., Sajjad M., Prasad P.N., **2010**, *In vivo biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles*, ACS nano, 4, 699-708
- Kumar R., Roy I., Hulchanskyy T.Y., Goswami L.N., Bonoiu A.C., Bergey E.J., Trampusch K.M., Maitra A., Prasad P.N., **2008**, *Covalently dye-linked, surface-controlled, and bioconjugated organically modified silica nanoparticles as targeted probes for optical Imaging*, ACS Nano, 2, 449-456
- Lai C.Y., Trewyn B.G., Jęftinija D.M., Jęftinija K., Xu S., Jęftinija S., Lin V.S-Y., **2007**, *A mesoporous silica nanosphere-based carrier system with chemically removable CdS nanoparticle caps for stimuli-responsive controlled released of neurotransmitters and drug molecules*, J. Am. Chem. Soc., 125, 4451-4459
- Larese F.F., D'Agostin F., Crosera M., Adami G., Renzi N., Bovenzi M., Maina G., **2009**, *Human skin penetration of silver particles through intact and damaged skin*, Toxicology, 255, 33-337
- Larsericdotter H., Oscarsson S., Buijs J., **2005**, *Structure, stability, and orientation of BSA adsorbed to silica*, J. Colloid Interface Sci., 289, 26-35
- Li M., Al-Jamal K.T., Kostarelos K., Reineke J., **2010**, *Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles*, ACS nano, 4, 6303-6317
- Li Y., Asadi A., Monroe M.R., Douglas E.P., **2009**, *pH effects on collagen fibrillogenesis in vitro: Electrostatic interactions and phosphate binding*, Mater. Sci. & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems, 29, 1643-1649
- Li Z., Wen L., Shao L., Chen J., **2004**, *Fabrication of porous hollow silica nanoparticles and their applications in drug release control*, J. Control. Release, 98, 245-254
- Lin Y.S., Hurley K.R., Haynes C.L., **2012**, *Critical considerations in the biomédical use of mesoporous silica nanoparticles*, J. Phys. Chem., 3, 364-374
- Lin W., Huang Y-W., Zhou X-D., Ma Y., **2006**, *In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells*, Toxicology and Applied Pharmacology, 217, 252-259
- Linthicum D.S., **2001**, *Ultrastructural effects of silicic acid on primary lung fibroblasts in tissue culture*, Tissue & Cell, 33, 514-523
- Lison D., Thomassen L.C.J., Rabolli V., Gonzalez L., Napierska D., Seo J.W., Kirsch-

- Volders M., Hoet P., Kirschhock C.E.A., Martens J.A., **2008**, *Nominal and effective dosimetry of silica nanoparticles in cytotoxicity assays*, Toxicological Sci., 104, 155-162
- Liu X., Sun J., **2010**, *Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress via JNK/P53 and NF- κ B pathways*, Biomaterials, 31, 8198-8209
- Lord M.S., Cousins B.G., Doherty P.J., Whitelock J.M., Simmons A., Williams R.L., Milthorpe B.K., **2006**, *The effect of silica nanoparticulate coatings on serum protein adsorption and cellular response*, Biomaterials, 27, 4856-4862
- Lu J., Liong M., Li Z., Zink J.I., Tamanoi F., **2010**, *Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals*, Small, 6, 1794-1805
- Lu J., Liong M., Fink Z.I., Tamanoi F., **2007**, *Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drug*, Small, 3, 1341-1346
- Lynch I., **2007**, *Are there generic mechanisms governing interactions between nanoparticles and cells? Epitope mapping the outer layer of the protein-material interface*, Physica A-Statistical Mechanics and Its Applications, 373, 511-520
- Mailaender V., Landfester K., **2009**, *Interaction of Nanoparticles with Cells*, 10, 2379-2400
- Mao Z., Wan L., Hu L., Ma L., Gao C., **2010**, *Tat peptide mediated cellular uptake of SiO₂ submicron particles*, Colloids Surfaces B-Biointerfaces, 75, 432-440
- Marieb E.N., **1993**, *Anatomie et physiologie humaines*
- Marro D., Guy R.H., Delgado-Charro M.B., **2001**, *Characterization of the iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin*, J. Control. Release, 70, 213-217
- Massiot D., Fayon F., Capron M., King I., Le Calvé S., Alonso B., Durand J.O., Bujoli B., Gan Z., Hoatson G., **2002**, *Modelling one and two-dimensional solid-state NMR spectra*, Magn. Reson. Chem., 40, 70-76
- Mellman I., **1996**, *Endocytosis and molecular sorting*, Annual Rev. Cell Developmental Biology, 12, 575-625
- Monteiro-Riviere N.A., Riviere J.E., **2009**, *Interaction of nanomaterials with skin: Aspects of absorption and biodistribution*, Nanotoxicology, 3, 188-193
- Monteiro-Riviere N.A., Zhang L.W., **2009**, *Assessment of quantum dot penetration into skin in different species under different mechanical actions*, Nanomaterials : risks and benefits, 43-52
- Moros M., Hernáez B., Garet E., Dias J.T., Sáez B., Grazú V., González-Fernández A., Alonso C., de la Fuente J. M., **2012**, *Monosaccharides versus PEG-functionalized NPs : influence in the cellular uptake*, ACS nano, 6, 1565-1577

- Nabeshi H., Tomoaki Y., Keigo M., Yasutaro N., Kazuhiko M., Akihiro A., Masaaki I., Saeko T., Sayuri K., Toshiro H., Takanori A., Takuya Y., Kohei Y., Tokuyuki Y., Kazuya N., Yasuhiro A., Yasuo Y., Haruhiko K., Takayoshi I., Norio I., Shinsaku N., Tadanori M., Shin-Ichi T., Yasuo T., **2011**, *Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application* Biomaterials, 32, 2713-2724
- Nanoderm, **2007**, *Quality of skin as a barrier to ultra-fine particles*
- Napierska D., Thomassen L.C.J., Lison D., Martens J.A., Hoet P.H., **2010**, *The nanosilica hazard: another variable entity*, Particle Fibre Tox., 7, 1-32
- Nelson S.M., Mahmoud T., Beaux M., Shapiro P., McIlroy D.N., Stenkamp D.L., **2010**, *Toxic and teratogenic silica nanowires in developing vertebrate embryos*, Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine, 6, 93-102
- Nyffenegger R., Quellet C., Ricka J., **1993**, *Synthesis of fluorescent monodisperse colloidal silica particles*, J. Colloid Interface Sci., 159, 150-157
- Park M.V.D.Z., Verharen H.W., Zwart E., Hernandez L.G., van Benthem J., Elsaesser A., Barnes C., McKerr G., Howard C.V., Salvati A., Lynch I., Dawson K.A., De Jong W.H., **2011**, *Genotoxicity evaluation of amorphous silica nanoparticles of different sizes using the micronucleus and the plasmid lacZ gene mutation assay*, Nanotoxicology, 5, 168-181
- Patwardhan S.V., Tilburey G.E., Perry C., **2011**, *Interactions of amines with silicon species in undersaturated solutions leads to dissolution and/or precipitation of silica*, Langmuir, 27, 15135-15145
- Phillies G.D.J., **1988**, *The hydrodynamic scaling model for polymer self-diffusion*, J. Phys. Chem., 93, 5029-5039
- Pinho S.L.C., Faneca H., Geraldes C.F.G.C., Delville M-H., Carlos L.D., Rocha J., **2012**, *Lanthanide-DTPA grafted silica nanoparticles as bimodal-imaging contrast agents*, Biomaterials, 33, 925-935
- V. Rabolli, L.C.J. Thomassen, C. Princen, D. Napierska, L. Gonzalez, M. Kirsch-Volders, P.H. Hoet, F. Huaux, C.E.A. Kirschhock J.A. Martens, D. Lison, *Influence of size, surface area and microporosity on the in vitro cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles in different cell types*, Nanotoxicology, **2010**, 4, 307-318
- Ramanujan S., Pluen A., McKee T.D., Brown E.B., Boucher Y., Jain R.K., **2002**, *Diffusion and convection in collagen gels: Implications for transport in the tumor interstitium*, Biophys. J., 83, 1650-1660
- Rao K.S., El-Hami K., Kodaki T., Matsushige K., **2005**, *A novel method for the synthesis of silica nanoparticles*, J. Colloid Interface Sci., 289, 125-131
- Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D., **2004**, *Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis*, Biochem. J., 377, 159-169

- Rezwan K., Studart A.R., Voros J., Gauckler L.J., **2005**, *Change of ζ potential of biocompatible colloidal oxide particles upon adsorption of bovine serum albumin and lysozyme*, J. Phys. Chem. B, 109, 14469-14474
- Rosenholm J.M., Sahlgren C., Linden M., **2010**, *Towards multifunctional, targeted drug delivery systems using mesoporous silica nanoparticles – opportunities & challenges*, Nanoscale, 2, 1870-1883
- Rosenholm J.M., Meinander A., Peuhu E., Niemi R., Eriksson J.E., Sahlgren C., Lindén M., **2009**, *Targeting of porous hybrid silica nanoparticles to cancer cells*, ACS nano, 3, 197-206
- Rouse J.G., Yang J., Ryman-Rasmussen J.P., Barron A.R., Monteiro-Riviere N.A., **2007**, *Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin*, Nano Lett., 7, 155-160
- Roy S., Woolley R., MacCraith B.D., McDonagh C., **2010**, *Fluorescence Lifetime Analysis and Fluorescence Correlation Spectroscopy Elucidate the Internal Architecture of Fluorescent Silica Nanoparticles*, Langmuir, 26, 13741-13746
- Ruizendaal L., Bhattacharjee S., Pournazari K., Rosso-Vasic M., de Haan L.H.J., Alink G.M., Marcelis A.T.M., Zuilhof H., **2009**, *Synthesis and cytotoxicity of silicon nanoparticles with covalently attached organic monolayers*, Nanotoxicology, 3, 339-347
- Saito G., Swanson J.A., Lee K-D., **2003**, *Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities*, Adv Drug Deliv Rev, 55, 199-215
- Santra S., Bagwe R.P., Dutta D., Stanley J.T., Walter G.A., Tan W., Moudgil B.M., Mericle R.A., **2005**, *Synthesis and characterization of fluorescent, radio-opaque, and paramagnetic silica nanoparticles for multimodal bioimaging applications*, Adv. Mater., 17, 2165-2169
- Santra S., Yang H., Dutta D., Stanley J.T., Holloway P.H., Tan W., Moudgil B.M., Mericle R.A., **2004**, *TAT conjugated, FITC doped silica nanoparticles for bioimaging applications*, Chem. Comm., 24, 2810-2811
- Sauer A.M., Schlossbauer A., Ruthardt N., Cauda V., Bein T., Bräuchle C., **2010**, *Role of Endosomal Escape for Disulfide-Based Drug Delivery from Colloidal Mesoporous Silica Evaluated by Live-Cell Imaging*, Nano Lett, 10, 3684-3691
- Schaefer H., Watts F., Brod J., Illel B., **1990**, *Follicular penetration, Prediction of percutaneous penetration. Methods, measurements, modeling*, 163–732
- Shapero K., Fenaroli F., Lynch I., Cottell D.C., Salvati A., Dawson K.A., **2011**, *Time and space resolved uptake study of silica nanoparticles by human cells*, Mol. BioSyst., 7, 371-378
- Shi J., Karlsson H.L., Johansson K., Gogvadze V., Xiao L., Li J., Burks T., Garcia-Bennett A., Uheida A., Muhammed M., Mathur S., Morgenstern R., Kagan V.E., Fadeel B., **2012**,

