



**HAL**  
open science

# Nanoparticules mésoporeuses d'ionosilice et de porphyrine : une plateforme multifonctionnelle pour la théranostique des cancers

Braham Mezghrani

► **To cite this version:**

Braham Mezghrani. Nanoparticules mésoporeuses d'ionosilice et de porphyrine : une plateforme multifonctionnelle pour la théranostique des cancers. Matériaux. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONT080 . tel-03934742

**HAL Id: tel-03934742**

**<https://theses.hal.science/tel-03934742>**

Submitted on 11 Jan 2023

**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.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Chimie et Physico-Chimie des Matériaux pour la Santé

École doctorale Sciences Chimiques Balard - ED 459

Unités de recherche

Institut Charles Gerhardt Montpellier - UMR 5253

Institut des Biomolécules Max Mousseron - UMR 5247

## Nanoparticules Mésoporeuses d'Ionosilice et de Porphyrine : Une Plateforme Multifonctionnelle pour la Théranostique des Cancers

Présentée par Braham MEZGHRANI  
Le 10 Décembre 2021

Sous la direction de Peter HESEMANN,  
Jean-Olivier DURAND et Nadir BETTACHE

Devant le jury composé de

M. Peter BEHRENS, Professor, Leibniz University Hannover - Allemagne

Mme. Muriel BARBERI-HEYOB, Professeur des universités, Université de Lorraine - France

Mme. Nadine MILLOT, Professeur des universités, Université de Bourgogne - France

Mme. Fabienne DUMOULIN, Associate Professor, Acıbadem University - Turquie

M. Peter HESEMANN, Directeur de recherche, Université de Montpellier - France

M. Jean-Olivier DURAND, Directeur de recherche, Université de Montpellier - France

M. Nadir BETTACHE, Chargé de recherche, Université de Montpellier - France

Président du jury

Rapporteure

Rapporteure

Examinatrice

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Co-directeur de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



*“If you don’t build your dream, someone  
will hire you to help build theirs”.*

*-Tony Gaskins-*



## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier les Professeurs Muriel BARBERI-HEYOB, Nadine MILLOT et Peter BEHRENS ainsi que le Docteur Fabienne DUMOULIN d'avoir aimablement accepté de juger et d'évaluer mon travail de thèse. Je suis très honoré de votre présence au sein du Jury de ma soutenance de thèse. Soyez assurés de toute ma reconnaissance et de tout mon respect.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude envers mes directeurs de thèse, qui sans eux toute cette aventure n'aurait pas eu lieu, les Docteurs Peter HESEMANN, Jean-Olivier DURAND et Nadir BETTACHE. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée au cours de ces 3 années de thèse, de m'avoir transmis une partie de votre expertise, d'avoir toujours répondu présents aux moments où j'en avais besoin, ainsi que pour votre appui infaillible.

Merci à Magali, cheffe de l'équipe « glyco- et nano vecteurs pour le ciblage thérapeutique », pour l'accueil chaleureux qui m'a été réservé au sein de ton équipe. Merci pour ta disponibilité, pour ton expertise scientifique, pour ta générosité et ta bonne humeur... sans oublier tes cadeaux « très originaux !! ». Si je serais amené un jour à être chef d'équipe, crois-moi que tu seras mon exemple !

Je remercie aussi Marcel et Alain pour leurs conseils et leur expertise scientifique.

Je ne remercierai jamais assez Lamiaa de m'avoir toujours accordé du temps malgré ton agenda super rempli. Ton aide a été énormément précieuse pour mener à bien ce projet, le confocal peut en être témoin des nombreuses heures qu'on a passé ensemble. Merci pour tes conseils, pour tes astuces, pour les moments de rire et merci de ne pas avoir encaissé 10€ à chaque question que je te posais ... j'avoue que 3 ans de thèse m'auraient coûté super cher!! Tu n'as pas été qu'une collègue au travail mais une grande sœur. Je te souhaite un avenir brillant, à la hauteur de tes aspirations.

À Nabila qui m'a aiguillé avant même de démarrer la thèse et qui m'a accompagné lors de mes premiers pas au labo. C'était agréable de t'avoir comme voisine de bureau pendant 2 années, et désolé si je t'ai parfois fait saigner des oreilles avec des goûts musicaux qui n'ont pas souvent été à ton goût.

À Khaled d'avoir toujours été à la rescousse pour les quelques soucis informatiques. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et pour les discussions intéressantes lors de nos pauses café.

À Laure qui m'a dispensé une instruction (presque militaire) aux bonnes pratiques en salle de culture. N'empêche, j'en garde de beaux souvenirs !

Merci Ilaria pour ta bienveillance, tes délicieux desserts et les minutes de cours d'italien, promis j'essayerai de m'y mettre plus sérieusement !!

À Marie pour ta bonne humeur et ton dynamisme au sein de l'équipe.

À Christophe, docteur en cours de chargement ! Félicitation pour le record du thésard le plus ...

À Morgane, notre responsable « animation et cohésion d'équipe » avec les after-work et sans oublier le rendez-vous annuel du séminaire Daurat !! D'ailleurs, je réserve ma place pour l'été 2022 !!

À Mélanie « Madame cuisine » pour les pauses gourmandes avec lesquelles tu nous as bien gâtés.

À Corentin, je n'aurais jamais cru dire ça un jour, mais je pense que ton « humour » va me manquer. Je te souhaite beaucoup de succès tout au long de ta thèse.

À Geoffrey pour les minutes « dormir moins bête », je pense qu'on aura appris pas mal de choses. Je te souhaite un bon courage à toi aussi pour la fin de ta thèse.

Je remercie également Denis et Kamel pour votre sympathie et bonne humeur.

Je souhaite remercier aussi Saher et Alysson qui m'ont accompagné lors de mes premières synthèses en chimie. Merci pour votre disponibilité ainsi que vos conseils.

Je remercie aussi le Docteur Sébastien RICHETER pour son expertise dans le domaine des porphyrines et ses précieuses indications.

Merci Mathilde d'avoir souvent organisé des petits moments de détente loin du stress de la thèse, autour d'un verre ou d'un jeu de société.

À Nicole pour tous les beaux moments qu'on a passé ensemble, entre joie et mélancolie ! Je te souhaite beaucoup de courage et de succès dans ta thèse.

À Céline, merci d'avoir organisé 3 années de suite, notre rendez-vous annuel tant attendu, le seul, l'unique et l'incontournable week-end camping-canoë dans les gorges du Tarn. J'en garde de très beaux souvenirs. Merci pour ta générosité et ta gentillesse.

Sans oublier le noyau dur, Maëlle, Maxime et Sofia. Nous avons passé ensemble la totalité de notre thèse, avec ses hauts et ses bas, ses rires et ses larmes. Nous voilà enfin parvenus à surmonter cette étape qui nous semblait tellement loin à certains moments. Merci pour votre aide, vos conseils, votre bonne humeur et pour chaque moment qu'on a passé ensemble (souvent entrain de maudire le moment où on a décidé de faire une thèse!).

Je remercie aussi l'ensemble des personnes des équipes CMOS, IMNO et SIKEMIA, avec qui j'ai eu à partager mon quotidien au labo, mes pauses déjeuné et pauses café. Merci à Hubert, Maroua, Melvyn, Nico Bond, Vincent, Rimeh, Raquel, Hisham, Amina, Lilia, Adeline ...

Merci Nassime pour ta présence et pour les nombreuses petites escapades improvisées. Je te souhaite beaucoup de succès dans ton parcours.

Je ne pourrai finir sans remercier mes parents et ma famille qui m'ont toujours soutenus et crus en moi. Vous me manquez énormément.

À la fin, je souhaiterai remercier toute personne ayant contribué de près ou de loin à la concrétisation de ce projet.

## RÉSUMÉ

Nous rapportons dans le présent travail l'utilisation de nanoparticules d'ionosilice mésoporeuses (PMINPs) en tant que nano-objets multifonctionnels pour l'imagerie, la thérapie photodynamique (PDT), la délivrance de médicaments ainsi que l'encapsulation et la délivrance efficaces de siRNA dans les cellules de cancer du sein. Les nanoparticules d'ionosilice mésoporeuses sont très appréciées de par leurs nombreux avantages : une surface spécifique élevée et une uniformité à la fois de la taille et de la forme des pores. Afin de conférer à ces nanoparticules des propriétés de PDT et d'internalisation photochimique (PCI) du siRNA, un dérivé de porphyrine a été incorporé dans la matrice ionosilicique.

Pour ce faire, nous avons synthétisé les PMINPs *via* un procédé d'hydrolyse - polycondensation, à partir de précurseurs oligo-silylés d'ammonium et de porphyrine. La formation de ces nano-objets a été attestée par microscopie électronique à transmission. Les nanoparticules formées ont ensuite été soigneusement caractérisées par RMN à l'état solide, sorption d'azote et diffusion dynamique de la lumière (DLS). Les propriétés spectrales de ces nanoparticules ont également été étudiées par spectroscopie UV-vis et d'émission de fluorescence, attestant de l'incorporation réussie du dérivé de porphyrine.

Nos résultats indiquent la formation de nano-bâtonnets hautement poreux. Un effet PDT significatif a été observé pour les PDT monophotonique et biphotonique, en raison d'une importante production de ROS lors de l'irradiation lumineuse des cellules cancéreuses traitées avec les nanoparticules. Les mesures du potentiel zêta des PMINPs ont révélé la présence de charges de surface positives qui ont favorisé l'adsorption des molécules de siRNA et de BODIPY. La complexation du siRNA a ensuite été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. De plus, les PMINPs ont formé des complexes stables avec le siRNA (jusqu'à 24 heures) et ont été efficacement internalisés dans les cellules après 4 heures d'incubation, principalement avec un processus d'endocytose énergie-dépendant. L'effet PCI est évident sous irradiation lumineuse et a conduit avec succès à l'inhibition de l'expression du gène de la luciférase dans les cellules cancéreuses exprimant la luciférase, alors qu'aucun effet d'extinction du gène n'a été observé en l'absence de lumière. L'action combinée de l'inhibition de l'expression génique par siRNA et la PDT a également été étudiée et a révélé l'existence d'un effet synergique.

Ce travail met en évidence le potentiel des nanoparticules d'ionosilice dopées en porphyrine en tant que nano-vecteurs de médicaments multifonctionnels pour les acides nucléiques, tels que le siRNA, avec une triple capacité à effectuer l'imagerie, la PDT et la PCI.

**MOTS CLÉS** Ionosilice, siRNA, PDT, PCI, délivrance de médicaments, cancer.



## ABSTRACT

We report the use of Periodic Mesoporous Ionosilica Nanoparticles (PMINPs) as versatile nano-objects for imaging, photodynamic therapy (PDT), drug delivery and efficient adsorption and delivery of siRNA into breast cancer cells. Mesoporous ionosilica nanoparticles are well known for several advantages: high specific area and uniformity of both size and shape of pores. In order to confer to these nanoparticles PDT and siRNA photochemical internalization (PCI) properties, a porphyrin derivative was integrated into the ionosilica framework.

For this purpose, we synthesized PMINPs *via* hydrolysis - polycondensation procedures, starting from oligosilylated ammonium and porphyrin precursors. The formation of these nano-objects was attested by transmission electron microscopy. The formed nanoparticles were then thoroughly characterized *via* solid state NMR, nitrogen sorption and dynamic light scattering. The spectral properties of these nanoparticles were also studied using UV-vis and fluorescence spectroscopy, attesting the successful incorporation of the porphyrin derivative.

Our results indicate the formation of highly porous nanorods. A significant PDT effect was observed for both one-photon and two-photon excitation PDT, due to an important ROS production upon light irradiation in nanoparticles treated-breast cancer cells. Zeta potential measurements of PMINPs revealed the presence of positive surface charges which promoted the adsorption of siRNA and BODIPY molecules. The electrostatic complexation of siRNA was then verified by electrophoresis gel retardation assay. Furthermore, PMINPs formed stable complexes with siRNA (up to 24 hours) and were efficiently internalized into the cells after 4 hours incubation mostly with energy-dependent endocytosis process. The PCI effect was obvious under light irradiation and successfully led to luciferase gene silencing in luciferase-expressing breast cancer cells, while no gene silencing effect was observed in the absence of light. The dual effect of gene silencing by siRNA and PDT was also studied and revealed the existence of a synergistic effect.

This work highlights the potential of porphyrin-doped ionosilica nanoparticles as multifunctional drug nanocarriers for nucleic acids, such as siRNA, with a triple ability to perform imaging, PDT and PCI.

**KEYWORDS** Ionosilica, siRNA, PDT, PCI, drug delivery, cancer therapy.



# TABLE DES MATIÈRES

<i>Avant-propos</i> .....	1
<i>Liste des abréviations</i> .....	3
<i>Table des illustrations</i> .....	7
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b><i>Chapitre I</i> : Introduction à la chimie du sol-gel</b> .....	13
1. Les nanoparticules de silice mésoporeuses (MSNs) .....	14
2. Les matériaux hybrides poreux .....	15
2.1. Fonctionnalisation de surface par greffage .....	15
2.2. Co-condensation .....	15
2.3. Organosilices périodiques mésoporeuses (PMOs) .....	16
3. Les ionosilices .....	17
<b><i>Chapitre II</i> : Thérapie photodynamique des cancers</b> .....	19
1. Principe de la PDT .....	19
2. Mécanismes d'action de la PDT .....	21
2.1. Destruction des cellules tumorales .....	21
2.2. Atteintes vasculaires .....	22
2.3. Réponses inflammatoire et immunitaire .....	22
3. Photosensibilisateurs utilisés en PDT .....	23
3.1. Photosensibilisateurs de première génération .....	23
3.2. Photosensibilisateurs de seconde génération .....	23
3.3. Photosensibilisateurs de troisième génération .....	24
3.4. Photosensibilisateurs inorganiques .....	24
4. Les porphyrines .....	24
5. PDT monophotonique vs PDT biphotonique .....	25
6. Applications cliniques de la PDT .....	27
7. Avenir de la PDT en cancérologie .....	29
<b><i>Chapitre III</i> : Thérapie génique anticancéreuse</b> .....	31
1. Définition de la thérapie génique .....	31
2. Exemples d'acides nucléiques utilisés dans la lutte anticancéreuse .....	32
2.1. L'ADN plasmidique .....	32
2.2. L'ARN messenger .....	35
2.3. Les oligonucléotides anti-sens .....	35
3. Phénomène d'interférence par ARN et siRNA .....	37
3.1. Mécanisme d'action du siRNA .....	38
3.2. Utilisation clinique du siRNA .....	39
3.3. Obstacles liés à la délivrance du siRNA .....	41
3.3.1. Modifications chimiques du siRNA .....	42
a) Modification du résidu phosphonate .....	42

b) Modification du ribose .....	42
c) Modification de la base .....	44
3.3.2. Les vecteurs utilisés pour la délivrance du siRNA .....	44
3.3.3. L'échappement endosomal .....	46
<b>Chapitre IV : Internalisation photochimique (PCI) .....</b>	<b>49</b>
1. Principe de la PCI.....	49
2. Mécanisme d'action de la PCI.....	50
3. PCI pour la délivrance de siRNA .....	52
4. Utilisation clinique de la PCI .....	54

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

1. Chemicals and siRNA molecules .....	59
2. PMINPs synthesis .....	59
3. Study of BODIPY loading in PMINPs.....	60
4. Study of BODIPY release from PMINPs .....	60
5. Analytical methods and apparatus.....	61
5.1. Transmission electron microscopy (TEM) .....	61
5.2. CP-MAS solid-state NMR .....	61
5.3. Nitrogen sorption-desorption .....	61
5.4. Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR) .....	61
5.5. Zeta potential and dynamic light scattering (DLS) measurements .....	62
5.6. UV-visible absorption spectroscopy .....	62
5.7. Fluorescence spectroscopy .....	62
6. Biological experiments.....	62
6.1. Cell lines .....	62
6.2. Cytotoxicity assay .....	62
6.3. Photodynamic therapy experiments .....	63
6.4. Cellular reactive oxygen species detection and quantification .....	63
6.5. Photo-degradation of 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) and detection of singlet oxygen .....	63
6.6. Agarose gel retardation assay .....	64
6.7. Evaluation of the stability of the complexes siRNA/PMINPs .....	64
6.8. siRNA/PMINPs complex characterisation .....	64
6.9. Cellular uptake kinetics of PMINPs and siRNA/PMINPs complexes.....	64
6.10. Imaging .....	65
6.11. Mechanism of the cellular uptake of PMINPs and siRNA/PMINPs complexes .....	65
6.12. One-photon induced siFluc delivery and cell luciferase assay .....	65
6.13. Dual evaluation of two-photon excitation PDT and gene silencing using siIAP .....	66
6.14. Study of PCI and endosomal escape mechanism of the complexes siRNA/PMINPs .....	66
6.15. Zebrafish breeding conditions .....	67
6.16. <i>In vivo</i> toxicity study of PMINPs in zebrafish embryos .....	67
6.17. Two-photon excitation PDT study in zebrafish embryos .....	67
7. Statistical analysis .....	68

## RESULTATS ET DISCUSSION

**Chapitre I** : Synthèse et caractérisation des nanoparticules hybrides à base d'ionosilice et de porphyrine..... 71

1. Synthèse et optimisation des PMINPs..... 71
2. Protocole final de synthèse des PMINPs..... 75
3. Caractérisation des PMINPs..... 75

**Chapitre II** : Utilisation des PMINPs comme support efficace pour la réalisation de la thérapie photodynamique anticancéreuse..... 81

1. Etude de la cytotoxicité et de l'internalisation cellulaire des PMINPs ..... 81
2. Etude de l'effet PDT monophotonique..... 82
  - 2.1. PDT utilisant une lumière bleue vs lumière verte..... 82
  - 2.2. Etude des propriétés photochimiques des PMINPs ..... 85
3. Etude de l'effet PDT biphotonique *in vitro*..... 88
4. Etude de l'effet PDT biphotonique *in vivo*..... 90

**Chapitre III** : Utilisation des PMINPs comme vecteur efficace pour la délivrance contrôlée des médicaments..... 95

1. Etude de la délivrance contrôlée du siRNA ..... 95
  - 1.1. Etude de la complexation du siRNA..... 95
  - 1.2. Caractérisation du complexe siRNA/PMINPs..... 97
  - 1.3. Etude de l'internalisation cellulaire des complexes siRNA/PMINPs ..... 98
  - 1.4. Etude de l'activité biologique des complexes siRNA/PMINPs internalisés..... 101
  - 1.5. Mise en évidence du phénomène d'internalisation photochimique (PCI) ..... 104
  - 1.6. Combinaison de la PDT biphotonique et de la thérapie par délivrance de siRNA ..... 105
2. Etude de la délivrance contrôlée du BODIPY (Bdp) ..... 109
  - 2.1. Etude de l'encapsulation du Bdp ..... 109
  - 2.2. Caractérisation des PMINPs chargées avec le Bdp (PMINPs@Bdp)..... 112
  - 2.3. Etude de la libération *in vitro* du Bdp..... 113
  - 2.4. Etude de la libération *in cellulo* du Bdp..... 116
  - 2.5. Etude de la capacité des PMINPs@Bdp à complexer le siRNA ..... 117

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES** ..... 121

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** ..... 127

**ANNEXE** ..... 155



## AVANT-PROPOS

Chaque jour, près de 1000 nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués en France. En 2018, l'Institut National du Cancer a estimé à 382 000 nouveaux cas de cancer et 157 400 décès liés à la même pathologie en France métropolitaine. Chez les hommes, les cancers de la prostate et du poumon sont respectivement les cancers les fréquents et les plus mortels. Pour les femmes, le cancer du sein reste de loin le plus fréquent et le plus mortel. Avec ces chiffres, les cancers en France arrivent en tête des causes de décès chez l'homme et à la deuxième place chez la femme, après les maladies vasculaires.

Améliorer la prévention, réduire les séquelles de la maladie et intensifier la lutte contre les cancers de mauvais pronostic sont les priorités de la nouvelle stratégie décennale. Ces objectifs ne peuvent être atteints qu'avec des méthodes de diagnostic sensibles permettant une détection précoce de la maladie ainsi qu'une prise en charge thérapeutique adéquate reposant sur des outils fiables, et réalisant un compromis entre la qualité de vie du patient et l'efficacité du traitement.

Ainsi, ce travail de thèse de Doctorat réalisé sous la supervision des docteurs Peter Hesemann, Jean-Olivier Durand et Nadir Bettache, entre dans le cadre d'une étroite collaboration entre deux instituts de recherche montpelliérains, l'Institut Charles Gerhardt Montpellier (ICGM) et l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), chacun dans son domaine d'expertise, afin de mettre au point des nanoparticules innovantes et multifonctionnelles, destinées à renforcer l'arsenal théranostique (thérapeutique et diagnostique) dans la lutte contre les cancers.

Ce manuscrit se compose de trois grandes parties :

- La première partie de ce manuscrit est consacrée à la partie bibliographique, qui est subdivisée en plusieurs chapitres, et est entièrement dédiée à l'étude de l'état de l'art.

Dans son premier chapitre, nous introduisons la chimie du sol-gel ainsi que les principales classes de nanoparticules de silice et d'organosilice mésoporeuses, pour enchaîner par la suite avec les ionosilices et les nanoparticules ionosiliciques mésoporeuses, leurs avantages et leurs applications.

Au cours du second chapitre, la thérapie photodynamique est abordée, en définissant son principe, ses mécanismes d'action et ses différents types ainsi que les photosensibilisateurs utilisés. Des exemples de médicaments commercialisés reposant sur le principe de la PDT ainsi que leurs applications cliniques sont cités pour clôturer ce chapitre.

Le troisième chapitre décrit quant à lui la place de la thérapie génique dans le traitement des cancers. Des exemples d'utilisation d'acides nucléiques sont donnés, pour mettre l'accent par la suite

sur la délivrance du siRNA, son importance en tant que stratégie dans le traitement des cancers ainsi que les médicaments commercialisés utilisant cette technologie en thérapeutique humaine.

Le quatrième et dernier chapitre de cette première partie est consacré au mécanisme d'internalisation photochimique (PCI), son principe et ses applications cliniques.

- La seconde partie est la partie expérimentale rédigée en anglais, qui regroupe l'ensemble des caractérisations et protocoles opératoires réalisés.
- La troisième partie est dédiée aux résultats ainsi que la discussion. Tout comme la première partie, cette partie est subdivisée en plusieurs chapitres.

Le premier chapitre décrit la synthèse et la caractérisation des nanoparticules hybrides PMINPs, synthétisées à base d'ionosilice et de porphyrine. Diverses caractérisations morphologiques, chimiques, physico-chimiques et texturales ont été effectuées.

Le deuxième chapitre s'intéresse à l'utilisation des PMINPs en tant que support pour réaliser la thérapie photodynamique anti-cancéreuse et l'étude de leurs propriétés photochimiques ainsi que leur aptitude à générer un stress oxydatif intracellulaire après irradiation lumineuse monophotonique ou biphotonique. Une partie de ce chapitre aborde aussi les essais de PDT biphotonique *in vivo*, chez des embryons de poisson-zèbre, comportant des xénogreffes de cellules tumorales humaines.

Le troisième chapitre est consacré à l'utilisation des PMINPs comme vecteur pour la délivrance contrôlée de médicaments. Nous décrivons dans un premier temps la capacité des PMINPs à encapsuler le siRNA et à le délivrer à l'intérieur des cellules par mécanisme d'internalisation photochimique, déclenchée par une irradiation lumineuse. Nous exposons également l'avantage d'une thérapie combinée, associant le siRNA à la PDT biphotonique. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la délivrance du BODIPY qui a été encapsulé avec succès et libéré par la suite de l'intérieur des porosités des PMINPs. Cette étude est réalisée comme preuve de concept, étant donné que le BODIPY est dénué de toute activité pharmacologique. Il est utilisé comme produit fluorescent permettant de visualiser son relargage intracellulaire par microscopie confocale.

Enfin, une conclusion générale résumant les principaux résultats obtenus ainsi que des perspectives envisageables en vue d'une étude plus approfondie ou dans le but d'une amélioration des performances des PMINPs vont clôturer ce manuscrit.

**N.B.** Les références des études cliniques citées dans ce manuscrit peuvent être consultées sur le site internet : *clinicaltrials.gov*

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

### A

ADN	Acide désoxyribonucléique
Ago2	Agronaute 2
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARN	Acide ribonucléique
ATR	Attenuated Total Reflectance

### B

Bdp	BODIPY
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Barrett-Joyner-Helenda

### C

CI	Combination Index
CMV	Cytomégalovirus
CP-MAS	Cross-Polarization Magic Angle Spinning

### D

DCFDA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
DLC	Drug Loading Content
DLE	Drug Loading Efficiency
DLS	Dynamic Light Scattering
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOX	Doxorubicine
DPBF	1,3-diphenylisobenzofuran
DR	Drug Release
dsRNA	Double strand RNA

### E

EMA	European Medicines Agency
EPR	Enhanced Permeability and Retention
ET	Ecart-type

## **F**

FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Fourier Transform-Infrared Spectrometry
fwr	Feed weight ratio

## **G**

GFP	Green Fluorescent Protein
GNA	Glycol Nucleic Acid

## **H**

HDL	High Density Lipoprotein
Hp	Hematoporphyrine
HSV-TK	Herpes Simplex Virus-Thymidine Kinase

## **I**

IAP	Inhibitor of Apoptotic Protein
IL	Interleukine
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

## **K**

KJS	Kruk-Jaroniec-Sayari
-----	----------------------

## **L**

LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LDL	Low Density Lipoprotein
Lipo	Lipofectamine
LNA	Locked Nucleic Acid
LUC	Luciférase

## **M**

MCM	Mobil Corporation of Matter
MeTrisN	Methyl-(tris(3-trimethoxysilyl)propyl) ammonium iodide
MSNs	Mesoporous Silica Nanoparticles

MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

## N

NIR Near Infrared

NPs Nanoparticules

## O

OPE One-Photon Excitation

## P

PBS Phosphate Buffered Saline

PCI Photochemical Internalization

PDI Polydispersity Index

PDT Photodynamic Therapy

PEG Polyethylene glycol

PLL Poly-L-Lysine

PMINPs Periodic Mesoporous Ionosilica Nanoparticles

PMOs Periodic Mesoporous Organosilicas

PS Photosensibilisateur

## R

RF Remaining Fluorescence

RFP Red Fluorescent Protein

RIPs Ribosomes Inactivating Proteins

RISC RNA-Induced Silencing Complex

RNAi RNA interference

RMN Résonance Magnétique Nucléaire

ROS Reactive Oxygen Species

## S

SBA-15 Santa Barbara Amorphous-15

SD Standard Deviation

SHS Sodium n-hexadecylsulfate

siCtrl siRNA Contrôle négatif

siFluc siRNA dirigé contre la luciférase

siIAP	siRNA dirigé contre les protéines inhibitrices d'apoptose
siRNA	small-interfering RNA
SSA	Specific Surface Area

## T

TBE	Tris-Borate-EDTA
TEB	1,3,5-triethylbenzène
TEM	Transmission Electron Microscopy
TEOS	Tétraéthyle orthosilicate
TF	Total Fluorescence
TMOS	Tétraméthyle orthosilicate
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPCS <sub>2a</sub>	Tétraphényl-chlorine disulfonate
TPE	Two-Photon Excitation
TPPS <sub>2a</sub>	Tétraphényl-porphyrin disulfonate

## U

UNA	Unlocked Nucleic Acid
UV-vis	Ultraviolet-visible

## Z

ZF	Zebrafish
----	-----------

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1.</b> Structures mésoporeuses des matériaux M41S .....	14
<b>Figure 2.</b> Les différentes voies d'obtention de matériaux hybrides.....	16
<b>Figure 3.</b> Principes de base de la PDT.....	21
<b>Figure 4.</b> Structures de bases de certains exemples de photosensibilisateurs utilisés en PDT .....	23
<b>Figure 5.</b> Les deux formes d'agrégation des porphyrines : agrégats H et agrégats J.....	25
<b>Figure 6.</b> Profondeur de la pénétration des rayonnements lumineux à travers les tissus biologiques .....	26
<b>Figure 7.</b> Principe de l'absorption et de la fluorescence biphotonique.....	27
<b>Figure 8.</b> Structure du siRNA.....	38
<b>Figure 9.</b> Mécanisme d'action du siRNA aboutissant à la dégradation de l'ARNm cible .....	39
<b>Figure 10.</b> Structure des modifications chimiques du siRNA .....	43
<b>Figure 11.</b> Différences d'internalisation des drogues entre un tissu normal et un tissu tumoral mettant en jeu l'effet EPR .....	45
<b>Figure 12.</b> Endocytose d'un produit et son destin à l'intérieur des cellules .....	47
<b>Figure 13.</b> PDT vs PCI .....	49
<b>Figure 14.</b> Précurseurs utilisés pour la synthèse des PMINPs.....	72
<b>Figure 15.</b> Imagerie des nanoparticules par microscopie électronique à transmission.....	73
<b>Figure 16.</b> Caractérisation des PMINPs par TEM et DLS.....	76
<b>Figure 17.</b> Etude des propriétés texturales des PMINPs .....	77
<b>Figure 18.</b> Caractérisation chimique des PMINPs.....	77
<b>Figure 19.</b> Caractérisation physico-chimique des PMINPs.....	78
<b>Figure 20.</b> Spectroscopie FT-IR .....	79
<b>Figure 21.</b> Etude de la cytotoxicité des PMINPs réalisée sur deux lignées cellulaires : MDA-MB-231 et HUVECs.....	81
<b>Figure 22.</b> Etude de l'internalisation cellulaire des PMINPs par microscopie confocale dans les cellules MDA-MB-231.....	82
<b>Figure 23.</b> Etude de l'effet PDT monophotonique des PMINPs sur des cellules MDA-MB-231.....	83

<b>Figure 24.</b> Détection intracellulaire des ROS en utilisant le DCFDA après excitation monophotonique .....	86
<b>Figure 25.</b> Détection spectrale de la production photo-induite d'oxygène singulet à 410 nm, en utilisant le DPBF seul ou mélangé aux PMINPs, puis exposés ou non aux irradiations bleue ou verte .....	87
<b>Figure 26.</b> Etude de la PDT biphotonique dans le proche infrarouge à : 780 nm, 860 nm et 1064 nm .....	88
<b>Figure 27.</b> Détection intracellulaire des ROS en utilisant le DCFDA après excitation biphotonique .....	89
<b>Figure 28.</b> Etude de la toxicité des PMINPs <i>in vivo</i> sur œufs fécondés de poisson-zèbre, injectés (ou non) avec des suspensions de PMINPs .....	91
<b>Figure 29.</b> Etude de l'effet PDT biphotonique des PMINPs <i>in vivo</i> chez des embryons de ZF de 48 hpf ( n = 12) comportant des xénogreffes de cellules MDA-MB-231 pré-incubées avec les PMINPs ....	93
<b>Figure 30.</b> Etude de la complexation du siRNA par les PMINPs par la méthode de gel retard .....	96
<b>Figure 31.</b> Caractérisation des complexes siCtrl/PMINPs .....	98
<b>Figure 32.</b> Etude de l'internalisation cellulaire par mesures des intensités de fluorescence dans des cellules MDA-MB-231 traitées avec les PMINPs et les complexes siCtrl/PMINPs.....	99
<b>Figure 33.</b> Images de microscopie confocale des cellules MDA-MB-231 traitées (ou non) avec les PMINPs libres et les complexes siCtrl-ATTO-488/PMINPs .....	100
<b>Figure 34.</b> Etude de l'effet de la température sur l'internalisation cellulaire en utilisant des cellules MDA-MB-231 incubées avec PMINPs libres ou avec les complexes siCtrl-ATTO-488/PMINPs pendant 4 heures, à 4°C et à 37°C .....	101
<b>Figure 35.</b> Evaluation de l'activité biologique des complexes siFluc/PMINPs internalisés dans des cellules MDA-MB-231 qui expriment la luciférase, et qui sont exposées (ou non) à des irradiations lumineuses .....	102
<b>Figure 36.</b> Images de microscopie confocale de cellules MDA-MB-231 traitées (ou non) par les complexes siCtrl/PMINPs pendant 8 heures, puis exposées (ou non) à une lumière verte .....	104
<b>Figure 37.</b> Combinaison de l'effet PDT biphotonique avec la délivrance de siAP pro-apoptotique .....	106
<b>Figure 38.</b> Etude de l'effet de la combinaison de la PDT biphotonique avec la délivrance de siAP après irradiation par LASER pulsé en utilisant le logiciel CompuSyn .....	107
<b>Figure 39.</b> Structure chimique du bodipy (Bdp) utilisé .....	109
<b>Figure 40.</b> Etude de l'encapsulation du Bdp par les PMINPs en calculant la teneur en Bdp encapsulé (DLC) ainsi que l'efficacité d'encapsulation du Bdp (DLE) à (a) pH = 7 et (b) pH = 8.5.....	110

<b>Figure 41.</b> Spectres UV-vis réalisés dans l'eau Milli-Q de (a) PMINPs libres et du Bdp libre et des (b) culots de centrifugation récupérés après la réaction d'encapsulation du Bdp aux fwr de 100%, aux deux pH 7 et 8.5 .....	112
<b>Figure 42.</b> Etude de la cinétique de libération du Bdp à partir des PMINPs@Bdp sous l'effet du pH par calcul du taux de libération (DR) .....	114
<b>Figure 43.</b> Spectres UV-vis réalisés sur les culots de centrifugation récupérés à la fin de la réaction de libération du Bdp aux pH 4 et 7.4 .....	115
<b>Figure 44.</b> Images de microscopie confocale obtenues à partir de cellules MDA-MB-231 traitées (ou non) par les PMINPs ou les PMINPs@Bdp .....	116
<b>Figure 45.</b> Etude de la complexation du siRNA par les PMINPs@Bdp par méthode de gel retard..	117
*****	
<b>Schéma 1.</b> Réaction générale du sol-gel .....	13
<b>Schéma 2.</b> Principe général de la thérapie photodynamique (PDT) .....	19
<b>Schéma 3.</b> Diagramme de Jablonski adapté pour illustrer les effets de la PDT.....	20
*****	
<b>Tableau 1.</b> Liste non-exhaustive de photosensibilisateurs commercialisés pour diverses indications .....	28
<b>Tableau 2.</b> Liste non exhaustive d'essais cliniques de thérapies géniques basées sur la délivrance d'ADN plasmidique .....	33
<b>Tableau 3.</b> Liste non exhaustive d'essais cliniques de thérapies géniques basées sur la délivrance d'ARN messager .....	34
<b>Tableau 4.</b> Liste des médicaments approuvés par la FDA utilisés en thérapie génique reposant sur la délivrance d'oligonucléotides anti-sens .....	36
<b>Tableau 5.</b> Liste non exhaustive d'essais cliniques de thérapies géniques basées sur la délivrance de siRNA.....	40
<b>Tableau 6.</b> Liste des médicaments à base de siRNA commercialisés (Juillet 2021) utilisés en médecine humaine .....	41
<b>Tableau 7.</b> Exemples de systèmes nanoparticulaires utilisés pour la délivrance du siRNA : avantages et inconvénients.....	46
<b>Tableau 8.</b> Exemples de systèmes particuliers utilisés pour la délivrance de siRNA, dont le mécanisme d'action repose sur le principe de la PCI.....	53
<b>Tableau 9.</b> Résumé des différentes quantités de précurseurs (1) et (2) utilisés pour les différents ratios molaires pour la synthèse des nanoparticules.....	73

<b>Tableau 10.</b> Résumé des résultats obtenus lors de la caractérisation des nanoparticules synthétisées par TEM, DLS et par sorption d'azote ( $S_{BET}$ : surface spécifique calculée par la méthode BET, VP : volume poreux, DP : diamètre de pores).....	74
<b>Tableau 11.</b> Comparaison entre divers systèmes PDT nanoparticulaires .....	84
<b>Tableau 12.</b> Exemples de thérapies anticancéreuses basées sur l'association de la PDT et du siRNA .....	108
<b>Tableau 13.</b> Etude comparative entre les DLC de divers systèmes nanoparticulaires utilisés pour la délivrance de médicaments .....	111
<b>Tableau 14.</b> Résultats des mesures de potentiel zêta réalisées sur les PMINPs@Bdp obtenues aux différents fwr, dans de l'eau et à pH 7.....	113

**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**



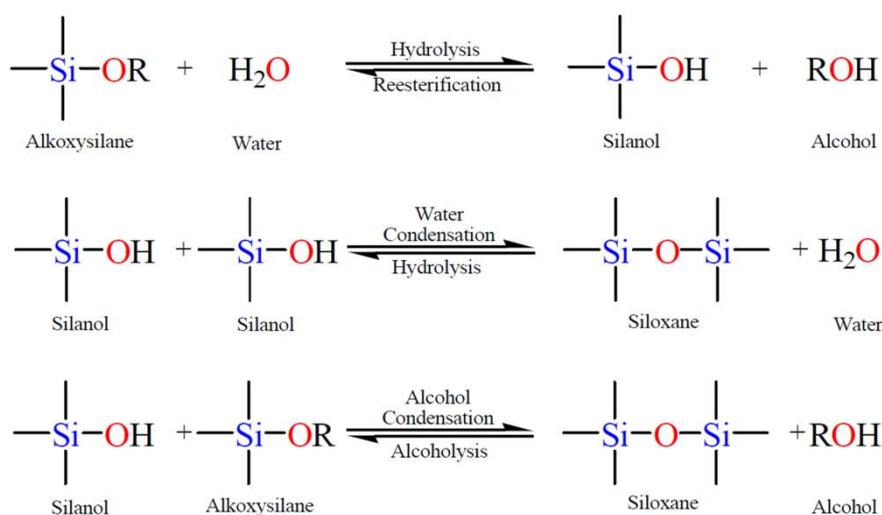
## CHAPITRE I : INTRODUCTION À LA CHIMIE DU SOL-GEL

La chimie sol-gel, autrefois appelée « chimie douce », a été largement utilisée durant les années 70 du siècle dernier, au moment où les réactions sol-gel ont montré leur aptitude à produire une grande variété de réseaux inorganiques. Ces réactions ont ainsi permis de transformer une solution aqueuse d'alcoxydes métalliques ou métalloïdiques, le plus souvent des alcoxydes de silicium ou encore d'aluminium, zirconium ou titane, en un réseau solide inorganique.<sup>1</sup>

Les réactions sol-gel sont aussi capables de produire des matériaux vitreux d'oxydes inorganiques, homogènes, d'une grande pureté ainsi qu'à une température modérée, proche de l'ambiante, et surtout bien plus basse que les températures utilisées dans les procédés conventionnels de l'industrie du verre de l'ordre de 1300 - 1500°C.<sup>2</sup> Elles présentent aussi l'avantage d'avoir la possibilité de produire une silice sous différentes formes : couches minces, fibres, aérogels, xérogels ou encore des matériaux poreux pour diverses applications.

Le procédé sol-gel implique des réactions d'hydrolyse et de condensation de monomères alcoxydes inorganiques. Avant que l'état « gel » ne soit atteint, le système est dans un état liquide « sol » constitué d'un mélange d'oligomères colloïdaux et de monomères partiellement hydrolysés. Le gel sera constitué d'un réseau d'oxyde ou on observe l'établissement de liaisons chimiques assurant la cohésion mécanique du matériau en lui conférant un caractère rigide et non déformable. Les alcoxydes, comme le tétraméthoxysilane (TMOS) ou le tétraéthoxysilane (TEOS), sont les alcoxydes les plus fréquemment utilisés due à leur hydrolyse facile en présence d'eau à pH neutre, acide ou alcalin, et leur condensation suite à la formation de liaisons covalentes « siloxanes ».<sup>3</sup> Le mécanisme général des réactions d'hydrolyse et de condensation impliquant un alcoxyde de silicium est illustré dans le schéma 1.

*Schéma 1. Réaction générale du sol-gel.*<sup>3</sup>

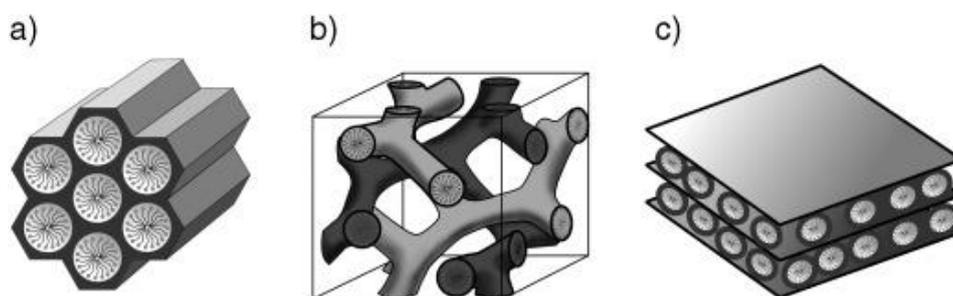


## 1. Les Nanoparticules de Silice Mésoporeuses (MSNs)

Stöber *et al.* ont été les premiers en 1968 à avoir décrit la synthèse de particules de silice monodisperse, en utilisant un précurseur de silice à base de silicate de tétra-alkyl dans un mélange d'eau/éthanol et en présence d'ammoniaque comme catalyseur.<sup>4</sup> En 1971, un premier brevet a été déposé par Chiola *et al.* portant sur la synthèse de matériaux de silice mésoporeuse, obtenus par hydrolyse et condensation du TEOS en présence d'un surfactant cationique.<sup>5</sup>

Selon la classification de l'IUPAC, les noms des matériaux poreux leur sont attribués en fonction de leurs tailles de pores. On retrouve la catégorie des matériaux microporeux avec le diamètre le plus faible qui est inférieur à 2 nm, et à l'opposé les matériaux macroporeux ou le diamètre de pores est supérieur à 50 nm. Entre les deux catégories, on retrouve les matériaux mésoporeux dont le diamètre de pore est compris entre 2 et 50 nm.<sup>6</sup>

Les matériaux à base de silice mésoporeuse sont restés en grande partie inconnus et inexplorés jusqu'en 1990, année au cours de laquelle le groupe de Kuroda publie pour la première fois le procédé de synthèse de cette classe de matériaux. En 1992, des chercheurs de la Mobil Oil Corporation ont mis au point la synthèse d'une nouvelle classe de matériaux siliciques mésoporeux. Cette synthèse se fait sous des conditions alcalines et en utilisant un surfactant de nature anionique. Cette nouvelle classe développée est celle des M41S, incluant les MCM (Mobil Corporation of Matter), et renferme les matériaux MCM-41 à structure hexagonale<sup>7</sup>, les MCM-48 à structure cubique<sup>8</sup> ainsi que les MCM-50 à structure lamellaire<sup>9</sup> (figure 1). En 1998, un groupe de chercheurs de l'université Santa Barbara en Californie, synthétisait pour la première fois des silices mésoporeuses par modification du pH et de la nature du surfactant. L'utilisation d'un surfactant non-ionique de type triblock copolymère Pluronic P123 en milieu acide a ainsi conduit aux matériaux SBA-15 (Santa Barbara Amorphous-15).<sup>10</sup>



**Figure 1.** Structures mésoporeuses des matériaux M41S : a) MCM-41 à structure hexagonale, b) MCM-48 à structure cubique et c) MCM-50 à structure lamellaire.<sup>11</sup>

## 2. Les matériaux hybrides poreux

La combinaison des propriétés des matériaux organiques et inorganiques, en un seul matériau unique a bénéficié d'une attention particulière au sein de la communauté des chimistes des matériaux. En effet, cela donne la possibilité de combiner de nombreuses fonctionnalités apportées par une fraction organique, à une matrice silicique inorganique hydrophile, poreuse, robuste sur les plans mécanique et chimique, en plus des multiples possibilités de mise en forme.<sup>11</sup>

La synthèse de matériaux hybrides poreux peut se faire de différentes manières (figure 2) :

### 2.1. Fonctionnalisation de surface par greffage

Dans ce cas, la fonctionnalisation de surface intervient en post-synthèse. Elle consiste en la formation d'une liaison covalente entre une molécule organique et un support de silice préformé. La surface des matériaux siliciques synthétisés est constituée de deux différentes entités. On retrouve les liaisons covalentes de type siloxanes (Si-O-Si), hydrophobes et faiblement réactives. Et on retrouve aussi les groupements silanols (Si-OH) hautement impliqués dans la réactivité de la silice et responsables de la possibilité de sa fonctionnalisation. Ces groupements vont pouvoir réagir avec des organo-silanes de type  $\text{RSi}(\text{OR}')_3$ , ou plus rarement avec des chloro-silanes  $\text{ClSiR}_3$  ou encore avec des silazanes  $\text{HN}(\text{SiR}_3)_2$ .<sup>11</sup>

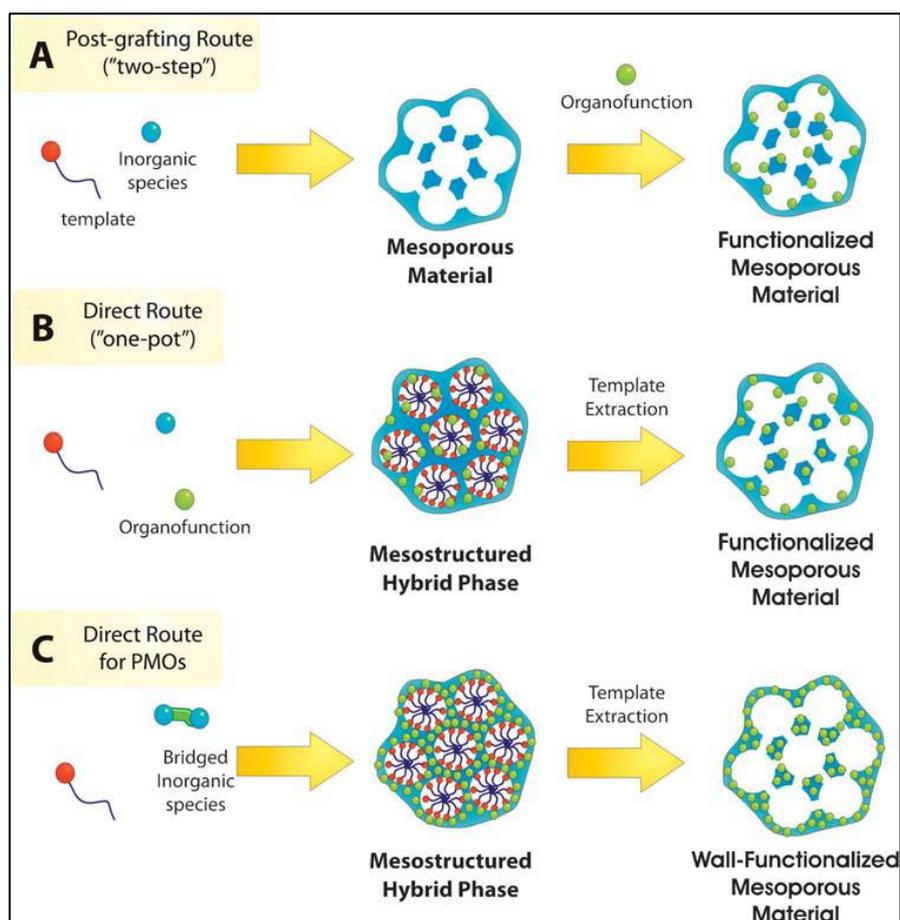
### 2.2. Co-condensation

L'obtention de matériaux hybrides poreux peut être réalisée aussi par co-condensation en une seule réaction directe, comme ce qu'a été effectué par les groupes de Shea<sup>12</sup>, Mann<sup>13</sup>, Macquarrie<sup>14</sup> et Stein<sup>15</sup>. Cette méthode de co-condensation consiste en un co-assemblage d'un alcoxyosilane avec un alcoxyorganosilane de type  $\text{RSi}(\text{OR}')_3$  selon le procédé d'hydrolyse-condensation, en présence d'un agent tensioactif et sous conditions acide ou basique. Contrairement à la fonctionnalisation par greffage post-synthèse, cette voie de synthèse directe permet l'incorporation des fonctions organiques au fur et à mesure de la constitution du réseau silicique. Cela donne lieu généralement à une distribution relativement homogène et uniforme des groupements organiques sur l'ensemble de la matrice silicique par rapport aux matériaux fonctionnalisés obtenus par la méthode de greffage.

Il a été rapporté dans la littérature qu'une utilisation d'alcoxyorganosilane à un pourcentage élevé en co-condensation avec du TEOS conduisait à une perte de l'organisation des silices méso-structurées, avec baisse du volume poreux et de la surface spécifique. Ainsi, pour une meilleure maîtrise du procédé de synthèse par co-condensation, il est recommandé d'utiliser des quantités de groupements organiques à une fraction molaire située entre 5-15 mol%.<sup>16</sup>

### 2.3. Organosilices Périodiques Mésoporeuses (PMOs)

Les matériaux PMOs ont été décrits pour la première fois en 1999, au cours de travaux réalisés par trois différents groupes de recherches : Inagaki<sup>17</sup>, Stein<sup>18</sup> et Ozin<sup>19</sup>. Cette nouvelle génération de matériaux PMOs a été obtenue par procédé sol-gel, où la polycondensation d'alcoxy-silanes-pontés de type  $(R'O)_3Si-R-Si(OR')_3$  est guidée par des agents tensioactifs responsables de l'architecture organisée du matériau, en l'absence de toute source de silice. Le procédé de synthèse des PMOs permet d'avoir une homogénéité totale dans la distribution des motifs organiques au sein de la matrice silicique, comparée aux deux méthodes citées précédemment.<sup>11</sup> Il est à noter qu'avoir un taux élevé de fraction organique associé à une porosité élevée et accessible n'est pas réalisable avec les MSNs post-greffés, où on observe une baisse significative de la surface spécifique et du volume poreux après greffage, à cause de l'espace occupé par les fractions organiques sur la surface interne des mésopores.<sup>20-21</sup> La modulation de l'hydrophilie/hydrophobie des pores va permettre aussi d'augmenter la capacité de chargement en médicament. Les PMOs permettent également une facilité de greffages post-synthèse de molécules à la surface par de simples réactions de chimie organique classique.<sup>22-24</sup>



**Figure 2.** Les différentes voies d'obtention de matériaux hybrides poreux : A) par greffage en post-synthèse, B) par co-condensation et C) synthèse directe des PMOs. Adaptée de la référence<sup>25</sup>.

### 3. Les ionosilices

Les ionosilices constituent une nouvelle famille qui a récemment émergé et qui se définit comme un ensemble de matériaux fonctionnels dans la sphère des matériaux hybrides organiques-inorganiques. Les ionosilices sont obtenues par procédé sol-gel à partir de précurseurs ioniques oligosilylés. Une grande variété de composés ioniques a été utilisée pour la formation de matériaux ionosiliciques hybrides portant des sous-structures d'ammonium ou d'imidazolium. Considérées comme une catégorie spécifique des organosilices, les ionosilices présentent l'avantage de combiner les propriétés texturales et morphologiques de la silice avec la versatilité chimique des liquides ioniques.<sup>26-29</sup>

D'une part, les ionosilices ont montré une grande polyvalence chimique et physico-chimique due au nombre élevé d'espèces ioniques réparties uniformément au sein d'une matrice de silice hybride.<sup>12, 30-32</sup> Elle dépend aussi du nombre important de combinaisons cation/anion possibles. En effet, l'hydrophilicité de ces ionosilices est intimement liée à la nature du contre-ion. À titre d'exemple, les halogénures vont générer des ionosilices hydrophiles, contrairement aux thiocyanates ou une baisse d'hydrophilicité a pu être constatée.<sup>33-34</sup>

D'autre part, les ionosilices ont la capacité d'adopter des morphologies et textures variables, de la même façon que les matériaux siliciques obtenus par des réactions sol-gel.<sup>7, 35-37</sup> Ainsi, il a été possible d'obtenir des matériaux ionosiliciques faiblement poreux, jusqu'à des matériaux hautement poreux de l'ordre de 1000 m<sup>2</sup>/g, grâce à l'utilisation d'un agent tensioactif.<sup>38</sup> Parmi les différentes morphologies qu'il est possible d'obtenir par sol-gel, on retrouve les nanoparticules.

Les nanoparticules ionosiliciques mésoporeuses ont été obtenues en utilisant la technique de Stöber modifiée. Beaucoup d'études au sein de notre équipe se sont intéressées aux diverses applications de ces nano-objets telles que la catalyse<sup>26</sup>, la séparation par échange ionique<sup>39</sup>, et particulièrement, leurs applications dans le domaine biomédical. Ces nanoparticules ont montré une faible cytotoxicité, une grande hydrophilie et mésoporosité ainsi qu'une bonne stabilité et dispersibilité dans les milieux aqueux. Tous ces critères ont favorablement ouvert la voie à leur utilisation dans des applications médicales *in vitro* et *in vivo*, comme potentiels vecteurs pour la délivrance des médicaments. A titre d'exemple, les nanoparticules ionosiliciques ont été utilisées comme véhicules pour la délivrance de médicaments anioniques, comme le diclofénac<sup>40</sup>, un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien, et la gemcitabine monophosphate<sup>41</sup>, un médicament anti-cancéreux. Récemment, nous avons pu démontrer aussi, le fort potentiel des nanoparticules ionosiliciques à complexer des acides nucléiques chargés négativement comme le siRNA par des interactions électrostatiques, grâce au nombre important de charges positives à leurs surfaces, ce qui sera détaillé par la suite.<sup>42</sup>

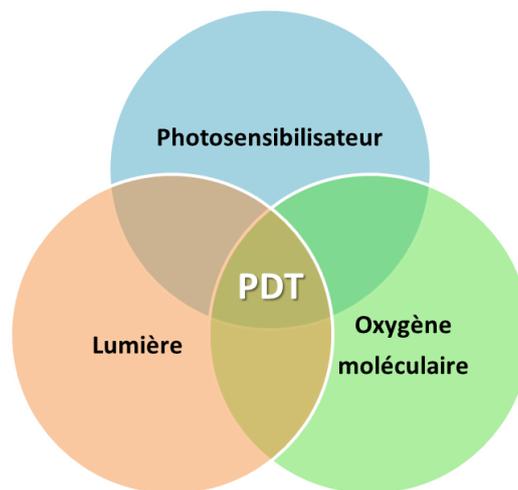


## CHAPITRE II : THÉRAPIE PHOTODYNAMIQUE DES CANCERS

Appelée aussi la photothérapie dynamique, la PDT présente de nombreuses applications, cependant, nous allons nous focaliser uniquement sur l'application anticancéreuse. La PDT est alors une intervention oncologique alternative pour l'ablation de la tumeur et la préservation de la fonction des tissus sains. Depuis son invention au début du XXe siècle par Raab et sa première démonstration moderne par Dougherty *et al.* en 1975 pour le traitement de différents types de tumeurs chez des souris, la PDT a fait l'objet d'importantes études et est devenue une méthode de traitement spécifique et localisée de la maladie.<sup>43</sup> Essentiellement, il s'agit de l'administration d'un photosensibilisateur (PS) localisant la tumeur, suivie de son éclairage local avec une lumière d'une longueur d'onde spécifique pour activer le PS.

### 1. Principe de la PDT

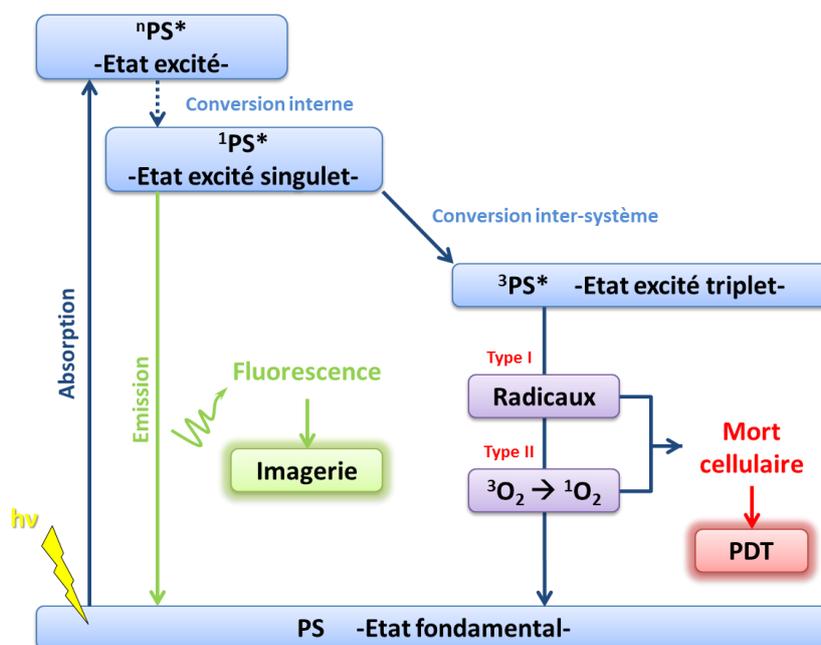
Afin de pouvoir exercer un effet photodynamique, il est nécessaire de réunir un certain nombre de conditions. En effet, le terme « action photodynamique » est utilisé dans le domaine de la photobiologie afin de désigner des photosensibilisateurs dont l'action est dépendante de la consommation d'oxygène moléculaire présent dans le milieu. Ainsi trois acteurs clés sont indispensables à une action PDT (schéma 2) : (i) un photosensibilisateur ; (ii) une lumière à une longueur d'onde adéquate ; et (iii) l'oxygène moléculaire.<sup>44-47</sup>



**Schéma 2.** Principe général de la thérapie photodynamique (PDT).

Un photosensibilisateur va absorber un photon de lumière ( $h\nu$ ) et va ainsi passer de l'état fondamental (PS) à un état excité ( $^n\text{PS}^*$ ) de courte durée de vie. Le photosensibilisateur va être stabilisé par passage à un état excité singulet ( $^1\text{PS}^*$ ) de plus faible énergie, par phénomène de conversion interne (schéma 3). A ce stade, le photosensibilisateur excité pourra soit revenir à l'état

fondamental par émission de fluorescence, une propriété qui peut être exploitée pour l'imagerie et la photo-détection ; soit il peut subir une conversion inter-système par laquelle le spin de son électron excité s'inverse pour former un état triplet ( $^3\text{PS}^*$ ) à durée de vie relativement plus longue. Le photosensibilisateur au niveau d'excitation triplet peut alors interagir directement avec un substrat, tel que la membrane cellulaire ou une molécule, et transférer un proton ou un électron pour former un radical anion ou cation, respectivement, qui réagira ensuite avec l'oxygène moléculaire pour produire des espèces réactives oxygénées (ROS) tels que les anions superoxydes, les radicaux hydroxyles et peroxydes d'hydrogène (réaction de type I). Alternativement, l'énergie du photosensibilisateur excité peut être directement transférée à l'oxygène moléculaire, pour produire de l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$  (réaction de type II). Les produits ainsi formés à la suite des réactions de type I et de type II sont responsables de la mortalité cellulaire et de l'effet thérapeutique de la PDT. Il est important de noter que les réactions de type I et de type II peuvent se produire simultanément. Cependant, la plupart des études indiquent la prévalence des réactions de PDT de type II, donc l'oxygène singulet joue un rôle prédominant dans la PDT.<sup>48-51</sup>



*Schéma 3. Diagramme de Jablonski adapté pour illustrer les effets de la PDT.*

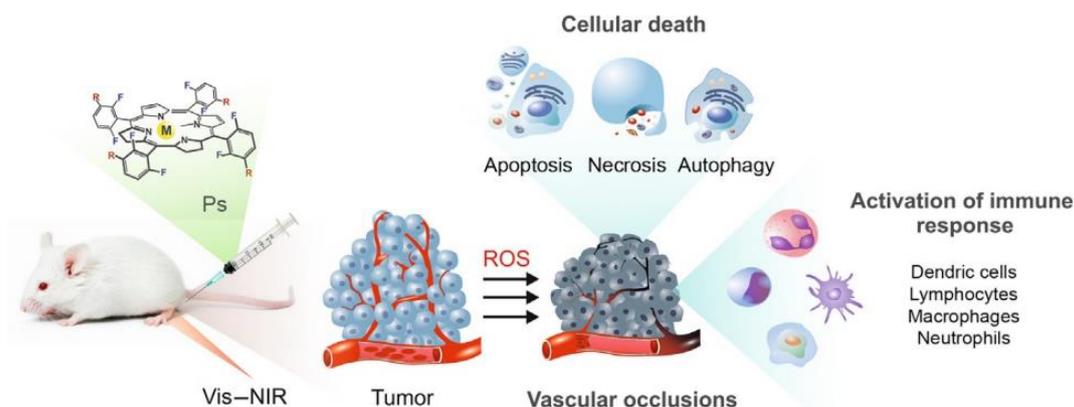
Les photosensibilisateurs peuvent être administrés de deux façons différentes. Par voie topique, en application locale (émulsion, crème, injection sous-cutanée) ou par administration systémique, par voie intraveineuse ou par voie orale. Après un certain temps en post-administration, et peu importe la voie utilisée, le photosensibilisateur va s'accumuler au niveau du tissu tumoral, qui sera par la suite activé en utilisant une lumière à la longueur d'onde appropriée afin d'induire le mécanisme de photothérapie dynamique.

## 2. Mécanismes d'action de la PDT

Suite à l'exposition du tissu néoplasique (préalablement traité avec le PS) à une irradiation et l'enclenchement du mécanisme de la PDT, l'étendue et l'importance des destructions tumorales photo-induites dépendent de divers facteurs<sup>52-55</sup> :

- Le PS : son type, sa concentration, sa localisation dans le microenvironnement tumoral ou sa localisation subcellulaire au moment de l'irradiation et le délai entre l'administration du PS et l'irradiation lumineuse.
- L'irradiation : sa puissance, sa durée et la dose d'énergie transmise en  $J/cm^2$ .
- La tumeur : son type, son volume, sa localisation dans les tissus et son niveau d'oxygénation.

La PDT de par son mécanisme d'action anti-tumorale va agir à différents niveaux et sur diverses cibles afin de lutter efficacement contre le cancer (figure 3).



**Figure 3.** Principes de base de la PDT : un PS est administré puis activé par la lumière visible ou NIR après un temps défini. Les ROS photo-induits vont entraîner la mort des cellules tumorales, la destruction de la néo-vascularisation accompagnées de l'induction de réactions inflammatoires locales et du développement d'une immunité anti-tumorale systémique.<sup>56</sup>

### 2.1. Destruction des cellules tumorales

Les sites d'accumulation du PS dans les cellules cancéreuses correspondent en général aux sites où sont observés les dommages cellulaires photo-induits. En effet, cela est principalement dû aux propriétés des espèces chimiques oxydantes produites suite à l'effet PDT. Ces espèces se caractérisent par une demi-vie très brève de 0.03 à 0.18 ms, avec une diffusion très limitée dans le milieu ne dépassant pas un diamètre de  $0.02 \mu m$ .<sup>57-58</sup> Les dégradations irréversibles photo-induites à l'intérieur des cellules cancéreuses concernent essentiellement l'oxydation des lipides, des acides aminés et des protéines, ayant un impact direct sur des cibles vitales comme les membranes plasmiques, les mitochondries, l'appareil de Golgi, les lysosomes et le réticulum endoplasmique.

Le but ultime de la PDT est celui d'entraîner la mort cellulaire. Cette mort cellulaire peut se produire de différentes façons : par apoptose, par nécrose ou par autophagie.<sup>59-60</sup>

La mort cellulaire nécrotique, souvent déclenchée par des doses élevées de PS et/ou de lumière, se caractérise généralement par une rupture de la membrane plasmique, entraînant la libération du contenu intracellulaire, et déclenchant une réponse inflammatoire.

La mort cellulaire apoptotique se caractérise par une fragmentation nucléaire, une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN chromosomique et la formation de corps apoptotiques qui seront éliminés *in vivo* par phagocytose, empêchant ainsi le déclenchement d'une réponse inflammatoire. Dans certaines situations, la cellule emprunte une voie alternative de mort cellulaire, c'est la voie autophagique.

## **2.2. Atteintes vasculaires**

L'oxygène et les différents nutriments sont les deux éléments indispensables à la survie des cellules tumorales. Plus la masse tumorale croît, plus ses besoins deviennent importants. Ainsi, la croissance des tumeurs solides est intimement liée à leur aptitude à induire la néo-angiogenèse.

