

Nanoparticules et vectorisation de médicaments

Matériel et méthodes

Introduction

Notre étude modèle pour la délivrance de médicaments s'articule autour de trois axes majeurs : la synthèse chimique des nanoparticules et le chargement du fluorophore (qui joue le rôle de principe actif), la caractérisation physico-chimique des particules (mesure de la taille des particules synthétisées, estimation de l'efficacité d'encapsulation, étude cinétique du relargage du fluorophore) et enfin les tests biologiques d'internalisation dans des cellules animales. Ce document rassemble les protocoles et matériels scientifiques utilisés au cours de nos expériences. Les manipulations décrites sont effectuées avec une blouse attachée, des lunettes et gants de protection.

I- Synthèse chimique des nanoparticules

On choisit dans notre étude d'évaluer l'influence de divers paramètres sur l'efficacité d'internalisation par les cellules. La taille des nanoparticules, leur composition chimique et l'existence ou non d'un greffage covalent entre le matériau et le fluorophore sont les variables de travail retenues. Ce paragraphe explicite les trois protocoles suivis lors des manipulations, chacun associé à un type spécifique de nanoparticule.

Particules de silice pleine 200 nm et 400 nm

La synthèse « one-pot » s'effectue à température ambiante (condensation de Stöber en milieu basique). Le tableau suivant rassemble les réactifs nécessaires à la manipulation (Sigma-Aldrich):

Réactifs	Silice 200 nm	Silice 400 nm
TEOS (TETRAETHYL ORTHOSILICATE, >= 99.0 % GC) 	7,6 ml	7,0 ml
Ethanol absolu (ETHANOL ABSOLUTE, FOR HPLC, =99.8%)	200 ml	200 ml
Fluorescéine – FITC (FLUORESCEIN ISOTHIOCYANATE ISOMER I, >=9)	~20 mg	~20 mg
Eau ultrapure	6 ml	11 ml
Solution d'ammoniaque (28% AMMONIUM HYDROXIDE SOLUTION) 	8,7 ml	14,3 ml
APTES	12 µl	12 µl

Les mélanges décrits ci-dessus sont mis sous agitation pendant 48 heures. Les béchers de 400 ml sièges des réactions sont recouverts de parafilm et placés sous une hotte aspirante. Le mélange équimolaire FITC-APTES permet de fonctionnaliser les nanoparticules et de greffer le fluorophore au matériau silice de manière covalente. Il est obtenu en mélangeant dans un pilulier 6 ml d'éthanol, 21,5 mg de FITC et 12 µl d'APTES, entouré de papier aluminium (pour préserver la fluorophore de la dégradation par les rayons UV) sous agitation pendant 24 heures. On récupère le produit synthétisé par centrifugation (5000 tours par minutes par cycles de 15 minutes avec redispersion préalable dans 40 ml d'éthanol) et séchage à température ambiante sur la paillasse.

Particules de silice mésoporeuse

La réaction se déroule également à température ambiante. On ajoute un surfactant au mélange (CTAB) permettant de créer les pores du matériau après calcination. Le tableau suivant regroupe les réactifs utiles, à l'exception du fluorophore et de l'APTES dont les quantités ne varient pas entre les expériences.

Réactifs	Silice mésoporeuse
TEOS (98%) 	19,15 ml
Ethanol absolu	100 ml
CTAB (HEXADECYLTRIMETHYLAMMONIUM) 	3,125 g
Eau ultrapure	70,35 ml

Solution d'ammoniaque (28%) 	16,85 ml
--	----------

L'éthanol, l'eau ultrapure et l'ammoniac sont introduits dans un bécher de 400 ml. Le CTAB est ajouté et le mélange est mis sous agitation pendant 15 minutes. Le TEOS est ajouté goutte à goutte pendant approximativement deux heures à l'aide d'une ampoule de coulée. Le produit est filtré sur Büchner puis lavé à l'éthanol avant d'être laissé à sécher pendant une nuit. Le surfactant est ensuite calciné dans un four à 800 °C pendant 3 heures. On charge la silice mésoporeuse, avec de la fluorescéine dans l'eau, ou en fonctionnalisant avec le mélange FITC-APTES décrit plus haut, après l'étape de calcination.

Particules en coques de polymère

On synthétise des particules en polycaprolactone (PCL) par double émulsion (eau dans huile dans eau) à l'aide d'un Ultra-Turrax, un disperseur permettant une agitation ultra-rapide du mélange. Le tableau suivant explicite les réactifs nécessaires à la manipulation.

Réactifs	Coque en polymère
PVA (POLYVINYL ALCOHOL 4-88, 31'000, 1%)	50 ml (solution à 0,5%)
PCL (POLYCAPROLACTONE, AVERAGE MN CA. 10,000)	1 g
Dichlorométhane 	4 ml
Eau distillée	1 ml

20 mg de molécule active (fluorescéine) sont dissous dans 1 ml d'eau distillée. 0,5 ml de cette solution est prélevé et introduit dans une phase organique composée de 1 g de PCL dissous dans 4 ml de dichlorométhane. La solution est une première fois agitée à l'aide de l'Ultra-Turrax (avec un encadrant dans un laboratoire de l'UMR CIB), à 16 000 tours par minute pendant 15 minutes. La tige du disperseur doit être baignée dans un volume suffisant de solution, une verrerie à col long est donc utilisée pour la première émulsion. Celle-ci est ensuite transférée dans une phase aqueuse de 50 ml de solution de PVA à 0,5 %, et agitée à 21 500 tours par minute pendant 15 minutes. La manipulation avec le disperseur s'effectue sous hotte, dans un bain de glace afin d'éviter l'évaporation du dichlorométhane et la formation d'agrégats qui ferait perdre les effets de la sonification. La tige de l'appareil est lavée à la fin de la manipulation au savon, puis avec une petite cuve remplie d'éthanol. La phase organique est séchée à l'évaporateur rotatif. Un culot est formé au fond du ballon, et prélevé et dispersé dans l'éthanol pour les tests cellulaires.