- Microsomal glutathionne transférase 1 protects against toxicity induced by silica nanoparticles but not by zinc oxide nanoparticles*, ACS nano, 6, 1925-1938
- Shi J., Votruba A.R., Farokhzad O.C., Langer R., **2010**, *Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications*, Nano Lett, 10, 3223-3230
- Sjöberg S., **1996**, *Silica in aqueous environments*, J. Non-crystalline solids, 196, 51-57
- Slowing I.I., Vivero-Escoto J.L., Zhao Y., Kandel K., Peerapatdit C., Trewyn B.G., Lin V.S-Y., **2011**, *Exocytosis of Mesoporous Silica Nanoparticles from Mammalian Cells: From Asymmetric Cell-to-Cell Transfer to Protein Harvesting*, Small, 7, 1526-1532
- Slowing I.I., Vivero-Escoto J.L., Wu C.W., Lin V.S-Y., **2008**, *Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers*, Adv. Drug Deliv. Rev., 60, 1278-1288
- Slowing I.I., Trewyn B.G., Lin V.S-Y., **2006**, *Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells*, J Am Chem Soc, 128, 14792-14793
- Sonavane G., Tomoda K., Sano A., Ohshima H., Terada H., Makino K., **2008**, *In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size*, Colloids Surfaces B-Biointerfaces, 65, 1-10
- Souris J.S., Lee C-H., Cheng S-H., Chen C-T., Yang C-S., Ho J.A., Mou C-Y., Lo L-W., **2010**, *Surface charge-mediated rapid hepatobiliary excretion of mesoporous silica nanoparticles*, Biomaterials, 31, 5564-5574
- Speit G., Hartmann A., **2005**, *The comet assay : a sensitive genotoxicity test for the détection of DNA damage*, Methods in molecular biology, 291, 85-95
- Stayton I., Winiarz J., Shannon K., Ma Y., **2009**, *Study of uptake and loss of silica nanoparticles in living human lung epithelial cells at single cell level*, Anal. Bioanal. Chem., 394, 1595-1608
- Stöber W., Fink A., Bohn E., **1968**, *Controlled growth of monodisperse silica sphères in the micron size range*, J. Colloid Interface Sci., 26, 62-69
- Stracke F., Weiss B., Lehr C-M., Koenig K., Schaefer U.F., Schneider M., **2006**, *Multiphoton microscopy for the investigation of dermal penetration of nanoparticle-borne drugs*, J. Investigative Dermatology, 126, 2224-2233
- Sun W., Fang N., Trewyn B.G., Tsunoda M., Slowing I.I., Lin V.S-Y., Yeung E.S., **2008**, *Endocytosis of a single mesoporous silica nanoparticle into a human lung cancer cell observed by differential interference contrast microscopy*, Anal. Bioanal. Chem., 391, 2119-2125
- Tan W., Wang K., He X., Zhao X.J., Drake T., Wang L., Bagwe R.P., **2004**, *Bionanotechnology based on silica nanoparticles*, Med. Res. Rev., 24, 621-638

- Taylor-Pashow K.M.L., Della Rocca J., Huxford R.C., Lin W., **2010**, *Hybrid nanomaterials for biomedical applications*, Chem. Comm., 46, 5832-5849
- Thayer L.A., **1930**, *Colorimetric determination of silica in the presence of phosphates and iron*, Anal. Ed., 2, 276-283
- Thomassen L.C.J., Aerts A., Rabolli V., Lison D., Gonzalez L., Kirsch-Volders M., Napierska D., Hoet P.H., Kirschhock C.E.A., Martens J.A., **2010**, *Synthesis and Characterization of Stable Monodisperse Silica Nanoparticle Sols for in Vitro Cytotoxicity Testing*, Langmuir, 26, 328-335
- Trewyn B.G., Nieweg J.A., Zhao Y., Lin V.S-Y., **2008**, *Biocompatible mesoporous silica nanoparticles with different morphologies for animal cell membrane, penetration*, Chem. Engineering J., 137, 23-29
- Unfried K., Albrecht C., Klotz L-O., Von Mikecz A., Grether-Beck S., Schins R.P.F., **2007**, *Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms*, Nanotoxicology, 1, 52-71
- Vácha R., Martinez-Veracoechea F.J., Frenkel D., **2011**, *Receptor-mediated endocytosis of nanoparticles of various shapes*, Nano letters, 11, 5391-5395
- Vallet-Regi M., **2006**, *Ordered mesoporous materials in the context of drug delivery systems and bone tissue engineering*, Chem. Eur. J., 12, 5934-5943
- van Blaaderen A., Kentgens A.P.M., **1992**, *Particle morphology and chemical microstructure of colloidal silica spheres made from alkoxysilanes*, J. Non-crystalline solids, 149, 161-178
- van Blaaderen A., Vrij A., **1992**, *Synthesis and characterization of colloidal dispersions of fluorescent monodisperse silica spheres*, Langmuir, 8, 2921-2931
- van Blaaderen A., van Geest J., Vrij A., **1992**, *Monodisperse colloidal silica spheres from tetraalkoxysilanes : particle formation and growth mechanism*, J. Colloid Interface Sci., 154, 481-501
- van Schooneveld M.M., Vucic E., Koole R., Zhou Y., Stocks J., Cormode D.P., Tang C.Y., Gordon R.E., Nicolay K., Meijerink A., Fayad Z.A., Mulder W.J.M., **2008**, *Improved biocompatibility and pharmacokinetics of silica nanoparticles by means of a lipid coating : a multimodality investigation*, Nano letters, 8, 2517-2525
- Venugopal M.G., Ramshaw J.A.M., Braswell E., Zhu D., Brodsky B., **1994**, *Electrostatic interactions in collagen-like triple-helical peptides*, Biochem., 33, 7948-7956
- Vivero-Escoto J.L., Slowing I.I., Trewyn B.G., Lin V.S-Y., **2010**, *Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Controlled Drug Delivery*, Small, 16, 1952-1967
- Vogelsberger W., Seidel A., Rudakoff G., **1992**, *Solubility of silica gel in water*, J. Chem. Soc. Faraday Trans., 88, 473-476

- Vogt A., Combadiere B., Hadam S., Stieler K.M., Lademann J., Schaefer H., Autran B., Sterry W., Blume-Peytavi U., **2006**, *40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin*, *J. Investigative Dermatology*, 126, 1316-1322
- Voisin P., Ribot E.J., Miraux S., Bouzier-Sore A-K., Lahitte J-F., Bouchaud V., Mornet S., Thiaudière E., Franconi J-M., Raison L., Labrugère C., Delville M-H., **2007**, *Use of lanthanide-grafted inorganic nanoparticles as effective contrast agents for cellular uptake Imaging*, *Bioconjugate Chem.*, 18, 1053-1063
- Voytik-Harbin S.L., Brightman A.O., Waisner B., Lamar C.H., Badylack S., **1998**, *Application and evaluation of the alamar blue assay for cell growth and survival of fibroblasts*, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 34, 239-246
- Wallace A.F., Gibbs G.V., Dove P.M., **2010**, *Influence of Ion-Associated Water on the Hydrolysis of Si-O Bonded Interactions*, *J. Phys. Chem. A*, 114, 2534–2542
- Wang T., Bai J., Jiang X., Nienhaus G.U., **2012**, *Cellular uptake of nanoparticles by membrane penetration: a study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry*, *ACS nano*, 6, 1251-1259
- Wang L-S., Wu L-C., Lu S-Y., Chang L-L., Teng I-T., Yang C-M., Ho J-A., **2010**, *Biofunctionalized phospholipid-capped mesoporous silica nanoshuttles for targeted drug delivery: improved water suspensibility and decreased nonspecific protein binding*, *ACS nano*, 4, 4371-4379
- Wang F., Gao F., Lan M., Yuan H., Huang Y., Liu J., **2009**, *Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells*, *Tox. In vitro*, 23, 808-815
- Wang L., Zhao W., Tan W., **2008**, *Bioconjugated Silica Nanoparticles: Development and Applications*, *Nano Res.*, 1, 99-115
- Wang L., Tan W., **2006**, *Multicolor FRET silica nanoparticles by single wavelength excitation*, *Nano Letters*, 6, 84-88
- Wang L., Wang K., Santra S., Zhao X., Hilliard L.R., Smith J.E., Wu Y., Tan W., **2006**, *Watching silica nanoparticles glow in the biological world*, *Anal. Chem.*, 78, 647-654
- Wu J., Liu W., Xue C., Zhou S., Lan F., Bi L., Xu H., Yang X., Zeng F-D., **2009**, *Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure*, *Toxicol. Letters*, 191, 1-8
- Xie G., Sun J., Zhong G., Shi L., Zhang D., **2010**, *Biodistribution and toxicity of intravenously administered silica nanoparticles in mice*, *Arch Toxicol*, 84, 183-190
- Xu Z.P., Zeng Q.H., Lu G.Q., Yu A.B., **2006**, *Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery*, *Chem. Engineering Sci.*, 61, 1027-1040
- Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida

- T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y., Imazawa T., Aoshima H., Shishido K., Kawai Y., Mayumi T., Tsunoda S-I., Itoh N., Yoshikawa T., Yanagihara I., Saito S., Tsutsumi Y., **2011**, *Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice*, *Nature Nanotechnology*, 6, 321-328
- Yan Y., Johnston A.P.R., Dodds S.J., Kamphuis M.M.J., Ferguson C., Parton R.G., Nice E.C., Heath J.K., Caruso F., **2010**, *Uptake and intracellular fate of disulfide-bonded polymer hydrogel capsules for Doxorubicin delivery to colorectal cancer cells*, *ACS Nano*, 4, 2928-2936
- Yang Y., Coradin T., **2007**, *A green route to silica nanoparticles with tunable size and structure*, *Green Chem.*, 10, 183-190
- Yokoi T., Wakabayashi J., Otsuka Y., Fan W., Iwama M., Watanabe R., Aramaki K., Shimojima A., Tatsumi T., Okubo T., **2009**, *Mechanism of Formation of Uniform-Sized Silica Nanospheres Catalyzed by Basic Amino Acids*, *Chem. Mater.*, 21, 3719-3729
- Yu T., Greish K., McGill L.D., Ray A., Ghandehari H., **2012**, *Influence of geometry, porosity, and surface characteristics of silica nanoparticles on acute toxicity, their vasculature effect and tolerance threshold*, *ACS nano*, 6, 2289-2301
- Yu T., Malugin A., Ghandehari H., **2011**, *Impact of Silica Nanoparticle Design on Cellular Toxicity and Hemolytic Activity*, *ACS Nano*, 5, 5717-5728
- Yu K.O., Grabinski C.M., Schrand A.M., Murdock R.C., Wang W., Gu B., Schlager J.J., Hussain S.M., **2009**, *Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mouse keratinocytes*, *J. Nanopart. Res.*, 11, 15-24
- Yuan H., Gao F., Zhang Z., Miao L., Yu R., Zhao H., Lan M., **2010**, *Study on controllable preparation of silica nanoparticles with multi-sizes and their size-dependent cytotoxicity in pheochromocytoma cells and human embryonic kidney cells*, *J. Health Sci.*, 56, 632-640
- Yue T., Zhang X., **2012**, *Cooperative effect in receptor-mediated endocytosis of multiple nanoparticles*, *ACS nano*, 6, 196-205
- Zhang Y., Hu L., Yu D., Gao C., **2010**, *Influence of silica particle internalization on adhesion and migration of human dermal fibroblasts*, *Biomaterials*, 31, 8465-84

Liste des abréviations

APTES : AminoPropylTriEthoxySilane

BET : Brunauer, Emmett et Teller

BTSPD : Bis(TriethoxySilylPropyl)-Disulfide

CP-MAS : CrossPolarization-Magic Angle Spinning

DLS : Dynamic Light Scattering

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : DiMethylSulfOxide

DTT : DiThioThrétol

FITC : Fluorecéine IsoThioCyanate

HBSS : Hank's Buffered Salt Solution

ICP : Induced Coupled Plasma

MEB : Microscopie électronique à balayage

MET : Microscopie électronique en transmission

MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

NHDF : Normal Human Dermal Fibroblast

NP : Nanoparticule

PBS : Phosphate Buffer Saline

PFA : ParaFormAldehyde

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

TEOS : TetraEthylOrthoSiliate

Tris-HCl : trishydroxyméthylaminométhane

WGA : Wheat Germ Agglutinin

Table des figures

1.1 : structure de la peau (Marieb 1993)	23
1.2 : a) Enchaînement caractéristique d'acides aminés dans la triple hélice de collagène, b) assemblage en fibrilles	24
1.3 : Dissolution de la silice (Iler 1979)	33
1.4 : Schéma des différentes voies d'internalisation (Hillaireau 2009)	37
2.1 : Structure schématique des nanoparticules fluorescentes	60
2.2 : Equation bilan de la synthèse des particules n%SS	60
2.3 : Suivi de l'agrégation des nanoparticules fluorescentes dans le milieu de culture par DLS, a) Si+200 après 2 heures dans le milieu, b) Si+60 après 6 heures, c) Si-10 après 24 heures	61
2.4 : Images MET et analyse statistique de la taille des particules pleines fluorescentes : (a) Si+200, (b) Si+60, (c) Si+10, (d) Si-10	61
2.5 : Images en MET des nanoparticules incorporant des ponts disulfures et analyse statistique de la dispersion en taille	62
2.6 : Isotherme d'adsorption d'azote pour les particules n%SS fluorescentes	68
2.7 : Analyse de la taille des nanoparticules Si+200 fluorescentes et non fluorescentes dans le milieu de culture et dosage dans le tampon pH 7,4	71
2.8 : Suivi par dosage de l'acide silicique et par fluorescence de la dissolution de Si+200 et Si+60 dans le tampon Tris-HCl pH 7,4 @ 37°C	72

2.9 : Dissolution des nanoparticules pleines dans le milieu de culture à 37°C, suivie par fluorescence	73
2.10 : Dissolution des nanoparticules n%SS dans le tampon Tris-HCl pH 7,4 à 37°C, suivie par dosage de l'acide silicique	76
2.11 : Dissolution des nanoparticules n%SS dans le milieu de culture à 37°C, suivie par fluorescence	78
3.1 : Image en microscopie à fluorescence des fibroblastes dermiques humains après 4h d'exposition aux nanoparticules : a) Si+200, b) Si+60, c) Si+10, d) Si-10, e) décomposition de b) et image en transmission	84
3.2 : Images en microscopie à fluorescence des fibroblastes dermiques humains après 24h d'exposition aux nanoparticules : a) Si+200, b) Si+60, c) Si+10, d) Si-10	86
3.3 : Evolution de l'intensité intracellulaire de la FITC en fonction du temps de contact nanoparticules-cellules	87
3.4 : Images en MET des cellules NHDF après 24 heures d'exposition aux nanoparticules (a, b) Si+200, (c, d) Si+60, (e, f) Si+10 et (g, h) Si-10 (M : mitochondrie, ER : réticulum endoplasmique)	88
3.5 : Images en microscopie à fluorescence des fibroblastes dermiques humains après 24h d'exposition aux nanoparticules : a-d) sans inhibiteur, e-l) avec un inhibiteur : e-h) monodansylcadaverine, i-l) phorbol myristate acétate	89
3.6 : Activité métabolique mesurée par le test à la résazurine (gauche) et évolution du nombre de cellules vivantes (droite) après 4 heures et 24 heures d'exposition aux nanoparticules	91
3.7 : Evaluation de la génotoxicité des particules de silice par le test des comètes, a) répartition des comètes dans les différentes catégories de dommages, b) indice d'endommagement de l'ADN	93
3.8 : Images en microscopie à fluorescence des fibroblastes dermiques humains après 48h d'exposition aux nanoparticules : a) Si+200, b) Si+60, c) Si+10, d) Si-10	96
3.9 : Images en MET des cellules NHDF après 7 jours d'exposition aux nanoparticules (a, b) Si+200, (c, d) Si+60	97
3.10 : Activité métabolique mesurée par le test à la résazurine (a) et évolution du nombre de cellules vivantes (b) de 24 heures à 7 jours d'exposition aux nanoparticules ; * p < 0,05 par rapport au témoin	98
3.11 : Evolution de l'activité métabolique (test à la résazurine) des cellules exposées aux nanoparticules pendant 7 jours puis mises en culture	101

3.12 : Images en microscopie à fluorescence et MET des cellules NHDF après 7 jours d'exposition aux nanoparticules et 7 jours de culture dans du milieu sans particules (a, b, c) Si+200, (d, e, f) Si+40	102
3.13 : Distribution de taille des nanoparticules Si+200 évaluée par MET (a) dans l'eau, (b) dans les cellules après 2 semaines, (c) hors des cellules après 2 semaines, (d) après 2 semaines dans le milieu de culture à 37°C	103
3.14 : Suivi du contenu du milieu renouvelé après une semaine d'exposition des cellules aux nanoparticules, mesuré par fluorescence des espèces solubles (symboles creux) et des nanoparticules libérées (symboles pleins)	105
4.1 : Images de MEB des gels à 3 mg/mL (H3) et 5 mg/mL (H5)	112
4.2 : Dispositif de diffusion	113
4.3 : Schéma des deux processus couplés pris en compte dans la modélisation.....	115
4.4 : Courbes calculée de a) diffusion et b) dissolution	116
4.5 : Evolution de l'intensité totale de fluorescence en sortie d'un gel à 3 mg/mL lors de la diffusion des particules de silice et décomposition du signal de diffusion de Si-10 en formes solubles et nanoparticules	118
4.6 : Coefficients de diffusion des particules calculés dans l'eau	120
4.7 : Influence de la concentration en collagène et de la voie de fibrillogénèse sur la diffusion totale (particules et formes solubles) des particules Si+60 et contribution des nanoparticules et des formes solubles au signal de diffusion de Si+60 dans un hydrogel de collagène à 5 mg/mL	124
4.8 : Modélisation de l'évolution du coefficient de diffusion en fonction de la concentration en collagène	125
4.9: Influence des cellules sur la diffusion totale de Si+40 et Si-10 dans des gels de collagène à 3 mg/mL	128
4.10 : Comparaison de l'influence de cellules vivantes et mortes sur la diffusion (a) et la dissolution (b) de nanoparticules Si+60 dans un gel à 3 mg/mL	130
4.11 : Internalisation, suivie par microscopie à fluorescence confocale, après 24 heures d'exposition, des particules Si+60 dans les cellules immobilisées dans les gels de collagène a) 1,5 mg/mL, b) 3 mg/mL, c) 5 mg/mL	132
4.12 : Analyse de la colocalisation des signaux de fluorescence de la FITC et du lysosensor dans une cellule de l'échantillon H1,5c exposé 24h aux Si+60, la zone 3 représente la colocalisation du signal de la fluorescéine et du Lysosensor	133