La vascularisation néoformée, souvent de structure anarchique, présente des défauts dans l'agencement des cellules endothéliales, laissant apparaître entre elles des pores permettant au PS de s'infiltrer et de s'accumuler à l'intérieur de la masse tumorale, c'est l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) qu'on détaillera au prochain chapitre.<sup>61</sup>

Le PS peut également se lier aux protéines et lipoprotéines plasmatiques telles que l'albumine, LDL (low-density lipoprotein) et HDL (high-density lipoprotein), connues pour leur grande affinité envers les cellules endothéliales et l'endothélium vasculaire tumoral en raison de la forte expression de récepteurs spécifiques à leurs surfaces. A ce stade, l'activation du PS entrainera des lésions au niveau des cellules endothéliales, conduisant à la formation de sites thrombogéniques activant ainsi l'agrégation plaquettaire, l'adhésion des leucocytes et une vasoconstriction. Tous ces effets vont conduire à un arrêt partiel ou total du flux sanguin responsable d'une hypoxie tumorale post-PDT.<sup>62-65</sup>

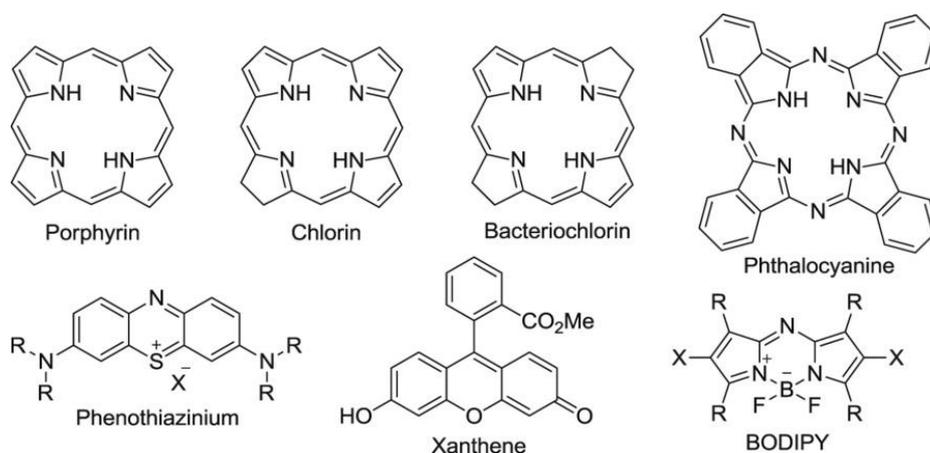
## **2.3. Réponses inflammatoire et immunitaire**

Le principal déclencheur du processus inflammatoire est la libération de médiateurs pro-inflammatoires à partir de la région traitée. Ils comprennent des composants du système du complément, des protéinases, des cytokines, des facteurs de croissance, etc. Différents leucocytes sont alors stimulés tels que les macrophages qui vont éliminer les cellules cancéreuses endommagées par phagocytose et présentent les protéines des cellules tumorales aux lymphocytes T helper CD4, qui activent ensuite les lymphocytes T cytotoxiques CD8. Ainsi, la PDT présente l'avantage supplémentaire d'être un processus de stimulation immunitaire.<sup>66-67</sup>

### 3. Photosensibilisateurs utilisés en PDT

#### 3.1. Photosensibilisateurs de première génération

L'hématoporphyrine (Hp) a été la première porphyrine utilisée comme PS. C'est un mélange complexe de composés porphyriniques, dont la purification et la modification chimique ont conduit à la découverte d'un dérivé d'hématoporphyrine (HpD), qui s'est avéré plus sélectif pour les tissus tumoraux, induisant une photosensibilisation cutanée moins intense par rapport à Hp. Plus tard, un mélange de dimères et d'oligomères de porphyrine, isolés de HpD a été commercialisé sous le nom de Photofrin®. Bien que ce produit ait été largement utilisé pour traiter différents cancers, son utilisation clinique a été fortement limitée par ses propriétés intrinsèques, notamment ; une faible pureté chimique, en effet, le produit commercialisé est un mélange de plus de 60 molécules ; sa longue demi-vie et sa forte accumulation au niveau de la peau, entraînant une photosensibilisation cutanée prolongée de près de 2 à 3 mois après l'administration ; en plus de sa longueur d'onde d'excitation, trop courte pour une pénétration tissulaire optimale.<sup>53, 68</sup>



**Figure 4.** Structures de bases de certains exemples de photosensibilisateurs utilisés en PDT.<sup>69</sup>

#### 3.2. Photosensibilisateurs de seconde génération

Les nombreux obstacles associés à l'utilisation des PSs de première génération ont conduit à d'importantes recherches visant à optimiser l'efficacité des PSs *via* la modification des groupements périphériques de la porphyrine, ou par modification directe du noyau porphyrinique. Ces travaux ont mené à l'émergence d'un nombre important de nouvelles molécules de PSs non porphyrinoïdes. A titre d'exemples (figure 4), on retrouve les métalloporphyrines (Lutrin® et Lutex®), les porphycènes, les bactériophéophorbides (Tookad®), les purpurines (Purlytin®), les phtalocyanines, les chlorines (Foscan®), les précurseurs de la protoporphyrine IX (Hexvix®, Metvix® et Levulan®), les phénothiazines (bleu de méthylène et bleu de toluidine), les cyanines (mérocyanine 540), les dipyrrométhènes, l'hypericine et les xanthènes (Rose Bengal).<sup>69</sup>

### 3.3. Photosensibilisateurs de troisième génération

Une grande partie de la recherche dans ce domaine se concentre sur le développement de PSs de troisième génération qui peuvent être activées avec une lumière d'une longueur d'onde plus longue, et entraînant une photosensibilité généralisée de durée plus courte, grâce à une meilleure spécificité tumorale. En bref, les PSs de 3e génération sont une amélioration des PSs de deuxième génération, et sont souvent obtenus par modification de PSs préexistants par conjugaison avec des entités biologiques comme des peptides ou des anticorps pour atteindre un ciblage spécifique de la tumeur. Les PSs de 3e génération peuvent être obtenus aussi par conjugaison ou encapsulation chimique du PS dans des véhicules permettant son transport efficace dans le sang, du site d'administration au tissu cible, comme les nanoparticules. Bien que de nombreux PSs de troisième génération aient été largement étudiés, peu ont été évalués pour des applications cliniques, parfois par manque de sélectivité *in vivo*, qui a pu être surmonté par le greffage de molécules de ciblage comme le mannose, l'acide folique, etc.<sup>70-75</sup>

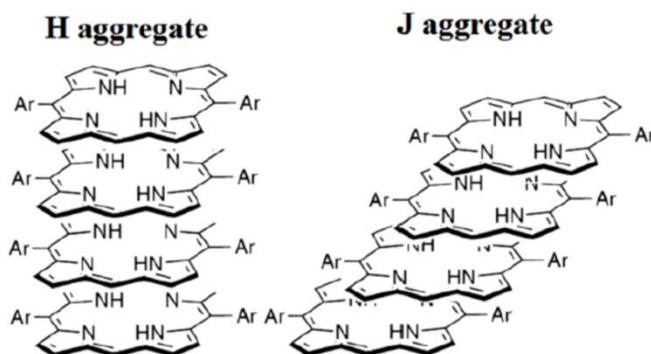
### 3.4. Photosensibilisateurs inorganiques

Après avoir détaillé les PSs organiques, nous allons nous intéresser aux PSs d'origine inorganique développés pour la PDT. Le dioxyde de titane  $\text{TiO}_2$  est utilisé comme un photo-catalyseur capable de générer des ROS suite à une irradiation UV, induisant un important effet phototoxique contre les cancers.<sup>76-78</sup> Les semi-conducteurs comme l'oxyde de zinc  $\text{ZnO}$  ont aussi un grand potentiel en PDT. En effet, ils donnent la possibilité de régler leurs spectres d'absorption avec précision de l'UV au proche infrarouge NIR, en modifiant leurs tailles et compositions.<sup>79</sup> Certaines nanoparticules métalliques (Ag, Pt et Au) peuvent également être utilisées pour générer des ROS.<sup>80</sup> Ces nanoparticules métalliques sont dotées de coefficients d'extinction 4 à 6 fois supérieurs que ceux des PSs organiques, aboutissant à une efficacité plus élevée de génération d'oxygène singulet.<sup>81</sup> Certains PSs inorganiques sont aptes à produire des radicaux hydroxyles par la participation de molécules d'eau au lieu de l'oxygène moléculaire. Ces PSs inorganiques ont ainsi une grande importance dans le traitement des tumeurs solides hypoxiques.<sup>82</sup>

## 4. Les porphyrines

Au cours de ce travail, nous nous intéresserons aux porphyrines. Les porphyrines appartiennent à la famille des macrocycles aromatiques. Elles sont formées de quatre cycles pyrroliques reliés entre eux par des ponts méthylènes (figure 4). Elles possèdent aussi dans leurs structures, une cavité centrale comportant quatre atomes d'azote, donnant la possibilité de complexer une vaste gamme de cations métalliques, tels que le Zn, Ni, Co, etc.

Vu l'hydrophobicité des porphyrines portée par leur squelette carboné, les porphyrines sont contraintes à s'agréger dans les milieux inadéquats par des interactions de type  $\pi$ -stacking. Elles peuvent ainsi former des agrégats de type H, où les macrocycles s'empilent selon un arrangement cofacial donnant une structure en colonne. Les agrégats de porphyrines peuvent s'assembler aussi en forme d'escaliers, donnant lieu à des agrégats de type J (figure 5).<sup>83</sup>



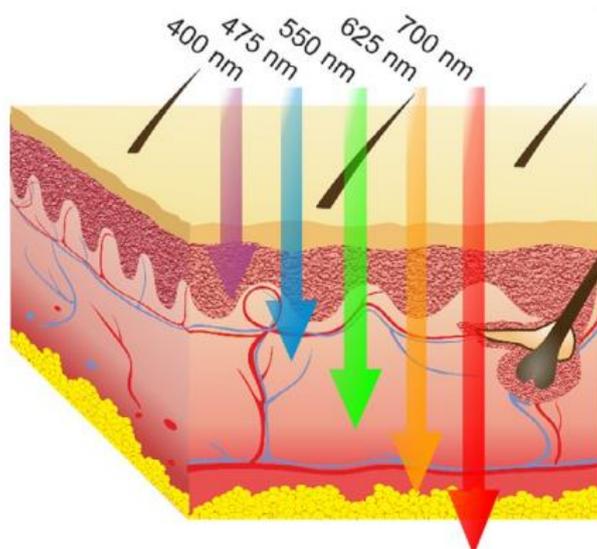
**Figure 5.** Les deux formes d'agrégation des porphyrines : agrégats H et agrégats J.<sup>84</sup>

Les porphyrines sont dotées d'une signature spectrale caractéristique observée par spectroscopie d'absorption UV-visible. On retrouve une bande très intense qui apparaît entre 390 et 440 nm, c'est la bande de Soret. Elle est suivie d'une série de bandes d'intensités plus faibles, c'est les bandes Q qui apparaissent entre 500 et 700 nm. Le nombre de bandes Q peut varier en fonction de la présence ou non de cation métallique au centre de sa cavité. Quatre bandes Q sont en général observées chez les porphyrines bases libres, contrairement à une ou deux bandes Q chez les porphyrines métallées.

### 5. PDT monophotonique vs PDT biphotonique

Le choix de la longueur d'onde du faisceau lumineux utilisé pour l'activation optimale d'un PS est primordial afin de générer des ROS et induire un effet PDT. En effet, deux obstacles majeurs sont rencontrés lors de la PDT anticancéreuse : la profondeur de pénétration dans le tissu et la diffusion de la lumière. Il faudra noter aussi que l'interaction de la lumière avec les tissus n'entraîne pas une absorption totale du faisceau. On retrouve aussi des phénomènes de diffusion, de transmission et de réflexion. La profondeur de pénétration de la lumière à travers les tissus va dépendre de nombreux paramètres critiques tels que l'énergie des photons, le coefficient d'extinction molaire, le temps d'éclairage et la physiologie des tissus.<sup>56</sup>

Différentes longueurs d'onde peuvent être utilisées en PDT monophotonique, allant du champ visible jusqu'au proche infrarouge (NIR). Le recours à des longueurs d'onde inférieures à 650 nm présente l'inconvénient de la faible pénétration de ces rayonnements dans les tissus, avec une profondeur allant de moins de 1 mm pour une lumière bleue, jusqu'à près de 4 mm pour une lumière rouge (figure 6).<sup>56</sup>



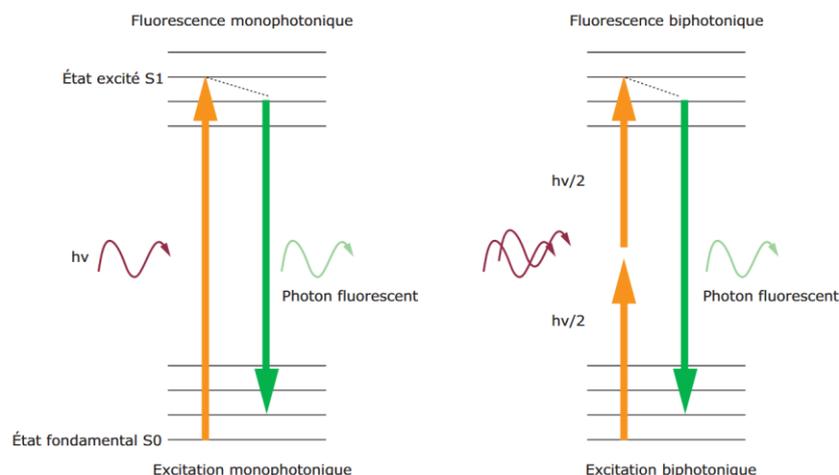
**Figure 6.** Profondeur de la pénétration des rayonnements lumineux à travers les tissus biologiques.

*Adaptée de la référence<sup>56</sup>.*

Pour surmonter la faible pénétration de ces lumières, il y a eu recours à l'utilisation de la lumière proche infrarouge à grande longueur d'onde qui présente une meilleure pénétration en raison de sa faible diffusion dans les tissus. De plus, on retrouve dans la région NIR la fenêtre thérapeutique optique qui correspond aux deux fenêtres de transparence des tissus biologiques, la NIR I comprise entre 650 et 950 nm et la NIR II entre 1000 et 1350 nm. Ces deux plages correspondent aux régions spectrales où l'hémoglobine, la mélanine et l'eau possèdent une absorption minimale.<sup>85</sup>

Cependant, l'augmentation des longueurs d'onde entraîne une diminution de l'énergie transmise et donc une moindre efficacité à générer des ROS. C'est dans ce contexte que la PDT biphotonique a fait son apparition avec l'émergence de la microscopie confocale. Ainsi, beaucoup de chercheurs se sont intéressés au développement de PSs pour la PDT biphotonique.<sup>86</sup>

L'excitation biphotonique est alors l'absorption de deux photons simultanément afin d'atteindre l'état excité, au lieu qu'un seul photon pour la PDT classique (figure 7). Par conséquent, il est nécessaire d'utiliser une densité de photons très élevée, afin d'augmenter la possibilité que le PS absorbe deux photons en même temps. Pour cela, on a recours généralement à l'utilisation de lasers pulsés.<sup>87</sup> L'utilisation de la PDT biphotonique présente de nombreux avantages, dont le principal est l'augmentation de la pénétration de la lumière dans les tissus biologiques pour atteindre une profondeur de 2 cm en moyenne<sup>88</sup>, voire jusqu'à une profondeur de 10 cm dans les tissus mous selon les résultats de certains travaux.<sup>89-90</sup> La PDT à deux photons permet aussi d'améliorer la précision spatiale du traitement. En effet, l'excitation biphotonique du PS ne se produit qu'au niveau du point focal où la densité de photons est maximale, ce qui représente un volume d'environ  $1 \mu\text{m}^3$ . Cet avantage permet de localiser l'effet phototoxique à une zone bien restreinte et donc de limiter les dommages photo-induits sur les tissus avoisinants.<sup>87</sup>



**Figure 7.** Principe de l'absorption et de la fluorescence biphotonique.<sup>91</sup>

Il a été rapporté dans la littérature que la formation d'agrégats de porphyrine de type J permettrait d'augmenter le potentiel des porphyrines à réaliser de la PDT biphotonique.<sup>92</sup>

## 6. Applications cliniques de la PDT

Un certain nombre d'exigences doivent être requises pour l'utilisation d'un PS en clinique<sup>47</sup> :

- Pureté chimique élevée ;
- Facilité de synthèse à grande échelle et sa reproductibilité ;
- Absence de dégradation lors de l'activation par la lumière (pas de métabolites toxiques) ;
- Photo-stabilité et stabilité chimique lors du transport, du stockage et de la reconstitution ;
- Solubilité dans les solvants injectables et les fluides corporels ;
- Amphiphilicité pour assurer un grand volume de distribution ;
- Bonne biocompatibilité et sélectivité vis-à-vis du tissu tumoral ;
- Bonne demi-vie dans les tissus cibles ;
- Elimination rapide des tissus non ciblés afin de minimiser la photosensibilité cutanée ;
- Rendement quantique élevé permettant une génération importante de ROS ;
- Coefficient d'extinction molaire élevé ;
- Excitable par les longueurs d'onde du proche infrarouge (700 - 1300 nm) ;
- Plusieurs voies d'administration (intraveineuse, intra-tumorale, topique ou par inhalation).

Les PSs approuvés par les différentes autorités de santé dans le monde possèdent deux grandes indications. Une indication à visée diagnostique permettant de révéler la présence de tumeurs par des techniques d'imagerie. La seconde indication est à visée thérapeutique afin d'entraîner la destruction des cellules tumorales par mécanisme PDT.

Le tableau 1 suivant regroupe un certain nombre d'exemples de PSs ayant bénéficiés d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour différentes indications.

**Tableau 1.** Liste non-exhaustive de photosensibilisateurs commercialisés pour diverses indications.

Nom du produit	Indications	Administration	$\lambda$ excitation
PHOTOFRIN® Porfimère sodique	Cancer de l'œsophage et bronchique non à petites cellules	Intraveineuse	630 nm
VISUDYNE® Vertéporfine	Dégénérescence maculaire liée à l'âge	Intraveineuse	689 nm
AMELUZ® Acide 5- aminolévulinique	Kératose actinique Carcinome basocellulaire	Topique	630 nm ou 570 - 670 nm
LEVULAN® Acide 5- aminolévulinique	Kératose actinique	Topique	400 - 450 nm
METVIXIA® Aminolévulinate de méthyle	Kératose actinique Carcinome basocellulaire	Topique	570 - 670 nm
FOSCAN® Témoporfine	Carcinome épidermoïde de la tête et du cou	Intraveineuse	652 nm
LASERPHYRIN® Talaporfine	Cancers du poumon, de l'œsophage et du cerveau	Intraveineuse	664 nm
HEXVIX®/CYSVIEW® Hexyl aminolévulinate	Cystoscopie pour le diagnostic du cancer de la vessie	Solution intra-vésicale	360 - 450 nm
TOOKAD® Padéliporfine	Cancer de la prostate	Intraveineuse	753 nm
PHOTOLON® Fotolon	Divers cancers malins	Intraveineuse	660 - 670 nm
RADACHLORIN® Brémachlorine	Cancer cutané	Intraveineuse	660 - 670 nm

Quelques remarques liées à l'utilisation de certains de ces médicaments sont à retenir :

- Deux médicaments contenant l'acide 5-aminolévulinique sont commercialisés dans le monde, AMELUZ® en Europe et LEVULAN® aux États-Unis. Pour la même indication (kératose actinique), le premier est utilisé à une longueur d'onde de 630 nm ou 570 - 670 nm, quant au second, il est utilisé à 400 - 450 nm.
- Une étude réalisée avec le FOSCAN® pour la PDT intrapéritonéale a montré que l'utilisation de la lumière rouge (652 nm) s'est avérée limitée en raison de la toxicité intestinale chez de nombreux patients. Cependant, utiliser une lumière verte moins pénétrante (514 nm) a permis d'éviter d'endommager la cavité péritonéale même à des doses de lumière plus élevées.<sup>93</sup>

- Une autre étude a montré que l'irradiation de PHOTOFRIN® avec une lumière verte (514 nm) induisait des effets similaires au niveau tumoral à ceux obtenus avec l'excitation à 630 nm, avec une diminution des dommages aux tissus normaux.<sup>94</sup>

## 7. Avenir de la PDT en cancérologie

De nombreux essais cliniques sont menés, utilisant la PDT pour le diagnostic et/ou le traitement de divers types de cancer. Ces études cliniques se focalisent sur des stratégies différentes : (i) développement de nouveaux PSs ayant donné des résultats prometteurs au cours des études précliniques ; (ii) trouver de nouvelles indications thérapeutiques à des PSs préexistants sur le marché; (iii) associer la PDT à d'autres thérapies afin d'améliorer l'efficacité du traitement telles que l'immunothérapie, la chimiothérapie, la thérapie génique, etc. ; ou encore (iv) augmenter l'efficacité de la PDT en l'associant à des néoadjuvants.

Le premier exemple est un essai clinique de phase II (NCT03727061) qui consiste en l'étude des effets secondaires de la PDT interstitielle et évaluation de son efficacité en association avec la chimiothérapie à base de cisplatine ou carboplatine et fluorouracile et/ou des agents ciblés (cetuximab) et/ou une immunothérapie (nivolumab ou pembrolizumab) pour traiter les patients atteints d'un cancer de la tête et du cou métastatique ou récidivant. La PDT interstitielle utilise un médicament PS PHOTOFRIN® activé par un laser délivré par des fibres optiques dans la tumeur.

Le second exemple est un autre essai de phase II (NCT03033225) qui étudie l'efficacité de la PDT à la vertéporfine guidée par ultrasons pour le traitement des patients atteints de tumeurs pancréatiques solides qui ne peuvent pas être retirées par chirurgie ou d'un cancer métastatique du pancréas. Cette thérapie est une PDT à base de vertéporfine utilisant un dispositif laser guidé par imagerie à ultrasons qui peut être moins invasive mais aussi efficace que les méthodes actuelles de traitement pour les patients atteints d'un cancer du pancréas.

Le dernier exemple est une étude clinique de phase I (NCT03467789) ayant pour but d'établir les conditions optimales pour le traitement des patients atteints de carcinome basocellulaire multiple par PDT. L'hypothèse spécifique de l'étude est que la vitamine D3 pourrait être utile comme néoadjuvant pour améliorer les réponses tumorales à la PDT. Dans les études précliniques, les chercheurs ont montré que les tumeurs épithéliales sont plus sensibles à la PDT à base d'acide 5-aminolévulinique lorsqu'elles sont amorcées par une préexposition à la vitamine D3 (cholécalférol).<sup>95</sup> Cette étude testera l'hypothèse selon laquelle des suppléments de vitamine D3, administrés par voie *per os* sur une durée relativement courte, peuvent augmenter l'efficacité de la PDT pour les voies cutanées. Dans l'ensemble, cette étude aidera à établir la vitamine D3/PDT orale comme nouvelle thérapie combinée pour le traitement du cancer de la peau.



## CHAPITRE III : THÉRAPIE GÉNIQUE ANTICANCÉREUSE

Durant ces dernières décennies, d'importants progrès ont été obtenus dans le domaine de la recherche biomédicale en général, et plus particulièrement, dans le domaine du génie génétique. Ces progrès ont contribué massivement à une meilleure compréhension des dysfonctionnements à l'origine de certaines pathologies, entre autre, la cancérogénèse. De plus en plus d'affections humaines trouvent alors leur explication au niveau moléculaire, voire au niveau génétique dans certains cas. Cette nouvelle avancée, définissant le cancer comme résultat d'une aberration dans le génome de la cellule hôte a permis de mettre au point de nouvelles cibles et approches thérapeutiques, comme la thérapie génique. Cela a été rendu possible grâce aux progrès considérables qu'a connus la virologie, avec l'avènement d'outils efficaces permettant la transgénèse.

### 1. Définition de la thérapie génique

La thérapie génique consiste à introduire des gènes dans des cellules d'un patient et à utiliser les produits d'expression de ces gènes à des fins thérapeutiques. Autrement dit, la thérapie génique désigne l'ensemble des procédés permettant l'utilisation de gènes comme médicaments.

À la différence des thérapies classiques qui vont agir sur l'activité ou le fonctionnement d'une protéine, la thérapie génique va intervenir plus en amont, afin de corriger le dysfonctionnement à sa source. La thérapie génique se traduit donc par le transfert de matériels génétiques dans une cellule cible, ayant comme objectif de remplacer un gène défaillant, inactiver ou supprimer un gène muté, ou encore, introduire ou faire exprimer un gène aboutissant à la production d'une protéine thérapeutique.<sup>96-97</sup>

Initialement, il avait été envisagé d'utiliser la thérapie génique pour traiter des maladies monogéniques héréditaires, telles que la fibrose kystique et la dystrophie musculaire de Duchenne. Cependant, il est rapidement apparu que la même approche pouvait être utilisée pour soigner n'importe quel type de pathologie acquise, à partir du moment où elle pouvait bénéficier d'une protéine thérapeutique, cela peut être le cas d'hormones, de cytokines, de facteurs de croissance, de facteurs de coagulation ou encore de protéines virales comme pour le cas des vaccins.

Ainsi, les champs d'application de la thérapie génique en médecine humaine sont très larges. Autre que la correction de certaines maladies héréditaires, la thérapie génique peut être utilisée dans le traitement des cancers, des maladies infectieuses, des maladies cardio-vasculaires et neurodégénératives, ou encore la vaccination. Un grand nombre d'acides nucléiques font actuellement l'objet d'études cliniques, dont certains se sont déjà vus attribuer leurs autorisations de mise sur le marché, principalement par la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis.<sup>98</sup>

## 2. Exemples d'acides nucléiques utilisés dans la lutte anticancéreuse

### 2.1. L'ADN plasmidique

L'une des façons les plus simples pour l'introduction d'un gène dans le noyau cellulaire est l'utilisation d'un plasmide. Les plasmides sont des fragments d'ADN bicaténaires circulaires, présents dans les cellules bactériennes et indépendants du génome bactérien. Ils codent souvent pour des protéines responsables de résistance aux antibiotiques.<sup>99</sup> En thérapeutique, le plasmide peut être exploité pour induire l'expression d'une protéine dotée d'une activité anticancéreuse, comme la protéine p53. En effet, des études ont montré que dans près de 50% des cas de cancers chez l'homme, une mutation du gène de la p53 (connu comme gène suppresseur de tumeur) était rencontrée.<sup>100</sup> En outre, l'utilisation d'un plasmide codant pour la p53 a permis une récupération de l'activité apoptotique des cellules tumorales. Ceci a pu être prouvé par une étude réalisée par Kim *et al.* en 2002 sur un modèle murin de cancer ovarien, avec une diminution de 60% du volume de la tumeur.<sup>101</sup>

En restant dans le même contexte, et afin d'augmenter l'efficacité de la réponse immune anti-tumorale, beaucoup de recherches ont mis l'accent sur le rôle majeur que pourraient avoir les cytokines pro-inflammatoires (IL-12 et TNF- $\alpha$ ) dans le traitement du cancer.<sup>102</sup> Des études précliniques menées par Kircheis *et al.* sur un modèle murin de neuroblastome, fibrosarcome et de mélanome ont pu montrer l'efficacité de la délivrance du gène codant pour le TNF- $\alpha$  entraînant une régression de la taille des tumeurs de plus de 60%.<sup>103</sup>

Cette approche a été également exploitée pour la délivrance de gènes suicides. Le plasmide va ainsi permettre l'expression d'un gène codant pour une enzyme d'activation dans la tumeur, qui activera ensuite une prodrogue non toxique administrée par voie systémique, uniquement au niveau intra-tumoral. L'exemple le plus étudié est la transfection avec un plasmide comportant le gène de l'enzyme HSV-TK (Herpes Simplex Virus-Thymidine Kinase) responsable de la phosphorylation du ganciclovir en ganciclovir triphosphate, inhibiteur de l'enzyme ADN polymérase.<sup>104</sup> Cette stratégie a fait l'objet d'études cliniques qui ont démontré une efficacité notable, notamment dans le traitement du glioblastome avec la combinaison HSV-TK/ganciclovir et du cancer de la prostate avec HSV-TK/valaciclovir.<sup>105-106</sup>

La vaccination par ADN représente une autre stratégie prometteuse pour stimuler le système immunitaire. Les vaccins à ADN sont des plasmides conçus pour délivrer des gènes codant pour des antigènes tumoraux, provoquant ou augmentant la réponse immunitaire envers les cellules tumorales porteuses de ces antigènes. Jusqu'à présent, un seul vaccin thérapeutique contre le cancer a été approuvé pour un usage humain (Sipuleucel-T, PROVENGE®). Ce vaccin contient des cellules mononuclées autologues du sang périphérique activées et dirigées contre la phosphatase acide prostatique. PROVENGE® est indiqué pour le traitement du cancer de la prostate métastatique résistant à la castration.<sup>107</sup>

**Tableau 2.** Liste non exhaustive d'essais cliniques de thérapies géniques basées sur la délivrance d'ADN plasmidique.

<b>Description de l'essai</b>	<b>Type de cancer</b>	<b>Phase de l'essai</b>	<b>Identifiant NCT (clinicaltrials.gov)</b>	<b>Laboratoire</b>
Un anesthésique local est appliqué sur la peau, suivie d'une incision et d'une dissection jusqu'à ce que le muscle soit exposé. Le plasmide est ensuite injecté par voie intramusculaire et immédiatement suivi par l'application d'impulsions électriques via une électrode à aiguille insérée dans le muscle. La plaie est suturée et un pansement est appliqué. La procédure de traitement est estimée à 30 min.	Tumeur maligne métastatique	Phase I	NCT01664273	Copenhagen University Hospital
Etude de l'efficacité de la leuvectine pour la délivrance du gène d'IL-2 suivie d'une intervention chirurgicale pour le traitement de patients atteints de cancer de la prostate de stade II ou III.	Cancer de la prostate	Phase II	NCT00004050	Vical
Etude de l'efficacité de l'administration d'un plasmide codant pour la chaîne A de la toxine diphtérique sous la régulation du promoteur H19, hautement présent dans les cellules tumorales. La production localisée de la toxine entraîne une destruction sélective des cellules tumorales via l'inhibition de la synthèse des protéines dans la cellule tumorale.	Cancer superficiel de la vessie	Phase II	NCT00595088	Anchiano Therapeutics
Etude des effets secondaires et de l'efficacité de la thérapie vaccinale dans le traitement des patients atteints d'un cancer du pancréas qui a été retiré par chirurgie.	Cancer du pancréas	Phase II	NCT00389610	Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center

**Tableau 3.** Liste non exhaustive d'essais cliniques de thérapies géniques basées sur la délivrance d'ARN messenger.

Description de l'essai	Type de cancer	Phase de l'essai	Identifiant NCT (clinicaltrials.gov)	Laboratoire
L'étude introduit un nouveau concept d'immunothérapie anticancéreuse individualisée pour traiter chaque patient avec le vaccin à ARNm approprié et immunogène pour la tumeur d'un patient donné.	Cancer du sein triple négatif	Phase I	NCT02316457	BioNTech
Cette approche vaccinale est basée sur le ciblage de multiples mutations tumorales immunogènes et uniques à la tumeur d'un patient donné à l'aide d'un vaccin polyépitopique à base d'ARNm fabriqué pour être utilisé chez un seul patient.	Mélanome	Phase I	NCT02035956	BioNTech
Etude de l'innocuité et de l'immunogénicité de ce vaccin à ARNm en combinaison avec une radiothérapie locale pour le traitement de consolidation et d'entretien du cancer du poumon non à petites cellules de stade IV après chimiothérapie ou thérapie avec un inhibiteur de l'EGFR tyrosine kinase en première intention.	Carcinome pulmonaire non à petites cellules	Phase I	NCT01915524	CureVac
Administration du vaccin à ARNm avant et en association à une chimiothérapie néo-adjuvante (carboplatine/paclitaxel) afin de générer une réponse immunitaire anti-tumorale	Cancer ovarien	Phase I	NCT04163094	BioNTech
Evaluation de la sécurité et de l'efficacité préliminaire de l'addition d'un vaccin à ARNm à une immunothérapie à base de durvalumab seulement ou durvalumab + tremelimumab	Cancer pulmonaire métastatique non à petites cellules	Phase I Phase II	NCT03164772	MedImmune CureVac PharmaJet

D'autres exemples d'études cliniques de délivrance d'ADN plasmidiques sont présentés dans le tableau 2.<sup>108</sup>

## **2.2. L'ARN messenger**

L'ARN messenger (ARNm) est un acide nucléique retrouvé naturellement dans les cellules, dont le rôle est de transmettre une copie transitoire de l'information génétique (d'un ou de plusieurs gènes) codée par le génome (transcription), afin de permettre la synthèse des protéines correspondantes par les ribosomes (traduction).

L'ARNm synthétique fournit une matrice pour la synthèse de toute protéine, fragment de protéine ou peptide donné et peut se prêter une large gamme d'applications pharmaceutiques, y compris différentes modalités d'immunothérapies anticancéreuses. Grâce à la facilité et à la rapidité de sa production à grande échelle, l'ARNm est idéalement placé pour les vaccins anticancéreux, de plus de la facilité à apporter des modifications chimiques améliorant son efficacité. L'utilisation de l'ARNm présente aussi un autre avantage dans la délivrance de protéines. En effet, la production d'une molécule bioactive (exemple de cytokine) codée à partir de la matrice d'ARNm peut améliorer les propriétés pharmacocinétiques, pharmacodynamiques ainsi que la sécurité de la molécule, en comparaison à l'utilisation de la protéine recombinante respective.<sup>109</sup>

La vaccination contre le cancer implique l'induction de réponses cellulaires T spécifiques à la tumeur, potentiellement capables d'induire un rejet de la tumeur en fournissant des antigènes tumoraux dans le cadre de l'immuno-stimulation. Certains vaccins anticancéreux ciblant les antigènes exposés en surface visent en outre à induire une réponse humorale des cellules B spécifique de la tumeur.<sup>110</sup>

La faisabilité de la vaccination à base d'ARNm contre le cancer a été démontrée pour la toute première fois il y a environ 25 ans. Depuis, de nombreuses études précliniques et cliniques ont exploré l'ARNm pour la vaccination anticancéreuse, soit en transfectant *ex vivo* des cellules dendritiques autologues, soit par injection intramusculaire directe.<sup>111</sup>

Une sélection d'essais cliniques basés sur l'utilisation de l'ARNm est présentée dans le tableau 3.<sup>110</sup>

## **2.3. Les oligonucléotides anti-sens**

Les oligonucléotides anti-sens représentent la pierre angulaire de la thérapie anti-sens, qui vont induire une régulation négative de l'expression des gènes. Ces oligonucléotides anti-sens innovants ont un grand potentiel thérapeutique pour le traitement de diverses maladies, dont les cancers, en modifiant l'expression des protéines par le biais de multiples mécanismes moléculaires.

**Tableau 4.** Liste des médicaments approuvés par la FDA utilisés en thérapie génique reposant sur la délivrance d'oligonucléotides anti-sens.

<b>Médicament</b>	<b>Indication</b>	<b>Mécanisme d'action</b>
Fomivirsen VITRAVENE®	Traitement local de la rétinite à cytomégalovirus (CMV) chez des patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).	C'est un oligonucléotide anti-sens phosphorothioate inhibiteur de la production de plusieurs protéines responsables de la régulation de l'expression des gènes viraux essentiels à la réplication du CMV. Administration par injection intra-vitréenne.
Mipomersen KYNAMRO®	Traitement de certaines formes d'hypercholestérolémies familiales.	Mipomersen cible l'ARNm responsable de la production d'apolipoprotéine B-100, un composant structurel essentiel des LDL et VLDL. Administration par injection sous-cutanée.
Defibrotide DEFITELIO®	Traitement de la maladie veino-occlusive hépatique sévère.	C'est un mélange d'oligonucléotides anti-sens administré en perfusion, ayant des effets anti-thrombotiques, fibrinolytiques, antiadhésifs et anti-inflammatoires démontrés. Le mécanisme d'action est multifactoriel.
Eteplirsen EXONDYS51®	Traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne.	Eteplirsen se lie à l'exon 51 (porteur de la mutation) du pré-ARNm de la dystrophine, entraînant un saut d'exon lors de l'épissage de l'ARNm chez les patients présentant des mutations génétiques.
Pegaptanib MACUGEN®	Prise en charge de néo-vascularisations choroïdiennes secondaires à la dégénérescence maculaire liée à l'âge.	Pegaptanib est un oligonucléotide modifié PEGylé qui se lie avec une haute spécificité et affinité à l'ARNm du facteur de croissance vasculaire endothélial extracellulaire (VEGF165) en inhibant sa biosynthèse. Administration par injection intra-vitréenne.
Nusinersen SPINRAZA®	Traitement de l'amyotrophie spinale 5q.	Nusinersen est un oligonucléotide anti-sens qui augmente le pourcentage d'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits de l'ARNm du gène codant pour la protéine SMN2 (protéine de survie des motoneurones) en se liant à un site d'inactivation de l'épissage intronique (ISS-N1) présent dans l'intron 7 du pré-ARNm de SMN2, ce qui se traduit par une protéine SMN2 fonctionnelle avec sa séquence entière.

De façon générale, ces oligonucléotides non-codants se lient à l'ARNm et vont empêcher la traduction des protéines cibles et ainsi inhiber l'expression des gènes.<sup>112</sup>

Jusqu'à présent, la FDA a approuvé la mise sur le marché de six (06) médicaments à base d'oligonucléotides anti-sens pour diverses indications thérapeutiques (tableau 4).

Dans le domaine de la lutte contre le cancer, plusieurs études ont confirmé que la thérapie anti-sens pouvait être utilisée comme inhibiteur de l'expression des gènes, ce qui entrainera une diminution de la croissance tumorale.

Un exemple très prometteur est celui du Custirsén, qui est un oligonucléotide anti-sens dirigé contre la clusterine, largement connue comme inhibitrice d'apoptose. Elle est aussi impliquée dans le processus de cancérogenèse à travers l'inhibition du gène suppresseur de tumeur Nkx3.1. Custirsén a été bien toléré dans les essais cliniques de phase I et avec une activité prometteuse révélée lors des essais cliniques de phase II. Custirsén, utilisé en phase III (NCT01578655) pour le traitement du cancer de la prostate en association avec une chimiothérapie, a pu montrer des résultats prometteurs.<sup>113</sup>

Un autre exemple d'oligonucléotides anti-sens est celui de l'ANGIOZYME®, un ribozyme anti-angiogénique par clivage de l'ARNm correspondant aux récepteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Flt-1 et KDR), induisant une inhibition de l'angiogenèse et de la croissance tumorale. ANGIOZYME® est le premier ribozyme synthétique qui est amené jusqu'aux essais cliniques chez l'homme, après avoir montré une inhibition significative de l'angiogenèse dans des modèles de tumeurs animales. Les essais cliniques de phase I ont démontré qu'ANGIOZYME® avait une bonne tolérance ainsi qu'une bonne biodisponibilité chez les patients atteints de tumeurs solides réfractaires, y compris le cancer colorectal. Plusieurs essais de phase II sont réalisés chez des patients atteints d'une tumeur maligne avancée afin de tester son efficacité thérapeutique.<sup>114</sup>

Après avoir abordé quelques exemples des principales classes d'acides nucléiques utilisées en thérapie génique, à savoir, l'ADN plasmidique, l'ARN messager et les oligonucléotides anti-sens ; nous allons nous intéresser à présent aux petits ARN interférents ou siRNA.

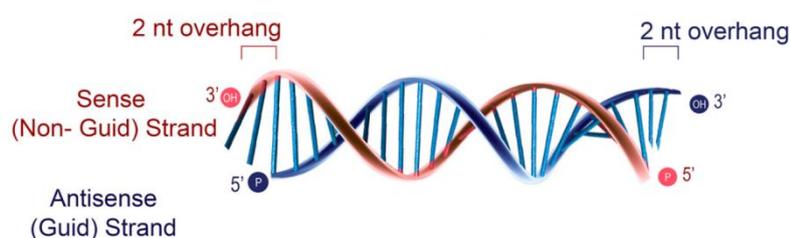
### **3. Phénomène d'interférence par ARN et siRNA**

L'interférence par ARN (RNAi) est un processus naturel de protection contre l'invasion par du matériel génique exogène qui est rencontré dans les cellules, par lequel l'ARNm cible est dégradé, induisant l'extinction de l'expression génique.<sup>115</sup> En 1993, le tout premier microRNA (miRNA) « lin-4 » a été décrit chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, responsable de la régulation des gènes qui contrôle le développement du ver.<sup>116</sup> Ces travaux ont été récompensés par le prix Nobel de médecine ou de physiologie en 2006, décerné à Andrew Fire et Craig Mello pour la découverte des mécanismes par lesquels se produit le phénomène d'interférence par ARN. Ils ont ainsi démontré que l'extinction de l'expression génique par RNAi se fait via l'intervention d'un ARN double brin au

niveau post-transcriptionnel, connu sous le nom de small interfering RNA (siRNA) ou petit ARN interférent.

### 3.1. Mécanisme d'action du siRNA

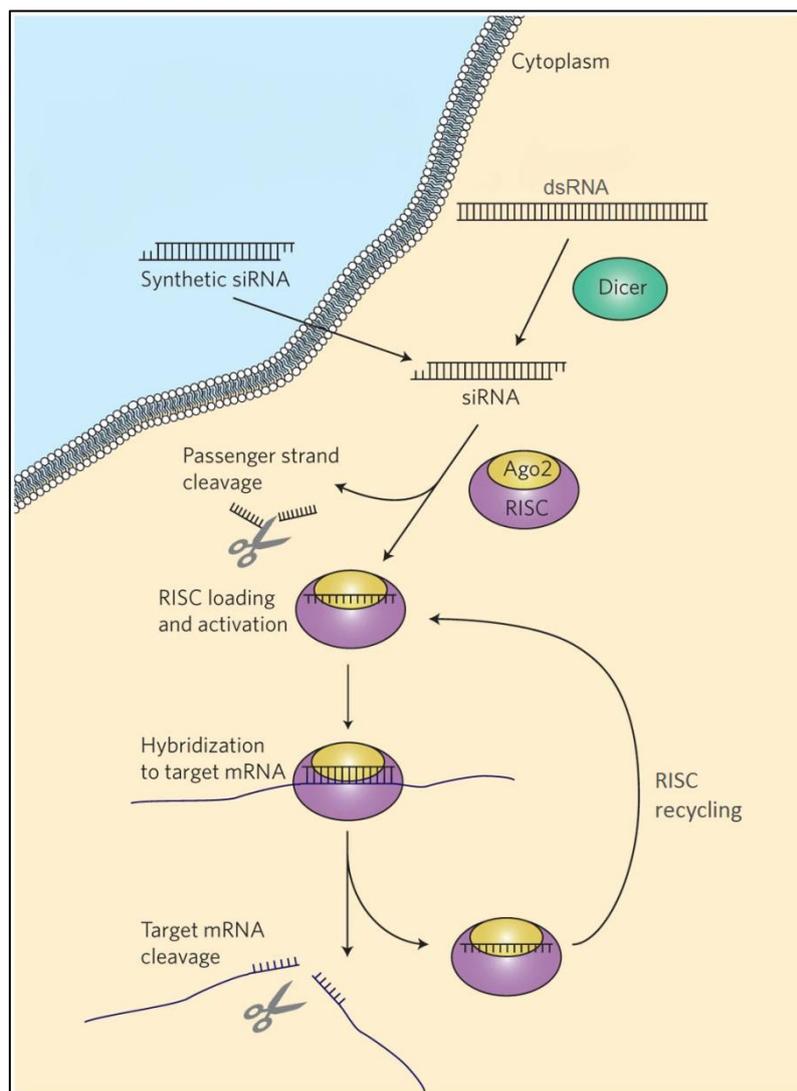
Le siRNA est une macromolécule d'ARN double brin chargée négativement, longue de 21 à 23 nucléotides, avec deux nucléotides non appariés aux extrémités 3' de chaque brin (figure 8). La molécule de siRNA se compose d'un brin passager ou non-guide (brin sens) et d'un brin guide (brin antisens).<sup>117-118</sup>



**Figure 8.** Structure du siRNA.<sup>117</sup>

La biogenèse du siRNA commence d'abord par la dégradation de l'ARN long double brin (dsRNA) dans le cytoplasme via l'intervention de l'enzyme Dicer qui est une ribonucléase appartenant à la famille des RNase III (figure 9). Cette première étape n'aura pas lieu dans le cas d'un apport exogène de siRNA, qui sera directement prêt à entrer dans la machinerie de RNAi. Pour son activation, le siRNA est intégré au complexe protéique RISC (RNA-Induced Silencing Complex) afin de produire un ARN simple brin après dégradation du brin passager. L'ARN simple brin obtenu va fonctionner comme un guide antisens pour le complexe RISC. En se liant à sa cible d'ARNm complémentaire par des liaisons de type Watson-Crick, le complexe RISC va induire le clivage de l'ARNm cible *via* l'action de la protéine Argonaute 2 (Ago2) empêchant ainsi l'expression de la protéine cible. A la fin de sa mission, le complexe RISC sera relâché et pourra ainsi être recyclé et réutilisé dans d'autres cycles de RNAi.<sup>119-120</sup>

En théorie, le siRNA ne fonctionne que lorsque son brin antisens est complètement apparié à l'ARNm cible. Cependant, quelques mésappariements sont tolérés par le complexe RISC, ce qui peut conduire à une suppression indésirable de l'expression d'autres gènes, à cause d'un mésappariement nucléotidique. Ainsi, il est impératif de sélectionner la séquence de siRNA qui garantit une bonne spécificité envers l'ARNm cible.<sup>121</sup>



**Figure 9.** Mécanisme d'action du siRNA aboutissant à la dégradation de l'ARNm cible.

Adapté de la référence.<sup>120</sup>

### 3.2. Utilisation clinique du siRNA

Près de deux décennies après que le mécanisme naturel de suppression d'expression génique utilisant l'interférence par ARN a été élucidé, les thérapies basées sur les siRNA ont finalement fait leur entrée sur le marché pharmaceutique. Quatre médicaments à base de siRNA ont d'ores et déjà été approuvés depuis 2018, et de nombreux autres sont à des stades avancés des essais cliniques. La majorité de ces candidats médicaments sont indiqués pour des maladies rares ou orphelines. Ceci démontre pleinement l'importance du siRNA comme une nouvelle classe de médicaments à fort potentiel thérapeutique. Bien qu'actuellement aucune thérapie à base de siRNA ne soit approuvée pour le traitement des cancers, de nombreuses investigations cliniques sont en cours.<sup>122</sup>

**Tableau 5.** Liste non exhaustive d'essais cliniques de thérapies géniques basées sur la délivrance de siRNA.

<b>Intitulé de l'essai</b>	<b>Traitement</b>	<b>Type de cancer</b>	<b>Phase de l'essai</b>	<b>Identifiant NCT (clinicaltrials.gov)</b>
Exosomes dans le traitement de malades atteints d'un cancer du pancréas métastatique avec mutation KrasG12D.	Exosomes dérivés de cellules stromales mésenchymateuses avec siRNA KRAS G12D.	Cancer du pancréas métastatique	Phase I	NCT03608631
Étude du siRNA Atu027 chez des patients atteints d'un cancer solide avancé.	siRNA Atu027	Cancer solide avancé	Phase I	NCT00938574
siRNA EphA2 dans le traitement des patients atteints de tumeurs solides avancées ou récurrentes.	siRNA encapsulé par un liposome ciblant EphA2	Cancer solide avancé	Phase I	NCT01591356
Étude de phase Ib/2, multicentrique, à dose croissante de DCR-MYC chez des patients atteints de carcinome hépatocellulaire.	siRNA DCR-MYC	Carcinome hépatocellulaire	Phase I Phase II	NCT02314052
Étude d'innocuité du CALAA-01 pour le traitement des cancers à tumeur solide.	siRNA CALAA-01	Cancer à tumeur solide	Phase I	NCT00689065
Immunothérapie du mélanome utilisant des cellules dendritiques autologues doublement transfectées par une combinaison d'ARNs codant pour des antigènes associés aux tumeurs du mélanome (MART-1, tyrosinase, gp100 et MAGE-3) et par un siRNA ciblant les sous-unités bêta de l'immunoprotéasome inductible LMP2, LMP7 et MECL1.	Cellules dendritiques transfectées par le protéasome-siRNA et par des ARNs d'antigènes tumoraux	Mélanome métastatique	Phase I	NCT00672542

Certains exemples d’essais cliniques utilisant le siRNA dans des stratégies anti-tumorales sont présentés dans le tableau 5.<sup>122-123</sup>

En août 2018, la FDA a approuvé la mise sur le marché de Patisiran (ONPATPRO®), le premier médicament basé sur la technologie du siRNA, utilisé dans la prise en charge d’amyloses héréditaires à transthyréline. Patisiran a ainsi ouvert la voie à trois autres siRNA qui ont été approuvés par la FDA et l’EMA entre 2019 et en 2021 (tableau 6).

**Tableau 6.** Liste des médicaments à base de siRNA commercialisés (Juillet 2021) utilisés en médecine humaine.

Nom du siRNA	Nom commercial	Laboratoire	Indications
Patisiran	ONPATPRO®	Alnylam	Amylose héréditaire à transthyréline
Givosiran	GIVLAARI®	Alnylam	Porphyrie hépatique aiguë
Lumasiran	OXLUMO®	Alnylam	Hyperoxalurie primitive de type I
Inclisiran	LEQVIO®	Alnylam Novartis	Hypercholestérolémie primaire

### 3.3. Obstacles liés à la délivrance du siRNA

Les thérapies utilisant le siRNA sont confrontées à de nombreuses limitations *in vivo*. En effet, le siRNA est sujet à la dégradation par les nucléases et à l’élimination par induction d’une réponse immunitaire. D’autres obstacles sont rencontrés aussi, tels que l’instabilité chimique et la toxicité du siRNA, en plus de la possibilité d’entraîner une suppression d’expression génique non spécifique.

Au cours des premières étapes du développement des thérapies par siRNA, de nombreuses molécules ont été conçues sur la base de siRNA non modifiés ou légèrement modifiés. Ces molécules peuvent médier la suppression de l’expression génique *in vivo* lorsque le siRNA est directement inoculé par administration locale dans le tissu, avec une moindre efficacité et des effets indésirables. De plus, les siRNA non-modifiés peuvent activer le récepteur Toll-like 3 (TLR3) et entraîner des effets néfastes sur les systèmes sanguin et lymphatique par stimulation de la sécrétion de l’interleukine-12 et de l’interféron-gamma. D’où est venu l’intérêt de la modification chimique du siRNA.<sup>124</sup>

Un autre moyen de surmonter les obstacles liés à la délivrance du siRNA est le vecteur. Différents systèmes de vectorisation ont été élaborés pour la délivrance du siRNA permettant d’augmenter sa stabilité et sa spécificité, tels que les liposomes, les exosomes et les différents types de systèmes nanoparticulaires.

La dernière stratégie est le recours à l'échappement endosomal qui pourra être réalisé suivant différentes stratégies.

### **3.3.1. Modifications chimiques du siRNA**

Les siRNA chimiquement modifiés ont été conçus afin de supprimer l'effet immunogène induit par les siRNA, et d'améliorer leur activité et leur spécificité. En fonction de la structure naturelle des nucléotides, de nombreuses modifications chimiques peuvent être réalisées au niveau du groupement phosphate, du ribose et de la base azotée.

#### **a) Modification du résidu phosphonate**

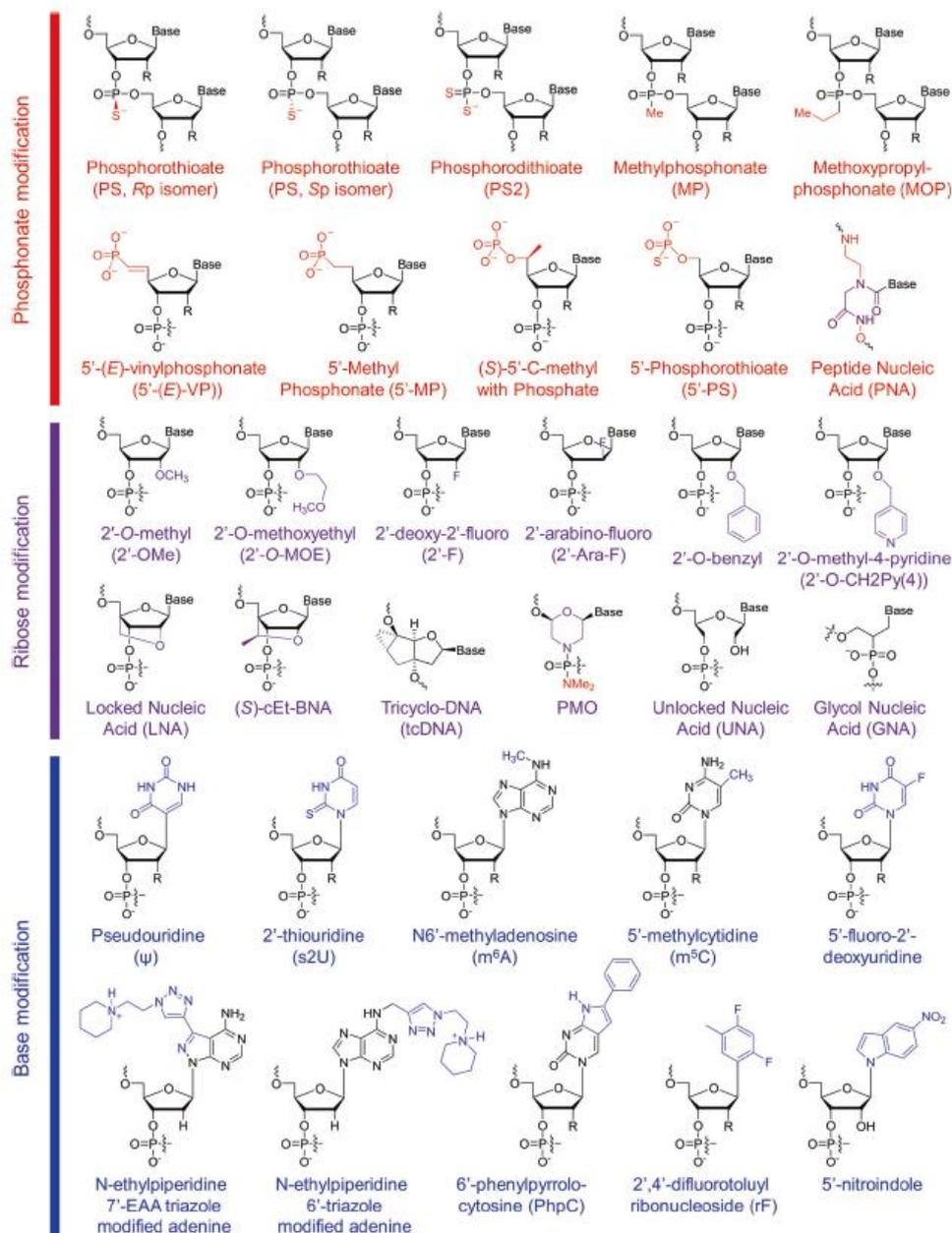
La liaison phosphorothioate a été largement utilisée dans la modification d'oligonucléotides antisens. Cette modification consiste en un remplacement d'un atome d'oxygène non-engagé dans une liaison phosphoester par un atome de soufre. Cette liaison confère aux oligonucléotides modifiés une résistance aux nucléases et une plus grande stabilité et hydrophobicité facilitant leurs liaisons aux protéines plasmatiques, particulièrement à l'albumine, rallongeant ainsi leur temps de demi-vie dans la circulation générale (figure 10).<sup>125-127</sup>

D'autres résidus ont été utilisés aussi comme le phosphorodithioate (PS2), le méthylphosphonate (MP), le méthoxypropylphosphonate (MOP) et l'acide nucléique peptidique (PNA). La modification de PS2 permet d'augmenter l'affinité entre le complexe RISC et le siRNA. Les modifications utilisant MP et MOP ont été réalisées pour réduire la liaison du siRNA aux protéines. Le PNA est généralement utilisé pour modifier des sondes de détection pour capturer et détecter certaines cibles d'acide nucléique (figure 10).<sup>128</sup>

Une stratégie nouvellement développée procède à la modification des phosphonates par divers analogues à l'extrémité 5' du siRNA, tels que le 5'-(E)-vinyl phosphonate (5'-(E)-VP), le 5'-méthylphosphonate, le 5'-phosphorothioate, etc. (figure 10). L'utilisation du résidu 5'-(E)-VP s'est avéré être le mécanisme le plus puissant et le plus stable sur le plan métabolique. Ces substitutions hydrophobes permettent l'augmentation de la puissance et de la stabilité du siRNA dans les tissus en augmentant son affinité et sa liaison vis-à-vis du complexe RISC.<sup>129</sup>

#### **b) Modification du ribose**

Les modifications du ribose en position 2' ont été très largement utilisées pour protéger les siRNA contre les ribonucléases, dont la présence du groupement 2'-OH est indispensable pour l'activité de l'enzyme et la dégradation de l'ARN. Le 2'-O-méthyl (2'-OMe) est la modification la plus fréquemment utilisée dans le développement de médicaments.



**Figure 10.** Structure des modifications chimiques du siRNA. Selon le site de la modification, ces structures peuvent être divisées en trois classes : modification du groupement phosphonate, modification du ribose et modification de la base, qui sont marquées respectivement en rouge, violet et bleu.<sup>121</sup>

En effet, cette modification chimique entraîne une amélioration de la stabilité du siRNA et de son affinité envers son ARNm cible, accompagnée d'une baisse de son immunogénicité *in vivo*.<sup>130</sup> On retrouve aussi le 2'-O-méthoxyéthyle (2'-O-MOE) qui montre une affinité de liaison plus élevée pour l'ARNm que le 2'-O-méthyl.

Le 2'-C, le 4'-C voire l'ensemble du cycle osidique peuvent également subir des modifications, ce qui produit des molécules telles que les UNA (Unlocked Nucleic Acid), les LNA (Locked Nucleic Acid), les GNA (Glycol Nucleic Acid), les phosphorodiamidate morpholino oligomères (PMO), etc. (figure 10). Par exemple, les UNA et GNA entraînent le blocage de l'entrée des brins passagers et favorisent l'incorporation du brin guide au sein du complexe RISC, en introduisant une asymétrie chimique dans le double brin du siRNA.<sup>131</sup>

### c) **Modification de la base**

La modification des bases est une stratégie très avantageuse pour le développement de nouveaux médicaments à base d'acides nucléiques. Par exemple (figure 10), la substitution avec la pseudo-uridine, la 5-méthylcytidine, N6-méthyladénosine ou d'autres analogues de d'uridine et de cytidine peut réduire la reconnaissance par le système immunitaire, tout en rendant les siRNA plus résistants aux nucléases. Cependant, les laboratoires pharmaceutiques ont une attitude prudente vis-à-vis de ces molécules, et préfèrent utiliser des bases naturelles, en raison de préoccupations relatives à la sécurité de ces bases artificielles qui pourraient potentiellement être réutilisées et incorporées dans le génome humain.<sup>132-134</sup>

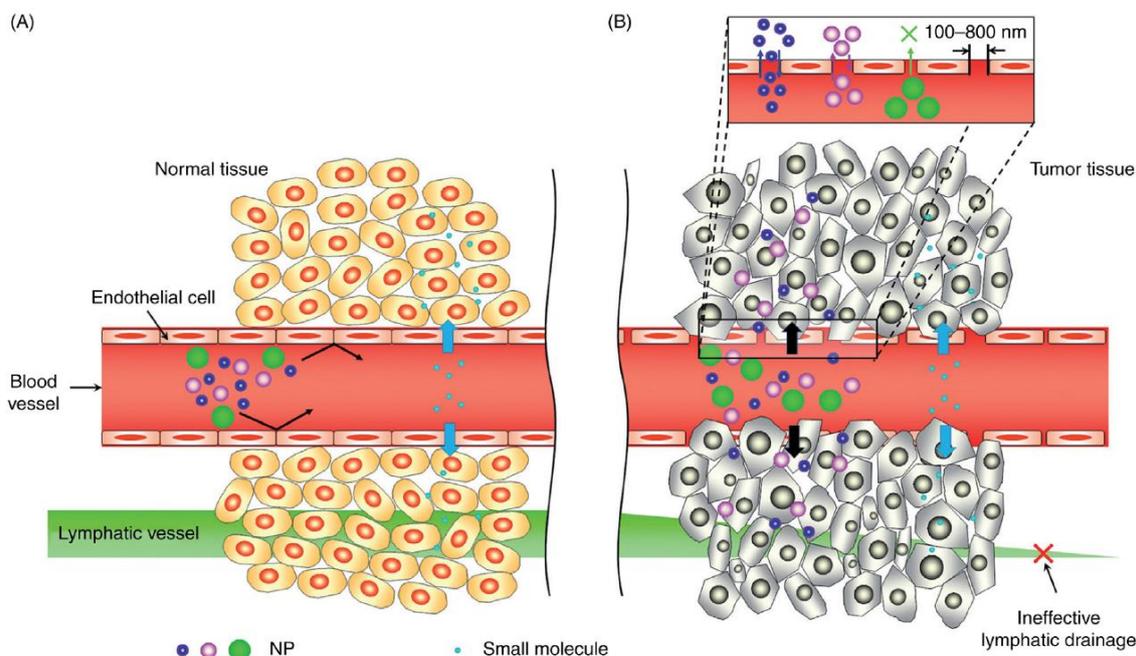
### 3.3.2. **Les vecteurs utilisés pour la délivrance du siRNA**

Les polyplexes à base de polymères biocompatibles polycationiques tels que la poly-L-lysine, protamine et polyéthylèneimine, et les lipoplexes à base de lipides cationiques tels que la lipofectamine, ont été largement utilisés pour la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques dont le siRNA. Ces composés présentent l'avantage d'une bonne efficacité de transfection ainsi qu'une facilité d'industrialisation. Néanmoins, leur faible stabilité et leur faible capacité de ciblage limitent leurs applications en clinique, en plus de leur potentielle toxicité dans certains cas.

L'utilisation de vecteurs viraux a également montré ses limites, qui sont principalement liées à leur sécurité d'utilisation. En effet, quelques accidents liés à l'utilisation de vecteurs viraux ont été rapportés, essentiellement de fortes réactions inflammatoires dues à leur immunogénicité, voire des cancers liés à l'utilisation de vecteurs viraux intégratifs qui vont insérer leur génome viral à proximité d'oncogènes dans le génome des cellules hôtes.<sup>135-136</sup>

Les nanoparticules ont ainsi fait leur apparition comme des nouveaux vecteurs prometteurs pour la délivrance des gènes. Ces nano-systèmes présentent l'avantage de la facilité de greffage en surface de diverses molécules biocompatibles telles que, le polyéthylène glycol (PEG), des sucres, des peptides, etc. Le recours à la fonctionnalisation va permettre un ciblage actif des nanoparticules et de leur cargaison vers les cellules cancéreuses ciblées avec un faible impact sur les tissus non-ciblés.

Un autre avantage majeur des nanoparticules dans le traitement des cancers est que ces nano-objets tirent profit de la physiopathologie du tissu tumoral, caractérisé par la présence de larges fenestrations dans sa néo-vascularisation, surajouté à un drainage lymphatique défaillant, ce qui facilite l'extravasation des nanoparticules des vaisseaux et leur accumulation au niveau du tissu tumoral par ciblage passif, c'est l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention).



**Figure 11.** Différences d'internalisation des drogues entre un tissu normal (A) et un tissu tumoral (B), mettant en jeu l'effet EPR. Les petites molécules sont internalisées de façon identique entre les deux tissus. Cependant, l'internalisation des nanoparticules se fait en fonction de leurs tailles au niveau de la tumeur, contrairement à une absence quasi-totale d'internalisation au niveau des tissus sains.<sup>137</sup>

De nombreux vaisseaux tumoraux ont un revêtement cellulaire endothélial anormal avec des péricytes agencés de façon anarchique, faisant apparaître des pores de tailles variables, allant de 100 à 800 nm dans divers modèles tumoraux (figure 11). Contrairement aux vaisseaux tumoraux, les vaisseaux normaux ont une taille de pores de l'ordre de 10 nm, laissant passer des petites molécules comme des médicaments de chimiothérapie, mais beaucoup plus petite que la taille de la plupart des formulations nanoparticulaires, permettant ainsi un passage préférentiel des nanoparticules à travers les pores des vaisseaux tumoraux et donc une diminution des effets indésirables.<sup>137-140</sup>

Dans le tableau 7 suivant, nous présentons uniquement certains exemples de vecteurs non-viraux utilisés pour la délivrance du siRNA.

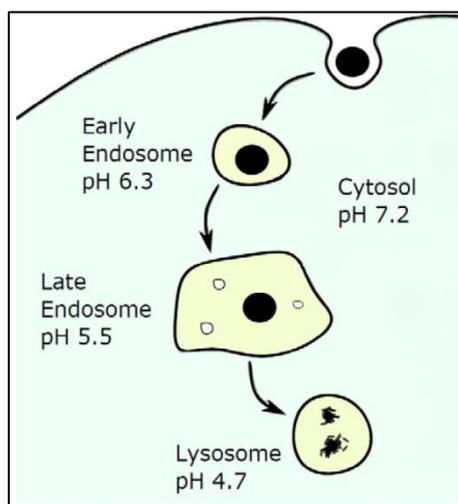
**Tableau 7.** Exemples de systèmes nanoparticulaires utilisés pour la délivrance du siRNA : avantages et inconvénients.

Composition	Avantages	Inconvénients	Références
<b>Lipide</b> (Liposomes)	-Biodégradabilité -Biocompatibilité -Possibilité de transport de molécules hydrophiles ou hydrophobes	-Capacité d'encapsulation limitée -Stabilité modérée	<sup>141</sup>
<b>Polymère</b>	-Biodégradabilité -Bonne pénétration tissulaire -Facilité de manipulation	-Réactions allergiques possibles -Métabolisme in vivo pas toujours élucidé	<sup>142-143</sup>
<b>Silice</b> <b>Organosilice</b> <b>Ionosilice</b>	-Grande capacité d'encapsulation -Possibilité de moduler la forme et la taille -Fonctionnalisation simple	Nécessité de plus d'informations pharmacocinétique et toxicologique pour permettre une utilisation en clinique	<sup>42, 144</sup>
<b>Métal</b> (fer, or)	-Biocompatibilité -Possibilité de moduler la forme et la taille -Fonctionnalisation simple	Nécessité de plus d'informations pharmacocinétique et toxicologique pour permettre une utilisation en clinique	<sup>145-146</sup>
<b>Carbone</b>	-Très grande capacité d'encapsulation -Fonctionnalisation simple	Nécessité de plus d'informations pharmacocinétique et toxicologique pour permettre une utilisation en clinique	<sup>147</sup>

### 3.3.3. L'échappement endosomal

Les vecteurs chargés en siRNA sont internalisés dans les cellules et se retrouvent dans les endosomes précoces qui vont maturer en endosomes tardifs, caractérisés par un pH acide et la présence d'enzymes actives, pour finalement fusionner avec des lysosomes (figure 12). A l'intérieur de ces endosomes, la dégradation des vecteurs est enclenchée et les acides nucléiques sont détruits par l'action des nucléases.<sup>148</sup>

En conséquence, l'échappement endo-lysosomal est une étape décisive pour une délivrance efficace du siRNA dans le cytoplasme des cellules tumorales. Trois stratégies ont été utilisées pour échapper au compartiment endo-lysosomal.