II- Caractérisation physique des nanoparticules

On réalise différentes mesures sur les particules synthétisées, afin de connaître précisément leurs caractéristiques physiques avant les tests d'internalisation cellulaire.

Détermination du diamètre des nanoparticules

On utilise un appareil DLS (Dynamic Light Scattering), au SIMM, pour déterminer la taille des objets synthétisés par diffusion quasi-élastique de la lumière. Le dispersant utilisé dans nos manipulations est le solvant dans lequel baigne les particules, i.e. l'éthanol dans la majorité des cas. Des mesures sont effectuées régulièrement pour évaluer la stabilité des solutions, la croissance des particules et leur agrégation au cours du temps.

Détermination de la porosité de la silice mésoporeuse

On effectue un BET avec l'aide d'une chercheuse dans le laboratoire de matériaux cristallisés afin de déterminer le volume total des pores du matériau par adsorption de l'azote.

Détermination de l'efficacité d'encapsulation du fluorophore

On cherche dans le cas des particules de silice pleine à estimer le taux d'encapsulation de molécule active, donnée indispensable dans une étude modèle de « drug delivery ». On réalise d'abord une courbe d'étalonnage de la fluorescence pour mesurer l'efficacité de chargement des capsules par méthode directe. Les nanoparticules de silice sont dégradées à l'aide d'une solution de soude à 10 % en masse (expérimentalement 10,8 %). On garde cette proportion constante pour les manipulations sur les étalons et les échantillons, car la fluorescence varie en fonction du pH de la solution. 2,5 mg de fluorescéine sont dissous dans 100 ml de soude à 10,8 % pour constituer une solution mère à 20,4 mg.L⁻¹, et on réalise la gamme étalon suivante dans des cuves à spectroscopie de fluorescence de contenance 3 ml :

Concentration en fluorophore (mg.L ⁻¹)	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8	1
--	-----	-----	-----	-----	-----	---

Les mesures de fluorescence sont réalisées au LPEM avec l'accord d'un chercheur.

Ex	495 nm
Start	470 nm
Stop	650 nm
Step	1,00 nm
Dwell	0,200 s
Iris	100
Ex BW	1,20
Em BW	1,20
Ex Corr	Off
Ref Corr	On
Em Corr	On

On utilise un spectromètre à fluorescence en mode émission avec une longueur d'onde d'excitation à 495 nm (correspondant à l'absorption de la fluorescéine). Les maxima d'émission sont observés aux alentours de 520 nm. On conserve les réglages ci-contre constants pour toutes les mesures, afin de comparer fidèlement étalons et échantillons :

Etude cinétique du relargage du fluorophore

On cherche à estimer la quantité de molécule active relâchée en milieu aqueux au cours du temps, afin de mimer le transport du cargo dans l'organisme. On réalise différentes solutions aqueuses contenant des particules de types variés, de concentrations égales à 0,17 g.L⁻¹. Des spectres de fluorescence sont réalisés à intervalles de temps réguliers pour suivre la dégradation des enveloppes de silice pleine et le relargage du fluorophore en solution.

III- Internalisation cellulaire

On travaille avec des cellules adhérentes de fibroblastes de souris (lignée L929). Les plaques 6-puits contiennent 2 ml de milieu de culture (mélange de 45 ml de « Dulbecco's modified eagle's medium » et 5 ml d'antibiotiques). On disperse les nanoparticules dans les puits, environ 0,01 g de produit dans 10 ml de milieu de culture, en gardant un contrôle sur chaque plaque. Les cellules sont incubées à 36,7 °C. Le milieu de culture est enlevé 18h plus tard, les puits sont rincés au PBS une fois, puis une solution de PFA à 4% est ajoutée (permettant de fixer les cellules). Le PFA est enlevé 3 jours plus tard, les puits sont rincés au PBS à 1 %. 1 ml de PBS avec surfactant est ajouté dans chaque puits pour assouplir la membrane. Le surnageant est retiré après 10 minutes. 1 ml de DAPI est ajouté dans chaque puits (marqueur fluorescent bleu des noyaux cellulaires). Le surnageant est enlevé après 10 minutes. Les puits sont rincés 3 fois au PBS à 1 %.

Bibliographie sélective

- [1] Long-term fate of silica nanoparticles interacting with human dermal fibroblasts, Elsevier
Sandrine Quignard, Gervaise Mosser, Michel Boissière, Thibaud Coradin
UPMC Univ Paris06, CNRS, Chimie de la Matière Condensée de Paris, Collège de France, F-75005 Paris, France
Laboratoire ERRMECe EA1391, Institut des Matériaux, Université de Cergy-Pontoise, F-95302 Pontoise, France
- [2] Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell, Chem Soc Rev
Shahed Behzadi, Vahid Serpooshan, Wei Tao, Majd A. Hamaly, Mahmoud Y. Alkawareek, Erik C. Dreaden, Dennis Brown, Alaaldin M. Alkilany, Omid C. Farokhzad and Morteza Mahmoudi
- [3] Naveed Ahmed. Elaboration of nanoparticles for theranostic applications : In vivo imaging and drug delivery. Human health and pathology. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. English. ffNNT : 2012LYO10128ff. fftel-00980587f
- [4] I. Vazquez, Naiara & González, Zoilo & Ferrari, Begona & Castro, Y. (2017). Synthesis of mesoporous silica nanoparticles by sol-gel as nanocontainer for future drug delivery applications. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio. 56. 10.1016/j.bsecv.2017.03.002.