4.13 : Observation par microscopie à fluorescence des cellules immobilisées dans les gels H3c après exposition aux nanoparticules (de haut en bas) Si+200, Si+60, Si+10 et Si-10 sans inhibiteur (a-d) ou en présence d'inhibiteur d'internalisation de la voie clathrine (e-h) et de la voie caveolae (i-l) (les flèches indiquent des cellules	135
4.14 : Evolution du nombre de cellules vivantes (a) et activité métabolique des cellules (b) dans les gels de collagène à 3 mg/mL exposés aux différentes particules	137
4.15 : Evolution de l'activité métabolique des cellules exposées aux particules Si+60 dans les gels de collagène à différentes concentrations	138
4.16 : Influence des particules sur l'adhésion (a) et la prolifération (b) des NHDF dans les gels composites collagène-silice à 3 mg/mL et 5 mg/mL	142
4.17 : Influence de la source de silice sur l'adhésion (a) et la prolifération (b) des NHDF dans les gels composites collagène-silice à 3 mg/mL et 5 mg/mL	145
5.1 : a) Spectre RMN-CP ¹³ C, b) évolution de la somme des intensités du disulfure, de l'APTES et des ethoxy, c) spectre RMN-CP ²⁹ Si et d) comparaison des spectres CP ²⁹ Si et INEPT pour les particules 30%SS non fluorescentes	152
5.2 : Terminologie des différents types d'atomes de silicium	153
5.3 : Spectres RMN Hetcor des particules 30%SS, a) ¹ H- ¹³ C, b) ¹ H- ²⁹ Si, c) analyse des deux spectres 2D pour déterminer quels atomes de carbone sont à proximité des différents types de sites silicium	155
5.4 : Schéma de structure des particules 30%SS	156
5.5 : Suivi par dosage de la dissolution des particules n%SS (0,6 mg/mL) dans un tampon à pH 4,5 à 37°C	158
5.6 : Schéma de la réaction du DTT avec un disulfure	159
5.7 : Réduction des ponts disulfures des particules n%SS en présence de DTT dans un tampon à pH 7,4 à 37°C	160
5.8 : Suivi de l'internalisation des particules n%SS dans des NHDF après 24 heures (a-e) et 7 jours (f-j) d'exposition à une suspension de particules à 0,6mg/mL dans du milieu de culture	162
5.9 : images MET des cellules après 7 jours d'exposition aux suspensions de nanoparticules n%SS	163
5.10 : Images MET des cellules après 7 jours d'exposition aux particules n%SS suivis de 7 jours de culture sans particules	165
5.11 : Evolution de l'activité métabolique des cellules exposées aux nanoparticules n%SS	166

5.12 : Exocytose des particules n%SS et de leur produit de dissolution après 7 jours d'exposition	168
5.13 : Mise en évidence en MET de la dégradation intracellulaire après 14 jours des particules 10%SS (a-c), 20%SS (d), 30%SS (e) et exocytose des particules 30%SS après 14 jours (f) (barre 100 nm)	169
5.14 : Libération intracellulaire du marqueur Hoechst 33258 encapsulé par interactions électrostatiques dans les particules 0%SS après (a) 6h, (b) 8h, (c) 24h, (d) 72 heures et (e) 7 jours d'incubation avec les nanoparticules	173
5.15 : Influence de la présence de ponts disulfures dans les particules sur la libération intracellulaire du marqueur Hoechst 33258	175
6.1 : Equation bilan du greffage de la fluorescéine sur l'APTES	180
6.2 : Equation bilan de la synthèse des nanoparticules n%SS fluorescentes	182
6.3 : Réaction du test à la résazurine	195
6.4: Différentes classes de comètes en fonction du dommage causé à l'ADN	196
6.5 : Procédé d'obtention des gels de collagène à 3 mg/mL acellulaires (H3), cellularisés (H3c), composite acellulaire (H3 composite), composite cellularisé (H3c composite) ..	201
6.6: Description du dispositif de diffusion et du suivi par spectroscopie de fluorescence ...	203
6.7 : Principe du test MTT	207
6.8 : Réaction du DTT avec un pont disulfure	208

Liste des tableaux

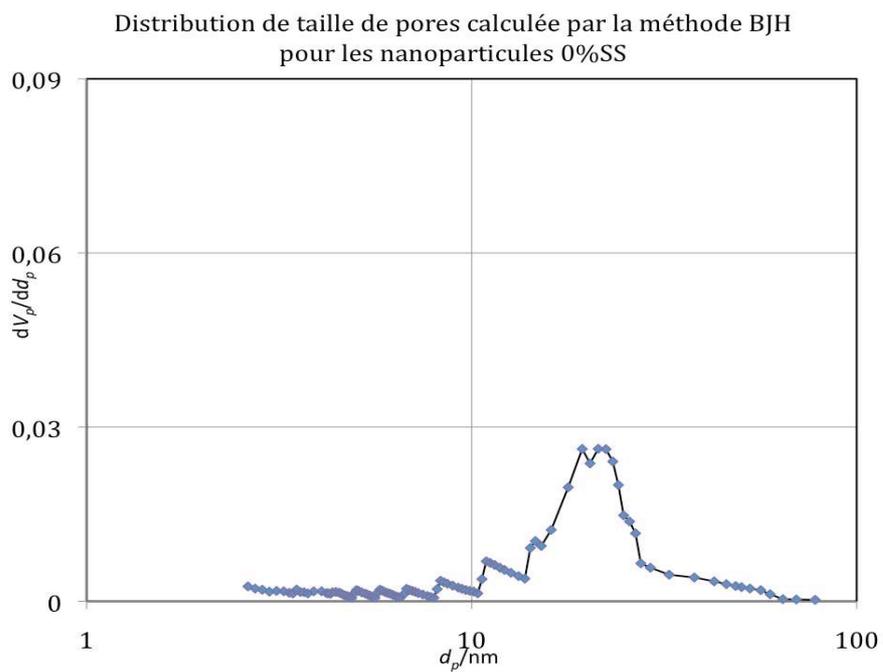
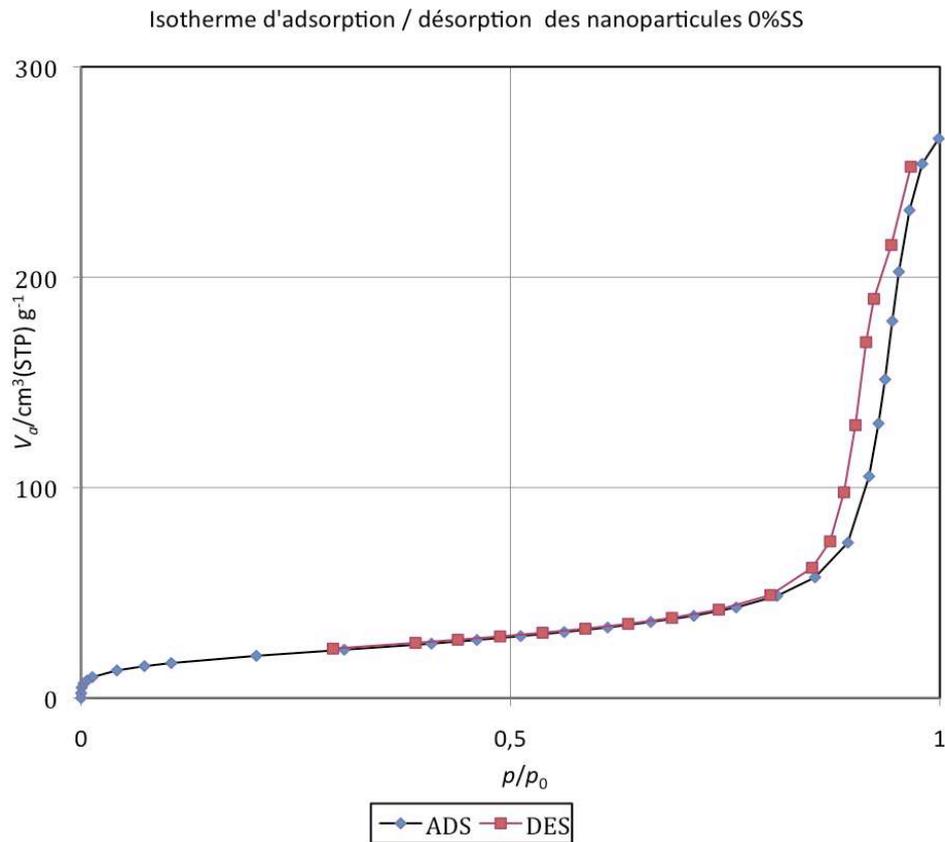
1.1 : Résumé des résultats de diffusion de diverses nanoparticules à travers la peau	27
2.1 : Caractéristiques des nanoparticules	62
2.2 : Composition des nanoparticules n%SS obtenue par analyse élémentaire	66
2.3 : Porosité et surface spécifique des nanoparticules contenant des ponts disulfures	68
2.4 : Résultats des mesures d'ICP pour des solutions de silicates, de particules (Ludox) et des mélanges silicate-particules à concentration totale en silicium constante	71
2.5 : Paramètres de dissolution des nanoparticules dans le milieu de culture à 37°C	75
4.1 : Paramètres de diffusion dans un gel de collagène à 3 mg/mL	118
4.2 : Paramètres de diffusion des nanoparticules Si+40 dans différents gels de collagène ..	126
4.3 : Paramètres de diffusion dans un gel de collagène à 3 mg/mL avec cellules	129
4.4 : Module de conservation et de perte des gels composites définis par rhéologie	144
6.1: Composition des synthèses	181
6.2 : Composition des synthèses des nanoparticules hybrides % massique Disulfure/TEOS	182
6.3 : Description des filtres de fluorescence utilisés pour les différents marqueurs	192
6.4 : Composition des gels de collagène	201