**Figure 12.** Endocytose d'un produit et son destin à l'intérieur des cellules. Les produits internalisés sont initialement contenus dans un endosome précoce, où le pH luminal est légèrement acide (~6,3). La maturation de l'endosome précoce en endosome tardif s'accompagne d'une acidification supplémentaire (pH~5,5). Enfin, l'endosome tardif fusionne avec le lysosome (pH~4,7) et les produits sont dégradés par les enzymes hydrolytiques. Adapté de la référence<sup>148</sup>.

Tout d'abord, l'effet d'éponge à protons qui résulte de la protonation des molécules piégées à l'intérieur de l'endosome, par action du pH acide du milieu. Parmi les molécules qui permettent cet effet, on retrouve les polymères polycationiques tels que le polyéthylèneimine. Ces polyamines vont empêcher l'acidification de l'endosome en exerçant un effet tampon. En réponse à cet effet, les pompes à protons vont générer un afflux important de protons, accompagné d'eau et d'ions chlorures entraînant un gonflement de la vésicule suivi d'un choc osmotique responsable de la rupture de la membrane endosomale et de la libération de son contenu dans le cytosol.<sup>149</sup>

Une autre stratégie d'échappement est l'utilisation de peptides fusogènes qui pénètrent dans les bicouches phospholipidiques des vésicules et y créent des pores qui vont entraîner un gonflement suivi d'un choc osmotique.<sup>150</sup>

En dernier, on retrouve un mécanisme basé sur l'utilisation concomitante d'un photosensibilisateur et d'un rayonnement lumineux. Ce mécanisme est l'internalisation photochimique (photochemical internalization - PCI) qui sera détaillé au cours du prochain chapitre.

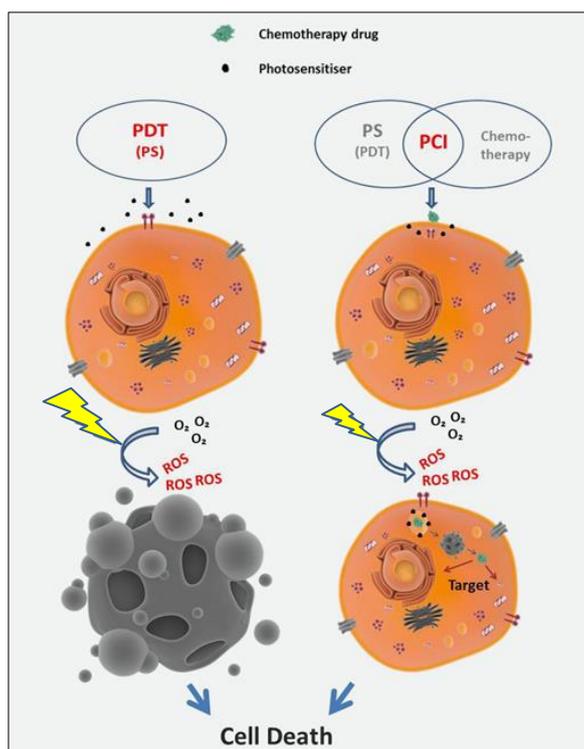


## CHAPITRE IV : INTERNALISATION PHOTOCHIMIQUE (PCI)

Nous avons commencé à évoquer le processus de l'échappement endo-lysosomal à la fin du chapitre précédent. Ce mécanisme s'est avéré nécessaire pour préserver l'intégrité moléculaire des macromolécules internalisées ainsi que leur activité pharmacologique, en empêchant leur dégradation intra-lysosomale. On retrouve donc, en plus de l'effet d'éponge à protons et des agents fusogènes, l'internalisation photochimique (PCI).

### 1. Principe de la PCI

Le principe de la PCI a été inspiré de celui de la PDT. En effet, la PCI est une technologie qui repose sur l'utilisation de photosensibilisateurs qui vont se retrouver au niveau des endosomes qui, suite à une activation lumineuse, conduisent à la rupture des membranes des vésicules endocytaires et à la libération contrôlée de leur contenu dans le milieu cytoplasmique par production de ROS. La PCI peut être utilisée pour la délivrance de peptides, oligonucléotides, molécules chimiothérapeutiques, etc.



**Figure 13.** PDT vs PCI. Les ROS produits lors de la PDT sont suffisants pour avoir un impact sur la cellule entière et entraîner sa mort. Cependant, lors de la PCI, la dose de lumière utilisée est insuffisante pour causer une mort cellulaire, mais suffisante pour provoquer des dommages au niveau local, par destruction de la membrane du compartiment endo-lysosomal et libération du médicament chimiothérapeutique piégé à l'intérieur. Adapté de la référence<sup>151</sup>.

Cependant, et contrairement à la PDT, la PCI est considérée comme une technique sublétales, du moment que l'interruption des membranes endo-lysosomales n'est pas particulièrement cytotoxique, en raison de la courte portée d'action et de la courte durée de vie des ROS produits, confinant l'effet des dommages à un niveau subcellulaire, au strict site de production, sans entraîner la mort cellulaire. Un exemple est illustré dans la figure 13, utilisant la PCI pour la délivrance de molécule chimiothérapique.

La PCI ne nécessite donc qu'une faible dose d'irradiation lumineuse, dans le seul but de libérer les molécules piégées au sein du compartiment endo-lysosomal, de sorte à ce qu'elles puissent échapper à la dégradation et atteindre, en toute sécurité, leurs cibles intracellulaires.<sup>151-157</sup>

Le mécanisme de la PCI a été décrit pour la première fois par Berg *et al.* en 1999, lors de la délivrance de protéines inactivant les ribosomes (RIPs) de type I, la peroxydase de raifort (peptide dérivé de p21ras) et d'un plasmide codant pour la GFP dont la translocation dans le cytosol a été induite par une irradiation lumineuse.<sup>158</sup>

## 2. Mécanisme d'action de la PCI

La PCI trouve son application essentiellement dans la délivrance de macromolécules, dont l'internalisation cellulaire dépend de la voie de l'endocytose. En effet, les petites molécules de faible poids moléculaire (inférieur à 500 Da) peuvent dans certains cas facilement franchir les membranes cellulaires par diffusion.<sup>159-160</sup>

Afin de pouvoir bénéficier de la PCI, il est essentiel que le PS utilisé puisse s'accumuler au niveau des endosomes, sans qu'il y ait translocation dans le cytoplasme lors de l'acidification du milieu luminal dans les endosomes tardifs et les lysosomes.<sup>161</sup>

Les PSs utilisés pour des applications en PCI peuvent se localiser soit dans la lumière des endosomes comme dans le cas de nanoparticules, soit dans les membranes endo-lysosomales. Dans ce dernier cas, il est important que le PS présente un caractère amphiphile, lui permettant de s'incorporer au sein de la bicouche phospholipidique, tel que le tetraphenyl-chlorine disulfonate (TPCS<sub>2a</sub>).

Suite à l'exposition du PS à la lumière, des ROS se forment de la même manière que lors de la PDT, avec une quantité moindre et engendrant uniquement des dommages localisés. Il a été rapporté dans la littérature que la teneur en oxygène est plus élevée au niveau des membranes, mais aussi que la durée de vie des ROS générées dans la phase lipidique membranaire est plus longue que dans la phase aqueuse, renforçant ainsi l'impact des dommages sur les membranes du compartiment endo-lysosomal *via* la PCI.<sup>58, 162-164</sup>

Les ROS générées vont agir en perméabilisant les membranes endocytaires suite à diverses réactions d'oxydation. L'efficacité du traitement photochimique est dépendante de la composition membranaire en éléments sensibles à l'action des ROS, tels que les acides gras insaturés et les protéines comportant un ou plusieurs des acides aminés suivants : tryptophane, tyrosine, cystéine, méthionine et histidine.

La peroxydation des lipides membranaires est la réaction la plus importante conduisant à la lyse des endo-lysosomes. Peu de temps avant la rupture des vésicules, qui survient de façon brutale, le pH lysosomal augmente suite aux dommages apportés par les ROS aux pompes à protons-ATPases lysosomales par réticulation de la cystéine, entraînant une déstabilisation des lysosomes par l'échange  $K^+/H^+$ . De la même façon, plusieurs autres protéines sont également réticulées par la formation de ponts disulfures (S-S) responsables de la dénaturation de ces protéines ainsi que la perte de leurs activités.<sup>165-171</sup>

Il a été remarqué que le cholestérol membranaire, préférentiellement localisé dans la membrane plasmique et les endosomes précoces, pouvait exercer un effet antagoniste à l'action de la PCI après la peroxydation lipidique de l'un des feuilletts membranaires, par le mécanisme de flip-flop, réduisant ainsi la perméabilité membranaire après l'irradiation.<sup>172</sup>

Une fois que les membranes endo-lysosomales sont lysées, les médicaments libérés dans le cytosol ont accès à la plupart des cibles intracellulaires dans le cytoplasme ou le nucléoplasme. En l'absence de traitement photochimique, les médicaments piégés resteront dans les lysosomes ou seront dégradés par leurs enzymes hydrolytiques.

Le défi majeur pour réaliser avec succès la PCI est de définir la dose de lumière adéquate. En effet, les limites entre PDT et PCI peuvent parfois se confondre par le fait que la rupture des lysosomes peut être à l'origine de l'activation de la voie apoptotique. La principale voie est liée à la libération dans le cytosol de cathepsines lysosomales, impliquées dans le clivage de la protéine Bid en Bid tronqué (tBid) pro-apoptotique, responsable du relargage du cytochrome c mitochondriale dans le cytosol, induisant l'activation de la cascade de signalisation apoptotique. Les cathepsines vont agir aussi en clivant la protéine anti-apoptotique Bcl-2, favorisant davantage les processus apoptotiques.<sup>173-176</sup>

On retrouve aussi dans la littérature des études qui exploitent le mécanisme de la PCI d'une autre façon, c'est la stratégie « light first » ou « lumière d'abord ». Cette hypothèse repose sur l'idée que les endo-lysosomes rompus lors de l'activation lumineuse du PS peuvent fusionner avec des endosomes précoces nouvellement formés contenant la drogue d'intérêt qui a été administrée aux cellules après l'irradiation. Cela offrirait au contenu de la vésicule nouvellement formée, une voie d'évacuation vers le cytosol, en évitant le pH acide des lysosomes.

Cependant, il est important de noter que le traitement doit intervenir au maximum, 5 heures après l'exposition à la lumière, avant la réparation des lysosomes endommagés. Cette stratégie a été testée en utilisant le médicament FOSCAN® formulé en liposomes (FOSLIP®) et en liposomes PEGylés (FOSPEG®). Contrairement à FOSCAN® qui ne s'accumule pas au niveau des endosomes, les deux autres formulations se sont avérées favorables à un effet PCI. Ces deux formulations ont été utilisées pour la délivrance par PCI d'un médicament anticancéreux qui est la bléomycine, où l'irradiation lumineuse va intervenir en amont ou en aval de l'administration de l'agent chimiothérapeutique. Les résultats obtenus ont indiqué l'absence de l'effet chimiothérapeutique de la bléomycine, lorsque l'irradiation intervient après l'administration de la molécule, suite à sa dégradation intra-lysosomale. Tandis que la bléomycine administrée après l'exposition à la lumière a pu se frayer un chemin vers le cytosol et atteindre sa cible dans le noyau cellulaire afin d'exercer son action anti-tumorale.<sup>177-179</sup>

Dans le même état d'esprit, Lu *et al.* ont élaboré des micelles à base de phtalocyanine dendrimérique et de copolymère polyéthylène glycol et poly L-lysine (PEG-PLL). Ces micelles ont été utilisées pour la délivrance de la doxorubicine (DOX) *via* PCI sur des cellules MCF-7 (cancer du sein) résistantes à la DOX par abaissement du pH des endosomes, à la fois *in vitro* et sur des xénogreffes de souris. La PCI a produit de meilleurs résultats lorsque l'activation lumineuse de la phtalocyanine a eu lieu avant l'administration de DOX, à la fois *in vitro* et *in vivo*. En effet, les médicaments basiques, tels que la DOX sont protonés lors de leur passage dans les vésicules endocytaires acides, et deviennent donc incapables de traverser les membranes et y restent séquestrés.<sup>180-182</sup>

### 3. PCI pour la délivrance de siRNA

Dans le traitement des cancers, la PCI trouve de nombreuses applications permettant la délivrance intracellulaire de diverses macromolécules telles que les peptides, les protéines, les acides nucléiques et les agents chimiothérapeutiques. Dans cette partie, nous allons nous intéresser exclusivement à l'utilisation de la PCI pour la délivrance du siRNA.

De nombreuses études se sont intéressées à l'utilisation de la PCI pour l'inhibition de l'expression génique médiée par le siRNA en utilisant une variété de vecteurs. Ces vecteurs peuvent être de natures diverses : lipidique, polymérique, ou encore des nanoparticules de silice ou d'ionosilice mésoporeuses ainsi que des nanoparticules de type cœur-coquille avec un cœur métallique et une coquille de silice mésoporeuse.

Dans le tableau 8 suivant, nous allons citer quelques exemples utilisant la PCI pour la délivrance du siRNA.

**Tableau 8.** Exemples de systèmes particuliers utilisés pour la délivrance de siRNA, dont le mécanisme d'action repose sur le principe de la PCI.

Composition du vecteur	PS	siRNA	Lignée cellulaire	Référence
Nanoparticules organosiliciques mésoporeuses	Porphyrine	siFluc (Firefly luciferase)	MCF-7 (cancer du sein)	144
Nanoparticules organosiliciques mésoporeuses	Phtalocyanine	siFluc	MCF-7	183
Orthogonal photoactivable superballs avec coquille de silice mésoporeuse	Phtalocyanine	siSOD1 (Superoxyde dismutase 1)	HeLa (cancer cervical) Cal27 (carcinome oral)	184
Lipides cationiques	TPPS <sub>2a</sub> *	siRNA anti ARNm du gène S100A4	HCT-116/SW620 (cancer colorectal) OHS (ostéosarcome) RMS (rhabdomyosarcome)	185
Cyclodextrine	TPPS <sub>2a</sub> *	siRNA anti ARNm du gène S100A4	OHS RMS	186
Poly-L-lysine Poly-L-arginine Poly-L-histidine	TPPS <sub>2a</sub> *	siRNA anti ARNm des gènes S100A4, MEK1 et MEK2	OHS SK-MEL-28 (mélanome)	187
Polyamidoamine	TPPS <sub>2a</sub> *	Si-eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein)	OHS	188
Lipofectamine	TPPS <sub>2a</sub> *	siEGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)	A431 (carcinome épidermoïde)	189
Nanogels de dextran cationique	TPPS <sub>2a</sub> *	siFluc/si-eGFP	Huh-7 (carcinome hépatique)	190
Méthacrylamide Chitosan	TPPS <sub>2a</sub> *	siFluc	H1299 (cancer pulmonaire)	191

\* : Méso-tétraphénylporphyrine disulfonate.

#### 4. Utilisation Clinique de la PCI

Le premier essai clinique utilisant la technologie PCI chez l'homme a été mené à l'University College London Hospital en 2009 (NCT00993512).<sup>192</sup> Cette étude a été réalisée sur un groupe de 22 patients présentant des tumeurs malignes récurrentes et/ou métastatiques à des stades avancés de la peau ou de la tête et du cou. L'objectif de cette étude clinique de phase I est d'évaluer l'innocuité et la tolérance de la PCI induite par la fimaporfine (PS) commercialisée sous le nom d'AMPHINEX® (tétraphénylchlorine disulfonate -TPCS<sub>2a</sub>) administrée à des doses croissantes, pour la délivrance intracellulaire de la bléomycine, utilisée comme agent chimiothérapeutique.

Au jour 0, les patients recrutés ont reçu une dose du PS fimaporfine par injection intraveineuse lente. Dans le cas d'absence d'effets indésirables, une perfusion intraveineuse de bléomycine a été administrée le jour 4. Trois heures après, la zone tumorale préalablement délimitée est éclairée par un laser à 652 nm pour une durée de 10 minutes (60 J/cm<sup>2</sup>). Dans le but d'identifier la dose maximale tolérée, la dose initiale du PS de 0.25 mg/kg a été augmentée chez 3 groupes de patients à 0.5, 1.0 et 1.5 mg/kg.

Les données obtenues ont montré que la fimaporfine est un PS sûr et bien toléré par tous les patients. La mesure des constantes vitales et la réalisation de bilans sanguins chez chaque patient tout au long de l'essai n'a révélé aucune anomalie. Par conséquent, l'intervention PCI s'est avérée être sans danger et sans impact négatif sur l'homéostasie de l'organisme.

Les événements indésirables liés à la PCI étaient essentiellement d'ordre local, résultant du processus inflammatoire local. Des niveaux élevés de douleur pendant et après l'irradiation ont été rapportés par les patients ayant subi une PCI sous anesthésie locale, qui a pu être partiellement éliminée par le recours à une anesthésie générale. Cette douleur se situe uniquement au niveau du site illuminé et est directement proportionnelle à la taille de la surface de la tumeur irradiée et à l'efficacité clinique. L'un des principaux effets indésirables limitant la dose est la photosensibilité cutanée résiduelle, identique à celle rencontrée avec la PDT. Les études de photosensibilité cutanée ont indiqué que la réaction est dose dépendante, et qu'elle peut persister jusqu'à 2 à 3 semaines après l'administration du PS.

La technologie PCI, encore en phase de recherche clinique, a été utilisée jusqu'à présent dans la prise en charge des tumeurs complexes, avec un haut niveau de succès dans leur élimination, avec des effets indésirables minimes. Le défi est donc d'élargir l'utilisation de cette technologie à d'autres cancers, tels que le cholangiocarcinome inopérable, dont fait l'objet un essai clinique de phase II, récemment lancé (NCT04099888).

Après avoir introduit au cours de cette première partie bibliographique l'essentiel des notions de bases dans la chimie du sol-gel, la thérapie photodynamique, la thérapie génique, l'internalisation photochimique ainsi qu'un résumé de l'état de l'art dans chacun de ces domaines, nous allons nous intéresser à présent notre projet.

Au cours de ce travail, nous avons synthétisé et caractérisé une nouvelle classe de nanoparticules hybrides, à base d'ionosilice et de porphyrine. Cette combinaison inédite nous a permis de fusionner les propriétés chimique et physico-chimique intéressantes liées au précurseur ionosilicique, à l'action photosensibilisante de la porphyrine, donnant lieu à la possibilité de faire de la thérapie photodynamique, en plus de l'imagerie grâce à sa fluorescence.

Le précurseur ionosilicique cationique utilisé va permettre de doter les nanoparticules de charges de surface positives, qui pourront être exploitées afin de complexer diverses molécules chargées négativement, entre autre des acides nucléiques tels que le siRNA qui pourra être ensuite délivré à l'intérieur des cellules grâce au mécanisme d'internalisation photochimique.

L'ensemble des résultats obtenus seront détaillés, discutés et comparés à d'autres études réalisées dans le même contexte. Mais avant cela, une description complète des protocoles réalisés est donnée dans la partie expérimentale suivante.



**PARTIE**

**EXPERIMENTALE**



## EXPERIMENTAL PART

### 1. Chemicals and siRNA molecules

(3-Aminopropyl) trimethoxysilane, (3-chloropropyl) trimethoxysilane, N,N-diisopropylethylamine, sodium hexadecyl sulfate (containing 40% sodium stearyl sulfate) and anhydrous 1-propanol were purchased from abcr GmbH, Germany. Iodomethane, 3-(triethoxysilyl) propyl isocyanate, 1,3,5-triethylbenzene, 1,3-diphenylisobenzofuran and ammonium chloride were obtained from Sigma-Aldrich, France. 5,10,15,20-Tetrakis(4-aminophenyl)porphine and 1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl-8-(4-carboxyphenyl)BODIPY were purchased from PorphyrChem, France. Silane PEG-2000 and silane PEG-5000 were obtained from RAPP Polymer, Germany. All chemicals were used as received.

All siRNA used were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). The Firefly Luciferase siRNA (siFluc) targeting sequence (sense: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3' and anti-sense: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3'). The siRNA inhibitor apoptotic proteins (siIAP) targeting sequence (sense: 5'-CUAGGAGACAGUCCUAUUCdTdT-3' and anti-sense 5'-GAAUAGGACUGUCUCCUAGdTdT-3'). The control siRNA without any biological activity used in two forms as negative control, without any labelling (siCtrl) or labelled with ATTO-488 (siCtrl-ATTO-488) (sense: 5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT-3' and anti-sense: 5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGdTdT-3').

### 2. PMINPs synthesis

A mixture of sodium hexadecylsulfate SHS (100 mg, 0.3 mmol), 1,3,5-triethylbenzene (1.5 mL) and deionized water (30 mL) was stirred at 70°C for 8 hours at 750 rpm in a 100 mL round bottom flask. Then, a mixture of precursors was prepared in 3 mL of 1-propanol: methyl-(tris(3-trimethoxysilyl)propyl) ammonium iodide (187.3 mg, 0.361 mmol) and the tetrasilylated porphyrin (31.6 mg, 0.019 mmol). The mixture was added drop by drop under vigorous stirring during 20 minutes. Then, an aqueous solution of non-ionic surfactant triblock copolymer F127 (20 mg in 1 mL) was added to the reaction, followed after 5 minutes by 600 µL of ammonia (0.1 M). Ten minutes later, an aqueous solution of Silane-PEG 2000 (20 mg in 1 mL) was added. The mixture was stirred at 1250 rpm for 16 hours at 70°C.

The reaction was cooled to room temperature, and then the synthesized nanoparticles were collected by centrifugation (20k rpm for 15 minutes) and were washed twice with ethanol before surfactant extraction with several washes using a saturated ethanolic solution of ammonium chloride (6 g/L).

### 3. Study of BODIPY loading in PMINPS

The bodipy (Bdp) loading in PMINPs was carried out in aqueous media at two different pH conditions [pH 7 (phosphate buffer) and pH 8.5 (ammonium buffer)] using increasing feed weight ratios (fwr – Equation 1) ranging from 30 to 100% of Bdp, for a fixed amount of PMINPs.

$$fwr (\%) = \frac{\text{Mass of BODIPY fed}}{\text{Mass of PMINPs}} \times 100$$

**Equation 1.** Formula of feed weight ratio (fwr).

The solutions of Bdp at various concentrations were prepared. Then, 500  $\mu\text{L}$  of each solution was mixed with 500  $\mu\text{L}$  of PMINPs suspension at 1 mg/mL to reach different fwr. The Bdp loading into PMINPs is performed by simple soaking of Bdp with PMINPs suspension. The soaking was achieved in dark condition, at room temperature and under stirring for 24 hours. The supernatants were then collected by centrifugation (20 000 rpm for 15 min), and analyzed by UV-vis spectroscopy and absorbance measurements at 524 nm. The amounts of Bdp loaded were calculated from calibration curves obtained with Bdp solutions at various concentrations.

Two key parameters are used in literature to evaluate the drug loading capacity of nanomedicines.<sup>193-194</sup> First, Drug Loading Content (DLC – Equation 2) is determined by the physico-chemical properties of the nano-system and represents the weight ratio of Bdp loaded to PMINPs used. Second, Drug Loading Efficiency (DLE – Equation 3) is related to the used mass of drug in feed and the drug loading mechanism, and corresponds to the mass ratio percentage of Bdp loaded to the amount of Bdp initially introduced.

$$DLC (\%) = \frac{\text{Mass of BODIPY loaded}}{\text{Mass of PMINPs}} \times 100$$

**Equation 2.** Formula of Drug Loading Content (DLC).

$$DLE (\%) = \frac{\text{Mass of BODIPY loaded}}{\text{Mass of BODIPY in feed}} \times 100$$

**Equation 3.** Formula of Drug Loading Efficiency (DLE).

### 4. Study of BODIPY release from PMINPs

The Bdp release from PMINPs was performed in aqueous conditions supplemented with 10% of DMSO at pH 4 (acetate buffer) and pH 7.4 (PBS) for only fwr = 100%. The process was carried out in dark condition, at room temperature and without stirring.

The centrifugation pellets obtained at the end of the loading procedure were dispersed in 1 mL of buffer and Bdp release was monitored by UV-vis spectrophotometer absorbance at 524 nm, at

different time points until 24 hours. The amounts of Bdp released were calculated from calibration curves obtained with Bdp solutions at various concentrations.

Getting good drug loading skills is not a sufficient parameter for a nanomedicine use to be considered as a good carrier for drug delivery. PMINPs should be able to release a maximum amount of Bdp loaded from their porosities. That is why a third key parameter must be added to evaluate drug delivery abilities of nanoparticles.<sup>194</sup> Drug Released (DR - Equation 4) refers to mass ratio between Bdp released and Bdp loaded.

$$DR (\%) = \frac{\text{Mass of BODIPY released}}{\text{Mass of BODIPY loaded}} \times 100$$

**Equation 4.** Formula of Drug Released (DR).

## 5. Analytical methods and apparatus

### 5.1. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Transmission electron microscope observations were carried out using JEOL 1400 Plus instrument (120kV). Samples were deposited from ethanolic suspensions (200 µg/mL) onto a carbon-coated copper grid and were dried in the air.

### 5.2. Cross-polarization magic angle spinning (CP-MAS) solid-state NMR

<sup>29</sup>Si CP-MAS and <sup>13</sup>C CP-MAS NMR experiments were recorded on a Varian VNMRS 300 MHz NMR Spectrometer (USA), using a 3.2 mm magic angle spinning (MAS) probe spinning at 6 kHz and 12 kHz respectively.

### 5.3. Nitrogen sorption-desorption

N<sub>2</sub> sorption-desorption isotherms at liquid nitrogen temperature was employed to measure specific surface area (SSA), pore volume and pore size using TRISTAR 3000 gas sorption analyzer instrument (Micromeritics, USA). Specific surface area was calculated by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method.<sup>195</sup> Pore volume and average pore size were estimated using the Barrett-Joyner-Helenda method with the Kruk-Jaroniec-Sayari (BJH/KJS).<sup>196</sup> All calculations were performed on the sorption branch of the isotherm. The day prior to analysis, the samples were outgassed overnight at 100°C.

### 5.4. Fourier Transform Infrared Spectrometry (FT-IR)

Infrared spectra were recorded on Spectrum Two FT-IR spectroscopy instrument (PerkinElmer, USA). The attenuated total reflectance (ATR) measurement mode was used (diamond crystal), and measurements were performed in the 500 - 4000 cm<sup>-1</sup> range. Two types of nanoparticles were used for this analysis, without silane PEG-2000 and decorated with silane PEG-2000; both spectra were then compared with the spectrum of free-silane PEG-2000.

### **5.5. Zeta potential and Dynamic Light Scattering (DLS) measurements**

Zeta potential and DLS measurements were performed with Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) at 25°C and pH 7, using standard disposable cuvettes. Analyses were carried out on PMINPs using an aqueous suspension or cell culture medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum (200 µg/mL). Three individual measurements were performed and averaged to get the final analysis result. The same procedure was repeated using an aqueous suspension of PMINPs@Bdp at 200 µg/mL.

### **5.6. Ultraviolet-visible (UV-vis) absorption spectroscopy**

UV-Vis absorption spectra were collected at 25°C on a JASCO V-750 spectrophotometer (France) in 10 mm quartz cells, using an aqueous solution of free-porphyrin at 100 µg/mL and an aqueous suspension of PMINPs at 200 µg/mL. The same method was repeated using free-bodipy at 100 µg/mL and PMINPs@Bdp at 200 µg/mL.

### **5.7. Fluorescence spectroscopy**

Emission spectra were recorded at 25°C on a fluorescence spectrophotometer (FS920, Edinburgh Instruments) with a 450 W continuous xenon arc lamp using a quartz cuvette with 1.0 cm excitation path length and an aqueous solution of free-porphyrin at 100 µg/mL and an aqueous suspension of nanoparticles at 200 µg/mL. Excitation wavelength was 430 nm.

## **6. Biological experiments**

### **6.1. Cell lines**

Human breast cancer cell line (MDA-MB-231) was purchased from ATCC. MDA-MB-231-LUC-RFP stable cell line was obtained from AMSBIO (SC041, Abingdon, UK). Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium Gibco™ (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and gentamycin 100 µg/mL. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were purchased from ATCC and were maintained in Endothelial cell Growth Medium 2 supplemented with FBS (2%), epidermal growth factor (5 ng/mL), basic fibroblast growth factor (10 ng/mL), insulin-like growth factor (20 ng/mL), vascular endothelial growth factor (0.5 ng/mL), ascorbic acid (1 µg/mL), heparin (22.5 µg/mL), hydrocortisone (0.2 µg/mL), 1% penicillin/streptomycin. All cells were incubated at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>.

### **6.2. Cytotoxicity assay**

MDA-MB-231 cells and HUVECs were seeded in 96-well plates, in their respective medium, at a density of 2000 cells per well (200 µL). After 24 hours, cells were treated with different concentrations of nanoparticles ranging from 1 to 100 µg/mL. Control wells were treated with the vehicle. Cells were incubated for 3 days, and the cell viability was then determined by the colorimetric MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. MTT was added in each well at a final concentration of 0.5 mg/mL for 4 hours at 37°C. Then medium was aspirated and the

formed purple crystals were dissolved with equal volumes of ethanol/DMSO. The optical density was measured using a multiwell plate reader (Multiskan FC, ThermoFisher Scientific, USA) at 540 nm. The mean absorbance of control cells served as the reference for calculating 100% cellular viability.

### **6.3. Photodynamic therapy experiments**

MDA-MB-231 cells were seeded in 96-well plates at a density of 3000 cells per well and allowed to grow for 24 hours. Then cells were treated with 5 and 10  $\mu\text{g/mL}$  nanoparticles for 24 hours. Non-treated cells were considered as a control. After incubation with PMINPs, cells were exposed (or not) to green light irradiation at 545 nm ( $34 \text{ J/cm}^2$ ) or blue light at (450 - 490 nm) for 15 min duration ( $8 \text{ J/cm}^2$ ), in order to study one-photon excitation PDT (OPE-PDT) effect. The light beam was focused by a microscope objective lens (4x/0.10). Two days later, the phototoxicity effect of nanoparticles was assessed using MTT assay as previously described. The percentage of cell viability was calculated according to the control not exposed to light (set as 100%). In order to investigate two-photon excitation PDT (TPE-PDT) effect, the same procedure was performed using a pulsed laser at 780, 860 and 1064 nm for 4.68 s (3x 1.56 s, 3 W).

### **6.4. Cellular Reactive Oxygen Species detection and quantification**

MDA-MB-231 cells were seeded in 96-well plate, then left to grow for 24 hours. Cells were treated with PMINPs at a concentration of 20  $\mu\text{g/mL}$  for 24 hours. After the incubation period, ROS were detected using DCFDA/ $\text{H}_2$ DCFDA-Cellular ROS Assay Kit (Abcam, UK). In principle, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) is a fluorogenic dye that measures ROS activity within the cells. Control (non-treated) cells and nanoparticles treated cells were incubated with 20  $\mu\text{M}$  of DCFDA for 45 min at 37°C, then cells were exposed (or not) to green light beam ( $\lambda_{\text{exc}}$  545 nm for 15 min,  $34 \text{ J/cm}^2$ ) or blue light at (450 - 490 nm) for 15 min duration ( $8 \text{ J/cm}^2$ ), under the same conditions as PDT experiments. After irradiation, cells were washed twice then visualized using Leica DM.IRB fluorescence microscope at 450 - 490 nm, objective 10x. The obtained images were processed for the cell fluorescence intensity quantification using ImageJ software. The same procedure was performed using a pulsed laser at 780 nm (3x 1.56 s, 3 W).

### **6.5. Photo-degradation of 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) and detection of singlet oxygen**

For singlet oxygen evaluations using DPBF probe, several ethanolic suspensions of PMINPs (10  $\mu\text{g/mL}$ ) mixed to DPBF (35  $\mu\text{M}$ ) in a final volume of 200  $\mu\text{L}$  were illuminated at 450 - 490 nm (blue light) or 545 nm (green light) for different light irradiation times ranging from 15 to 900 seconds. The same procedure was repeated using DPBF solutions only. The decomposition of DPBF was then monitored by the absorbance measurements at 410 nm, using NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, USA). The experiment was performed three times.

### **6.6. Agarose gel retardation assay**

In order to determine the siRNA binding ability to PMINPs, gel retardation assay was carried out. A fixed quantity (0.364 µg) of siCtrl was added to increasing amounts of PMINPs, in a way to have increasing weight ratios (from 1/3 to 1/30). The mixture was incubated at 37°C for 30 min for effective complex formation. After incubation, the siCtrl/PMINPs complex was mixed with xylene cyanol 0.25% then electrophoresed on 2% (w/v) agarose gel containing GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Interchim, France), with running buffer Tris-Borate-EDTA (TBE) 0.5X pH 8.2 at 100V for 30 min. siCtrl bands were visualized and photographed by an ultraviolet transilluminator (Infinity Gel documentation Imaging, Vilber Lourmat, France). The high binding capacity was expressed by a total retardation of siCtrl, as showed by the disappearance of siCtrl bands on the gel. The same procedure was repeated and the same ratios were used to investigate the binding capacity of PMINPs@Bdp.

### **6.7. Evaluation of the stability of the complexes siRNA/PMINPs**

In order to evaluate the stability of the complex siRNA/PMINPs, gel retardation assay was performed at different time points. A fixed amount of siCtrl (0.36 µg) was added to a fixed quantity of PMINPs (3.6 µg), in order to have a weight ratio of (1/10). The mixture was incubated at 37°C for 30 min, 1 h, 4 h, 6 h, 18 h and 24 h, and then electrophoresed on 2% (w/v) agarose gel, as previously described.

### **6.8. siRNA/PMINPs complex characterization**

Zeta potential and DLS measurements were performed using Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) at 25°C and pH 7, using standard disposable cuvettes. Different weight ratios of siCtrl and PMINPs were prepared in RNase-free water and incubated for 30 min at 37°C. Three individual measurements were done immediately after siCtrl/PMINPs complex formation.

### **6.9. Cellular uptake kinetics of PMINPs and siRNA/PMINPs complexes**

MDA-MB-231 cells were seeded in 96-well plate, then left to grow for 24 hours at 37°C. Cells were treated with PMINPs (14 µg/mL) or with the complex siCtrl-ATTO-488/PMINPs (100 nM / 14 µg/mL) at a weight ratio of 1/10 for different time intervals (1 h, 4 h, 6 h, 18 h and 24 h). The cellular uptake of PMINPs and complexes was monitored by fluorescence intensity measurements, using CLARIOstar high performance monochromator multimode microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). At the end of incubation time, total fluorescence (TF) was measured, then cells were washed three times with PBS and the remaining fluorescence (RF) was recorded. The results are expressed as a ratio RF/TF (%). Fluorescence intensities were corrected according to the total number of living cells in each well, determined by MTT assay as previously described.

## 6.10. Imaging

MDA-MB-231 cells were seeded into glass bottom 8-well tissue culture chambers (SARSTEDT, Germany), at a density of  $10^6$  cells/cm<sup>2</sup> for 24 hours. Then, cells were incubated for 4 hours with 500  $\mu$ L culture medium containing complex siCtrl-ATTO-488 (100 nM)/PMINPs (14  $\mu$ g/mL) using weight ratio 1/10, free-PMINPs, free siCtrl-ATTO-488 (100 nM) and Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent (Invitrogen, USA) /siCtrl-ATTO-488 as a positive control. Untreated cells were considered as a negative control. Twenty minutes prior the end of incubation, cells were loaded with CellMask™ Orange plasma membrane stain (Invitrogen, France) and Hoechst 33342 nucleus stain (Invitrogen, USA) at a final concentration of 5  $\mu$ g/mL and 10  $\mu$ g/mL, respectively. Then, cells were washed three times with culture medium before observation with LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss, France). Cells were scanned at 780 nm for PMINPs, 488 nm for siCtrl-ATTO-488, 561 nm for CellMask and 760 nm for Hoechst, using a high magnification (63x/1.4 OIL Plan-Apo). The same setup was used for PMINPs@Bdp imaging. Cells were scanned at 488 nm for BODIPY.

## 6.11. Mechanism of the cellular uptake of PMINPs and siRNA/PMINPs complexes

As endocytosis is greatly temperature dependent, we monitored the cellular uptake of PMINPs and the siRNA/PMINPs complexes in two different temperature conditions: 4°C and 37°C. MDA-MB-231 cells were seeded in two 96-well plates, then left to grow for 24 h at 37°C. The first plate was treated with PMINPs (14  $\mu$ g/mL) or with the complex siCtrl-ATTO-488/PMINPs (100 nM / 14  $\mu$ g/mL) for four hours at 37°C. The second plate was treated in the same way, but using cold condition (4°C), then left at 4°C for four hours. The cellular uptake of PMINPs and complexes was monitored by fluorescence intensity measurements, using CLARIOstar high performance monochromator multimode microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) as previously described. The results are expressed as a percentage of fluorescence of cells left at 4°C compared to the cells left at 37°C (set as 100%). Fluorescence intensities were corrected according to the total number of living cells in each well, determined by MTT assay as previously described.

## 6.12. One-photon induced siFluc delivery and cell luciferase assay

Twenty four hours prior to transfection, MDA-MB-231-LUC-RFP cells were plated at a density of 3000 cells per well, into 96-well white plate, PS, F-bottom,  $\mu$ CLEAR® (greiner bio-one, Germany). The complex siFluc/PMINPs was freshly prepared in serum free cell culture medium for 30 min at 37°C using different concentrations of siFluc (50, 100 and 200 nM) at a weight ratio of 1/10. Then, cells were treated (or not) with siFluc/PMINPs complex for four hours. After that, fetal bovine serum was added in each well to reach a 10% serum. After eight hours of incubation, cells were submitted to light irradiation at 545 nm for 5 min duration (11.3 J/cm<sup>2</sup>). The light beam was focused by a microscope objective lens (4x/0.10). After 48 hours of transfection, luciferase activity was evaluated by addition of D-Luciferin (PerkinElmer, USA) at a final concentration of  $10^{-3}$  M. Cell

luminescence was measured 10 min after, with a plate reader CLARIOstar high performance monochromator multimode microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent was used as positive control transfection reagent. Results are expressed as a percentage of luminescence activity of treated cells compared to the control cells (set as 100%). Luciferase activity was corrected according to the total number of living cells in each well, as determined by the MTT assay previously described. The same procedure was performed using the blue light at (450 - 490 nm) for 5 min duration (2.6 J/cm<sup>2</sup>).

### **6.13. Dual evaluation of two-photon excitation-PDT and gene silencing using siAP**

MDA-MB-231 cells were seeded into glass bottom 384-well plate (CORNING, USA), at a density of 2000 cells per well for 24 hours. The complex siAP/PMINPs was prepared in serum free cell culture medium for 30 min at 37°C using different concentrations of siAP (50, 100 and 200 nM) at a weight ratio of 1/10. Then, cells were treated (or not) with siAP/PMINPs complex for four hours. After that, fetal bovine serum was added in each well to reach a 10% serum. After eight hours of incubation, cells were submitted to pulsed LASER irradiation at 780 nm for 4.68 s duration (3x 1.56 s, 3 W). Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent was used as positive control transfection reagent. Results are expressed as a percentage of cell death determined by MTT assay, and compared to the non-treated and non-irradiated control cells (set as 100%). In this case, the correct transfection of siRNA targeted against Inhibitor of Apoptosis Protein (siAP) may increase the cell death efficiency of PDT. The obtained combination effect was then investigated using CompuSyn software.<sup>197</sup>

### **6.14. Study of PCI and endosomal escape mechanism of the complexes siRNA/PMINPs**

MDA-MB-231 cells were seeded into glass bottom 96-well plate half area (CORNING, USA), at a density of 10<sup>6</sup> cells/cm<sup>2</sup> for 24 hours. Cells were then incubated with 100 µL culture medium containing complex siCtrl (100 nM)/PMINPs (14 µg/mL) at weight ratio 1/10. Untreated cells were considered as a control. Eight hours later, cells were irradiated or not at 545 nm for 5 min (11.3 J/cm<sup>2</sup>). The light beam was focused by a microscope objective lens (4x/0.10). After irradiation, cells were stained with LysoTracker® Green DND-26 (Molecular Probes, USA) at a final concentration of 1 µM for 2 hours and 20 min before the end of incubation they stained with Hoechst 33342 at 10 µg/mL. Thereafter, cells were washed three times with culture medium before observation with LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss, Germany). Cells were scanned at 780 nm for the complex siCtrl/PMINPs, 488 nm for LysoTracker Green and 760 nm for Hoechst, using a high magnification (63x/1.4 OIL Plan-Apo).

### **6.15. Zebrafish breeding conditions**

Wild-type AB and Casper zebrafish (*Danio rerio*) strains were purchased from Zebrafish International Resource Center (ZIRC) as embryos and were raised to adulthood in circulating aquarium system inside environmentally controlled room (28°C, 80% humidity, 14 h light/10 h dark cycle), in the lab's facilities of Molecular Mechanisms in Neurodegenerative Dementia (MMDN), Inserm U1198, Montpellier University, Montpellier.

Experiments with zebrafish embryos until 96 hpf are considered as in vitro studies according to the EU Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.<sup>198</sup>

### **6.16. In vivo toxicity study of PMINPs in zebrafish embryos**

Fertilized AB zebrafish eggs were collected, examined under stereo microscope and then maintained at 28°C. A volume of 1 nL of PMINPs suspension (at 0.5 or 1 mg/mL) was microinjected (or not) into the cytoplasm of blastomeres (embryonic cells sitting atop the yolk of newly fertilized egg) of embryos at 1-4 cell-stage, using FemtoJet® 4x microinjector (Eppendorf, Germany). For each condition, 70 fertilized eggs were selected (n = 70). Because there are no membranes separating blastomeres from the yolk at this early stage, the suspension injected in one cell will evenly spread throughout the whole organism. The percentages of living, deformed and dead embryos were recorded using Olympus MVX10 stereo microscope at 4, 24, 48 and 72 hpf.

### **6.17. Two-photon excitation-PDT study in zebrafish embryos**

MDA-MB-231-LUC-RFP cells were seeded in Nunc EasYFlask 75 cm<sup>2</sup>. 24 hours after seeding, cells were treated with 10 µg/mL of PMINPs for 24 h. After incubation, cells were washed thrice with PBS then trypsinized and suspended in culture medium. Cells were counted, centrifuged and then suspended in the required volume of PBS containing 10 % FBS to have a solution of  $2 \times 10^7$  cells/mL. The solution was kept in ice until injection. Casper embryos at 48 hpf were used. Embryos were anesthetized with tricaine solution 10 min prior to injection. Then, embryos were placed on agar mold for the microinjection of MDA-MB-231-LUC-RFP cells previously incubated with PMINPs. Each embryo received 10 nL cell suspension to get 200 - 400 injected cells per embryo in the pericardial cavity. After injection, the xenografted embryos were kept in water at 30°C. 24 hours after injection, embryos were imaged using confocal microscopy Zeiss LSM 880 at  $\lambda_{exc} = 561$  nm and  $\lambda_{em} = 567 - 716$  nm, objective 20x, for the detection of cancer cell xenografts stained in red by the red fluorescent protein. Bright field images were also acquired. Then, each embryo was placed in a well of 48-well plate with 400 µL of water containing tricaine. Embryos were divided into two groups; exposed or not to irradiation, using pulsed laser at 780 nm (3x 1.56 s, 3 W). 12 embryos were used for each condition (n = 12). 24 hours later, the embryos were exposed again to imaging.

## **7. Statistical analysis**

Results were presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent experiments. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism. The comparison between groups was analyzed with Student's t-test. Differences were considered statistically significant when p values were less than 0.05. The level of significance was defined as ns (non-statistically significant), \* statistical significance difference ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.005$ ), \*\*\* ( $p < 0.0005$ ) and \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ).

# **RÉSULTATS ET DISCUSSION**



# CHAPITRE I : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES NANOPARTICULES HYBRIDES À BASE D'IONOSILICE ET DE PORPHYRINE

Au cours de ce chapitre, nous allons nous intéresser à l'étape de synthèse des nanoparticules ionosiliciques périodiques mésoporeuses (PMINPs) contenant des motifs de porphyrine et à l'optimisation de leur protocole de synthèse. Nous allons ainsi observer l'impact de la variation de certains paramètres clés, tels que la quantité de porphyrine et l'utilisation d'agent gonflant, sur la morphologie des nanoparticules, leurs tailles et leurs textures.

Une fois que la synthèse sera achevée, les nano-objets obtenus seront caractérisés en utilisant diverses méthodes analytiques, afin de s'assurer de l'obtention de caractéristiques morphologiques, chimiques, physico-chimiques et spectrales adéquates pour les diverses applications prévues.

Nous allons ainsi recourir à la microscopie électronique à transmission (TEM), la DLS, la RMN du solide, l'adsorption d'azote, les spectroscopies UV-visible, infrarouge et d'émission de fluorescence, en plus de la mesure du potentiel zêta. L'ensemble de ces techniques de caractérisation effectuées vont nous permettre de confirmer les propriétés intéressantes des nanoparticules d'ionosilice déjà citées dans la partie bibliographique : une porosité élevée, une architecture hautement organisée ainsi qu'une polyvalence chimique inégalée, due à la grande variabilité et le nombre élevé d'espèces ioniques réparties de façon homogène sur l'ensemble du réseau ionosilicique.

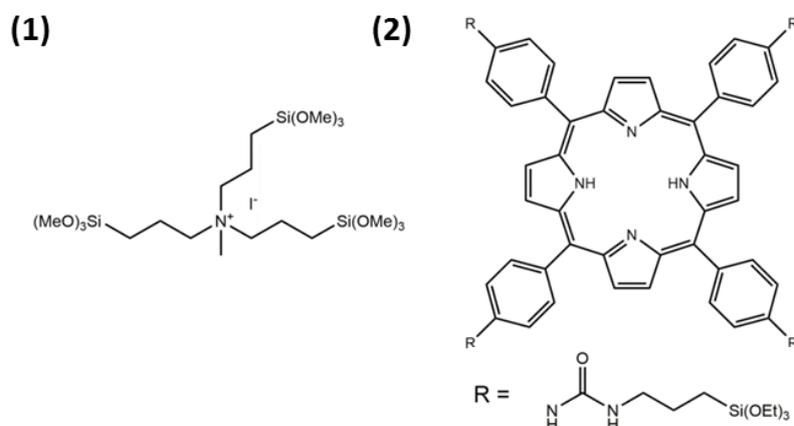
## 1. Synthèse et optimisation des PMINPs

La synthèse des PMINPs met en jeu deux précurseurs (figure 14). Le premier est un précurseur d'ionosilice méthyl-(tris(3-triméthoxysilyl)propyl)ammonium (MeTrisN) et le second précurseur est une porphyrine tétrasilylée. Ces deux précurseurs ont été synthétisés et caractérisés au sein de notre laboratoire selon la littérature.<sup>26, 28, 38, 199</sup>

Avant de procéder à la synthèse des nanoparticules, un cahier des charges a été établi afin de déterminer les spécificités recherchées pour nos nano-objets :

- Monodispersité et biocompatibilité ;
- Diamètre de particule adapté aux applications biomédicales ne dépassant pas 150 nm ;
- Surface spécifique élevées et taille de pores adaptée ;
- Charge de surface positive ;
- Teneur suffisante en porphyrine pour la réalisation de l'imagerie et de la PDT.

Nous nous sommes retrouvés d'emblée face à un paramètre critique représenté par la quantité de porphyrine qui sera incorporée au sein du réseau ionosilicique, sans entraîner une désorganisation du réseau et restant dans un intervalle de granulométrie acceptable pour l'application biomédicale.



**Figure 14.** Précurseurs utilisés pour la synthèse des PMINPs :  
(1) *MeTrisN* et (2) *porphyrine tétrasilylée*.

Au cours de la partie bibliographique, il a été cité que la fraction molaire des entités organiques (porphyrine) doit être comprise entre 5-15 mol%.<sup>16</sup> Ainsi, nous avons réalisé des essais de synthèse en utilisant différentes fractions molaires de porphyrine (5, 10 et 15 mol%), comme mentionné dans le tableau 9.

Pour la synthèse des nanoparticules, nous avons eu recours à l'utilisation du n-hexadécylsulfate de sodium (SHS) en tant qu'agent tensioactif anionique, responsable de l'architecture des réseaux ionosiliciques ainsi que de la porogénèse. Une quantité de SHS est dissoute dans de l'eau déionisée. Puis, le mélange est maintenu sous agitation pendant une heure à 70 °C.

Une fois que le mélange devienne clair, il sera possible d'enclencher les réactions sol-gel par ajout des deux précurseurs MeTrisN et porphyrine utilisés à différents ratios molaires, dissous dans du 1-propanol anhydre, selon les données montrées dans le tableau 9.

La synthèse des nanoparticules est basée sur de fortes interactions électrostatiques entre les groupements ammonium du précurseur ionosilicique cationique et le surfactant anionique, résultant en un effet *template* (moulage). Les précurseurs sont délicatement incorporés au milieu réactionnel sous agitation vigoureuse. La formation du réseau ionosilicique est la conséquence de la formation de liaisons covalentes de type siloxane (Si-O-Si) entre les groupements alcoxysilyles de différentes molécules de MeTrisN. Les porphyrines sont incluses aussi de manière covalente dans les murs des nanoparticules lors du procédé sol-gel.

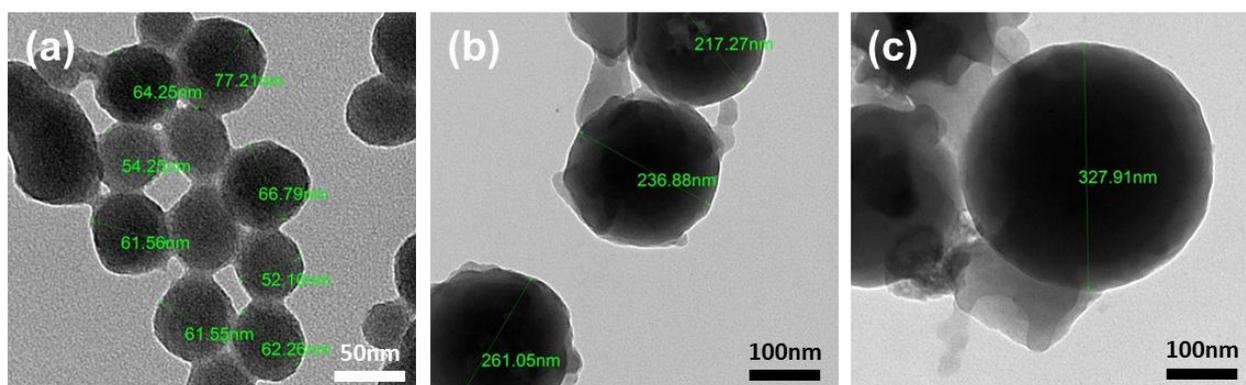
Ensuite, une solution aqueuse de surfactant non-ionique triblock copolymère F127 est ajoutée, qui va assurer le rôle d'inhibiteur de coalescence et d'agrégation particulaire. Ceci sera suivi après, par l'ajout d'ammoniaque afin d'opérer dans des conditions alcalines.

Etant donné que les nano-objets synthétisés sont destinés à des applications biomédicales, il est primordial d'assurer leur biocompatibilité en utilisant un agent furtif qui permet d'éviter la reconnaissance des nanoparticules par les cellules du système immunitaire. Ceci a été concrétisé par la fonctionnalisation en surface des nanoparticules par des motifs de polyéthylène glycol silylé (Si-PEG 5000) par ajout au milieu réactionnel d'une solution aqueuse de PEG.<sup>200</sup>

**Tableau 9.** Résumé des différentes quantités de précurseurs (1) et (2) utilisés pour les différents ratios molaires pour la synthèse des nanoparticules.

Ratio	Précurseur (1) : MeTrisN			Précurseur (2) : Porphyrine		
	(%)	Quantité (mg)	N <sup>bre</sup> moles (mmol)	(%)	Quantité (mg)	N <sup>bre</sup> moles (mmol)
95/5	95	187.3	0.361	5	31.6	0.019
90/10	90	177.4	0.342	10	63.2	0.038
85/15	85	167.6	0.323	15	94.8	0.057

Afin de contrôler les propriétés morphologiques et texturales des nanoparticules obtenues, il est nécessaire de les caractériser par TEM, DLS et par sorption d'azote. Les images de TEM sont montrées dans la figure 15 et l'ensemble des résultats obtenus sont résumés dans le tableau 10.



**Figure 15.** Imagerie des nanoparticules par microscopie électronique à transmission. Ces nanoparticules ont été synthétisées aux différents ratios sus-cités : 95/5, 90/10 et 85/15, qui sont montrées respectivement aux images (a), (b) et (c).

**Tableau 10.** Résumé des résultats obtenus lors de la caractérisation des nanoparticules synthétisées par TEM, DLS et par sorption d'azote ( $S_{BET}$  : surface spécifique calculée par la méthode BET,  $V_P$  : volume poreux,  $D_P$  : diamètre de pores).

Ratio	Diamètre (nm) par TEM	Diamètre (nm) par DLS	$S_{BET}$ ( $m^2/g$ )	$V_P$ ( $cm^3/g$ )	$D_P$ ( $\text{Å}$ )
95/5	$69 \pm 8$	$431 \pm 32$	1287	1.02	34
90/10	$241 \pm 26$	$495 \pm 15$	737	0.78	42
85/15	$319 \pm 35$	$593 \pm 18$	409	0.61	59

Un certain nombre de renseignements peuvent être tirés de ces résultats préliminaires. Nous avons pu remarquer à partir des images de TEM que le diamètre des nanoparticules est proportionnel à la quantité de porphyrine incorporée. Plus la quantité de porphyrine augmente, plus le diamètre des particules augmente. La même tendance a été observée avec le diamètre des pores calculé par méthode BJH. Cependant, la surface spécifique et le volume poreux sont quant à eux inversement proportionnels aux quantités de porphyrine utilisées. Ces observations seraient dues au poids moléculaire élevé des résidus de porphyrine (1664.28 g/mol) comparé au poids moléculaire du MeTrisN (518.85 g/mol). Il serait donc intéressant d'optimiser les caractéristiques des nanoparticules obtenues au ratio 95/5, notamment, d'œuvrer pour avoir un diamètre de pores plus grand.

De plus, nous pouvons observer aussi de grands écarts entre le diamètre réel des nanoparticules obtenu par les images TEM et le diamètre hydrodynamique obtenu par DLS. Cette divergence serait due à l'agrégation de deux ou de plusieurs nanoparticules formant ainsi des amas de grandes tailles. Le PEG-5000 greffé en surface des nanoparticules pourrait être responsable de ce phénomène de pontage interparticulaire, par enchevêtrement des longues chaînes polyéthers linéaires des résidus PEG de différentes nanoparticules. Il serait donc préférable de recourir à un PEG de plus faible poids moléculaire avec des chaînes plus courtes, tel que le PEG-2000.

Le dernier point critique et pas des moindres, est le taux résiduel de surfactant dans les porosités des nanoparticules après lavage et extraction du SHS par une solution éthanolique de chlorure d'ammonium. En effet, la présence de surfactant à l'intérieur des nanoparticules entrainera l'apparition d'une cytotoxicité indésirable. Il est donc primordial de réaliser une extraction efficace du SHS afin de garantir la bonne tolérance des nano-objets par les systèmes biologiques. Etant donné que l'unique source d'atomes de soufre dans nos matériaux est les groupements sulfates du SHS, il est alors possible de quantifier le taux de SHS résiduel par analyse élémentaire. Nous avons effectué des essais de cytotoxicité du SHS sur des cultures cellulaires type MDA-MB-231, et il s'est avéré que le taux résiduel de SHS tolérable par les cellules ne devra pas excéder 10% (m/v), afin de garantir un taux de viabilité cellulaire supérieur à 80%. Nous nous fixerons donc l'objectif d'atteindre le taux le plus bas possible, tout en étant à moins de 10% (m/v).

Afin d'observer l'impact ainsi que l'importance des lavages, un premier lot de nanoparticules a été lavé uniquement avec de l'éthanol. L'analyse élémentaire a révélé la présence d'un taux résiduel de SHS à  $35.05 \pm 0.21$  %. Ce taux a été vu à la baisse suite à une extraction de SHS en utilisant la solution de chlorure d'ammonium (6 g/L), pour atteindre  $7.95 \pm 0.11$  %. La répétition de l'extraction une seconde fois nous a permis d'atteindre un taux résiduel de  $3.14 \pm 0.01$  %, que nous considérons suffisant pour nos futures applications biomédicales *in vitro* et *in vivo*.

## 2. Protocole final de synthèse des PMINPs

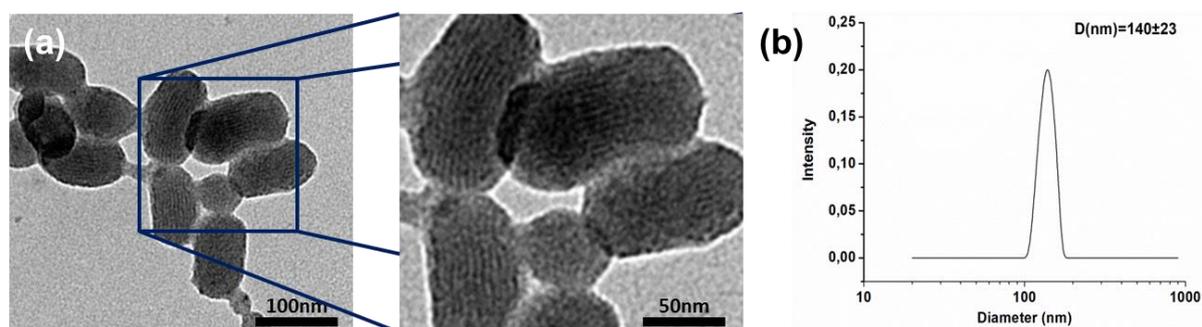
Dans un ballon, sont mélangés les composés suivants : le surfactant SHS et 1,3,5-triéthylbenzène dans un volume d'eau déionisée, et maintenus sous agitation. Le 1,3,5-triéthylbenzène (TEB) a été ajouté dans le but de tirer profit de sa fonctionnalité d'agent gonflant. En effet, le TEB, hautement hydrophobe, va se nicher au cœur des micelles de SHS, entraînant ainsi l'élargissement de leur diamètre et aboutissant *in fine* à un plus grand diamètre de pores dans les nanoparticules, après extraction du surfactant. Ensuite, un mélange de précurseurs est préparé dans du 1-propanol anhydre : MeTrisN et porphyrine tétrasilylée. Le mélange est ensuite incorporé délicatement au milieu réactionnel et sous agitation vigoureuse. Juste après, une solution aqueuse de F127 est ajoutée et suivie après par de l'ammoniaque, afin que la réaction sol-gel puisse se dérouler dans des conditions alcalines. Une solution aqueuse de silane-PEG-2000 est ajoutée. La réaction sol-gel est maintenue sous agitation vigoureuse pendant une nuit entière, à 70°C. Une fois que la réaction est achevée, le milieu réactionnel est amené à température ambiante, puis les nanoparticules obtenues sont récupérées par centrifugation. L'excès de surfactant est éliminé par des lavages successifs à l'éthanol, puis l'extraction du surfactant des porosités intervient en utilisant une solution éthanolique saturée de chlorure d'ammonium. Les nanoparticules obtenues sont conservées dans de l'eau à une température de -20°C, dans des solutions stock à 10 mg/mL, en vue des caractérisations ultérieures.

## 3. Caractérisation des PMINPs

Les nouvelles nanoparticules ainsi synthétisées en utilisant le protocole optimisé, à la différence des nanoparticules antérieures (figure 15), seront caractérisées par différentes méthodes analytiques, afin de s'assurer de la conformité de leurs propriétés au cahier des charges prédéfini.

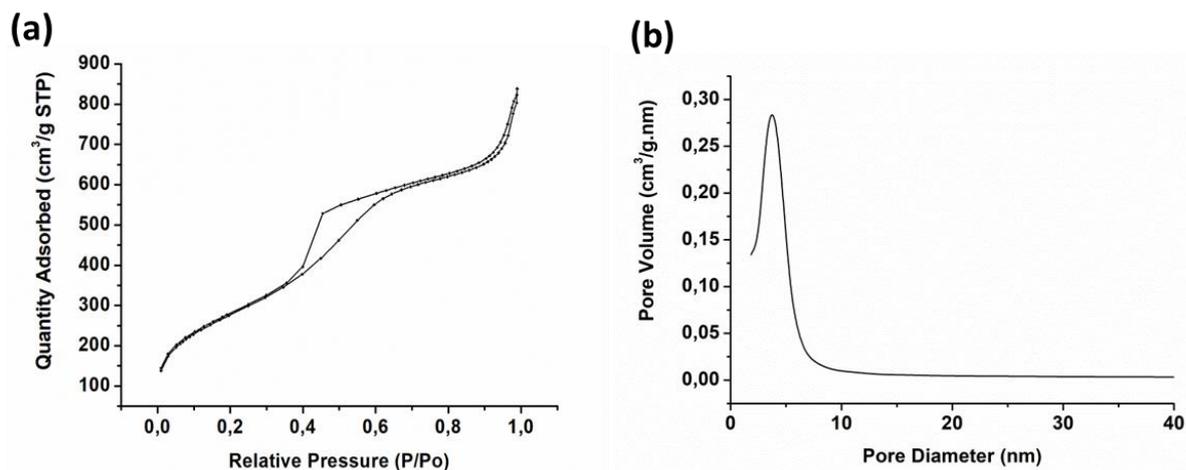
Les images obtenues par microscopie électronique à transmission (figure 16a) ont révélé la présence de nanorods ayant pour dimensions  $108 \pm 9$  nm de longueur et  $54 \pm 4$  nm de largeur. Les images nous montrent également la présence de canaux poreux hautement organisés parcourant les nanoparticules. Les mesures de DLS (figure 16b) réalisées dans de l'eau ont quant à elles indiqué la formation de nanoparticules monodisperses d'un diamètre hydrodynamique de  $140 \pm 23$  nm (PDI =  $0.18 \pm 0.012$ ).

Ces résultats vont à l'encontre d'une hypothétique agrégation observée sur les images TEM, qui serait uniquement due à l'étape de séchage des grilles de TEM après dépôt de l'échantillon. Afin d'étudier la stabilité colloïdale des PMINPs dans un milieu biologique, nous avons effectué des mesures de DLS après dispersion des PMINPs dans le milieu de culture cellulaire DMEM supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (FBS), avec suivi de l'évolution du diamètre pendant 24 heures. Les résultats ont montré un diamètre hydrodynamique moyen de  $201 \pm 7$  nm et qui reste stable jusqu'à au moins 24 h. Cette augmentation du diamètre des PMINPs dans le DMEM + 10% FBS comparée au diamètre obtenu dans l'eau serait due à la formation d'une couronne de protéines en surface des PMINPs, suite à l'adsorption des protéines contenues dans le sérum (FBS).<sup>201-202</sup>



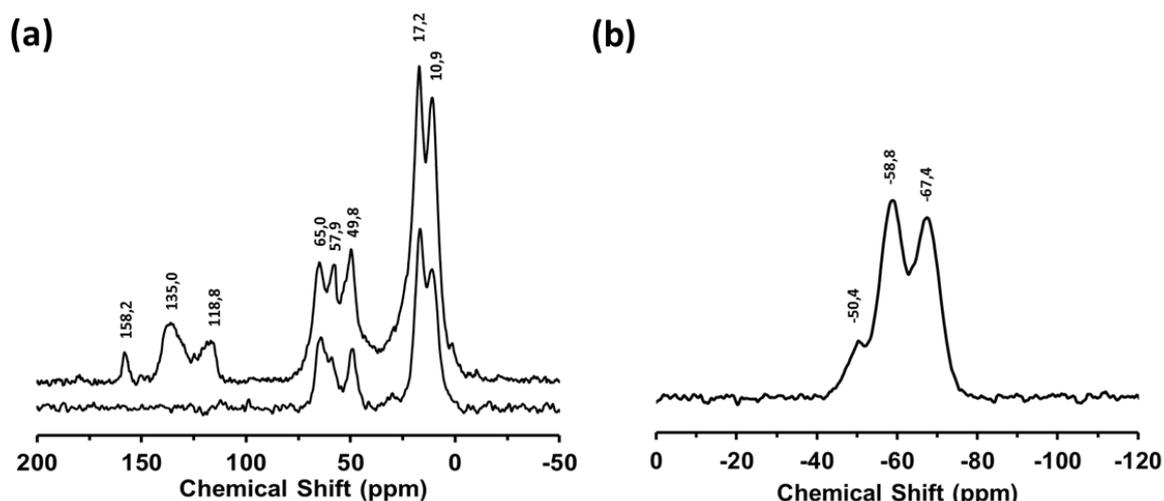
**Figure 16.** Caractérisation des PMINPs par TEM et DLS. (a) Les images TEM obtenues montrent la présence de nanorods, avec une porosité hautement organisée. (b) Les mesures de DLS sur les PMINPs à partir d'une suspension aqueuse de PMINPs à une concentration de  $200 \mu\text{g/mL}$ , à  $25^\circ\text{C}$  et à  $\text{pH } 7$  ( $n = 9$ ).

Nous nous sommes intéressés ensuite à l'étude des propriétés texturales des PMINPs par la technique de sorption d'azote. L'isotherme obtenu est de type IV et présente une boucle d'hystérèse comprise entre 0.4 et 0.6  $P/P_0$ , caractéristique des matériaux mésoporeux (figure 17a).<sup>203-204</sup> Les nanoparticules présentent une surface spécifique de  $1015 \text{ m}^2/\text{g}$  et un volume poreux de  $1.29 \text{ cm}^3/\text{g}$ . La distribution de la taille des pores calculée par la méthode BJH a été obtenue à partir de la branche de sorption de l'isotherme et donne un diamètre moyen des pores de 5,1 nm (figure 17b). Cette valeur est considérablement plus élevée par rapport aux nanoparticules d'ionosilice précédemment rapportées dans la littérature en raison de l'utilisation de triéthylbenzène comme agent gonflant au cours de la réaction d'hydrolyse-polycondensation.<sup>26, 41, 205</sup> Ces valeurs obtenues représentent également un excellent compromis entre la surface spécifique et le diamètre des pores, en comparaison avec les nanoparticules synthétisées aux différents ratios 95/5, 90/10 et 85/15 dont les chiffres sont résumés dans le tableau 10, grâce à l'utilisation de l'agent gonflant 1,3,5-triéthylbenzène. La forte augmentation de l'isotherme à haute pression partielle est due à la porosité inter-grain, indicatrice de la formation de nanoparticules.



**Figure 17.** Etude des propriétés texturales des PMINPs. (a) Détermination de la surface spécifique des PMINPs par la technique de sorption d'azote et calculée par la méthode BET. (b) Distribution de la taille des pores des PMINPs par la méthode BJH.

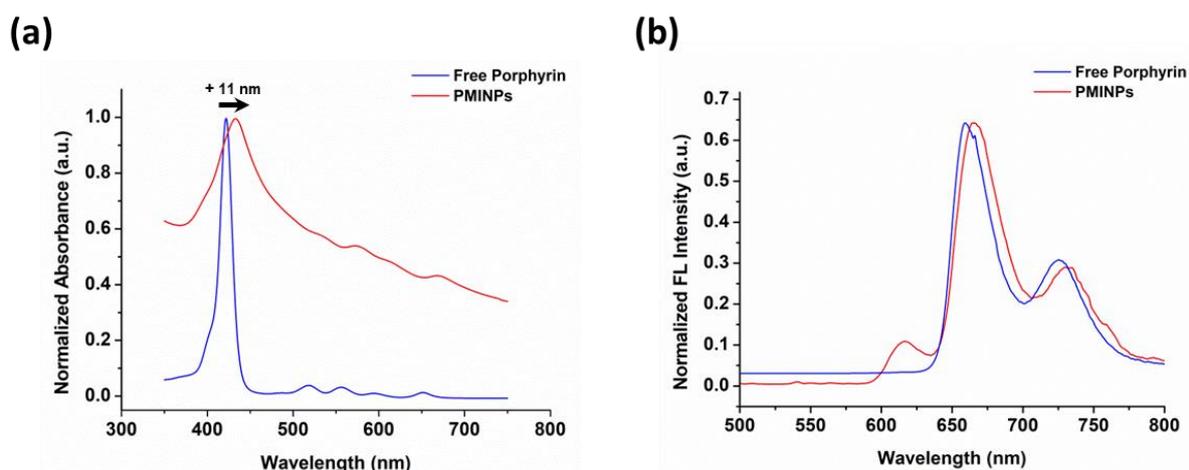
Afin de s'assurer de l'intégrité chimique des éléments constitutifs de PMINPs, nous avons effectué des spectroscopies RMN à l'état solide  $^{13}\text{C}$  CP-MAS et  $^{29}\text{Si}$  CP-MAS du matériau, et les deux spectres sont indiqués sur les figures 18a et 18b, respectivement. Le spectre  $^{13}\text{C}$  CP-MAS des PMINPs affiche des pics larges et intenses à 10.9, 17.2, 49.3 et 65.0 ppm qui peuvent être attribués aux chaînes alkyles du précurseur ionosilicique, comme le montre le spectre d'un matériau obtenu à partir du précurseur ionosilicique pur (figure 18a, en bas).<sup>28</sup> Il montre également des signaux supplémentaires à 57.9 ppm ainsi que les larges pics à 118.8 et 135 ppm.



**Figure 18.** Caractérisation chimique des PMINPs. (a) Spectroscopie RMN à l'état solide  $^{13}\text{C}$  CP-MAS des PMINPs (en haut), et d'un matériau obtenu à partir de MeTrisN pur (en bas). (b) Spectroscopie RMN à l'état solide  $^{29}\text{Si}$  CP-MAS des PMINPs.

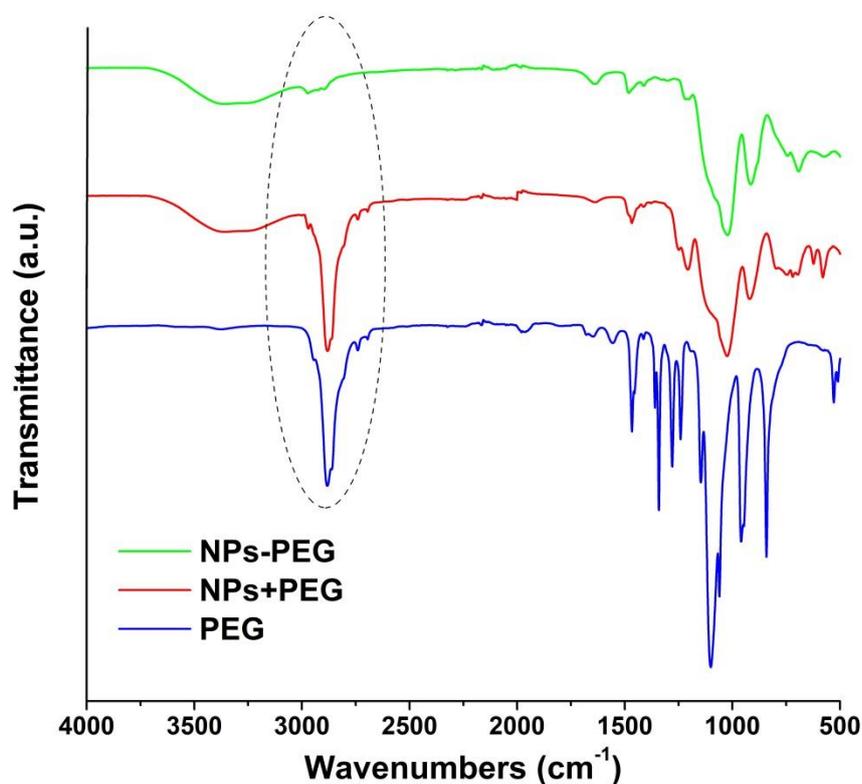
Ces pics sont indicateurs de la présence des sous-structures de porphyrine dans le matériau. Enfin, la résonance à 158.2 ppm est caractéristique des centres carbonés C=O des groupements urée. Les résultats ont été confirmés par spectroscopie RMN liquide du composé de porphyrine silylée. Le spectre  $^{13}\text{C}$  CP-MAS du matériau indique donc la présence à la fois de fragments d'ammonium issus du précurseur ionosilicique et de porphyrine au sein des nanoparticules. Le spectre  $^{29}\text{Si}$  CP-MAS des PMINPs montre les signaux  $T^1$ ,  $T^2$  et  $T^3$  à -50.4, -58.8 et -67.4 ppm, respectivement. Ces signaux peuvent être attribués aux centres de silicium dans différents environnements chimiques :  $T^1$  et  $T^2$  représentent le silicium dans les environnements  $\text{RSi}(\text{OSi})_1(\text{OR})_2$  et  $\text{RSi}(\text{OSi})_2(\text{OR})_1$ , tandis que  $T^3$  représente le silicium dans un environnement  $\text{RSi}(\text{OSi})_3$  entièrement condensé.

Les spectres UV-visible de la porphyrine libre et des nanoparticules sont représentés sur la figure 19a. Un pic fin et intense est observé à 422 nm, caractéristique de la bande d'absorption de Soret de la porphyrine base libre, suivi par quatre bandes Q à 518, 556, 594 et 652 nm. Les porphyrines incorporées au sein des nanoparticules présentent une large bande d'absorption de Soret à 433 nm et des bandes Q à 533, 573, 614 et 669 nm. À partir de ces résultats, nous pouvons déduire la présence d'un déplacement bathochrome (redshift), par comparaison des longueurs d'onde d'absorption de la porphyrine libre et la porphyrine présente dans les PMINPs. À titre d'exemple, la bande de Soret de la porphyrine libre a été décalée vers le rouge de 11 nm suite à son insertion au sein du réseau ionosilicique. L'origine de ce déplacement spectral peut être attribuée soit à la formation d'agrégats J de porphyrine dans les nanostructures, soit à l'aplanissement de la porphyrine au sein des nanostructures induisant une plus grande conjugaison  $\pi$  entre le macrocycle et les groupements *meso*-aryle.<sup>206</sup> Cette propriété spectrale intéressante nous donnera la possibilité de profiter des avantages de l'absorption biphotonique pour réaliser de la PDT à deux photons.



**Figure 19.** Caractérisation physico-chimique des PMINPs. Comparaison entre les spectres (a) UV-visible et (b) de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 430$  nm) de la porphyrine libre (100 g/mL) et des nanoparticules (200  $\mu\text{g/mL}$ ) dans l'eau, à 25°C.

Ensuite, les spectres d'émission de fluorescence de la porphyrine libre et des nanoparticules ont été réalisés ( $\lambda_{exc} = 430 \text{ nm}$ ) et les résultats obtenus sont montrés à la figure 19b. Les deux bandes d'émission de porphyrine au sein des nanoparticules à 664 et 732 nm sont légèrement décalées vers le rouge par rapport à celles du précurseur de porphyrine silylée correspondant (659 et 725 nm). Une faible bande d'émission supplémentaire est également observée à 611 nm lorsque des porphyrines sont incorporées dans les nanoparticules, probablement en raison de la formation d'agrégats.<sup>207</sup> Ici, nous avons tiré profit des propriétés d'émission des porphyrines pour contrôler l'internalisation des PMINPs par endocytose dans les cellules vivantes en utilisant la microscopie à fluorescence et la microscopie confocale.



**Figure 20.** Spectroscopie FT-IR. Comparaison entre les spectres infrarouges obtenus dans les différentes conditions : nanoparticules en présence de PEG-2000 (PMINPs) représentées par la courbe rouge, les nanoparticules en l'absence de PEG-2000 représentées par la courbe verte, et comparées à la courbe bleue qui représente le PEG-2000 libre. Il est facile de reconnaître l'empreinte caractéristique liée à la présence du PEG-2000 à la surface des PMINPs.

En dernier lieu, une analyse par spectroscopie infrarouge (FT-IR) est réalisée et a permis de démontrer la fonctionnalisation de surface des PMINPs par le silane-PEG 2000 à l'aide de nanoparticules avec et sans revêtement PEG, et comparées au silane-PEG 2000 seul (figure 20). Les signaux caractéristiques dus à la présence de motifs silane-PEG 2000 dans les nanoparticules sont clairement visibles dans la région  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$  des spectres, ce qui peut être attribué aux vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique des groupements  $-\text{CH}_2-$  des chaînes aliphatiques du PEG. Une bande intense est également observée dans la région  $1130-1000\text{ cm}^{-1}$  qui témoigne de la formation des liaisons siloxanes (Si-O-Si) résultats des réactions d'hydrolyse-polycondensation. Quant à la large bande observée entre  $3400$  et  $3200\text{ cm}^{-1}$ , elle est due à la présence de groupements  $-\text{OH}$  libres, et plus précisément, des groupements silanols libres (Si-OH) non engagés dans les liaisons siloxanes.

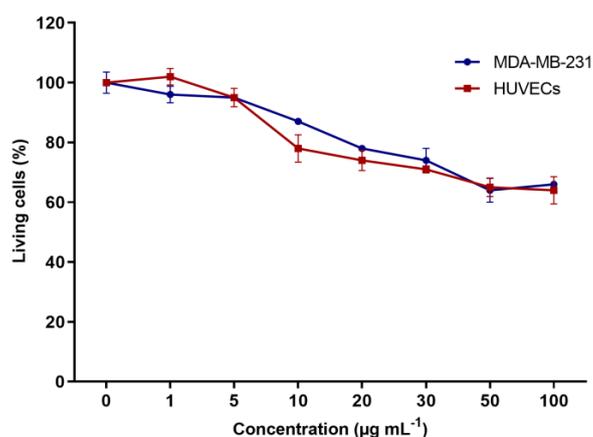
Ainsi, nous sommes parvenus à synthétiser des nanoparticules hybrides, à base d'ionosilice et de porphyrine. L'ensemble des caractérisations effectuées nous ont permis de confirmer la bonne conformité des différentes propriétés des PMINPs à la totalité des exigences chimiques et physico-chimiques qui figurent dans le cahier des charges préétabli. Il est maintenant possible de procéder aux caractérisations d'ordre biologique ainsi que l'étude des applications biomédicales des PMINPs.

## CHAPITRE II : UTILISATION DES PMINPs COMME SUPPORT EFFICACE POUR LA RÉALISATION DE LA THÉRAPIE PHOTODYNAMIQUE ANTICANCÉREUSE

Après avoir réussi à synthétiser et à caractériser les PMINPs, nous nous intéresserons dans ce chapitre à l'étude de la cytotoxicité en l'absence de lumière et à la phototoxicité des PMINPs induite par un rayonnement lumineux à des longueurs d'onde bien précises. Ceci nous permettra de statuer sur le potentiel de ces nano-objets à induire un effet PDT dans des cellules cancéreuses traitées.

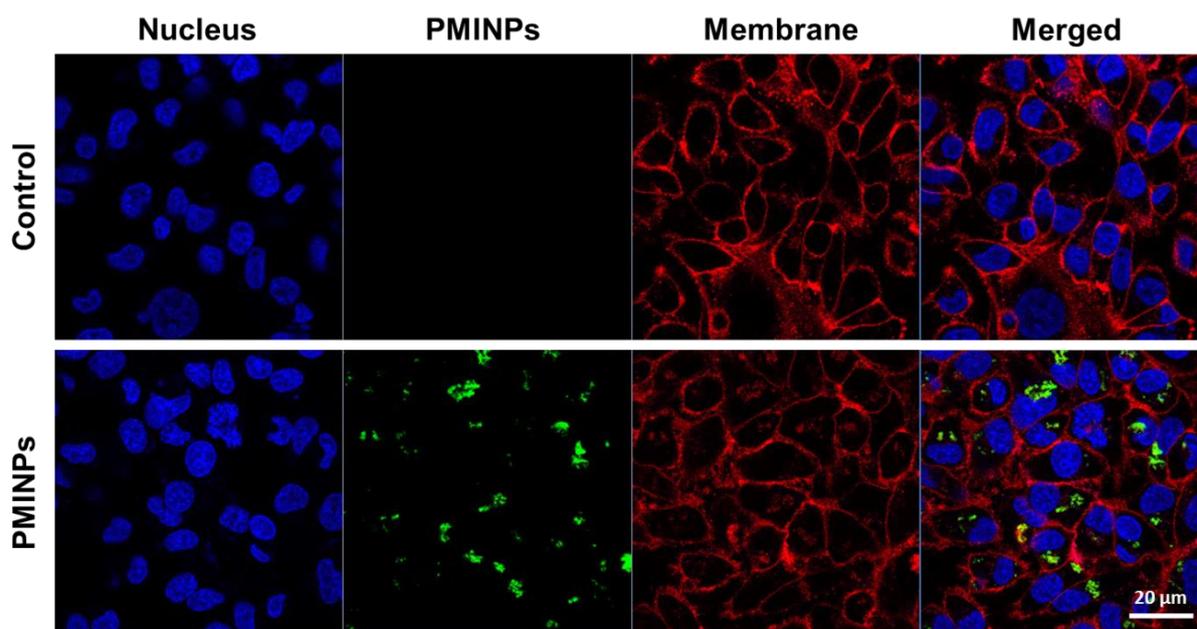
### 1. Etude de la cytotoxicité et de l'internalisation cellulaire des PMINPs

L'effet cytotoxique des PMINPs en l'absence d'irradiation lumineuse a été évalué en utilisant deux lignées cellulaires : une lignée de cellules de cancer du sein humain (MDA-MB-231) et une lignée saine de cellules endothéliales humaines issues de la veine ombilicale (HUVECs). Ces cellules ont été traitées de la même façon, avec des concentrations croissantes de PMINPs, de 1 à 100  $\mu\text{g/mL}$ , comme illustré dans la figure 21. La viabilité cellulaire après 72 heures a été évaluée par la méthode du MTT, basée sur la capacité des cellules vivantes à réduire le réactif MTT de couleur jaune, en cristaux violets de formazan. Le taux de survie cellulaire a été déterminé par lecture de la densité optique à 540 nm. Les résultats obtenus montrent une tendance quasi similaire entre les deux lignées cellulaires. Le taux de viabilité cellulaire est resté au-dessus de 70% jusqu'à la concentration de 30  $\mu\text{g/mL}$ , puis baisse légèrement pour atteindre les taux de  $66 \pm 0.7\%$  et  $64 \pm 4.6\%$  à la concentration de 100  $\mu\text{g/mL}$ , pour les MDA-MB-231 et les HUVECs respectivement. Ces résultats témoignent d'une bonne biocompatibilité des PMINPs et nous donnent la possibilité de sélectionner l'intervalle de concentrations à utiliser lors des prochaines investigations.



**Figure 21.** Etude de la cytotoxicité des PMINPs réalisée sur deux lignées cellulaires : MDA-MB-231 et HUVECs. Ces cellules ont été traitées à différentes concentrations de PMINPs pendant 72 heures. Les résultats sont présentés en tant que Moyenne  $\pm$  ET ( $n = 9$ ).

Une étude qualitative de l'internalisation cellulaire des PMINPs a été réalisée par la suite, utilisant la microscopie confocale. Pour cette expérience, des cellules de type MDA-MB-231 ont été utilisées et ont été traitées par 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PMINPs pendant 24 heures. Le marquage des membranes cytoplasmiques et des noyaux cellulaires pour l'imagerie a été effectué en utilisant le CellMask orange et le Hoechst, respectivement. Les images obtenues par microscopie confocale présentées dans la figure 22 ont révélé une internalisation réussie des PMINPs à l'intérieur des cellules cancéreuses.



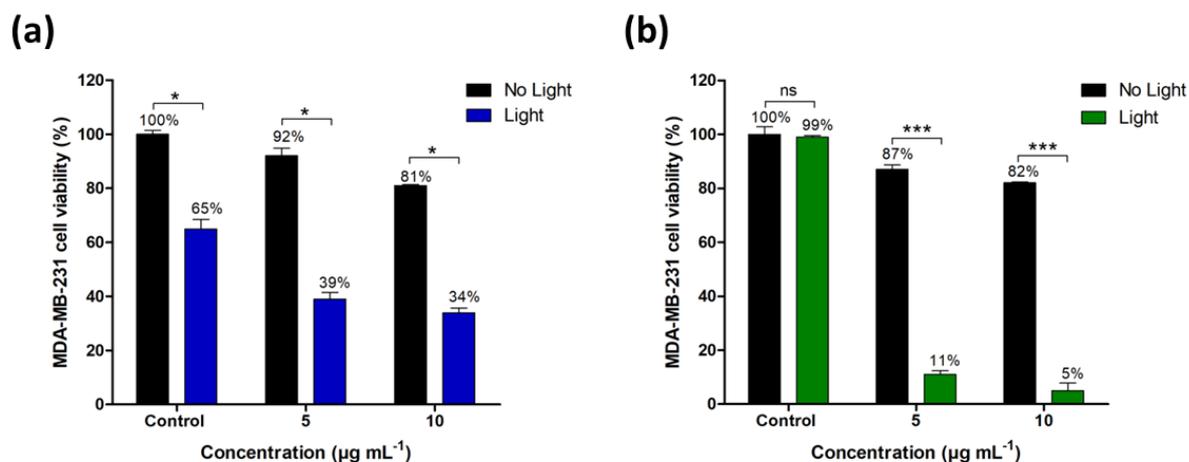
**Figure 22.** Etude de l'internalisation cellulaire des PMINPs (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) par microscopie confocale dans les cellules MDA-MB-231. Les noyaux, PMINPs et membranes cellulaires apparaissent respectivement en bleu, vert et rouge.

## 2. Etude de l'effet PDT monophotonique

### 2.1. PDT utilisant une lumière bleue vs lumière verte

L'efficacité photodynamique des PMINPs a été étudiée en utilisant la lignée cellulaire MDA-MB-231. Dans un premier temps, les cellules ont été traitées par les PMINPs aux concentrations de 5 et 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pendant 24 heures, puis ont été exposées à une irradiation de couleur bleue (450-490 nm) pendant 15 min (8  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Cette longueur d'onde a été sélectionnée car elle correspond à un segment de la bande d'absorption de Soret, qui représente le maximum d'absorption de la porphyrine incorporée dans les PMINPs, comme montré par le spectre UV-visible dans la figure 19a. De façon inattendue, un effet phototoxique important a été observé au niveau des cellules irradiées et en l'absence de PMINPs (cellules contrôles), ce qui est préjudiciable pour notre application, entraînant un taux de mortalité de  $35 \pm 3.5\%$ . En l'absence d'irradiation, les taux de mortalité chez les cellules traitées sont de  $8 \pm 2.9\%$  et de  $19 \pm 0.4\%$ , qui ont été vu à la hausse suite à l'application d'une

irradiation bleue pour atteindre des taux de  $61 \pm 2.4\%$  et  $66 \pm 1.7\%$ , respectivement aux concentrations de 5 et 10  $\mu\text{g/mL}$ . Ces résultats sont présentés dans la figure 23a.



**Figure 23.** Etude de l'effet PDT monophotonique des PMINPs sur des cellules MDA-MB-231 traitées (ou non) avec les nanoparticules, aux concentrations 5 et 10  $\mu\text{g/mL}$  pendant 24 heures, et exposées (ou non) à : (a) une lumière bleue (450-490 nm) pendant 15 min ( $8 \text{ J/cm}^2$ ), ou, (b) une lumière verte (545 nm) pendant 15 min ( $34 \text{ J/cm}^2$ ). Les résultats sont présentés en tant que moyenne  $\pm$  ET ( $n = 9$ ). \*Différence statistiquement significative à partir de la condition « no light » ( $p < 0.05$ ), \*\*\*Différence statistiquement significative ( $p < 0.0005$ ), ns pour différence statistiquement non-significative.

Dans un second temps, nous avons reproduit les mêmes conditions, sauf qu'au lieu d'utiliser une irradiation bleue, nous avons exposé les cellules traitées à des irradiations lumineuses de couleur verte à 545 nm pendant 15 min ( $34 \text{ J/cm}^2$ ).

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 23b. En comparant les résultats obtenus avec la lumière bleue à ceux obtenus avec la lumière verte, une absence totale de phototoxicité liée à la lumière verte (en l'absence de PMINPs) a pu être observée, avec un taux de mortalité ne dépassant pas  $1 \pm 0.6\%$ . En l'absence d'irradiations vertes, des taux de mortalité quasi-similaires ont été observés d'une valeur de  $13 \pm 1.6\%$  et de  $18 \pm 0.4\%$  chez les cellules traitées avec les PMINPs à la concentration de 5 et 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement, ce qui reste en concordance avec les valeurs obtenues lors de l'étude de cytotoxicité présentées dans la figure 21. Cependant, et lors de l'exposition des cellules traitées aux irradiations vertes pendant 15 min, un très important effet PDT est observé, entraînant une mort cellulaire quasi-totale. En effet, le pourcentage de mortalité cellulaire obtenu a été significativement élevé, pour atteindre des taux de  $89 \pm 1.3\%$  et  $95 \pm 2.8\%$  respectivement, pour les concentrations de PMINPs de 5 et 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Une étude bibliographique comparative de l'efficacité PDT des PMINPs avec d'autres systèmes nanoparticulaires utilisant divers photosensibilisateurs a été réalisée. Les données résumées dans le tableau 11 placent les PMINPs parmi les systèmes PDT les plus efficaces qui ont été étudiés.

**Tableau 11.** Comparaison entre divers systèmes PDT nanoparticulaires.

<b>Système nanoparticulaire</b>	<b>Photo-sensibilisateur</b>	<b>Lignée cellulaire</b>	<b>Longueur d'onde</b>	<b>Efficacité PDT</b>	<b>Réf</b>
Porphyrin-Ethylene-Based Periodic Mesoporous Organosilica Nanoparticles	Porphyrine	MCF-7 (cancer du sein)	405 nm	80% de mort cellulaire	208
			650 nm	26% de mort cellulaire	
Zr(IV)-based porphyrinic MOF Nanoparticles	Porphyrine	HeLa (cancer cervical)	420 nm 630 nm	80% de mort cellulaire pour les deux $\lambda$	209
Perfluorocarbon@Porphyrin Nanoparticles	Porphyrine	HT-29 (adénocarcinome colorectal)	650 nm	95% de mort cellulaire	210
Porphyrin-doped Magnetic Chitosan Nanoparticles	Porphyrine	SW480 (adénocarcinome du colon)	650 nm	90% de mort cellulaire	211
Porphyrin-based bridged Silsesquioxane Nanoparticles	Porphyrine	MDA-MB-231	420 - 440 nm	44% de mort cellulaire	212
Protoporphyrin IX modified Mesoporous Silica Nanoparticles	Protoporphyrine IX	HeLa	514 nm	95% de mort cellulaire	213
Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles with encapsulated Protoporphyrin IX	Protoporphyrine IX	HeLa	532 nm	Nécrose observée par microscopie confocale 8 min après irradiation	214
Titanium Dioxide Nanoparticles conjugated with Phtalocyanine and Folic Acid	Phthalocyanine	HeLa	Lampe Xénon	80% de mort cellulaire	215
			420 - 800 nm	60% de mort cellulaire	
Silica Nanoparticles conjugated with Silicon Phthalocyanine	Phthalocyanine	A375 (mélanome non pigmenté)	Lampe halogène 600-700nm	95% de mort cellulaire	216
Chlorin-conjugated Magnetic Nanoparticles	Chlorine e6	MGC-803 (cancer gastrique)	633 nm	80% de mort cellulaire	217
Folic Acid-conjugated Graphene Oxide loaded with Chlorin	Chlorine e6	MGC-803	633 nm	90% de mort cellulaire	218
Manganese Ferrite Nanoparticle-Anchored Mesoporous Silica Nanoparticles	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	U-87 MG (glioblastome)	670 nm	90% de mort cellulaire	219
	Chlorine e6				
ZnO Nanoparticles	ZnO	SMMC-7721 (hépatocarcinome)	254 nm	75% de mort cellulaire	220
Periodic Mesoporous Ionosilica Nanoparticles	Porphyrine	MDA-MB-231	545 nm	95% de mort cellulaire	42

## 2.2. Etude des propriétés photochimiques des PMINPs

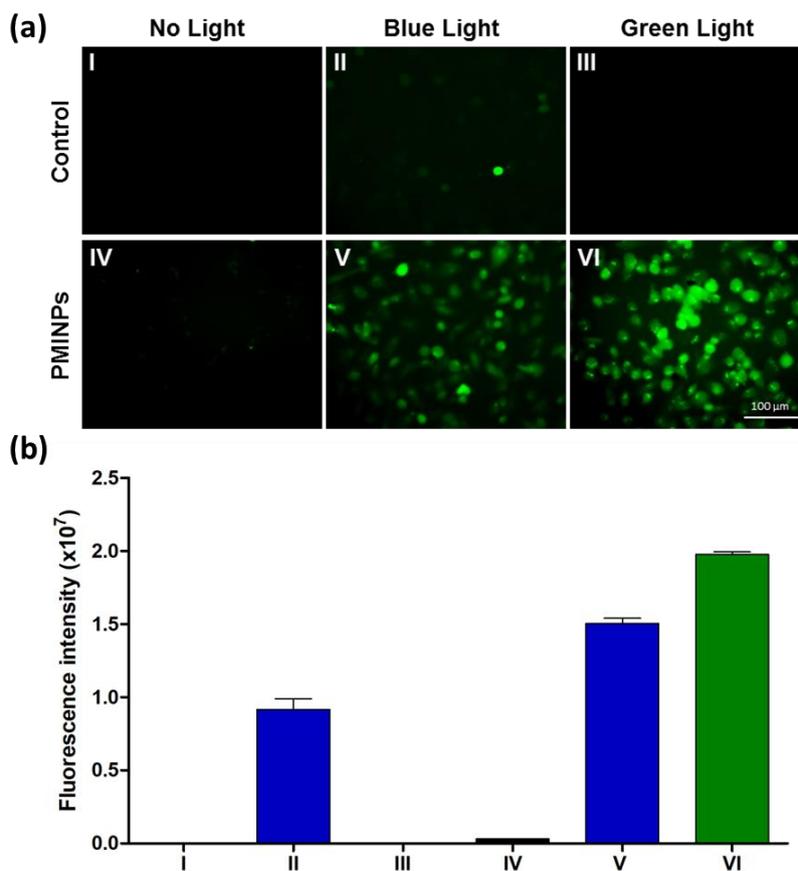
La mort cellulaire résultante de l'effet PDT est la conséquence d'une production intracellulaire importante d'espèces réactives oxygénées (ROS) et l'induction d'un stress oxydant. Afin de mettre en évidence la génération des ROS, des cellules MDA-MB-231 ont été traitées (ou non) avec les PMINPs, puis exposées (ou non) à une lumière bleue (450-490 nm) pendant 15 min ( $8 \text{ J/cm}^2$ ), ou, à une lumière verte 545 nm pendant 15 min ( $34 \text{ J/cm}^2$ ), conjointement à l'utilisation du réactif DCFDA. Après internalisation cellulaire, le DCFDA est transformé en présence de ROS en un composé émettant une intense fluorescence verte capable d'être observée par microscopie à épi-fluorescence. Le DCFDA permet de détecter divers types de ROS, tels que les radicaux hydroxyles, le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet.<sup>221</sup> Les images obtenues par microscopie à épi-fluorescence (figure 24a) ont été utilisées pour quantifier l'intensité de fluorescence intracellulaire en utilisant le logiciel ImageJ et les résultats obtenus sont exposés dans la figure 24b.

Les résultats de la quantification de l'intensité de fluorescence (figure 24b) montrent une absence de fluorescence verte au niveau des cellules contrôles non-irradiées et des cellules traitées par PMINPs et non-irradiées, comme présentés dans la figure 24, conditions (I) et (IV) respectivement. Le résultat obtenu avec la condition (IV) confirme la biocompatibilité des PMINPs avec l'absence de stress oxydatif intracellulaire, en l'absence d'irradiation. De plus, les résultats confirment aussi l'effet phototoxique de la lumière bleue, comme observé avec les cellules contrôle irradiées dans la figure 23a, et ceci par la visualisation de fluorescence verte dans le cytoplasme des cellules [figure 24, condition (II)], indiquant la production de ROS. Cependant, aucune fluorescence verte n'a pu être détectée au niveau du contrôle irradié avec la lumière verte [figure 24, condition (III)].

Lorsque les cellules traitées par les PMINPs ont été exposées aux irradiations lumineuses bleue ou verte, représentées respectivement par les conditions (V) et (VI) de la figure 24, une augmentation importante de l'intensité de fluorescence verte cytoplasmique est observée, indicatrice d'une forte production intracellulaire de ROS. Comparée à l'intensité de fluorescence obtenue suite à l'irradiation bleue, l'intensité de fluorescence obtenue après une irradiation lumineuse verte est 1.3 fois plus importante.

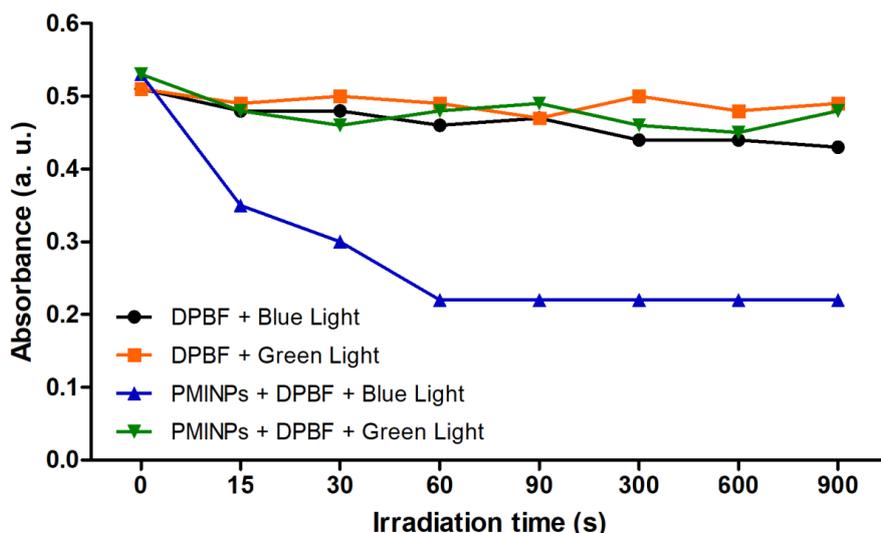
L'ensemble de ces résultats mettent en évidence la sécurité d'utilisation des irradiations lumineuses vertes pour les cellules non-traitées, ainsi que la grande capacité des PMINPs à induire la production intracellulaire des ROS, suite à leur excitation par une lumière verte à 545 nm.

La différence d'efficacité observée entre les irradiations bleue et verte utilisées pour l'activation des PMINPs nous a poussés à réaliser d'autres investigations.



**Figure 24.** Détection intracellulaire des ROS en utilisant le DCFDA. (a) Images de microscopie à épifluorescence obtenues sur des cellules MDA-MB-231 ( $n = 3$ ) traitées (ou non) avec les PMINPs (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pendant 24 heures, puis exposées (ou non) à une irradiation bleue (15 min, 8  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) ou à une irradiation verte (15 min, 34  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). (b) Quantification de l'intensité de fluorescence intracellulaire par le logiciel ImageJ ( $n = 6$ ). (I) Contrôle non-irradié, (II) contrôle irradié avec la lumière bleue, (III) contrôle irradié avec la lumière verte, (IV) cellules traitées et non-irradiées, (V) cellules traitées et irradiées avec la lumière bleue, (VI) cellules traitées et irradiées avec la lumière verte.

La production photo-induite d'oxygène singulet a été étudiée par la méthode d'extinction de fluorescence (quenching) utilisant le 1,3-diphénylisobenzofuran (DPBF). Le DPBF est une sonde fluorescente qui va interagir avec l'oxygène singulet formant un peroxyde instable qui se décompose en 1,2-dibenzoylbenzène non-fluorescent, entraînant une baisse de l'absorbance mesurée à 410 nm.<sup>222</sup> Plusieurs suspensions de PMINPs ont été préparées à la concentration de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , et mises en contact avec le DPBF. Ces mélanges ont été ensuite irradiés avec des faisceaux de lumière bleue (450-490 nm) ou verte (545 nm), pendant différents temps d'exposition, allant de 15 à 900 secondes. Afin de s'assurer de la fiabilité des mesures d'absorbance, le même protocole a été réalisé en utilisant uniquement des solutions de DPBF, en l'absence de PMINPs.



**Figure 25.** Détection spectrale de la production photo-induite d'oxygène singulet à 410 nm, en utilisant le DPBF seul ou mélangé aux PMINPs, puis exposés ou non aux irradiations bleue (450-490 nm) ou verte (545 nm), à différents temps d'exposition, de 15 à 900 s ( $n = 3$ ). Les courbes noire et orange représentent le DPBF seul exposé aux irradiations bleue et verte, respectivement. Les courbes bleue et verte représentent le mélange DPBF + PMINPs exposé aux irradiations bleue et verte, respectivement.

Les résultats exposés dans la figure 25 montrent l'absence de changements significatifs dans les valeurs d'absorbances liées aux PMINPs exposées à la lumière verte à aucun des différents temps d'irradiation, indiquant l'absence de production d'oxygène singulet. Le même comportement a été observé avec les solutions de DPBF seul exposées aux irradiations bleue ou verte. Étonnamment, l'exposition des PMINPs à la lumière bleue entraîne une baisse progressive des valeurs d'absorbance, jusqu'à atteindre un plateau qui est observé à partir d'une durée d'exposition de 60 s, correspondant à la décomposition du DPBF suite à la production d'oxygène singulet induite par la photo-activation des PMINPs à l'aide de la lumière bleue.

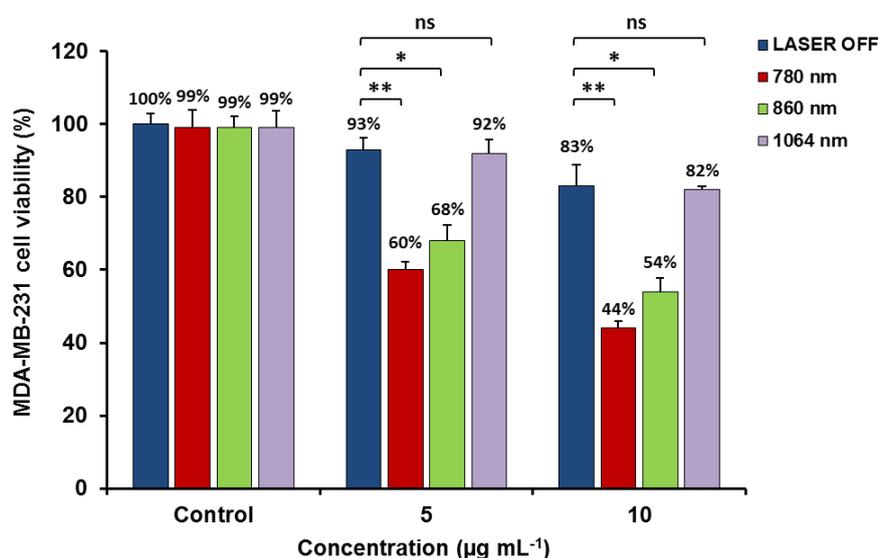
Selon la littérature, ces résultats suggèrent l'existence de deux mécanismes PDT qui sont observés en fonction de la longueur d'onde d'excitation utilisée<sup>45,50</sup> :

- L'utilisation de la lumière verte entraîne la production de ROS (figure 24), cependant le recours au DPBF a démontré l'absence de production d'oxygène singulet (figure 25). Ceci correspond à un mécanisme de PDT de type (I).
- L'utilisation de la lumière bleue a révélé la production de ROS (figure 24), et plus spécifiquement, la production d'oxygène singulet (figure 25), correspondant à un mécanisme de PDT de type (II).

### 3. Etude de l'effet PDT biphotonique *in vitro*

L'effet PDT biphotonique est tributaire de la capacité du photosensibilisateur à absorber deux photons simultanément, en ayant recours en général à des longueurs d'onde de faible énergie localisées dans le proche infrarouge (NIR), et en tenant compte des fenêtres de transparence des tissus biologiques situées entre 650-950 nm pour NIR I et 1000-1350 nm pour NIR II.<sup>85</sup> Pour réaliser la PDT biphotonique, il est indispensable de recourir à l'utilisation d'un LASER pulsé comme source de lumière, afin de permettre d'absorption de deux photons à la fois par le photosensibilisateur.

Dans cette partie de notre étude, trois longueurs d'onde différentes situées dans le NIR ont été testées sur des MDA-MB-231 traitées (ou non) avec les PMINPs aux concentrations de 5 et 10 µg/mL, et exposées (ou non) à un LASER pulsé (puissance à la source de 3 W) à une des longueurs d'onde suivantes : 780 nm, 860 nm et 1064 nm pendant une durée totale de 4.68 s (3x 1.56 s).

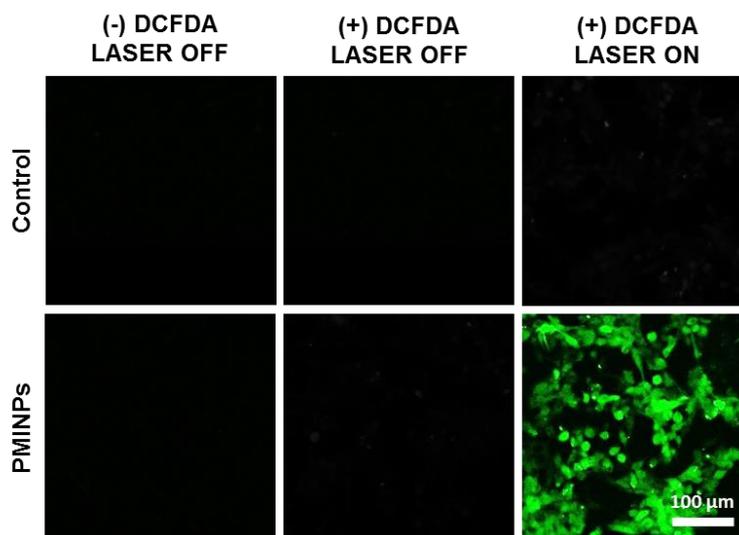


**Figure 26.** Etude de la PDT biphotonique à trois différentes longueurs d'onde d'excitation : 780 nm, 860 nm et 1064 nm, à l'aide d'un LASER pulsé (3x 1.56 s, 3 W) sur des cellules MDA-MB-231 traitées (ou non) avec les PMINPs aux concentrations 5 et 10 µg/mL pendant 24 heures. Les résultats sont présentés en tant que moyenne ± ET (n = 9). \*Différence statistiquement significative à partir de la condition « LASER OFF » (p < 0.05), \*\*Différence statistiquement significative (p < 0.005), ns pour différence statistiquement non-significative.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 26. Les taux de viabilité cellulaire restent inchangés pour les cellules non-traitées avoisinant les 100%, indépendamment de la présence ou de l'absence d'irradiations, toutes longueurs d'onde confondues. De la même façon, l'exposition des cellules traitées avec les PMINPs à des irradiations de longueur d'onde 1064 nm ne produit aucun

effet PDT significatif, tenant compte de la cytotoxicité inhérente des PMINPs. Cependant, un effet PDT est observé lors de l'utilisation d'irradiations à 860 nm, entraînant des taux de mortalité de  $32 \pm 4.4\%$  et de  $46 \pm 3.8\%$  aux concentrations de 5 et 10  $\mu\text{g/mL}$  respectivement. Ces taux de mortalité ont été augmentés lors de l'exposition des cellules traitées à des irradiations de longueur d'onde 780 nm, pour atteindre  $40 \pm 2.3\%$  et  $56 \pm 2.0\%$  respectivement pour des concentrations de 5 et 10  $\mu\text{g/mL}$ . L'irradiation avec la longueur d'onde 780 nm est retenue pour la suite de l'étude.

L'effet PDT par production de ROS est confirmé par la suite par microscopie à épifluorescence en utilisant le kit DCFDA. Des cellules MDA-MB-231 sont traitées (ou non) avec une suspension de 20  $\mu\text{g/mL}$  de PMINPs pendant 24 heures, puis exposées (ou non) à des irradiations à la longueur d'onde de 780 nm ( $3 \times 1.56$  s, 3 W) seulement. Comme évoqué précédemment, la détection des ROS se fait par la présence de fluorescence verte intra-cytoplasmique. Les images recueillies par microscopie sont montrées dans la figure 27. Aucune fluorescence n'a été détectée dans les contrôles irradié et non-irradié ainsi qu'au niveau des cellules traitées et non-irradiées. Cependant, l'exposition des cellules traitées avec les PMINPs a révélé une intense fluorescence verte intracellulaire, indicatrice d'une production photo-induite de ROS.



**Figure 27.** Détection intracellulaire des ROS en utilisant le DCFDA. Images de microscopie à épifluorescence obtenues sur des cellules MDA-MB-231 ( $n = 3$ ) traitées (ou non) avec les PMINPs (20  $\mu\text{g/mL}$ ) pendant 24 heures, puis exposées (ou non) à des irradiations à 780 nm ( $3 \times 1.56$  s, 3 W) en utilisant un LASER pulsé. Différentes conditions sont illustrées : (-) DCFDA / LASER OFF représente l'absence des deux paramètres, (+) DCFDA / LASER OFF présence de DCFDA seulement, contrairement à la condition (+) DCFDA / LASER ON où les deux paramètres sont présents.

#### 4. Etude de l'effet PDT biphotonique *in vivo*

Etant donné que la PDT qui repose sur le principe d'une excitation biphotonique permet d'avoir une plus grande profondeur de pénétration dans les tissus biologiques, nous avons opté d'étudier la PDT biphotonique à 780 nm sur un modèle *in vivo* qui a gagné en popularité ces 20 dernières années. Il s'agit du modèle zebrafish ou poisson-zèbre (ZF).

Le ZF a commencé depuis peu à être utilisé en tant que modèle pour les maladies humaines, notamment le cancer. Ce modèle présente le grand avantage de permettre la croissance de lignées cellulaires cancéreuses humaines de la même façon qu'avec des modèles mammifères tels que les souris.<sup>223-224</sup> Les embryons ZF sont de plus en plus utilisés pour la formation de xénogreffes de tumeurs humaines car lors des premiers stades de développement, le ZF ne possède pas encore de système immunitaire inné, ce qui évite les rejets des cellules humaines injectées. De plus, le ZF développe des tumeurs dans pratiquement tous les organes avec une histologie similaire à celle des tumeurs humaines.<sup>225</sup> Enfin, le séquençage du génome ZF a révélé l'existence de 70 % de similitude dans les séquences géniques avec le génome humain.

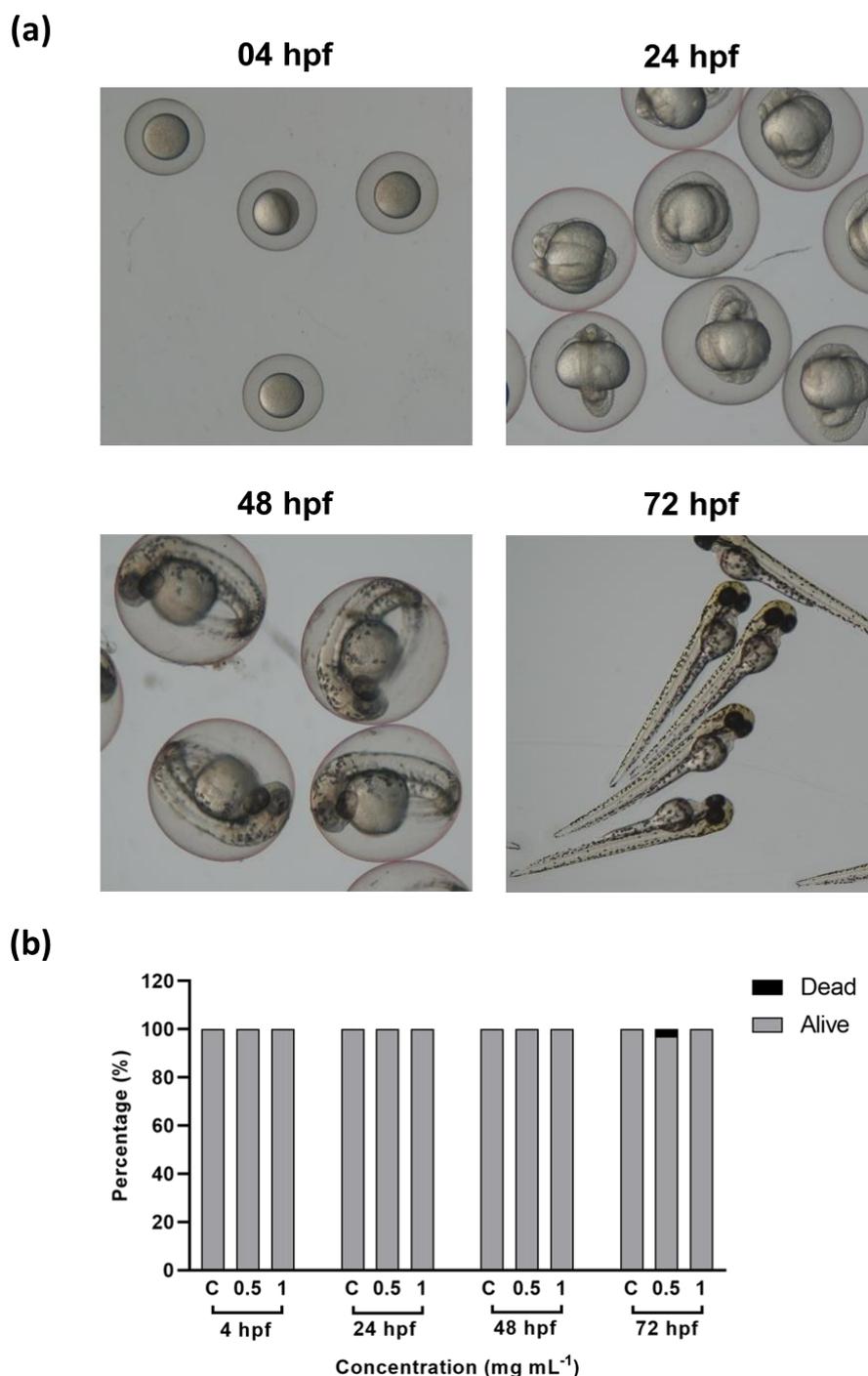
Un autre grand avantage du modèle ZF est la transparence des tissus de l'embryon permettant l'imagerie microscopique ainsi que la surveillance en temps réel des xénogreffes injectées. De plus, il est possible aussi de réaliser des études *in vivo* sur des objets fluorescents comme les nanoparticules.<sup>226</sup>

Le modèle ZF au stade zygote a largement été utilisé aussi pour l'évaluation de la toxicité de nano-objets de diverses natures chimiques sur le développement normal des embryons.

Ainsi, nous avons commencé d'abord par l'évaluation de la toxicité des PMINPs sur le modèle ZF au stade zygote (unicellulaire) par l'injection d'une suspension de nanoparticules à l'intérieur de l'œuf fécondé. Deux concentrations ont été sélectionnées : 0.5 et 1 mg/mL. 70 œufs fécondés ont été utilisés pour chaque condition.

Le développement embryonnaire des zygotes injectés (ou non) est surveillé quotidiennement, jusqu'à 72 heures post-fécondation (hpf), en notant l'ensemble des événements pouvant survenir : apparition de malformations au niveau du cœur ou de la queue, apparition d'œdèmes, voire mort.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 28 et témoignent de l'excellente biocompatibilité des PMINPs. En effet, à la plus grande concentration utilisée de 1 mg/mL, un taux de viabilité de 100% a pu être obtenu jusqu'à 3 jours post-fécondation, avec absence totale de malformations chez les embryons. Cependant, à 0.5 mg/mL nous avons noté la mort de deux embryons à 72 hpf, entraînant la baisse du taux de viabilité à cette concentration à 97%. Cette mortalité pourrait être imputée à l'étape de l'injection des PMINPs ou bien à la qualité intrinsèque de l'œuf.



**Figure 28.** Etude de la toxicité des PMINPs in vivo sur œufs fécondés de poisson-zèbre, injectés (ou non) avec des suspensions de PMINPs aux concentrations 0.5 et 1 mg/mL et surveiller par la suite quotidiennement pendant 3 jours. (a) Photographies des œufs puis des embryons de poisson-zèbre injectés, prises à l'aide d'une loupe binoculaire, à différents stades de développement : 4 hpf, 24 hpf, 48 hpf et 72 hpf. (b) Graphique résumant les résultats de l'étude de toxicité des PMINPs sur œufs de poisson-zèbre (n = 70).

Une fois que l'étude de toxicité était achevée et que la biocompatibilité des PMINPs confirmée chez les ZF, nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'effet de la PDT biphotonique à 780 nm chez des embryons de ZF âgés de 48 hpf, auxquels des xénogreffes de cellules cancéreuses humaines de type MDA-MB-231 exprimant la protéine RFP (Red Fluorescent Protein) et pré-incubées avec les PMINPs à la concentration de 10 µg/mL ont été injectées dans l'espace péri-cardiaque. L'évolution de la taille des xénogreffes dans le temps a été réalisée par des observations en microscopie confocale, grâce à la présence de la protéine RFP qui colore les xénogreffes en rouge.

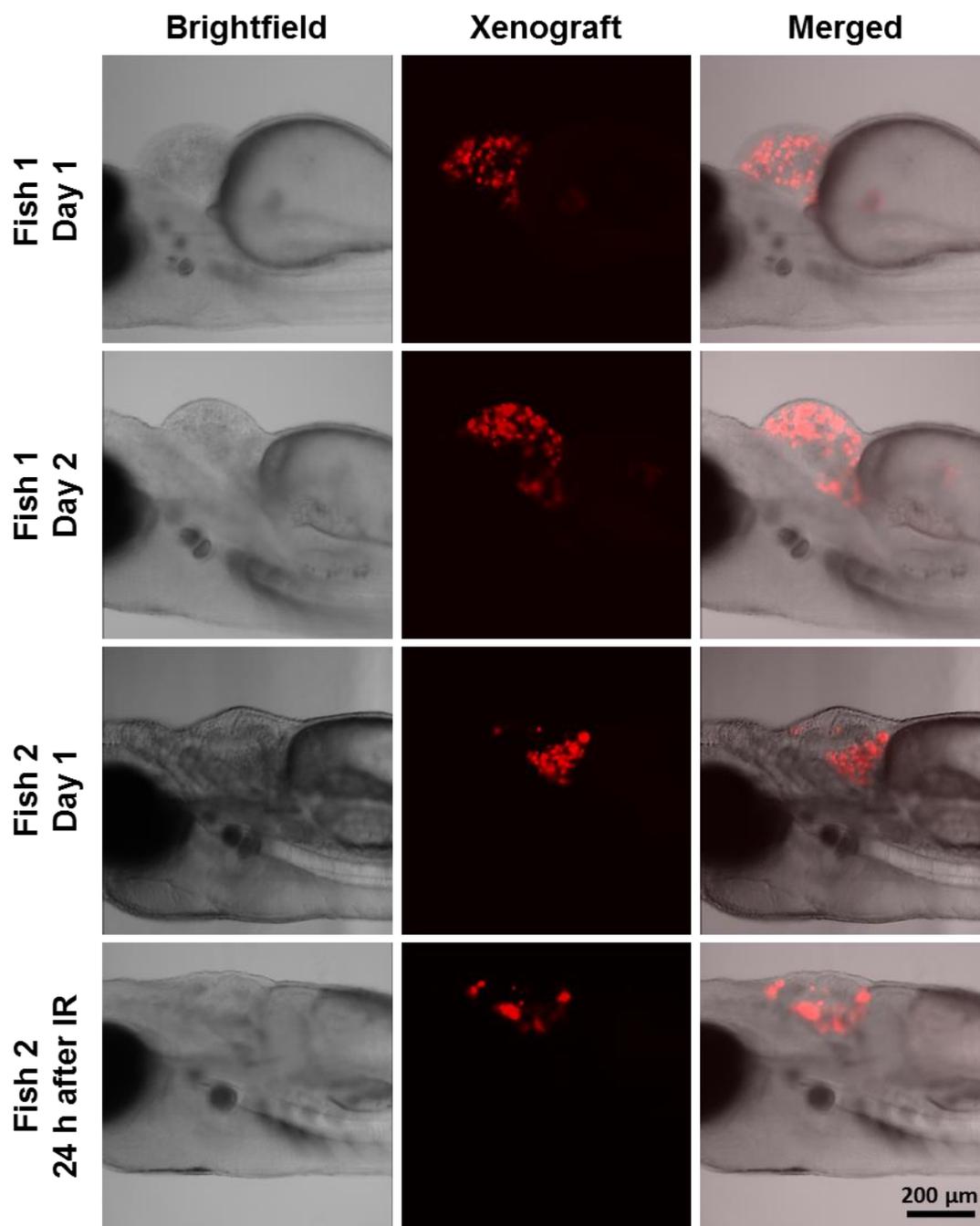
Deux lots d'embryons de ZF de 12 individus chacun ( $n = 12$ ) ont été composés, comportant chacun les xénogreffes de cellules cancéreuses humaines, traitées préalablement avec les PMINPs. Le premier lot n'a pas été exposé aux irradiations, contrairement au second, où les xénogreffes ont subi des irradiations à 780 nm à l'aide d'un LASER pulsé (3x 1.56 s, 3 W).

Les images obtenues par observation en microscopie confocale sont présentées dans la figure 29. D'une part, chez l'embryon 1, une augmentation dans l'intensité de la fluorescence rouge est remarquée au lendemain de l'injection des xénogreffes à l'embryon en l'absence d'irradiation, en comparaison avec l'image du même embryon obtenue la veille, à 4 heures après l'injection. Cette augmentation de l'intensité de fluorescence est indicatrice de la croissance de la xénogreffe de cellules cancéreuses humaine avec absence d'une réaction de rejet de greffe chez l'embryon. Ce résultat confirme aussi qu'en l'absence de source d'excitation lumineuse, les PMINPs n'exercent aucun effet PDT.

D'autre part, chez l'embryon 2, une baisse dans l'intensité de la fluorescence rouge est observée à 24 heures après irradiation des xénogreffes à 780 nm (3x 1.56 s, 3 W), en comparaison avec le même embryon imagé la veille de l'irradiation, mais aussi avec l'embryon 1 où une augmentation de l'intensité de fluorescence a été observée. Cette baisse de fluorescence est due à la photo-activation par LASER pulsé des PMINPs accumulées à l'intérieur des xénogreffes et à l'induction d'un effet PDT, conduisant à la production de ROS et l'enclenchement du mécanisme d'apoptose aboutissant à la mort des cellules tumorales et à la réduction de la taille des xénogreffes.

Les résultats encourageants obtenus lors de cette expérimentation *in vivo* constituent une preuve de concept du bon fonctionnement des PMINPs comme support nanoparticulaire pour la réalisation de la PDT biphotonique chez le modèle ZF. Toutefois, des arrangements et des optimisations doivent être apportés afin d'améliorer la sensibilité et la fiabilité des résultats.

Ainsi, au cours de ce chapitre, l'une des applications des PMINPs a été explorée et les résultats obtenus ont démontré l'efficacité des PMINPs à réaliser la PDT anticancéreuse à la fois mono et biphotonique, *in vitro* et *in vivo*. La suite des applications des PMINPs sera détaillée dans le chapitre suivant.



**Figure 29.** Etude de l'effet PDT biphotonique des PMINPs *in vivo* chez des embryons de ZF de 48 hpf ( $n = 12$ ) comportant des xénogreffes de cellules MDA-MB-231 pré-incubées avec les PMINPs ( $10 \mu\text{g/mL}$ ), irradiées (ou non) à  $780 \text{ nm}$  ( $3 \times 1.56 \text{ s}$ ,  $3 \text{ W}$ ). La surveillance de l'évolution de la taille des xénogreffes marquées en rouge par la protéine RFP est réalisée par microscopie confocale. Les images obtenues au premier jour ont été réalisées à 4 heures après injection, et celles du deuxième ont été réalisées 24 heures après (avant ou sans irradiation).



## **CHAPITRE III : UTILISATION DES PMINPs COMME VECTEUR EFFICACE POUR LA DÉLIVRANCE CONTRÔLÉE DES MÉDICAMENTS**

La délivrance contrôlée des médicaments peut être réalisée grâce à différents facteurs déclencheurs leur permettant ainsi d'atteindre leurs cibles et d'exercer leurs effets thérapeutiques. Ces facteurs endogènes ou exogènes, peuvent être de diverses natures : physique, chimique, mécanique, etc.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à deux exemples de molécules à vectoriser : une macromolécule qui est le siRNA et une molécule de faible poids moléculaire qui est le BODIPY. La délivrance du siRNA a été rendue possible grâce à des irradiations lumineuses, cependant, la délivrance du BODIPY s'est faite grâce au changement de pH.

### **1. Etude de la délivrance contrôlée du siRNA**

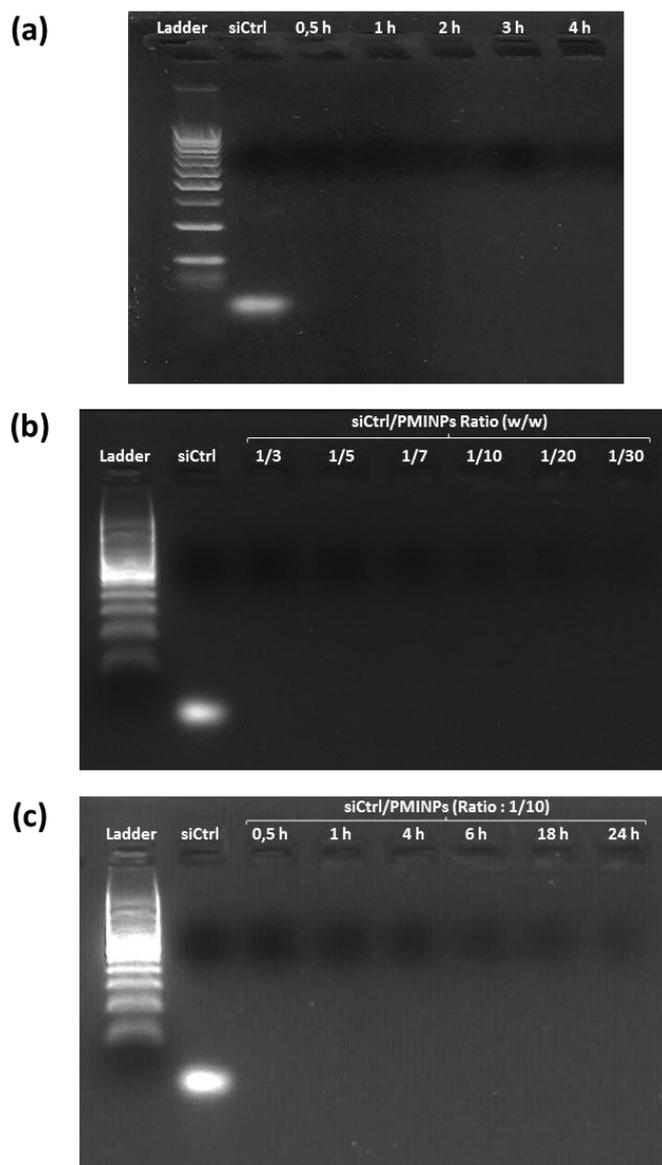
Comme décrit initialement au cours de la partie bibliographique, le siRNA est une macromolécule chargée négativement, appartenant à la classe des acides nucléiques.

Les mesures de potentiel zêta des PMINPs ont révélé la présence de charges de surface positives de +35.8 mV, liées à la présence des groupements ammoniums du précurseur ionosilicique. Nous avons donc émis l'hypothèse de la possibilité de complexation d'acides nucléiques, entre autre, le siRNA par les PMINPs. Ainsi, nous allons nous intéresser dans cette partie à l'étude de la complexation du siRNA par les PMINPs et aux applications biomédicales pouvant en découler.

#### **1.1. Etude de la complexation du siRNA**

Afin de vérifier l'aptitude des PMINPs à complexer le siRNA, nous avons eu recours à la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose ou le gel retard.

Tout d'abord, le premier objectif était de déterminer le temps nécessaire afin que les complexes siRNA/PMINPs puissent se former, en fixant le ratio pondéral siRNA/PMINPs à 1/20 (m/m). Le siRNA contrôle (siCtrl) et les PMINPs sont mis en contact pour former les complexes pendant des intervalles de temps croissants allant de 30 min jusqu'à 4 heures, à 37°C. Une fois que les temps de complexation sont écoulés, les mélanges sont déposés dans les puits du gel d'agarose à 2% (m/v), puis soumis à un champ électrique pour réaliser la migration. Le gel obtenu présenté à la figure 30a, montre une absence totale de bandes de siRNA libre sur l'ensemble des différents temps de complexation, indiquant ainsi que la durée de complexation de 30 min est largement suffisante pour permettre la prise en charge du siRNA libre par les PMINPs et la formation des complexes siCtrl/PMINPs.



**Figure 30.** Etude de la complexation du siRNA par les PMINPs par la méthode de gel retard. (a) Détermination du temps de complexation nécessaire pour la formation des complexes siRNA/PMINPs au ratio pondéral de 1/20, en essayant différents temps de complexation, allant de 30 min à 4 h, à 37°C. (b) Détermination des ratios pondéraux permettant une complexation totale du siRNA, avec différents ratios siRNA/PMINPs testés, allant de 1/3 à 1/30, pendant 30 min et à 37°C. (c) Etude de la stabilité des complexes siRNA/PMINPs, au ratio de 1/10, pendant une période allant de 30 min jusqu'à 24 heures à 37°C.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'étude du ratio siRNA/PMINPs efficace, avec la quantité de PMINPs la plus faible garantissant une complexation totale du siRNA. Ainsi, une quantité fixe de siCtrl a été ajoutée à des quantités croissantes de PMINPs, conduisant à différents ratios pondéraux de siRNA/PMINPs, variant de 1/3 à 1/30, avec un temps de complexation

fixé à 30 min et à une température de 37°C. Un gel retard a été ensuite réalisé et les résultats sont exposés à la figure 30b. L'analyse du gel a révélé une complexation totale du siCtrl, montrée par l'absence de bandes de siCtrl sur le gel, et cela pour l'ensemble des ratios pondéraux testés.

Le ratio pondéral 1/10 représente un bon compromis entre une complexation totale du siRNA, une bonne biocompatibilité ainsi qu'une quantité de PMINPs suffisante pour les applications biomédicales. Ainsi, nous avons sélectionné ce ratio pour la réalisation des investigations futures.

En dernier, l'étude de la stabilité du complexe siRNA/PMINPs a été effectuée, afin de vérifier l'absence d'un éventuel relargage du siRNA depuis les PMINPs. Une quantité fixe de siCtrl est ajoutée à une quantité suffisante de PMINPs, en respectant le ratio pondéral de 1/10. Les mélanges ont été laissés à 37°C pendant des durées croissantes, allant de 30 min à 24 heures. Ensuite, les complexes ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose et le gel obtenu est présenté à la figure 30c. L'analyse du gel a montré encore une fois, l'absence totale de siCtrl libre sur le gel, sur l'ensemble des temps testés, confirmant ainsi l'absence d'une libération de siRNA à partir des complexes, jusqu'à 24 heures.

L'ensemble de ces résultats obtenus dans la figure 30 témoignent de la grande affinité et de la grande capacité d'encapsulation des PMINPs vis-à-vis du siRNA, en plus de la grande stabilité des complexes siRNA/PMINPs formés.