Annexes

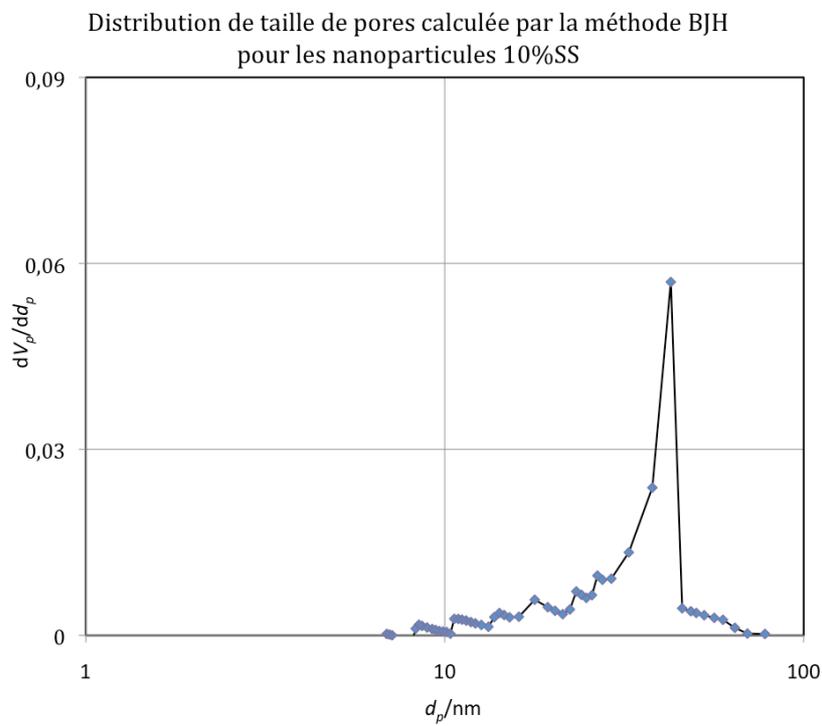
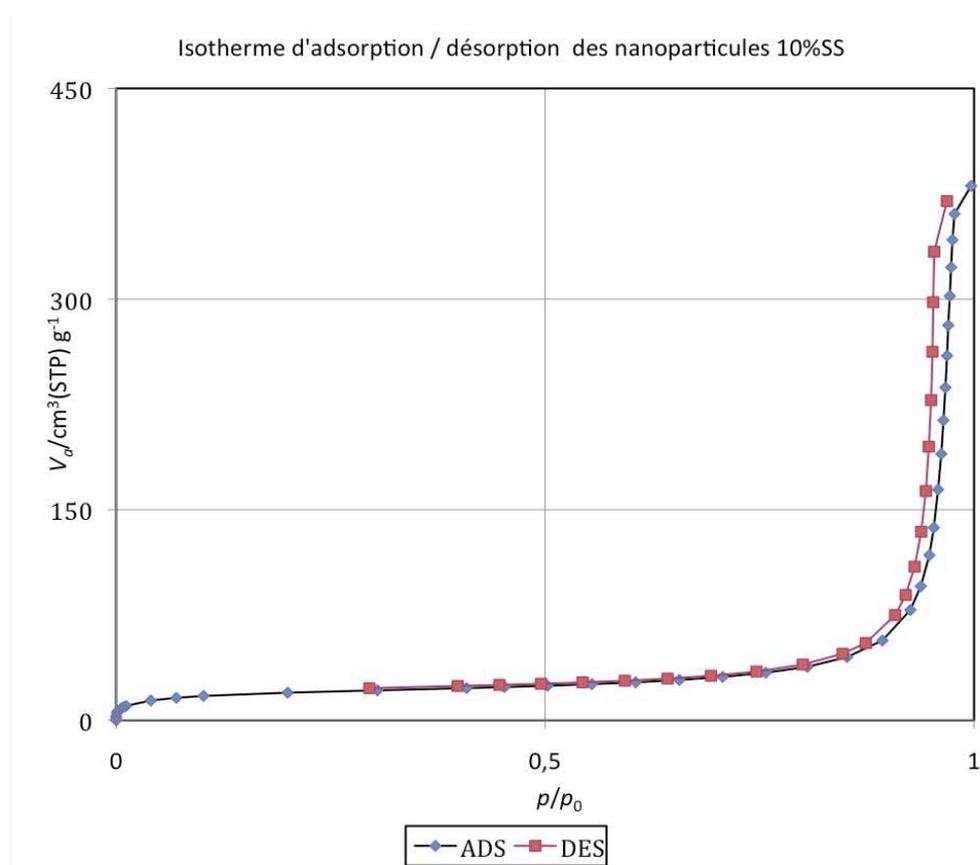
ANNEXE 1 : ISOTHERMES D'ASORPTION-DESORPTION ET DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES PORES (BJH) POUR LES PARTICULES N%SS	243
Nanoparticules 0%SS fluorescentes	243
Nanoparticules 10%SS fluorescentes	242
Nanoparticules 20%SS fluorescentes	243
Nanoparticules 30%SS fluorescentes	246
Nanoparticules 40%SS fluorescentes	245
Nanoparticules 20%SS non fluorescentes	246
Nanoparticules 40%SS non fluorescentes	247
ANNEXE 2 : ETUDE DE LA DIFFUSION PAR SIMULATION NUMERIQUE	248
ANNEXE 3 : DECOMPOSITION DU SIGNAL DE DIFFUSION DES PARTICULES DANS H3 EN FORMES SOLUBLES ET NANOPARTICULES	252

Annexe 1 : Isothermes d'adsorption-désorption et distribution de la taille des pores (BJH) pour les particules n%SS