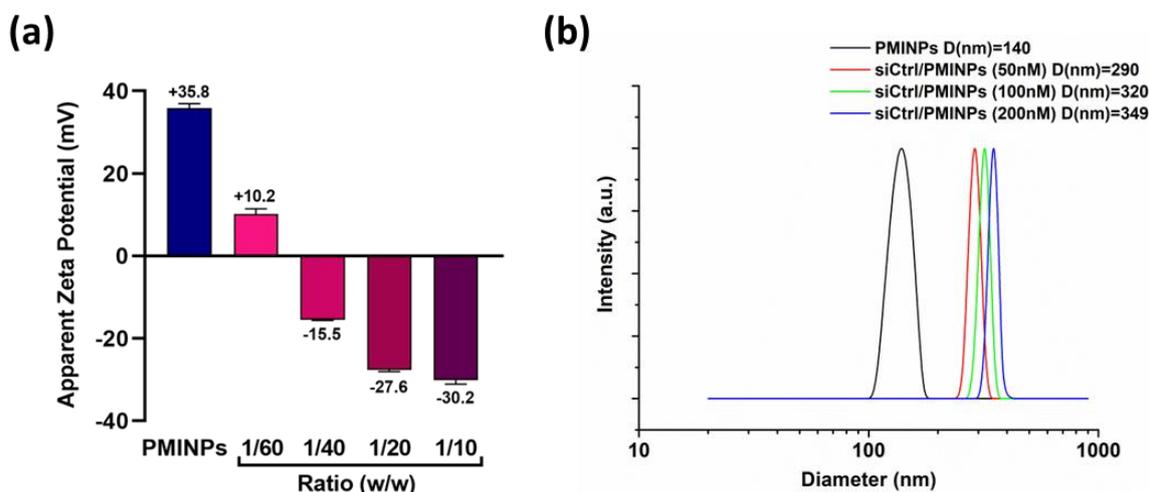
## **1.2. Caractérisation du complexe siRNA/PMINPs**

Après avoir confirmé la formation des complexes siRNA/PMINPs par gel retard, une étape de caractérisation de ces complexes sera effectuée.

Des mesures de potentiel zêta ont été réalisées afin de visualiser les variations de la charge de surface des PMINPs suite à l'adsorption/encapsulation du siRNA (figure 31a). Comme énoncé précédemment, les PMINPs libres sont dotées d'un grand nombre de charges positives de surface leur conférant ainsi un potentiel zêta positif de +35.8 mV. Après complexation du siRNA à différents ratios siRNA/PMINPs (m/m), les valeurs de potentiel zêta ont commencé à baisser progressivement avec la baisse des quantités de PMINPs vers +10.2, -15.5 et -27.6 mV, jusqu'à atteindre un plateau autour de -30 mV, respectivement pour des ratios pondéraux de 1/60, 1/40, 1/20 et 1/10. La baisse des valeurs de potentiel zêta est donc proportionnelle à l'augmentation du recouvrement de surface des PMINPs par le siRNA.

Les diamètres hydrodynamiques moyens des PMINPs libres et des complexes ont également été mesurés par DLS. Le ratio pondéral utilisé a été fixé à 1/10, pour différentes combinaisons de siCtrl/PMINPs : 50, 100 et 200 nM de siCtrl, respectivement avec 7, 14 et 28 µg/mL de PMINPs. Les résultats de DLS obtenus et présentés à la figure 31b indiquent une augmentation du diamètre des

nano-objets suite à la complexation du siRNA, passant de  $140 \pm 23$  nm pour les PMINPs libres, aux environs de 300 nm après adsorption/encapsulation de siRNA. Plus précisément, une augmentation des diamètres des complexes a été observée proportionnellement à l'augmentation des quantités de siRNA, avec un diamètre de particules de  $290 \pm 37$  nm pour 50 nM,  $320 \pm 41$  nm pour 100 nM et  $349 \pm 55$  nm pour 200 nM de siRNA.



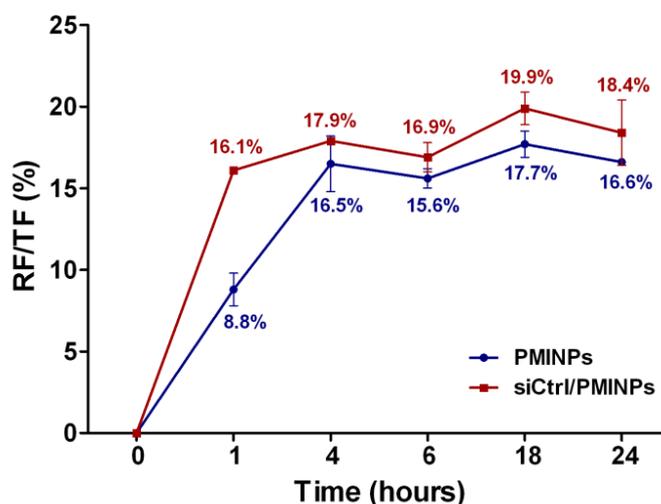
**Figure 31.** Caractérisation des complexes siCtrl/PMINPs. (a) Mesures de potentiel zêta des PMINPs libres (200  $\mu$ g/mL) et des complexes siCtrl/PMINPs en utilisant des ratios pondéraux croissants, de 1/10 à 1/60 ( $n = 3$ ). (b) Mesures de la taille des particules par DLS, en comparant le diamètre des PMINPs libres à celui des complexes siCtrl/PMINPs formés au ratio 1/10 en utilisant des quantités croissantes de siCtrl de 50 à 200 nM ( $n = 3$ ).

L'ensemble de ces résultats met clairement en évidence la complexation du siRNA par les PMINPs. L'adsorption/complexation du siRNA se produit donc essentiellement à la surface des nanoparticules, comme le montre explicitement la diminution du potentiel zêta et une augmentation de la taille des nanoparticules après complexation.

### 1.3. Etude de l'internalisation cellulaire des complexes siRNA/PMINPs

Etant donné que la complexation du siRNA par les PMINPs a pu être démontrée avec succès, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la cinétique d'internalisation des complexes formés siRNA/PMINPs à l'intérieur des cellules MDA-MB-231, en comparaison avec l'internalisation des PMINPs libres, à l'aide de mesures d'intensité de fluorescence. Les cellules ont été traitées par les PMINPs ou par les complexes siCtrl-ATTO-488/PMINPs au ratio 1/10, à différents intervalles de temps, et incubées à 37°C. Les résultats obtenus présentés dans la figure 32 montrent que les taux d'internalisation des PMINPs et des complexes augmentent au fur et à mesure du temps, pour atteindre des taux quasi-similaires de  $16.5 \pm 1.7\%$  et  $17.9 \pm 0.2\%$  respectivement, après 4 h de traitement.

Puis à 24 h, les taux d'internalisation se stabilisent à  $16.6 \pm 0.6\%$  pour les PMINPs et à  $18.4 \pm 1.3\%$  pour les complexes siCtrl/PMINPs. À partir de ces résultats, on peut conclure qu'un temps d'incubation de 4 h est suffisant pour atteindre la capacité maximale d'internalisation des cellules, à la fois pour les PMINPs libres et les complexes siRNA/PMINPs.



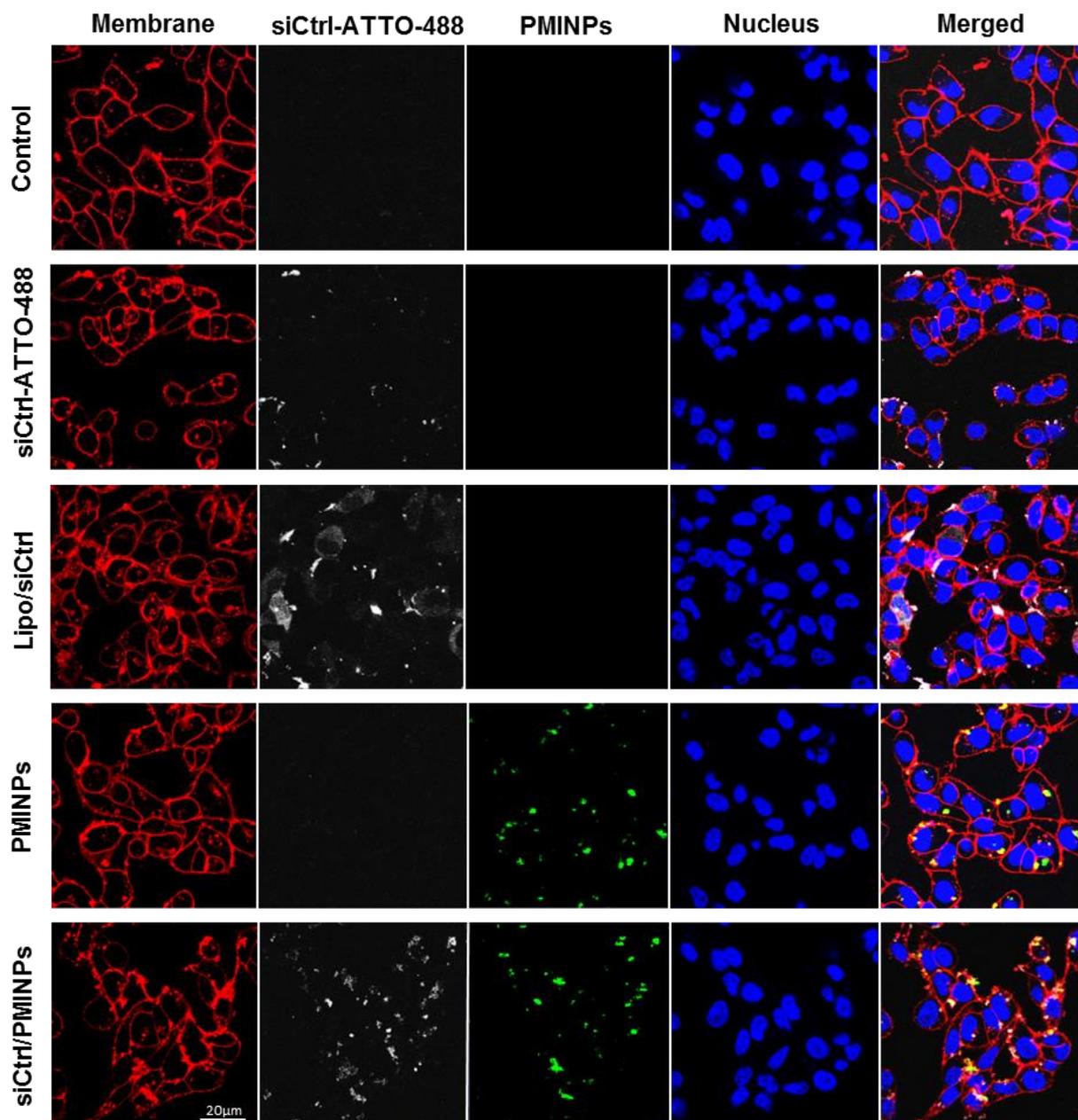
**Figure 32.** Etude de l'internalisation cellulaire par mesures des intensités de fluorescence dans des cellules MDA-MB-231 traitées avec les PMINPs et les complexes siCtrl/PMINPs à 37°C à différents intervalles de temps. Les résultats sont présentés en tant que moyenne  $\pm$  ET ( $n = 9$ ).

L'internalisation cellulaire des PMINPs et des complexes siRNA/PMINPs a également été évaluée qualitativement dans les cellules MDA-MB-231 après 4 h de traitement, en utilisant la microscopie confocale.

Les images de microscopie présentées à la figure 33 révèlent que les PMINPs libres sont internalisées dans les cellules (coloration verte) et de plus, en cas de complexation du siRNA, les PMINPs sont capables de délivrer le siCtrl-ATTO-488 dans le cytosol (coloration blanche), de la même façon qu'avec le contrôle positif utilisé (Lipofectamine).

En revanche, le siCtrl-ATTO-488 libre ne pénètre pas dans les cellules puisqu'uniquement une très faible fluorescence liée au siCtrl-ATTO-488 a pu être observée autour des membranes cellulaires dans seulement quelques cellules. Ceci serait principalement dû à l'adsorption du siRNA fluorescent sur les feuillettes externes des membranes plasmiques des cellules traitées par le siRNA libre.

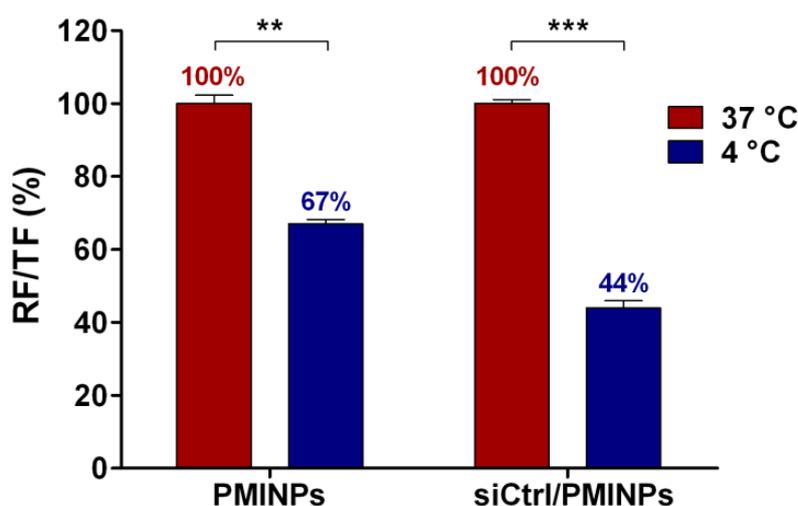
Ce résultat fournit une preuve de la transfection efficace du siRNA à l'intérieur des cellules MDA-MB-231 par les PMINPs.



**Figure 33.** Images de microscopie confocale des cellules MDA-MB-231 traitées (ou non) avec du siCtrl-ATTO-488 libre, lipofectamine/siCtrl-ATTO-488, PMINPs libres et les complexes siCtrl-ATTO-488/PMINPs au ratio 1/10 ( $n = 3$ ). Les membranes plasmiques, siCtrl-ATTO-488, PMINPs et les noyaux apparaissent respectivement colorés en rouge, blanc, vert et bleu.

Après avoir évalué l'internalisation cellulaire du complexe siRNA/PMINPs et des PMINPs libres, nous avons étudié leurs mécanismes d'internalisation cellulaire. Pour cette raison, les cellules MDA-MB-231 ont été traitées avec des PMINPs ou des complexes siCtrl-ATTO-488/PMINPs, puis ont été maintenues à basse température (4°C) pendant 4 h. La même procédure a été répétée, sauf que cette fois, les cellules ont pu se développer normalement à 37°C.

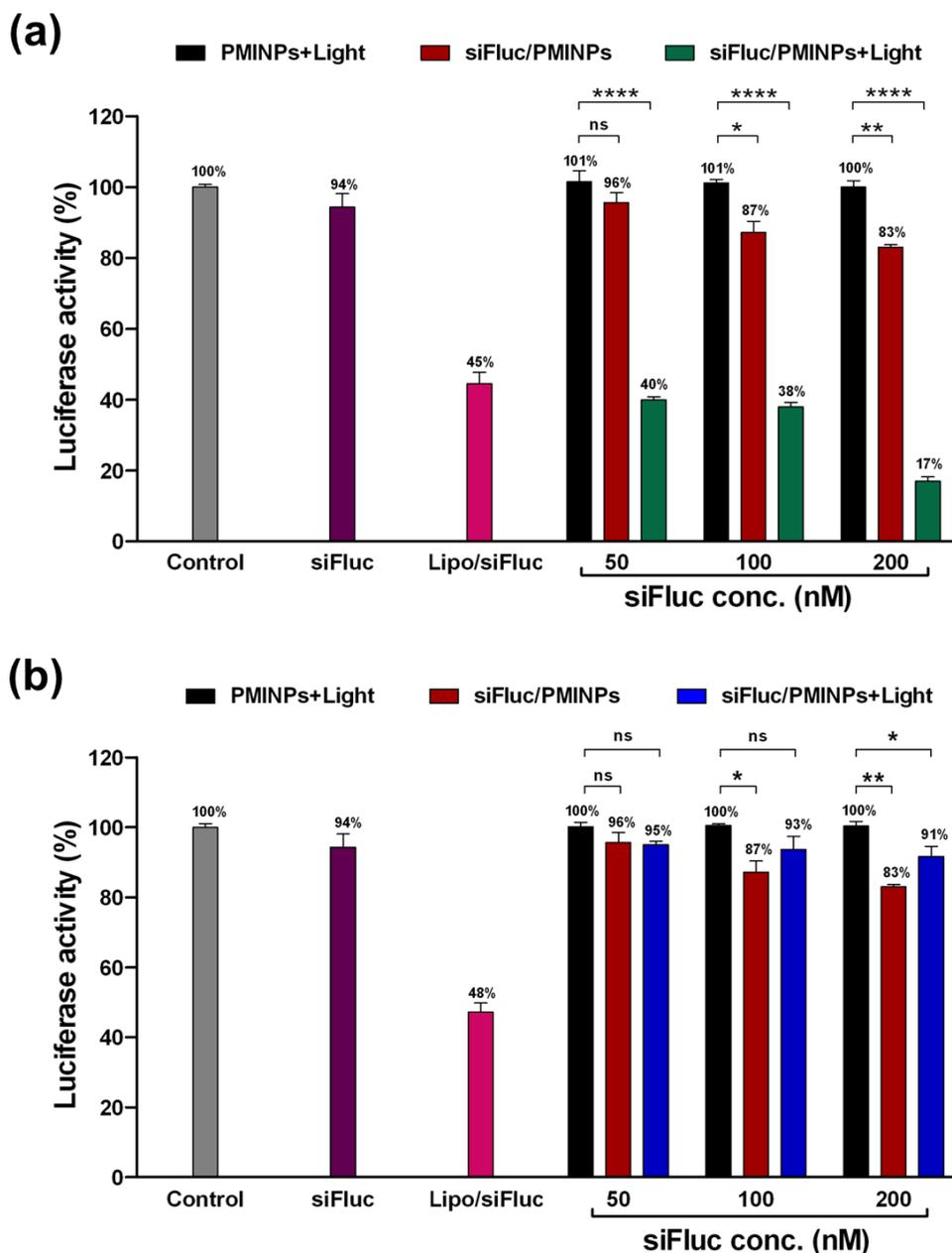
Ensuite, les taux d'internalisation des cellules ont été contrôlés par des mesures d'intensité de fluorescence pour les deux conditions précédentes (Figure 34). En effet, l'exposition des cellules à des températures basses (4°C) est une méthode couramment utilisée pour induire une inhibition non spécifique de l'endocytose.<sup>227-228</sup> La baisse de la température de 37°C à 4°C inhibe significativement l'internalisation des PMINPs et des complexes siCtrl-ATTO-488/PMINPs de 33 ± 1.1% et 56 ± 1.9% respectivement, ce qui indique que l'internalisation cellulaire de ces composés est dépendante de la température. Ce résultat suggère qu'un processus d'endocytose dépendant de l'énergie serait à l'origine de l'internalisation de 56% des complexes, tandis que les 44% restants peuvent être attribués à l'adhésion physique ou à la translocation directe.



**Figure 34.** Etude de l'effet de la température sur l'internalisation cellulaire en utilisant des cellules MDA-MB-231 incubées avec PMINPs libres ou avec les complexes siCtrl-ATTO-488/PMINPs pendant 4 heures, à 4°C et à 37°C. Les taux d'internalisation cellulaires ont été calculés à partir des mesures d'intensité de fluorescence. Les résultats sont présentés en tant que moyenne ± ET (n = 9). \*\*Différence statistiquement significative à partir du taux d'internalisation à 37°C (p < 0.005), \*\*\*Différence statistiquement significative (p < 0.0005).

#### 1.4. Etude de l'activité biologique des complexes siRNA/PMINPs internalisés

L'activité biologique des complexes siRNA/PMINPs internalisés a été étudiée en utilisant un siRNA ciblé contre le gène de la luciférase (siFluc), dans la lignée cellulaire MDA-MB-231-LUC-RFP exprimant de façon stable la protéine enzyme luciférase, et l'avons comparée avec la lipofectamine utilisée comme contrôle positif de transfection. En présence de luciférase, la luciférine est oxydée en oxyluciférine avec génération de luminescence. Dans le cas où siFluc est délivré efficacement, la biosynthèse de la luciférase est inhibée, entraînant ainsi une baisse dans les valeurs de luminescence.



**Figure 35.** Evaluation de l'activité biologique des complexes siFluc/PMINPs internalisés dans des cellules MDA-MB-231 qui expriment la luciférase, et qui sont exposées (ou non) à des irradiations de (a) lumière verte ou de (b) lumière bleue par mesure de la luminescence liée à l'activité luciférase. Les barres grises, violettes et roses représentent respectivement les cellules non-traitées (contrôle), les cellules traitées avec siFluc seul (100 nM) et les cellules traitées avec les complexes lipofectamine/siFluc. Les barres noires représentent les cellules traitées avec les PMINPs libres aux concentrations 7, 14 et 28  $\mu\text{g/mL}$  et irradiées avec (a) lumière verte (545 nm pendant 5 min, 11.3  $\text{J/cm}^2$ ) ou (b) lumière bleue (450-490 nm pendant 5 min, 2.6  $\text{J/cm}^2$ ), après 8 heures d'incubation. Les barres rouges représentent les cellules traitées avec les complexes siFluc/PMINPs (50, 100 et 200 nM de siFluc mélangés au ratio 1/10 avec 7, 14 et 28  $\mu\text{g/mL}$  de PMINPs respectivement) et non exposées aux irradiations. Les barres vertes et bleues représentent le traitement précédent

*accompagné d'irradiations par lumière verte ou bleue respectivement après 8 heures d'incubation. Pour l'ensemble des conditions, les mesures de l'activité luciférase ont été réalisées à 48 heures après traitement, et corrigées par la suite en fonction des valeurs de viabilité cellulaire obtenues par MTT, considérant ainsi l'expression luciférase par les cellules vivantes seulement. Ces résultats sont présentés en tant que moyenne  $\pm$  ET ( $n = 9$ ). ns est l'absence de différence statistiquement significative. \* et \*\*différence statistiquement significative ( $p < 0.05$  et  $p < 0.005$  respectivement) et \*\*\*\*différence statistiquement significative ( $p < 0.0001$ ).*

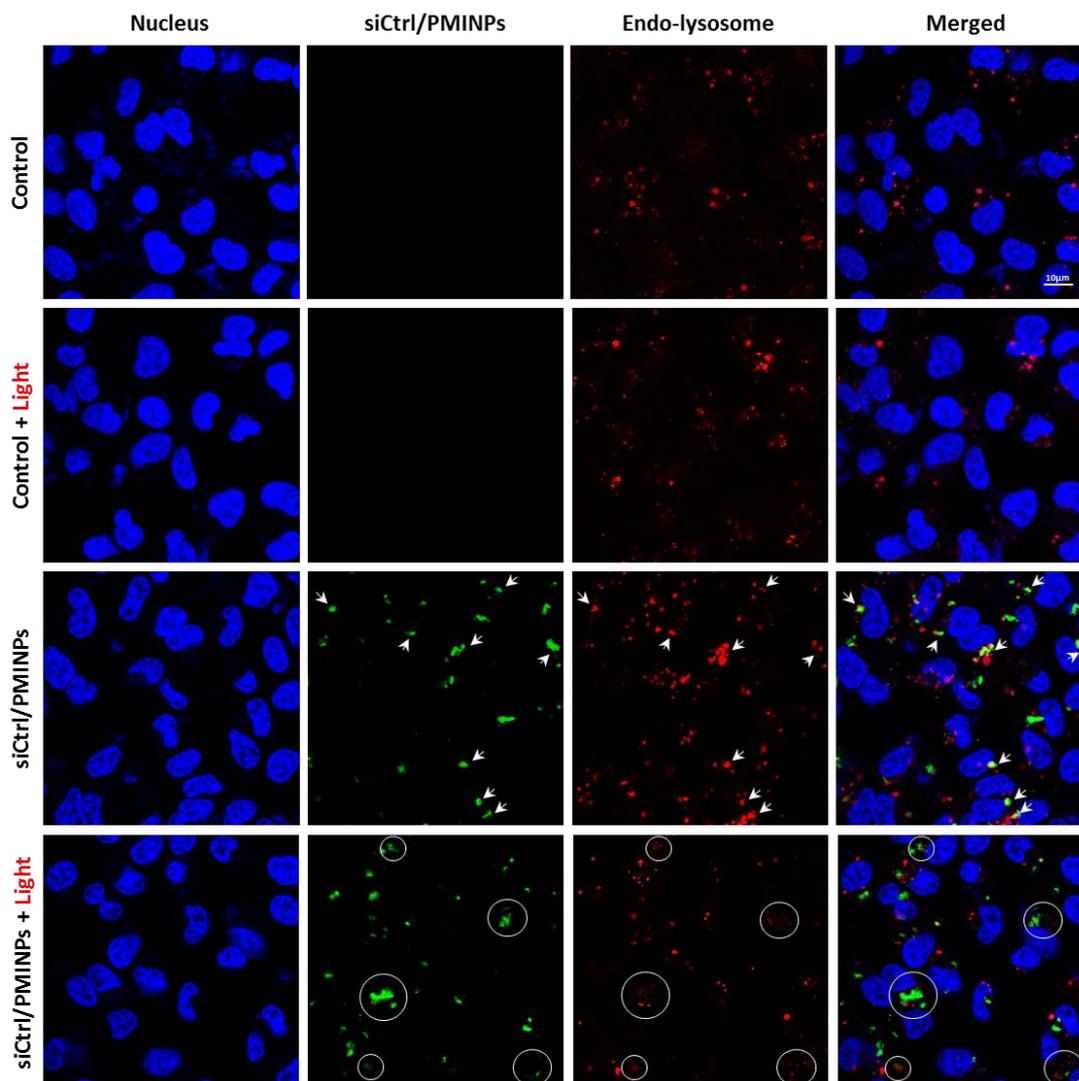
La figure 35a montre que siFluc libre n'entraîne pas une diminution significative de l'expression de la luciférase lorsqu'il est incubé avec les cellules (barres violettes) car seulement  $6 \pm 2.8\%$  de l'activité de la luciférase est inhibée. Ce résultat est en accord avec les résultats d'imagerie obtenus par microscopie confocale présentés à la figure 33, qui confirment l'incapacité du siRNA libre à franchir les membranes plasmiques et pénétrer dans les cellules.<sup>229</sup> Les PMINPs libres accompagnées d'une irradiation de lumière verte à 545 nm pendant 5 min n'induisent pas de diminution de la luminescence, prouvant qu'à 5 min d'irradiation, la phototoxicité des PMINPs n'a pas d'impact sur l'activité luciférase (Figure 35a, barres noires). De plus, lorsque le siFluc est complexé avec les PMINPs à un ratio pondéral de 1/10 en utilisant différentes concentrations et incubé avec des cellules MDA-MB-231-LUC-RFP sans irradiation lumineuse, les valeurs de luminescence ne sont pas significativement diminuées, avec seulement  $4 \pm 2.4\%$ ,  $13 \pm 2.6\%$  et  $17 \pm 0.9\%$  pour 50, 100 et 200 nM de siFluc, respectivement (Figure 35a, barres rouges). En revanche, lorsque les complexes siFluc/PMINPs ont été irradiés à 545 nm et pendant 5 min ( $11.3 \text{ J/cm}^2$ ) après 8 h de traitement cellulaire, les complexes inhibent efficacement l'activité luciférase de manière dose-dépendante (Figure 35a, barres vertes), les valeurs sont de  $60 \pm 0.8\%$  et  $62 \pm 1.1\%$  pour des concentrations de siFluc de 50 et 100 nM, respectivement. Plus encore, le complexe siFluc/PMINPs à la concentration de 200 nM de siFluc produit un effet plus significatif sur l'activité luciférase que le contrôle positif lipofectamine/siFluc (Figure 35a, barre rose), les taux d'inhibition sont de  $83 \pm 1.1\%$  et  $55 \pm 2.2\%$  pour siFluc/PMINPs et lipofectamine/siFluc, respectivement. La viabilité cellulaire par méthode MTT a été réalisée pour ne prendre en compte que l'expression de la luciférase par les cellules vivantes.

La même procédure utilisant des complexes siFluc/PMINPs a été répétée en utilisant cette fois-ci des irradiations de lumière bleue (450-490 nm) pendant 5 min ( $2.6 \text{ J/cm}^2$ ). Les résultats présentés sur la figure 35b révèlent l'absence de tout effet sur l'activité luciférase.

Les résultats obtenus démontrent le fort potentiel d'inhibition de l'expression génique des complexes siRNA/PMINPs lors d'une irradiation à la lumière verte. Cette activité est probablement liée à un mécanisme d'internalisation photochimique (PCI), qui entraîne des dommages au niveau des membranes des endo-lysosomes et libère le siRNA dans le cytosol des cellules.<sup>157</sup>

### 1.5. Mise en évidence du phénomène d'internalisation photochimique (PCI)

Afin de mettre en évidence l'existence d'un mécanisme PCI, nous avons utilisé l'imagerie par microscopie confocale pour mettre en évidence la localisation subcellulaire des complexes siRNA/PMINPs internalisés, ainsi que la visualisation de l'échappement endosomal grâce à l'utilisation d'un traceur d'endo-lysosomes, en présence ou en l'absence d'irradiation lumineuse verte.



**Figure 36.** Images de microscopie confocale de cellules MDA-MB-231 traitées (ou non) par les complexes siCtrl/PMINPs pendant 8 heures, puis exposées (ou non) à une lumière verte à 545 nm ( $11.3 \text{ J/cm}^2$ ) pendant 5 min ( $n = 3$ ). Les noyaux, les complexes siCtrl/PMINPs et les endo-lysosomes apparaissent respectivement en bleu, en vert et en rouge. Un motif de fluorescence ponctuée est observé chez les cellules traitées en l'absence d'irradiation, avec présence de tâches jaunes (flèches) indicatrice de co-localisation des complexes avec les endo-lysosomes. Cette fluorescence ponctuée va disparaître pour laisser place à une fluorescence diffuse (cercles) après irradiation, comme résultats de la rupture photo-induite des membranes endo-lysosomales.

Comme montré au niveau de la figure 36, les complexes siCtrl/PMINPs marqués en vert, sont effectivement internalisés à l'intérieur des cellules MDA-MB-231 et sont localisés dans des vésicules granulaires représentant le compartiment endo-lysosomal marqué en rouge, en l'absence de toute irradiation lumineuse de couleur verte.

L'apparition de tâches de couleur jaune au niveau des images fusionnées (mentionnées par des flèches, figure 36) est la résultante de la superposition des deux fluorescences verte et rouge, correspondant respectivement aux complexes siCtrl/PMINPs et aux endo-lysosomes. Cette superposition de fluorescence indique la co-localisation et l'accumulation des complexes au niveau des vésicules endo-lysosomales.

Deux heures après l'exposition des cellules traitées par les complexes à des irradiations de lumière verte (545 nm, pendant 5 min, 11.3 J/cm<sup>2</sup>), une fluorescence rouge diffuse apparaît (mentionnée par des cercles, figure 36), accompagnée d'une réduction du motif de fluorescence rouge ponctuée, démontrant la rupture photo-induite des membranes endo-lysosomales, grâce au mécanisme de PCI, suivie de la libération des complexes siCtrl/PMINPs et/ou les molécules de siCtrl piégés dans les endo-lysosomes, vers le cytoplasme. Quelques tâches jaunes sont également observées indiquant un processus de PCI en cours.

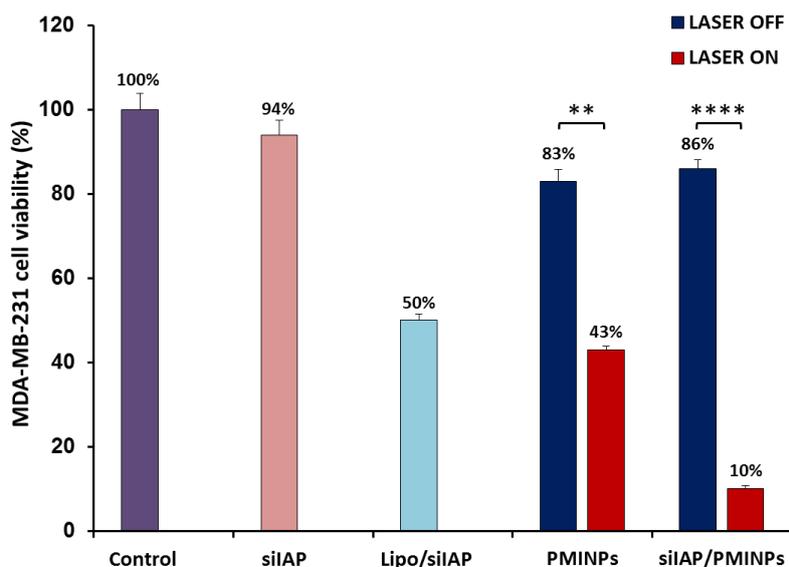
L'ensemble de ces résultats indiquent l'efficacité des PMINPs à complexer le siRNA, l'internaliser dans les cellules, mais également, permettre son échappement du compartiment endo-lysosomal grâce au mécanisme de PCI induit par des irradiations de lumière verte, et ainsi, libérer le siRNA dans le cytosol et lui accorder la possibilité de rejoindre sa cible cytoplasmique, en préservant son intégrité chimique.

### **1.6. Combinaison de la PDT biphotonique et de la thérapie par délivrance de siRNA**

Suite aux résultats encourageants obtenus avec la PDT biphotonique et l'inhibition de l'expression génique par délivrance de siRNA, nous avons opté pour l'amélioration de l'efficacité de la PDT biphotonique à 780 nm (figure 26), en la combinant avec la délivrance de siRNA dirigé contre les protéines inhibitrices d'apoptose (c-IAP1). Le siIAP va permettre alors l'inhibition de la production de protéines anti-apoptotique, donnant ainsi la possibilité de l'activation de la voie apoptotique, entraînant la mort cellulaire.

Pour cela, des cellules MDA-MB-231 ont été traitées (ou non) avec les PMINPs libres à 14 µg/mL ou par les complexes siIAP/PMINPs préalablement formés au ratio 1/10, comportant 100 nM de siIAP et 14 µg/mL de PMINPs. Les cellules ont été par la suite irradiées (ou non) à 780 nm en utilisant un LASER pulsé (3x 1.56 s, 3 W). Les cellules ont été traitées aussi avec le siIAP seul et les complexes lipo/siIAP, représentant respectivement le contrôle négatif et positif de la transfection. Les mesures de viabilité cellulaire sont réalisées par la suite par méthode MTT (figure 37).

Les résultats obtenus avec les PMINPs libres sont quasi-similaires à ceux obtenus lors de la réalisation de la PDT biphotonique (figure 26). Les valeurs de viabilité cellulaire obtenues avec les PMINPs libres et les complexes siIAP/PMINPs sont eux aussi quasi-identiques, et sont respectivement de  $83 \pm 2.9\%$  et de  $86 \pm 2.2\%$ . Un taux de mortalité statistiquement significatif a été observé chez les cellules traitées les PMINPs et irradiées, d'une valeur de  $57 \pm 0.8\%$ , qui a été hautement augmenté lors de l'irradiation des cellules traitées par les complexes siIAP/PMINPs pour atteindre un taux de mortalité cellulaire de  $90 \pm 0.7\%$ .

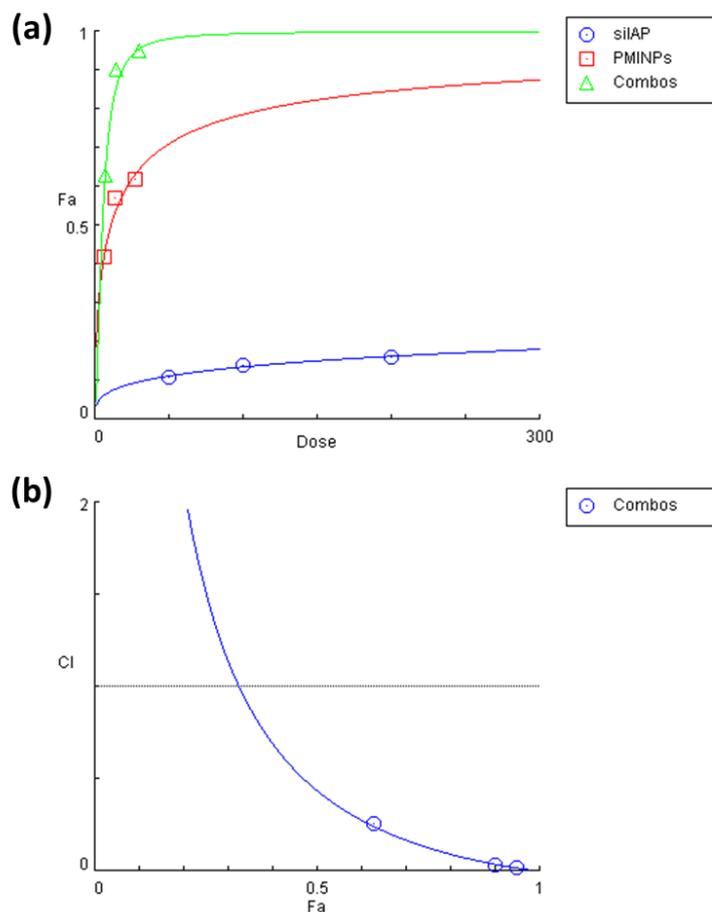


**Figure 37.** Combinaison de l'effet PDT biphotonique avec la délivrance de siIAP pro-apoptotique ( $n = 3$ ). Les cellules MDA-MB-231 sont traitées (ou non) avec les PMINPs libres ( $14 \mu\text{g/mL}$ ) ou avec les complexes siIAP/PMINPs ( $100 \text{ nM}/14 \mu\text{g/mL}$ ) au ratio 1/10, puis irradiées (ou non) en utilisant un LASER pulsé à  $780 \text{ nm}$  ( $3 \times 1.56 \text{ s}$ ,  $3 \text{ W}$ ), 8 heures après traitement. Le siIAP seul et lipo/siIAP sont utilisés comme contrôle de la transfection. Le taux de viabilité cellulaire est mesuré par MTT. \*\*différence statistiquement significative avec la même condition non-irradiée ( $p < 0.005$ ) et \*\*\*\*différence statistiquement significative ( $p < 0.0001$ ).

Afin de déterminer la nature de l'association entre les effets obtenus par PDT biphotonique et ceux liés à la délivrance du siIAP et l'inhibition de l'expression des protéines anti-apoptotiques, nous avons recouru à l'utilisation du logiciel CompuSyn qui va déterminer la valeur de l'indice de combinaison (CI). En fonction de la valeur de CI obtenue, 3 types d'effets peuvent être observés<sup>197</sup> :

- Effet additif : si  $CI = 1$  ;
- Effet synergique : si  $CI < 1$  ;
- Effet antagoniste : si  $CI > 1$ .

Dans le cas de notre étude, la valeur de l'indice de combinaison  $CI = 0.43$ , ce qui nous permet de mettre en évidence l'existence d'un effet synergique entre la PDT biphotonique et la délivrance de siIAP photo-induite, par irradiation à 780 nm, tel que montrer dans la figure 38.



**Figure 38.** Etude de l'effet de la combinaison de la PDT biphotonique avec la délivrance de siIAP après irradiation par LASER pulsé à 780 nm ( $3 \times 1.56$  s, 3 W) dans des cellules MDA-MB-231 traitées avec PMINPs libres, siIAP seul ou avec les complexes siIAP/PMINPs. (a) Courbes dose-effet des PMINPs libres, siIAP seul et la combinaison des deux dans les complexes. Dans ce cas, l'effet représente le taux de mortalité cellulaire. (b) Détermination de l'indice de combinaison (CI) en fonction de l'effet obtenu (Fa),  $CI = 0.43$ . Ces deux graphiques ont été obtenus en utilisant le logiciel CompuSyn.

La combinaison de l'effet PDT à l'action d'inhibition de l'expression des protéines anti-apoptotiques médiée par le siIAP permettrait d'avoir un grand avantage, spécialement dans le cas de la présence d'une hypoxie intra-tumorale, due à la baisse des quantités d'oxygène à l'intérieur de la tumeur, responsable de la diminution de l'efficacité de l'action PDT des PMINPs, par baisse de la production des ROS.

Plusieurs stratégies combinant l'action PDT à celle de différentes cibles de siRNA ont été étudiées. Quelques exemples sont présentés dans le tableau 12 suivant.

**Tableau 12.** Exemples de thérapies anticancéreuses basées sur l'association de la PDT et du siRNA (adapté de la référence<sup>230</sup>).

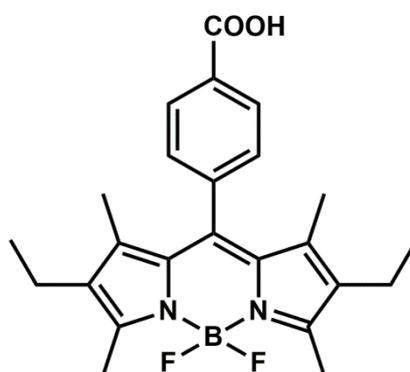
Cible du siRNA	Support de la PDT	Longueur d'onde (nm)	Rôles de la cible du siRNA	Réf
<b>HSP70</b>	MnO <sub>2</sub> /Cu <sub>2</sub> -xS	980	La surexpression de HSP70 permet l'augmentation de la résistance thermique des cellules tumorales et l'accélération de la réparation des dommages tissulaires induits par la chaleur.	231
<b>HIF-1α</b>	Vertéporfine	690	HIF-1α est un facteur induit par l'hypoxie et permet l'adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie tels que l'angiogenèse, la synthèse de l'hémoglobine et la glycolyse.	232-
	Porphyrine	650		233
<b>XBP1</b>	Méthylphéophorbide-α (MPPα)	630	XBP1 est une protéine fortement exprimée chez certaines cellules tumorales malignes, favorisant leur survie sous hypoxie et induit l'apparition de métastases et de résistances aux médicaments chimiothérapeutiques.	230
<b>RRM2</b>	Chlorine-e6 (Ce6)	660	La surexpression de RRM2 est responsable de la résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie.	234
<b>Rac1</b>	Ce6	660	Rac1 favorise l'angiogenèse et inhibe l'apoptose des cellules tumorales.	235
<b>Nrf2</b>	Indocyanine green (ICG)	808	La surexpression de Nrf2 réduit la sensibilité des cellules tumorales à la chimiothérapie et entraîne l'inhibition de l'apoptose.	236
<b>ABCG2</b>	Protoporphyrine IX	390-420	ABCG2 assure la protection des cellules tumorales contre les dommages liés à l'action des ROS.	237
<b>MTH1</b>	Ce6	660	MTH1 est impliquée dans le processus de réparation de l'ADN dans les cellules tumorales suite aux dommages liés à l'action des ROS.	238
<b>hTERT</b>	PEG-PEI black phosphorus nanosheets (PPBP)	660	La surexpression de cette sous-unité catalytique de la télomérase hTERT conduit à l'immortalisation des cellules tumorales.	239
<b>PD-L1</b>	Ce6	670	La surexpression de PD-L1 à la surface des cellules tumorales inhibe les réponses immunitaires par les lymphocytes T cytotoxiques.	240
	Porphyrine	650		241
	ICG	808		242
<b>c-IAP1</b>	Porphyrine	780	L'expression de c-IAP1 par les cellules tumorales leur permet de bloquer la voie apoptotique.	*

\* : Notre travail (figure 37).

## 2. Etude de la délivrance contrôlée du BODIPY (Bdp)

Nous avons pu démontrer avec succès au cours de la partie précédente, la capacité des PMINPs à complexer et à délivrer à l'intérieur des cellules des macromolécules de type siRNA, grâce à des interactions électrostatiques entre les charges de surface positives des PMINPs et les charges négatives des molécules de siRNA.

Dans cette deuxième partie, nous nous intéresserons à la délivrance d'une molécule de petite taille, fluorescente mais sans aucune activité thérapeutique particulière, utilisée uniquement comme une preuve de concept, c'est le BODIPY dont la structure est présentée dans la figure 39. Comme cité auparavant lors de la partie bibliographique, les nanoparticules à base d'ionosilice ont été utilisées dans le but de délivrer des médicaments anioniques tels que le diclofénac et la gemcitabine monophosphate.<sup>40-41</sup>



*Figure 39. Structure chimique du BODIPY (Bdp) utilisé.*

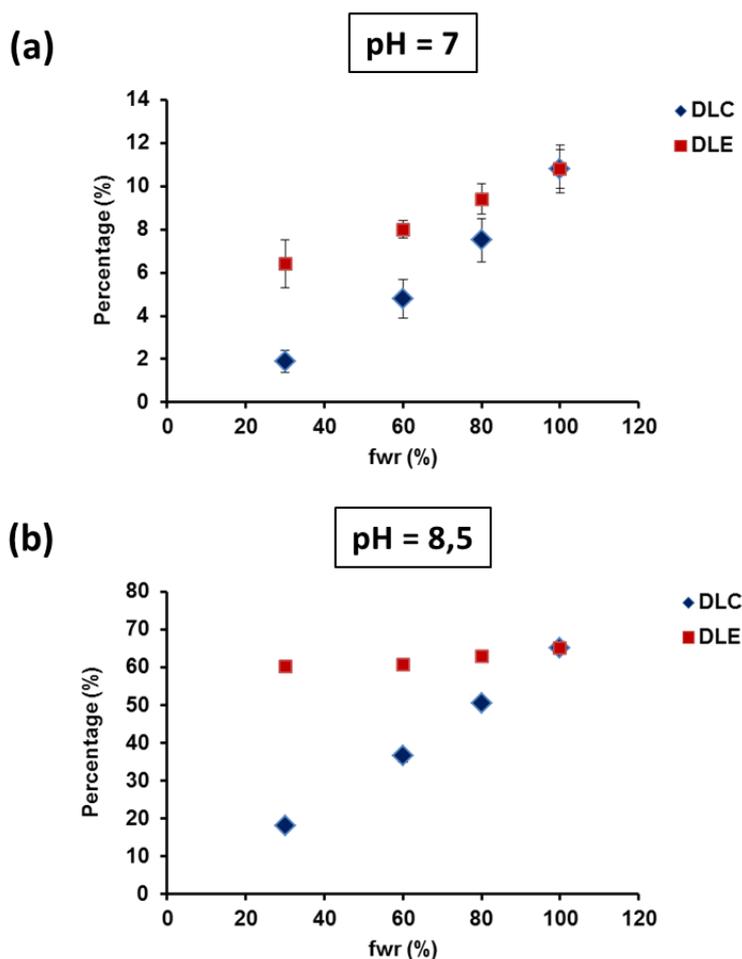
### 2.1. Etude de l'encapsulation du Bdp

L'encapsulation du Bdp dans les PMINPs a été réalisée en utilisant des solutions tampons, à deux pH différents (7 et 8.5), et en utilisant différents ratios pondéraux (feed weight ratios - fwr). Les solutions aqueuses de Bdp à différentes concentrations ont été préparées, puis 500  $\mu$ L de chaque solution ont été mélangés avec 500  $\mu$ L de la suspension de PMINPs, de sorte à obtenir différents fwr. Chaque fwr a été réalisé en trois fois, pour chacune des deux conditions de pH. Les mélanges ont été maintenus sous agitation et à l'abri de la lumière pendant 24 heures. Puis, le surnageant est récupéré après centrifugation (20k rpm, 10 min) et est analysé par spectrophotométrie UV-vis pour mesurer les absorbances à 524 nm, correspondant au maximum d'absorbance du Bdp. La quantification de la quantité de Bdp encapsulé pour chaque fwr est calculée à partir des courbes d'étalonnage obtenues avec des solutions de Bdp à différentes concentrations.

Deux principaux paramètres sont souvent rencontrés dans la littérature et sont utilisés pour l'étude de l'encapsulation des médicaments par les nanomatériaux, il s'agit de la teneur en

médicament encapsulé (Drug Loading Content - DLC) et de l'efficacité d'encapsulation du médicament (Drug Loading Efficiency - DLE), dont les formules sont présentées dans la partie expérimentale.

Afin de déterminer le meilleur ratio fwr nous permettant d'atteindre la plus grande teneur en Bdp encapsulé et la plus haute efficacité d'encapsulation, différents fwr ont été testés allant de 30 à 100% et en utilisant deux valeurs de pH différentes. Les différents surnageants collectés sont analysés pour obtenir les valeurs de DLC et de DLE correspondantes, et ainsi tracer les courbes présentées dans la figure 40.



**Figure 40.** Etude de l'encapsulation du Bdp par les PMINPs en calculant la teneur en Bdp encapsulé (DLC) ainsi que l'efficacité d'encapsulation du Bdp (DLE) à (a) pH = 7 et (b) pH = 8.5.

A partir de la figure 40a, nous pouvons déduire qu'à pH 7, de très faibles taux d'encapsulation du Bdp ont été obtenus, avec des valeurs de DLC et de DLE ne dépassant pas respectivement  $10.8 \pm 1.1\%$  et  $10.8 \pm 0.9\%$ , et cela au plus haut ratio fwr de 100%.

Cependant, en reproduisant les mêmes conditions à pH 8.5, nous observons d'une part sur la figure 40b, une augmentation graduelle des pourcentages de DLC avec des valeurs de  $18.1 \pm 1.2\%$ ,  $36.5 \pm 1.5\%$ ,  $50.4 \pm 1.1\%$  et  $65.1 \pm 0.8\%$ , respectivement pour des fwr de 30, 60, 80 et 100%. D'autre part, les valeurs de DLE restent relativement stables entre 60 et 65%, atteignant  $65.1 \pm 1.8\%$  pour le ratio fwr de 100%.

Ainsi, il est évident que l'encapsulation du Bdp par les PMINPs est pH-dépendante, et ceci est principalement due à la déprotonation des groupements carboxyliques avec apparition de charges négatives qui vont interagir avec les charges positives des groupements ammoniums du précurseur ionosilicique des PMINPs, grâce à un phénomène d'échange anionique. Le ratio fwr de 100% est donc le meilleur, qui nous a permis d'obtenir un taux d'encapsulation de 65% à pH 8.5.

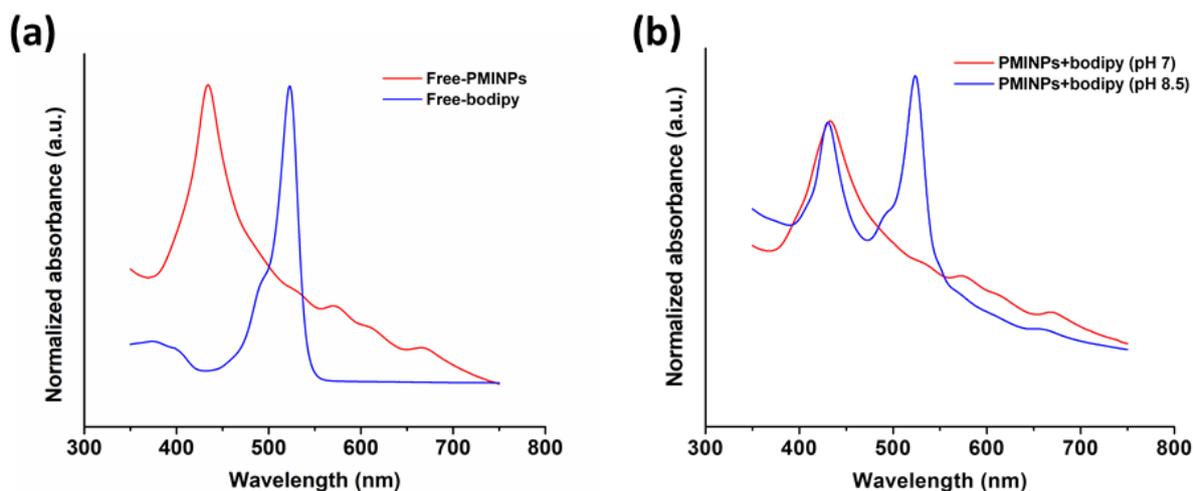
Une étude comparative des pourcentages de DLC a été réalisée sur des nanoparticules des natures diverses, utilisées pour la délivrance de médicaments. Les valeurs de DLC présentées dans le tableau 13 placent les PMINPs parmi les systèmes nanoparticulaires les plus performants utilisés pour l'encapsulation de molécules médicamenteuses, avec une DLC de 65%.

**Tableau 13.** Etude comparative entre les DLC de divers systèmes nanoparticulaires utilisés pour la délivrance de médicaments.

Nature des nano-objets	Mécanisme d'encapsulation	DLC (%)	Réf.
NPs de silice mésoporeuses			243-245
NPs de silicate de calcium mésoporeuses			246-248
NPs de silicate de magnésium mésoporeuses	Interactions électrostatiques non-covalentes, $\pi$ -stacking, liaisons hydrogène ou interactions hydrophobes.	$\leq 69\%$	249-251
NPs de carbone mésoporeuses		$\leq 59\%$	252-254
Clusters de nano-cristaux colloïdaux magnétiques mésoporeux		$\leq 35\%$	255-258
NPs organométalliques	Liaisons de coordination, $\pi$ -stacking ou interactions hydrophobes.	$\leq 58\%$	259-262
NPs de protéine	Liaisons covalentes avec la matrice protéique, $\pi$ -stacking, interactions hydrophobes ou par cristallisation.	$\leq 44\%$	263-266
NPs polymériques	Liaisons covalentes	$\leq 58\%$	267-270
Liposomes	Interactions électrostatiques non-covalentes ou interactions hydrophobes.	$\leq 70\%$	271-274

## 2.2. Caractérisation des PMINPs chargées avec le Bdp (PMINPs@Bdp)

Dans le but de vérifier l'encapsulation du Bdp à l'intérieur des PMINPs, des spectres UV-vis ont été réalisés sur les culots de centrifugation récupérés après le test d'encapsulation, pour les ratios fwr de 100%, à pH 7 et 8.5. Les culots ont été re-dispersés dans de l'eau Milli-Q, puis analysés par spectroscopie UV-vis. Les spectres obtenus sont présentés dans la figure 41.



**Figure 41.** Spectres UV-vis réalisés dans l'eau Milli-Q de (a) PMINPs libres et du Bdp libre et des (b) culots de centrifugation récupérés après la réaction d'encapsulation du Bdp aux fwr de 100%, aux deux pH 7 et 8.5.

La figure 41a représente les spectres UV-vis des PMINPs libres et du Bdp libre, réalisés en tant que contrôles pour la suite des caractérisations. Comme précédemment indiqué dans la figure 19, les PMINPs présentent un pic d'absorption à 433 nm, tandis que le maximum d'absorption du Bdp se situe à 524 nm.

Dans la figure 41b, nous pouvons facilement attester l'encapsulation du Bdp à l'intérieur des PMINPs par l'apparition d'un pic d'absorption intense à 524 nm, attribué au Bdp, et cela uniquement pour le processus d'encapsulation réalisée à pH 8.5. Cependant, ce pic n'a pu être observé à pH 7, confirmant ainsi le très faible taux d'encapsulation obtenu, ne dépassant pas 11%.

Nous pouvons conclure qu'il y a bien eu encapsulation du Bdp à l'intérieur des PMINPs à pH 8.5 uniquement, obtenant ainsi les PMINPs@Bdp.

Des mesures de potentiel zêta dans l'eau à pH 7 ont été réalisées aussi sur les PMINPs@Bdp obtenues aux différents fwr à pH 8.5. Les résultats sont présentés dans le tableau 13 suivant.

**Tableau 14.** Résultats des mesures de potentiel zêta réalisées sur les PMINPs@Bdp obtenues aux différents fwr, dans de l'eau et à pH 7.

Composé	Potentiel zêta (mV)
PMINPs libres	+35.8
PMINPs@Bdp à fwr = 30%	+25.7
PMINPs@Bdp à fwr = 60%	+28.1
PMINPs@Bdp à fwr = 80%	+30.5
PMINPs@Bdp à fwr = 100%	+31.2

Les résultats des mesures de potentiel zêta obtenus dans le tableau 14 montrent une baisse dans la valeur du potentiel zêta de près de 10 mV au ratio de 30% en comparaison avec les PMINPs libres. Puis, les potentiels zêta vont augmenter progressivement à +28.1 mV, +30.5 mV jusqu'à atteindre +31.2 mV, respectivement aux ratios 60, 80 et 100%.

En comparant ces résultats à ceux obtenus lors de la complexation du siRNA (figure 31a), nous pouvons émettre l'hypothèse qu'au plus faible ratio de 30%, les molécules de Bdp sont essentiellement adsorbées à la surface des PMINPs, entraînant une baisse de leur potentiel zêta. Cependant, plus le ratio augmente et plus le potentiel zêta des PMINPs@Bdp se rapproche de la valeur de celle des PMINPs libres, suggérant une encapsulation du Bdp à l'intérieur des porosités des PMINPs, avec un faible impact observé sur le potentiel zêta à la surface des PMINPs.

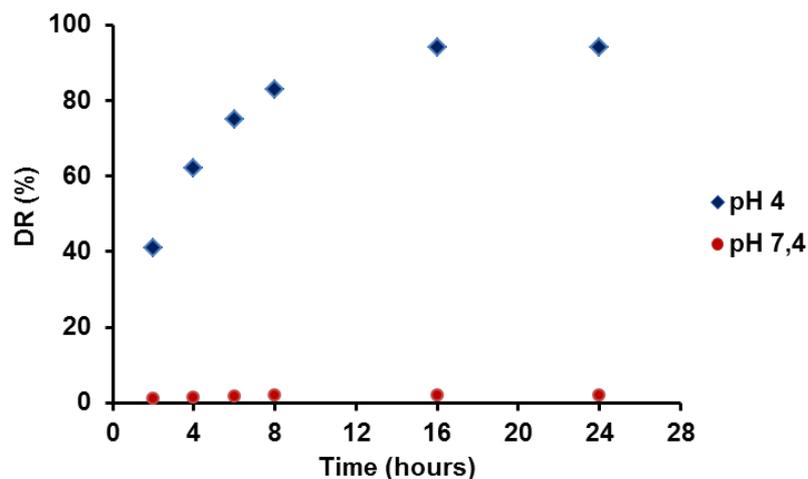
### 2.3. Etude de la libération *in vitro* du Bdp

L'obtention d'un taux d'encapsulation élevé n'est à lui seul pas suffisant pour juger de l'efficacité des nano-objets à délivrer des médicaments. En effet, il est primordial que les nanoparticules soient capables de libérer une quantité maximale du médicament encapsulé, afin qu'il puisse atteindre sa cible et exercer son effet thérapeutique.

Ainsi, un autre paramètre important a été utilisé dans la littérature pour l'étude de la libération du médicament encapsulé, c'est le taux de médicament libéré (Drug Released - DR), dont la formule est énoncée dans la partie expérimentale.

La libération du Bdp a été réalisée dans un mélange solution tampon/DMSO avec un ratio de 9:1, à deux pH différents (4 et 7.4), et en utilisant les PMINPs@Bdp obtenues au fwr de 100% à pH 8.5. Les mélanges ont été maintenus à l'abri de la lumière et sans agitation pendant 24 heures, au cours desquelles une cinétique de libération du Bdp a été réalisée par mesure des absorbances à 524 nm à

l'aide d'un spectrophotomètre UV-vis. La quantification du taux de Bdp libéré pour chaque condition est calculée à partir des courbes d'étalonnage obtenues avec des solutions de Bdp à différentes concentrations. Les taux de Bdp libérés sont présentés dans la figure 42.



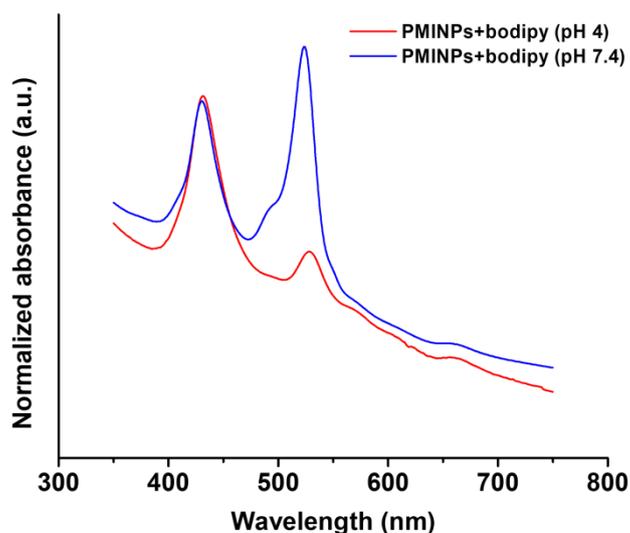
**Figure 42.** Etude de la cinétique de libération du Bdp à partir des PMINPs@Bdp sous l'effet du pH par calcul du taux de libération (DR).

A pH 7.4, la libération du Bdp à partir des PMINPs est quasi-nulle, avec un taux de libération de  $1.1 \pm 0.3\%$  à 2 heures, puis  $2.0 \pm 0.9\%$  au bout de 24 heures.

La même opération a été répétée à pH 4, ou nous avons pu observer une libération du Bdp d'allure exponentielle jusqu'à 24 heures, avec un taux de  $41 \pm 1.2\%$  à 2 heures, puis  $75 \pm 0.9\%$  à 6 heures, jusqu'à atteindre un plateau à partir de 16 heures qui s'est stabilisé autour de 94%.

Ainsi, de la même façon que l'encapsulation, la libération du Bdp est pH-dépendante. Le milieu acide va entraîner la protonation de la fonction carboxylique du Bdp, le conduisant à quitter les PMINPs pour se retrouver libre dans le milieu.

Pour mieux visualiser cela, nous avons réalisé des spectres UV-vis sur les culots de centrifugation récupérés à la fin de la réaction de libération du Bdp réalisée à pH 4 et 7.4. Les spectres obtenus sont montrés dans la figure 43.



**Figure 43.** Spectres UV-vis réalisés sur les culots de centrifugation récupérés à la fin de la réaction de libération du Bdp aux pH 4 et 7.4.

La courbe de couleur bleue (figure 43) correspondante au spectre réalisé sur le culot récupéré après le processus de libération à pH 7.4 est identique à la courbe bleue obtenue lors de l'encapsulation du Bdp à pH 8.5 présentée dans la figure 41b. Ceci prouve l'absence d'impact du pH 7.4 sur la libération du Bdp des PMINPs.

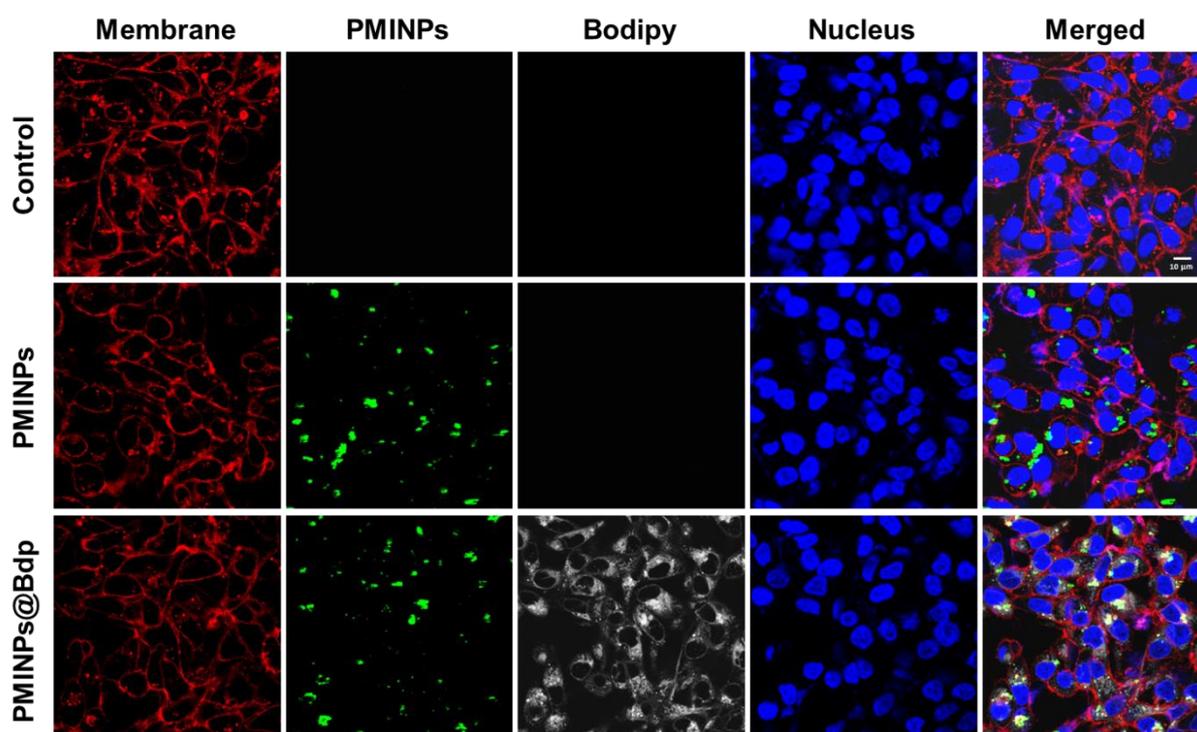
Cependant, et à pH 4, une nette baisse dans l'intensité du pic situé à 524 nm, correspondant au maximum d'absorption du Bdp, est clairement observée et témoigne d'une perte en masse du Bdp de l'intérieur des PMINPs, qui est due à l'important taux de libération du Bdp de 94% à pH 4, tel qu'observer à la figure 42. Le Bdp quitte alors les porosités des PMINPs pour se retrouver à l'état soluble dans le surnageant. Quant au pic attribué à la porphyrine à 433 nm, il reste bien visible peu importe les conditions de pH, confirmant que les motifs de porphyrine sont liés à la matrice ionosilicique par des liaisons covalentes.

Cette propriété de libération de molécules pH-sensible est une excellente preuve de concept qui peut être exploitée pour la délivrance de médicaments ciblant les cellules tumorales. En effet, nous avons pu observer qu'à pH 7.4, qui mime le pH sanguin, l'absence de libération du Bdp. Cependant, un passage à pH acide, qui représente le pH du microenvironnement tumoral ainsi que celui du compartiment endo-lysosomal, est responsable d'une libération exponentielle du Bdp.<sup>275-278</sup>

#### 2.4. Etude de la libération *in cellulo* du Bdp

Afin de visualiser la délivrance du Bdp à l'intérieur des cellules, des MDA-MB-231 ont été traitées avec des PMINPs ou des PMINPs@Bdp à la concentration de 20 µg/mL pendant 24 heures, puis observées par microscopie confocale.

Etant donné que les PMINPs empruntent la voie endo-lysosomale, le pH acide des vésicules lysosomales devrait induire la libération du Bdp des PMINPs, qui diffusera par la suite à l'ensemble du cytosol des cellules. Les résultats d'imagerie obtenus sont présentés dans la figure 44.



**Figure 44.** Images de microscopie confocale obtenues à partir de cellules MDA-MB-231 traitées (ou non) par les PMINPs ou les PMINPs@Bdp à la concentration de 20 µg/mL pendant 24 heures. Les membranes cellulaires, les PMINPs, le Bdp et les noyaux apparaissent respectivement colorés en rouge, vert, blanc et bleu.

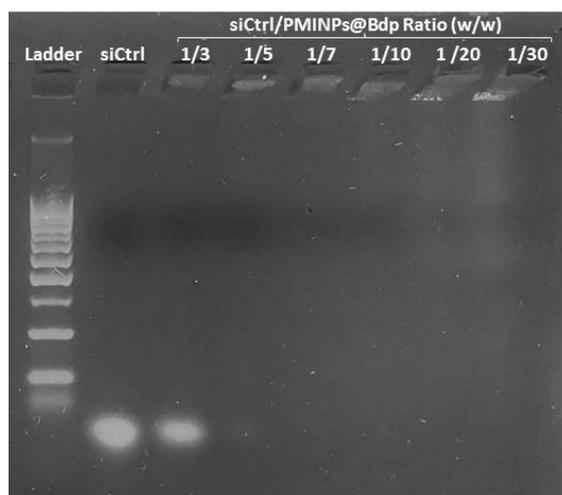
Les résultats d'imagerie obtenus confortent notre hypothèse de départ. Le Bdp a été bel et bien relargué des porosités des PMINPs grâce à l'acidité lysosomale. Cette propriété peut être très intéressante pour l'encapsulation et la vectorisation de médicaments anioniques pouvant être retenus et libérés par la suite par un mécanisme d'échange anionique, tels que la gemcitabine monophosphate ou la doxorubicine chlorhydrate, utilisées dans le traitement chimiothérapique des cancers.

## 2.5. Etude de la capacité des PMINPs@Bdp à complexer le siRNA

Au cours des parties précédentes, nous avons pu confirmer l'aptitude des PMINPs d'une part, à complexer le siRNA par des interactions électrostatiques, et d'autre part, à encapsuler le Bdp par des échanges anioniques.

Nous nous sommes donc interrogés quant à la faisabilité d'encapsuler à la fois le Bdp et le siRNA, tout en sachant que la complexation du siRNA a entraîné une variation importante du potentiel zêta, passant de +35.8 mV pour les PMINPs libres, à -30.2 mV pour les complexes siRNA/PMINPs au ratio pondéral de 1/10 (figure 31). Contrairement à l'encapsulation du Bdp, ou une très faible variation du potentiel zêta a pu être observé, pour atteindre une valeur de +31.2 mV pour un ratio fwr de 100% (tableau 14).

Afin de vérifier l'aptitude des PMINPs@Bdp à complexer le siRNA, un gel retard a été réalisé après mise en contact pendant 30 min et à 37°C, d'une quantité fixe de siCtrl avec des quantités croissantes de PMINPs@Bdp, pour avoir *in fine* des ratios pondéraux allant de 1/3 à 1/30.



**Figure 45.** Etude de la complexation du siRNA par les PMINPs@Bdp par méthode de gel retard. Différents ratios pondéraux siCtrl/PMINPs@Bdp ont pu être testés, allant de 1/3 à 1/30, avec un temps de complexation de 30 min, à 37°C.

Après analyse du gel obtenu, présenté dans la figure 45, on observe une faible complexation du siCtrl pour le ratio 1/3, en comparaison avec la tâche observée au niveau du puits contenant du siCtrl libre. Une complexation quasi-totale est observée à partir du ratio 1/5, qui va évoluer vers une complexation totale à partir du ratio 1/7 jusqu'au plus haut ratio testé à 1/30. Il est possible de visualiser également la présence de fluorescence au niveau des puits, grâce à l'intense fluorescence du Bdp, confirmant une fois de plus, le succès de la complexation du siRNA par les PMINPs@Bdp.

En comparant les gels retard liés à la complexation du siRNA par les PMINPs et les PMINPs@Bdp, présentés respectivement aux figures 30b et 45, on peut remarquer une baisse dans la sensibilité des nanoparticules à complexer le siRNA pour les ratios pondéraux 1/3 et 1/5 en présence de Bdp, contrairement aux PMINPs qui montraient une complexation totale à tous les ratios testés, allant de 1/3 à 1/30. Cette différence serait due à la faible baisse dans la valeur du potentiel zêta en présence de Bdp (+31.2 mV), par rapport aux PMINPs libres (+35.8 mV). Toutefois, cette variation reste sans impact étant donné que nous nous sommes fixés dès le départ au ratio pondéral 1/10.

Ainsi, nous pouvons conclure que les PMINPs représentent une plateforme multifonctionnelle qui donne la possibilité d'unir différentes stratégies thérapeutiques ; à la fois, la PDT, la thérapie génique par siRNA ainsi que la délivrance de molécules de petites tailles telles que des molécules chimiothérapeutiques, afin de permettre une lutte efficace, et sur tous les fronts, contre les cancers.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons abordé au cours de ce travail, l'un des plus grands enjeux de la santé publique du XXI<sup>e</sup> siècle, représenté par la lutte contre le cancer. Il existe de nos jours, un grand nombre de stratégies dans l'arsenal des traitements anti-cancéreux, en passant par la chimiothérapie, la radiothérapie, l'immunothérapie et la chirurgie. Cependant, un certain nombre d'inconvénients ont pu être remarqués et sont souvent incriminés dans l'échec thérapeutique. En effet, cela est dû à l'absence ou au manque de spécificité des traitements qui agissent sans distinction entre les cellules saines et les cellules tumorales, mais aussi à cause de l'apparition de résistances aux traitements utilisés, engendrant une baisse de l'efficacité thérapeutique. Ainsi, recourir à un ciblage passif (par effet EPR) ou actif (par greffage de molécules de ciblage) en utilisant des nano-objets encapsulant des principes actifs permettraient d'améliorer la spécificité d'action. Quant à la résistance aux traitements, la combinaison de plusieurs thérapies empruntant des voies pharmacologiques différentes représenterait une excellente alternative, en minimisant au maximum un éventuel risque d'échappement thérapeutique des cellules tumorales.

À la suite des trois années de thèse, nous sommes parvenus à synthétiser avec succès des nanoparticules ionosiliciques mésoporeuses (PMINPs) multifonctionnelles, combinant en un seul nano-objet, l'ensemble des avantages apportés par les ionosilices, à savoir des propriétés texturales, morphologiques et interfaciales hautement intéressantes, à l'action photosensibilisante apportée par la porphyrine.

Tout d'abord, nous avons démontré l'efficacité des PMINPs en thérapie photodynamique suite à une irradiation monophotonique à 545 nm, mais aussi en biphotonique en utilisant un LASER pulsé à 780 nm. Cet effet a été observé à la fois, *in vitro* sur les cultures de cellules cancéreuses MDA-MB-231 en 2-D et *in vivo* sur des xénogreffes de cellules cancéreuses humaines injectées chez des embryons de poisson-zèbre. Nous avons montré par la même occasion, la place importante de la PDT en thérapie anti-cancéreuse par le grand nombre d'essais cliniques reposant sur cette stratégie ainsi que les médicaments déjà présents sur le marché, et utilisés pour le diagnostic ou le traitement des cancers.

Ensuite, les PMINPs ont mis en évidence leur potentiel en tant que vecteur efficace pour la complexation et la délivrance intracellulaire du siRNA par un mécanisme d'internalisation photochimique (PCI) enclenchée par une irradiation lumineuse, sans entraîner de mortalité cellulaire. Les complexes siRNA/PMINPs ont ainsi été capables d'entraîner une inhibition quasi-totale de l'expression de la protéine ciblée par le siRNA.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

De nos jours, quatre médicaments reposant sur la thérapie par siRNA ont pu obtenir l'autorisation de mise sur le marché par l'EMA en Europe et la FDA aux Etats-Unis. Ceci ne peut que témoigner de l'importance de cette stratégie innovante et son impact dans le domaine de la santé humaine. Il est important de souligner aussi que l'émergence des vaccins à ARN messager au cours de la pandémie de COVID-19, aura certainement un effet propulseur pour la thérapie génique et la délivrance d'acides nucléiques en général, et le siRNA plus particulièrement, avec l'intensification de la recherche dans le domaine et l'augmentation du nombre d'essais cliniques chez l'homme.

Puis, les PMINPs ont montré également leur importance en tant que vecteur de médicament, avec une preuve de concept réalisée à l'aide du BODIPY, connu comme étant une molécule faiblement soluble dans l'eau, qui a pu être encapsulé avec succès à l'intérieur des porosités des PMINPs. Les résultats *in vitro* et *in cellulo* ont témoigné de la délivrance pH-dépendante de la molécule. En effet, une absence de libération de la molécule est observée au pH physiologique, contrairement à une libération importante de l'ordre de 94% est remarquée au pH acide du microenvironnement tumoral.

Il a été démontré par plusieurs études que l'utilisation des nanoparticules permet de surmonter certains obstacles liés aux médicaments, tels que la faible hydro-solubilité ou le faible temps de demi-vie *in vivo*. En effet, un nombre considérable de nouveaux médicaments commercialisés ou des candidats médicaments (environ 70%) ne peuvent être absorbés au niveau des intestins, ni être en circulation dans le sang par administration intraveineuse, à cause de leur hydrophobicité. A titre d'exemple, le paclitaxel et le docétaxel qui sont des molécules anti-cancéreuses efficaces, cependant avec une très faible solubilité dans l'eau, de l'ordre de 1 et 6 µg/mL respectivement.<sup>279-281</sup> Ceci confirme l'utilité des PMINPs.

En dernier lieu, les PMINPs ont démontré leur aptitude à encapsuler à la fois les molécules de siRNA et de BODIPY. Ceci pourrait avoir comme avantage la mise en place d'une trithérapie localisée à base de thérapie photodynamique, thérapie génique par siRNA et chimiothérapie, en plus de la possibilité de réaliser l'imagerie. Cette combinaison aurait comme objectif une lutte anti-cancéreuse efficace, qui écarterait tout éventuel risque de résistance tumorale au traitement.

En perspective, et en complément des résultats prometteurs d'ores et déjà obtenus, il serait important de mener des études pharmacocinétiques sur les PMINPs, à savoir, des études de biodistribution, de métabolisation et d'excrétion *in vivo*. Il est primordial aussi de vérifier l'existence de l'effet EPR, permettant un ciblage passif et une accumulation des PMINPs dans la tumeur, grâce à la présence de fenestrations dans la néo-vascularisation tumorale.

Un exemple hautement ambitieux qui représente un réel espoir pour les PMINPs est la thérapie AuroLase® qui utilise des nanoparticules d'or PEGylées de 155 nm de diamètre, non ciblées,

baptisées AuroShells® et utilisées pour l'ablation de tumeurs solides par thérapie d'hyperthermie photo-induite par irradiation dans le proche infrarouge.<sup>282</sup> Un premier essai clinique chez l'homme a été réalisé sur des patients atteints de cancer prostatique.<sup>283</sup> Une accumulation des AuroShells® a été observée au niveau des sites tumoraux suite à leur administration par voie intraveineuse. L'activation des nanoparticules par utilisation de fibre optique a permis une disparition totale des tumeurs de 3 à 7 jours après irradiation, par le mécanisme d'hyperthermie. Une augmentation de la quantité de nanoparticules accumulées dans les tumeurs prostatiques a été obtenue après fonctionnalisation des AuroShells® par la goséréline, qui est un analogue de l'hormone LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) qui se lie au récepteur de la LHRH, surexprimé à la surface des cellules cancéreuses prostatiques, ou fonctionnalisation par le peptide cyclo(RGDfK), ligand des Intégrines  $\alpha_v\beta_3$  surexprimées dans plusieurs types de cancers.<sup>284-285</sup> Un autre type de nanoparticules d'or PEGylées et fonctionnalisées par le TNF, baptisées Aurimmune®, ont pu franchir aussi l'étape d'essais cliniques de phase I (NCT 00356980).<sup>286</sup> Ceci pourrait nous amener à réfléchir à une éventuelle fonctionnalisation future des PMINPs par un motif de ciblage des cellules cancéreuses, afin d'augmenter l'internalisation des PMINPs dans les cellules cancéreuses. La fonctionnalisation des PMINPs pourrait être facilitée dans notre cas par le remplacement du silane-PEG-2000 avec un PEG bi-fonctionnel, comportant des groupements triméthoxy-silane  $-\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$  et une fonction amine  $-\text{NH}_2$ , de part et d'autre des extrémités de la chaîne PEG. Plusieurs stratégies de ciblage peuvent être envisagées par : fragments d'anticorps,<sup>287-291</sup> transferrine,<sup>292-295</sup> acide folique,<sup>296-300</sup> acide hyaluronique,<sup>301-303</sup> mannose,<sup>75, 304</sup> etc.

Une autre piste a été également testée à la fin de cette thèse mais qui n'a pas eu assez de temps pour être exploitée. C'est la possibilité de complexation de l'ARNm par les PMINPs vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose, qui pourrait trouver de nombreuses applications dans des situations pathologiques liées à une expression insuffisante d'une protéine donnée ... voire une hypothétique utilisation comme vecteur pour des vaccins à ARNm !?

Pour conclure, les nanoparticules inorganiques ou hybrides en général proposent de nombreuses applications biomédicales intéressantes. Cependant, le manque de recul vis-à-vis de leur toxicité et la garantie de leur innocuité représente un défi majeur devant être relevé afin de leur ouvrir la voie à l'utilisation clinique à grande échelle dans le but d'améliorer de la prise en charge des différentes pathologies.<sup>305-307</sup>



# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Zha, J.; Roggendorf, H. Sol-gel science, the physics and chemistry of sol-gel processing, Ed. by C. J. Brinker and G. W. Scherer, Academic Press, Boston 1990, xiv, 908 pp., bound—ISBN 0-12-134970-5. *Advanced Materials* **1991**, 3 (10), 522-522, DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.19910031025>.
- (2) Wen, J.; Wilkes, G. L. Organic/Inorganic Hybrid Network Materials by the Sol-Gel Approach. *Chemistry of Materials* **1996**, 8 (8), 1667-1681, DOI: [10.1021/cm9601143](https://doi.org/10.1021/cm9601143).
- (3) ALOthman, Z. A. A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials. *Materials* **2012**, 5 (12), 2874-2902.
- (4) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science* **1968**, 26 (1), 62-69, DOI: [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5).
- (5) V. Chiola, J. E. R., and C.D. Vanderpool US Patent 3, 556,725. 1971.
- (6) Brinker, C. J. Porous inorganic materials. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **1996**, 1 (6), 798-805, DOI: [https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(96\)80104-5](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(96)80104-5).
- (7) Beck, J. S.; Vartuli, J. C.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; Kresge, C. T.; Schmitt, K. D.; Chu, C. T. W.; Olson, D. H.; Sheppard, E. W.; McCullen, S. B.; Higgins, J. B.; Schlenker, J. L. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, 114 (27), 10834-10843, DOI: [10.1021/ja00053a020](https://doi.org/10.1021/ja00053a020).
- (8) Vartuli, J. C.; Schmitt, K. D.; Kresge, C. T.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; McCullen, S. B.; Hellring, S. D.; Beck, J. S.; Schlenker, J. L. Effect of Surfactant/Silica Molar Ratios on the Formation of Mesoporous Molecular Sieves: Inorganic Mimicry of Surfactant Liquid-Crystal Phases and Mechanistic Implications. *Chemistry of Materials* **1994**, 6 (12), 2317-2326, DOI: [10.1021/cm00048a018](https://doi.org/10.1021/cm00048a018).
- (9) Dubois, M.; Gulik-Krzywicki, T.; Cabane, B. Growth of silica polymers in a lamellar mesophase. *Langmuir* **1993**, 9 (3), 673-680, DOI: [10.1021/la00027a011](https://doi.org/10.1021/la00027a011).
- (10) Zhao, D.; Huo, Q.; Feng, J.; Chmelka, B. F.; Stucky, G. D. Nonionic Triblock and Star Diblock Copolymer and Oligomeric Surfactant Syntheses of Highly Ordered, Hydrothermally Stable, Mesoporous Silica Structures. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120 (24), 6024-6036, DOI: [10.1021/ja974025i](https://doi.org/10.1021/ja974025i).
- (11) Hoffmann, F.; Cornelius, M.; Morell, J.; Fröba, M. Silica-Based Mesoporous Organic-Inorganic Hybrid Materials. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45 (20), 3216-3251, DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.200503075>.
- (12) Loy, D. A.; Shea, K. J. Bridged Polysilsesquioxanes. Highly Porous Hybrid Organic-Inorganic Materials. *Chemical Reviews* **1995**, 95 (5), 1431-1442, DOI: [10.1021/cr00037a013](https://doi.org/10.1021/cr00037a013).
- (13) Burkett, S. L.; Sims, S. D.; Mann, S. Synthesis of hybrid inorganic-organic mesoporous silica by co-condensation of siloxane and organosiloxane precursors. *Chemical Communications* **1996**, (11), 1367-1368, DOI: [10.1039/CC960001367](https://doi.org/10.1039/CC960001367).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (14) Macquarrie, D. J. Direct preparation of organically modified MCM-type materials. Preparation and characterisation of aminopropyl–MCM and 2-cyanoethyl–MCM. *Chemical Communications* **1996**, (16), 1961-1962, DOI: 10.1039/CC9960001961.
- (15) Lim, M. H.; Blanford, C. F.; Stein, A. Synthesis and Characterization of a Reactive Vinyl-Functionalized MCM-41: Probing the Internal Pore Structure by a Bromination Reaction. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (17), 4090-4091, DOI: 10.1021/ja9638824.
- (16) Wahab, M. A.; Beltramini, J. N. Recent advances in hybrid periodic mesostructured organosilica materials: opportunities from fundamental to biomedical applications. *RSC Advances* **2015**, *5* (96), 79129-79151, DOI: 10.1039/C5RA10062C.
- (17) Inagaki, S.; Guan, S.; Fukushima, Y.; Ohsuna, T.; Terasaki, O. Novel Mesoporous Materials with a Uniform Distribution of Organic Groups and Inorganic Oxide in Their Frameworks. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (41), 9611-9614, DOI: 10.1021/ja9916658.
- (18) Melde, B. J.; Holland, B. T.; Blanford, C. F.; Stein, A. Mesoporous Sieves with Unified Hybrid Inorganic/Organic Frameworks. *Chemistry of Materials* **1999**, *11* (11), 3302-3308, DOI: 10.1021/cm9903935.
- (19) Asefa, T.; MacLachlan, M. J.; Coombs, N.; Ozin, G. A. Periodic mesoporous organosilicas with organic groups inside the channel walls. *Nature* **1999**, *402* (6764), 867-871, DOI: 10.1038/47229.
- (20) Walcarius, A.; Etienne, M.; Bessière, J. Rate of Access to the Binding Sites in Organically Modified Silicates. 1. Amorphous Silica Gels Grafted with Amine or Thiol Groups. *Chemistry of Materials* **2002**, *14* (6), 2757-2766, DOI: 10.1021/cm021117k.
- (21) Walcarius, A.; Etienne, M.; Lebeau, B. Rate of Access to the Binding Sites in Organically Modified Silicates. 2. Ordered Mesoporous Silicas Grafted with Amine or Thiol Groups. *Chemistry of Materials* **2003**, *15* (11), 2161-2173, DOI: 10.1021/cm021310e.
- (22) Croissant, J. G.; Cattoën, X.; Wong Chi Man, M.; Durand, J.-O.; Khashab, N. M. Syntheses and applications of periodic mesoporous organosilica nanoparticles. *Nanoscale* **2015**, *7* (48), 20318-20334, DOI: 10.1039/C5NR05649G.
- (23) Mizoshita, N.; Tani, T.; Inagaki, S. Syntheses, properties and applications of periodic mesoporous organosilicas prepared from bridged organosilane precursors. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40* (2), 789-800, DOI: 10.1039/C0CS00010H.
- (24) Nouredine, A.; Trens, P.; Toquer, G.; Cattoën, X.; Man, M. W. Tailoring the hydrophilic/lipophilic balance of clickable mesoporous organosilicas by the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition click-functionalization. *Langmuir* **2014**, *30* (41), 12297-305, DOI: 10.1021/la503151w.
- (25) Soler-Illia, G. J. A. A.; Azzaroni, O. Multifunctional hybrids by combining ordered mesoporous materials and macromolecular building blocks. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40* (2), 1107-1150, DOI: 10.1039/C0CS00208A.
- (26) El Hankari, S.; Motos-Pérez, B.; Hesemann, P.; Bouhaouss, A.; Moreau, J. J. E. Pore size control and organocatalytic properties of nanostructured silica hybrid materials containing amino and ammonium groups. *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21* (19), 6948-6955, DOI: 10.1039/C1JM10422E.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (27) Lee, B.; Im, H.-J.; Luo, H.; Hagaman, E. W.; Dai, S. Synthesis and Characterization of Periodic Mesoporous Organosilicas as Anion Exchange Resins for Perrhenate Adsorption. *Langmuir* **2005**, *21* (12), 5372-5376, DOI: 10.1021/la050313d.
- (28) Nguyen, T. P.; Hesemann, P.; Linh Tran, T. M.; Moreau, J. J. E. Nanostructured polysilsesquioxanes bearing amine and ammonium groups by micelle templating using anionic surfactants. *Journal of Materials Chemistry* **2010**, *20* (19), 3910-3917, DOI: 10.1039/B925352A.
- (29) Hesemann, P.; Viau, L.; Vioux, A. Silica Ionogels and Ionosilicas. In *The Sol-Gel Handbook*; 2015; pp 487-518.
- (30) Corriu, R. J. P.; Moreau, J. J. E.; Thepot, P.; Man, M. W. C. New mixed organic-inorganic polymers: hydrolysis and polycondensation of bis(trimethoxysilyl)organometallic precursors. *Chemistry of Materials* **1992**, *4* (6), 1217-1224, DOI: 10.1021/cm00024a020.
- (31) Shea, K. J.; Loy, D. A.; Webster, O. Arylsilsesquioxane gels and related materials. New hybrids of organic and inorganic networks. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (17), 6700-6710, DOI: 10.1021/ja00043a014.
- (32) Van Der Voort, P.; Esquivel, D.; De Canck, E.; Goethals, F.; Van Driessche, I.; Romero-Salguero, F. J. Periodic Mesoporous Organosilicas: from simple to complex bridges; a comprehensive overview of functions, morphologies and applications. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42* (9), 3913-3955, DOI: 10.1039/C2CS35222B.
- (33) Thach, U. D.; Trens, P.; Prelot, B.; Zajac, J.; Hesemann, P. Tuning the Interfacial Properties of Mesoporous Ionosilicas: Effect of Cationic Precursor and Counter Anion. *The Journal of Physical Chemistry C* **2016**, *120* (48), 27412-27421, DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b09457.
- (34) Wu, H.; Hesemann, P.; Trens, P.; Silly, G.; Salles, F.; Zajac, J. Ionosilica-based anion exchangers for low-temperature thermochemical storage of energy under mild conditions of adsorbent regeneration and saturation. *Chemical Engineering Journal* **2020**, *398*, 125634, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125634>.
- (35) Hench, L. L.; West, J. K. The sol-gel process. *Chemical Reviews* **1990**, *90* (1), 33-72, DOI: 10.1021/cr00099a003.
- (36) Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C.; Beck, J. S. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature* **1992**, *359* (6397), 710-712, DOI: 10.1038/359710a0.
- (37) Zhao, D.; Feng, J.; Huo, Q.; Melosh, N.; Fredrickson, G. H.; Chmelka, B. F.; Stucky, G. D. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science* **1998**, *279* (5350), 548-552, DOI: 10.1126/science.279.5350.548.
- (38) Thach, U. D.; Prelot, B.; Pellet-Rostaing, S.; Zajac, J.; Hesemann, P. Surface Properties and Chemical Constitution as Crucial Parameters for the Sorption Properties of Ionosilicas: The Case of Chromate Adsorption. *ACS Applied Nano Materials* **2018**, *1* (5), 2076-2087, DOI: 10.1021/acsanm.8b00020.
- (39) Ju, Y. H.; Webb, O. F.; Dai, S.; Lin, J. S.; Barnes, C. E. Synthesis and Characterization of Ordered Mesoporous Anion-Exchange Inorganic/Organic Hybrid Resins for Radionuclide Separation. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2000**, *39* (2), 550-553, DOI: 10.1021/ie990597v.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (40) Bouchal, R.; Miletto, I.; Thach, U. D.; Prelot, B.; Berlier, G.; Hesemann, P. Ionosilicas as efficient adsorbents for the separation of diclofenac and sulindac from aqueous media. *New Journal of Chemistry* **2016**, *40* (9), 7620-7626, DOI: 10.1039/C6NJ01473A.
- (41) Bouchal, R.; Daurat, M.; Gary-Bobo, M.; Da Silva, A.; Lesaffre, L.; Aggad, D.; Godefroy, A.; Dieudonné, P.; Charnay, C.; Durand, J.-O.; Hesemann, P. Biocompatible Periodic Mesoporous Ionosilica Nanoparticles with Ammonium Walls: Application to Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, *9* (37), 32018-32025, DOI: 10.1021/acsami.7b07264.
- (42) Mezghrani, B.; Ali, L. M. A.; Richeter, S.; Durand, J.-O.; Hesemann, P.; Bettache, N. Periodic Mesoporous Ionosilica Nanoparticles for Green Light Photodynamic Therapy and Photochemical Internalization of siRNA. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2021**, *13* (25), 29325-29339, DOI: 10.1021/acsami.1c05848.
- (43) Dougherty, T. J.; Grindey, G. B.; Fiel, R.; Weishaupt, K. R.; Boyle, D. G. Photoradiation Therapy. II. Cure of Animal Tumors With Hematoporphyrin and Light23. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **1975**, *55* (1), 115-121, DOI: 10.1093/jnci/55.1.115.
- (44) dos Santos, A. F.; de Almeida, D. R. Q.; Terra, L. F.; Baptista, M. S.; Labriola, L. Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* **2019**, *5*, 25, DOI: 10.20517/2394-4722.2018.83.
- (45) Fan, W.; Huang, P.; Chen, X. Overcoming the Achilles' heel of photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews* **2016**, *45* (23), 6488-6519, DOI: 10.1039/C6CS00616G.
- (46) Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kędzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlińska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *106*, 1098-1107, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>.
- (47) Lucky, S. S.; Soo, K. C.; Zhang, Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (4), 1990-2042, DOI: 10.1021/cr5004198.
- (48) Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2004**, *1* (4), 279-293, DOI: [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4).
- (49) Ding, H.; Yu, H.; Dong, Y.; Tian, R.; Huang, G.; Boothman, D. A.; Sumer, B. D.; Gao, J. Photoactivation switch from type II to type I reactions by electron-rich micelles for improved photodynamic therapy of cancer cells under hypoxia. *Journal of Controlled Release* **2011**, *156* (3), 276-280, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.019>.
- (50) Espinoza, C.; Trigos, Á.; Medina, M. E. Theoretical Study on the Photosensitizer Mechanism of Phenalenone in Aqueous and Lipid Media. *The Journal of Physical Chemistry A* **2016**, *120* (31), 6103-6110, DOI: 10.1021/acs.jpca.6b03615.
- (51) Pineiro, M.; Pereira, M. M.; Formosinho, S. J.; Arnaut, L. G. New Halogenated Phenylbacteriochlorins and Their Efficiency in Singlet-Oxygen Sensitization. *The Journal of Physical Chemistry A* **2002**, *106* (15), 3787-3795, DOI: 10.1021/jp013678p.
- (52) Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer* **2003**, *3* (5), 380-387, DOI: 10.1038/nrc1071.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (53) Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbek, M.; Moan, J.; Peng, Q. Photodynamic Therapy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **1998**, *90* (12), 889-905, DOI: 10.1093/jnci/90.12.889.
- (54) Henderson, B. W.; Dougherty, T. J. HOW DOES PHOTODYNAMIC THERAPY WORK? *Photochemistry and Photobiology* **1992**, *55* (1), 145-157, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x>.
- (55) Oleinick, N. L.; Morris, R. L.; Belichenko, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2002**, *1* (1), 1-21, DOI: 10.1039/B108586G.
- (56) Dąbrowski, J. M. Chapter Nine - Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation. In *Advances in Inorganic Chemistry*; van Eldik, R.; Hubbard, C. D., Eds.; Academic Press: 2017; pp 343-394.
- (57) Niedre, M.; Patterson, M. S.; Wilson, B. C. Direct Near-infrared Luminescence Detection of Singlet Oxygen Generated by Photodynamic Therapy in Cells In Vitro and Tissues In Vivo. *Photochemistry and Photobiology* **2002**, *75* (4), 382-391, DOI: [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0750382DNILDO2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750382DNILDO2.0.CO2).
- (58) Moan, J.; Berg, K. THE PHOTODEGRADATION OF PORPHYRINS IN CELLS CAN BE USED TO ESTIMATE THE LIFETIME OF SINGLET OXYGEN. *Photochemistry and Photobiology* **1991**, *53* (4), 549-553, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1991.tb03669.x>.
- (59) Buytaert, E.; Dewaele, M.; Agostinis, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2007**, *1776* (1), 86-107, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.07.001>.
- (60) Mroz, P.; Yaroslavsky, A.; Kharkwal, G. B.; Hamblin, M. R. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers* **2011**, *3* (2), 2516-2539.
- (61) Baluk, P.; Hashizume, H.; McDonald, D. M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* **2005**, *15* (1), 102-111, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.12.005>.
- (62) Abels, C. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochemical & Photobiological Sciences* **2004**, *3* (8), 765-771, DOI: 10.1039/B314241H.
- (63) Chen, B.; Pogue, B. W.; Hoopes, P. J.; Hasan, T. Vascular and Cellular Targeting for Photodynamic Therapy. **2006**, *16* (4), 279-306, DOI: 10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v16.i4.10.
- (64) Dolmans, D. E.; Kadambi, A.; Hill, J. S.; Waters, C. A.; Robinson, B. C.; Walker, J. P.; Fukumura, D.; Jain, R. K. Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy. *Cancer research* **2002**, *62* (7), 2151-6.
- (65) Huang, Z.; Xu, H.; Meyers, A. D.; Musani, A. I.; Wang, L.; Tagg, R.; Barqawi, A. B.; Chen, Y. K. Photodynamic Therapy for Treatment of Solid Tumors — Potential and Technical Challenges. *Technology in Cancer Research & Treatment* **2008**, *7* (4), 309-320, DOI: 10.1177/153303460800700405.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (66) Nowis, D.; Stokłosa, T.; Legat, M.; Issat, T.; Jakóbsiak, M.; Gołąb, J. The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2005**, *2* (4), 283-298, DOI: [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00098-0](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00098-0).
- (67) van Duijnhoven, F. H.; Aalbers, R. I. J. M.; Rovers, J. P.; Terpstra, O. T.; Kuppen, P. J. K. The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer, a literature review. *Immunobiology* **2003**, *207* (2), 105-113, DOI: <https://doi.org/10.1078/0171-2985-00221>.
- (68) Allison, R. R.; Downie, G. H.; Cuenca, R.; Hu, X.-H.; Childs, C. J. H.; Sibata, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2004**, *1* (1), 27-42, DOI: [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00007-9).
- (69) Zhang, J.; Jiang, C.; Figueiró Longo, J. P.; Azevedo, R. B.; Zhang, H.; Muehlmann, L. A. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2018**, *8* (2), 137-146, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.09.003>.
- (70) Hudson, R.; Carcenac, M.; Smith, K.; Madden, L.; Clarke, O. J.; Pèlegri, A.; Greenman, J.; Boyle, R. W. The development and characterisation of porphyrin isothiocyanate–monoclonal antibody conjugates for photoimmunotherapy. *British Journal of Cancer* **2005**, *92* (8), 1442-1449, DOI: [10.1038/sj.bjc.6602517](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602517).
- (71) Malatesti, N.; Smith, K.; Savoie, H.; Greenman, J.; Boyle, R. W. Synthesis and in vitro investigation of cationic 5,15-diphenyl porphyrin-monoclonal antibody conjugates as targeted photodynamic sensitizers. *International journal of oncology* **2006**, *28* (6), 1561-9.
- (72) Staneloudi, C.; Smith, K. A.; Hudson, R.; Malatesti, N.; Savoie, H.; Boyle, R. W.; Greenman, J. Development and characterization of novel photosensitizer : scFv conjugates for use in photodynamic therapy of cancer. *Immunology* **2007**, *120* (4), 512-517, DOI: [10.1111/j.1365-2567.2006.02522.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02522.x).
- (73) Taquet, J. P.; Frochot, C.; Manneville, V.; Barberi-Heyob, M. Phthalocyanines covalently bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy. *Current medicinal chemistry* **2007**, *14* (15), 1673-87, DOI: [10.2174/092986707780830970](https://doi.org/10.2174/092986707780830970).
- (74) Baydoun, M.; Moralès, O.; Frochot, C.; Ludovic, C.; Leroux, B.; Thecua, E.; Ziane, L.; Grabarz, A.; Kumar, A.; de Schutter, C.; Collinet, P.; Azais, H.; Mordon, S.; Delhem, N. Photodynamic Therapy Using a New Folate Receptor-Targeted Photosensitizer on Peritoneal Ovarian Cancer Cells Induces the Release of Extracellular Vesicles with Immunoactivating Properties. *Journal of Clinical Medicine* **2020**, *9* (4), DOI: [10.3390/jcm9041185](https://doi.org/10.3390/jcm9041185).
- (75) Gary-Bobo, M.; Mir, Y.; Rouxel, C.; Brevet, D.; Basile, I.; Maynadier, M.; Vaillant, O.; Mongin, O.; Blanchard-Desce, M.; Morère, A.; Garcia, M.; Durand, J.-O.; Raehm, L. Mannose-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Efficient Two-Photon Photodynamic Therapy of Solid Tumors. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (48), 11425-11429, DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201104765>.
- (76) Lagopati, N.; Kitsiou, P. V.; Kontos, A. I.; Venieratos, P.; Kotsopoulou, E.; Kontos, A. G.; Dionysiou, D. D.; Pispas, S.; Tsilibary, E. C.; Falaras, P. Photo-induced treatment of breast epithelial cancer cells using nanostructured titanium dioxide solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2010**, *214* (2), 215-223, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2010.06.031>.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (77) Rozhkova, E. A.; Ulasov, I.; Lai, B.; Dimitrijevic, N. M.; Lesniak, M. S.; Rajh, T. A High-Performance Nanobio Photocatalyst for Targeted Brain Cancer Therapy. *Nano Letters* **2009**, *9* (9), 3337-3342, DOI: 10.1021/nl901610f.
- (78) Wang, C.; Cao, S.; Tie, X.; Qiu, B.; Wu, A.; Zheng, Z. Induction of cytotoxicity by photoexcitation of TiO<sub>2</sub> can prolong survival in glioma-bearing mice. *Molecular Biology Reports* **2011**, *38* (1), 523-530, DOI: 10.1007/s11033-010-0136-9.
- (79) Samia, A. C. S.; Chen, X.; Burda, C. Semiconductor Quantum Dots for Photodynamic Therapy. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (51), 15736-15737, DOI: 10.1021/ja0386905.
- (80) Vankayala, R.; Sagadevan, A.; Vijayaraghavan, P.; Kuo, C.-L.; Hwang, K. C. Metal Nanoparticles Sensitize the Formation of Singlet Oxygen. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (45), 10640-10644, DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201105236>.
- (81) Jain, P. K.; Eustis, S.; El-Sayed, M. A. Plasmon Coupling in Nanorod Assemblies: Optical Absorption, Discrete Dipole Approximation Simulation, and Exciton-Coupling Model. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (37), 18243-18253, DOI: 10.1021/jp063879z.
- (82) Jańczyk, A.; Krakowska, E.; Stochel, G.; Macyk, W. Singlet Oxygen Photogeneration at Surface Modified Titanium Dioxide. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (49), 15574-15575, DOI: 10.1021/ja065970m.
- (83) Maiti, N. C.; Mazumdar, S.; Periasamy, N. J- and H-Aggregates of Porphyrins with Surfactants: Fluorescence, Stopped Flow and Electron Microscopy Studies. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **1998**, *02* (05), 369-376, DOI: 10.1002/(SICI)1099-1409(199807/10)2:4/5<369::AID-JPP92>3.0.CO;2-3.
- (84) Safar Sajadi, S. M.; Khoei, S. The simultaneous role of porphyrins' H- and J- aggregates and host-guest chemistry on the fabrication of reversible Dextran-PMMA polymersome. *Scientific Reports* **2021**, *11* (1), 2832, DOI: 10.1038/s41598-021-82256-7.
- (85) Vijayaraghavan, P.; Liu, C.-H.; Vankayala, R.; Chiang, C.-S.; Hwang, K. C. Designing Multi-Branched Gold Nanoechinus for NIR Light Activated Dual Modal Photodynamic and Photothermal Therapy in the Second Biological Window. *Advanced Materials* **2014**, *26* (39), 6689-6695, DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.201400703>.
- (86) Denk, W.; Strickler, J. H.; Webb, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **1990**, *248* (4951), 73, DOI: 10.1126/science.2321027.
- (87) Bolze, F.; Jenni, S.; Sour, A.; Heitz, V. Molecular photosensitisers for two-photon photodynamic therapy. *Chemical Communications* **2017**, *53* (96), 12857-12877, DOI: 10.1039/C7CC06133A.
- (88) Starkey, J. R.; Rebane, A. K.; Drobizhev, M. A.; Meng, F.; Gong, A.; Elliott, A.; McInerney, K.; Spangler, C. W. New two-photon activated photodynamic therapy sensitizers induce xenograft tumor regressions after near-IR laser treatment through the body of the host mouse. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2008**, *14* (20), 6564-73, DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-07-4162.
- (89) Huang, X.; Pallaoro, A.; Braun, G. B.; Morales, D. P.; Ogunyankin, M. O.; Zasadzinski, J.; Reich, N. O. Modular Plasmonic Nanocarriers for Efficient and Targeted Delivery of Cancer-Therapeutic siRNA. *Nano Letters* **2014**, *14* (4), 2046-2051, DOI: 10.1021/nl500214e.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (90) Weissleder, R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nature Biotechnology* **2001**, *19* (4), 316-317, DOI: 10.1038/86684.
- (91) DURAND, J.-O.; RAEHM, L. Nanoparticules mésoporeuses de silice (MSN) et applications biologiques. *Techniques de l'ingénieur* **2009**, Réf : NM4050 v1.
- (92) Biswas, S.; Ahn, H.-Y.; Bondar, M. V.; Belfield, K. D. Two-Photon Absorption Enhancement of Polymer-Templated Porphyrin-Based J-Aggregates. *Langmuir* **2012**, *28* (2), 1515-1522, DOI: 10.1021/la203883k.
- (93) Veenhuizen, R. B.; Ruevekamp, M. C.; Oppelaar, H.; Ransdorp, B.; van de Vijver, M.; Helmerhorst, T. J. M.; Kenemans, P.; Stewart, F. A. Intraperitoneal Photodynamic Therapy: Comparison of Red and Green Light Distribution and Toxicity. *Photochemistry and Photobiology* **1997**, *66* (3), 389-395, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb03163.x>.
- (94) Foster, T. H.; Gibson, S. L.; Raubertas, R. F. Response of Photofrin-sensitised mesothelioma xenografts to photodynamic therapy with 514 nm light. *Br J Cancer* **1996**, *73* (8), 933-6, DOI: 10.1038/bjc.1996.184.
- (95) Maytin, E. V.; Hasan, T. Vitamin D and Other Differentiation-promoting Agents as Neoadjuvants for Photodynamic Therapy of Cancer. *Photochemistry and Photobiology* **2020**, *96* (3), 529-538, DOI: <https://doi.org/10.1111/php.13230>.
- (96) Ledley, F. D. Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Human gene therapy* **1995**, *6* (9), 1129-44, DOI: 10.1089/hum.1995.6.9-1129.
- (97) Verma, I. M.; Naldini, L.; Kafri, T.; Miyoshi, H.; Takahashi, M.; Blömer, U.; Somia, N.; Wang, L.; Gage, F. H. In *Gene Therapy: Promises, Problems and Prospects*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2000; pp 147-157.
- (98) Ginn, S. L.; Amaya, A. K.; Alexander, I. E.; Edelstein, M.; Abedi, M. R. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *The Journal of Gene Medicine* **2018**, *20* (5), e3015, DOI: <https://doi.org/10.1002/jgm.3015>.
- (99) Williams, P. D.; Kingston, P. A. Plasmid-mediated gene therapy for cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* **2011**, *91* (4), 565-576, DOI: 10.1093/cvr/cvr197.
- (100) Sharma, B.; Ma, W.; Adjei, I. M.; Panyam, J.; Dimitrijevic, S.; Labhasetwar, V. Nanoparticle-mediated p53 gene therapy for tumor inhibition. *Drug Delivery and Translational Research* **2011**, *1* (1), 43-52, DOI: 10.1007/s13346-010-0008-9.
- (101) Kim, C. K.; Choi, E. J.; Choi, S. H.; Park, J. S.; Haider, K. H.; Ahn, W. S. Enhanced p53 gene transfer to human ovarian cancer cells using the cationic nonviral vector, DDC. *Gynecologic oncology* **2003**, *90* (2), 265-72, DOI: 10.1016/s0090-8258(03)00248-8.
- (102) Cytokine Gene Therapy for Cancer with Naked DNA. *Molecular Urology* **2000**, *4* (2), 47-50, DOI: 10.1089/10915360050138576.
- (103) Kircheis, R.; Ostermann, E.; Wolschek, M. F.; Lichtenberger, C.; Magin-Lachmann, C.; Wightman, L.; Kursu, M.; Wagner, E. Tumor-targeted gene delivery of tumor necrosis factor- $\alpha$  induces tumor necrosis and tumor regression without systemic toxicity. *Cancer Gene Therapy* **2002**, *9* (8), 673-680, DOI: 10.1038/sj.cgt.7700487.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (104) Wang, J.; Lu, X. X.; Chen, D. Z.; Li, S. F.; Zhang, L. S. Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology* **2004**, *10* (3), 400-3, DOI: 10.3748/wjg.v10.i3.400.
- (105) Shirakawa, T.; Terao, S.; Hinata, N.; Tanaka, K.; Takenaka, A.; Hara, I.; Sugimura, K.; Matsuo, M.; Hamada, K.; Fuji, K.; Okegawa, T.; Higashihara, E.; Gardner, T. A.; Kao, C.; Chung, L. W.; Kamidono, S.; Fujisawa, M.; Gotoh, A. Long-term outcome of phase I/II clinical trial of Ad-OC-TK/VAL gene therapy for hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Human gene therapy* **2007**, *18* (12), 1225-32, DOI: 10.1089/hum.2007.074.
- (106) Voges, J.; Reszka, R.; Gossmann, A.; Dittmar, C.; Richter, R.; Garlip, G.; Kracht, L.; Coenen, H. H.; Sturm, V.; Wienhard, K.; Heiss, W.-D.; Jacobs, A. H. Imaging-guided convection-enhanced delivery and gene therapy of glioblastoma. *Annals of Neurology* **2003**, *54* (4), 479-487, DOI: <https://doi.org/10.1002/ana.10688>.
- (107) Anassi, E.; Ndefo, U. A. Sipuleucel-T (provenge) injection: the first immunotherapy agent (vaccine) for hormone-refractory prostate cancer. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* **2011**, *36* (4), 197-202.
- (108) Lopes, A.; Vandermeulen, G.; Pr eat, V. Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **2019**, *38* (1), 146, DOI: 10.1186/s13046-019-1154-7.
- (109) Conry, R. M.; LoBuglio, A. F.; Wright, M.; Sumerel, L.; Pike, M. J.; Johanning, F.; Benjamin, R.; Lu, D.; Curiel, D. T. Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer research* **1995**, *55* (7), 1397-400.
- (110) Beck, J. D.; Reidenbach, D.; Salomon, N.; Sahin, U.; T ureci,  .; Vormehr, M.; Kranz, L. M. mRNA therapeutics in cancer immunotherapy. *Molecular Cancer* **2021**, *20* (1), 69, DOI: 10.1186/s12943-021-01348-0.
- (111) Kranz, L. M.; Diken, M.; Haas, H.; Kreiter, S.; Loquai, C.; Reuter, K. C.; Meng, M.; Fritz, D.; Vascotto, F.; Hefesha, H.; Grunwitz, C.; Vormehr, M.; H usemann, Y.; Selmi, A.; Kuhn, A. N.; Buck, J.; Derhovanessian, E.; Rae, R.; Attig, S.; Diekmann, J.; Jabulowsky, R. A.; Heesch, S.; Hassel, J.; Langguth, P.; Grabbe, S.; Huber, C.; T ureci,  .; Sahin, U. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature* **2016**, *534* (7607), 396-401, DOI: 10.1038/nature18300.
- (112) Crooke, S. T.; Baker, B. F.; Crooke, R. M.; Liang, X.-h. Antisense technology: an overview and prospectus. *Nature Reviews Drug Discovery* **2021**, *20* (6), 427-453, DOI: 10.1038/s41573-021-00162-z.
- (113) Zielinski, R.; Chi, K. N. Custirsen (OGX-011): a second-generation antisense inhibitor of clusterin in development for the treatment of prostate cancer. *Future oncology (London, England)* **2012**, *8* (10), 1239-51, DOI: 10.2217/fon.12.129.
- (114) Weng, D. E.; Usman, N. Angiozyme: A Novel angiogenesis inhibitor. *Current Oncology Reports* **2001**, *3* (2), 141-146, DOI: 10.1007/s11912-001-0014-7.
- (115) Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **2001**, *411* (6836), 494-498, DOI: 10.1038/35078107.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (116) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**, *391* (6669), 806-811, DOI: 10.1038/35888.
- (117) Alshaer, W.; Zureigat, H.; Al Karaki, A.; Al-Kadash, A.; Gharaibeh, L.; Hatmal, M. m. M.; Aljabali, A. A. A.; Awidi, A. siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *European Journal of Pharmacology* **2021**, *905*, 174178, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174178>.
- (118) Ashrafizadeh, M.; Zarrabi, A.; Hushmandi, K.; Hashemi, F.; Rahmani Moghadam, E.; Raei, M.; Kalantari, M.; Tavakol, S.; Mohammadinejad, R.; Najafi, M.; Tay, F. R.; Makvandi, P. Progress in Natural Compounds/siRNA Co-delivery Employing Nanovehicles for Cancer Therapy. *ACS Combinatorial Science* **2020**, *22* (12), 669-700, DOI: 10.1021/acscombsci.0c00099.
- (119) Hannon, G. J. RNA interference. *Nature* **2002**, *418* (6894), 244-251, DOI: 10.1038/418244a.
- (120) Kanasty, R.; Dorkin, J. R.; Vegas, A.; Anderson, D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature Materials* **2013**, *12* (11), 967-977, DOI: 10.1038/nmat3765.
- (121) Hu, B.; Zhong, L.; Weng, Y.; Peng, L.; Huang, Y.; Zhao, Y.; Liang, X.-J. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2020**, *5* (1), 101, DOI: 10.1038/s41392-020-0207-x.
- (122) Zhang, M. M.; Bahal, R.; Rasmussen, T. P.; Manautou, J. E.; Zhong, X.-b. The growth of siRNA-based therapeutics: Updated clinical studies. *Biochemical Pharmacology* **2021**, *189*, 114432, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114432>.
- (123) Shahryari, A.; Burtscher, I.; Nazari, Z.; Lickert, H. Engineering Gene Therapy: Advances and Barriers. *Advanced Therapeutics* **2021**, *n/a* (n/a), 2100040, DOI: <https://doi.org/10.1002/adtp.202100040>.
- (124) Cho, W. G.; Albuquerque, R. J.; Kleinman, M. E.; Tarallo, V.; Greco, A.; Nozaki, M.; Green, M. G.; Baffi, J. Z.; Ambati, B. K.; De Falco, M.; Alexander, J. S.; Brunetti, A.; De Falco, S.; Ambati, J. Small interfering RNA-induced TLR3 activation inhibits blood and lymphatic vessel growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106* (17), 7137-42, DOI: 10.1073/pnas.0812317106.
- (125) Bennett, C. F. Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. *Annual review of medicine* **2019**, *70*, 307-321, DOI: 10.1146/annurev-med-041217-010829.
- (126) Geselowitz, D. A.; Neckers, L. M. Bovine serum albumin is a major oligonucleotide-binding protein found on the surface of cultured cells. *Antisense research and development* **1995**, *5* (3), 213-7, DOI: 10.1089/ard.1995.5.213.
- (127) Yu, R. Z.; Kim, T. W.; Hong, A.; Watanabe, T. A.; Gaus, H. J.; Geary, R. S. Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B-100. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2007**, *35* (3), 460-8, DOI: 10.1124/dmd.106.012401.
- (128) Marshall, W. S.; Caruthers, M. H. Phosphorodithioate DNA as a potential therapeutic drug. *Science* **1993**, *259* (5101), 1564, DOI: 10.1126/science.7681216.
- (129) Prakash, T. P.; Lima, W. F.; Murray, H. M.; Li, W.; Kinberger, G. A.; Chappell, A. E.; Gaus, H.; Seth, P. P.; Bhat, B.; Crooke, S. T.; Swayze, E. E. Identification of metabolically stable 5'-phosphate

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

analogs that support single-stranded siRNA activity. *Nucleic acids research* **2015**, *43* (6), 2993-3011, DOI: 10.1093/nar/gkv162.

(130) Inoue, H.; Hayase, Y.; Imura, A.; Iwai, S.; Miura, K.; Ohtsuka, E. Synthesis and hybridization studies on two complementary nona(2'-O-methyl)ribonucleotides. *Nucleic acids research* **1987**, *15* (15), 6131-6148, DOI: 10.1093/nar/15.15.6131.

(131) Janas, M. M.; Schlegel, M. K.; Harbison, C. E.; Yilmaz, V. O.; Jiang, Y.; Parmar, R.; Zlatev, I.; Castoreno, A.; Xu, H.; Shulga-Morskaya, S.; Rajeev, K. G.; Manoharan, M.; Keirstead, N. D.; Maier, M. A.; Jadhav, V. Selection of GalNAc-conjugated siRNAs with limited off-target-driven rat hepatotoxicity. *Nature Communications* **2018**, *9* (1), 723, DOI: 10.1038/s41467-018-02989-4.

(132) Anderson, B. R.; Muramatsu, H.; Jha, B. K.; Silverman, R. H.; Weissman, D.; Karikó, K. Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2'-5'-oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L. *Nucleic acids research* **2011**, *39* (21), 9329-38, DOI: 10.1093/nar/gkr586.

(133) Karikó, K.; Muramatsu, H.; Welsh, F. A.; Ludwig, J.; Kato, H.; Akira, S.; Weissman, D. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2008**, *16* (11), 1833-40, DOI: 10.1038/mt.2008.200.

(134) Kormann, M. S.; Hasenpusch, G.; Aneja, M. K.; Nica, G.; Flemmer, A. W.; Herber-Jonat, S.; Huppmann, M.; Mays, L. E.; Illenyi, M.; Schams, A.; Griese, M.; Bittmann, I.; Handgretinger, R.; Hartl, D.; Rosenecker, J.; Rudolph, C. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol* **2011**, *29* (2), 154-7, DOI: 10.1038/nbt.1733.

(135) Bono, N.; Ponti, F.; Mantovani, D.; Candiani, G. Non-Viral in Vitro Gene Delivery: It is Now Time to Set the Bar! *Pharmaceutics* **2020**, *12* (2), DOI: 10.3390/pharmaceutics12020183.

(136) Patil, S.; Gao, Y.-G.; Lin, X.; Li, Y.; Dang, K.; Tian, Y.; Zhang, W.-J.; Jiang, S.-F.; Qadir, A.; Qian, A.-R. The Development of Functional Non-Viral Vectors for Gene Delivery. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20* (21), 5491.

(137) Alasvand, N.; Urbanska, A. M.; Rahmati, M.; Saeidifar, M.; Gungor-Ozkerim, P. S.; Sefat, F.; Rajadas, J.; Mozafari, M. Chapter 13 - Therapeutic Nanoparticles for Targeted Delivery of Anticancer Drugs. In *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*; Grumezescu, A. M., Ed.; Elsevier: 2017; pp 245-259.

(138) Jasim, A.; Abdelghany, S.; Greish, K. Chapter 2 - Current Update on the Role of Enhanced Permeability and Retention Effect in Cancer Nanomedicine. In *Nanotechnology-Based Approaches for Targeting and Delivery of Drugs and Genes*; Mishra, V.; Kesharwani, P.; Mohd Amin, M. C. I.; Iyer, A., Eds.; Academic Press: 2017; pp 62-109.

(139) Shukla, T.; Upmanyu, N.; Pandey, S. P.; Sudheesh, M. S. Chapter 14 - Site-specific drug delivery, targeting, and gene therapy. In *Nanoarchitectonics in Biomedicine*; Grumezescu, A. M., Ed.; William Andrew Publishing: 2019; pp 473-505.

(140) Stylianopoulos, T.; Wong, C.; Bawendi, M. G.; Jain, R. K.; Fukumura, D. Multistage nanoparticles for improved delivery into tumor tissue. *Methods in enzymology* **2012**, *508*, 109-30, DOI: 10.1016/b978-0-12-391860-4.00006-9.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (141) Shao, L.; Kahraman, N.; Yan, G.; Wang, J.; Ozpolat, B.; Ittmann, M. Targeting the TMPRSS2/ERG fusion mRNA using liposomal nanovectors enhances docetaxel treatment in prostate cancer. *The Prostate* **2020**, *80* (1), 65-73, DOI: 10.1002/pros.23918.
- (142) Zhang, W.; Xu, W.; Lan, Y.; He, X.; Liu, K.; Liang, Y. Antitumor effect of hyaluronic-acid-modified chitosan nanoparticles loaded with siRNA for targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Int J Nanomedicine* **2019**, *14*, 5287-5301, DOI: 10.2147/IJN.S203113.
- (143) Zhupanyn, P.; Ewe, A.; Büch, T.; Malek, A.; Rademacher, P.; Müller, C.; Reinert, A.; Jaimes, Y.; Aigner, A. Extracellular vesicle (ECV)-modified polyethylenimine (PEI) complexes for enhanced siRNA delivery in vitro and in vivo. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2020**, *319*, 63-76, DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.12.032.
- (144) Mauriello Jimenez, C.; Aggad, D.; Croissant, J. G.; Tresfield, K.; Laurencin, D.; Berthomieu, D.; Cubedo, N.; Rossel, M.; Alsaiari, S.; Anjum, D. H.; Sougrat, R.; Roldan-Gutierrez, M. A.; Richeter, S.; Oliviero, E.; Raehm, L.; Charnay, C.; Cattoën, X.; Clément, S.; Wong Chi Man, M.; Maynadier, M.; Chaleix, V.; Sol, V.; Garcia, M.; Gary-Bobo, M.; Khashab, N. M.; Bettache, N.; Durand, J.-O. Porous Porphyrin-Based Organosilica Nanoparticles for NIR Two-Photon Photodynamic Therapy and Gene Delivery in Zebrafish. *Advanced Functional Materials* **2018**, *28* (21), 1800235, DOI: <https://doi.org/10.1002/adfm.201800235>.
- (145) Artiga, Á.; Serrano-Sevilla, I.; De Matteis, L.; Mitchell, S. G.; de la Fuente, J. M. Current status and future perspectives of gold nanoparticle vectors for siRNA delivery. *Journal of Materials Chemistry B* **2019**, *7* (6), 876-896, DOI: 10.1039/C8TB02484G.
- (146) Jin, L.; Wang, Q.; Chen, J.; Wang, Z.; Xin, H.; Zhang, D. Efficient Delivery of Therapeutic siRNA by Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles into Oral Cancer Cells. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (11), 615.
- (147) Huang, Y. P.; Hung, C. M.; Hsu, Y. C.; Zhong, C. Y.; Wang, W. R.; Chang, C. C.; Lee, M. J. Suppression of Breast Cancer Cell Migration by Small Interfering RNA Delivered by Polyethylenimine-Functionalized Graphene Oxide. *Nanoscale research letters* **2016**, *11* (1), 247, DOI: 10.1186/s11671-016-1463-0.
- (148) Pei, D.; Buyanova, M. Overcoming Endosomal Entrapment in Drug Delivery. *Bioconjugate Chemistry* **2019**, *30* (2), 273-283, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00778.
- (149) Wojnilowicz, M.; Glab, A.; Bertucci, A.; Caruso, F.; Cavalieri, F. Super-resolution Imaging of Proton Sponge-Triggered Rupture of Endosomes and Cytosolic Release of Small Interfering RNA. *ACS Nano* **2019**, *13* (1), 187-202, DOI: 10.1021/acsnano.8b05151.
- (150) Varkouhi, A. K.; Scholte, M.; Storm, G.; Haisma, H. J. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release* **2011**, *151* (3), 220-228, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.004>.
- (151) Martinez de Pinillos Bayona, A.; Moore, C. M.; Loizidou, M.; MacRobert, A. J.; Woodhams, J. H. Enhancing the efficacy of cytotoxic agents for cancer therapy using photochemical internalisation. *International Journal of Cancer* **2016**, *138* (5), 1049-1057, DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.29510>.
- (152) Adigbli, D. K.; MacRobert, A. J. Photochemical internalisation: the journey from basic scientific concept to the threshold of clinical application. *Current Opinion in Pharmacology* **2012**, *12* (4), 434-438, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.04.005>.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (153) Berg, K.; Weyergang, A.; Vikdal, M.; Norum, O.-J.; Selbo, P. K. Photochemical Internalization: A Novel Technology for Targeted Macromolecule Therapy. In *Photodynamic Therapy: From Theory to Application*; Abdel-Kader, M. H., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2014; pp 119-127.
- (154) Bøe, S.; Prasmickaite, L.; Engesæter, B.; Hovig, E. Light-directed delivery of nucleic acids. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2011**, *764*, 107-21, DOI: 10.1007/978-1-61779-188-8\_7.
- (155) Jerjes, W.; Theodossiou, T. A.; Hirschberg, H.; Høgset, A.; Weyergang, A.; Selbo, P. K.; Hamdoon, Z.; Hopper, C.; Berg, K. Photochemical Internalization for Intracellular Drug Delivery. From Basic Mechanisms to Clinical Research. *Journal of Clinical Medicine* **2020**, *9* (2), DOI: 10.3390/jcm9020528.
- (156) Martinez de Pinillos Bayona, A.; Woodhams, J. H.; Pye, H.; Hamoudi, R. A.; Moore, C. M.; MacRobert, A. J. Efficacy of photochemical internalisation using disulfonated chlorin and porphyrin photosensitisers: An in vitro study in 2D and 3D prostate cancer models. *Cancer Letters* **2017**, *393*, 68-75, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.02.018>.
- (157) Selbo, P. K.; Weyergang, A.; Høgset, A.; Norum, O.-J.; Berstad, M. B.; Vikdal, M.; Berg, K. Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules. *Journal of Controlled Release* **2010**, *148* (1), 2-12, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.06.008>.
- (158) Berg, K.; Selbo, P. K.; Prasmickaite, L.; Tjelle, T. E.; Sandvig, K.; Moan, J.; Gaudernack, G.; Fodstad, O.; Kjølrsrud, S.; Anholt, H.; Rodal, G. H.; Rodal, S. K.; Høgset, A. Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer research* **1999**, *59* (6), 1180-3.
- (159) Lipinski, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* **2004**, *1* (4), 337-341, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>.
- (160) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* **23** (1997) 3-25. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46* (1), 3-26, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0).
- (161) Bohley, P.; Seglen, P. O. Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* **1992**, *48* (2), 151-157, DOI: 10.1007/BF01923508.
- (162) Ehrenberg, B.; Anderson, J. L.; Foote, C. S. Kinetics and Yield of Singlet Oxygen Photosensitized by Hypericin in Organic and Biological Media. *Photochemistry and Photobiology* **1998**, *68* (2), 135-140, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1998.tb02479.x>.
- (163) Lindig, B. A.; Rodgers, M. A. J.; Schaap, A. P. Determination of the lifetime of singlet oxygen in water-d<sub>2</sub> using 9,10-anthracenedipropionic acid, a water-soluble probe. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102* (17), 5590-5593, DOI: 10.1021/ja00537a030.
- (164) Rodgers, M. A. J. TIME RESOLVED STUDIES OF 1.27 μm LUMINESCENCE FROM SINGLET OXYGEN GENERATED IN HOMOGENEOUS and MICROHETEROGENEOUS FLUIDS. *Photochemistry and Photobiology* **1983**, *37* (1), 99-103, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1983.tb04440.x>.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (165) de Bruin, K. G.; Fella, C.; Ogris, M.; Wagner, E.; Ruthardt, N.; Bräuchle, C. Dynamics of photoinduced endosomal release of polyplexes. *Journal of Controlled Release* **2008**, *130* (2), 175-182, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.06.001>.
- (166) Wan, F.-Y.; Zhang, G.-J. Enhancement of lysosomal proton permeability induced by photooxidation of membrane thiol groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2002**, *402* (2), 268-274, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00083-8).
- (167) Yao, J.; Zhang, G.-J. Loss of lysosomal integrity caused by the decrease of proton translocation in Methylene blue-mediated photosensitization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1996**, *1284* (1), 35-40, DOI: [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(96\)00105-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(96)00105-8).
- (168) Yao, J.; Zhang, G.-J. Lysosomal destabilization via increased potassium ion permeability following photodamage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1997**, *1323* (2), 334-342, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(96\)00202-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(96)00202-7).
- (169) Kerdous, R.; Heuvingh, J.; Bonneau, S. Photo-dynamic induction of oxidative stress within cholesterol-containing membranes: Shape transitions and permeabilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2011**, *1808* (12), 2965-2972, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.08.002>.
- (170) Ohtsuki, T.; Miki, S.; Kobayashi, S.; Haraguchi, T.; Nakata, E.; Hirakawa, K.; Sumita, K.; Watanabe, K.; Okazaki, S. The molecular mechanism of photochemical internalization of cell penetrating peptide-cargo-photosensitizer conjugates. *Scientific Reports* **2015**, *5* (1), 18577, DOI: [10.1038/srep18577](https://doi.org/10.1038/srep18577).
- (171) Sakharov, D. V.; Elstak, E. D. R.; Chernyak, B.; Wirtz, K. W. A. Prolonged lipid oxidation after photodynamic treatment. Study with oxidation-sensitive probe C11-BODIPY581/591. *FEBS Letters* **2005**, *579* (5), 1255-1260, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.024>.
- (172) van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008**, *9* (2), 112-124, DOI: [10.1038/nrm2330](https://doi.org/10.1038/nrm2330).
- (173) Domagala, A.; Fidy, K.; Bobrowicz, M.; Stachura, J.; Szczygiel, K.; Firczuk, M. Typical and Atypical Inducers of Lysosomal Cell Death: A Promising Anticancer Strategy. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19* (8), DOI: [10.3390/ijms19082256](https://doi.org/10.3390/ijms19082256).
- (174) Hafner Česen, M.; Pegan, K.; Špes, A.; Turk, B. Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Experimental Cell Research* **2012**, *318* (11), 1245-1251, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.03.005>.
- (175) Kessel, D. Apoptosis, Paraptosis and Autophagy: Death and Survival Pathways Associated with Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology* **2019**, *95* (1), 119-125, DOI: <https://doi.org/10.1111/php.12952>.
- (176) Repnik, U.; Stoka, V.; Turk, V.; Turk, B. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2012**, *1824* (1), 22-33, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.08.016>.
- (177) Berg, K.; Dietze, A.; Kaalhus, O.; Høgset, A. Site-Specific Drug Delivery by Photochemical Internalization Enhances the Antitumor Effect of Bleomycin. *Clinical Cancer Research* **2005**, *11* (23), 8476, DOI: [10.1158/1078-0432.CCR-05-1245](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1245).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (178) Peng, W.; Samplonius, D. F.; de Visscher, S.; Roodenburg, J. L. N.; Helfrich, W.; Witjes, M. J. H. Photochemical internalization (PCI)-mediated enhancement of bleomycin cytotoxicity by liposomal mTHPC formulations in human head and neck cancer cells. *Lasers in Surgery and Medicine* **2014**, *46* (8), 650-658, DOI: <https://doi.org/10.1002/lsm.22281>.
- (179) Prasmickaite, L.; Høgset, A.; Selbo, P. K.; Engesæter, B. Ø.; Hellum, M.; Berg, K. Photochemical disruption of endocytic vesicles before delivery of drugs: a new strategy for cancer therapy. *British Journal of Cancer* **2002**, *86* (4), 652-657, DOI: [10.1038/sj.bjc.6600138](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600138).
- (180) Lou, P. J.; Lai, P. S.; Shieh, M. J.; MacRobert, A. J.; Berg, K.; Bown, S. G. Reversal of doxorubicin resistance in breast cancer cells by photochemical internalization. *Int J Cancer* **2006**, *119* (11), 2692-8, DOI: [10.1002/ijc.22098](https://doi.org/10.1002/ijc.22098).
- (181) Lu, H.-L.; Syu, W.-J.; Nishiyama, N.; Kataoka, K.; Lai, P.-S. Dendrimer phthalocyanine-encapsulated polymeric micelle-mediated photochemical internalization extends the efficacy of photodynamic therapy and overcomes drug-resistance in vivo. *Journal of Controlled Release* **2011**, *155* (3), 458-464, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.005>.
- (182) Schindler, M.; Grabski, S.; Hoff, E.; Simon, S. M. Defective pH Regulation of Acidic Compartments in Human Breast Cancer Cells (MCF-7) Is Normalized in Adriamycin-Resistant Cells (MCF-7adr). *Biochemistry* **1996**, *35* (9), 2811-2817, DOI: [10.1021/bi952234e](https://doi.org/10.1021/bi952234e).
- (183) Ekineker, G.; Nguyen, C.; Bayır, S.; Dominguez Gil, S.; İşçi, Ü.; Daurat, M.; Godefroy, A.; Raehm, L.; Charnay, C.; Oliviero, E.; Ahsen, V.; Gary-Bobo, M.; Durand, J.-O.; Dumoulin, F. Phthalocyanine-based mesoporous organosilica nanoparticles: NIR photodynamic efficiency and siRNA photochemical internalization. *Chemical Communications* **2019**, *55* (77), 11619-11622, DOI: [10.1039/C9CC05703J](https://doi.org/10.1039/C9CC05703J).
- (184) Zhang, Z.; Jayakumar, M. K. G.; Zheng, X.; Shikha, S.; Zhang, Y.; Bansal, A.; Poon, D. J. J.; Chu, P. L.; Yeo, E. L. L.; Chua, M. L. K.; Chee, S. K.; Zhang, Y. Upconversion superballs for programmable photoactivation of therapeutics. *Nature Communications* **2019**, *10* (1), 4586, DOI: [10.1038/s41467-019-12506-w](https://doi.org/10.1038/s41467-019-12506-w).
- (185) Bøe, S.; Longva, A. S.; Hovig, E. Photochemically induced gene silencing using small interfering RNA molecules in combination with lipid carriers. *Oligonucleotides* **2007**, *17* (2), 166-73, DOI: [10.1089/oli.2007.0076](https://doi.org/10.1089/oli.2007.0076).
- (186) Bøe, S. L.; Longva, A. S.; Hovig, E. Cyclodextrin-Containing Polymer Delivery System for Light-Directed siRNA Gene Silencing. *Oligonucleotides* **2010**, *20* (4), 175-182, DOI: [10.1089/oli.2010.0230](https://doi.org/10.1089/oli.2010.0230).
- (187) Jørgensen, J. A. L.; Longva, A. S.; Hovig, E.; Bøe, S. L. Evaluation of Biodegradable Peptide Carriers for Light-Directed Targeting. *Nucleic Acid Therapeutics* **2013**, *23* (2), 131-139, DOI: [10.1089/nat.2012.0403](https://doi.org/10.1089/nat.2012.0403).
- (188) Bøe, S. L.; Jørgensen, J. A. L.; Longva, A. S.; Lavelle, T.; Sæbøe-Larssen, S.; Hovig, E. Light-Controlled Modulation of Gene Expression Using Polyamidoamine Formulations. *Nucleic Acid Therapeutics* **2013**, *23* (2), 160-165, DOI: [10.1089/nat.2012.0413](https://doi.org/10.1089/nat.2012.0413).
- (189) Oliveira, S.; Fretz, M. M.; Høgset, A.; Storm, G.; Schiffelers, R. M. Photochemical internalization enhances silencing of epidermal growth factor receptor through improved endosomal escape of siRNA. *Biochimica et biophysica acta* **2007**, *1768* (5), 1211-7, DOI: [10.1016/j.bbamem.2007.01.013](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.01.013).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (190) Raemdonck, K.; Naeye, B.; Høgset, A.; Demeester, J.; De Smedt, S. C. Prolonged gene silencing by combining siRNA nanogels and photochemical internalization. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2010**, *145* (3), 281-8, DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.04.012.
- (191) Varkouhi, A. K.; Lammers, T.; Schiffelers, R. M.; van Steenberghe, M. J.; Hennink, W. E.; Storm, G. Gene silencing activity of siRNA polyplexes based on biodegradable polymers. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **2011**, *77* (3), 450-7, DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.11.016.
- (192) Sultan, A. A.; Jerjes, W.; Berg, K.; Høgset, A.; Mosse, C. A.; Hamoudi, R.; Hamdoon, Z.; Simeon, C.; Carnell, D.; Forster, M.; Hopper, C. Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS2a)-induced photochemical internalisation of bleomycin in patients with solid malignancies: a phase 1, dose-escalation, first-in-man trial. *The Lancet Oncology* **2016**, *17* (9), 1217-1229, DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30224-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30224-8).
- (193) Shen, S.; Wu, Y.; Liu, Y.; Wu, D. High drug-loading nanomedicines: progress, current status, and prospects. *Int J Nanomedicine* **2017**, *12*, 4085-4109, DOI: 10.2147/ijn.s132780.
- (194) Ménard, M.; Meyer, F.; Parkhomenko, K.; Leuvre, C.; Francius, G.; Bégin-Colin, S.; Mertz, D. Mesoporous silica templated-albumin nanoparticles with high doxorubicin payload for drug delivery assessed with a 3-D tumor cell model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2019**, *1863* (2), 332-341, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.10.020>.
- (195) Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society* **1938**, *60* (2), 309-319, DOI: 10.1021/ja01269a023.
- (196) Barrett, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *Journal of the American Chemical Society* **1951**, *73* (1), 373-380, DOI: 10.1021/ja01145a126.
- (197) Chou, T.-C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacological Reviews* **2006**, *58* (3), 621, DOI: 10.1124/pr.58.3.10.
- (198) Strähle, U.; Scholz, S.; Geisler, R.; Greiner, P.; Hollert, H.; Rastegar, S.; Schumacher, A.; Selderslaghs, I.; Weiss, C.; Witters, H.; Braunbeck, T. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology* **2012**, *33* (2), 128-132, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.06.121>.
- (199) Lerouge, F.; Cerveau, G.; Corriu, R. J. P.; Stern, C.; Guillard, R. Self-organization of porphyrin units induced by magnetic field during sol-gel polymerization. *Chemical Communications* **2007**, (15), 1553-1555, DOI: 10.1039/B616421H.
- (200) Talamini, L.; Picchetti, P.; Ferreira, L. M.; Sitia, G.; Russo, L.; Violatto, M. B.; Travaglini, L.; Fernandez Alarcon, J.; Righelli, L.; Bigini, P.; De Cola, L. Organosilica Cages Target Hepatic Sinusoidal Endothelial Cells Avoiding Macrophage Filtering. *ACS Nano* **2021**, *15* (6), 9701-9716, DOI: 10.1021/acsnano.1c00316.
- (201) Aggarwal, P.; Hall, J. B.; McLeland, C. B.; Dobrovolskaia, M. A.; McNeil, S. E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, *61* (6), 428-437, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.009>.