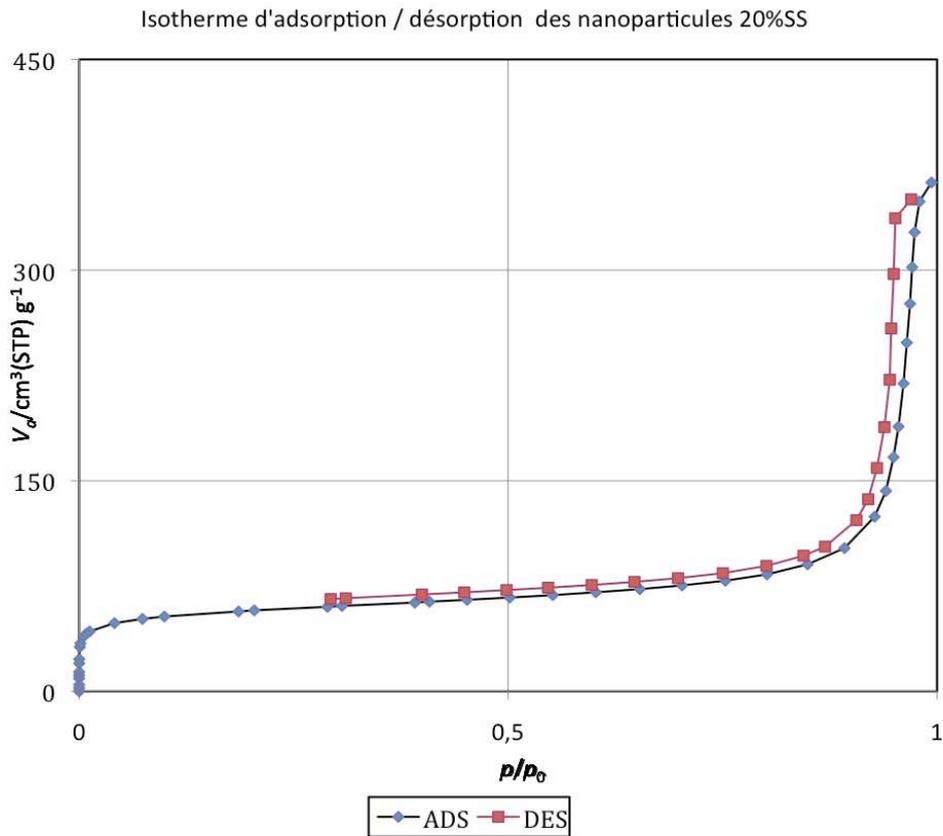
NANOPARTICULES 0%SS FLUORESCENTES



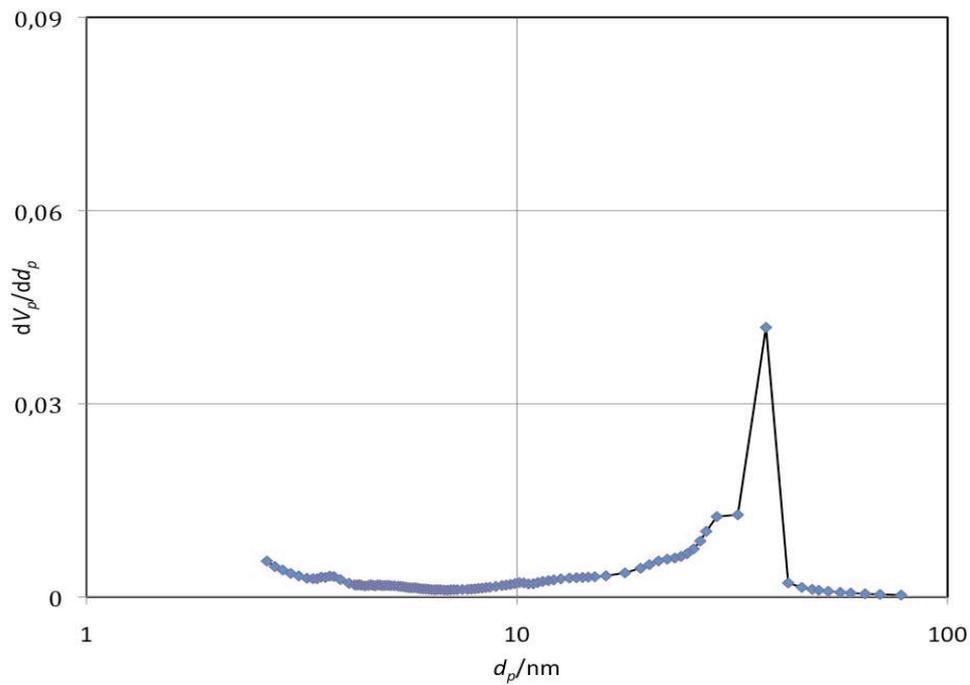
NANOPARTICULES 10%SS FLUORESCENTES



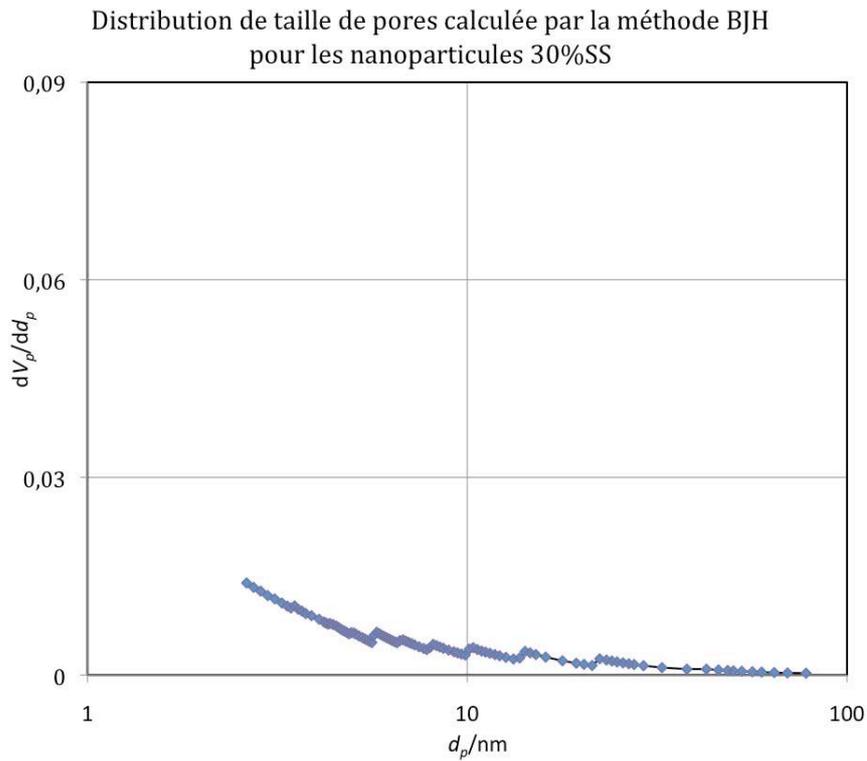
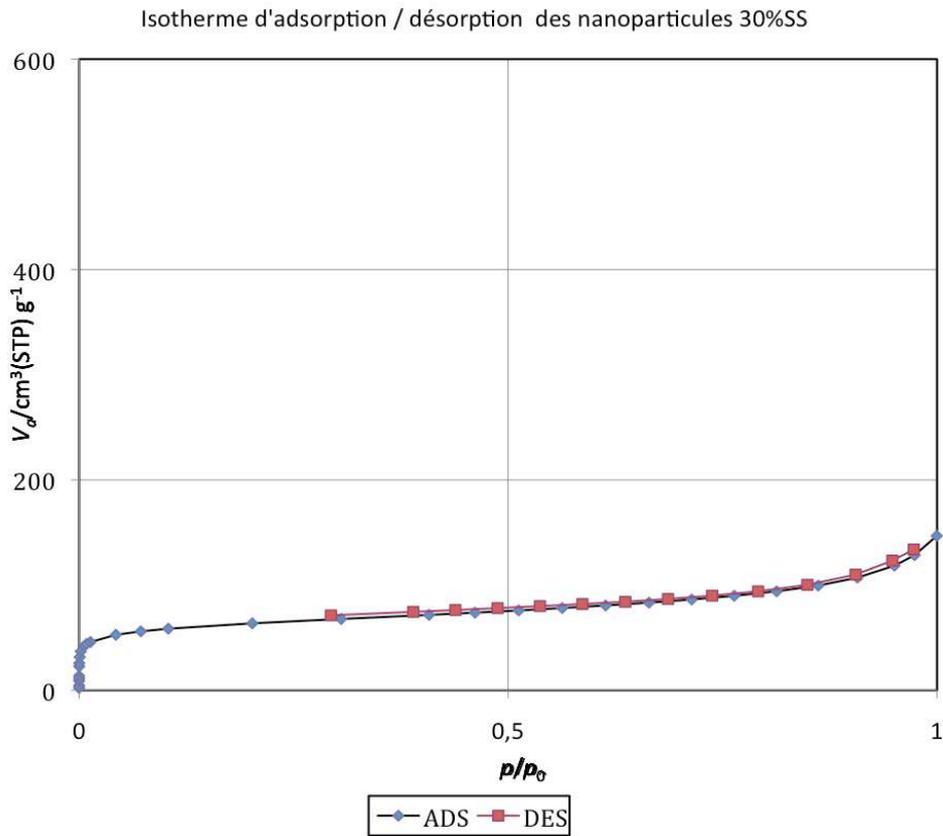
NANOPARTICULES 20%SS FLUORESCENTES



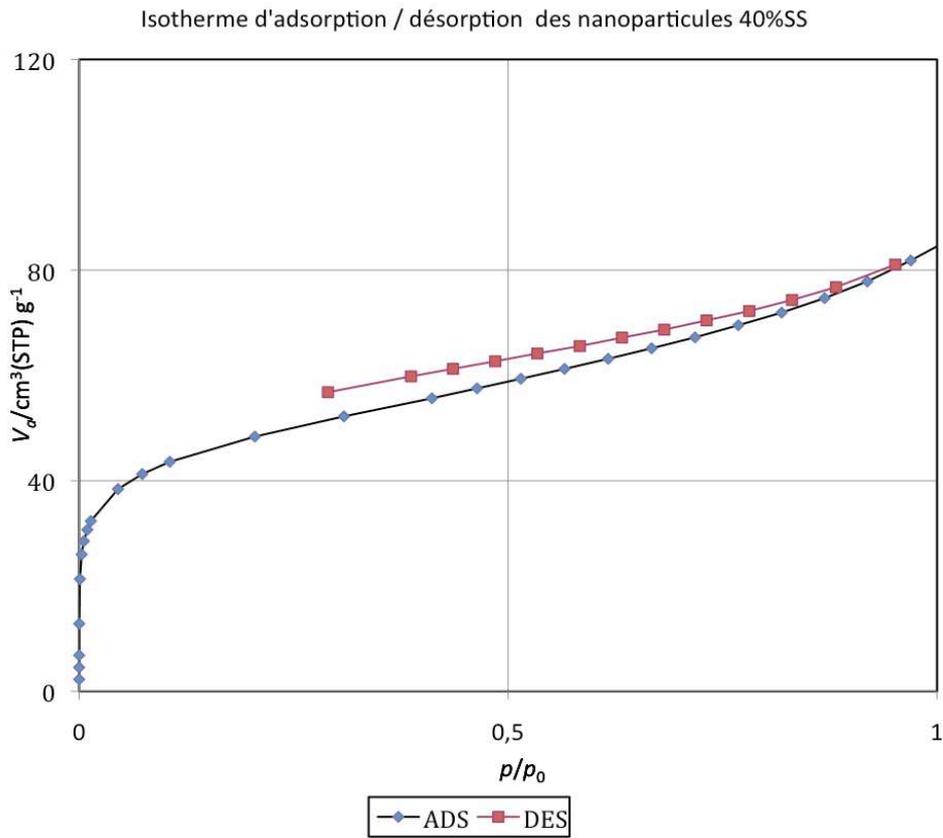
Distribution de taille de pores calculée par la méthode BJH pour les nanoparticules 20%SS