(202) Mahmoudi, M.; Lynch, I.; Ejtehadi, M. R.; Monopoli, M. P.; Bombelli, F. B.; Laurent, S. Protein–Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges. *Chemical Reviews* **2011**, *111* (9), 5610-5637, DOI: 10.1021/cr100440g.

(203) Rouquerol, J.; Rouquerol, F.; Llewellyn, P.; Maurin, G.; Sing, K., Adsorption by Ordered Mesoporous Materials. In *Adsorption by Powders and Porous Solids*, 2nd ed.; Press, A., Ed. 2013; pp 529-564.

(204) Donohue, M. D.; Aranovich, G. L. Classification of Gibbs adsorption isotherms. *Advances in Colloid and Interface Science* **1998**, *76-77*, 137-152, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00044-X](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00044-X).

(205) Daurat, M.; Rahmani, S.; Bouchal, R.; Akrouf, A.; Budimir, J.; Nguyen, C.; Charnay, C.; Guari, Y.; Richeter, S.; Raehm, L.; Bettache, N.; Gary-Bobo, M.; Durand, J.-O.; Hesemann, P. Organosilica Nanoparticles for Gemcitabine Monophosphate Delivery in Cancer Cells. *ChemNanoMat* **2019**, *5* (7), 888-896, DOI: <https://doi.org/10.1002/cnma.201900202>.

(206) Laurencin, D.; Yot, P. G.; Gervais, C.; Guari, Y.; Clément, S.; Elkaim, E.; Paillet, M.; Cot, D.; Richeter, S. Synthesis, characterization and modeling of self-assembled porphyrin nanorods. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2019**, *23* (11n12), 1346-1354, DOI: 10.1142/S1088424619501451.

(207) Fagadar-Cosma, E.; Enache, C.; Vlascici, D.; Fagadar-Cosma, G.; Stadler, H.; Bazylak, G. Nanostructured Glasses Based on Hybrid Silica Materials Incorporating a New Asymmetrical Phenyl-Substituted Porphyrin. *Open Chem. Biomed. Methods J.* **2009**, *2*, 99-106.

(208) Aggad, D.; Jimenez, C. M.; Dib, S.; Croissant, J. G.; Lichon, L.; Laurencin, D.; Richeter, S.; Maynadier, M.; Alsaïari, S. K.; Boufatit, M.; Raehm, L.; Garcia, M.; Khashab, N. M.; Gary-Bobo, M.; Durand, J.-O. Gemcitabine Delivery and Photodynamic Therapy in Cancer Cells via Porphyrin-Ethylene-Based Periodic Mesoporous Organosilica Nanoparticles. *ChemNanoMat* **2018**, *4* (1), 46-51, DOI: <https://doi.org/10.1002/cnma.201700264>.

(209) Park, J.; Jiang, Q.; Feng, D.; Mao, L.; Zhou, H.-C. Size-Controlled Synthesis of Porphyrinic Metal–Organic Framework and Functionalization for Targeted Photodynamic Therapy. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138* (10), 3518-3525, DOI: 10.1021/jacs.6b00007.

(210) Liang, X.; Chen, M.; Bhattarai, P.; Hameed, S.; Dai, Z. Perfluorocarbon@Porphyrin Nanoparticles for Tumor Hypoxia Relief to Enhance Photodynamic Therapy against Liver Metastasis of Colon Cancer. *ACS Nano* **2020**, *14* (10), 13569-13583, DOI: 10.1021/acsnano.0c05617.

(211) Sun, Y.; Chen, Z. L.; Yang, X. X.; Huang, P.; Zhou, X. P.; Du, X. X. Magnetic chitosan nanoparticles as a drug delivery system for targeting photodynamic therapy. *Nanotechnology* **2009**, *20* (13), 135102, DOI: 10.1088/0957-4484/20/13/135102.

(212) Dib, S.; Aggad, D.; Mauriello Jimenez, C.; Lakrafi, A.; Hery, G.; Nguyen, C.; Durand, D.; Morère, A.; El Cheikh, K.; Sol, V.; Chaleix, V.; Dominguez Gil, S.; Bouchmella, K.; Raehm, L.; Durand, J.-O.; Boufatit, M.; Cattoën, X.; Wong Chi Man, M.; Bettache, N.; Gary-Bobo, M. Porphyrin-based bridged silsesquioxane nanoparticles for targeted two-photon photodynamic therapy of zebrafish xenografted with human tumor. *Cancer Reports* **2019**, *2* (5), e1186, DOI: <https://doi.org/10.1002/cnr2.1186>.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (213) Tu, H.-L.; Lin, Y. S.; Lin, H.-Y.; Hung, Y.; Lo, L.; Chen, Y.; Mou, C. In vitro Studies of Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Advanced Materials* **2009**, *21*, 172-177.
- (214) Qian, J.; Gharibi, A.; He, S. Colloidal mesoporous silica nanoparticles with protoporphyrin IX encapsulated for photodynamic therapy. *Journal of biomedical optics* **2009**, *14* (1), 014012, DOI: 10.1117/1.3083427.
- (215) Liang, X.; Xie, Y.; Wu, J.; Wang, J.; Petković, M.; Stepić, M.; Zhao, J.; Ma, J.; Mi, L. Functional titanium dioxide nanoparticle conjugated with phthalocyanine and folic acid as a promising photosensitizer for targeted photodynamic therapy in vitro and in vivo. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2021**, *215*, 112122, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112122>.
- (216) Zhao, B.; Yin, J. J.; Bilski, P. J.; Chignell, C. F.; Roberts, J. E.; He, Y. Y. Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. *Toxicology and applied pharmacology* **2009**, *241* (2), 163-72, DOI: 10.1016/j.taap.2009.08.010.
- (217) Huang, P.; Li, Z.; Lin, J.; Yang, D.; Gao, G.; Xu, C.; Bao, L.; Zhang, C.; Wang, K.; Song, H.; Hu, H.; Cui, D. Photosensitizer-conjugated magnetic nanoparticles for in vivo simultaneous magnetofluorescent imaging and targeting therapy. *Biomaterials* **2011**, *32* (13), 3447-3458, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.032>.
- (218) Huang, P.; Xu, C.; Lin, J.; Wang, C.; Wang, X.; Zhang, C.; Zhou, X.; Guo, S.; Cui, D. Folic Acid-conjugated Graphene Oxide loaded with Photosensitizers for Targeting Photodynamic Therapy. *Theranostics* **2011**, *1*, 240-50, DOI: 10.7150/thno/v01p0240.
- (219) Kim, J.; Cho, H. R.; Jeon, H.; Kim, D.; Song, C.; Lee, N.; Choi, S. H.; Hyeon, T. Continuous O<sub>2</sub>-Evolving MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticle-Anchored Mesoporous Silica Nanoparticles for Efficient Photodynamic Therapy in Hypoxic Cancer. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139* (32), 10992-10995, DOI: 10.1021/jacs.7b05559.
- (220) Li, J.; Guo, D.; Wang, X.; Wang, H.; Jiang, H.; Chen, B. The Photodynamic Effect of Different Size ZnO Nanoparticles on Cancer Cell Proliferation In Vitro. *Nanoscale research letters* **2010**, *5* (6), 1063, DOI: 10.1007/s11671-010-9603-4.
- (221) Chen, X.; Zhong, Z.; Xu, Z.; Chen, L.; Wang, Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radical Research* **2010**, *44* (6), 587-604, DOI: 10.3109/10715761003709802.
- (222) Wang, H.; Yang, X.; Shao, W.; Chen, S.; Xie, J.; Zhang, X.; Wang, J.; Xie, Y. Ultrathin Black Phosphorus Nanosheets for Efficient Singlet Oxygen Generation. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (35), 11376-11382, DOI: 10.1021/jacs.5b06025.
- (223) He, S.; Lamers, G. E.; Beenakker, J. W.; Cui, C.; Ghotra, V. P.; Danen, E. H.; Meijer, A. H.; Spaik, H. P.; Snaar-Jagalska, B. E. Neutrophil-mediated experimental metastasis is enhanced by VEGFR inhibition in a zebrafish xenograft model. *The Journal of pathology* **2012**, *227* (4), 431-45, DOI: 10.1002/path.4013.
- (224) Teng, Y.; Xie, X.; Walker, S.; White, D. T.; Mumm, J. S.; Cowell, J. K. Evaluating human cancer cell metastasis in zebrafish. *BMC cancer* **2013**, *13*, 453, DOI: 10.1186/1471-2407-13-453.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (225) Amatruda, J. F.; Shepard, J. L.; Stern, H. M.; Zon, L. I. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer cell* **2002**, *1* (3), 229-31, DOI: 10.1016/s1535-6108(02)00052-1.
- (226) Evensen, L.; Johansen, P. L.; Koster, G.; Zhu, K.; Herfindal, L.; Speth, M.; Fenaroli, F.; Hildahl, J.; Bagherifam, S.; Tulotta, C.; Prasmickaite, L.; Mælandsmo, G. M.; Snaar-Jagalska, E.; Griffiths, G. Zebrafish as a model system for characterization of nanoparticles against cancer. *Nanoscale* **2016**, *8* (2), 862-877, DOI: 10.1039/C5NR07289A.
- (227) Chang, C.-C.; Wu, M.; Yuan, F. Role of specific endocytic pathways in electrotransfection of cells. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* **2014**, *1*, 14058, DOI: <https://doi.org/10.1038/mtm.2014.58>.
- (228) Mao, S.; Germershaus, O.; Fischer, D.; Linn, T.; Schnepf, R.; Kissel, T. Uptake and Transport of PEG-Graft-Trimethyl-Chitosan Copolymer–Insulin Nanocomplexes by Epithelial Cells. *Pharmaceutical Research* **2005**, *22* (12), 2058-2068, DOI: 10.1007/s11095-005-8175-y.
- (229) Kanasty, R. L.; Whitehead, K. A.; Vegas, A. J.; Anderson, D. G. Action and Reaction: The Biological Response to siRNA and Its Delivery Vehicles. *Molecular Therapy* **2012**, *20* (3), 513-524, DOI: <https://doi.org/10.1038/mt.2011.294>.
- (230) Li, K.; Zhang, Y.; Hussain, A.; Weng, Y.; Huang, Y. Progress of Photodynamic and RNAi Combination Therapy in Cancer Treatment. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2021**, DOI: 10.1021/acsbomaterials.1c00765.
- (231) Cao, Y.; Meng, X.; Wang, D.; Zhang, K.; Dai, W.; Dong, H.; Zhang, X. Intelligent MnO<sub>2</sub>/Cu<sub>2</sub>-xS for Multimode Imaging Diagnostic and Advanced Single-Laser Irradiated Photothermal/Photodynamic Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2018**, *10* (21), 17732-17741, DOI: 10.1021/acsaami.8b05050.
- (232) Luan, X.; Guan, Y.-Y.; Liu, H.-J.; Lu, Q.; Zhao, M.; Sun, D.; Lovell, J. F.; Sun, P.; Chen, H.-Z.; Fang, C. A Tumor Vascular-Targeted Interlocking Trimodal Nanosystem That Induces and Exploits Hypoxia. *Advanced Science* **2018**, *5* (8), 1800034, DOI: <https://doi.org/10.1002/adv.201800034>.
- (233) Sun, S.; Xu, Y.; Fu, P.; Chen, M.; Sun, S.; Zhao, R.; Wang, J.; Liang, X.; Wang, S. Ultrasound-targeted photodynamic and gene dual therapy for effectively inhibiting triple negative breast cancer by cationic porphyrin lipid microbubbles loaded with HIF1 $\alpha$ -siRNA. *Nanoscale* **2018**, *10* (42), 19945-19956, DOI: 10.1039/C8NR03074J.
- (234) Zhang, M.; Weng, Y.; Cao, Z.; Guo, S.; Hu, B.; Lu, M.; Guo, W.; Yang, T.; Li, C.; Yang, X.; Huang, Y. ROS-Activatable siRNA-Engineered Polyplex for NIR-Triggered Synergistic Cancer Treatment. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2020**, *12* (29), 32289-32300, DOI: 10.1021/acsaami.0c06614.
- (235) Wufuer, R.; Ma, H.-X.; Luo, M.-Y.; Xu, K.-Y.; Kang, L. Downregulation of Rac1/PAK1/LIMK1/cofilin signaling pathway in colon cancer SW620 cells treated with Chlorin e<sub>6</sub> photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2021**, *33*, 102143, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102143>.
- (236) Shi, S.; Wang, Y.; Wang, B.; Chen, Q.; Wan, G.; Yang, X.; Zhang, J.; Zhang, L.; Li, C.; Wang, Y. Homologous-targeting biomimetic nanoparticles for photothermal therapy and Nrf2-siRNA amplified photodynamic therapy against oral tongue squamous cell carcinoma. *Chemical Engineering Journal* **2020**, *388*, 124268, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124268>.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (237) Lim, M. S. H.; Nishiyama, Y.; Ohtsuki, T.; Watanabe, K.; Kobuchi, H.; Kobayashi, K.; Matsuura, E. Lactosome-Conjugated siRNA Nanoparticles for Photo-Enhanced Gene Silencing in Cancer Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2021**, *110* (4), 1788-1798, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.01.026>.
- (238) Fan, H.; Zhang, L.; Hu, X.; Zhao, Z.; Bai, H.; Fu, X.; Yan, G.; Liang, L.-H.; Zhang, X.-B.; Tan, W. An MTH1-targeted nanosystem for enhanced PDT via improving cellular sensitivity to reactive oxygen species. *Chemical Communications* **2018**, *54* (34), 4310-4313, DOI: [10.1039/C8CC01841C](https://doi.org/10.1039/C8CC01841C).
- (239) Chen, L.; Chen, C.; Chen, W.; Li, K.; Chen, X.; Tang, X.; Xie, G.; Luo, X.; Wang, X.; Liang, H.; Yu, S. Biodegradable Black Phosphorus Nanosheets Mediate Specific Delivery of hTERT siRNA for Synergistic Cancer Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2018**, *10* (25), 21137-21148, DOI: [10.1021/acsami.8b04807](https://doi.org/10.1021/acsami.8b04807).
- (240) Lin, X.; Wu, M.; Li, M.; Cai, Z.; Sun, H.; Tan, X.; Li, J.; Zeng, Y.; Liu, X.; Liu, J. Photo-responsive hollow silica nanoparticles for light-triggered genetic and photodynamic synergistic therapy. *Acta Biomaterialia* **2018**, *76*, 178-192, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.007>.
- (241) Lan, G.; Ni, K.; Xu, Z.; Veroneau, S. S.; Song, Y.; Lin, W. Nanoscale Metal–Organic Framework Overcomes Hypoxia for Photodynamic Therapy Primed Cancer Immunotherapy. *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140* (17), 5670-5673, DOI: [10.1021/jacs.8b01072](https://doi.org/10.1021/jacs.8b01072).
- (242) Liu, Y.; Pan, Y.; Cao, W.; Xia, F.; Liu, B.; Niu, J.; Alfranca, G.; Sun, X.; Ma, L.; Fuente, J. M. d. I.; Song, J.; Ni, J.; Cui, D. A tumor microenvironment responsive biodegradable CaCO<sub>3</sub>/MnO<sub>2</sub>- based nanoplatform for the enhanced photodynamic therapy and improved PD-L1 immunotherapy. *Theranostics* **2019**, *9* (23), 6867-6884, DOI: [10.7150/thno.37586](https://doi.org/10.7150/thno.37586).
- (243) Slowing, I. I.; Vivero-Escoto, J. L.; Wu, C.-W.; Lin, V. S. Y. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60* (11), 1278-1288, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.012>.
- (244) Tarn, D.; Ashley, C. E.; Xue, M.; Carnes, E. C.; Zink, J. I.; Brinker, C. J. Mesoporous Silica Nanoparticle Nanocarriers: Biofunctionality and Biocompatibility. *Accounts of Chemical Research* **2013**, *46* (3), 792-801, DOI: [10.1021/ar3000986](https://doi.org/10.1021/ar3000986).
- (245) Vallet-Regi, M.; Rámila, A.; del Real, R. P.; Pérez-Pariente, J. A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. *Chemistry of Materials* **2001**, *13* (2), 308-311, DOI: [10.1021/cm0011559](https://doi.org/10.1021/cm0011559).
- (246) Wu, J.; Zhu, Y. J.; Cao, S. W.; Chen, F. Hierachically nanostructured mesoporous spheres of calcium silicate hydrate: surfactant-free sonochemical synthesis and drug-delivery system with ultrahigh drug-loading capacity. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **2010**, *22* (6), 749-53, DOI: [10.1002/adma.200903020](https://doi.org/10.1002/adma.200903020).
- (247) Zhu, Y. J.; Guo, X. X.; Sham, T. K. Calcium silicate-based drug delivery systems. *Expert opinion on drug delivery* **2017**, *14* (2), 215-228, DOI: [10.1080/17425247.2016.1214566](https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1214566).
- (248) Zhu, Y. J.; Sham, T. K. The potential of calcium silicate hydrate as a carrier of ibuprofen. *Expert opinion on drug delivery* **2014**, *11* (9), 1337-42, DOI: [10.1517/17425247.2014.923399](https://doi.org/10.1517/17425247.2014.923399).
- (249) Bigham, A.; Hassanzadeh-Tabrizi, S. A.; Rafienia, M.; Salehi, H. Ordered mesoporous magnesium silicate with uniform nanochannels as a drug delivery system: The effect of calcination

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

temperature on drug delivery rate. *Ceramics International* **2016**, *42* (15), 17185-17191, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.08.009>.

(250) Sun, T.-W.; Zhu, Y.-J.; Qi, C.; Chen, F.; Jiang, Y.-Y.; Zhang, Y.-G.; Wu, J.; Wu, C. Templated solvothermal synthesis of magnesium silicate hollow nanospheres with ultrahigh specific surface area and their application in high-performance protein adsorption and drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B* **2016**, *4* (19), 3257-3268, DOI: 10.1039/C5TB02632F.

(251) Wang, B.; Meng, W.; Bi, M.; Ni, Y.; Cai, Q.; Wang, J. Uniform magnesium silicate hollow spheres as high drug-loading nanocarriers for cancer therapy with low systemic toxicity. *Dalton Transactions* **2013**, *42* (24), 8918-8925, DOI: 10.1039/C3DT50659B.

(252) Gu, J.; Su, S.; Li, Y.; He, Q.; Shi, J. Hydrophilic mesoporous carbon nanoparticles as carriers for sustained release of hydrophobic anti-cancer drugs. *Chemical Communications* **2011**, *47* (7), 2101-2103, DOI: 10.1039/C0CC04598E.

(253) Wang, H.; Li, X.; Ma, Z.; Wang, D.; Wang, L.; Zhan, J.; She, L.; Yang, F. Hydrophilic mesoporous carbon nanospheres with high drug-loading efficiency for doxorubicin delivery and cancer therapy. *Int J Nanomedicine* **2016**, *11*, 1793-806, DOI: 10.2147/ijn.s103020.

(254) Zhou, L.; Dong, K.; Chen, Z.; Ren, J.; Qu, X. Near-infrared absorbing mesoporous carbon nanoparticle as an intelligent drug carrier for dual-triggered synergistic cancer therapy. *Carbon* **2015**, *82*, 479-488, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.10.091>.

(255) Li, D.; Tang, J.; Guo, J.; Wang, S.; Chaudhary, D.; Wang, C. Hollow-core magnetic colloidal nanocrystal clusters with ligand-exchanged surface modification as delivery vehicles for targeted and stimuli-responsive drug release. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2012**, *18* (51), 16517-24, DOI: 10.1002/chem.201202249.

(256) Li, D.; Tang, J.; Wei, C.; Guo, J.; Wang, S.; Chaudhary, D.; Wang, C. Doxorubicin-conjugated mesoporous magnetic colloidal nanocrystal clusters stabilized by polysaccharide as a smart anticancer drug vehicle. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2012**, *8* (17), 2690-7, DOI: 10.1002/smll.201200272.

(257) Luo, B.; Xu, S.; Luo, A.; Wang, W.-R.; Wang, S.-L.; Guo, J.; Lin, Y.; Zhao, D.-Y.; Wang, C.-C. Mesoporous Biocompatible and Acid-Degradable Magnetic Colloidal Nanocrystal Clusters with Sustainable Stability and High Hydrophobic Drug Loading Capacity. *ACS Nano* **2011**, *5* (2), 1428-1435, DOI: 10.1021/nn103213y.

(258) Sun, C.; Xu, S.; Guo, J.; Xu, K.; Wang, C. The inhibitory and apoptotic effects of docetaxel-loaded mesoporous magnetic colloidal nanocrystal clusters on bladder cancer T24 cells in vitro. *Journal of biomedical nanotechnology* **2014**, *10* (3), 455-62, DOI: 10.1166/jbn.2014.1779.

(259) Ali, L. M. A.; Mathlouthi, E.; Cahu, M.; Sene, S.; Daurat, M.; Long, J.; Guari, Y.; Salles, F.; Chopineau, J.; Devoisselle, J.-M.; Larionova, J.; Gary-Bobo, M. Synergic effect of doxorubicin release and two-photon irradiation of Mn<sup>2+</sup>-doped Prussian blue nanoparticles on cancer therapy. *RSC Advances* **2020**, *10* (5), 2646-2649, DOI: 10.1039/C9RA09133E.

(260) Cai, W.; Chu, C.-C.; Liu, G.; Wang, Y.-X. J. Metal–Organic Framework-Based Nanomedicine Platforms for Drug Delivery and Molecular Imaging. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2015**, *11* (37), 4806-4822, DOI: <https://doi.org/10.1002/smll.201500802>.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (261) Sood, A.; Arora, V.; Shah, J.; Kotnala, R. K.; Jain, T. K. Multifunctional gold coated iron oxide core-shell nanoparticles stabilized using thiolated sodium alginate for biomedical applications. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* **2017**, *80*, 274-281, DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.079.
- (262) Wu, M.; Wang, Q.; Liu, X.; Liu, J. Highly efficient loading of doxorubicin in Prussian Blue nanocages for combined photothermal/chemotherapy against hepatocellular carcinoma. *RSC Advances* **2015**, *5* (39), 30970-30980, DOI: 10.1039/C4RA16138F.
- (263) Hong, S.; Choi, D. W.; Kim, H. N.; Park, C. G.; Lee, W.; Park, H. H. Protein-Based Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (7), DOI: 10.3390/pharmaceutics12070604.
- (264) Jain, A.; Singh, S. K.; Arya, S. K.; Kundu, S. C.; Kapoor, S. Protein Nanoparticles: Promising Platforms for Drug Delivery Applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2018**, *4* (12), 3939-3961, DOI: 10.1021/acsbmaterials.8b01098.
- (265) Ren, D.; Dalmau, M.; Randall, A.; Shindel, M. M.; Baldi, P.; Wang, S. W. Biomimetic Design of Protein Nanomaterials for Hydrophobic Molecular Transport. *Adv Funct Mater* **2012**, *22* (15), 3170-3180, DOI: 10.1002/adfm.201200052.
- (266) Ren, D.; Kratz, F.; Wang, S. W. Protein nanocapsules containing doxorubicin as a pH-responsive delivery system. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2011**, *7* (8), 1051-60, DOI: 10.1002/smll.201002242.
- (267) Ahmad, N.; Ahmad, R.; Alam, M. A.; Ahmad, F. J. Enhancement of oral bioavailability of doxorubicin through surface modified biodegradable polymeric nanoparticles. *Chemistry Central Journal* **2018**, *12* (1), 65, DOI: 10.1186/s13065-018-0434-1.
- (268) Gao, J.; Liu, J.; Xie, F.; Lu, Y.; Yin, C.; Shen, X. Co-Delivery of Docetaxel and Salinomycin to Target Both Breast Cancer Cells and Stem Cells by PLGA/TPGS Nanoparticles. *Int J Nanomedicine* **2019**, *14*, 9199-9216, DOI: 10.2147/ijn.s230376.
- (269) Guo, J.; Gao, X.; Su, L.; Xia, H.; Gu, G.; Pang, Z.; Jiang, X.; Yao, L.; Chen, J.; Chen, H. Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery. *Biomaterials* **2011**, *32* (31), 8010-20, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.004.
- (270) Malinovskaya, Y.; Melnikov, P.; Baklaushev, V.; Gabashvili, A.; Osipova, N.; Mantrov, S.; Ermolenko, Y.; Maksimenko, O.; Gorshkova, M.; Balabanyan, V.; Kreuter, J.; Gelperina, S. Delivery of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles into U87 human glioblastoma cells. *International journal of pharmaceutics* **2017**, *524* (1-2), 77-90, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.03.049.
- (271) Franco, M. S.; Roque, M. C.; Oliveira, M. C. Short and Long-Term Effects of the Exposure of Breast Cancer Cell Lines to Different Ratios of Free or Co-Encapsulated Liposomal Paclitaxel and Doxorubicin. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (4), DOI: 10.3390/pharmaceutics11040178.
- (272) Fu, M.; Tang, W.; Liu, J.-J.; Gong, X.-Q.; Kong, L.; Yao, X.-M.; Jing, M.; Cai, F.-Y.; Li, X.-T.; Ju, R.-J. Combination of targeted daunorubicin liposomes and targeted emodin liposomes for treatment of invasive breast cancer. *Journal of Drug Targeting* **2020**, *28* (3), 245-258, DOI: 10.1080/1061186X.2019.1656725.
- (273) Poy, D.; Ebrahimi Shahemabadi, H.; Akbarzadeh, A.; Moradi-Sardareh, H.; Ebrahimifar, M. Carboplatin liposomal nanoparticles: Preparation, characterization, and cytotoxicity effects on lung

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

cancer in vitro environment. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2018**, 67 (6), 367-370, DOI: 10.1080/00914037.2017.1332624.

(274) Xia, T.; He, Q.; Shi, K.; Wang, Y.; Yu, Q.; Zhang, L.; Zhang, Q.; Gao, H.; Ma, L.; Liu, J. Losartan loaded liposomes improve the antitumor efficacy of liposomal paclitaxel modified with pH sensitive peptides by inhibition of collagen in breast cancer. *Pharmaceutical Development and Technology* **2018**, 23 (1), 13-21, DOI: 10.1080/10837450.2016.1265553.

(275) Anderson, M.; Moshnikova, A.; Engelman, D. M.; Reshetnyak, Y. K.; Andreev, O. A. Probe for the measurement of cell surface pH in vivo and ex vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, 113 (29), 8177, DOI: 10.1073/pnas.1608247113.

(276) Gisbert-Garzarán, M.; Manzano, M.; Vallet-Regí, M. pH-Responsive Mesoporous Silica and Carbon Nanoparticles for Drug Delivery. *Bioengineering* **2017**, 4 (1), DOI: 10.3390/bioengineering4010003.

(277) Vander Heiden Matthew, G.; Cantley Lewis, C.; Thompson Craig, B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **2009**, 324 (5930), 1029-1033, DOI: 10.1126/science.1160809.

(278) Boedtkjer, E.; Pedersen, S. F. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annual Review of Physiology* **2020**, 82 (1), 103-126, DOI: 10.1146/annurev-physiol-021119-034627.

(279) Du, W.; Hong, L.; Yao, T.; Yang, X.; He, Q.; Yang, B.; Hu, Y. Synthesis and evaluation of water-soluble docetaxel prodrugs-docetaxel esters of malic acid. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2007**, 15 (18), 6323-30, DOI: 10.1016/j.bmc.2007.04.002.

(280) Kawabata, Y.; Wada, K.; Nakatani, M.; Yamada, S.; Onoue, S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. *International journal of pharmaceutics* **2011**, 420 (1), 1-10, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.08.032.

(281) Liggins, R. T.; Burt, H. M. Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations. *Adv Drug Deliv Rev* **2002**, 54 (2), 191-202, DOI: 10.1016/s0169-409x(02)00016-9.

(282) Gad, S. C.; Sharp, K. L.; Montgomery, C.; Payne, J. D.; Goodrich, G. P. Evaluation of the toxicity of intravenous delivery of auroshell particles (gold-silica nanoshells). *International journal of toxicology* **2012**, 31 (6), 584-94, DOI: 10.1177/1091581812465969.

(283) Rastinehad, A. R.; Anastos, H.; Wajswol, E.; Winoker, J. S.; Sfakianos, J. P.; Doppalapudi, S. K.; Carrick, M. R.; Knauer, C. J.; Taouli, B.; Lewis, S. C.; Tewari, A. K.; Schwartz, J. A.; Canfield, S. E.; George, A. K.; West, J. L.; Halas, N. J. Gold nanoshell-localized photothermal ablation of prostate tumors in a clinical pilot device study. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2019**, 116 (37), 18590, DOI: 10.1073/pnas.1906929116.

(284) Wolfe, T.; Chatterjee, D.; Lee, J.; Grant, J. D.; Bhattarai, S.; Tailor, R.; Goodrich, G.; Nicolucci, P.; Krishnan, S. Targeted gold nanoparticles enhance sensitization of prostate tumors to megavoltage radiation therapy in vivo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2015**, 11 (5), 1277-1283, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.12.016>.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (285) Xie, H.; Diagaradjane, P.; Deorukhkar, A.; Goins, B.; Bao, A.; Phillips, W.; Wang, Z.; Schwartz, J.; Krishnan, S. Integrin  $\alpha\beta 3$ -targeted gold nanoshells augment tumor vasculature-specific imaging and therapy. *Int J Nanomedicine* **2011**, *6*, 259-69, DOI: 10.2147/IJN.S15479.
- (286) Libutti, S. K.; Paciotti, G. F.; Byrnes, A. A.; Alexander, H. R.; Gannon, W. E.; Walker, M.; Seidel, G. D.; Yuldasheva, N.; Tamarkin, L. Phase I and Pharmacokinetic Studies of CYT-6091, a Novel PEGylated Colloidal Gold-rhTNF Nanomedicine. *Clinical Cancer Research* **2010**, *16* (24), 6139, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0978.
- (287) Chen, F.; Ma, K.; Madajewski, B.; Zhuang, L.; Zhang, L.; Rickert, K.; Marelli, M.; Yoo, B.; Turker, M. Z.; Overholtzer, M.; Quinn, T. P.; Gonen, M.; Zanzonico, P.; Tuesca, A.; Bowen, M. A.; Norton, L.; Subramony, J. A.; Wiesner, U.; Bradbury, M. S. Ultrasmall targeted nanoparticles with engineered antibody fragments for imaging detection of HER2-overexpressing breast cancer. *Nature Communications* **2018**, *9* (1), 4141, DOI: 10.1038/s41467-018-06271-5.
- (288) Cheng, W. W. K.; Allen, T. M. Targeted delivery of anti-CD19 liposomal doxorubicin in B-cell lymphoma: A comparison of whole monoclonal antibody, Fab' fragments and single chain Fv. *Journal of Controlled Release* **2008**, *126* (1), 50-58, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.11.005>.
- (289) Nelson, A. L. Antibody fragments. *mAbs* **2010**, *2* (1), 77-83, DOI: 10.4161/mabs.2.1.10786.
- (290) Richards, D. A.; Maruani, A.; Chudasama, V. Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction. *Chemical Science* **2017**, *8* (1), 63-77, DOI: 10.1039/C6SC02403C.
- (291) Zhang, Y.; Guo, J.; Zhang, X.-L.; Li, D.-P.; Zhang, T.-T.; Gao, F.-F.; Liu, N.-F.; Sheng, X.-G. Antibody fragment-armed mesoporous silica nanoparticles for the targeted delivery of bevacizumab in ovarian cancer cells. *International journal of pharmaceutics* **2015**, *496* (2), 1026-1033, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.080>.
- (292) Chen, X.; Sun, H.; Hu, J.; Han, X.; Liu, H.; Hu, Y. Transferrin gated mesoporous silica nanoparticles for redox-responsive and targeted drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, *152*, 77-84, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.010>.
- (293) Cui, Y.; Xu, Q.; Chow, P. K.-H.; Wang, D.; Wang, C.-H. Transferrin-conjugated magnetic silica PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin and paclitaxel for brain glioma treatment. *Biomaterials* **2013**, *34* (33), 8511-8520, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.075>.
- (294) Hao, W.; Shen, Y.; Liu, D.; Shang, Y.; Zhang, J.; Xu, S.; Liu, H. Dual-pH-sensitivity and tumour targeting core-shell particles for intracellular drug delivery. *RSC Advances* **2017**, *7* (2), 851-860, DOI: 10.1039/C6RA25224A.
- (295) Saini, K.; Bandyopadhyaya, R. Transferrin-Conjugated Polymer-Coated Mesoporous Silica Nanoparticles Loaded with Gemcitabine for Killing Pancreatic Cancer Cells. *ACS Applied Nano Materials* **2020**, *3* (1), 229-240, DOI: 10.1021/acsanm.9b01921.
- (296) AbouAitah, K.; Swiderska-Sroda, A.; Farghali, A. A.; Wojnarowicz, J.; Stefanek, A.; Gierlotka, S.; Opalinska, A.; Allayeh, A. K.; Ciach, T.; Lojkowski, W. Folic acid-conjugated mesoporous silica particles as nanocarriers of natural prodrugs for cancer targeting and antioxidant action. *Oncotarget* **2018**, *9* (41).
- (297) Mishra, S.; Manna, K.; Kayal, U.; Saha, M.; Chatterjee, S.; Chandra, D.; Hara, M.; Datta, S.; Bhaumik, A.; Das Saha, K. Folic acid-conjugated magnetic mesoporous silica nanoparticles loaded

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

with quercetin: a theranostic approach for cancer management. *RSC Advances* **2020**, *10* (39), 23148-23164, DOI: 10.1039/D0RA00664E.

(298) Saroj, S.; Rajput, S. J. Etoposide encased folic acid adorned mesoporous silica nanoparticles as potent nanovehicles for enhanced prostate cancer therapy: synthesis, characterization, cellular uptake and biodistribution. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2018**, *46* (sup3), S1115-S1130, DOI: 10.1080/21691401.2018.1533843.

(299) Xu, X.; Wu, C.; Bai, A.; Liu, X.; Lv, H.; Liu, Y. Folate-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles as a Liver Tumor-Targeted Drug Delivery System to Improve the Antitumor Effect of Paclitaxel. *Journal of Nanomaterials* **2017**, *2017*, 2069685, DOI: 10.1155/2017/2069685.

(300) Yan, H.; You, Y.; Li, X.; Liu, L.; Guo, F.; Zhang, Q.; Liu, D.; Tong, Y.; Ding, S.; Wang, J. Preparation of RGD Peptide/Folate Acid Double-Targeted Mesoporous Silica Nanoparticles and Its Application in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Frontiers in Pharmacology* **2020**, *11* (898), DOI: 10.3389/fphar.2020.00898.

(301) Huang, Y.-Q.; Sun, L.-J.; Zhang, R.; Hu, J.; Liu, X.-F.; Jiang, R.-C.; Fan, Q.-L.; Wang, L.-H.; Huang, W. Hyaluronic Acid Nanoparticles Based on a Conjugated Oligomer Photosensitizer: Target-Specific Two-Photon Imaging, Redox-Sensitive Drug Delivery, and Synergistic Chemo-Photodynamic Therapy. *ACS Applied Bio Materials* **2019**, *2* (6), 2421-2434, DOI: 10.1021/acsabm.9b00130.

(302) Xu, H.; Wang, Z.; Li, Y.; Guo, Y.; Zhou, H.; Li, Y.; Wu, F.; Zhang, L.; Yang, X.; Lu, B.; Huang, Z.; Xu, W.; Xu, P. Preparation and characterization of a dual-receptor mesoporous silica nanoparticle–hyaluronic acid–RGD peptide targeting drug delivery system. *RSC Advances* **2016**, *6* (46), 40427-40435, DOI: 10.1039/C6RA03113G.

(303) Yu, M.; Jambhrunkar, S.; Thorn, P.; Chen, J.; Gu, W.; Yu, C. Hyaluronic acid modified mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery to CD44-overexpressing cancer cells. *Nanoscale* **2013**, *5* (1), 178-183, DOI: 10.1039/C2NR32145A.

(304) Hocine, O.; Gary-Bobo, M.; Brevet, D.; Maynadier, M.; Fontanel, S.; Raehm, L.; Richeter, S.; Looock, B.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Charnay, C.; Derrien, G.; Smaïhi, M.; Sahmoune, A.; Morère, A.; Maillard, P.; Garcia, M.; Durand, J.-O. Silicalites and Mesoporous Silica Nanoparticles for photodynamic therapy. *International journal of pharmaceutics* **2010**, *402* (1), 221-230, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.004>.

(305) Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioengineering & Translational Medicine* **2019**, *4* (3), e10143, DOI: <https://doi.org/10.1002/btm2.10143>.

(306) Frickenstein, A. N.; Hagood, J. M.; Britten, C. N.; Abbott, B. S.; McNally, M. W.; Vopat, C. A.; Patterson, E. G.; MacCuaig, W. M.; Jain, A.; Walters, K. B.; McNally, L. R. Mesoporous Silica Nanoparticles: Properties and Strategies for Enhancing Clinical Effect. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (4), DOI: 10.3390/pharmaceutics13040570.

(307) Shen, S.; Wu, Y.; Liu, Y.; Wu, D. High drug-loading nanomedicines: Progress, current status, and prospects. *Int J Nanomedicine* **2017**, *Volume 12*, 4085-4109, DOI: 10.2147/IJN.S132780.



# **ANNEXE**



Braham Mezghrani, Lamiaa M. A. Ali, Sébastien Richeter, Jean-Olivier Durand, Peter Hesemann, and Nadir Bettache. Periodic Mesoporous Ionosilica Nanoparticles for Green Light Photodynamic Therapy and Photochemical Internalization of siRNA. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2021** 13 (25), 29325-29339, DOI: 10.1021/acsami.1c05848

## Periodic Mesoporous Ionsilica Nanoparticles for Green Light Photodynamic Therapy and Photochemical Internalization of siRNA

Braham Mezghrani, Lamiaa M. A. Ali, Sébastien Richeter, Jean-Olivier Durand, Peter Hesemann,\* and Nadir Bettache\*

Cite This: *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2021, 13, 29325–29339

Read Online

ACCESS |

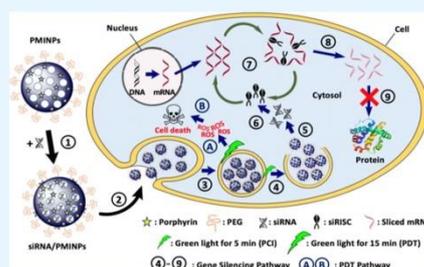
Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** We report periodic mesoporous ionsilica nanoparticles (PMINPs) as versatile nano-objects for imaging, photodynamic therapy (PDT), and efficient adsorption and delivery of small interfering RNA (siRNA) into breast cancer cells. In order to endow these nanoparticles with PDT and siRNA photochemical internalization (PCI) properties, a porphyrin derivative was integrated into the ionsilica framework. For this purpose, we synthesized PMINPs *via* hydrolysis-cocondensation procedures from oligosilylated ammonium and porphyrin precursors. The formation of these nano-objects was proved by transmission electron microscopy. The formed nanoparticles were then thoroughly characterized *via* solid-state NMR, nitrogen sorption, dynamic light scattering, and UV–vis and fluorescence spectroscopies. Our results indicate the formation of highly porous nanorods with a length of  $108 \pm 9$  nm and a width of  $54 \pm 4$  nm. A significant PDT effect of type I mechanism ( $95 \pm 2.8\%$  of cell death) was observed upon green light irradiation in nanoparticle-treated breast cancer cells, while the blue light irradiation caused a significant phototoxic effect in non-treated cells. Furthermore, PMINPs formed stable complexes with siRNA (up to 24 h), which were efficiently internalized into the cells after 4 h of incubation mostly with the energy-dependent endocytosis process. The PCI effect was obvious with green light irradiation and successfully led to  $83 \pm 1.1\%$  silencing of the luciferase gene in luciferase-expressing breast cancer cells, while no gene silencing effect was observed with blue light irradiation. The present work highlights the high potential of porphyrin-doped PMINPs as multifunctional nanocarriers for nucleic acids, such as siRNA, with a triple ability to perform imaging, PDT, and PCI.

**KEYWORDS:** *periodic mesoporous ionsilica nanoparticles, photodynamic therapy, siRNA, photochemical internalization, gene silencing*



### INTRODUCTION

Mesoporous organosilica nanoparticles (MON) attracted high attention in the last decade for bio-applications particularly as cancer theranostics.<sup>1–7</sup> They combine the textural features of mesoporous silica nanoparticles (MSN) with chemical function introduced by the organosilylated precursor molecules.

MONs have been recently used in photodynamic therapy (PDT). PDT is a light-based focal therapy that makes use of the combined action of photosensitizers and light irradiation at a specific wavelength, in the presence of molecular oxygen. The high production of reactive oxygen species (ROS) as a result of the PDT effect causes lipid peroxidation, protein oxidation, and DNA damage, ending with cell death.<sup>8</sup>

In this context, MON-containing photosensitizer molecules present excellent features for PDT applications, as their high porosity allows oxygen to diffuse in and out of the nanoparticles, combined with excellent biocompatibility.<sup>9–13</sup> In the course of our work concerning the use of periodic mesoporous organosilica nanoparticles (PMONPs) for

PDT<sup>14–17</sup> and photochemical internalization (PCI) of small interfering RNA (siRNA),<sup>18,19</sup> we focus here on a new class of PMONPs, which is periodic mesoporous ionsilica nanoparticles (PMINPs). Due to their morphological and chemical polyvalence, ionsilicas appear as a particularly versatile class of periodic mesoporous organosilicas.<sup>20</sup> Ionsilica nanoparticles have recently been reported as new vectors for anionic drug delivery such as diclofenac<sup>21</sup> and theranostic applications with gemcitabine monophosphate.<sup>22</sup> These nanoparticles are synthesized from a cationic tris(triethoxysilylated) precursor, in the absence of any silica source, using sodium hexadecylsulfate (SHS) as porogene that generates mesoporosity. PMINPs present a high amount of surface positive

Received: March 30, 2021

Accepted: June 4, 2021

Published: June 17, 2021



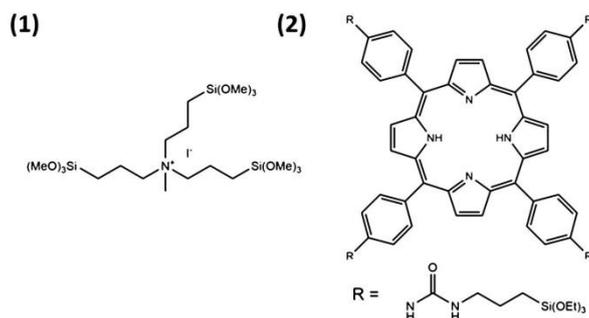


Figure 1. Chemical structures of nanoparticle precursors 1 and 2.

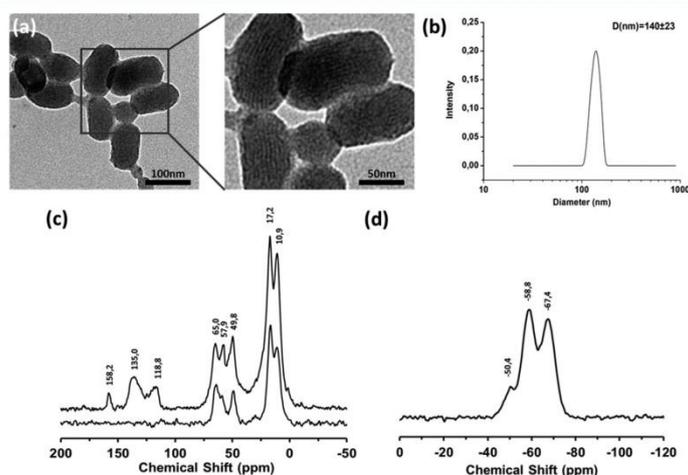


Figure 2. Nanoparticles' characterization. (a) TEM images of PMINPs displaying rod-shaped nanoparticles with regular pore architecture. (b) DLS measurement of PMINPs in an aqueous suspension of  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  at  $25^\circ\text{C}$  and  $\text{pH } 7$  ( $n = 9$ ). (c) Solid-state NMR  $^{13}\text{C}$  CP-MAS of PMINPs (top) and a bulk ionosilica obtained from precursor 1 (bottom). (d)  $^{29}\text{Si}$  CP-MAS spectra of PMINPs.

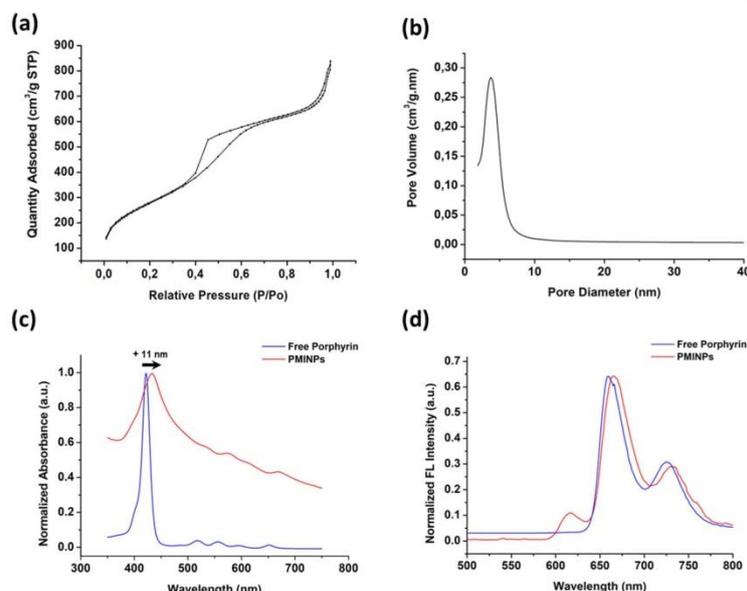
charges, a high specific surface area and ordered porosity allowing high loading of anions through anion exchange.<sup>23</sup> Due to these features, we anticipate that large anionic molecules such as nucleic acids, especially siRNA, can be loaded in or onto PMINPs. This approach appears as an interesting alternative to viral vectors, which have been used for efficient gene delivery, but which may exert immunologic and oncogenic adverse effects.<sup>24–26</sup>

The endo-lysosomal escape of nanoparticles/siRNA complex is a critical point in order to target the mRNA of interest in the cytoplasm, and it can be achieved by different possibilities such as proton sponge effect,<sup>27</sup> fusogenic groups<sup>28</sup> or PCI.<sup>29</sup>

PCI is considered as a sub-lethal procedure since the interruption of endo-lysosomal membranes is not cytotoxic, because of the short range of action and short lifetime of the produced ROS confining the damage effect to the production site.<sup>30</sup>

Compared to PDT, PCI requires an irradiation of lower intensity in order to release siRNA molecules that have been entrapped within the endo-lysosomal compartment, so that they are not exposed to degradation and can safely reach their intended intracellular target.

In this work, we report the use of PMINPs for PDT applications and then as siRNA delivery system combined with PCI. This combination is possible due to the chemical constitution of PMINPs, containing anion exchange groups that allow efficient siRNA adsorption, together with the photodynamic properties of the immobilized porphyrin molecules. We describe the straightforward synthesis of PMINPs incorporating porphyrin molecules in the scaffold and their physico-chemical characterization. Thereafter, we demonstrate the biocompatibility of the resulting functional ionosilica nanoparticles. We then report their PDT effect under green and blue light irradiations, their ability to complex siRNA, and their gene-silencing abilities promoted by the internalization of siRNA in cells through PCI. Our work



**Figure 3.** Physico-chemical characterizations of the nanoparticles. (a) Nitrogen sorption isotherm. (b) Pore size distribution of the nanoparticles. Comparison of the (c) UV-vis and (d) fluorescence ( $\lambda_{exc} = 430$  nm) spectra of free-porphyrin ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and nanoparticles ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) in water.

highlights the high potential of PMINPs for photodynamical applications.

## RESULTS AND DISCUSSION

The synthesis of PMINPs was performed from the ammonium ionosilica precursor **1**<sup>31,32</sup> and the tetrasilylated porphyrin derivative **2**<sup>33</sup> in a molar ratio of 95/5 (Figure 1). The sol gel reaction was performed in water, under basic reaction conditions, following a modified Stöber method. SHS was used as a template and triethylbenzene as a swelling agent, in order to increase the pore size. The PMINP synthesis was based on strong electrostatic interactions between the cationic organic ammonium precursor **1** and the anionic surfactant, and the simultaneous formation of covalent siloxane Si–O–Si bonds (Si–O–Si) between alkoxy-silyl groups of the ionic compound **1** and the silylated porphyrin compound **2**. The non-ionic surfactant (F127) was used as an inhibitor of grain agglomeration. In order to enhance the biocompatibility of the nanoparticles, an additional surface functionalization was performed by the subsequent addition of a silylated polyethylene glycol (Silane-PEG 2000).<sup>34</sup> The successful surface modification with PEG groups was monitored *via* FT-IR spectroscopy (Figure S1).

The formation of PMINPs was attested by transmission electron microscopy (TEM). The obtained images (Figure 2a) reveal the presence of nanorods with  $108 \pm 9$  nm in length and  $54 \pm 4$  nm in width, displaying pore channels in a highly regular arrangement. Dynamic light scattering (DLS) measurements (Figure 2b) confirm these results and indicate the formation of nanoparticles displaying monodisperse size distribution with a diameter of  $140 \pm 23$  nm, PDI = 0.18  $\pm$

0.012. The colloidal stability of these nanoparticles was also investigated in cell culture medium Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) using DLS. The result shows an average diameter of  $201.4 \pm 7.38$  nm, and the suspension remained stable until 24 h (data not shown). The difference observed in diameter (61.4 nm) between DLS in DMEM containing 10% FBS and DLS in water is due to the protein corona resulting in the adsorption of protein, contained in the serum, on the surface of nanoparticles.<sup>35,36</sup>

In order to check the chemical integrity of the ammonium and porphyrin building blocks, we performed <sup>13</sup>C CP-MAS and <sup>29</sup>Si CP-MAS solid-state NMR spectroscopy of the material, and both spectra are given in Figure 2c,d, respectively. The <sup>13</sup>C CP-MAS spectrum of the PMINPs displays large peaks at 10.9, 17.2, 49.3, and 65.0 ppm that can be attributed to the alkyl chains of the ammonium precursor, as shown by the spectrum of a material obtained from the pure ammonium precursor (Figure 2c, bottom).<sup>32</sup> It also shows additional signals at 57.9 ppm together with the large peaks in the downfield region, that is, at 118.8 and 135 ppm. These peaks indicate the presence of the porphyrin substructures in the material. Finally, the resonance at 158.2 ppm is characteristic for C=O carbon centers of urea groups. The results were confirmed *via* liquid NMR spectroscopy of the silylated porphyrin compound **2**. The <sup>13</sup>C CP-MAS spectrum of the material therefore indicates the presence of both ammonium and porphyrin fragments within the nanoparticles. The <sup>29</sup>Si CP-MAS spectrum of the PMINPs (Figure 2d) shows the T<sup>1</sup>, T<sup>2</sup>, and T<sup>3</sup> signals at  $-50.4$ ,  $-58.8$ , and  $-67.4$  ppm, respectively. These signals can be related to silicon centers in

different chemical environments:  $T^1$  and  $T^2$  stand for silicon in  $RSi(OSi)_1(OR)_2$  and  $RSi(OSi)_2(OR)_1$  environments, whereas  $T^3$  represents silicon in a fully condensed  $RSi(OSi)_3$  environment.

The textural properties of PMINPs were studied by nitrogen sorption experiments. The nitrogen sorption isotherm is displayed in Figure 3a. The isotherm is of type IV and displays a hysteresis loop between 0.4 and 0.6  $P/P_0$ , which is characteristic for mesoporous materials.<sup>37</sup> The nanoparticles display a specific surface area of  $1015 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  and a pore volume of  $1.29 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . The BJH pore size distribution was obtained from the adsorption branch of the isotherm and gives an average pore diameter of 5.1 nm (Figure 3b). This value is considerably higher compared to the formerly reported ionosilica nanoparticles,<sup>21,23</sup> due to the use of triethylbenzene as a swelling agent in the course of the hydrolysis–polycondensation reaction.<sup>31</sup> The strong increase of the isotherm at high partial pressure is due to intergrain porosity and indicates the formation of nanoparticles.

UV–visible spectra of the precursor 2 and nanoparticles are shown in Figure 3c. The characteristic Soret absorption band of the free-base porphyrin is observed at 422 nm and the Q bands at 518, 556, 594, and 652 nm. Free base porphyrins within nanoparticles show a broad Soret absorption band at 433 nm and Q bands at 533, 573, 614, and 669 nm. The increase in absorbance of the porphyrins in the nanoparticles at lower wavelength is due to diffusion. Compared with the porphyrin precursor, absorption bands of the porphyrins within nanoparticles are red-shifted. The origin of this spectral evolution may be attributed either to the formation of porphyrin J-aggregates in the nanostructures or to the flattening of the porphyrin within the nanostructures inducing a larger  $\pi$  conjugation between the macrocycle and *meso* aryl groups.<sup>38</sup> Fluorescence spectra of the precursor 2 and nanoparticles are displayed in Figure 3d ( $\lambda_{\text{exc}} = 430 \text{ nm}$ ). The two emission bands of porphyrins within nanoparticles at 664 and 732 nm are slightly red-shifted compared to those of the corresponding silylated porphyrin precursor (659 and 725 nm). An additional weak emission band is also observed at 611 nm when porphyrins are incorporated in the nanoparticles, likely due to the formation of aggregates.<sup>39</sup> Here, we took benefit of the emission properties of porphyrins to monitor the endocytosis of PMINPs in living cells using fluorescence microscopy.

After having established the formation of porphyrin-doped ionosilica nanoparticles with the incorporation of porphyrin fragments, we studied the dark toxicity and the phototoxicity of these nano-objects for siRNA adsorption, PDT, and PCI applications.

The cytotoxic effect of PMINPs in the absence of light irradiation was evaluated in both breast cancer (MDA-MB-231) and healthy human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) cell lines. Cells were treated with different nanoparticle concentrations (ranging from 1 to  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) as presented in Figure 4. The cell survival was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, which monitors the capacity of the living cells to reduce the MTT reagent to formazan crystals. The results show a similar toxic behavior of nanoparticles in both cell lines. The cell viability values are above 70% at concentrations  $\leq 30 \mu\text{g mL}^{-1}$  and slightly decrease to  $66 \pm 0.7$  and  $64 \pm 4.6\%$  for MDA-MB-231 and HUVECs, respectively, at a concentration of  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . These results

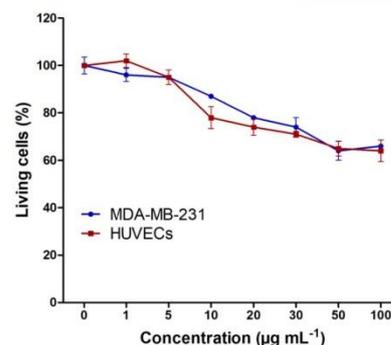


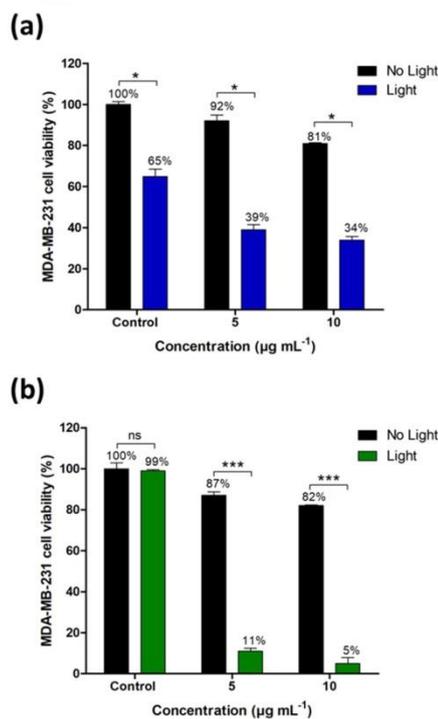
Figure 4. Cytotoxicity study of PMINPs on living MDA-MB-231 and HUVECs treated with different concentrations of PMINPs for 72 h. Results are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 9$ ).

highlight the good biocompatibility of PMINPs<sup>21</sup> and allowed us to determine the suitable concentration range for further biological investigations.

The photodynamic efficiency of PMINPs was then studied on MDA-MB-231 cell line. Cells were treated with nanoparticles at concentrations of 5 and  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  for 24 h, and then exposed, at a first time, to blue light irradiation (450–490 nm) for 15 min ( $8 \text{ J cm}^{-2}$ ), which corresponds to the Soret absorption band of porphyrin according to the obtained UV–vis spectrum in Figure 3c. Our results show an obvious phototoxic effect associated with the blue light irradiation of non-treated cancer cells (control), causing  $35 \pm 3.5\%$  cell death. In contrast, the treatment of the cells with 5 and  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  of PMINPs, without blue light irradiation, causes  $8 \pm 2.9$  and  $19 \pm 0.4\%$  of cell death, respectively, while, upon the blue light irradiation condition, the cell death percentages significantly increase to  $61 \pm 2.4$  and  $66 \pm 1.7\%$ , respectively (Figure 5a).

In a second time, a green light irradiation at 545 nm for 15 min ( $34 \text{ J cm}^{-2}$ ) was applied. Compared to blue light irradiation, only  $1 \pm 0.6\%$  of cell death is observed in the irradiated control experiment, demonstrating the absence of phototoxicity with the green light. In the case of absence of green light irradiation, the induced cell death values are of  $13 \pm 1.6$  and  $18 \pm 0.4\%$  for nanoparticle concentrations of 5 and  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. These results are in agreement with the obtained cytotoxicity results (Figure 4). In contrast, the green light irradiation induces cell death that significantly increases to  $89 \pm 1.3$  and  $95 \pm 2.8\%$  for 5 and  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively (Figure 5b).

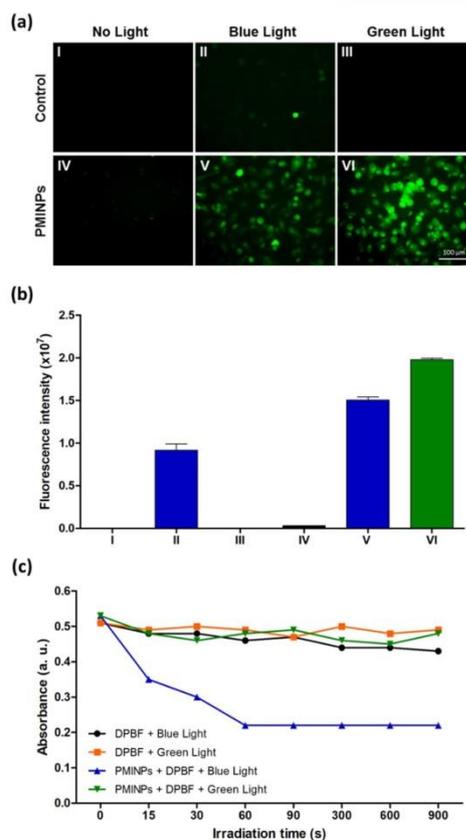
The generation of intracellular ROS is known to be a result of the photodynamic effect. The detection of ROS was carried out in MDA-MB-231 cells previously treated (or not) with PMINPs and exposed (or not) to blue light (450–490 nm for 15 min,  $8 \text{ J cm}^{-2}$ ) or green light (545 nm for 15 min,  $34 \text{ J cm}^{-2}$ ) irradiation using DCFDA kit assay. After cell internalization, DCFDA is transformed by ROS to a highly fluorescent derivative that can be observed by fluorescence microscopy. DCFDA mainly measures the ROS activity linked to the formation of hydroxyl radicals, hydrogen peroxide, and singlet oxygen.<sup>40</sup>



**Figure 5.** PDT effect studies of PMINPs. (a) PDT effect of PMINPs on MDA-MB-231 cells treated (or not) with 5 and 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of PMINPs for 24 h, and then, either exposed (or not) to blue irradiation (450–490 nm) for 15 min ( $8 \text{ J cm}^{-2}$ ) or (b) to green light beam (545 nm) for 15 min ( $34 \text{ J cm}^{-2}$ ). The results are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 9$ ). \* Statistically significant difference from no light condition ( $p < 0.05$ ), \*\*\* Statistically significant difference ( $p < 0.0005$ ), ns (non-statistically significant difference).

The obtained microscopy images were processed for the cell fluorescence intensity quantification using ImageJ software.

Our results show an absence of green fluorescence in non-irradiated control cells and non-irradiated PMINP-treated cells, as shown in Figure 6a,b, conditions (I) and (IV), respectively. Further, the obtained results confirm the phototoxic effect of the blue light irradiation observed on the irradiated control, as shown in Figure 5a, by the visualization of green fluorescence in the cytosol of cells [Figure 6a,b, condition (II)], indicating ROS production. In contrast, no fluorescence is detected in the green light irradiated control [Figure 6a,b, condition (III)]. When PMINP-treated cells were irradiated with either blue [Figure 6a,b, condition (V)] or green light [Figure 6a,b, condition (VI)], an elevation in the cytosolic fluorescence intensity is observed, indicating an important ROS generation. Compared to blue light irradiation, these results point the safety of green light irradiation on non-treated cells and the high intracellular ROS production induced by PMINP excitation using green light.



**Figure 6.** Detection of intracellular ROS and singlet oxygen generations; (a) fluorescence microscopy imaging of ROS using DCFDA assay in MDA-MB-231 cells ( $n = 3$ ) treated (or not) with 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of nanoparticles for 24 h, and then exposed (or not) to blue light irradiation (15 min,  $8 \text{ J cm}^{-2}$ ) or green light irradiation (15 min,  $34 \text{ J cm}^{-2}$ ). (b) Quantification of the cell fluorescence intensity in the obtained images using ImageJ software ( $n = 6$ ). (I) Non-irradiated control, (II) blue light irradiated control, (III) green light irradiated control, (IV) non-irradiated PMINP-treated cells, (V) blue light irradiated PMINP-treated cells, (VI) green light irradiated PMINP-treated cells. (c) Detection of singlet oxygen production by the induced photo-degradation of DPBF solution mixed with or without PMINPs upon blue (450–490 nm) or green (545 nm) light irradiation at different irradiation times ( $n = 3$ ).

The difference observed between the obtained results with blue and green light irradiations prompted us to carry out further investigations.

The photo-generated formation of singlet oxygen can be monitored using the 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) fluorescence quenching method. DPBF is a highly fluorescent probe that reacts with singlet oxygen forming unstable peroxide that decomposes into a non-fluorescent compound 1,2-dibenzoylbenzene, thus showing a diminution of the

Table 1. Comparison of Various Nanoparticular PDT Systems

material	photosensitizer	<i>in vitro</i> tumor model	wavelength	PDT efficiency (% of cell death)	refs
porphyrin-ethylene-based PMONPs	porphyrin	MCF-7 (human breast cancer cell line)	405 nm 650 nm	80% 26%	14
Zr(IV)-based porphyrinic MOF nanoparticles	porphyrin	HeLa (human cervical carcinoma cell line)	420 nm 630 nm	80% for both wavelengths	44
perfluorocarbon@porphyrin nanoparticles	porphyrin	HT-29 (human colorectal adenocarcinoma cell line)	650 nm	95%	45
porphyrin-doped magnetic chitosan nanoparticles	porphyrin	SW480 (human colon adenocarcinoma cell line)	650 nm	90%	46
porphyrin-based bridged silsesquioxane nanoparticles	porphyrin	MDA-MB-231 (human breast adenocarcinoma cell line)	420–440 nm	44%	47
protoporphyrin IX-modified MSNs	protoporphyrin IX	HeLa	514 nm	95%	48
colloidal MSNs with encapsulated protoporphyrin IX	protoporphyrin IX	HeLa	532 nm	cell necrosis observed by confocal microscopy 8 min after irradiation	49
titanium dioxide nanoparticles conjugated with phthalocyanine and folic acid	phthalocyanine	HeLa A549 (human lung cancer cell line)	xenon lamp 420–800 nm	80% 60%	50
silica nanoparticles conjugated with silicon phthalocyanine	phthalocyanine	A375 (non pigmented human melanoma cell line)	halogen lamp 600–700 nm	95%	51
chlorin-conjugated magnetic nanoparticles	chlorin e6	MGC-803 (human gastric cancer cell line)	633 nm	80%	52
folic acid-conjugated graphene oxide loaded with chlorin	chlorin e6	MGC-803	633 nm	90%	53
manganese ferrite nanoparticle-anchored MSNs	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -chlorin e6	U-87 MG (human glioblastoma cancer cell line)	670 nm	90%	54
ZnO nanoparticles	ZnO	SMMC-7721 (human hepatocarcinoma cell line)	254 nm	75%	55
PMINPs	porphyrin	MDA-MB-231	545 nm	95%	this work

absorption at 410 nm.<sup>41</sup> Several suspensions of PMINPs at a concentration of 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in the presence of DPBF were illuminated at different irradiation times (ranging from 15 to 900 s) using blue light (450–490 nm) or green light (545 nm). In order to ensure the reliability of the results, the procedure was repeated under the same conditions using DPBF solutions in the absence of PMINPs.

The results exposed in Figure 6c show non-significant change in the absorbance values of PMINPs upon green light irradiation at any irradiation time, indicating no singlet oxygen production. The same behavior was observed with DPBF solution alone exposed to blue or green light irradiations. Interestingly, application of blue light on PMINPs decreases gradually the absorbance values with the increase of irradiation time until 60 s, corresponding to the production of singlet oxygen induced by PMINPs and the decomposition of DPBF to reach finally a steady state.

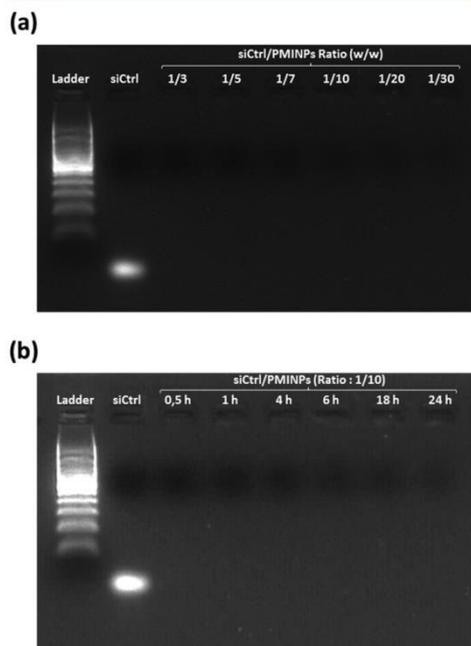
These results suggest the existence of two types of involved PDT mechanisms according to the used wavelength. Green light irradiation generates ROS (Figure 6a,b), but DPBF

reveals the absence of singlet oxygen (Figure 6c), thus corresponding to a PDT mechanism type (I). In contrast, blue light irradiation reveals a production of ROS and especially singlet oxygen, which corresponds to a PDT mechanism of type (II), as already described in the literature.<sup>42,43</sup>

Overall, porphyrin-doped PMINPs show a clear and adjustable photodynamic effect against MDA-MB-231 cells. A comparison with other nanoparticular systems highlight that PMINPs are among the most efficient PDT systems (Table 1). These results prompted us to combine these features with the particular anion exchange properties of the ionosilica matrix and hence to develop bifunctional nanoparticles combining PDT and siRNA carrier properties. For this reason, we focused on the delivery of siRNA promoted by PMINPs, and we studied the adsorption of siRNA with the nanoparticles more in detail.

Due to the use of the ammonium precursor 1 as the ionosilica precursor, PMINPs contain a large amount of positive surface charges. In order to exploit the high number of

positive charges, together with the high porosity of PMINPs, nucleic acid complexation using a negatively charged siRNA was performed and monitored by agarose gel retardation assay (Figure 7a). A fixed quantity of siCtrl was added to increasing



**Figure 7.** siRNA complexation studies. (a) Agarose gel retardation assay for nanoparticles complexed with siCtrl at different weight ratios ranging from 1/3 to 1/30. Electrophoresis was immediately performed after complex formation for 30 min at 37 °C. (b) Stability study of the siCtrl/PMINPs complex at a weight ratio 1/10 using agarose gel retardation assay. Before electrophoresis, the complexes were formed for 30 min, 1 h, 4 h, 6 h, 18 h, and 24 h at 37 °C.

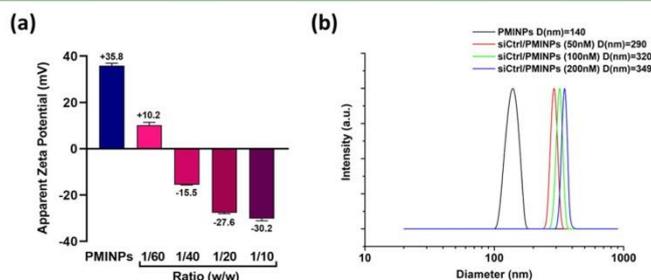
amounts of PMINPs, which led to different siCtrl/PMINPs weight ratios, ranging from 1/3 to 1/30. Before electrophoresis, the mixture was incubated for 30 min at 37 °C for the formation of siCtrl/PMINPs complexes. The analysis of the gel reveals a total retardation of siCtrl, as shown by the disappearance of siCtrl bands on the gel for all the weight ratios. Even at low weight ratio (1/3), where siRNA represents 33% (w/w), no free siRNA can be detected.

Then, the stability of the siRNA/PMINPs complex was studied, in order to verify if there was an eventual release of siRNA from the complex over time (Figure 7b). A fixed quantity of siCtrl was added to an amount of PMINPs, in a way to respect a weight ratio of 1/10. The complexes were left at 37 °C for different time intervals from 30 min to 24 h. After that, all samples were electrophoresed on agarose gel. Gel analysis results showed no detection of free siCtrl bands at all tested time points, confirming the absence of any released siRNA even until 24 h.

These results reflect the high affinity and binding capacity of PMINPs for siRNA and also the high stability of the siRNA/PMINPs complex.

In a second series of experiments, we used zeta potential measurements to monitor the variation of the surface charge of the nanoparticles induced by siRNA adsorption. Due to the high number of positive surface charges, free PMINPs display a positive zeta potential of +35.8 mV (Figure 8a). After siRNA adsorption at different siRNA/PMINPs weight ratios (from 1/10 to 1/60 w/w), this value progressively decreases to +10.2, -15.5, and -27.6 mV to reach a plateau around -30 mV for the increasing surface coverages, thus assuming that the whole surface of the PMINPs is covered by siRNA at the lowest used PMINP amounts.

Similarly, DLS measurements were performed with free PMINPs and on complexes with a fixed weight ratio (1/10), using different siCtrl/PMINPs combinations: 50, 100, and 200 nM siCtrl with 7, 14, and 28  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of PMINPs, respectively (Figure 8b). DLS results indicate that the diameter of the nanoparticles increases after siRNA complexation, from  $140 \pm 23$  nm for undecorated PMINPs, to around 300 nm after siRNA complexation. More specifically, we observed a clear trend regarding the size of the siRNA/PMINPs complexes as a function of the applied quantity of siRNA (in nM), with a particle size of  $290 \pm 37$  nm for 50 nM,  $320 \pm 41$  nm for 100 nM, and  $349 \pm 55$  nm for 200 nM siRNA.



**Figure 8.** siCtrl/PMINPs complex characterization. (a) Zeta potential measurements of free-PMINPs ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and siCtrl/PMINPs complexes using increasing weight ratios from 1/10 to 1/60 ( $n = 3$ ). (b) DLS measurements of free-PMINPs compared to siCtrl/PMINPs complexes using increasing amounts of siCtrl from 50 to 200 nM at a weight ratio of 1/10 ( $n = 3$ ).

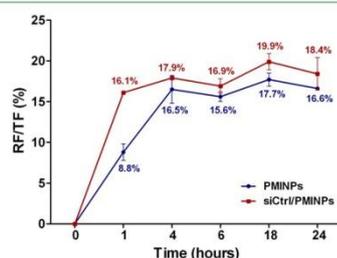
29331

<https://doi.org/10.1021/acsami.1c05848>  
ACS Appl. Mater. Interfaces 2021, 13, 29325–29339

All these results give a clear evidence of the complexation of siRNA by PMINPs. The adsorption of the siRNA mainly occurs on the surface of the nanoparticles, as shown by a diminution in zeta potential and an elevation in the size of the nanoparticles after complexation.

In the following, we focused, in particular, on cellular uptake of the siRNA/PMINPs complexes and the induced biological activity of the internalized siRNA. For this purpose, we selected siRNA/PMINPs complexes formed at a ratio of 1/10 (w/w), which ensures good biocompatibility.

Since siRNA complexation by PMINPs was successfully demonstrated, the kinetics of cell internalization of the siRNA/PMINPs complexes was studied in MDA-MB-231 cells and compared to PMINPs alone, using fluorescence intensity measurements. The cells were treated with PMINPs or with siCtrl-ATTO-488/PMINPs at a weight ratio of 1/10 at various time points and incubated at 37 °C. Our results demonstrate that the internalization rates of both PMINPs and siCtrl/PMINPs complex gradually increase to reach almost similar values of  $16.5 \pm 1.7$  and  $17.9 \pm 0.2\%$  respectively, after 4 h of treatment and then become stable reaching values of  $16.6 \pm 0.6\%$  for PMINPs and  $18.4 \pm 1.3\%$  for the complex siCtrl/PMINPs after 24 h (Figure 9). From this result, we can



**Figure 9.** Uptake kinetic study using fluorescence intensity measurements in living MDA-MB-231 cells treated with PMINPs and siCtrl-ATTO-488/PMINPs complex at 37 °C at different time intervals. Results are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 9$ ).

conclude that the time of incubation of 4 h is sufficient to reach the maximum capability of cells to internalize both bare nanoparticles and siCtrl/PMINPs complexes.

The cellular uptakes of PMINPs and siRNA/PMINPs complexes were also qualitatively evaluated in MDA-MB-231 cells after 4 h of the treatment using confocal microscopy. The microscopy images shown in Figure 10 reveal that free PMINPs are endocytosed inside the cells (green staining) and, moreover, in the case of complexation, PMINPs are able to deliver the siCtrl-ATTO-488 into the cytosol (white staining) as compared with Lipofectamine. In contrast, the free siCtrl-ATTO-488 does not penetrate cells since a weak fluorescence of siCtrl-ATTO-488 was observed around the cell membranes in only few cells. This result provides an evidence of the efficient siRNA transfection inside MDA-MB-231 cells by PMINPs.

After having evaluated the cell internalization of the complex siRNA/PMINPs and the free carrier PMINPs, we investigated their cellular uptake pathways. For this reason, MDA-MB-231 cells were treated with PMINPs or siCtrl-ATTO-488/PMINPs using cold medium and left for 4 h at 4 °C. The same procedure was repeated, but this time, the cells were allowed to

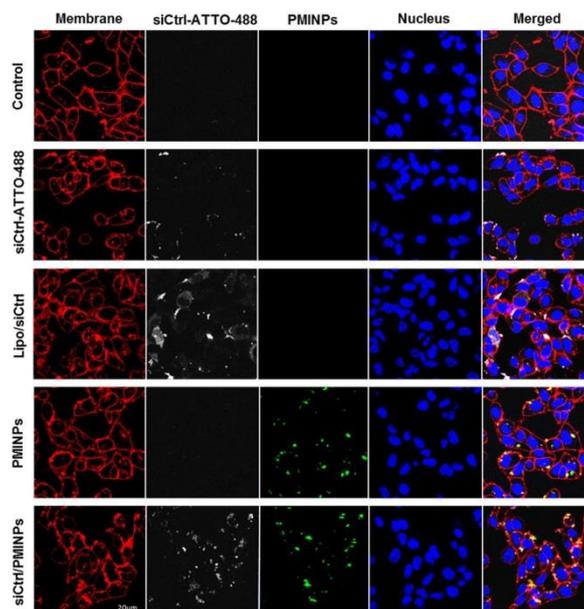
grow normally at 37 °C, and the cell internalization rates were monitored by fluorescence intensity measurements for both conditions (Figure 11). Indeed, the exposure of cells to low temperature (4 °C) is a commonly used method for non-specific inhibition of endocytosis.<sup>56,57</sup> Lowering the temperature from 37 to 4 °C significantly inhibits the uptake of PMINPs and siCtrl/PMINPs by  $33 \pm 1.1$  and  $56 \pm 1.9\%$ , respectively, indicating that the uptake is temperature-dependent. This result suggests that an energy-dependent endocytosis process may be responsible for the uptake of 56% of the internalized complexes, while the remaining 44% may be attributed to physical adhesion or direct translocation.

Finally, we studied the biological activity of the internalized siRNA/PMINPs complexes, using siRNA targeted against the luciferase gene, in MDA-MB-231-Luc-RFP cell line, and compared it with LipofectamineRNAiMAX used as a positive control of transfection. In the presence of luciferase, luciferin is oxidized into oxyluciferin with generation of luminescence. If siFluc is efficiently delivered, the formation of luciferase should be inhibited, resulting in a decrease in the luminescence. Figure 12a shows that free siFluc does not significantly decrease the luciferase expression when incubated with cells (purple bar) as only  $6 \pm 2.8\%$  of luciferase activity is inhibited. This result is in agreement with the confocal microscopy imaging results displayed in Figure 10, which confirms the inability of free siRNA to penetrate into the cells.<sup>58</sup> Free PMINPs with green light irradiation at 545 nm for 5 min ( $11.3 \text{ J cm}^{-2}$ ) do not induce a luminescence decrease, proving that at 5 min irradiation, the phototoxicity of PMINPs has no impact on luciferase activity (Figure 12a, black bars). Furthermore, when siFluc is complexed with PMINPs at a weight ratio of 1/10 using different concentrations and incubated with MDA-MB-231-Luc-RFP cells without light irradiation, the luminescence values are not significantly decreased, with only  $4 \pm 2.4$ ,  $13 \pm 2.6$ , and  $17 \pm 0.9\%$  for 50, 100, and 200 nM siFluc, respectively (Figure 12a, red bars). In contrast, when siFluc/PMINPs complexes were irradiated at 545 nm and for 5 min ( $11.3 \text{ J cm}^{-2}$ ) after 8 h of cell treatment, the complex efficiently inhibits the luciferase activity in a dose-dependent manner (Figure 12a, green bars), values are  $60 \pm 0.8$  and  $62 \pm 1.1\%$  for 50 and 100 nM siFluc concentrations, respectively. Interestingly, the complex siFluc/PMINPs at a siFluc concentration of 200 nM has a more significant effect on luciferase activity than the positive control lipofectamine/siFluc (Figure 12a, pink bar), the inhibition rates are  $83 \pm 1.1$  and  $55 \pm 2.2\%$  for siFluc/PMINPs and lipofectamine/siFluc, respectively. The MTT assay was carried out to take into account only the luciferase expression by living cells.

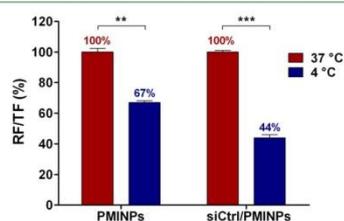
The same experiment using siFluc/PMINPs complexes was repeated upon blue light irradiation (450–490 nm) for 5 min ( $2.6 \text{ J cm}^{-2}$ ). The results presented in Figure 12b reveal the absence of any effect on luciferase activity.

The obtained results demonstrate the strong gene silencing potential of siRNA/PMINPs complexes upon green light irradiation. This activity is probably due to a PCI mechanism,<sup>59</sup> which disrupts the endosome–lysosome membranes and releases the siRNA into the cytosol of cells.

In order to prove the existence of the PCI mechanism, confocal microscopy was used to verify the cellular uptake of siRNA/PMINPs complexes and their subcellular localization and the cytosolic delivery of siRNA, in the absence or in the presence of green light irradiation. As shown in Figure 13, the siCtrl/PMINPs complexes (green staining) are taken up in



**Figure 10.** Confocal microscopy images of living MDA-MB-231 breast cancer cells untreated or treated with free siCtrl-ATTO-488, lipofectamine/siCtrl-ATTO-488, free-PMINPs, and siCtrl-ATTO-488/PMINPs complex at 1/10 weight ratio ( $n = 3$ ). Cell membrane, siCtrl, PMINPs, and nucleus appear in red, white, green, and blue colors, respectively.



**Figure 11.** Effect of temperature on the cellular uptake of MDA-MB-231 cells incubated with PMINPs and siCtrl-ATTO-488/PMINPs for 4 h at 4 and 37 °C using fluorescence intensity measurements. Results are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 9$ ). \*\* Statistically significant difference from cellular uptake at 37 °C ( $p < 0.005$ ); \*\*\* statistically significant difference ( $p < 0.0005$ ).

MDA-MB-231 cells and localized in granular vesicles representing the endo-lysosomal compartments (red staining), in the absence of green light irradiation. The yellow stain in the merged image (mentioned with arrows) is generated as a result of green (siCtrl/PMINPs) and red (endo-lysosomal compartments) fluorescence overlapping, indicating a co-localization and an accumulation of the complexes in endocytic vesicles. Two hours post light treatment, a diffused red fluorescence (pointed with circles) and a reduction of the punctuated fluorescence pattern are observed, demonstrating the disruption of the endo-lysosomal membranes suggested by the PCI mechanism and the release of siCtrl/PMINPs complexes and/or siCtrl molecules from the endo-lysosomes into the

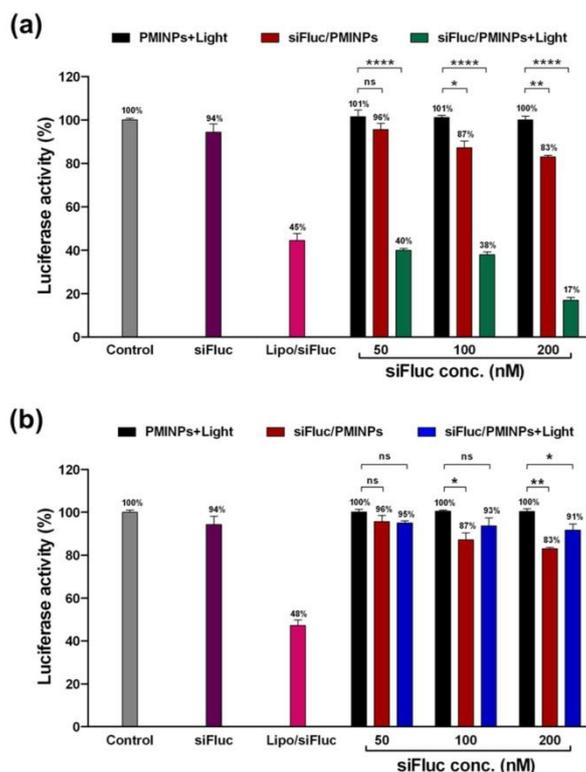
cytosol. Few yellow dots are also observed indicating an ongoing photochemical process. These results indicate the efficiency of the PCI mechanism for the endo-lysosomal liberation of siRNA, triggered by green light and delivered by PMINP carriers.

## CONCLUSIONS

In this work, we report the synthesis of biocompatible nanoparticles using an ammonium ionosilica precursor and a silylated porphyrin derivative. PMINPs have demonstrated their ability as multifunctional theranostic nano-tools: (i) the presence of porphyrin in the scaffold endowed our model with the ability of imaging and PDT thanks to its fluorescence properties and production of intracellular ROS after green light irradiation; and (ii) the high number of positive surface charges allowed an efficient siRNA complexation and subsequent siRNA delivery into the cytoplasm of cells *via* the PCI mechanism triggered by green light irradiation, which resulted in an effective luciferase gene silencing. Altogether, the results obtained with the PMINPs, such as imaging, PDT, and gene silencing, are promising to pursue our investigations for the use of PMINPs as efficient nano-devices for theranostic purposes.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Materials.** (3-Aminopropyl) trimethoxysilane, (3-chloropropyl) trimethoxysilane, *N*'-diisopropylethylamine, sodium hexadecyl sulfate (containing 40% sodium stearyl sulfate), and anhydrous 1-propanol were purchased from abcr GmbH, Germany. Iodomethane, 3-(triethoxysilyl) propyl isocyanate, 1,3,5-triethylbenzene, DPBF,



**Figure 12.** Evaluation of the biological activity and the PCI effect of the internalized siFluc/PMINPs complexes in MDA-MB-231 cells expressing luciferase and exposed (or not) to green light irradiation (a) or blue light irradiation (b) by the measurement of luminescence related to luciferase activity. Gray bar, purple bar, and pink bar represent untreated cells (control), cells treated with free-siFluc (100 nM) and cells treated with lipofectamine/siFluc, respectively. Black bars represent treated cells with different concentrations (7, 14, and 28  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of free nanoparticles and irradiated with green light irradiation (545 nm, for 5 min, 11.3  $\text{J cm}^{-2}$ ) (a) or blue light irradiation (b) (450–490 nm, for 5 min, 2.6  $\text{J cm}^{-2}$ ) after 8 h of incubation. Red bars represent cells treated with siFluc/PMINPs complexes (50, 100, and 200 nM siFluc mixed in a 1/10 weight ratio with 7, 14, and 28  $\mu\text{g mL}^{-1}$  PMINPs, respectively) and not exposed to irradiation. Green and blue bars represent the former treatment accompanied by green light irradiation or blue light irradiation, respectively, after 8 h of incubation. For both conditions, luciferase activity was measured after 48 h of treatment and cell viability was estimated by MTT assay to consider only luciferase expression by living cells. The results are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 9$ ), ns is non-statistically significant, \* and \*\* statistically significant difference ( $p < 0.05$  and  $p < 0.005$  respectively), and \*\*\* statistically significant difference ( $p < 0.0001$ ).

MTT, and ammonium chloride were obtained from Sigma-Aldrich, France. 5,10,15,20-Tetrakis(4-aminophenyl)porphine was purchased from PorphyChem, France. Silane-PEG 2000 was obtained from RAPP Polymer, Germany. All chemicals were used as received.

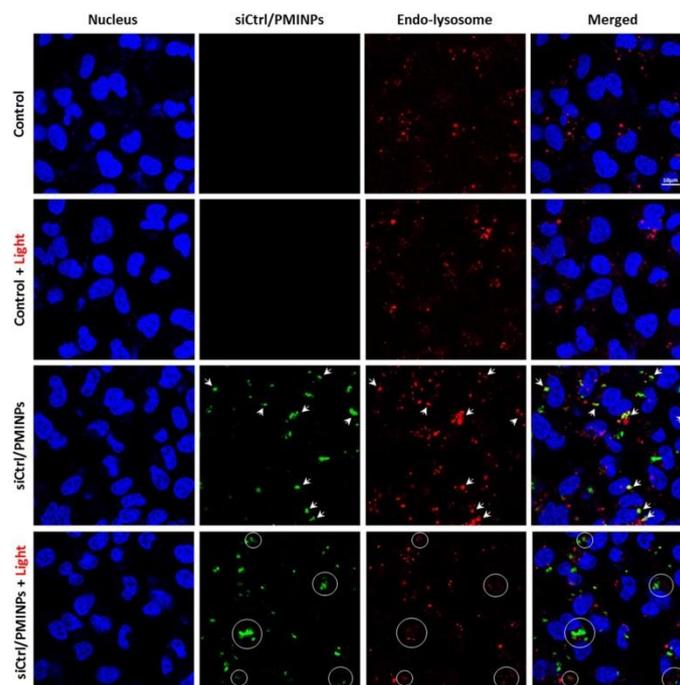
All siRNA used were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). The Firefly Luciferase siRNA (siFluc) targeting sequence (sense: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3' and anti-sense: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3') and the control siRNA without any biological activity are used in two forms as negative control, without any labeling (siCtrl) or labeled with ATTO-488 (siCtrl-ATTO-488) (sense: 5'-CGUACGCGAAUACUUCGAdTdT-3' and anti-sense: 5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGdTdT-3').

**Precursors' Synthesis.** The syntheses of the precursors methyl-tris(3-trimethoxysilyl)propyl ammonium iodide<sup>25,31,32</sup> and tetrasilylated porphyrin<sup>33</sup> were carried out according to the literature.

**PMINPs' Synthesis.** A mixture of sodium hexadecylsulfate SHS (100 mg, 0.3 mmol), 1,3,5-triethylbenzene (1.5 mL), and deionized water (30 mL) was stirred at 70 °C for 8 h at 750 rpm. Then, a mixture of precursors was prepared in 1-propanol: methyl-tris(3-trimethoxysilyl)propyl ammonium iodide (187.3 mg, 0.361 mmol) precursor 1 and the tetrasilylated porphyrin (31.6 mg, 0.019 mmol) precursor 2. The mixture was added dropwise during 20 min under vigorous stirring. Then, an aqueous solution of non-ionic surfactant triblock copolymer F127 (20 mg) was added to the reaction, followed by 600  $\mu\text{L}$  of ammonia (0.1 M) after 5 min. Ten minutes later, an aqueous solution of Silane-PEG 2000 (20 mg) was added. The mixture was stirred at 1250 rpm for 16 h at 70 °C. The reaction was cooled to room temperature, and then, the synthesized nanoparticles were collected by centrifugation (20k rpm for 15 min) and were washed two times with ethanol before surfactant removal with several washes using an ethanolic ammonium chloride solution (6  $\text{g L}^{-1}$ ).

29334

<https://doi.org/10.1021/acsami.1c05848>  
ACS Appl. Mater. Interfaces 2021, 13, 29325–29339



**Figure 13.** Confocal microscopy images of living MDA-MB-231 cells untreated or treated with siCtrl/PMINPs complexes for 8 h and exposed or not to green light irradiation for 5 min at 545 nm ( $11.3 \text{ J cm}^{-2}$ ) ( $n = 3$ ). Nucleus, siCtrl/PMINPs, and lysosome appear in blue, green, and red color, respectively. In the case of siCtrl/PMINP treated cells, the punctuated pattern in the absence of light indicates the co-localization (yellow color) of endocytic vesicles with siCtrl/PMINPs, as shown in the merged image (arrows). After light irradiation, a diffuse pattern (circles) is observed, where the fluorescence is spread throughout the cytosol of cells, as a result of photo-induced disruption of the endo-lysosomal membranes. Scale bar is  $10 \mu\text{m}$ .

**Characterization Techniques.** TEM,  $^{29}\text{Si}$  CP-MAS, and  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR cross-polarization magic-angle spinning (CP-MAS) solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, nitrogen sorption, and zeta potential/DLS measurements were carried out as previously reported.<sup>21,60–62</sup>

**Ultraviolet–Visible (UV–vis) Absorption Spectroscopy.** UV–vis absorption spectra were collected at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  on a JASCO V-750 spectrophotometer (France) in 10 mm quartz cells, using an aqueous solution of free-porphyrin at  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  and an aqueous suspension of nanoparticles at  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Fluorescence Spectroscopy.** Emission spectra were recorded at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  on a fluorescence spectrophotometer (FS920, Edinburgh Instruments) with a 450 W continuous xenon arc lamp using a quartz cuvette with 1.0 cm excitation path length and an aqueous solution of free-porphyrin at  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  and an aqueous suspension of nanoparticles at  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Excitation wavelength was 430 nm.

**Cell Lines.** Human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-231-LUC-RFP were grown in DMEM. HUVECs were maintained in endothelial cell growth medium 2. Both media were supplemented according to the literature.<sup>63,64</sup> All cells were grown at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  in a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$ .

**Cytotoxicity Assay.** MDA-MB-231 cells and HUVECs were seeded in 96-well plates, in their respective medium, at a density of 2000 cells per well ( $200 \mu\text{L}$ ). After 24 h, cells were incubated with increasing concentrations of nanoparticles ranging from 1 to  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Control wells were treated with the vehicle. Cells were

incubated for 3 days and then assayed for cell viability. Cell survival values were determined by the colorimetric MTT assay. MTT was added in each well at a final concentration of  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  for 4 h at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Then, medium was aspirated and the formed purple crystals were dissolved with equal volumes of ethanol/DMSO. The optical density was measured using a multiwell plate reader (Multiskan FC, ThermoFisher Scientific, USA) at 540 nm. The mean absorbance of control cells served as the reference for calculating 100% cellular viability.

**PDT Experiment.** MDA-MB-231 cells were seeded in 96-well plates at a density of 3000 cells per well and left to grow for 24 h. Then, cells were incubated with 5 and  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  nanoparticles for 24 h. Non-treated cells were considered as a control. After incubation with PMINPs, cells were exposed (or not) to green light irradiation at 545 nm for 15 min duration ( $34 \text{ J cm}^{-2}$ ). The light beam was focused by a microscope objective lens ( $4\times/0.10$ ). Two days later, the phototoxicity effect of nanoparticles was evaluated using MTT assay as previously described. The percentage of cell viability was calculated according to the control not exposed to light (set as 100%).

The same procedure was performed using the blue light at (450–490 nm) for 15 min duration ( $8 \text{ J cm}^{-2}$ ).

**Cellular ROS Detection and Quantification.** MDA-MB-231 cells were seeded in 96-well plate, then left to grow for 24 h. Cells were incubated with PMINPs at a concentration of  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  for 24 h. After the incubation period, ROS were detected using DCFDA/H<sub>2</sub>DCFDA-Cellular ROS Assay Kit (Abcam, UK). Control (non-

treated) cells and nanoparticle-treated cells were incubated with 20  $\mu\text{M}$  of DCFDA for 45 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ , and then, cells were exposed (or not) to green light beam under the same conditions as the PDT experiment ( $\lambda_{\text{exc}}$  545 nm for 15 min/34 J  $\text{cm}^{-2}$ ). After light exposure, cells were washed two times and then visualized using the Leica DM.IRB fluorescence microscope at 450–490 nm, objective 10 $\times$ .

The same procedure was performed using the blue light at (450–490 nm) for 15 min duration (8 J  $\text{cm}^{-2}$ ).

The obtained images ( $n = 6$  for each condition) were processed for the cell fluorescence intensity quantification using ImageJ software.

**Photo-Degradation of DPBF and Spectral Detection of Singlet Oxygen.** For singlet oxygen evaluations using the DPBF probe, several ethanolic suspensions of PMINPs (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) mixed to DPBF (35  $\mu\text{M}$ ) in a final volume of 200  $\mu\text{L}$  were illuminated at 450–490 nm (blue light) or 545 nm (green light) for different light irradiation times ranging from 15 to 900 s. The same procedure was repeated using DPBF solutions only. The decomposition of DPBF was then monitored by the absorbance measurements at 410 nm, using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, USA). The experiment was performed three times.

**Agarose Gel Retardation Assay.** In order to determine the siRNA binding ability to PMINPs, gel retardation assay was carried out. A fixed quantity (0.364  $\mu\text{g}$ ) of siCtrl was added to increasing amounts of PMINPs, in a way to have increasing weight ratios (from 1/3 to 1/30). The mixture was prepared in deionized water and incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 30 min for effective complex formation. After incubation, the siCtrl/PMINPs complex was mixed with xylene cyanol 0.25% and then electrophoresed on 2% (w/v) agarose gel containing GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Interchim, France), with running buffer Tris–Borate–EDTA 0.5 $\times$  pH 8.2 at 100 V for 30 min. siCtrl bands were visualized and photographed by an ultraviolet transilluminator (Infinity Gel documentation Imaging, Vilber Lourmat, France). The high binding capacity was expressed by a total retardation of siCtrl, as shown by the disappearance of siCtrl bands on the gel.

**Evaluation of the Stability of the siRNA/PMINPs Complexes.** In order to evaluate the stability of the siRNA/PMINPs complex, gel retardation assay was performed at different time points. A fixed amount of siCtrl (0.36  $\mu\text{g}$ ) was added to a fixed quantity of PMINPs (3.6  $\mu\text{g}$ ), in order to have a weight ratio of (1/10). The mixture was prepared in deionized water and incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 30 min, 1 h, 4 h, 6 h, 18 h, and 24 h, and then electrophoresed on 2% (w/v) agarose gel, as previously described.

**siRNA/PMINPs Complex Characterization.** Zeta potential and DLS measurements were performed using Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) at 25  $^{\circ}\text{C}$  and pH 7, using standard disposable cuvettes. Different weight ratios of siCtrl and PMINPs were prepared in deionized water and incubated for 30 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Three individual measurements were done immediately after siCtrl/PMINPs complex formation.

**Cellular Uptake Kinetics of PMINPs and siRNA/PMINPs Complexes.** MDA-MB-231 cells were seeded in a 96-well plate and then left to grow for 24 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Cells were treated with PMINPs (14  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) or with the complex siCtrl-ATTO-488/PMINPs (100 nM/14  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) at a weight ratio of 1/10 for different time intervals (1, 4, 6, 18, and 24 h). The cellular uptake of PMINPs and complexes was monitored by fluorescence intensity measurements, using CLARIOstar high-performance monochromator multimode microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). At the end of incubation time, total fluorescence was measured, and then, cells were washed three times with PBS and the remaining fluorescence was recorded. The results are expressed as a ratio of remaining fluorescence and total fluorescence RF/TF (%). Fluorescence intensities were corrected according to the total number of living cells in each well, determined by MTT assay as previously described.

**Imaging.** MDA-MB-231 cells were seeded into glass bottom 8-well tissue culture chambers (SARSTEDT, Germany), at a density of  $10^6$  cells  $\text{cm}^{-2}$  for 24 h. Then, cells were incubated for 4 h with 500  $\mu\text{L}$  culture medium containing complex siCtrl-ATTO-488 (100 nM)/PMINPs (14  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) using a weight ratio of 1/10, free-PMINPs,

free siCtrl-ATTO-488 (100 nM), and Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen, USA)/siCtrl-ATTO-488 as a positive control. Untreated cells were considered as a negative control. Twenty minutes prior to the end of incubation, cells were treated with CellMask Orange plasma membrane stain (Invitrogen, France) and Hoechst 33342 (Invitrogen, USA).<sup>65</sup> Then, cells were washed three times with culture medium before observation with a LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss, France). Cells were scanned at 800 nm for PMINPs, 488 nm for siCtrl-ATTO-488, 561 nm for CellMask, and 760 nm for Hoechst, using a high magnification (63 $\times$ /1.4 OIL Plan-Apo).

**Mechanism of the Cellular Uptake of PMINPs and siRNA/PMINPs Complexes.** As endocytosis is greatly temperature-dependent, we monitored the cellular uptake of PMINPs and the siRNA/PMINPs complexes in two different temperature conditions: 4 and 37  $^{\circ}\text{C}$ . MDA-MB-231 cells were seeded in two 96-well plates and then left to grow for 24 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . The first plate was treated with PMINPs (14  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) or with the complex siCtrl-ATTO-488/PMINPs (100 nM/14  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) for 4 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . The second plate was treated in the same way, but using cold medium (4  $^{\circ}\text{C}$ ), then left at 4  $^{\circ}\text{C}$  for 4 h. The cellular uptake of PMINPs and complexes was monitored by fluorescence intensity measurements, using CLARIOstar as previously described. The results are expressed as a percentage of RF/TF (%) at 4  $^{\circ}\text{C}$  compared to the RF/TF (%) at 37  $^{\circ}\text{C}$  (set as 100%). Fluorescence intensities were corrected according to the total number of living cells in each well, determined by MTT assay as previously described.

**One-Photon Induced siFluc Delivery and Cell Luciferase Assay.** Twenty four hours prior to transfection, MDA-MB-231-Luc-RFP cells were plated at a density of 3000 cells per well, into 96-well white plate, PS, F-bottom,  $\mu\text{CLEAR}$  (Greiner Bio-one, Germany). The siFluc/PMINPs complex was freshly prepared in serum-free cell culture medium for 30 min at 37  $^{\circ}\text{C}$  using different concentrations of siFluc (50, 100, and 200 nM) at a weight ratio of 1/10. Then, cells were treated (or not) with the siFluc/PMINPs complex for 4 h. After that, fetal bovine serum was added in each well to reach a 10% serum. After eight hours of incubation, cells were submitted to light irradiation at 545 nm for 5 min duration (11.3 J  $\text{cm}^{-2}$ ). The light beam was focused by a microscope objective lens (4 $\times$ /0.10). After 48 h of transfection, luciferase activity was evaluated by addition of D-luciferin (PerkinElmer, USA) at a final concentration of  $10^{-3}$  M. Cell luminescence was measured 10 min after, with a plate reader CLARIOstar. Lipofectamine was used as the positive control transfection reagent. Results are expressed as a percentage of luminescence activity of treated cells compared to the control cells (set as 100%). Luciferase activity was corrected according to the total number of living cells in each well, as determined by the MTT assay previously described.

The same procedure was performed using the blue light at (450–490 nm) for 5 min duration (2.6 J  $\text{cm}^{-2}$ ).

**Study of PCI and Endosomal Escape of the siRNA/PMINPs Complex by Confocal Microscopy.** MDA-MB-231 cells were seeded into glass bottom 96-well plate half area (CORNING, USA), at a density of  $10^6$  cells  $\text{cm}^{-2}$  for 24 h. Cells were then incubated with 100  $\mu\text{L}$  culture medium containing complex siCtrl (100 nM)/PMINPs (14  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) at a weight ratio of 1/10. Untreated cells were considered as a control. Eight hours later, cells were irradiated or not at 545 nm for 5 min (11.3 J  $\text{cm}^{-2}$ ). The light beam was focused by a microscope objective lens (4 $\times$ /0.10). After irradiation, cells were stained with LysoTracker Green DND-26 (Molecular Probes, USA) at a final concentration of 1  $\mu\text{M}$  for 2 h and 20 min before the end of incubation they stained with Hoechst 33342 at 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Thereafter, cells were washed three times with culture medium before observation with a LSM780 confocal microscope. Cells were scanned at 800 nm for the siCtrl/PMINPs complex, 488 nm for LysoTracker Green, and 760 nm for Hoechst, using high magnification (63 $\times$ /1.4 OIL Plan-Apo).

**Statistical Analysis.** Results were presented as mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism. The comparison between groups

was analyzed with Student's *t*-test. Differences were considered statistically significant when *p* values were less than 0.05. The level of significance was defined as ns (non-statistically significant), \* statistical significance difference (*p* < 0.05), \*\* (*p* < 0.005), \*\*\* (*p* < 0.0005), and \*\*\*\* (*p* < 0.0001).

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.1c05848>.

FT-IR spectra of PEG-silane 2000 and unpegylated and pegylated ionosilica nanoparticles (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

**Peter Hesemann** – ICGM, Univ Montpellier-CNRS-ENSCM, 34090 Montpellier, France; [orcid.org/0000-0001-5266-9791](https://orcid.org/0000-0001-5266-9791); Email: [peter.hesemann@umontpellier.fr](mailto:peter.hesemann@umontpellier.fr)

**Nadir Bettache** – IBMM, Univ Montpellier, CNRS, ENSCM; Avenue Charles Flahault, CEDEX 05, 34093 Montpellier, France; [orcid.org/0000-0001-5426-7024](https://orcid.org/0000-0001-5426-7024); Email: [nadir.bettache@umontpellier.fr](mailto:nadir.bettache@umontpellier.fr)

### Authors

**Braham Mezghrani** – IBMM, Univ Montpellier, CNRS, ENSCM; Avenue Charles Flahault, CEDEX 05, 34093 Montpellier, France; ICGM, Univ Montpellier-CNRS-ENSCM, 34090 Montpellier, France

**Lamiaa M. A. Ali** – IBMM, Univ Montpellier, CNRS, ENSCM; Avenue Charles Flahault, CEDEX 05, 34093 Montpellier, France; Department of Biochemistry, Medical Research Institute, University of Alexandria, Alexandria 21561, Egypt; [orcid.org/0000-0003-1176-5335](https://orcid.org/0000-0003-1176-5335)

**Sébastien Richeter** – ICGM, Univ Montpellier-CNRS-ENSCM, 34090 Montpellier, France

**Jean-Olivier Durand** – ICGM, Univ Montpellier-CNRS-ENSCM, 34090 Montpellier, France; [orcid.org/0000-0003-4606-2576](https://orcid.org/0000-0003-4606-2576)

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.1c05848>

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the “Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research” for the Ph.D. grant to B.M. and the Franco-Algerian steering committee for its support. We acknowledge the imaging facility MRI (Montpellier RIO Imaging) platform, member of the national infrastructure France Bio Imaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, “Investments for the future”) for confocal imaging facility access.

## ■ REFERENCES

- (1) Chen, Y.; Shi, J. Chemistry of Mesoporous Organosilica in Nanotechnology: Molecularly Organic–Inorganic Hybridization into Frameworks. *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 3235–3272.
- (2) Cheng, Y.; Jiao, X.; Fan, W.; Yang, Z.; Wen, Y.; Chen, X. Controllable Synthesis of Versatile Mesoporous Organosilica Nanoparticles as Precision Cancer Theranostics. *Biomaterials* **2020**, *256*, 120191.

- (3) Croissant, J. G.; Cattoën, X.; Wong Chi Man, M.; Durand, J.-O.; Khashab, N. M. Syntheses and Applications of Periodic Mesoporous Organosilica Nanoparticles. *Nanoscale* **2015**, *7*, 20318–20334.

- (4) Du, X.; Kleitz, F.; Li, X.; Huang, H.; Zhang, X.; Qiao, S. Z. Disulfide-Bridged Organosilica Frameworks: Designed, Synthesis, Redox-Triggered Biodegradation, and Nanobiomedical Applications. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1707325.

- (5) Du, X.; Li, X.; Xiong, L.; Zhang, X.; Kleitz, F.; Qiao, S. Z. Mesoporous Silica Nanoparticles with Organo-Bridged Silsesquioxane Framework as Innovative Platforms for Bioimaging and Therapeutic Agent Delivery. *Biomaterials* **2016**, *91*, 90–127.

- (6) Guimarães, R. S.; Rodrigues, C. F.; Moreira, A. F.; Correia, I. J. Overview of Stimuli-Responsive Mesoporous Organosilica Nanocarriers for Drug Delivery. *Pharmacol. Res.* **2020**, *155*, 104742.

- (7) Teng, Z.; Li, W.; Tang, Y.; Elzathary, A.; Lu, G.; Zhao, D. Mesoporous Organosilica Hollow Nanoparticles: Synthesis and Applications. *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1707612.

- (8) Yang, B.; Chen, Y.; Shi, J. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 4881–4985.

- (9) Chen, J.; Luo, H.; Liu, Y.; Zhang, W.; Li, H.; Luo, T.; Zhang, K.; Zhao, Y.; Liu, J. Oxygen-Self-Produced Nanoplatform for Relieving Hypoxia and Breaking Resistance to Sonodynamic Treatment of Pancreatic Cancer. *ACS Nano* **2017**, *11*, 12849–12862.

- (10) Li, L.; Yang, Z.; Fan, W.; He, L.; Cui, C.; Zou, J.; Tang, W.; Jacobson, O.; Wang, Z.; Niu, G.; Hu, S.; Chen, X. In Situ Polymerized Hollow Mesoporous Organosilica Biocatalysis Nanoreactor for Enhancing ROS-Mediated Anticancer Therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30*, 1907716.

- (11) Liu, W.; Tian, Y.; Zhang, Y.; Liu, K.; Zhao, S.; Zhang, J.; Su, Y.; Zhao, Y.; Tang, Y.; Sun, J.; Tian, W.; Song, L.; Teng, Z.; Wang, S.; Lu, G. Timely Coordinated Phototherapy Mediated by Mesoporous Organosilica Coated Triangular Gold Nanoprisms. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 3865–3875.

- (12) Yang, Z.; Fan, W.; Zou, J.; Tang, W.; Li, L.; He, L.; Shen, Z.; Wang, Z.; Jacobson, O.; Aronova, M. A.; Rong, P.; Song, J.; Wang, W.; Chen, X. Precision Cancer Theranostic Platform by In Situ Polymerization in Perylene Diimide-Hybridized Hollow Mesoporous Organosilica Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 14687–14698.

- (13) Yang, Z.; Wen, J.; Wang, Q.; Li, Y.; Zhao, Y.; Tian, Y.; Wang, X.; Cao, X.; Zhang, Y.; Lu, G.; Teng, Z.; Zhang, L. Sensitive, Real-Time, and In-Vivo Oxygen Monitoring for Photodynamic Therapy by Multifunctional Mesoporous Nanosensors. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 187–194.

- (14) Aggad, D.; Jimenez, C. M.; Dib, S.; Croissant, J. G.; Lichon, L.; Laurencin, D.; Richeter, S.; Maynadier, M.; Alsaïari, S. K.; Boufatit, M.; Raehm, L.; Garcia, M.; Khashab, N. M.; Gary-Bobo, M.; Durand, J.-O. Gemcitabine Delivery and Photodynamic Therapy in Cancer Cells via Porphyrin-Ethylene-Based Periodic Mesoporous Organosilica Nanoparticles. *ChemNanoMat* **2018**, *4*, 46–51.

- (15) Croissant, J. G.; Picard, S.; Aggad, D.; Klausen, M.; Mauriello Jimenez, C.; Maynadier, M.; Mongin, O.; Clermont, G.; Genin, E.; Cattoën, X.; Wong Chi Man, M.; Raehm, L.; Garcia, M.; Gary-Bobo, M.; Blanchard-Desce, M.; Durand, J.-O. Fluorescent Periodic Mesoporous Organosilica Nanoparticles Dual-Functionalized via Click Chemistry for Two-Photon Photodynamic Therapy in Cells. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 5567–5574.

- (16) Daurat, M.; Nguyen, C.; Dominguez Gil, S.; Sol, V.; Chaleix, V.; Charnay, C.; Raehm, L.; El Cheikh, K.; Morère, A.; Bernasconi, M.; Timpanaro, A.; Garcia, M.; Cunin, F.; Roessler, J.; Durand, J.-O.; Gary-Bobo, M. The Mannose 6-Phosphate Receptor Targeted with Porphyrin-Based Periodic Mesoporous Organosilica Nanoparticles for Rhabdomyosarcoma Theranostics. *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 3678–3684.

- (17) Jimenez, C. M.; Knezevic, N. Z.; Rubio, Y. G.; Szunerits, S.; Boukherroub, R.; Teodorescu, F.; Croissant, J. G.; Hocine, O.; Seric, M.; Raehm, L.; Stojanovic, V.; Aggad, D.; Maynadier, M.; Garcia, M.; Gary-Bobo, M.; Durand, J.-O. Nanodiamond–PMO for Two-Photon PDT and Drug Delivery. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 5803–5808.

- (18) Ekiner, G.; Nguyen, C.; Bayir, S.; Dominguez Gil, S.; İsci, Ü.; Daurat, M.; Godefroy, A.; Raehm, L.; Charnay, C.; Oliviero, E.; Ahsen, V.; Gary-Bobo, M.; Durand, J.-O.; Dumoulin, F. Phthalocyanine-Based Mesoporous Organosilica Nanoparticles: NIR Photodynamic Efficiency and siRNA Photochemical Internalization. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 11619–11622.
- (19) Mauriello Jimenez, C.; Aggad, D.; Croissant, J. G.; Tresfield, K.; Laurencin, D.; Berthomieu, D.; Cubedo, N.; Rossel, M.; Alsaia, S.; Anjum, D. H.; Sougrat, R.; Roldan-Gutierrez, M. A.; Richeter, S.; Oliviero, E.; Raehm, L.; Charnay, C.; Cattoën, X.; Clément, S.; Wong Chi Man, M.; Maynadier, M.; Chaleix, V.; Sol, V.; Garcia, M.; Gary-Bobo, M.; Khashab, N. M.; Bettache, N.; Durand, J.-O. Porous Porphyrin-Based Organosilica Nanoparticles for NIR Two-Photon Photodynamic Therapy and Gene Delivery in Zebrafish. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1800235.
- (20) Thach, U. D.; Trens, P.; Prelot, B.; Zajac, J.; Hesemann, P. Tuning the Interfacial Properties of Mesoporous Ionosilicas: Effect of Cationic Precursor and Counter Anion. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 27412–27421.
- (21) Bouchal, R.; Daurat, M.; Gary-Bobo, M.; Da Silva, A.; Lesaffre, L.; Aggad, D.; Godefroy, A.; Dieudonné, P.; Charnay, C.; Durand, J.-O.; Hesemann, P. Biocompatible Periodic Mesoporous Ionosilica Nanoparticles with Ammonium Walls: Application to Drug Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 32018–32025.
- (22) Daurat, M.; Rahmani, S.; Bouchal, R.; Akrouf, A.; Budimir, J.; Nguyen, C.; Charnay, C.; Guari, Y.; Richeter, S.; Raehm, L.; Bettache, N.; Gary-Bobo, M.; Durand, J. O.; Hesemann, P. Organosilica Nanoparticles for Gemcitabine Monophosphate Delivery in Cancer Cells. *ChemNanoMat* **2019**, *5*, 888–896.
- (23) Thach, U. D.; Prelot, B.; Pellet-Rostaing, S.; Zajac, J.; Hesemann, P. Surface Properties and Chemical Constitution as Crucial Parameters for the Sorption Properties of Ionosilicas: The Case of Chromate Adsorption. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, *1*, 2076–2087.
- (24) Bono, N.; Ponti, F.; Mantovani, D.; Candiani, G. Non-Viral in Vitro Gene Delivery: It is Now Time to Set the Bar! *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 183.
- (25) Patil, S.; Gao, Y. G.; Lin, X.; Li, Y.; Dang, K.; Tian, Y.; Zhang, W. J.; Jiang, S. F.; Qadir, A.; Qian, A. R. The Development of Functional Non-Viral Vectors for Gene Delivery. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5491.
- (26) Akki, R. A. Review Article on Gene Therapy. *J. Drug Delivery Ther.* **2019**, *9*, 688–692.
- (27) Wojnilowicz, M.; Glab, A.; Bertucci, A.; Caruso, F.; Cavalieri, F. Super-resolution Imaging of Proton Sponge-Triggered Rupture of Endosomes and Cytosolic Release of Small Interfering RNA. *ACS Nano* **2019**, *13*, 187–202.
- (28) Hoffmann, M.; Hersch, N.; Merkel, R.; Csiszar, A.; Hoffmann, B. Changing the Way of Entrance: Highly Efficient Transfer of mRNA and siRNA via Fusogenic Nano-Carriers. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2019**, *15*, 170–183.
- (29) Boe, S. L.; Hovig, E. Enhancing Nucleic Acid Delivery by Photochemical Internalization. *Ther. Delivery* **2013**, *4*, 1125–1140.
- (30) Berg, K.; Selbo, P. K.; Prasmickaite, L.; Tjelle, T. E.; Sandvig, K.; Moan, J.; Gaudernack, G.; Fodstad, O.; Kjølsvrud, S.; Anholt, H.; Rodal, G. H.; Rodal, S. K.; Høgstet, A. Photochemical Internalization: a Novel Technology for Delivery of Macromolecules into Cytosol. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1180.
- (31) El Hankari, S.; Motos-Pérez, B.; Hesemann, P.; Bouhaouss, A.; Moreau, J. J. E. Pore Size Control and Organocatalytic Properties of Nanostructured Silica Hybrid Materials Containing Amino and Ammonium Groups. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 6948–6955.
- (32) Nguyen, T. P.; Hesemann, P.; Linh Tran, T. M.; Moreau, J. J. E. Nanostructured Polysilsesquioxanes Bearing Amine and Ammonium Groups by Micelle Templating using Anionic Surfactants. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 3910–3917.
- (33) Lerouge, F.; Carveau, G.; Corriu, R. J. P.; Stern, C.; Guillard, R. Self-Organization of Porphyrin Units Induced by Magnetic Field during Sol–Gel Polymerization. *Chem. Commun.* **2007**, *15*, 1553–1555.
- (34) Talamini, L.; Picchetti, P.; Ferreira, L. M.; Sitia, G.; Russo, L.; Violatto, M. B.; Travaglini, L.; Fernandez Alarcon, J.; Righelli, L.; Bigini, P.; De Cola, L. Organosilica Cages Target Hepatic Sinusoidal Endothelial Cells Avoiding Macrophage Filtering. *ACS Nano* **2021**, DOI: 10.1021/acsnano.1c00316.
- (35) Aggarwal, P.; Hall, J. B.; McLeland, C. B.; Dobrovolskaia, M. A.; McNeil, S. E. Nanoparticle Interaction with Plasma Proteins as it relates to Particle Biodistribution, Biocompatibility and Therapeutic Efficacy. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 428–437.
- (36) Mahmoudi, M.; Lynch, I.; Ejtehadi, M. R.; Monopoli, M. P.; Bombelli, F. B.; Laurent, S. Protein-Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5610–5637.
- (37) Llewellyn, P.; Rouquerol, F. 13-Adsorption by Ordered Mesoporous Materials. In *Adsorption by Powders and Porous Solids*, 2nd ed.; Rouquerol, J., Sing, K. S. W., Llewellyn, P., Maurin, G., Eds.; Academic Press: Oxford, 2014, pp 529–564.
- (38) Laurencin, D.; Yot, P. G.; Gervais, C.; Guari, Y.; Clement, S.; Elkaim, E.; Paillet, M.; Cot, D.; Richeter, S. Synthesis, Characterization and Modeling of Self-Assembled Porphyrin Nanorods. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2019**, *23*, 1346–1354.
- (39) Fagadar-Cosma, E.; Enache, C.; Vlascici, D.; Fagadar-Cosma, G.; Stadler, H.; Bazylak, G. Nanostructured Glasses Based on Hybrid Silica Materials Incorporating a New Asymmetrical Phenyl-Substituted Porphyrin. *Open Chem. Biomed. Methods J.* **2009**, *2*, 99–106.
- (40) Chen, X.; Zhong, Z.; Xu, Z.; Chen, L.; Wang, Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a Fluorescent Probe for Reactive Oxygen Species Measurement: Forty Years of Application and Controversy. *Free Radical Res.* **2010**, *44*, 587–604.
- (41) Wang, H.; Yang, X.; Shao, W.; Chen, S.; Xie, J.; Zhang, X.; Wang, J.; Xie, Y. Ultrathin Black Phosphorus Nanosheets for Efficient Singlet Oxygen Generation. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11376–11382.
- (42) Espinoza, C.; Trigos, Á.; Medina, M. E. Theoretical Study on the Photosensitizer Mechanism of Phenalenone in Aqueous and Lipid Media. *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120*, 6103–6110.
- (43) Fan, W.; Huang, P.; Chen, X. Overcoming the Achilles' Heel of Photodynamic Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 6488–6519.
- (44) Park, J.; Jiang, Q.; Feng, D.; Mao, L.; Zhou, H.-C. Size-Controlled Synthesis of Porphyrinic Metal-Organic Framework and Functionalization for Targeted Photodynamic Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3518–3525.
- (45) Liang, X.; Chen, M.; Bhattarai, P.; Hameed, S.; Dai, Z. Perfluorocarbon@Porphyrin Nanoparticles for Tumor Hypoxia Relief to Enhance Photodynamic Therapy against Liver Metastasis of Colon Cancer. *ACS Nano* **2020**, *14*, 13569–13583.
- (46) Sun, Y.; Chen, Z. L.; Yang, X. X.; Huang, P.; Zhou, X. P.; Du, X. X. Magnetic Chitosan Nanoparticles as a Drug Delivery System for Targeting Photodynamic Therapy. *Nanotechnology* **2009**, *20*, 135102.
- (47) Dib, S.; Aggad, D.; Mauriello Jimenez, C.; Lakrafi, A.; Hery, G.; Nguyen, C.; Durand, D.; Morère, A.; El Cheikh, K.; Sol, V.; Chaleix, V.; Dominguez Gil, S.; Bouchmella, K.; Raehm, L.; Durand, J. O.; Boufatit, M.; Cattoën, X.; Wong Chi Man, M.; Bettache, N.; Gary-Bobo, M. Porphyrin-based Bridged Silsesquioxane Nanoparticles for Targeted Two-Photon Photodynamic Therapy of Zebrafish Xenografted with Human Tumor. *Cancer Rep.* **2019**, *2*, 1186.
- (48) Tu, H.-L.; Lin, Y.-S.; Lin, H.-Y.; Hung, Y.; Lo, L.-W.; Chen, Y.-F.; Mou, C.-Y. Vitro Studies of Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 172.
- (49) Qian, J.; Gharibi, A.; He, S. L. Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles with Protoporphyrin IX encapsulated for Photodynamic Therapy. *J. Biomed. Opt.* **2009**, *14*, 014012.
- (50) Liang, X.; Xie, Y. H.; Wu, J. X.; Wang, J.; Petkovic, M.; Stepic, M.; Zhao, J. Z.; Ma, J.; Mi, L. Functional Titanium Dioxide Nanoparticle Conjugated with Phthalocyanine and Folic Acid as a promising Photosensitizer for Targeted Photodynamic Therapy In Vitro and In Vivo. *J. Photochem. Photobiol., B* **2021**, *215*, 112122.

- (51) Zhao, B.; Yin, J.-J.; Bilski, P. J.; Chignell, C. F.; Roberts, J. E.; He, Y.-Y. Enhanced Photodynamic Efficacy towards Melanoma Cells by Encapsulation of Pc4 in Silica Nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *241*, 163–172.
- (52) Huang, P.; Li, Z.; Lin, J.; Yang, D.; Gao, G.; Xu, C.; Bao, L.; Zhang, C.; Wang, K.; Song, H.; Hu, H. Y.; Cui, D. X. Photosensitizer-Conjugated Magnetic Nanoparticles for In Vivo Simultaneous Magneto-fluorescent Imaging and Targeting Therapy. *Biomaterials* **2011**, *32*, 3447–3458.
- (53) Huang, P.; Xu, C.; Lin, J.; Wang, C.; Wang, X.; Zhang, C.; Zhou, X.; Guo, S.; Cui, D. Folic Acid-conjugated Graphene Oxide Loaded with Photosensitizers for Targeting Photodynamic Therapy. *Theranostics* **2011**, *1*, 240–250.
- (54) Kim, J.; Cho, H. R.; Jeon, H.; Kim, D.; Song, C.; Lee, N.; Choi, S. H.; Hyeon, T. Continuous O-2-Evolving MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticle-Anchored Mesoporous Silica Nanoparticles for Efficient Photodynamic Therapy in Hypoxic Cancer. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10992–10995.
- (55) Li, J.; Guo, D.; Wang, X.; Wang, H.; Jiang, H.; Chen, B. The Photodynamic Effect of Different Size ZnO Nanoparticles on Cancer Cell Proliferation In Vitro. *Nanoscale Res. Lett.* **2010**, *5*, 1063–1071.
- (56) Mao, S.; Germershaus, O.; Fischer, D.; Linn, T.; Schnepf, R.; Kissel, T. Uptake and Transport of PEG-graft-Trimethyl-Chitosan Copolymer-Insulin Nanocomplexes by Epithelial Cells. *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 2058–2068.
- (57) Chang, C.-C.; Wu, M.; Yuan, F. Role of Specific Endocytic Pathways in Electroporation of Cells. *Mol. Ther.–Methods Clin. Dev.* **2014**, *1*, 14058.
- (58) Kanasty, R. L.; Whitehead, K. A.; Vegas, A. J.; Anderson, D. G. Action and Reaction: the Biological Response to siRNA and its Delivery Vehicles. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 513–524.
- (59) Selbo, P. K.; Weyergang, A.; Høgstet, A.; Norum, O.-J.; Berstad, M. B.; Vikdal, M.; Berg, K. Photochemical Internalization provides Time- and Space-Controlled Endolysosomal Escape of Therapeutic Molecules. *J. Controlled Release* **2010**, *148*, 2–12.
- (60) Bouchal, R.; Miletto, I.; Thach, U. D.; Prelot, B.; Berlier, G.; Hesemann, P. Ionosilicas as efficient adsorbents for the separation of diclofenac and sulindac from aqueous media. *New J. Chem.* **2016**, *40*, 7620–7626.
- (61) Thach, U. D.; Hesemann, P.; Yang, G.; Geneste, A.; Le Caër, S.; Prelot, B. Ionosilicas as efficient sorbents for anionic contaminants: Radiolytic stability and ion capacity. *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *482*, 233–239.
- (62) Thach, U. D.; Prelot, B.; Hesemann, P. Design of ionosilicas: Tailoring ionosilicas for the efficient adsorption of p-aminosalicylate. *Sep. Purif. Technol.* **2018**, *196*, 217–223.
- (63) Ali, L. M. A.; Mathlouthi, E.; Cahu, M.; Sene, S.; Daurat, M.; Long, J.; Guari, Y.; Salles, F.; Chopineau, J.; Devoisselle, J.-M.; Larionova, J.; Gary-Bobo, M. Synergic effect of doxorubicin release and two-photon irradiation of Mn<sup>2+</sup>-doped Prussian blue nanoparticles on cancer therapy. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 2646–2649.
- (64) Seisenbaeva, G. A.; Ali, L. M. A.; Vardanyan, A.; Gary-Bobo, M.; Budnyak, T. M.; Kessler, V. G.; Durand, J. O. Mesoporous silica adsorbents modified with amino polycarboxylate ligands-functional characteristics, health and environmental effects. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *406*, 124698.
- (65) Ali, L. M. A.; Simon, M.; El Cheikh, K.; Aguesseau-Kondrotas, J.; Godefroy, A.; Nguyen, C.; Garcia, M.; Morère, A.; Gary-Bobo, M.; Maillard, L. Topological Requirements for Cl-M6PR-Mediated Cell Uptake. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 2533–2538.