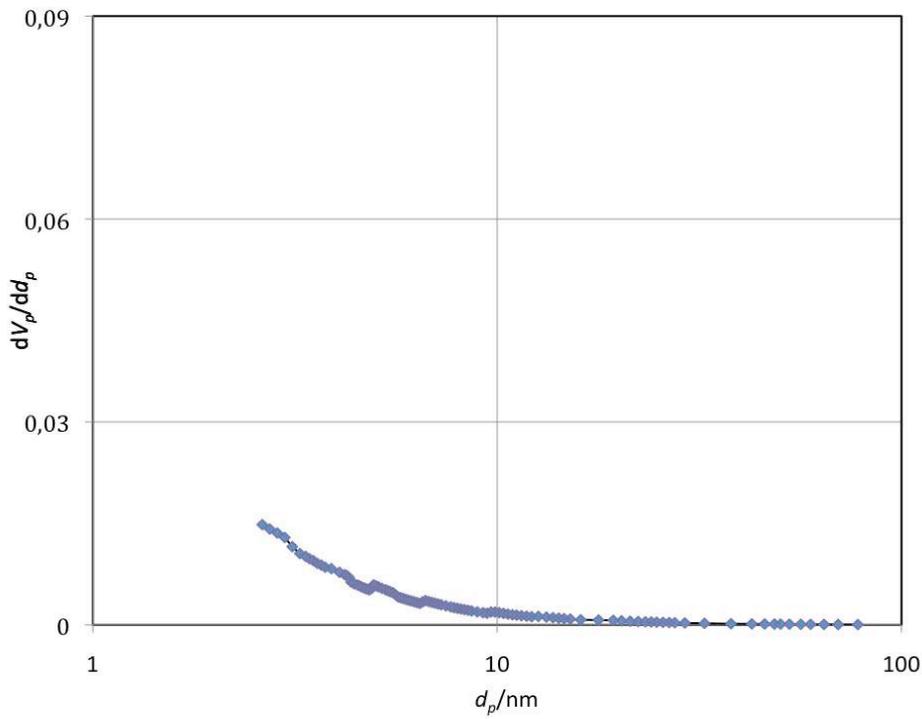
NANOPARTICULES 30%SS FLUORESCENTES



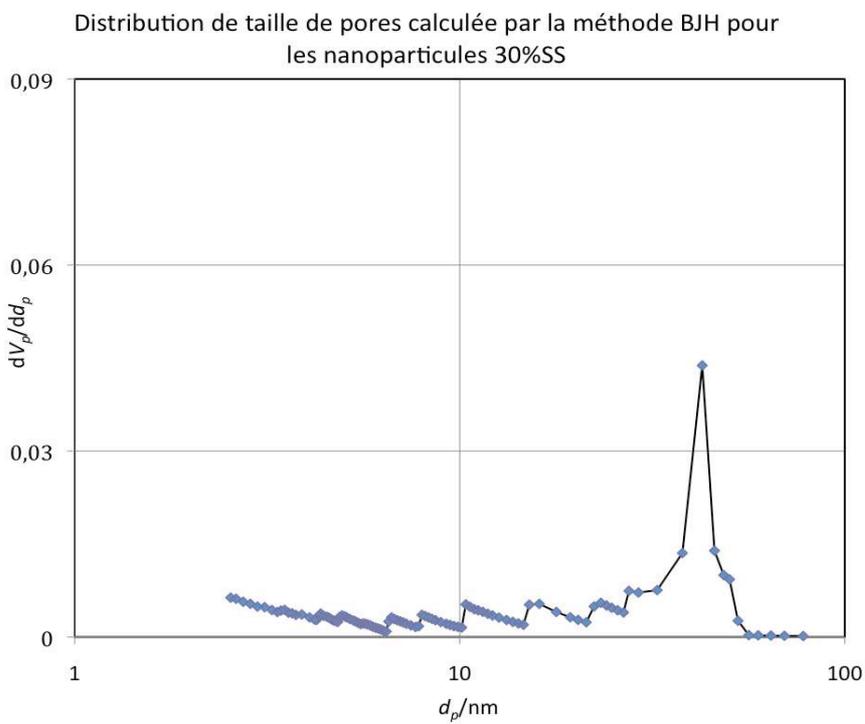
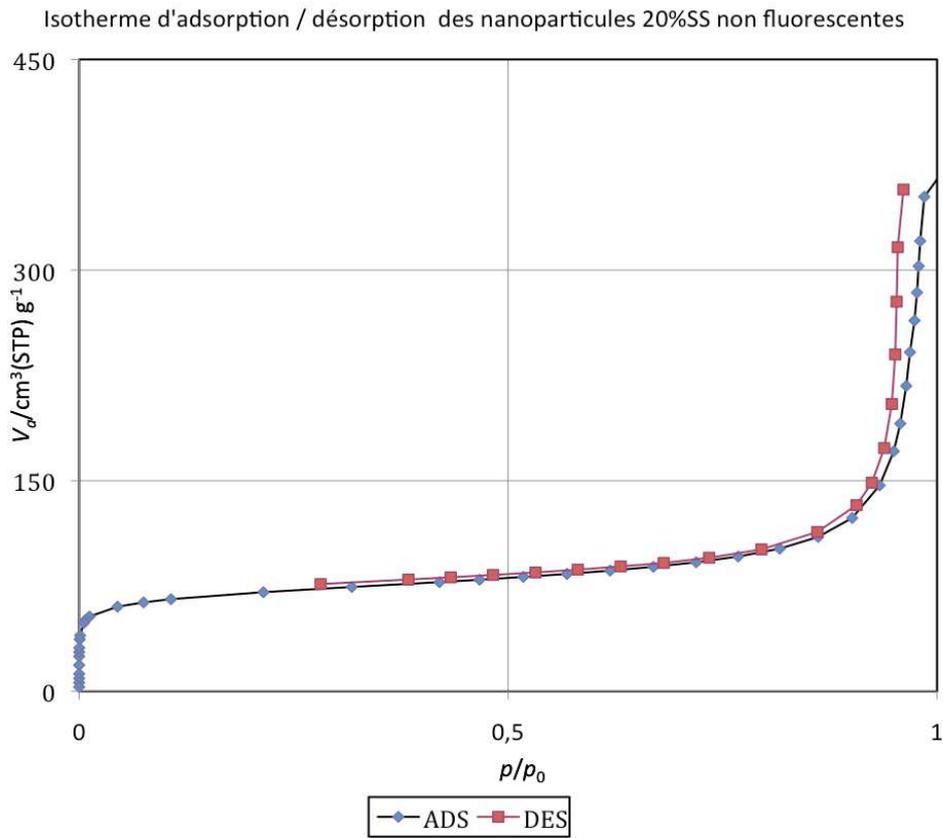
NANOPARTICULES 40%SS FLUORESCENTES



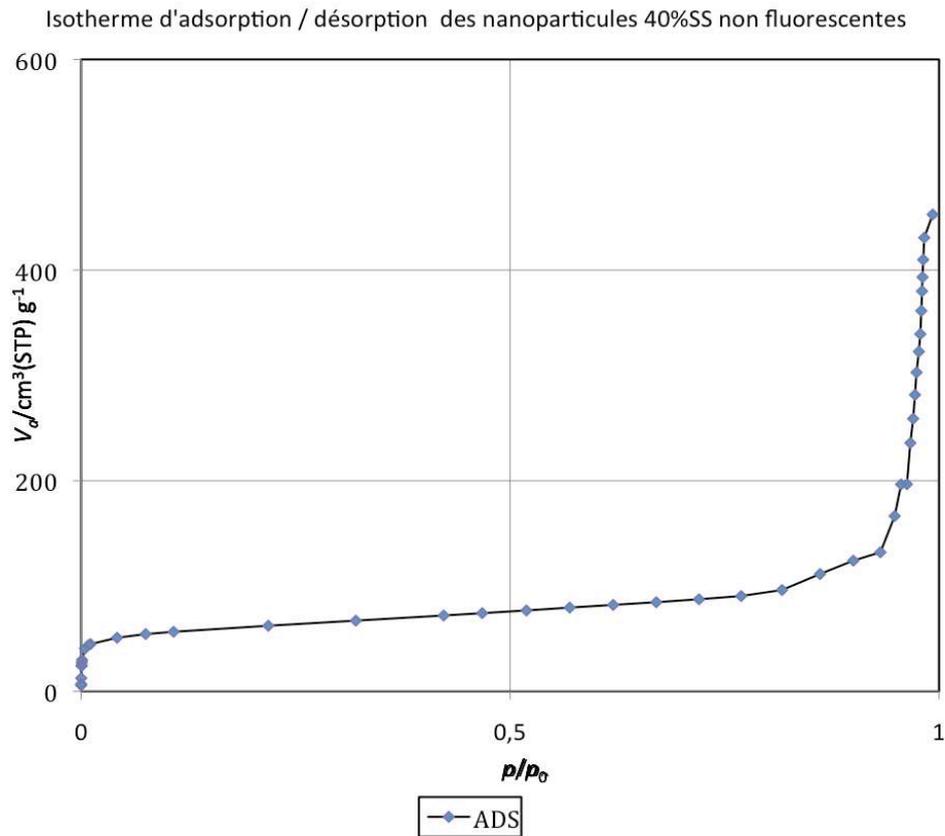
Distribution de taille de pores calculée par la méthode BJH pour les nanoparticules 40%SS



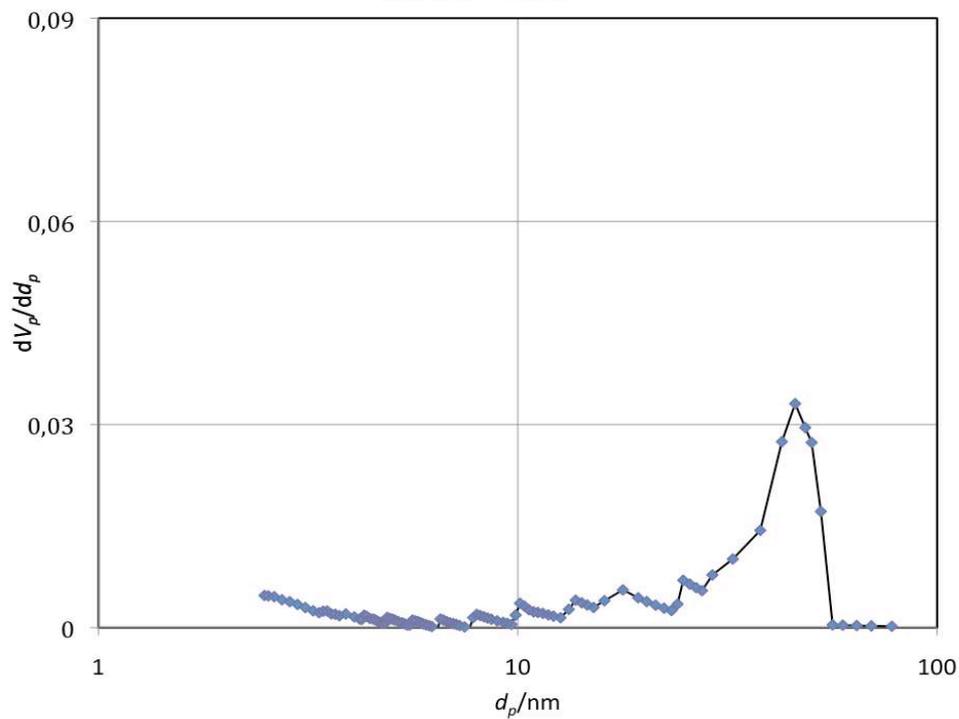
NANOPARTICULES 20%SS NON FLUORESCENTES



NANOPARTICULES 40%SS NON FLUORESCENTES



Distribution de taille de pores calculée par la méthode BJH pour les nanoparticules 40%SS non fluorescentes



Annexe 2 : Etude de la diffusion par simulation numérique

Les équations du système

Zone I

La zone I correspond à l'endroit où les nanoparticules sont déposées, leur concentration à $t = 0$ est la concentration initiale C_0 .

Zone II

La zone II est la région remplie d'hydrogel de collagène où la concentration se diffuse et subit un processus d'absorption-désorption, ce qui peut être modélisé par le système d'équations suivant :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - k_m \frac{\partial S}{\partial t}$$

$$\frac{\partial S}{\partial t} = k_a C - k_d S$$

Zone III

C'est la zone d'analyse de données et la concentration à $t = 0$ est une concentration nulle de nanoparticules qui augmente au fur et à mesure de l'évolution du système.

Conditions aux limites

Les frontières entre les zones I-II et II-III sont les régions où les échanges se font principalement suivant une équation de flux à travers d'une surface S (la surface du dispositif).

- Zone I-II

Modèle de flux à travers une frontière

$$l_1 S \frac{\partial C}{\partial t} = SD \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right)_{x=0}$$

où $l_1 S$ est le volume de la zone I. Cette équation traduit le fait que la concentration initiale diminue lors de la dynamique du système à cause du gradient de concentration à la frontière qui est le moteur du flux.

- Zone II-III

Modèle de flux à travers une frontière

$$l_3 S \frac{\partial C}{\partial t} = -SD \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right)_{x=l}$$

$l_3 S$ est le volume de la zone III et l'interprétation est la même que précédemment, sauf qu'ici la concentration augmente.

Équations sans dimension

Nous allons écrire le système en forme adimensionnelle en utilisant les échelles suivantes pour :

1 – l'espace : la longueur de l'échantillon l soit $\tilde{x} = \frac{x}{l}$

2 – la concentration : la concentration initiale C_0 soit $\tilde{C} = \frac{C}{C_0}$

3 – le temps : le temps de diffusion $\frac{l^2}{D}$ soit $\tau = \frac{t}{l^2/D}$

Nous avons donc une écriture dans des variables sans dimension

$$\frac{\partial \tilde{C}}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 \tilde{C}}{\partial \tilde{x}^2} - k \frac{\partial \tilde{S}}{\partial \tau}$$

$$\frac{\partial \tilde{S}}{\partial \tau} = \lambda(\tilde{C} - K\tilde{S})$$

où λ est le rapport entre le temps de diffusion $\left(\frac{D}{l^2}\right)$ et le temps de désorption k_d et K la

constante de Langmuir c'est à dire le rapport entre les temps de désorption et absorption $\frac{k_a}{k_d}$.

Pour les conditions aux limites nous avons :

$$\frac{\partial \tilde{C}}{\partial \tau} = \alpha \left(\frac{\partial \tilde{C}}{\partial x} \right)_{x=0}$$

et

$$\frac{\partial \tilde{C}}{\partial \tau} = \beta \left(\frac{\partial \tilde{C}}{\partial x} \right)_{x=1}$$

où α et β sont les rapports d'aspect $\frac{l_1}{l}$ et $\frac{l_3}{l}$ respectivement. Il faut noter que la deuxième condition aux limites est à $x = 1$ car la variable spatiale réduite est définie maintenant entre 0 et 1.

Approche Numérique

Pour intégrer numériquement le système proposé nous allons remplacer les opérateurs différentielles par des différences finies décentrées (pour l'opérateur temporel) et centrées (pour l'opérateur spatial) comme ceci :

- $\frac{\partial C}{\partial \tau}$ devient $\frac{C_j^{i+1} - C_j^i}{\Delta t}$

- $\frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$ devient $\frac{C_{j+1}^i - C_{j-1}^i}{2\Delta x}$

où l'indice i correspond au temps avec Δt l'échantillonnage temporel et l'indice j correspond à l'espace avec $\Delta x = \frac{1}{N}$ la résolution spatiale, N étant le nombre de points que l'on a utilisé pour discrétiser le segment de longueur 1.

Finalement si nous appelons $C[1]$ la concentration dans la zone 1, C la concentration dans la matrice d'hydrogel et $C[3]$ la concentration dans la zone 3 (la zone de mesure) nous avons le système discret suivant sur un maillage de N points, pour $j = 1, N$. Dans cette approche les nœuds $j=1$ et $j=N$ correspondent aux conditions aux limites et la zone II qui contient l'hydrogel est définie sur les nœuds $j = 2 \dots N-1$.

Le schéma d'intégration est donc

- $j=1 \quad C[1]^{i+1} = C[1]^i + \alpha \frac{\Delta t}{\Delta x} (C_{j=2}^i - C_{j=1}^i)$

- $j = 2 \dots N-1$

$$C_j^{i+1} = C_j^i + \frac{\Delta t}{2\Delta x} (C_{j+1}^i - C_{j-1}^i) + k_m \frac{(S_j^{i+1} - S_j^i)}{\Delta t}$$

$$C_j^{i+1} = C_j^i + \frac{\Delta t}{2\Delta x} (C_{j+1}^i - C_{j-1}^i) + k_m$$

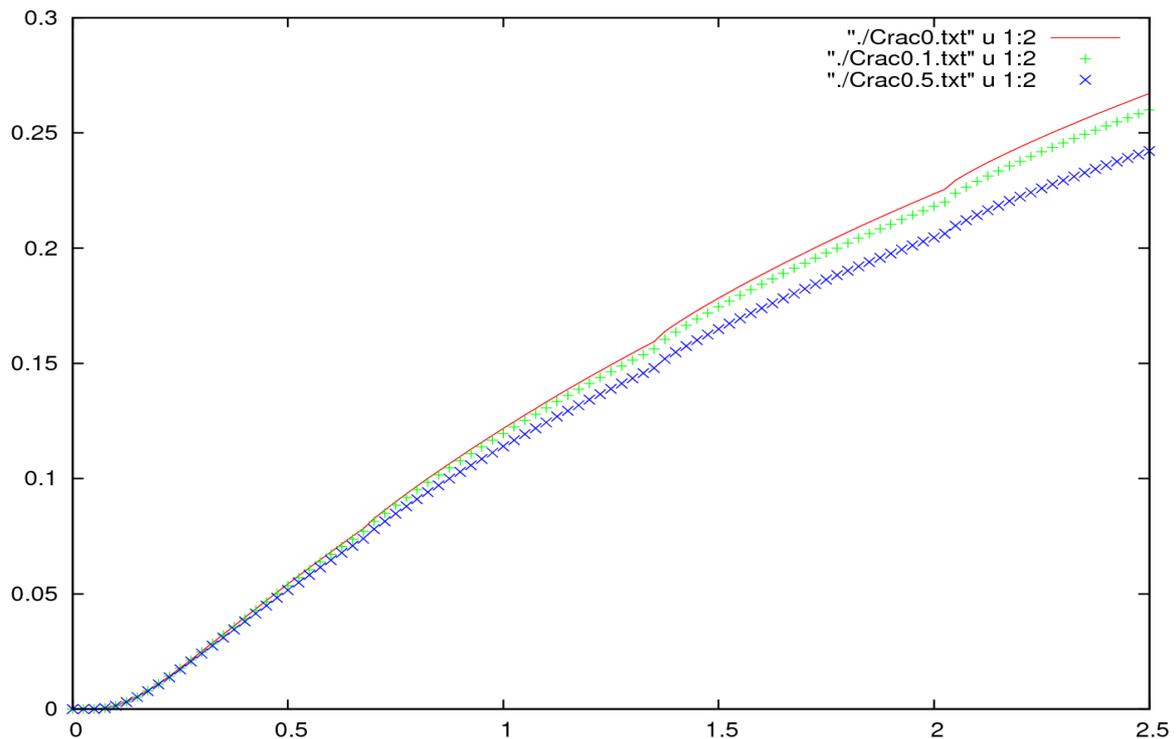
- $j=N \quad C[3]^{i+1} = C[3]^i - \beta \frac{\Delta t}{\Delta x} (C_{j=N}^i - C_{j=N-1}^i)$

Ce système doit être intégré entre le temps initial $i = 0$ et le temps final $i = M\Delta t$ à partir des conditions initiales données qui correspondent aux conditions expérimentales c'est à dire pour $i = 0$, à savoir :

Conditions Initiales	
$C[1]^{i=0} = C_0$	la concentration initiale
$C^{i=0} = 0$	pour tout j
$S^{i=0} = 0$	pour tout j
$C[3]^{i=0} = 0$	

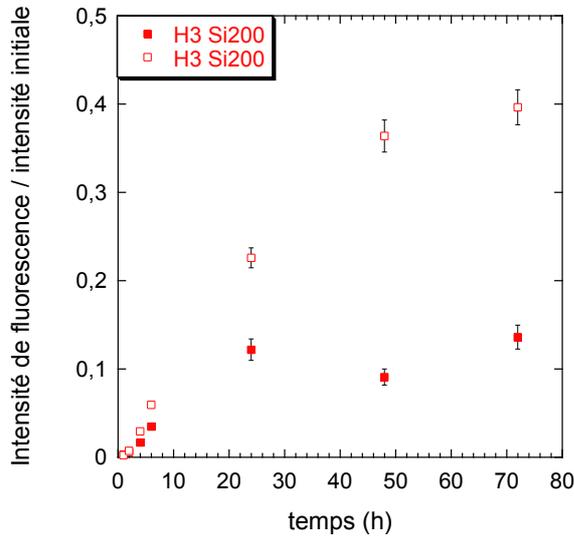
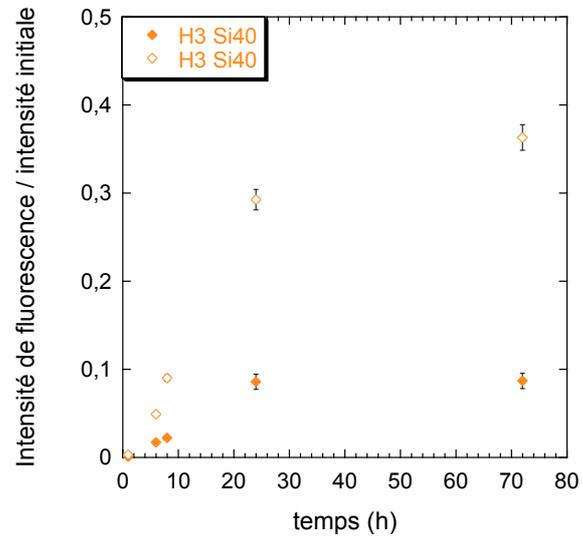
Les valeurs numériques de $C[3]$ au cours du temps doivent être comparées aux données expérimentales, la figure suivante présente un calcul numérique typique de la concentration $C[3]$ en fonction du temps pour des valeurs différentes de λ .

L'intérêt de l'outil numérique est d'analyser toutes les variations des paramètres du modèle et de rapporter les résultats aux données expérimentales pour (1) déterminer les facteurs prépondérants du système et (2) en retour, améliorer le modèle théorique.



Evolution de la concentration (en tenant compte de la dilution induite par les prélèvements) pour un système adimensionnel (à τ fixé) et des valeurs de λ allant de 0 à 0,5

Annexe 3 : Décomposition du signal de diffusion des particules dans H3 en formes solubles et nanoparticules

Signal de diffusion des particules Si+200**Signal de diffusion des particules Si+60****Signal de diffusion des particules Si+10**